

abs.qpcr()

Título: **Quantificação absoluta de genes (método da curva padrão) por Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR)**

A técnica da qPCR combina uma PCR normal com a detecção de fluoróforo, permitindo que o resultado da reação seja obtido em tempo real. Essa técnica permite a quantificação absoluta de um gene a partir da construção de uma curva padrão, usando uma amostra com concentração conhecida do gene.

A saída do equipamento de qPCR refere-se ao Cycle Threshold (Ct), ou seja, o limite de detecção onde o sinal do gene que está sendo duplicado destaca-se da fluorescência emitida pelos componentes da reação. Este valor é utilizado para se determinar a quantidade do gene alvo na reação.

A conversão deste valor para o número de cópias do gene na reação é realizada a partir de uma curva padrão. A construção da curva padrão passa pela clonagem e extração do DNA de plasmídeos com quantidades conhecidas do gene alvo, as quais são diluídas de forma serial e incluídas na reação de qPCR.

O cálculo do número de cópias é feito a partir da regressão dos valores de Ct em função do logaritmo da concentração do gene nas diferentes diluições dos padrões e a aplicação dos coeficientes linear e angular obtidos aos valores de Ct das amostras com concentração desconhecida do gene.

Para a realização da conversão, seria necessária a entrada dos seguintes dados:

Para a Curva Padrão

- Concentração de DNA (em ng/μl) extraído dos plasmídeos clonados
- Diluições dessas concentrações utilizadas para a curva padrão
- Volume do extrato utilizado na reação de PCR
- Número de pares de bases do plasmídeo clonado
- Número de cópias do gene de interesse em cada plasmídeo clonado
- Valores de Ct das diluições utilizadas para a curva padrão

Para a conversão

- Valores de Ct das amostras

A saída da função seria, para cada amostra, a quantidade de cópias do gene alvo presente na reação de qPCR. Planejo incluir outras possibilidades de saídas, mediante o fornecimento de novas informações. Por exemplo, caso seja fornecida a informação da concentração de DNA das amostras, a saída será o número de cópias do gene por nanograma de DNA. Caso a informação fornecida seja a quantidade de solo usado para extração de DNA, a saída será o número de cópias por grama de solo.

Olá Celio. Gostei da sua explicação da proposta. Gostaria de te fazer uma pergunta: O que te motivou a desenvolver essa proposta? Não há ferramentas prontas para realizar essa tarefa? Não há um pacote de R que já faça isso? A proposta me parece uma boa oportunidade de fazer um código legal.

Vamos nos falando.

—[Vitor Aguiar](#)

Olá, Vitor.

Minha motivação para esta proposta foi mais didática do que prática. Penso que a quantidade de detalhes dessa análise seja um bom laboratório para dominar as técnicas de fazer funções no R.

Existem vários programas pagos para a realização dessa tarefa e temos alguns pacotes baseados em R também (principalmente do projeto de desenvolvimento de software para bioinformática aberto [Bioconductor](#) - que eu ainda nem comecei a tentar entender)... mas até o momento, no laboratório, fazemos os cálculos em planilhas do excel (então, no fim das contas, talvez ela seja bastante utilizada... hehehe).

A ideia é fazer uma função para a análise que fazemos no laboratório apenas, que é a quantificação absoluta por curva padrão. Mas creio que 80% dos trabalhos de qPCR são analisados dessa forma, então, uma função mais simples pode até vir a ser bastante útil...

⇒[Celio](#)

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:trabalho_final1 

Last update: **2020/08/12 06:04**