



# MASARYKOVA UNIVERZITA

**„Rozvoj týmu pro výuku, výzkum a aplikace v oblasti funkční genomiky a proteomiky“  
(CZ.1.07/2.3.00/09.0132)**

## **Analýza obrazu**

**Jana Buršíková**

Oddělení funkční genomiky a proteomiky

ÚEB PŘF MU

[www.sci.muni.cz/pVpKnB/](http://www.sci.muni.cz/pVpKnB/)

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Analýza obrazu

- Srovnání a vyhodnocení 2D gelů  
(vizuálně nemožné)
- Převedení zobrazení do formy digitálních dat (pomocí skeneru nebo kamery)
- Analýza pomocí speciálního SW

# Cíle experimentu

- Definice jasně stanovených otázek – cílů (potvrzení hypotézy, soustředění se na úzce vymezený problém)
- Stanovení počtu a typu replik (umožňují statistické zpracování experimentálních údajů)
- Typ barvení
- Kontrolní vzorky, standard

# Experiment

- Cíle experimentu
- Příprava vzorku
- 2 DE
- Barvení
- Snímání obrazu
- Analýza obrazu - vyhodnocení
- Vyřezání vybraných spotů
- Digesce
- Identifikace
- (Zdroje chyb, variability)

# Biologické a technické repliky

- Biologické – vzorky z různých organismů téhož druhu, stejný „treatment“  
(x rostlinek Arabidopsis, x různých pacientů se stejným typem nádoru apod.), stanovení biologické diverzity - rozmanitosti
- Technické – stejný vzorek, stejný „treatment“ (reprodukovatelnost)
- Rozhodnutí o použití je nutné udělat před přípravou vzorku

# Dvourozměrná elektroforéza

- 1.rozměr – izoelektrická fokusace (pI)
- 2.rozměr – elektroforéza v polyakryamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (Mr)

# Barvení proteinů

- Viditelné barvení – Coomassie brilliant blue, stříbro
- Fluorescenční barvení – Sypro Ruby, Flamingo Pink, Deep Purple, Oriole, Lumitein
- Radioaktivní značení

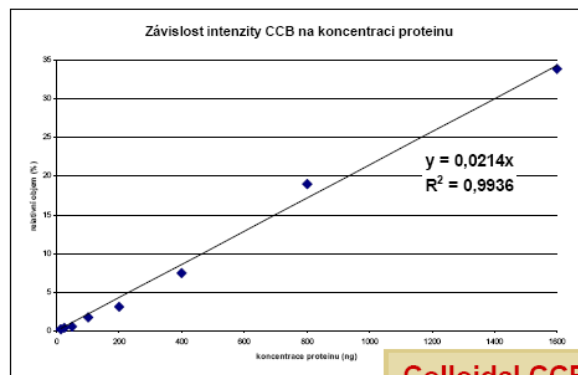
# Barvení proteinů

## Obecné požadavky na vizualizaci proteinů

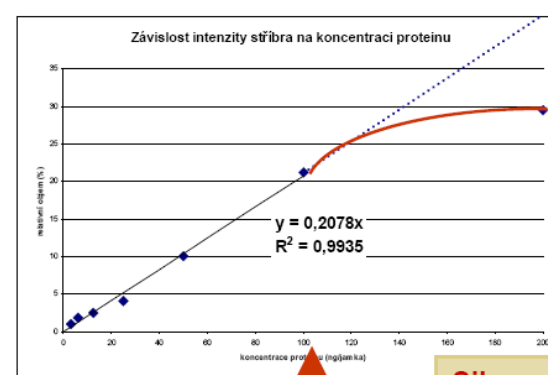
- vysoká citlivost
- široký lineární rozsah závislosti intenzity barvičky na množství proteinu v gelu
- kompatibilita s následnými analýzami



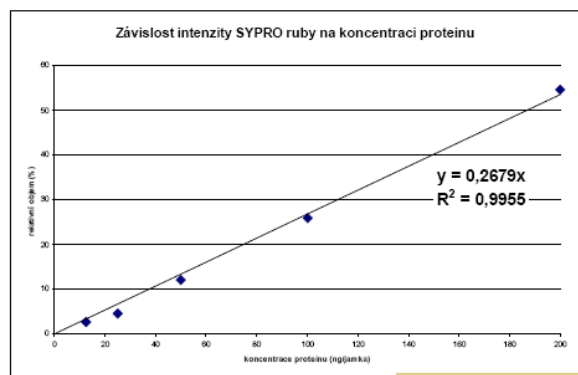
# Barvení – rozsah lineární závislosti intenzity barvičky na koncentraci proteinu



Colloidal CCB



Silver



SYPRO Ruby

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

Při vyšších množstvích odklon od linearity.

**Lineární dynamický rozsah**

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

# Snímání obrazu

- Vizuální vyhodnocení gelu není možné (pouze orientační u viditelných barviček)
- Po obarvení gelu je nutné převést zobrazení na gelu do podoby digitálních dat

# Snímání obrazu

- Viditelné barvičky
  - denzitometry (GS-800)
- Fluorescenční barvičky
  - skenery (FLA 7000)
- Kamery

(Ex/Em spektrum se musí shodovat s Ex/Em charakteristikami přístroje)



# Snímání obrazu

- Signály z biologických vzorků jsou konvertovány do digitálních dat v odstínech šedé barvy
- Načtení ve formátu TIFF, nejčastěji 16 bitový, rozlišení 65 536
- Transformace skenovaných „images“ do „spot volumes“ - tento úvodní proces analýzy obrazu je důležitým krokem (často kritickým) – zvolená možnost může mít velký vliv na kvantifikaci dat

# Analýza obrazu

- Konečný cíl řady experimentů = identifikace množství proteinových spotů a interpretace důležitosti těchto spotů – v biologickém, fyzikálním nebo chemickém kontextu
- Výběr spotů, které se významně liší podle daného „designu“ experimentu
- Výběr pouze několika velmi významných spotů, které budou případně použity jako budoucí marker
- Pro odpovídající odpovědi na zvolené otázky jsou často nutné rozdílné přístupy
- Cíl – zabránit ztrátě významných spotů = najít všechny spoty, které vykazují významné rozdíly (s vědomím, že mohou být zvoleny také irelevantní spoty – falešná pozitivita)

# Analýza obrazu – cíle, očekávání

Vychází z cíle experimentu

- srovnání gelů „treated“ a non-treated“ vzorků,
- detekce „up and down regulated proteins“
- interpolace izoelektrických bodů a MW,
- detekce nových, chybějících nebo modifikovaných proteinů,
- kvantifikace spotů,
- určení pozice spotu pro následné vyřezání,
- detekce a charakterizace skupin proteinů, drah a řetězců,
- statistická analýza experimentálních dat.

## 2 koncepty 2DE

- jeden gel – jeden vzorek
- mnohonásobná separace – DIGE gely

Princip:

proteiny v různých vzorcích značeny různými spektrálně odlišnými fluorescenčními barvičkami; směsný vzorek analyzován na jednom gelu; jiný způsob vyhodnocování, plně automatické, odpadá variabilita mezi gely

## DIGE gel





# SW

- Vývoj - kontinuální proces
- Spolehlivost
- Reprodukovatelnost
- Automatizace
- Srovnání gelů různých velikostí, tvarů, poškozených gelů
- Nesmí modifikovat „raw“ data

# SW

Přesná a správná práce v laboratoři je základem experimentu.

Sebelepší SW nedovede ze špatných podkladů vytvořit dobré výsledky.

Špatné vyhodnocení může zmařit předchozí dobrou práci.

# SW – přehled dostupných programů

- **Delta 2D**
- **ImageMaster**
- **Melanie**
- **Progenesis**
- **PDQuest**
- **Redfin Ludesi**

Různá filozofie, různý stupeň možností zasahovat do vyhodnocení, různá cena, možnosti statistických vyhodnocení.

# Melanie - SW



# Ludesi

dauid 101215 - [AD,AK vs ED,EK] - Ludesi REDFIN 3

Back to start page

Visual Controls: List, Gel, Spot, Enhance contrast, Show in color

Statistics, Export

AD,AK vs ED,EK | AD,ED vs AK,EK | AD vs AK | AD vs ED | AD vs EK | AK vs EK | ED vs EK | AK vs ED

Showing protein 1 out of 66 (filtered)

Search, Push to set location filter, Protein ID, Location

Push to set profile filter

Profile	Fold change	Anova	Mann-W	Presence %	Volume	Rating
2	No filter	No filter	No filter	No filter	No filter	★
24	48.55	1.037e-7	0.0022	75	2583	★

Size, Zoom, Edit Spots, Show nearby borders

AD,AK

ED,EK

Enter comments here

Spread plot, Bar plot

Click and drag on the image to navigate

Start | Doručená pošta - Mo... | Email (0) - Mozilla Fire... | Seznam - Najdu tam... | Prezentace kurz | Kopie - Image analysi... | dauid 101215 - [AD,A... | 7:31



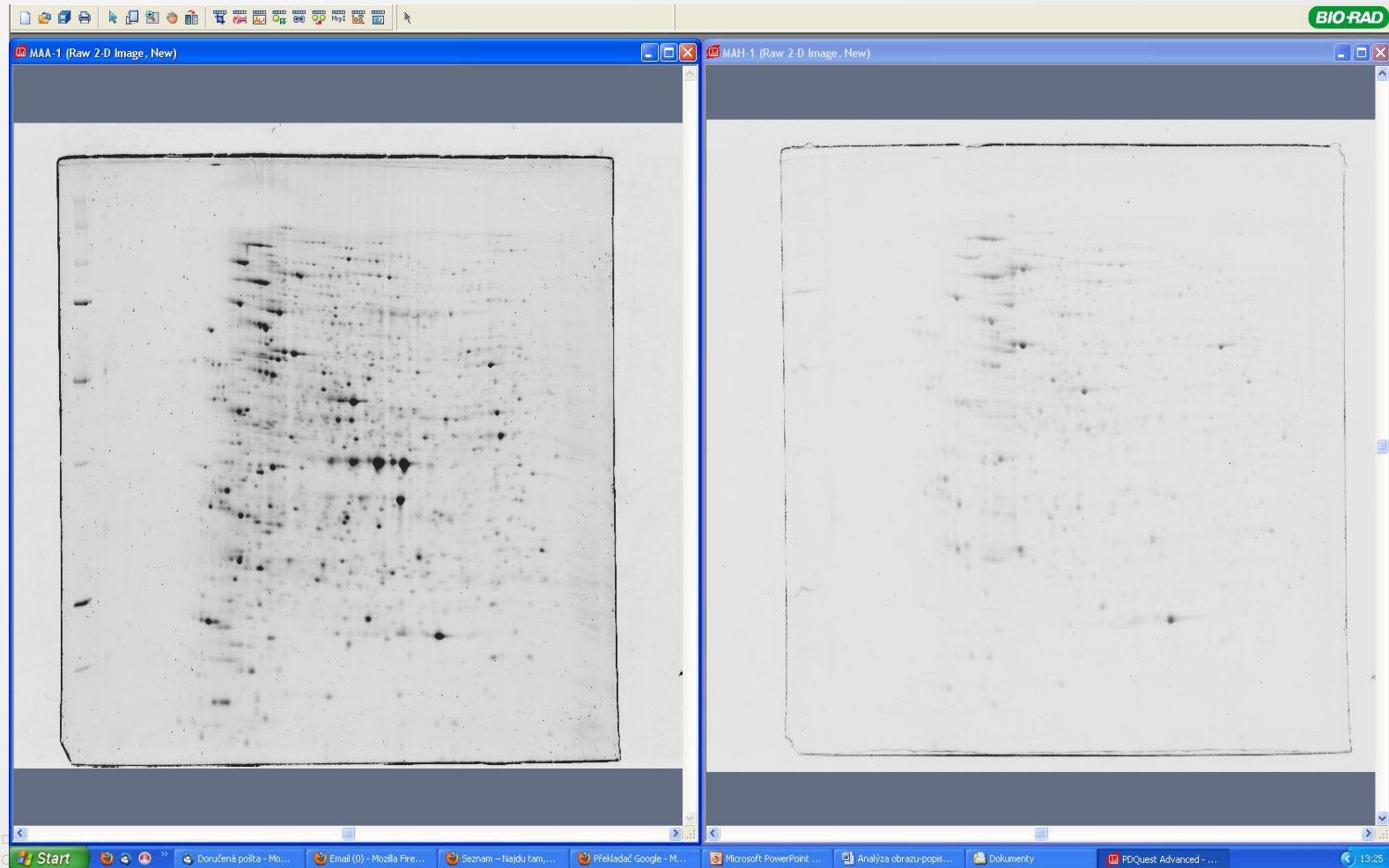
# Nejkritičtější části analýzy obrazu

- Správná detekce spotů
- Odečet pozadí
- Nesmí být modifikována základní data
- Výsledky analýzy jsou ovlivněny kvalitou a filosofií daného programu, manuální editování je vždy ovlivněno uživatelem.

# Vyhodnocování pomocí PDQuestu

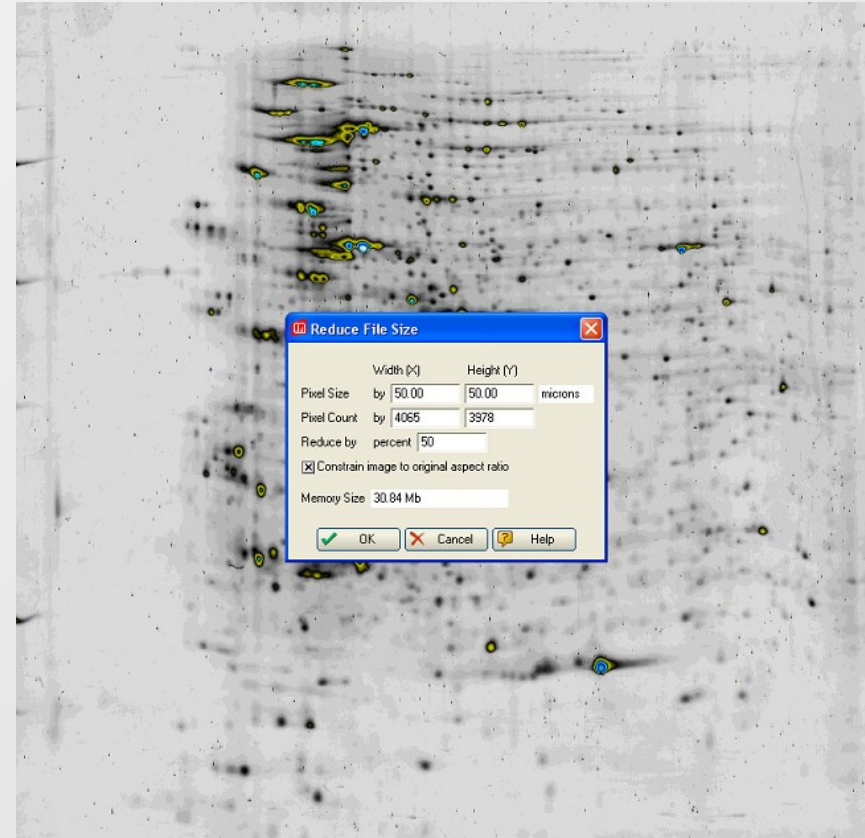
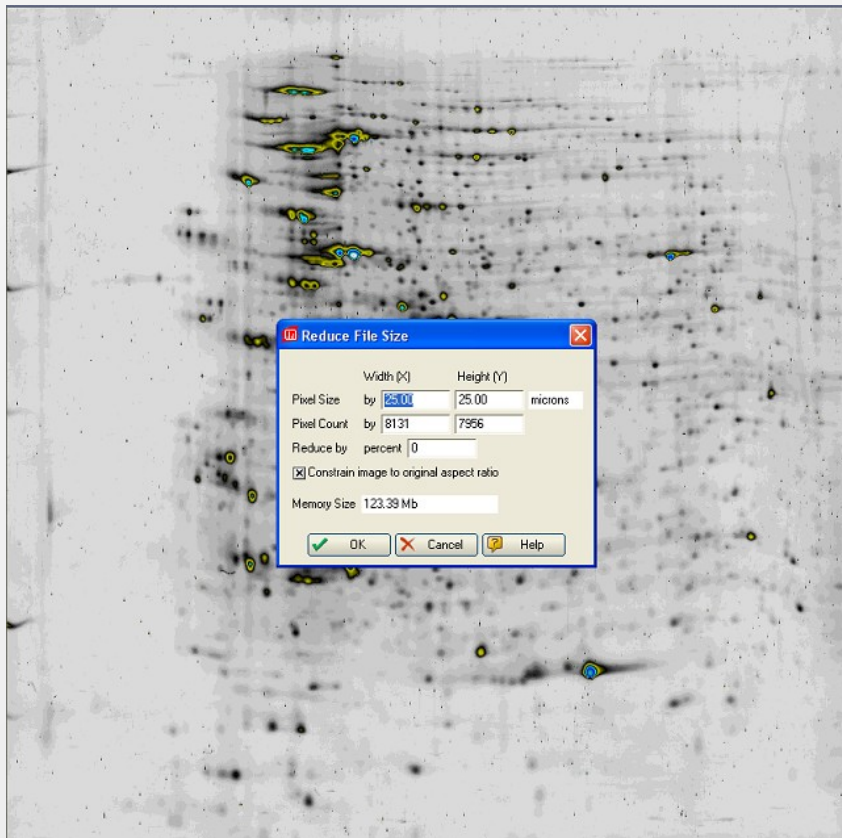
- Skenování gelu
- Úprava obrázku - rotace, redukce, transform, cropping
- Experiment Wizard
- Načtení upravených obrázků
- Vytvoření skupin
- Zadání parametrů (faint spot, small spot, largest cluster)
- Detekce spotů a analýza pozadí
- Vytvoření „master“ gelu a přiřazení spotů
- Editace
- Normalizace
- Analytické sety
- Výběr spotů pro další analýzu

# PDQuest – načtení gelu ve formátu TIFF



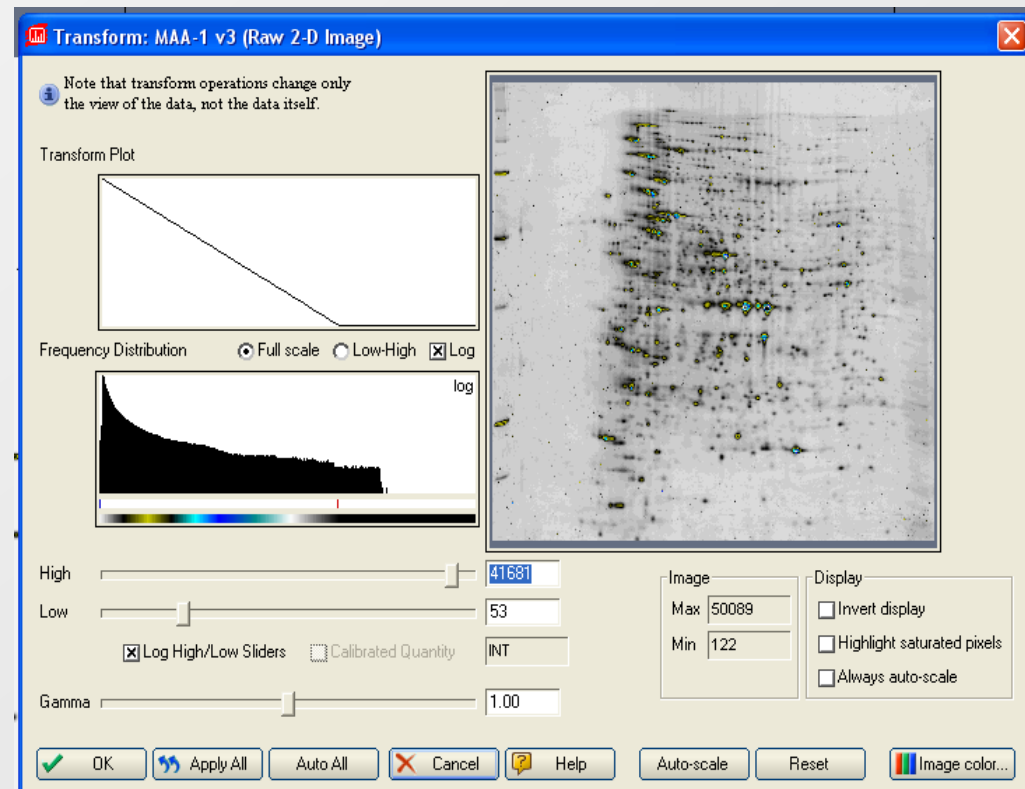


# Redukce obrázků

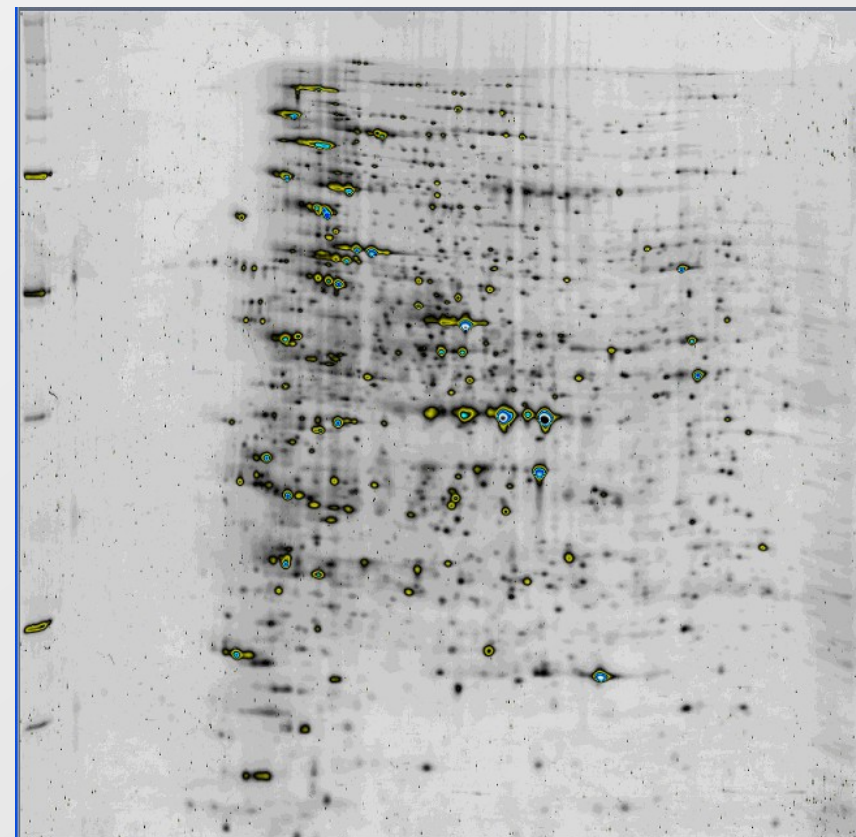
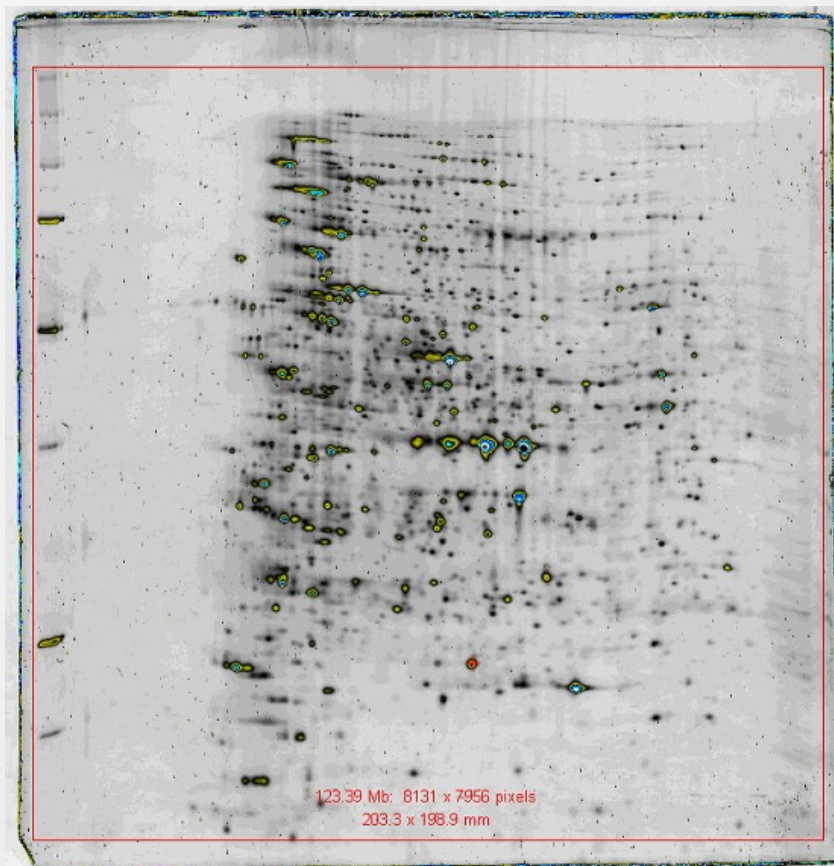


# Úprava

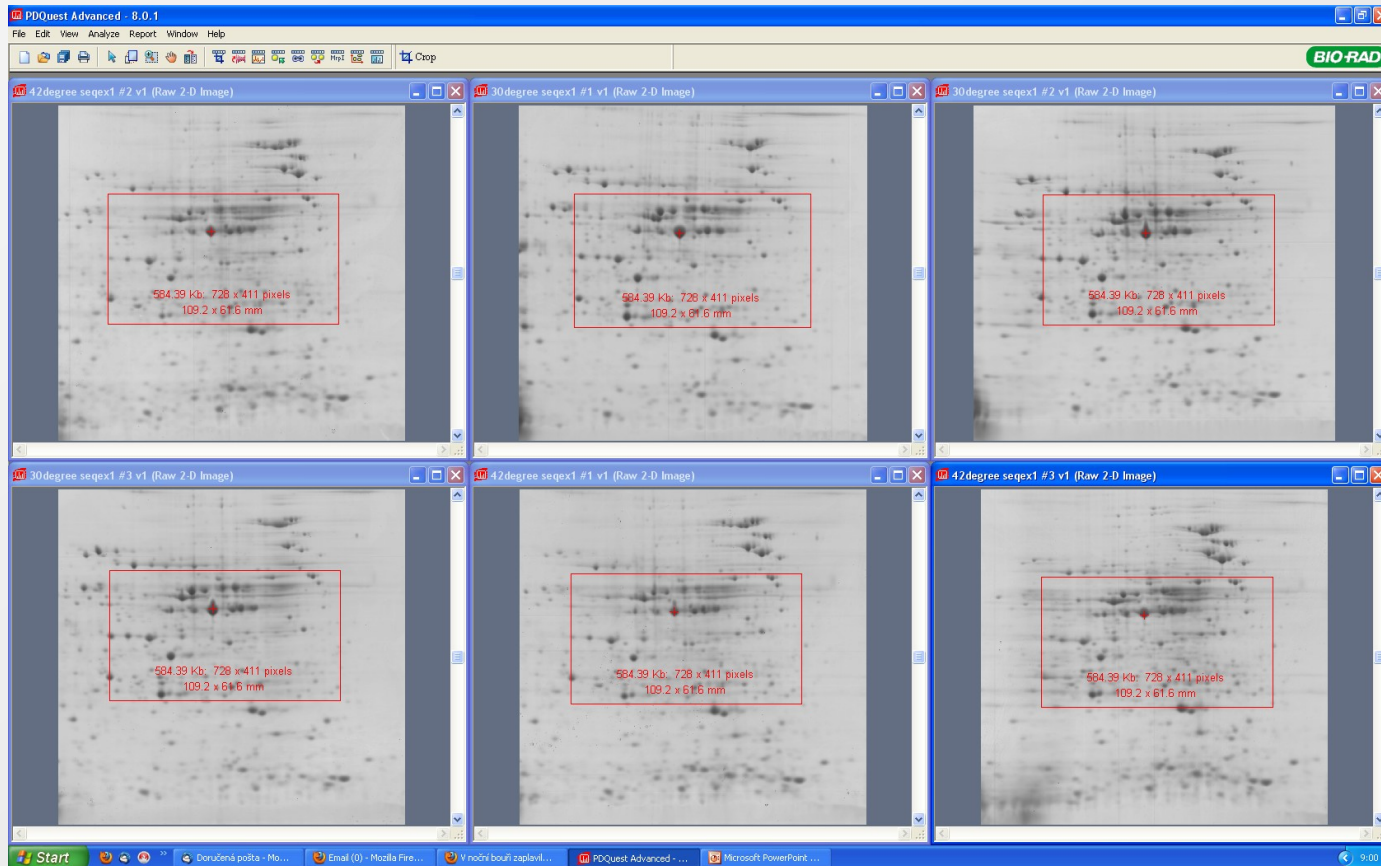
- Vertical/horizontal flip
- Transform
- Rotation
- Image cropping



# Úprava obrázku - cropping

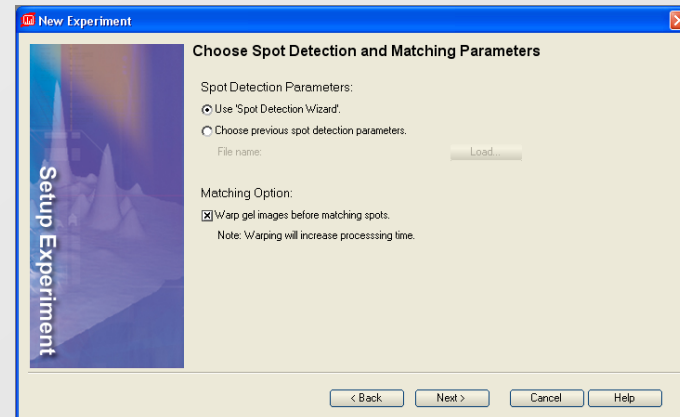


# Úprava obrázku - cropping



# Detekce spotů a filtrace pozadí

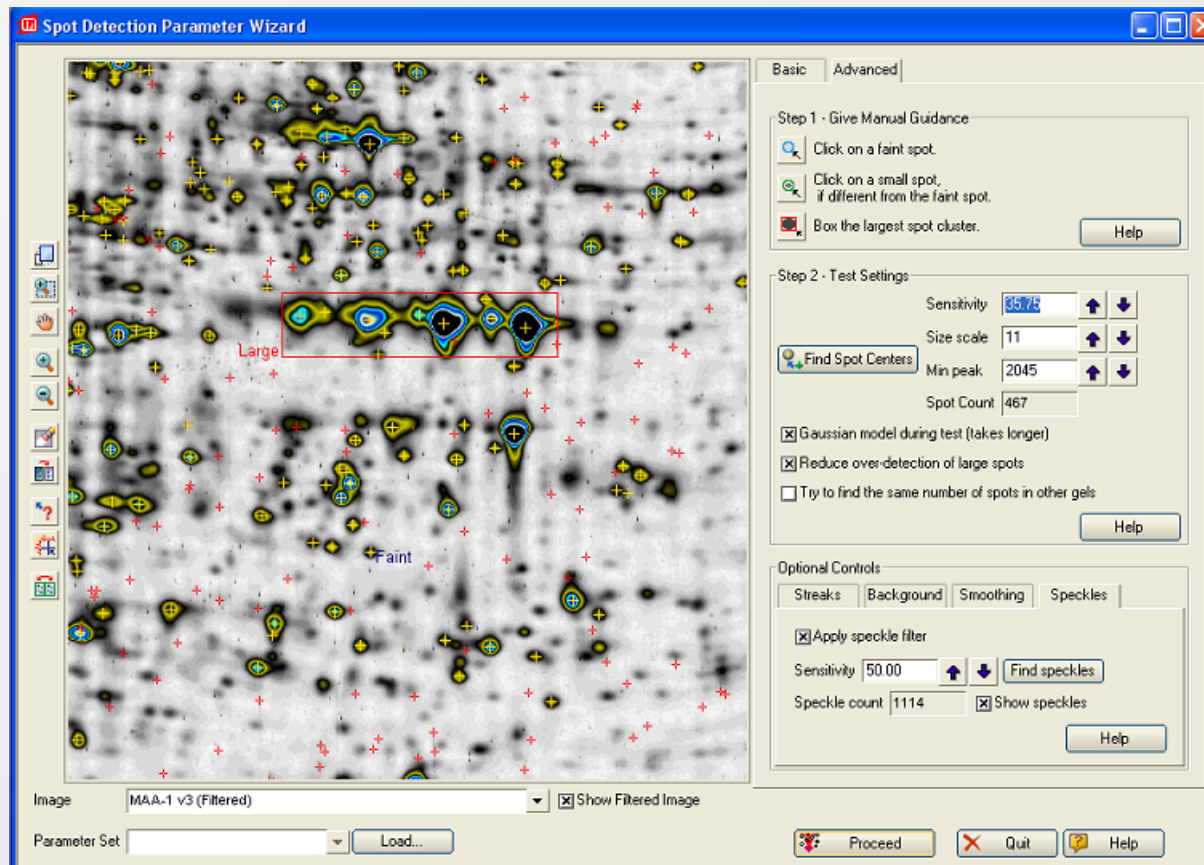
- Spot detection wizard – průvodce nastavením parametrů (step by step)
- Nastavení parametrů pro vyhledání spotů a odfiltrování pozadí
- Různé gely – různé parametry nastavení



# Detekce spotů a filtrace pozadí

- **Faint spot** – sensitivity and minimum peak value parameters
- **Small spot** – size scale parameter
- **Large spot cluster** - radius of the background substraction rolling ball and the streak removal rolling disk
- **Background substraction** is required for spot detection, method used – floating ball, the default radius size is calculated automatically based on the largest spot cluster you want to detect

# Detekce spotů a filtrace pozadí



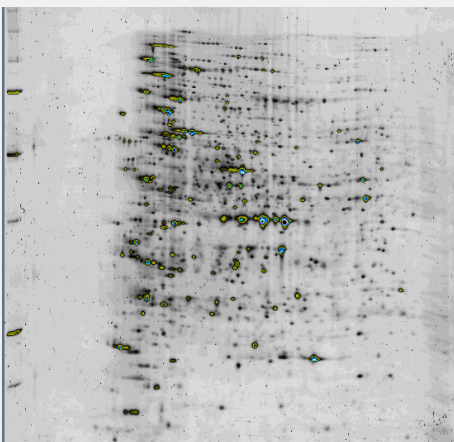
# Detekce spotů a filtrace pozadí

Scanset

3 zobrazení každého gelu

- původní (Raw 2-D scan)
- filtrovaný
- Gaussovský

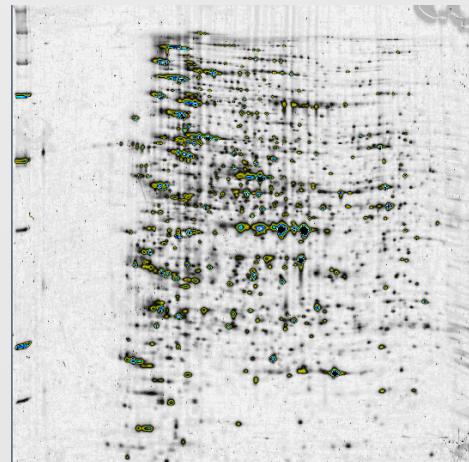
Raw 2D image



Gaussian



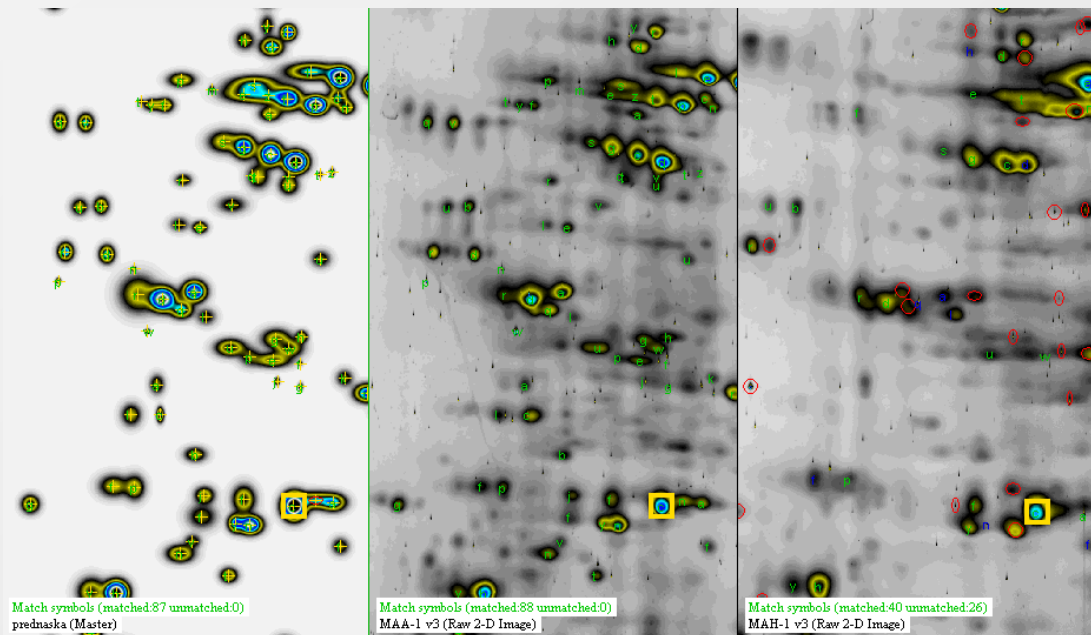
Filtered



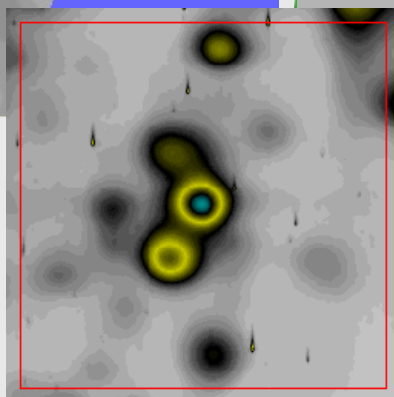
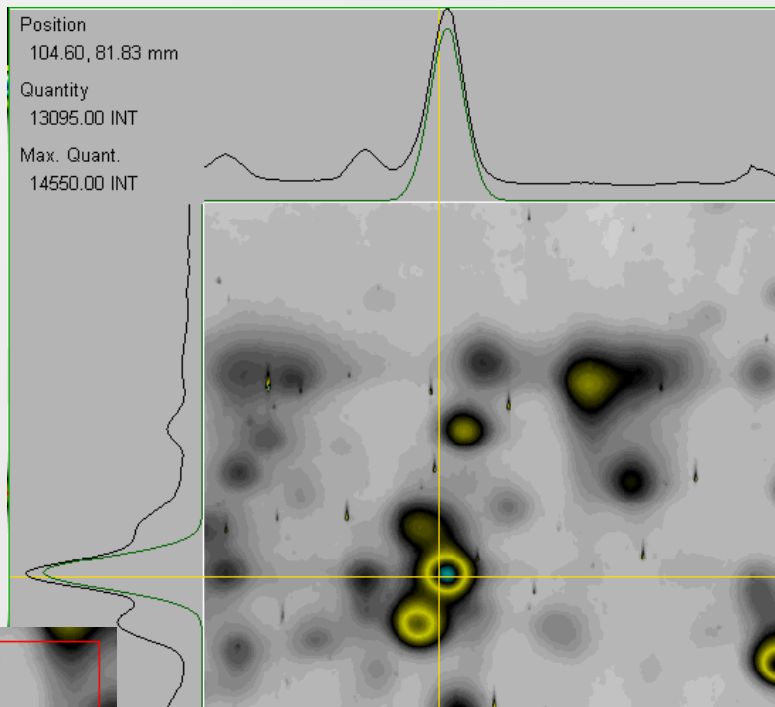
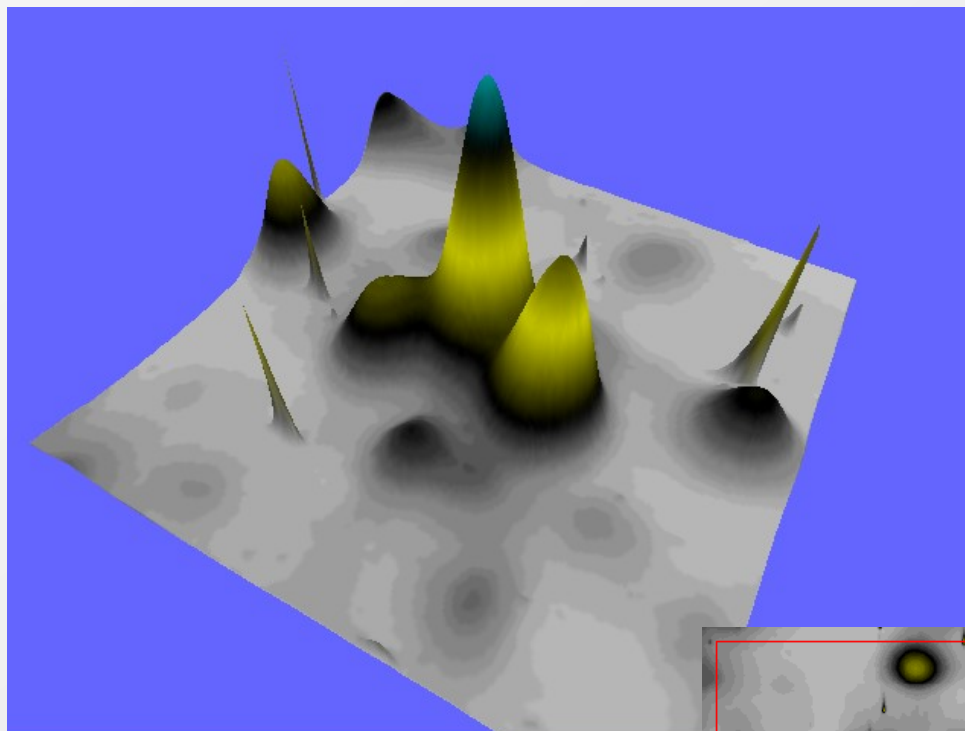


# Match Set

- Soubor gelů porovnávávaných navzájem v rámci experimentu
- Master gel = uměle vytvořený gel
- Prostřednictvím Master gelu jsou gely srovnávány mezi sebou



# Editování



# Experiment summary

- Experiment summary – počet spotů, matched spots, CV
- **Match rate 1** – the percentage of matched spots relatively to the total number of spots on the member (gel)
- **Match rate 2** – the percentage of matched spots on the gel relative to the total number of spots on the master gel

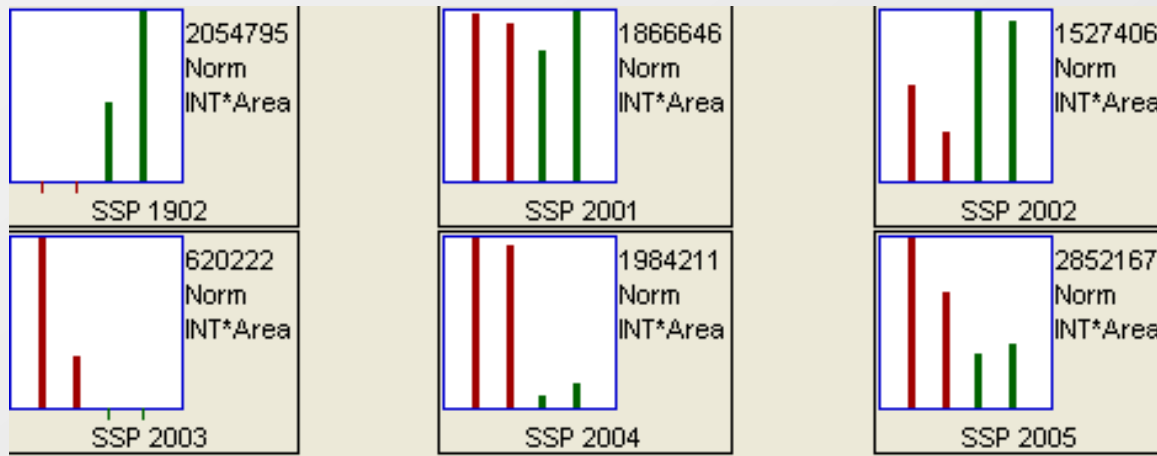
# Normalizace

- Rozdíly ve velikosti spotů a intenzitě (mezi gely) – nejsou způsobeny rozdílnou expresí
- Variace způsobené různými faktory – pipetování, příprava a zpracování vzorku, barvení.....

**NORMALIZACE** = předpoklad pro správné srovnání kvantity spotů

# Spot quantity

- celková intenzita definovaného spotu v daném zobrazení gelu (pro výpočet se používá gaussovské zobrazení spotu)
- koresponduje s množstvím proteinu v aktuálním spotu



# Spot quantity

**Spot quantity** = celková intenzita definovaného spotu v gelu, odpovídá množství proteinu v aktuálním spotu

Pro výpočet kvantity gaussovského spotu v PDQuestu platí:

$$\text{spot height} \times \pi \times \sigma_x \times \sigma_y$$

spot height – (peak value) – pík gaussovského zobrazení spotu, měří se v OD nebo image units

1 image unit (IU) = 100 mikrometrů nebo 0,1 mm

$\sigma_x$  = SD gaussovského rozdělení spotu ve směru osy x (v IU)

$\sigma_y$  = SD gaussovského rozdělení spotu ve směru osy y (v IU)

# Normalizace

- Kompenzace rozdílů nezpůsobených a nesouvisejících s vlastní expresí
- Provádí se pro každý gel v experimentu
- Zahrnuje:
  - nenormalizovanou intenzitu spotu
  - „scaling“ faktor – volí si uživatel
  - faktor kompenzující chyby pipetování
  - normalizační faktor (v závislosti na zvolené metodě)

# Metody normalizace

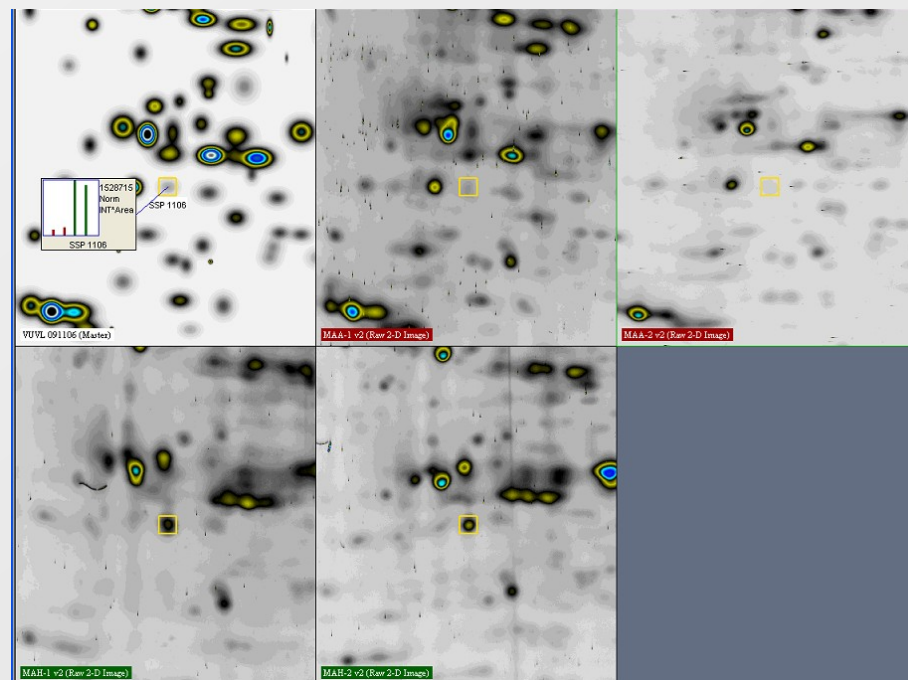
- Total quantity in analysis set
- Total quantity in valid spots
- Total density in gel image
- Specified value
- Mean of log ratios
- Local regression model



# 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)



# Analytické sety

Tři typy analytických setů:

- kvalitativní
- kvantitativní
- statistické (pouze pro replikativní skupiny)
- Booleovy analytické sety

Analysis Set Template - VUVL 091106 (Experiment)

Name:

Description:

Options:

- Estimate missing spots
- Estimate saturated spots
- Include qualitative changes (Min. fold over background:

Compare:

- Gels
- Repl. Gels
- Classes

A:

B:

Method:

- Above upper limit
- Below lower limit
- Between limits
- Outside limits

Plot type:

- Histogram
- Scatterplot

Log scale

Upper limit:

Lower limit:   = 1/upper

Mark spots:  Mark spots  Hide other sets

Mark spots on:

- Master gel
- Operand gels
- All gels

Show:

- Window labels
- SSP number

Format:

Spot count:

# Prezentace výsledků

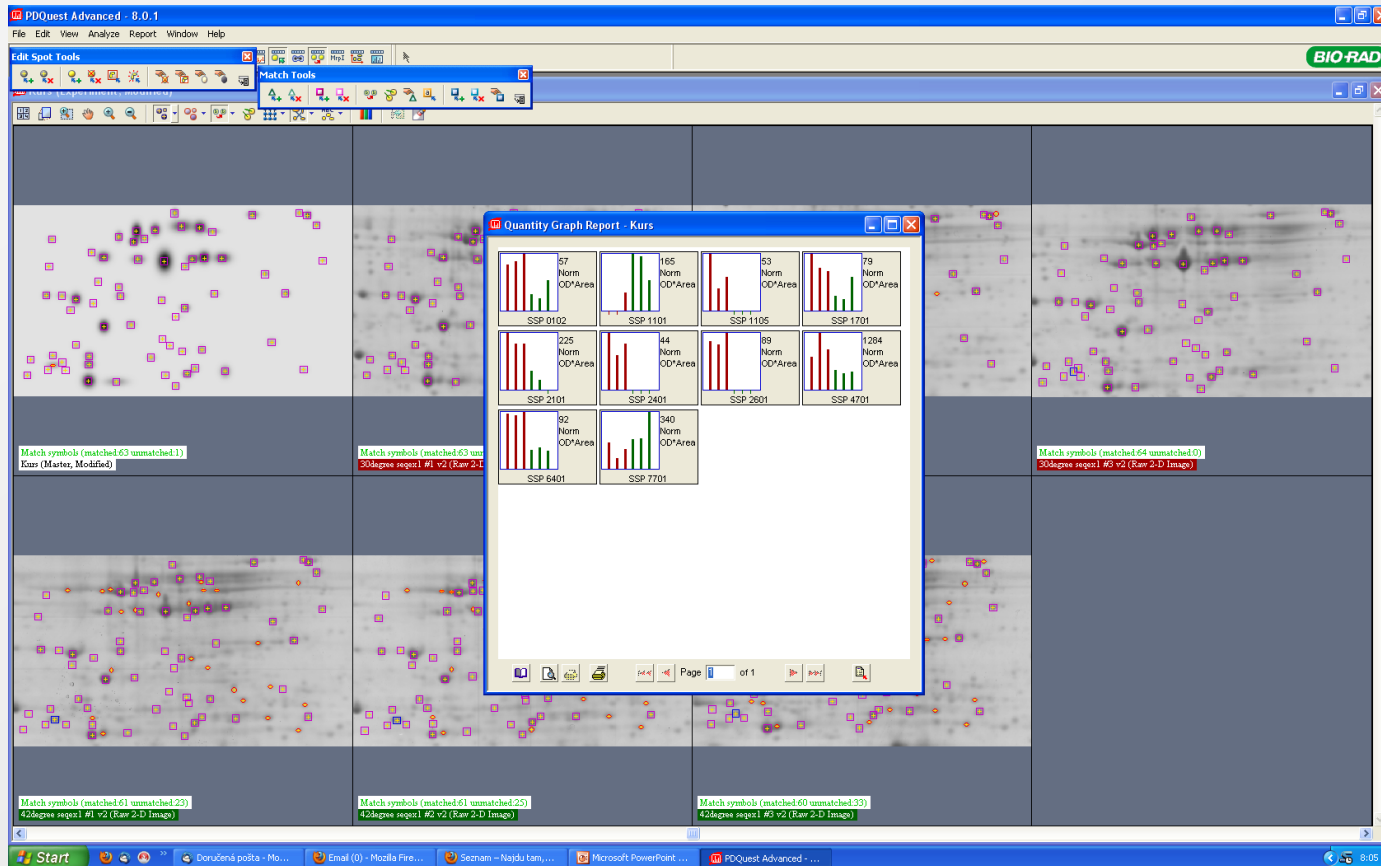
The screenshot displays the PDDQuest Advanced software interface. The main window shows a grid of spot images with various colored markers (red, green, blue, orange) overlaid on them. A central window titled 'Quantity Table Report - Kurs' is open, displaying a table of data. The table has columns for 'SSP', '30degree', 'Ratio', '42degree', and another 'Ratio'. The data rows are as follows:

SSP	30degree	Ratio	42degree	Ratio
0102	51.1	1.00	19.8	0.39
1101	53.1	1.00	136.7	2.57
1105	35.1	1.00		0.02
1701	64.6	1.00	27.7	0.43
2101	197.2	1.00	56.0	0.28
2401	35.4	1.00		0.02
2601	78.7	1.00		0.01
4701	984.3	1.00	405.7	0.41
6401	89.8	1.00	31.2	0.35
7701	112.3	1.00	232.8	2.07

Below the table, there are navigation controls including 'Page 1 of 1' and various icons. The software interface also includes a menu bar (File, Edit, View, Analyze, Report, Window, Help), a toolbar with 'Edit Spot Tools' and 'Match Tools', and a 'BIO-RAD' logo in the top right corner. The taskbar at the bottom shows the Start button and several open applications.



# Prezentace výsledků

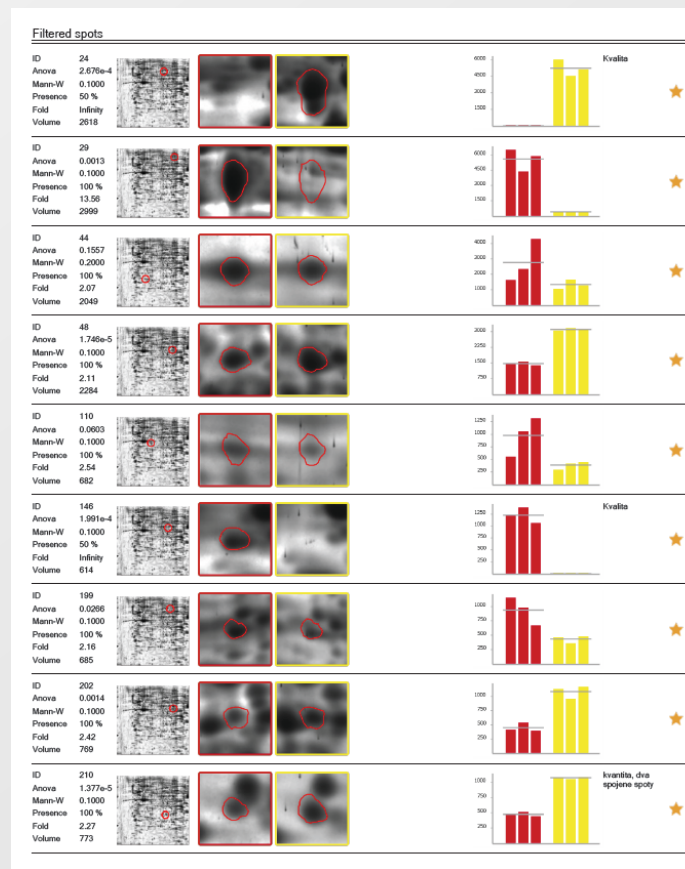
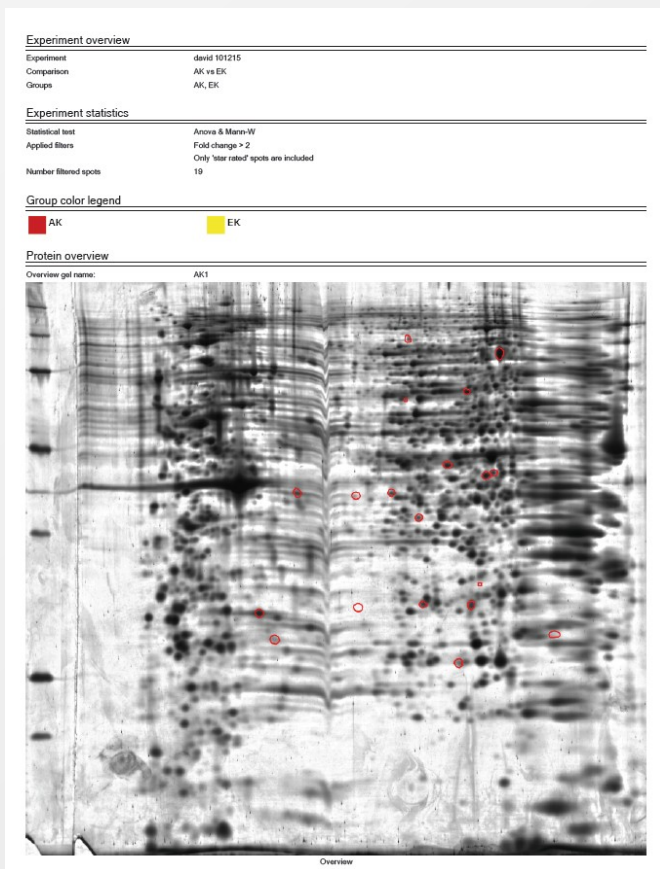


# Prezentace výsledků

The screenshot displays the PDDQuest Advanced software interface. The main window shows a 2D gel electrophoresis image with several spots marked by colored squares (red, green, blue, orange). A central window titled "Experiment Member Report - Kurs" is open, showing a zoomed-in view of a specific spot with its coordinates (1701, 2601, 2401, 6401, 0102, 1105, 2101). The main window has a grid of images with status bars indicating match counts for each region:

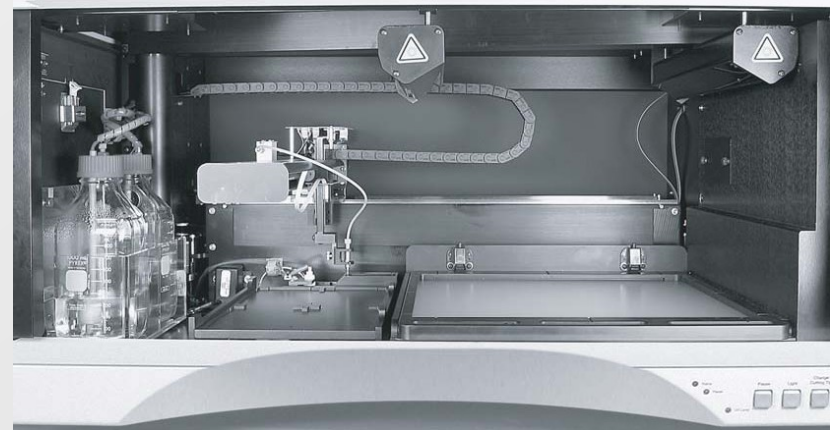
- Top-left: Match symbols (matched:63 unmatched:1) Kurs (Marker, Modified)
- Top-middle: Match symbols (matched:63 unmatched:1) 30degree seqe1 #1 v2 (Raw 2-D Image)
- Top-right: Match symbols (matched:64 unmatched:0) 30degree seqe1 #3 v2 (Raw 2-D Image)
- Bottom-left: Match symbols (matched:61 unmatched:23) 42degree seqe1 #1 v2 (Raw 2-D Image)
- Bottom-middle: Match symbols (matched:61 unmatched:25) 42degree seqe1 #2 v2 (Raw 2-D Image)
- Bottom-right: Match symbols (matched:60 unmatched:23) 42degree seqe1 #3 v2 (Raw 2-D Image)

# Prezentace výsledků - Redfin Ludesi



# Řezání spotů

- Manuálně  
(viditelné barvičky,  
transluminátor)
- Automaticky  
(spot cutter)



# Skladování gelů

- Uchovávání gelů:
  - $H_2O$  + případně přídavek azidu
  - vysušit a zatavit do fólie
- Zabránit kontaminaci keratiny – digesce keratinů probíhá stejně jako digesce hledaných proteinů – problémy při detekci slabších proteinů

## Digesce

- Štěpení trypsinem



## 2D elektroforéza

Neexistuje standardizace pro přípravu vzorků a průběh elektroforézy.

Není snadné srovnávat výsledky z různých laboratoří.

Protein nelze identifikovat pouze na základě jeho pozice v gelu.

Musí následovat identifikace – MALDI, LC MS/MS.

# Variabilita

- Rozdíly ve skupině vzorků- **biologická**
- **Technická** - váže se k používaným analytickým technikám, může být náhodná nebo systematická
- DIGE – snižuje variabilitu mezi gely

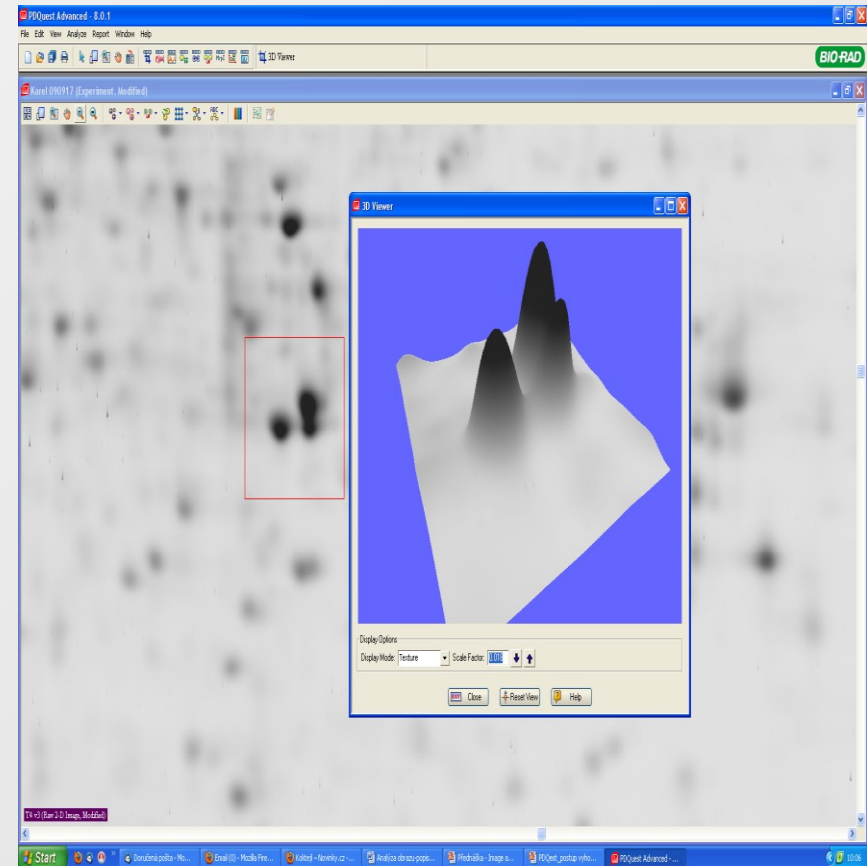
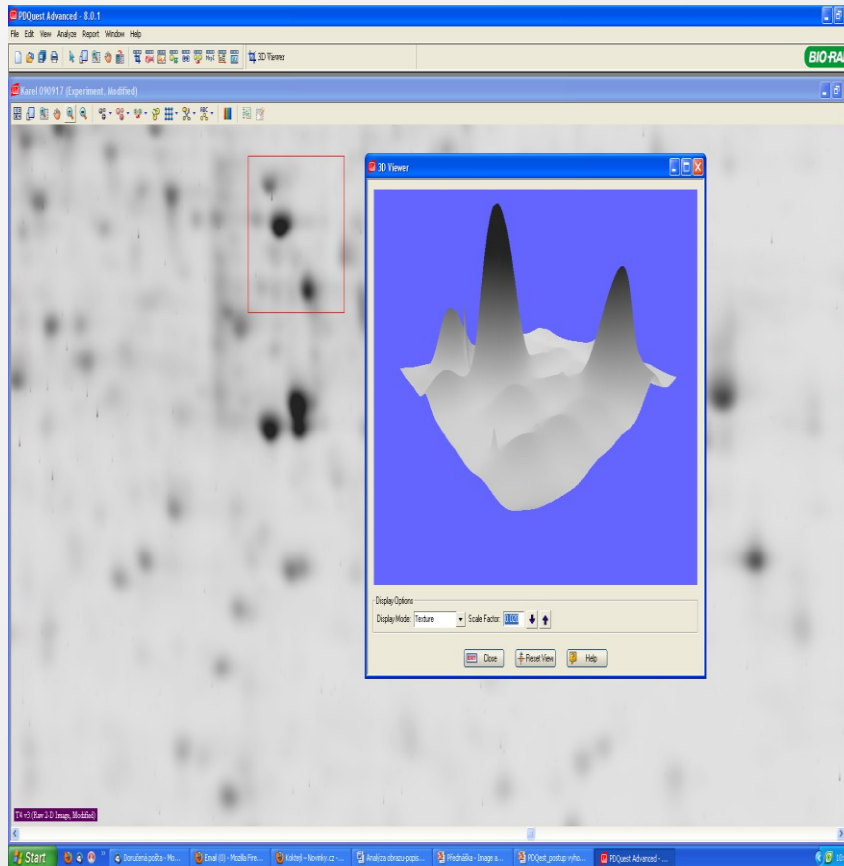
## Image analysis

- Image acquisition
- Background substration
- Specles, streaks
- SW – identifikace spotů, velikost a ohraničení spotu

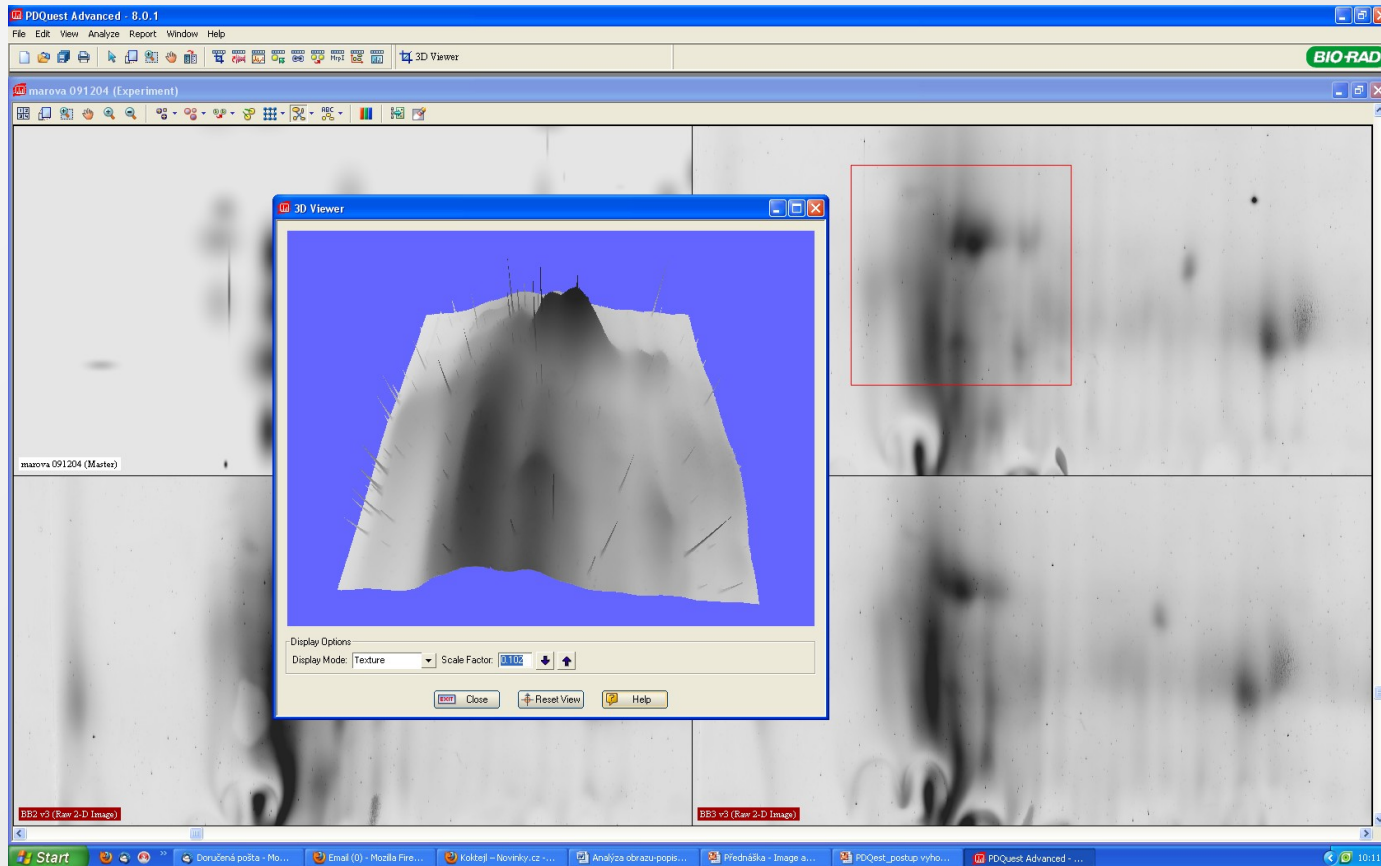
# Zdroje chyb

- Nedostatečná rehydratace stripu
- Neúplná absorpce vzorku na strip
- Neúplný přenos proteinů z prvního do druhého rozměru
- Barvení

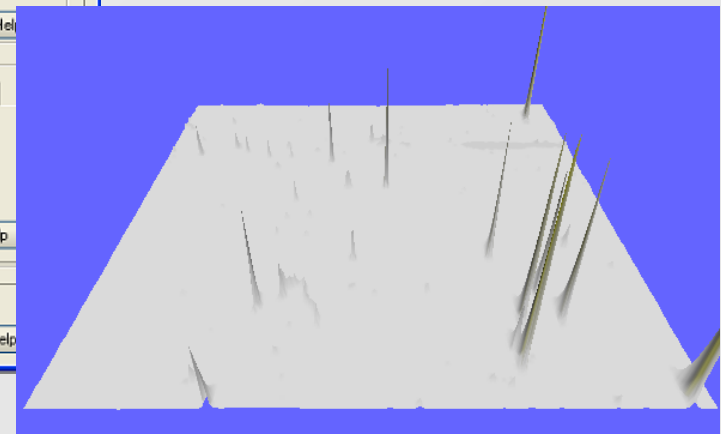
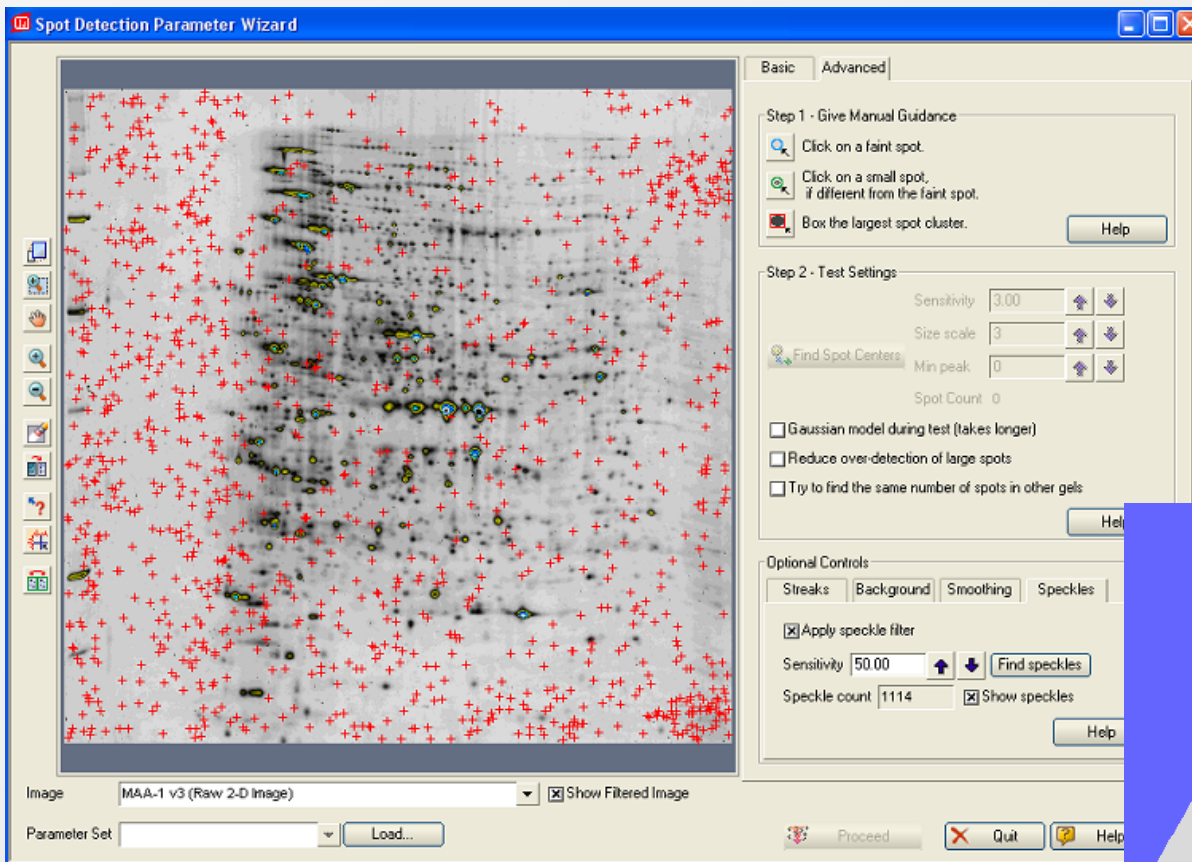
# Ohraničení spotu



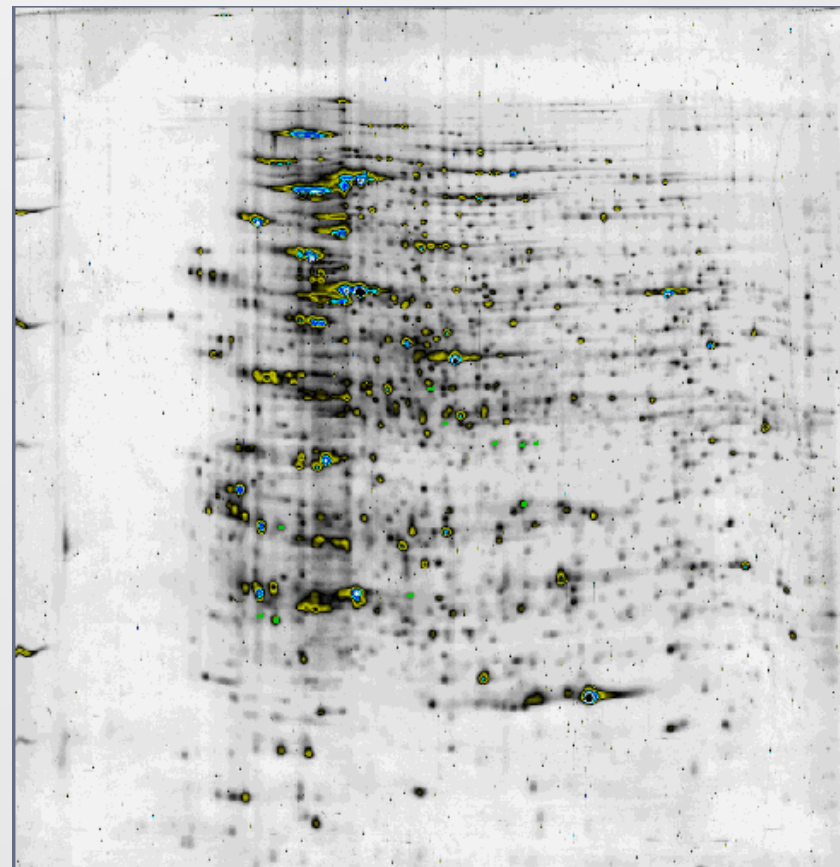
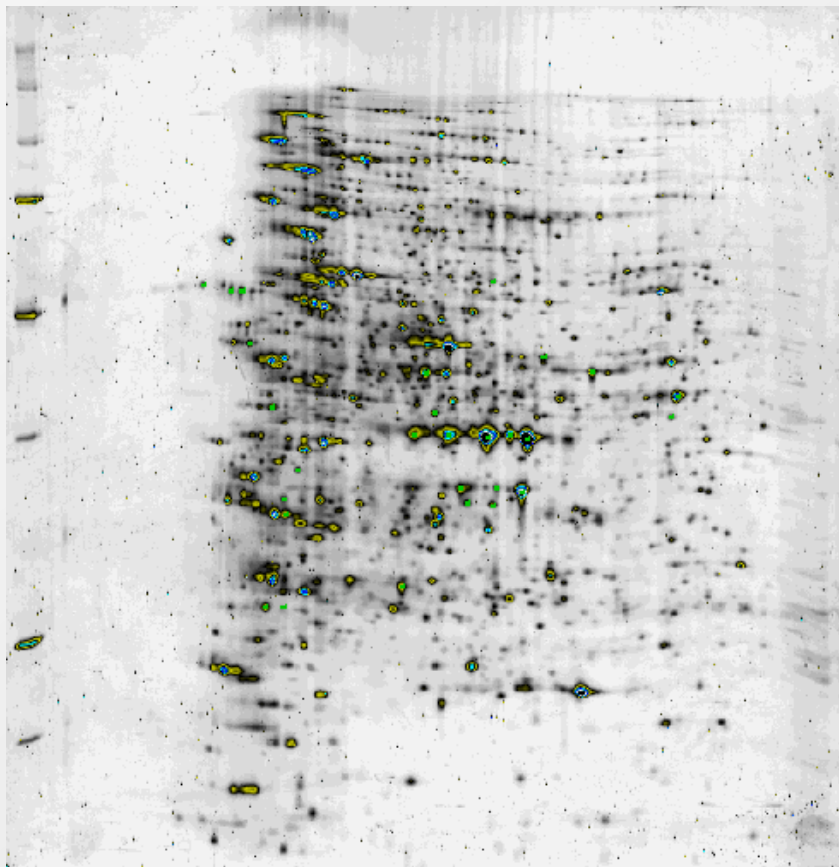
# Ohraničení spotu



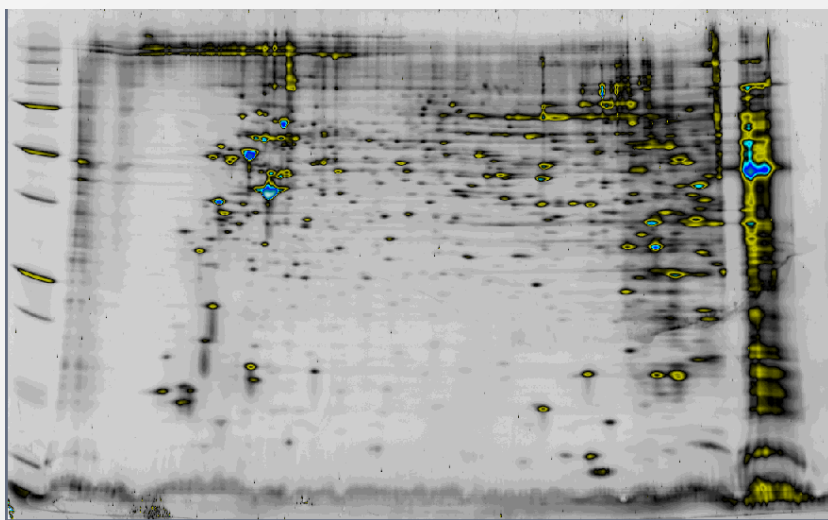
# Detekce - speckle



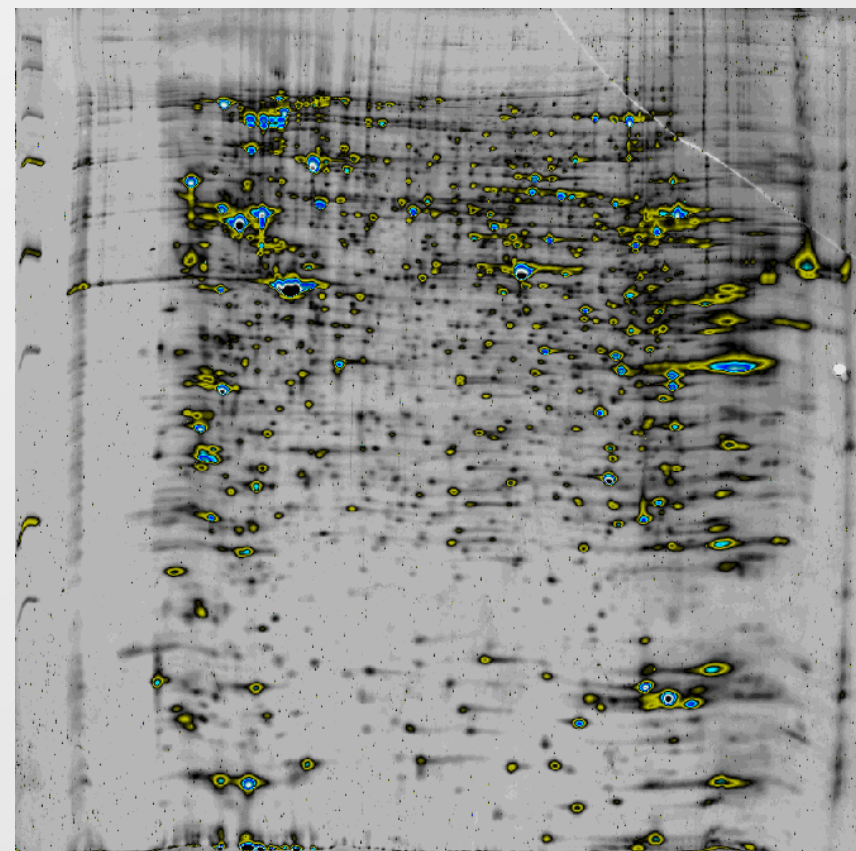
# Příklady



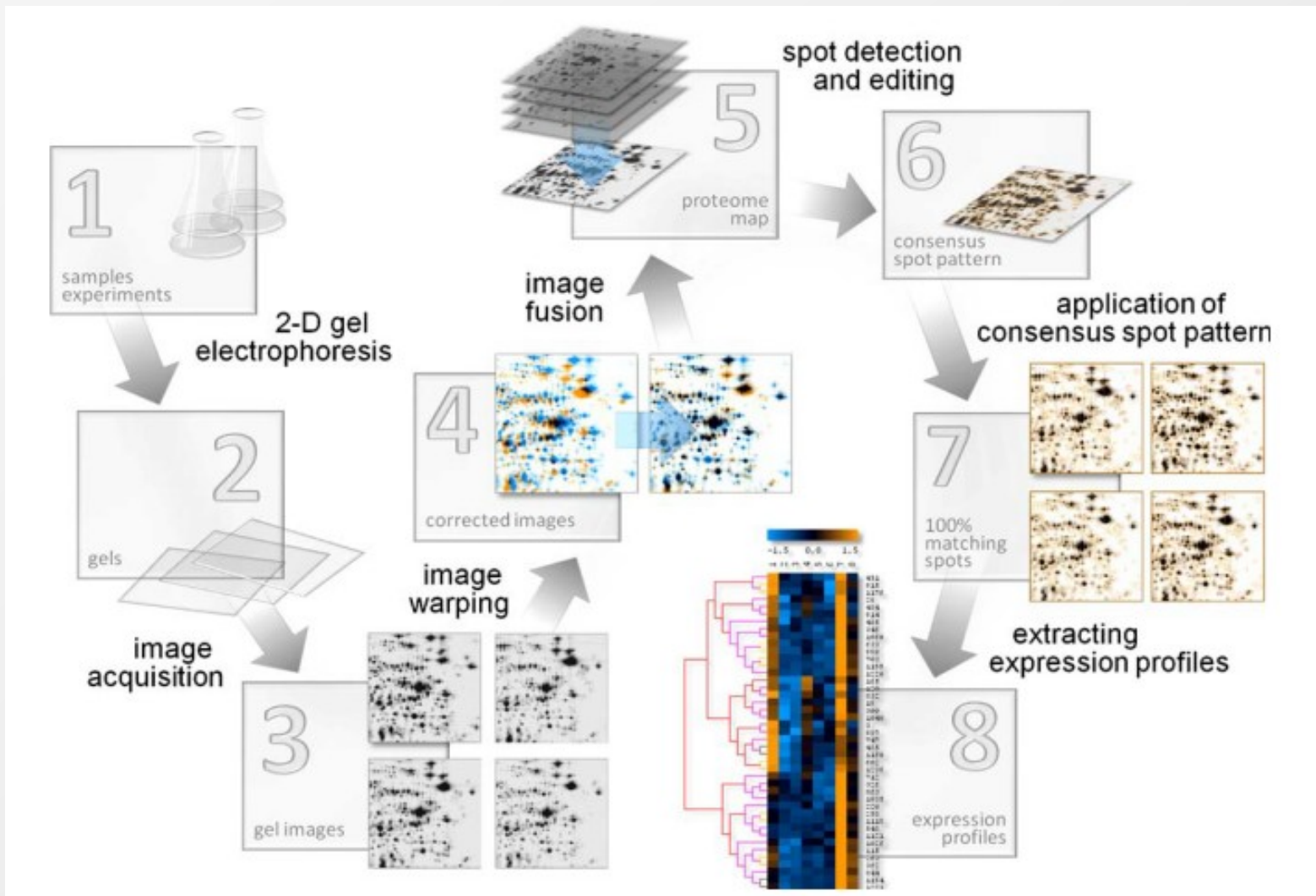
# Příklady



Stejný vzorek dělený na různých typech gelů







Tato prezentace vznikla s podporou projektu **OP VK**  
*„Rozvoj týmu pro výuku, výzkum a aplikace v oblasti funkční genomiky a proteomiky“* (CZ.1.07/2.3.00/09.0132)

## Děkuji za pozornost.

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

