

Analýza obrazu

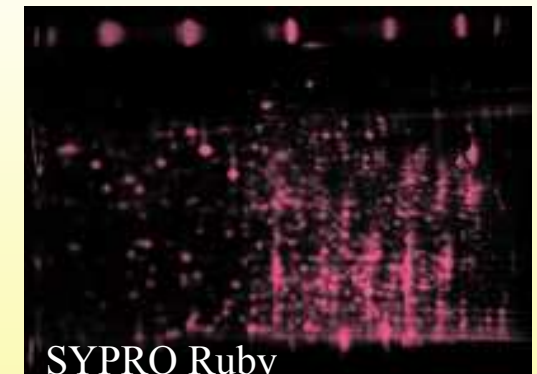
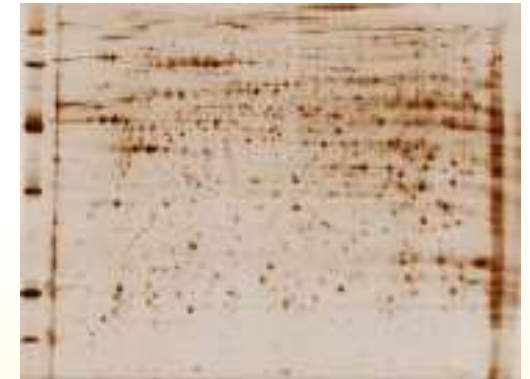
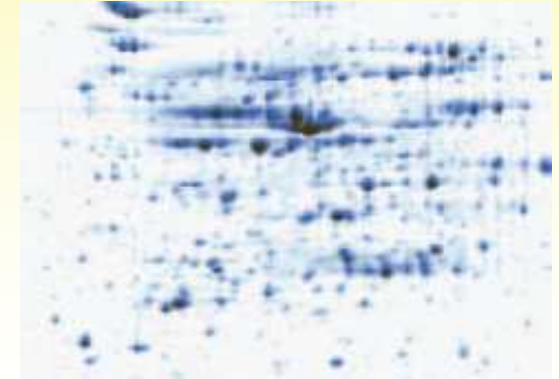
BARVENÍ PROTEINŮ

Obecné požadavky na vizualizaci proteinů:

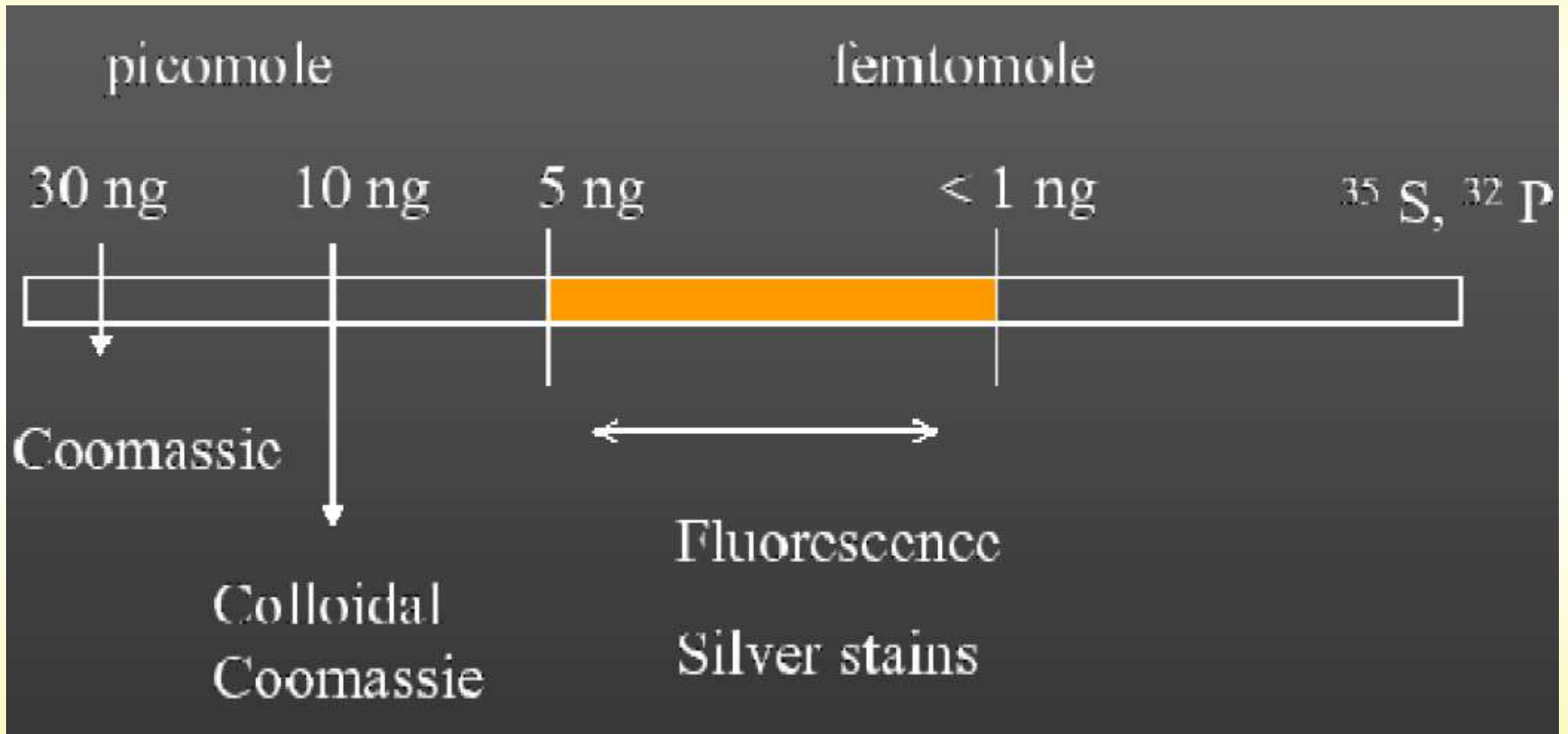
- vysoká citlivost
- široký lineární rozsah závislosti intenzity
barvičky na množství proteinu v gelu
- kompatibilita s následnými analýzami

Barvení proteinů po gelové elektroforéze

- Coomassie brilliant blue
 - R250
 - G250
- Stříbro
 - kyselá varianta barvení
 - amoniakální varianta barvení
- Fluorescenční barvičky – Sypro Ruby
 - Deep Purple
 - Flamingo

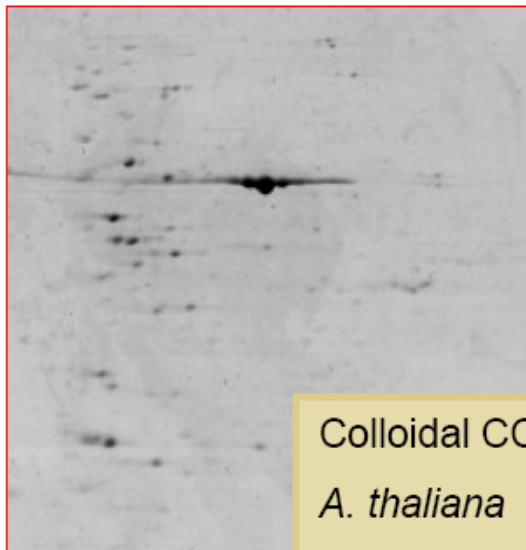


Barvení - citlivost



barvení stříbrem je 10-50x citlivější než Coomassie brilliant blue R-250

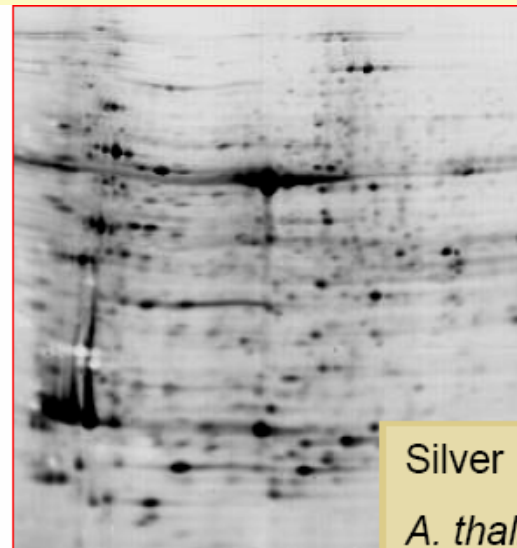
Citlivost barvení – 2D elektroforéza



Colloidal CCB

A. thaliana

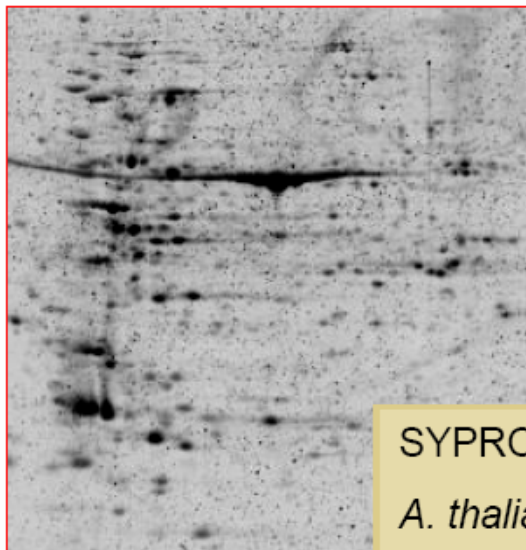
množství proteinu: 100 $\mu\text{g/gel}$



Silver

A. thaliana

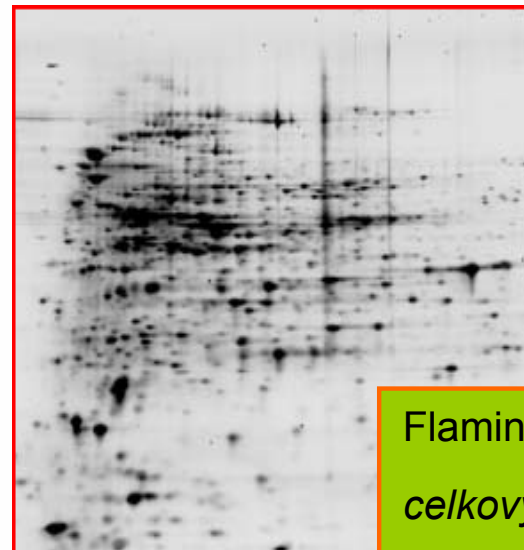
množství proteinu: 20 $\mu\text{g/gel}$



SYPRO Ruby

A. thaliana

množství proteinu: 20 $\mu\text{g/gel}$



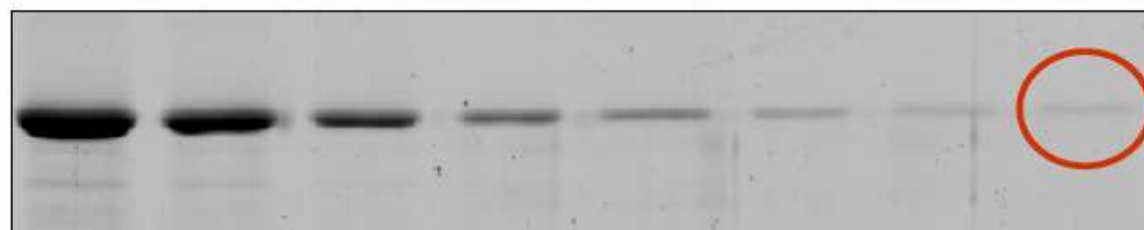
Flamingo

celkový protein *E. coli*

množství proteinu: 10 $\mu\text{g/gel}$

Citlivost barvení – 1D SDS-PAGE

ng BSA / jamka



1600 800 400 200 100 50 25 12.5



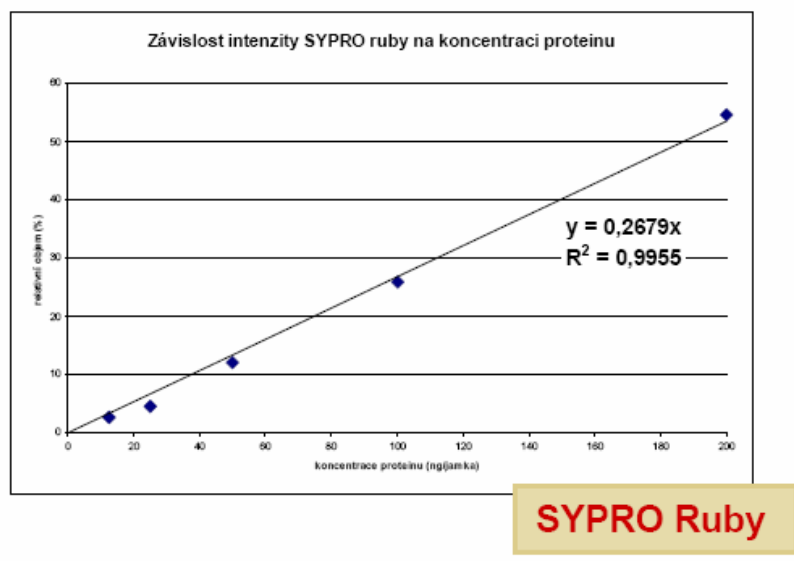
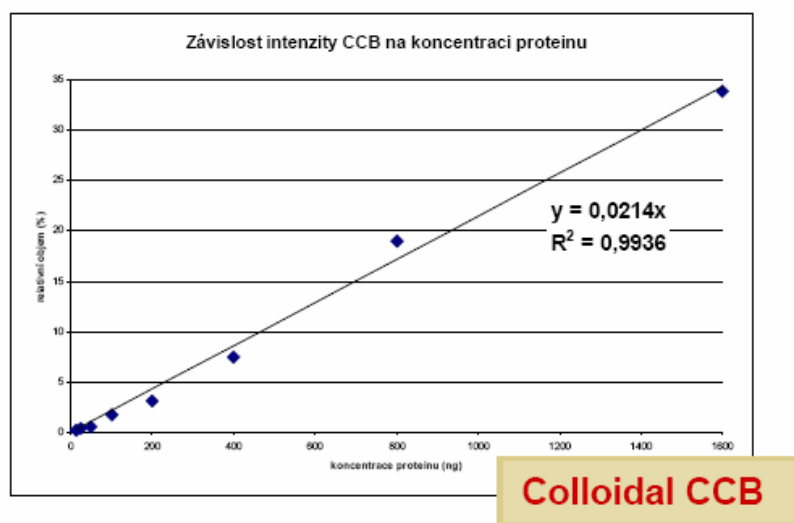
ProteoSilver Plus kit (Sigma-Aldrich)



SYPRO Ruby

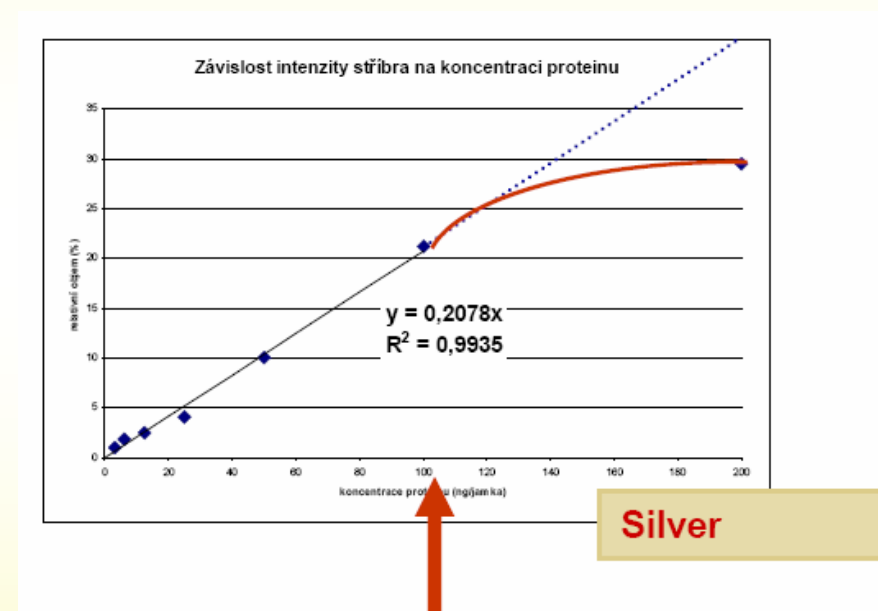
200 100 50 25 12.5 6.25 3.13 1.56

Barvení – rozsah lineární závislosti intenzity barvičky na koncentraci proteinu



Lineární dynamický rozsah

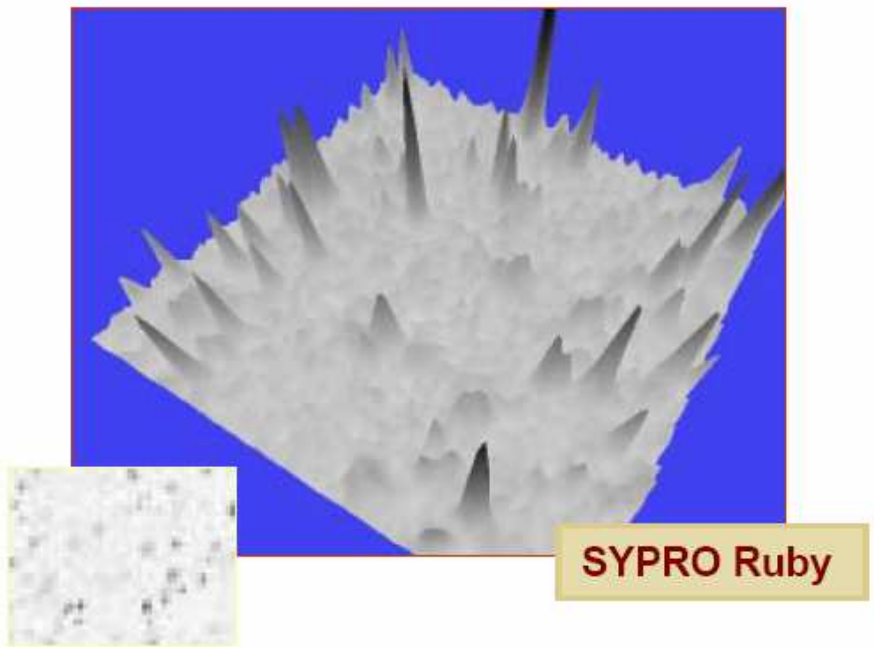
= graf závislosti intenzity barvičky (osa y)
na koncentraci proteinu (osa x)



Barvení stříbrem – lineární závislost pouze
v rozmezí do 100ng proteinu.

Při vyšších množstvích odklon od linearity.

Pozadí - 3D pohled



Charakter pozadí

Coomassie blue – čisté pozadí s drobnými skvrnami barvičky

Stříbro – čisté pozadí často s horizontálními pruhy

Fluorescenční barvičky – obvykle hrubší pozadí s výraznějšími skvrnami barvičky (lze snadno odfiltrvat)

Proteinový spot – 3D pohled



Colloidal CCB



Silver



SYPRO Ruby

Charakter píku

Při analýze obrazu pracujeme s **intenzitou** (**hustotou**) **barvičky**, která je úměrná množství proteinu.

Detekce

Viditelné barvičky (CB, Ag):

Denzitometry

GS800 Bio-Rad



Fluorescenční barvičky (Sypro Ruby):

Fluorescenční scannery

-Ex/Em spektrum se musí shodovat
s Ex/Em charakteristikami přístroje



Storm 840 Molecular Dynamics
(Ex/Em: 450/520 nm longpass)



Vyříznutí spotu z gelu

1) Manuálně (např. skalpelem)

- fluorescenčně barvené proteiny je třeba pro manuální řezání zviditelnit.

Existují 2 možnosti:

UV-transiluminátor – třeba chránit pokožku a oči

Dark Reader transiluminátor – UV záření je pomocí filtru konvertováno na modré světlo, které se využívá pro excitaci (pozadí se odfiltruje oranž. brýlemi)

2) Automaticky – automatický Spot Cutter napojený na software obrazové analýzy

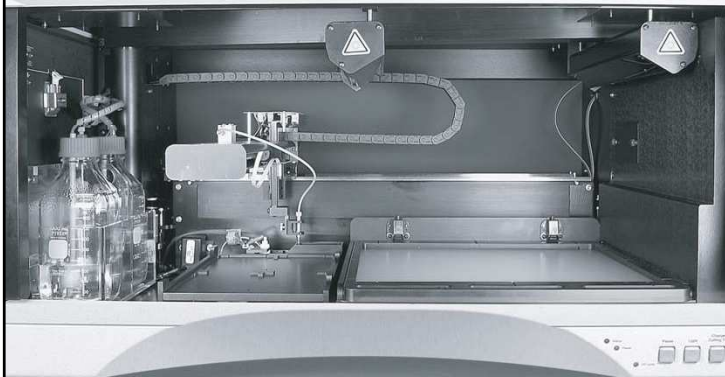
EXQuest Spot Cutter



UV-transilluminator
(Ex: 302, 365 nm)



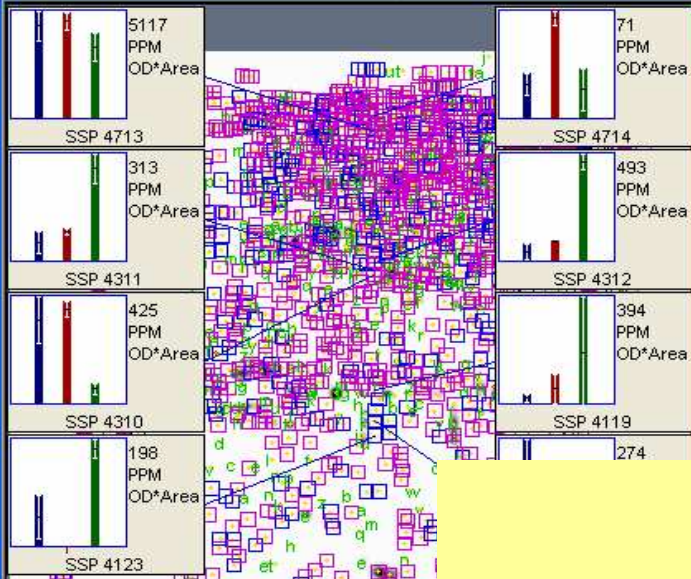
Dark Reader
(Ex: 490 nm)



BARVENÍ – shrnutí

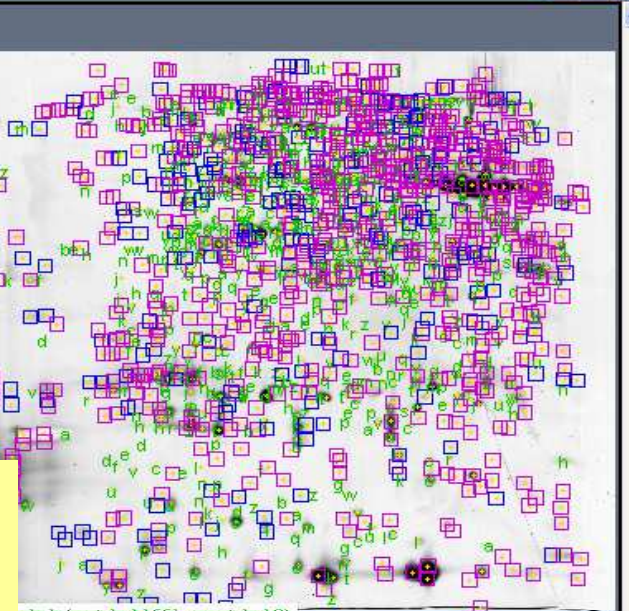
- End-point barvení
- Citlivost barvení
- Kvantifikace – lineární rozsah
- Charakter pozadí
- Charakter píku
- Vizualizace
- Identifikace / Kompatibilita s následnými analýzami (MS analýza)
- Cena

ATX KxheatshockxRTG 30-1-2007 (Matchset)

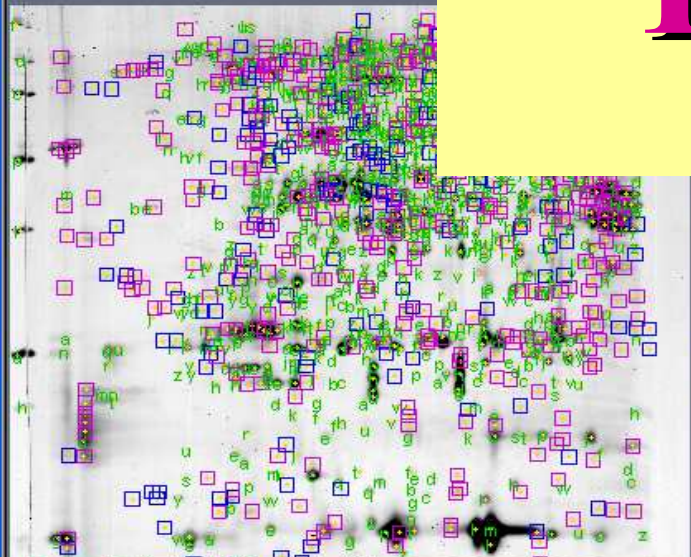


Match symbols (matched:1773 unmatched:10)
ATX KxheatshockxRTG 30-1-2007 (Master)

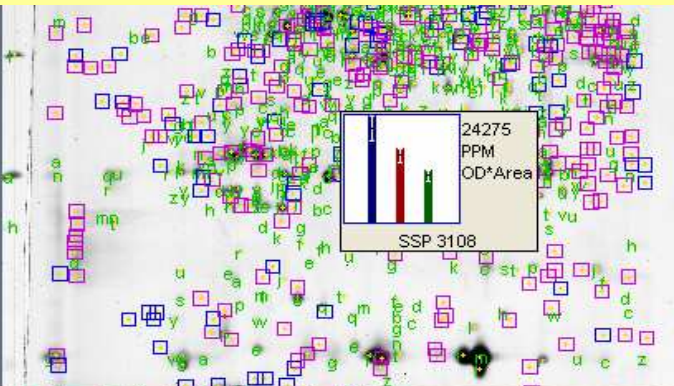
PDQuest



Match symbols (matched:1551 unmatched:0)
ATX 1B- Ag+ 2007-01-29 v3 (Raw 2-D Image)



Match symbols (matched:1536 unmatched:0)
Datko ATX 2A- Ag+ 2007-01-29 v3 (Raw 2-D Image)



Match symbols (matched:1532 unmatched:1)
Datko ATX 2B- Ag+ 2007-01-29 v3 (Raw 2-D Image)

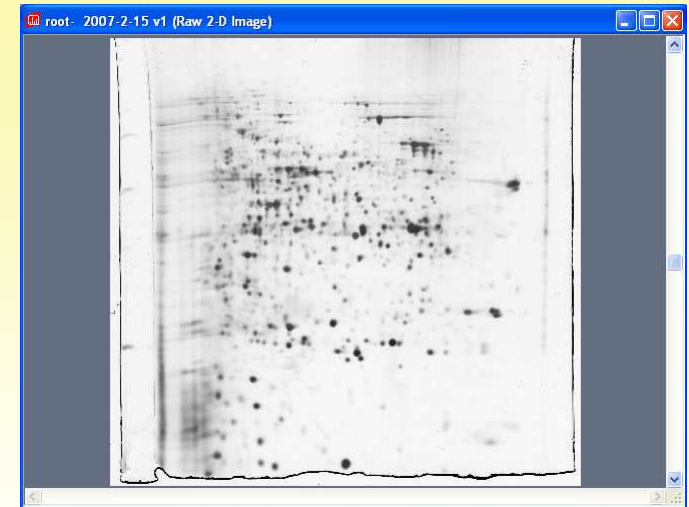
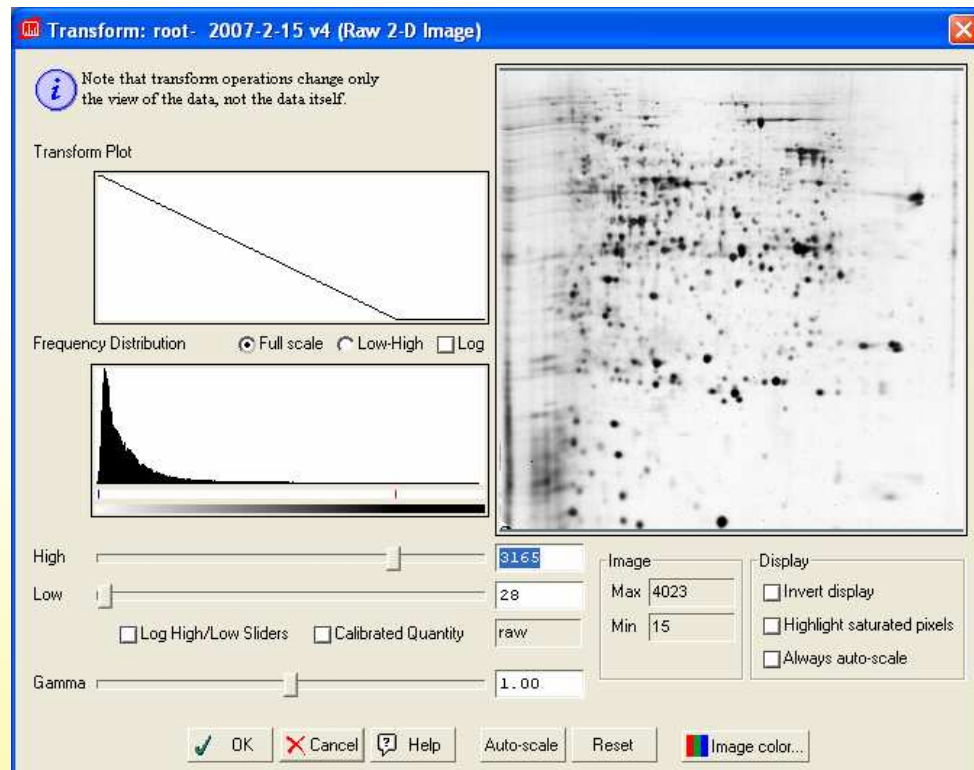
PDQuest – obrazová analýza

- Naskenování gelu (při velkém rozlišení)
- Úprava naskenovaného obrázku
- Detekce spotů a analýza pozadí
(vyhledávání spotů a odfiltrování pozadí)
- Matching – vytvoření Master gelu
- přiřazení spotů
- Editace spotů (vytvoření replikativních skupin)
- Normalizace
- Analytické sety = vyhledání rozdílných spotů
(kvalitativní, kvantitativní rozdíly, statistická analýza)

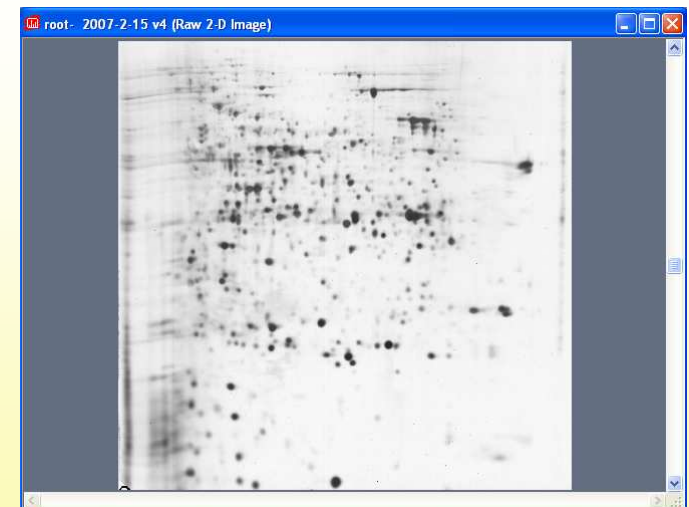
Úprava naskenovaného obrázku gelu

- vertical/horizontal flip
- rotation
- cropping image
- transform

transform



cropping
image



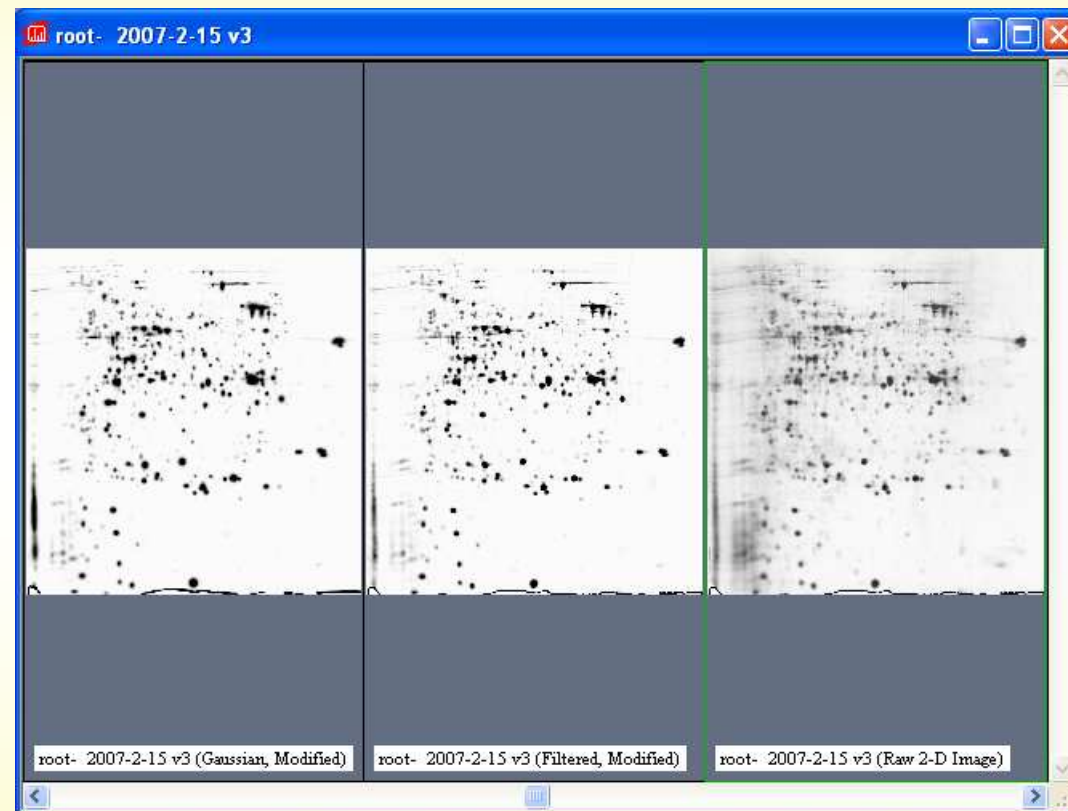
Detekce spotů a filtrace pozadí

- ✓ nastavení parametrů pro vyhledání spotů a odfiltrování pozadí pomocí *Spot Detection Parameter Wizard*
- ✓ výsledkem je tzv. *Scanset* – 3 podoby každého gelu:

původní scan (Raw 2-D scan)

filtrovaný obraz (odfiltrované pozadí)

gaussovský obraz

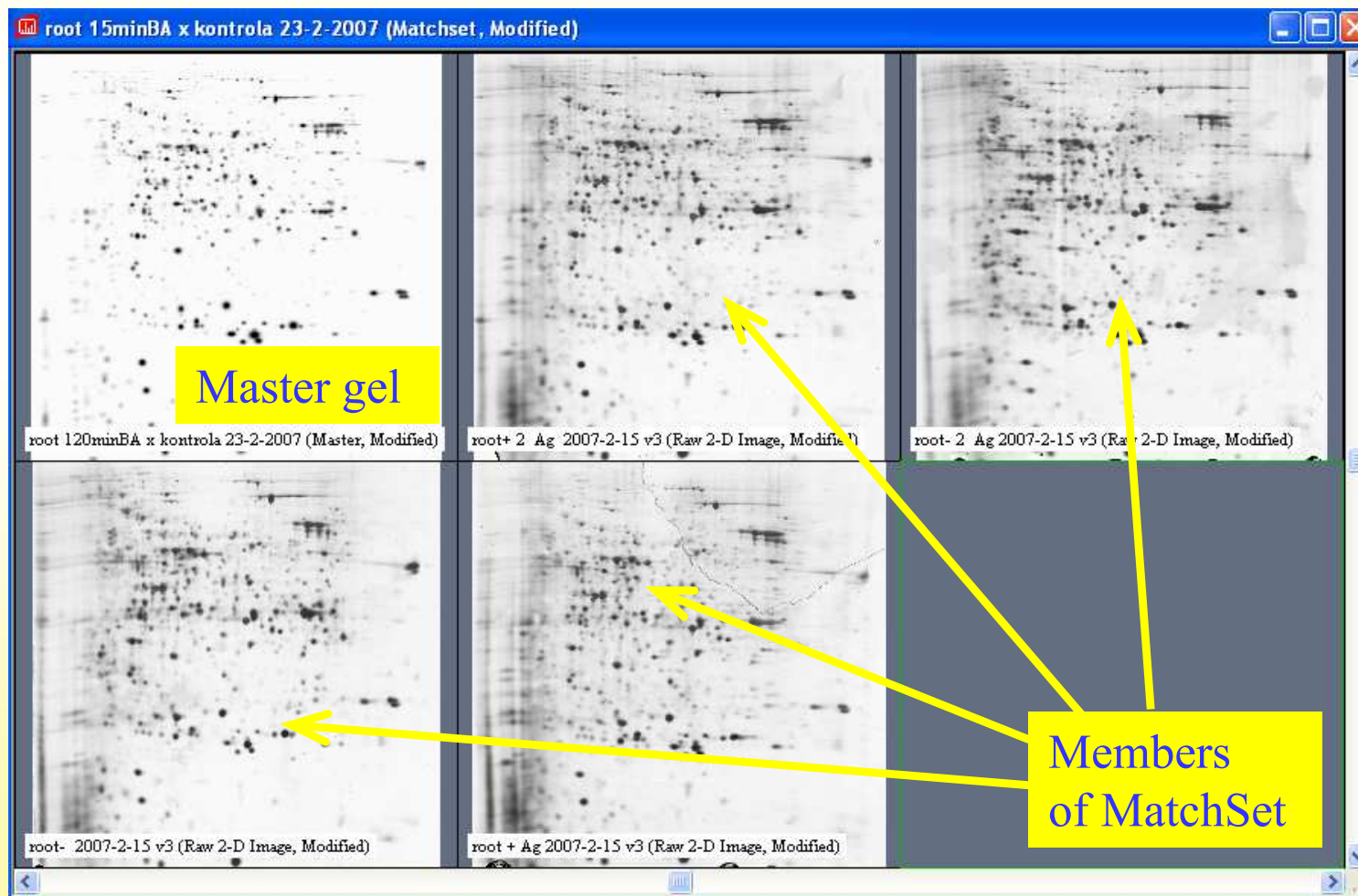


gaussovský obraz:

- umělý obraz
- gaussovské modelování = spoty jsou přepočítány na ideální spoty s profilem gaussovské křivky, které jsou snadno kvantifikovány
- tuto formu obrazu program používá pro další analýzu

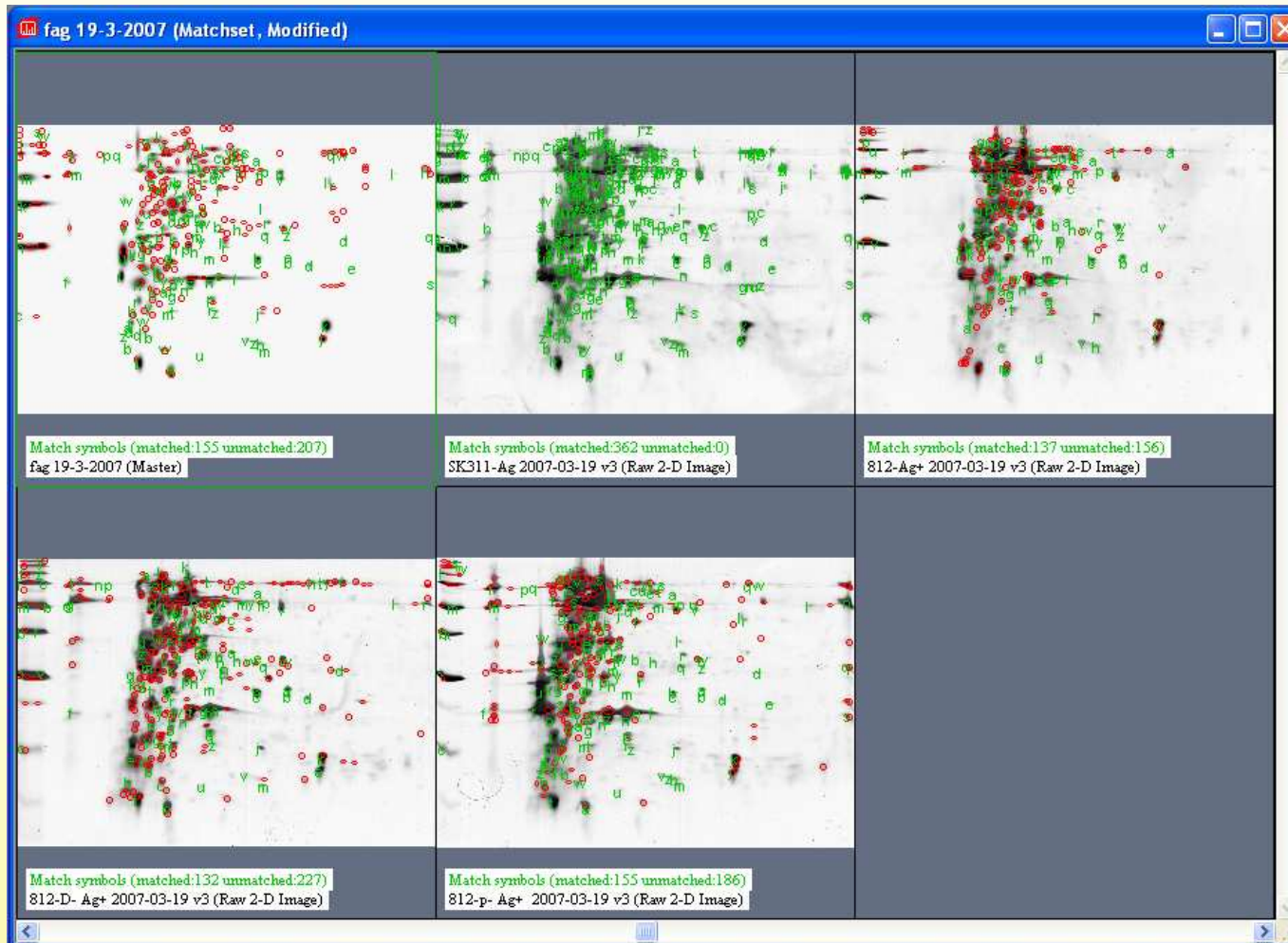
MatchSet

- ✓ Soubor gelů, které se mezi sebou navzájem porovnávají v rámci experimentu.
- ✓ Jeho nezbytnou součástí je tzv. **Master gel** = uměle vytvořený gel, který v konečné fázi musí obsahovat všechny spoty ze všech gelů v MatchSetu.
- ✓ Prostřednictvím Master gelu jsou gely srovnávány mezi sebou.



Matching spots

Přiřazení identických spotů mezi jednotlivými gely. Gely se přikládají (strečují) na sebe a spoty se automaticky matchují s vytvořeným Master gelem podle zadané míry přesnosti.



Zeleně označené

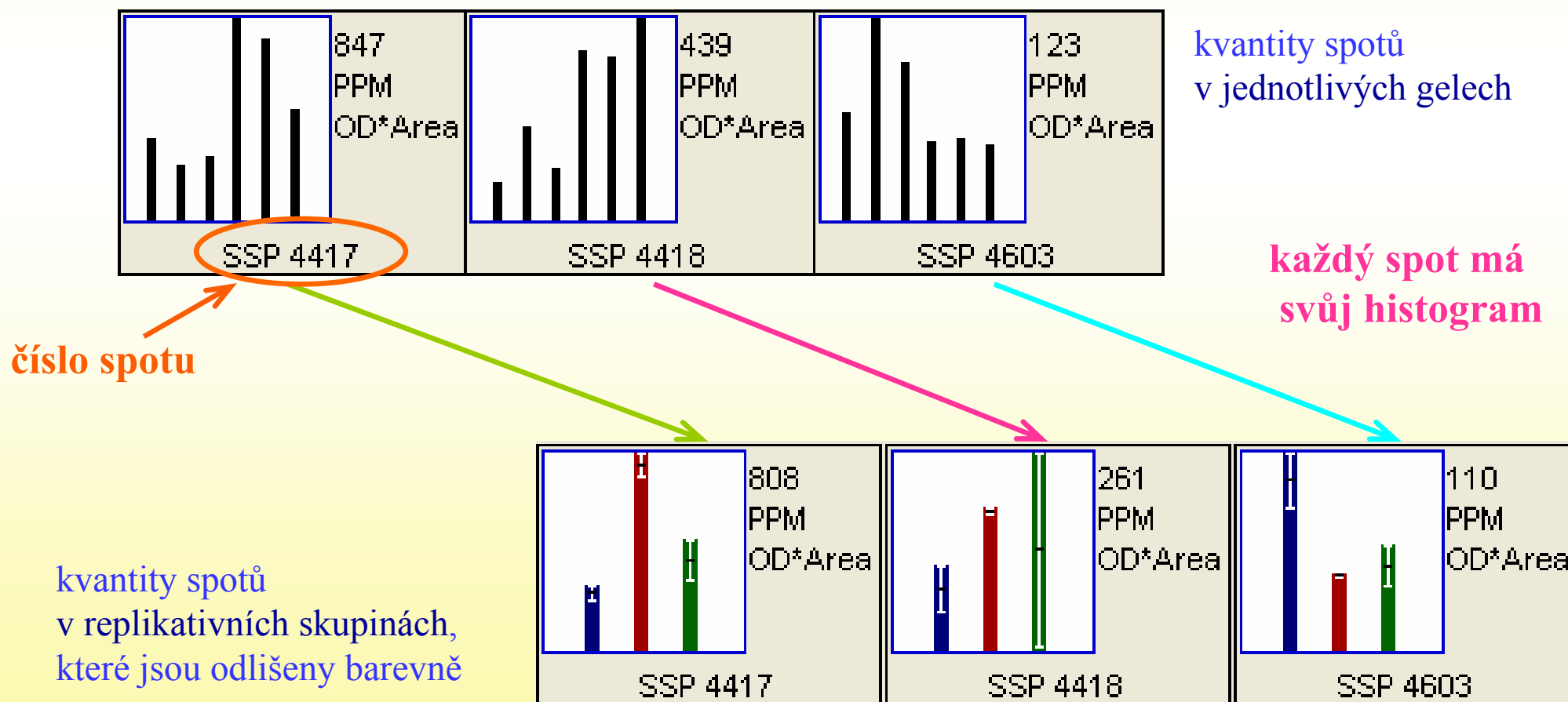
– zmatchované spoty

Červeně označené

– nezmatchované spoty

Replikativní skupiny

- ✓ **Použití** : máme-li 2 a více gelů od jednoho vzorku.
- ✓ Umožňují seskupit kopie gelů daného vzorku a určit průměrnou kvantitu každého spotu.
- ✓ Analýza gelů v replikách je podmínkou pro aplikaci statistických nástrojů (např. Student T-test).



Normalizace

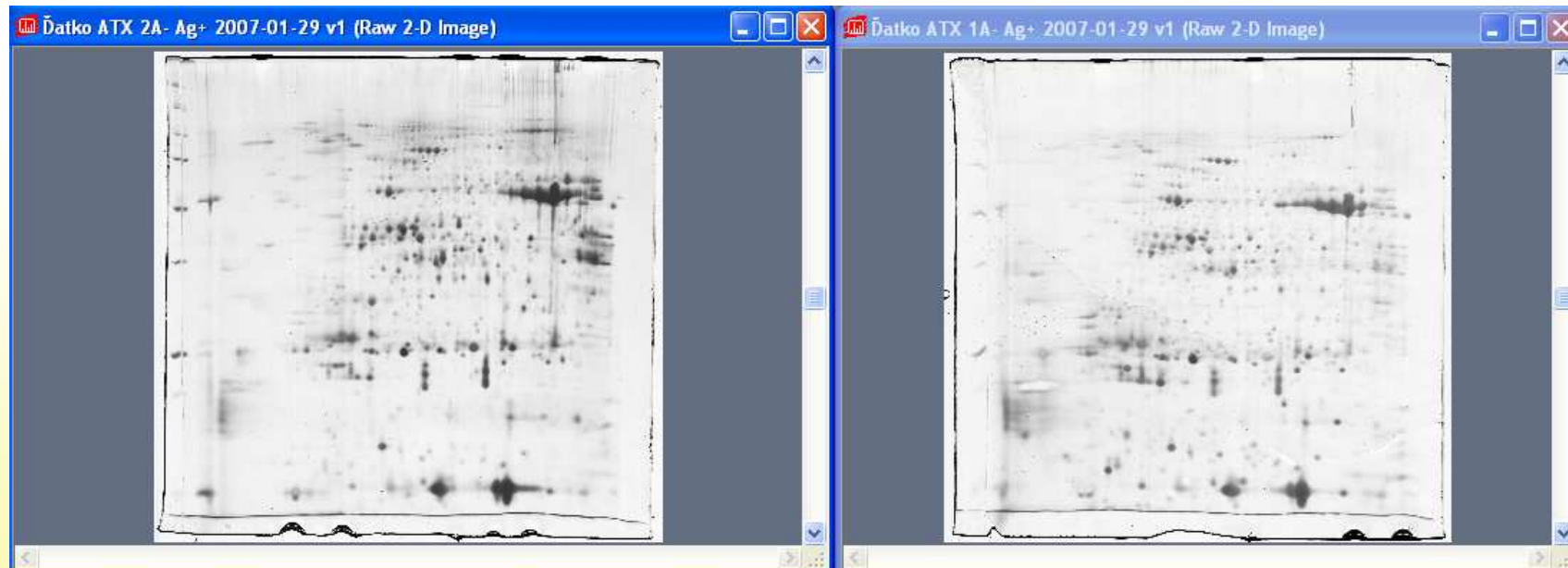
Slouží k vyrovnání intenzit jednotlivých gelů, aby mohlo být provedeno kvantitativní srovnání.

Nejčastější způsoby normalizace:

- surová kvantita každého spotu na gelu je dělena celkovou kvantitou všech spotů, které byly zahrnuty do Master gelu tzv. validovaných spotů
- surová kvantita každého spotu je dělena hodnotou celkové intenzity všech pixel na gelu

Gel se silnějším barvením lze dělit faktorem.

Slabý gel násobit faktorem nelze!



Analytické sety

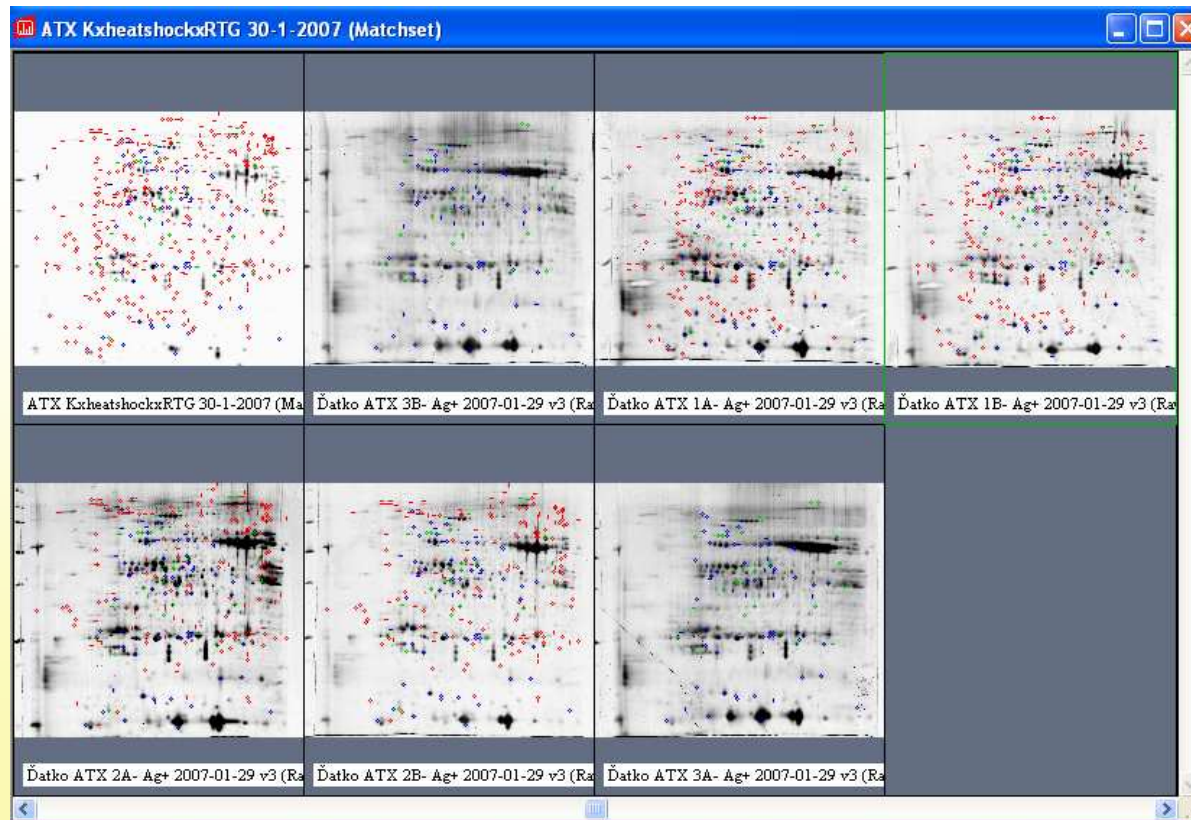
- ✓ skupiny spotů, které jsou pro nás statisticky a biologicky významné
- ✓ umožňuje vyhledání kvalitativních i kvantitativních rozdílů mezi gely (replikativními skupinami) a statistickou analýzu

Kvantitativní vyhodnocování:

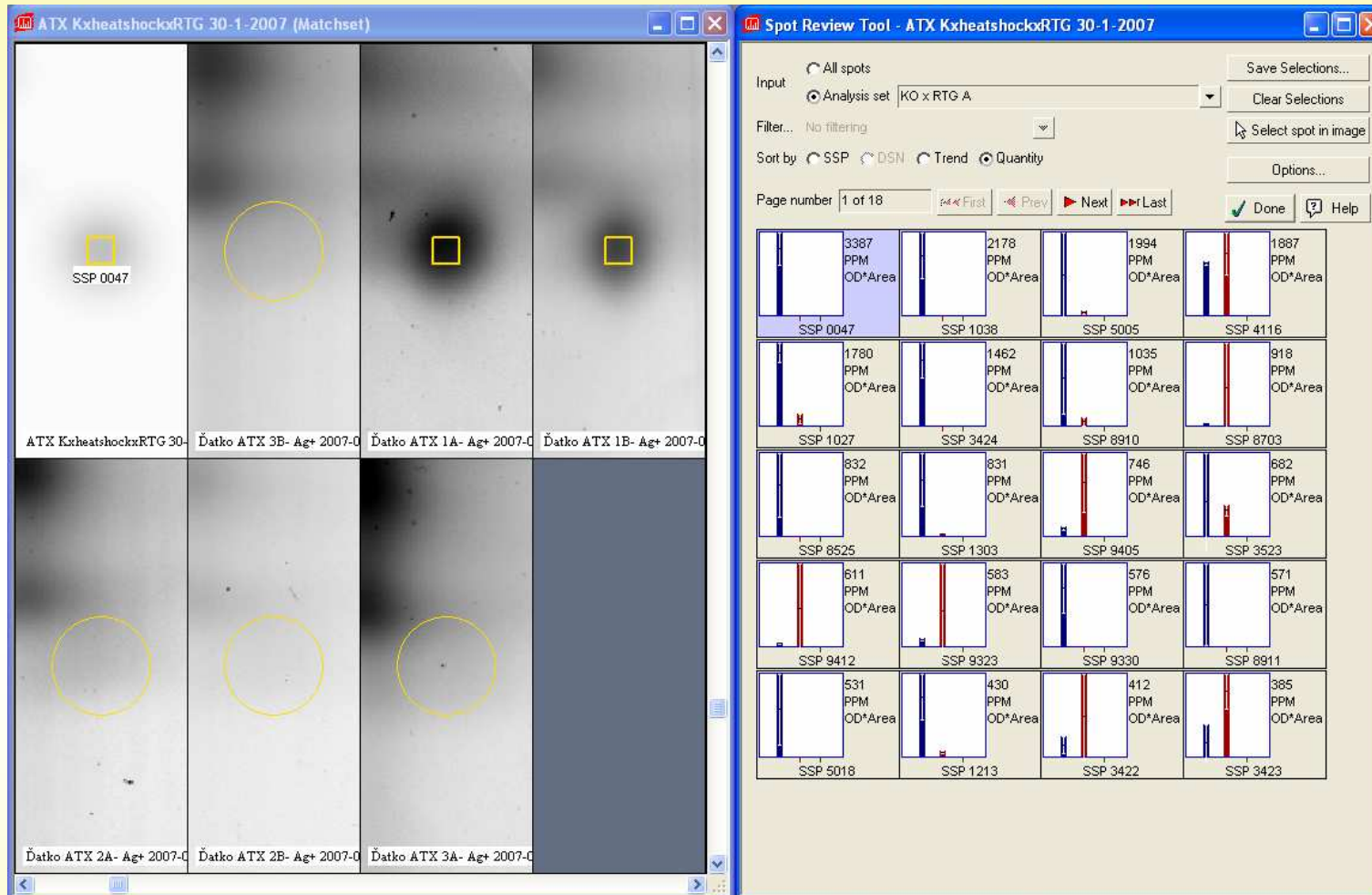
chyba vyhodnocení softwaru je **5% smodch**, chyba elektroforézy je **30% smodch**



v praxi vyhledáváme **dvoj- a vícenásobné změny v kvantitě**



Spot review



vyhledání rozdílných spotů



vyřezání spotů z gelu + digescce



MS-analýza

Příklady použití



Sledování vlivu exogenního cytokininu (BA) na zastoupení proteinů v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*

- přenos semenáčků na určitý časový interval (15, 30, 120 minut) do média s obsahem benzyladeninu
- sběr materiálu
 - ➔ kořeny (root)
 - ➔ nadzemní část (shoot)
- extrakce proteinů z rostlinného materiálu
- 2D elfo
- vyhodnocení gelů pomocí PDQuestu – vyhledání rozdílných proteinů vzhledem ke kontrole
- vyřezání spotů + digesce
- MS analýza

