

Manual de instruções

RGeasy

Sumário

1 Introdução	2
2 Acesso ao banco de dados	3
3 Registro de Novas Espécies	5
3.1 Registro de uma única espécie	5
3.2 Registro de mais de uma espécie	9

1 Introdução

Bem-vindo ao RGeasy!

Este manual é um guia tanto para pesquisadores que buscam genes de referência validados, para análise de expressão gênica via RT-qPCR, como para aqueles que desejam registrar espécies (animal, vegetal e microrganismo), utilizadas em seus estudos de validação de genes de referência (Figura 1). Por meio do uso dessa ferramenta, o acesso e o desenvolvimento da pesquisa são simplificados, por proporcionar maior divulgação de dados, reduzir o uso de recursos financeiros e diminuir o tempo necessário para o desenvolvimento de cada estudo. Além disso, pela maior visibilidade dos estudos cadastrados no RGeasy, eles poderão ser mais citados que o usualmente, como explanado no decorrer do manual.

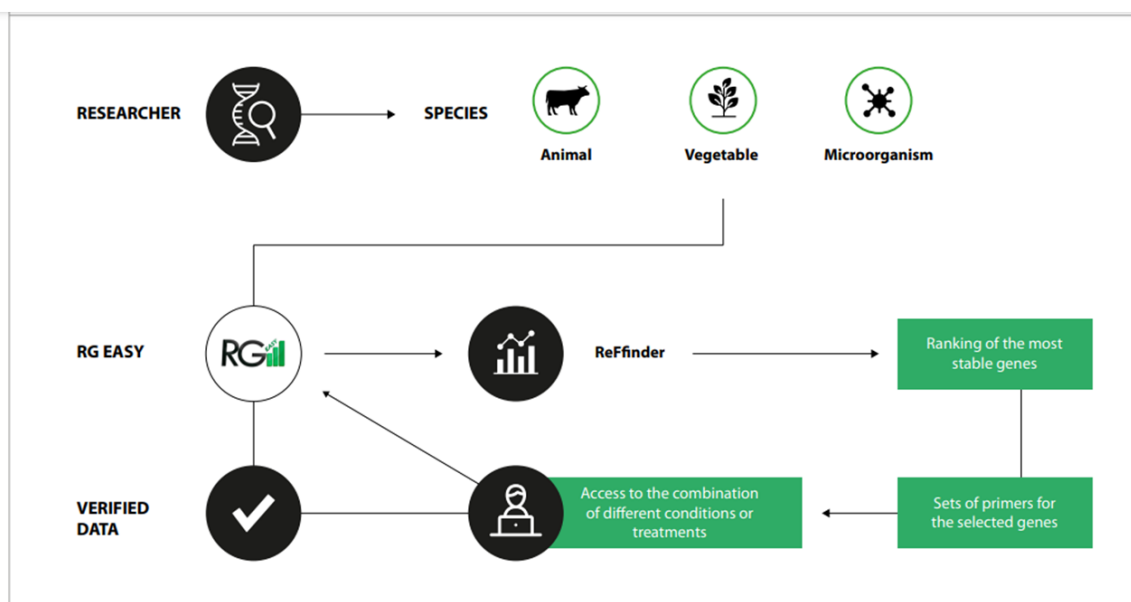


Figura 1- Manutenção e fluxo de trabalho do RGeasy. A partir do cadastro de espécies de animais, vegetais ou microrganismos, os pesquisadores disponibilizaram ao RGeasy dados, como os valores de Cq's, que são imediatamente verificados. A partir daí, são disponibilizadas ao público todas as combinações de condições/tratamentos possíveis para cada estudo. A nova combinação de tratamentos é ranqueada pelo ReFinder (XIE et al., 2012), e o RGeasy fornece, além do ranking com os genes de referência, um conjunto de *primers* validados para cada gene.

2 Acesso ao banco de dados

Ao utilizar o RGeasy, o usuário tem acesso às espécies registradas, clicando em “Species” na barra de navegação localizada na parte superior (Figura 2).

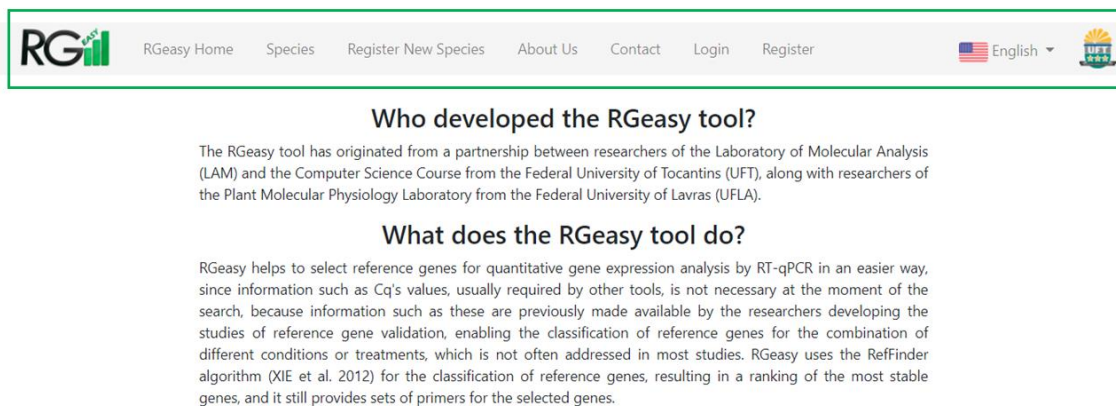


Figura 2- Interface gráfica inicial.

As espécies são separadas em três categorias: Animal, Plantas e Microrganismo (Figura 3). Ao clicar na espécie de interesse, são exibidos, automaticamente, todos os estudos de validação de genes de referência cadastrados. Nessa interface, o usuário tem acesso a cada estudo, clicando em seu nome e, abaixo de cada artigo, são exibidas as amostras analisadas.

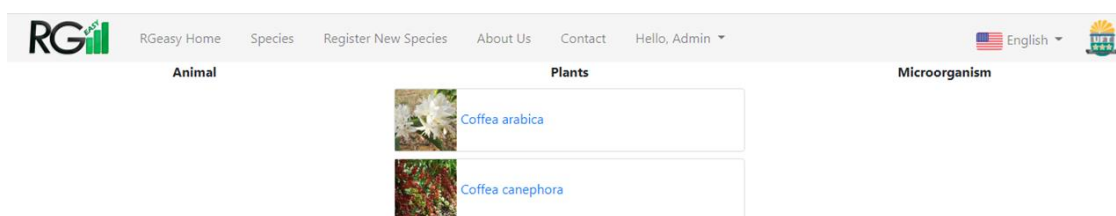
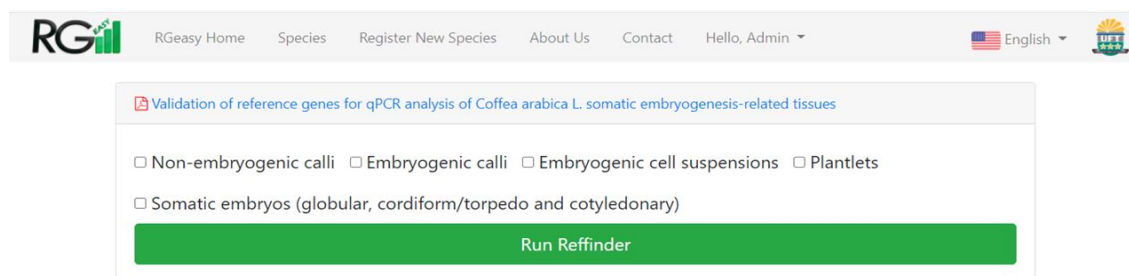


Figura 3- Categorias de espécies no RGeasy.

Para definir a combinação de tratamentos ou condições desejadas, o usuário deve selecionar as amostras de interesse, clicando no ícone ao seu lado (Figura 4). O resultado é exibido, instantaneamente, ao se clicar em “Run RefFinder”.



Validation of reference genes for qPCR analysis of *Coffea arabica* L. somatic embryogenesis-related tissues

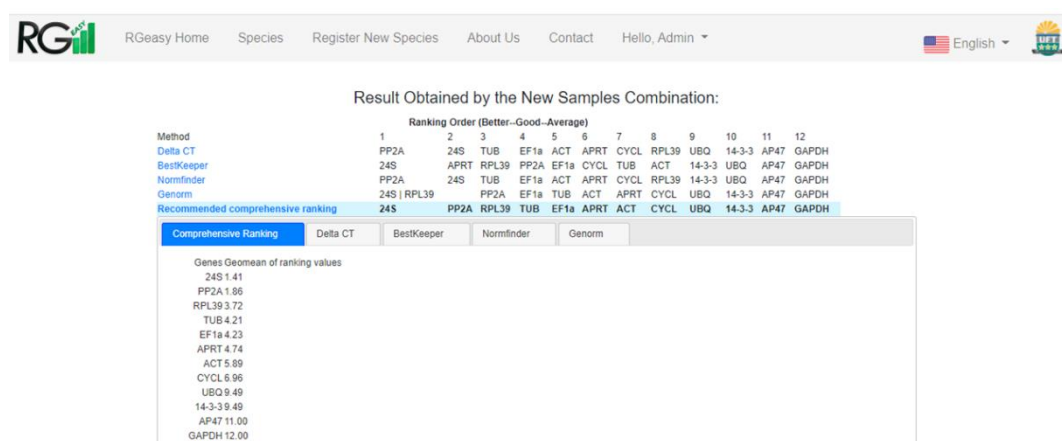
☐ Non-embryogenic calli
 ☐ Embryogenic calli
 ☐ Embryogenic cell suspensions
 ☐ Plantlets

☐ Somatic embryos (globular, cordiform/torpedo and cotyledonary)

Run Reffinder

Figura 4- Amostras analisadas no estudo intitulado “Validation of reference genes for qPCR analysis of *Coffea arabica* L. somatic embryogenesis-related tissues” de Freitas et al. (2017).

Como o RGeasy emprega a ferramenta do RefFinder, para a análise de estabilidade dos genes de referência, na página de resultados, é gerada uma tabela com o ranking dos genes, segundo os algoritmos: RefFinder, Delta CT, Bestkeeper, Normfinder e, por fim, Genorm (Figura 5).



Result Obtained by the New Samples Combination:

Method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Delta CT	PP2A	24S	TUB	EF1a	ACT	APRT	CYCL	RPL39	UBQ	14-3-3	AP47	GAPDH
BestKeeper	24S	APRT	RPL39	PP2A	EF1a	CYCL	TUB	ACT	14-3-3	UBQ	AP47	GAPDH
Normfinder	PP2A	24S	TUB	EF1a	ACT	APRT	CYCL	RPL39	14-3-3	UBQ	AP47	GAPDH
Genorm	24S	RPL39	PP2A	EF1a	TUB	ACT	APRT	CYCL	UBQ	14-3-3	AP47	GAPDH
Recommended comprehensive ranking	24S	PP2A	RPL39	TUB	EF1a	APRT	ACT	CYCL	UBQ	14-3-3	AP47	GAPDH

Comprehensive Ranking

Genes Geomean of ranking values

24S 1.41
 PP2A 1.86
 RPL39 3.72
 TUB 4.21
 EF1a 4.23
 APRT 4.74
 ACT 5.09
 CYCL 5.96
 UBQ 9.49
 14-3-3 9.49
 AP47 11.00
 GAPDH 12.00

Figura 5- Resultado gerado no RGeasy para diferentes amostras analisadas por Freitas et al. (2017).

Ainda, na página dos resultados, o RGeasy fornece um quadro com informações gerais, para cada um dos genes, de acordo com o ranking de estabilidade fornecido pelo RefFinder. Para cada gene, é disponibilizado o par de *primers*, o coeficiente de correlação (R^2), eficiência (e^*), número de acesso e o banco em que a sequência foi selecionada (Figura 6).

Gene: UBQ			Gene: PSAB		
Primer Sequence (Forward)		Primer Sequence (Reverse)	Primer Sequence (Forward)		Primer Sequence (Reverse)
TTTCCTGGCGTGGGTATTG		CGGGTTTATCTCTCCAACGAAT	TTTCCTGGCGTGGGTATTG		CGGGTTTATCTCTCCAACGAAT
R2	e*	Accession n	R2	e*	Accession n
0.99276	95.0	DV686961.1	0.9923	92.0	GT648763.1
Bank			Bank		
GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI)			GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI)		

Figura 6- Representação das informações gerais disponibilizadas pelo RGeasy, para dois genes de referência, Ubiquitin (UBQ) e photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 (PSAB), presentes no banco de dados do RGeasy.

Ao selecionar genes de referência, utilizando a ferramenta RGeasy, é imprescindível incluir, na seção Materiais e Métodos do artigo do usuário, a forma correta de citação do RGeasy, que é única, de acordo com a pesquisa que está sendo desenvolvida (Figura 7)

How to Cite

The RGeasy tool (citation soon) was used for the selection of reference genes through a new combination of treatments, obtained from the study developed by Freitas, et al. (2017) and ranked by the RefFinder (XIE et al., 2012) tool.

References:

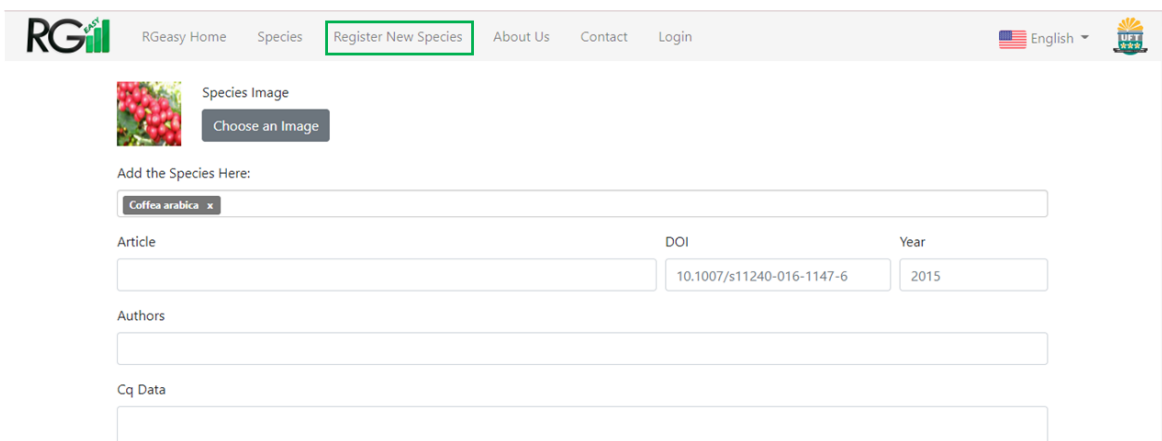
- [Reference Genes Easy](#)
- [RefFinder](#)
- [Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-related tissues](#)

Figura 7- Como citar o RGeasy tool disponibilizada ao final da página de resultados.

3 Registro de Novas Espécies

3.1 Registro de uma única espécie

Para o registro de novas espécies, o usuário deve clicar em “Register New Species”, localizado na barra de navegação (Figura 8). Em seguida, o usuário deve adicionar uma imagem que melhor represente a espécie que está sendo cadastrada. Posteriormente, deve-se adicionar o nome científico da espécie, assim como o nome do artigo, DOI, ano de publicação, autores e os valores de Cq's (Figura 8).



RG^{easy} RGeasy Home Species **Register New Species** About Us Contact Login English

Species Image
Choose an Image

Add the Species Here:
Coffea arabica x

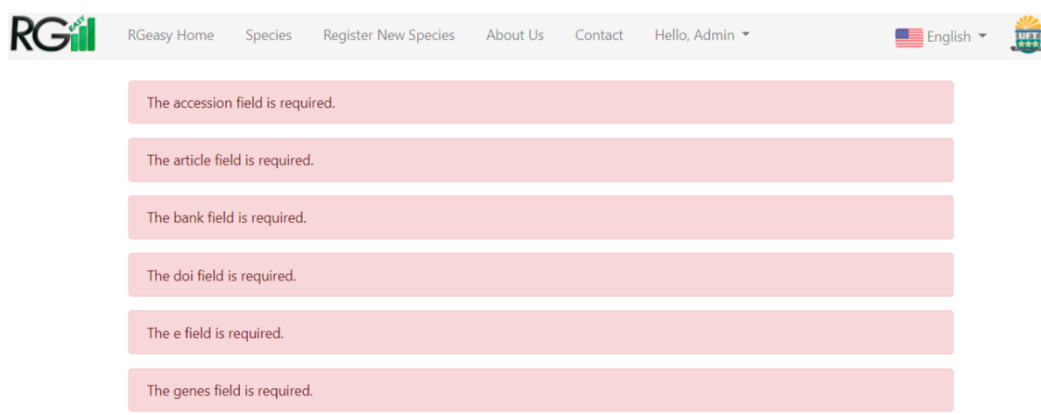
Article DOI Year
10.1007/s11240-016-1147-6 2015

Authors

Cq Data

Figura 8- Registro de uma nova espécie no banco de dados do RGeasy.

Ao preencher cada campo, não use “Enter”, pois a ferramenta entenderá que todos os campos foram preenchidos e gerará automaticamente a tabela com os valores de Cq’s (Figura 11) das amostras, para cada gene de referência analisado. Porém, como nem todos os campos estarão preenchidos, resultará em uma mensagem de erro como indicado na figura abaixo.



RG^{easy} RGeasy Home Species Register New Species About Us Contact Hello, Admin English

The accession field is required.

The article field is required.

The bank field is required.

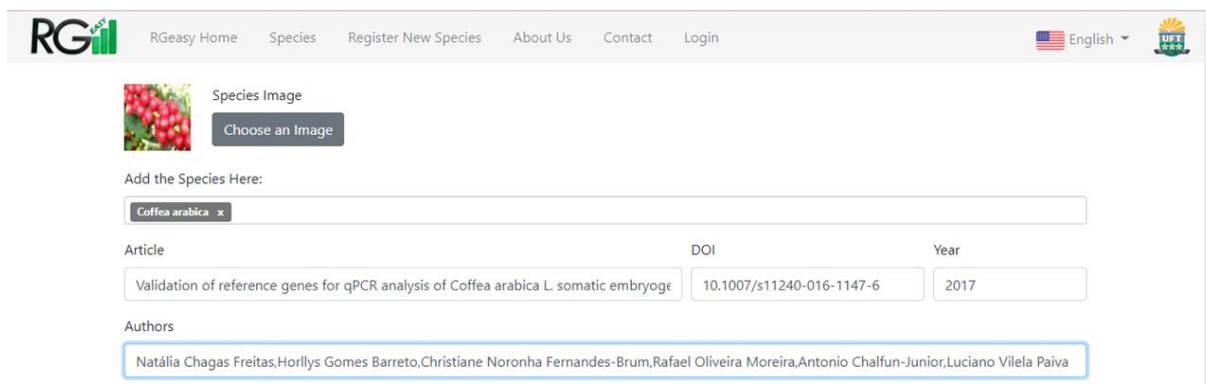
The doi field is required.

The e field is required.

The genes field is required.

Figura 9- Mensagem de erro gerado em razão dos campos em branco durante o registro de uma nova espécie no banco de dados do RGeasy.

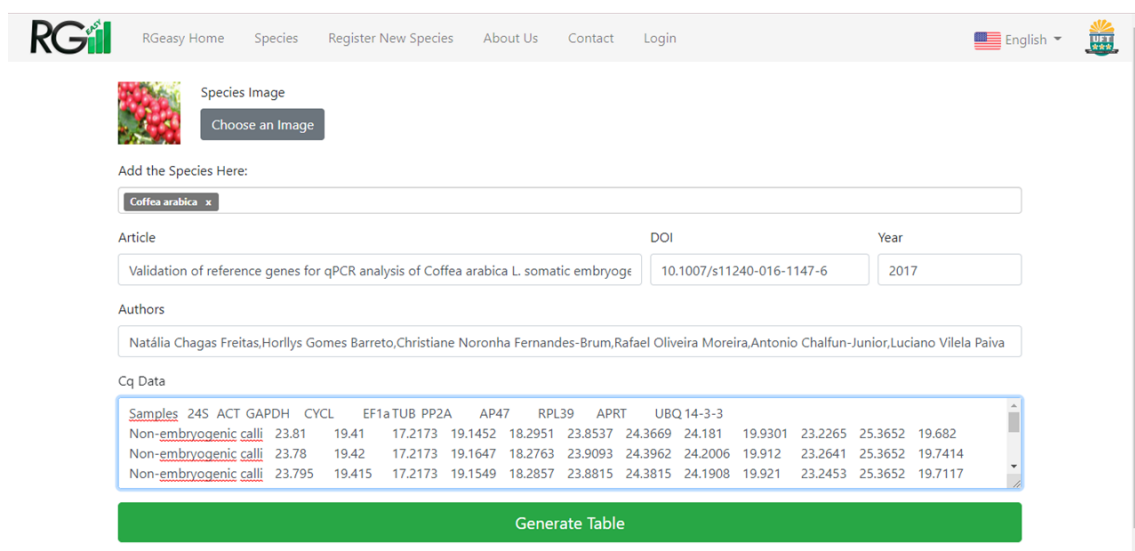
O nome de todos os autores do artigo deve ser inserido no campo “Authors” e deve ser separado exclusivamente por vírgula, não podendo ser empregado pontuações como “; : .” ou o sinal “&” (Figura 10).



The screenshot shows the RGeasy web interface. At the top, there is a navigation bar with links: RGeasy Home, Species, Register New Species, About Us, Contact, and Login. On the right, there is a language dropdown set to 'English' and a logo. Below the navigation bar, there is a 'Species Image' section with a 'Choose an Image' button. A text input field labeled 'Add the Species Here:' contains 'Coffea arabica'. Below this, there are three input fields: 'Article' (containing 'Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryo'), 'DOI' (containing '10.1007/s11240-016-1147-6'), and 'Year' (containing '2017'). The 'Authors' field is highlighted with a blue border and contains the text: 'Natália Chagas Freitas,Horllys Gomes Barreto,Christiane Noronha Fernandes-Brum,Rafael Oliveira Moreira,Antonio Chalfun-Junior,Luciano Vilela Paiva'.

Figura 10- Preenchimento do campo “Authors”, durante o registro de uma nova espécie, no banco de dados do RGeasy.

Após o preenchimento de todos os campos solicitados (Figura 11), será gerada uma tabela, que permitirá que os dados sejam editados caso necessário.



The screenshot shows the RGeasy web interface with the same fields as Figure 10. Below the 'Authors' field, there is a 'Cq Data' section. It contains a table with the following data:

Samples	24S	ACT	GAPDH	CYCL	EF1a	TUB	PP2A	AP47	RPL39	APRT	UBQ	14-3-3
Non-embryogenic calli	23.81	19.41	17.2173	19.1452	18.2951	23.8537	24.3669	24.181	19.9301	23.2265	25.3652	19.682
Non-embryogenic calli	23.78	19.42	17.2173	19.1647	18.2763	23.9093	24.3962	24.2006	19.912	23.2641	25.3652	19.7414
Non-embryogenic calli	23.795	19.415	17.2173	19.1549	18.2857	23.8815	24.3815	24.1908	19.921	23.2453	25.3652	19.7117

Below the table, there is a green button labeled 'Generate Table'.

Figura 11- Registro de uma nova espécie.

Ao clicar em “Generate table” (Figura 11), a tabela não poderá ser mais editada e um pop-up será exibido, solicitando ao usuário que selecione a categoria de espécie (Animal, vegetal ou microrganismo) da nova espécie que está sendo adicionada (Figura 12).

Which group of organisms does the new species belongs to?

☐ Animal ☐ Plants ☐ Microorganism

OK

Species Image
Choose an Image

Add the Species Here:
Coffea arabica x

Article
Validation of reference genes for

Authors
Natália Chagas Freitas, Horlyls Gor

Cq Data

Samples	24S	ACT	GAPDH	CYCL	EF1a	TUB	PP2A	AP47	RPL39	APRT	UBQ	14-3-3
Non-embryogenic calli	23.81	19.41	17.2173	19.1452	18.2951	23.8537	24.3669	24.181	19.9301	23.2265	25.3652	19.682
Non-embryogenic calli	23.78	19.42	17.2173	19.1647	18.2763	23.9093	24.3962	24.2006	19.912	23.2641	25.3652	19.7414
Non-embryogenic calli	23.795	19.415	17.2173	19.1549	18.2857	23.8815	24.3815	24.1908	19.921	23.2453	25.3652	19.7117

Generate Table

Figura 12- Os usuários do RGeasy devem informar o grupo de espécies da nova espécie que está sendo adicionada.

Abaixo da tabela contendo os valores de Cq, uma descrição de cada gene de referência candidato a ser analisado deve ser fornecida pelo usuário (Figura 13). Essas informações devem ser preenchidas cuidadosamente, pois serão disponibilizadas para os usuários do RGeasy.

Gene: **14-3-3** Vegetable Coffeea canephora

Primer Sequence (Forward)

Primer Sequence (Reverse)

R2 e* Accession Bank

Gene: **RPL7** Vegetable Coffeea canephora

Primer Sequence (Forward)

Primer Sequence (Reverse)

R2 e* Accession Bank

Figura 13- Os usuários devem preencher as informações genéticas para cada gene candidato a gene de referência da nova espécie que está sendo registrada no banco de dados do RGeasy.

Para finalizar o registro da espécie, basta clicar em “Generate”, após o preenchimento de todos os dados.

3.2 Registro de mais de uma espécie

Pesquisadores que realizam estudos que analisam a estabilidade de genes candidatos de referência, para duas ou mais espécies, podem fazer o registro das diferentes espécies por meio de um único processo de registro (Figura 14). Contudo isso só é possível se o mesmo grupo de genes candidatos a genes de referência estiver sendo analisado para ambas as espécies. Caso contrário, as espécies devem ser registradas, separadamente e, portanto o artigo terá que ser registrado mais de uma vez.

A

RG Home Species Register New Species About Us Contact Login English

Species Image
Choose an Image

Add the Species Here:

Coffea arabica

Article DOI Year
10.1007/s11240-016-1147-6 2015

Authors

Cq Data

Generate Table

B

RG Home Species Register New Species About Us Contact Login English

Species Image
Choose an Image

Add the Species Here:

Coffea arabica, Coffea canephora

Article DOI Year
10.1007/s11240-016-1147-6 2015

Authors

Cq Data

Generate Table

Figura 14- Processo de registro de duas ou mais espécies. O nome da segunda espécie deve ser acrescentado, logo após o nome da primeira espécie, sendo esses nomes separados por vírgula. Registro de uma espécie (A). Registro de duas ou mais espécies (B).

Durante o registro dos valores de Cq's, é fundamental identificar cada amostra com o nome da espécie a que se refere (Figura 15), para que o RGeasy possa diferenciar corretamente cada tecido. Caso contrário, a ferramenta pode reconhecer duas ou mais

amostras como apenas uma amostra. As etapas posteriores do registro de duas ou mais espécies são semelhantes às do registro de uma única espécie.

Cq Data

Tissue	14-3-3	RPL7	PSAB	ACTINA	DMXT	GAPDH	ADH2	UBQ
C. arabica Root	18.83401129	22.34721738	18.9538811	22.27552175	22.09	21.15589526	22.48976486	19.22130877
C. arabica Root	18.79161145	22.25786822	19.06681386	22.19844382	21.99	21.17575063	22.34972896	19.24057826
C. arabica Root	18.80009142	22.36707275	18.99152535	22.28515649	22.23	21.29488284	22.56445067	19.05751817

Cq Data

Tissue	14-3-3	RPL7	PSAB	ACTINA	DMXT	GAPDH	ADH2	UBQ
C. arabica Ro	18.83401129	22.34721738	18.9538811	22.27552175	22.09	21.15589526	22.48976486	19.22130877
C. arabica Ro	18.79161145	22.25786822	19.06681386	22.19844382	21.99	21.17575063	22.34972896	19.24057826
C. arabica Ro	18.80009142	22.36707275	18.99152535	22.28515649	22.23	21.29488284	22.56445067	19.05751817
C. canephora	27.05958129	31.08357957	26.96269561	28.89458898	28.29	26.04031594	29.09945913	27.44937779
C. canephora	26.9747816	32.27490168	27.25443877	28.80787631	28.43	26.28850805	28.77270871	27.39156934
C. canephora	26.76278237	30.58719535	26.67799624	28.96203217	28.56	26.10980973	29.0527805	27.3337609

Figura 15- Descrição de como identificar corretamente cada amostra no RGeasy. Nesse caso, foi utilizado tecido radicular para as duas espécies diferentes (*C. arabica* e *C. canephora*) (FERNANDES-BRUM et al., 2017) e, conforme destacado em verde, a identificação de cada amostra, nesse cenário, foi feita pela escrita do nome da espécie seguido do nome do tecido.