

help

abs.qpcr package:unknown R Documentation

Quantificação absoluta de genes por qPCR (método da curva padrão)

Description:

Calcula o numero de cópias de um gene a partir das informações de Cycle Threshold oriundas de equipamentos de PCR em Tempo Real e da construção de uma curva padrão. Métodos relativos de contagem ou qPCR digital não são suportados.

Usage:

```
abs.qpcr(ctp, cta, mtd="reaction", cdp=NULL, dlf=NULL,  
         dls=NULL, vol=NULL, tpl=NULL, mcs=1, cda=NULL)
```

Arguments:

ctp: uma matriz contendo os valores de Cycle Threshold das diluições da amostra padrão de DNA usada para a construção da curva padrão (observações nas linhas) ou vetor numérico com as médias dos valores de Cycle Threshold de cada diluição da amostra padrão.

cta: uma matriz contendo os valores de Cycle Threshold das amostras ambientais que serão quantificadas (observações nas linhas) ou vetor numérico com as médias dos valores de Cycle Threshold de cada amostra ambiental.

mtd: método de cálculo. 'reaction' é o default e calculará o numero de cópias do gene alvo na reação de qPCR de cada amostra. Caso seja especificado o método 'ngdna', torna-se necessário informar a concentração de DNA das amostras 'cda' e o resultado será o numero de cópias do gene alvo por nanograma de DNA extraído.

cdp: a concentração de DNA da amostra padrão utilizada para a construção da curva.

dlf: fator de diluição usado para a diluição seriada da amostra padrão. Se você fez diluições 1:10, o fator é 10.

dls: um vetor numérico com a sequência de diluições da amostra padrão utilizada para a construção da curva padrão. Usar valores integrais em ordem crescente.

vol: volume de amostras (tanto padrão quanto as ambientais) utilizadas na reação de qPCR.

tpl: valor total, em pares de bases nitrogenadas, do vetor

plasmidial mais o gene alvo de sua análise. O vetor plasmidial é um produto comercial e seu tamanho pode ser obtido na especificação técnica do produto utilizado. O numero de bases que contém o gene alvo somado ao vetor plasmidial depende dos primers utilizados para amplificá-lo.

mcs: numero de genes alvo que são inseridos no vetor plasmidial durante a clonagem para obtenção da amostra padrão. Esse numero é relacionado ao numero de 'multiple cloning sites' do vetor plasmidial utilizado. Como geralmente são utilizados vetores com um mcs, esse valor é default para esse argumento.

cda: concentração de DNA das amostras ambientais. Deve ser especificado somente no método 'ngdna', sendo utilizado para o cálculo do numero de cópias/ng DNA.

Details:

Não há argumentos opcionais nessa função caso seja requerido o cálculo do numero de copias/ng DNA (método 'ngdna'). Se for requerido o cálculo de cópias na reação (método 'reaction'), o argumento 'cda' (concentração de DNA das amostras) não é utilizado no cálculo.

Para iniciar a função, no entanto, são necessários apenas os dados de 'cycle threshold' das diluições do padrão e das amostras (argumentos 'ctp' e 'cta'). Neste caso, as informações faltantes que são necessárias para o cálculo escolhido são requeridas de forma interativa.

Value:

A saída da função é sempre um vetor numérico de tamanho idêntico ao numero de colunas (ou valores) do 'cycle threshold' das amostras ambientais. O método 'reaction' o resultado será o numero de cópias do gene analisado na reação de qPCR de cada amostra. O método 'ngdna' o resultado será o numero de cópias do gene analisado por nanograma de DNA da amostra.

Warning:

Alguns indicadores importantes em uma análise de qPCR são a cobertura da curva padrão, o coeficiente de determinação do modelo linear da curva e a eficiência da reação de qPCR. Todos esses indicadores, caso extrapolem os valores definidos por consenso na literatura, gerarão avisos que, apesar de não impedirem o cálculo do numero de cópias, devem ser cuidadosamente avaliados durante a análise dos resultados obtidos.

Note:

O argumento 'dls' é definido durante a realização das diluições seriadas da amostra padrão de DNA. Fazendo diluições seriadas de 1:10, a primeira resulta em uma amostra 10x menos concentrada, a segunda 100x, a terceira 1000x e assim por diante. Cinco dessas diluições são usadas para construir a curva padrão. Se for utilizada da segunda até a sexta diluições o argumento 'dls' deve receber a sequência 'c(2,3,4,5,6)' ou c(2:6). Caso o argumento não seja especificado, a função requisitará, de forma interativa, que você informe a primeira e a última diluições usadas (neste exemplo, '2' e '6').

Author:

Celio Roberto Jonck

References:

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.

Site 'qPCR Education' da Thermo Fisher

<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education.html>

See Also:

O pacote 'HTqPCR' Bioconductor (<https://www.bioconductor.org>) contém diversas ferramentas de análise relacionadas a qPCR

Examples:

```
## DADOS
## Não foram encontrados sets de dados similares a uma saída de
## equipamento de qPCR nos standard data sets do R. Os dados
## abaixo são de uma pesquisa realizada no Laboratório de
## Ecologia de Microrganismos da Universidade de São Paulo.
ctp=c(10.05, 17.07, 24.99, 29.43, 33.25)
cta=matrix(c(34.28, 34.45, 33.91, 29.20, 30.69, 29.79, 31.82,
            31.79, 31.66, 32.24, 31.71, 31.91, 32.64, 32.35, 32.54,
            28.69, 28.45, 29.16, 32.21, 32.08, 32.02, 33.14, 33.00,
            32.92, 35.41, 36.22, 36.49, 31.52, 31.61, 31.73), 3, 10,
            dimnames=list(paste("Ct", 1:3, sep=""), paste("Sample",
            1:10, sep="")))
cda=c(1.7, 6.2, 4.8, 5.8, 1.5, 6.8, 1.3, 7.8, 1.7, 2.1)
## EXEMPLO 1
## Neste caso, o padrão foi uma amostra de E.coli recombinante
## com inserção do gene alkB (degradação de n-alcanos). A
## concentração do padrão foi 73.8ng/μl, tendo sido diluída 7x
## em série com fator de diluição 10. Para a construção da
## curva padrão, foram utilizadas as diluições de 3 a 7. 0
## volume de amostra na reação de qPCR foi de 5 μl e o template
```

```
## tinha um total de 3200 pb. O método e o numero de genes
## foram definidos por padrão em 'reaction' e '1'.
abs.qpcr(ctp,cta,cdp=73.8, dlf=10, dls=c(3:7), vol=5, tpl=3200)
## EXEMPLO 2
## Alterando o método para 'ngdna' e fornecendo a concentração
## de DNA das amostras.
abs.qpcr(ctp, cta, mtd="ngdna", cdp=73.8, dlf=10, dls=c(3:7),
vol=5, tpl=3200, mcs=1, cda=cda)
## EXEMPLO 3
## É possível também entrar com apenas os valores de 'cycle
## threshold' do padrão e das amostras e ir preenchendo os
## valores restantes conforme eles são requisitados.
abs.qpcr(ctp, cta)
73.8
10
3
7
5
3200
## EXEMPLO 4
## Funciona da mesma forma para o método 'ngdna', mas torna-se
## obrigatório informar 'cda'.
abs.qpcr(ctp, cta, mtd="ngdna", cda=cda)
73.8
10
3
7
5
3200
```

#END

From:
<http://ecor.ib.usp.br/> - ecoR

Permanent link:
http://ecor.ib.usp.br/doku.php?id=05_curso_antigo:r2016:alunos:trabalho_final:biocelio:help

Last update: 2020/08/12 09:04

