



MASARYK UNIVERSITY

Analýza obrazu

Gabriela Lochmanová

CENTRÁLNÍ LABORATOŘ – PROTEOMIKA

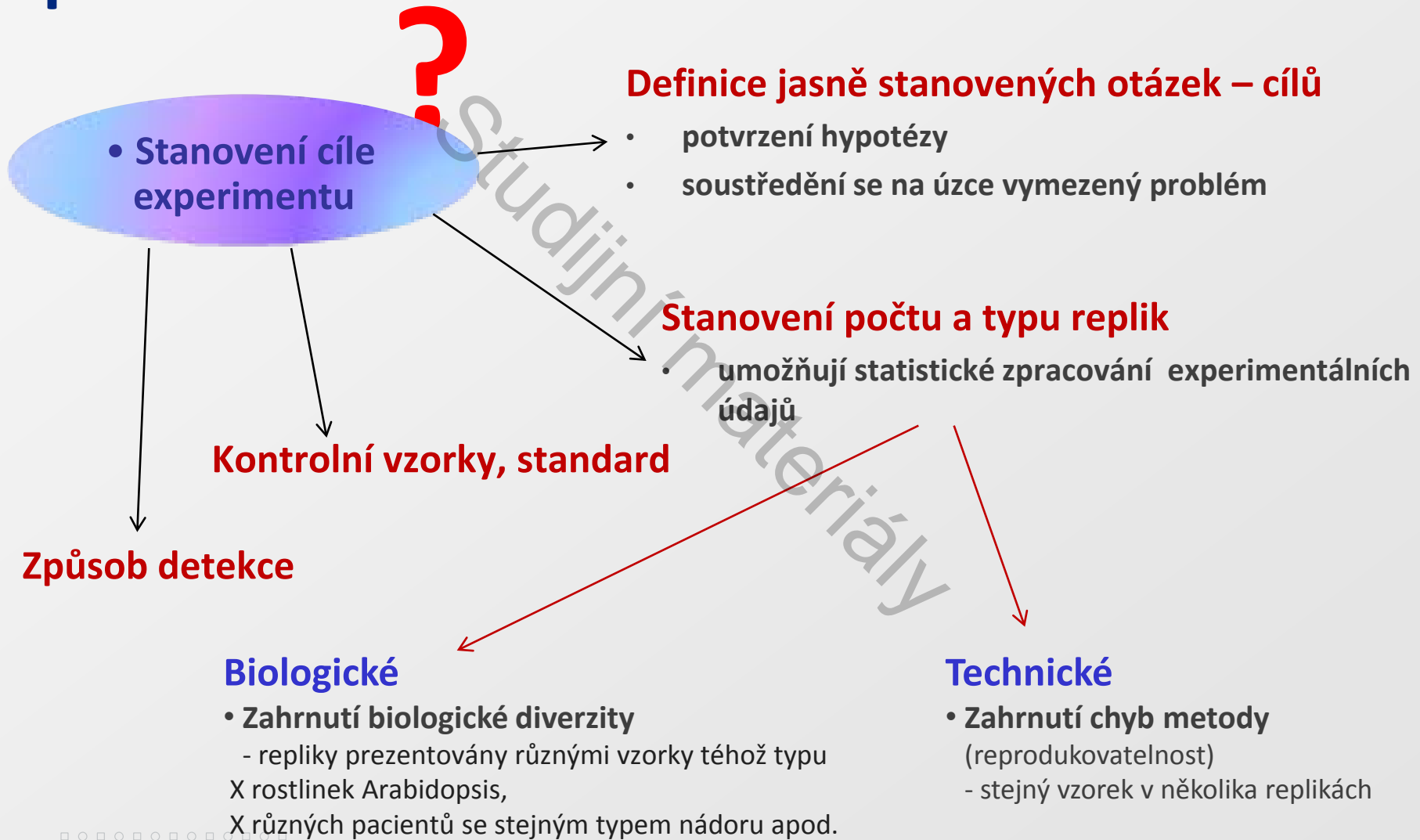
CEITEC – Středoevropský technologický institut

NCBR – Národní centrum pro výzkum biomolekul

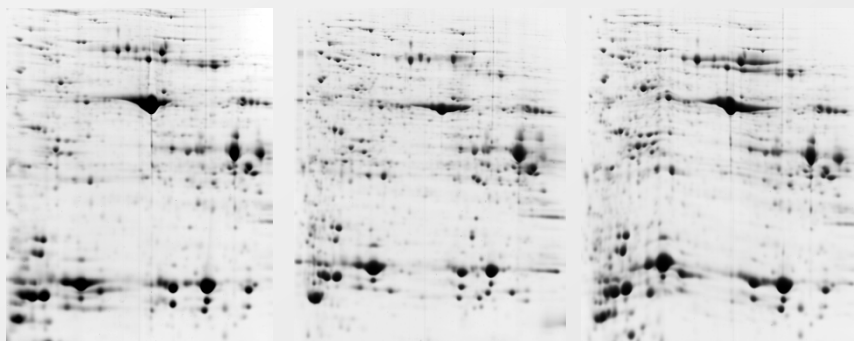
Přírodovědecká fakulta

Studijní materiály

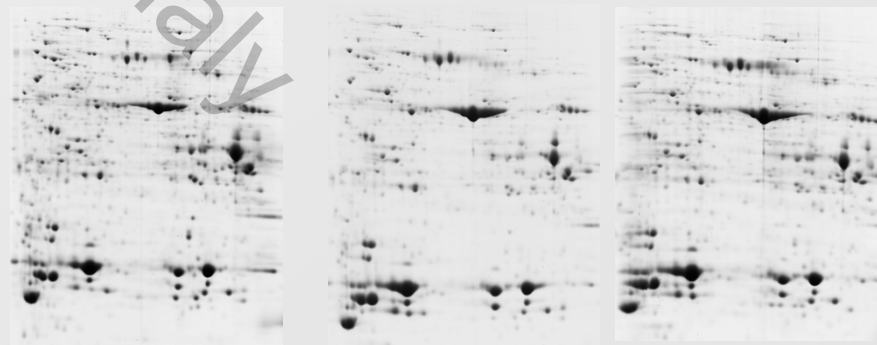
Experiment



Biologické repliky



Technické repliky



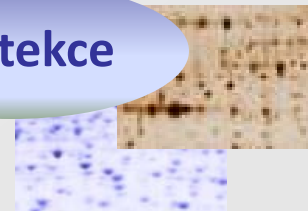
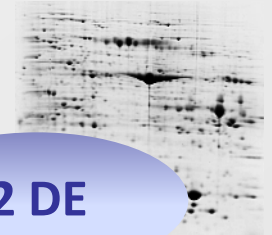
Experiment

- Stanovení cíle experimentu

- Příprava vzorku

- 2 DE

- Detekce



?

Studijní materiály



• **Detekce**

Obecné požadavky na vizualizaci proteinů

- vysoká citlivost
- kvantitativní barvení
- široký lineární rozsah závislosti intenzity barvičky na množství proteinu v gelu

Dynamický rozsah

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

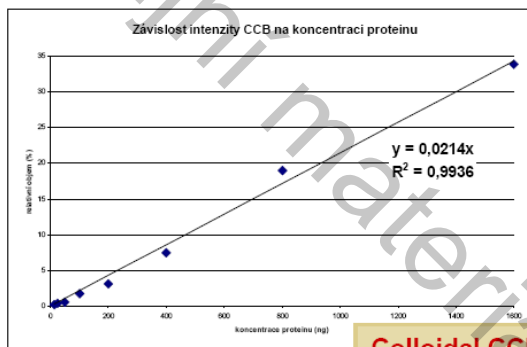
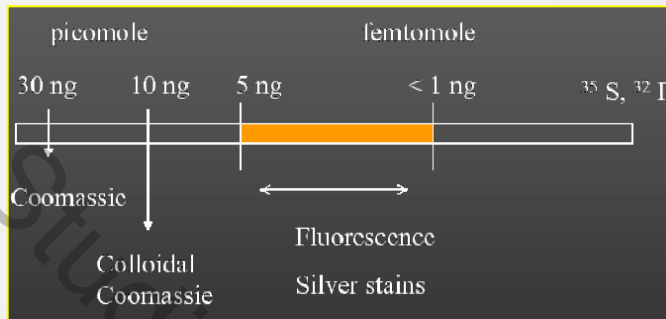
- end-point

- trvanlivost

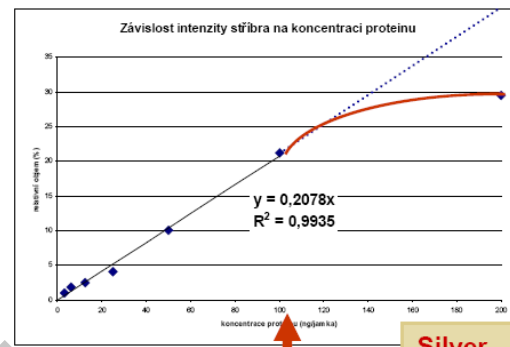
(např. zhášení fluorescenčních barviček!)

- kompatibilita s následnými analýzami

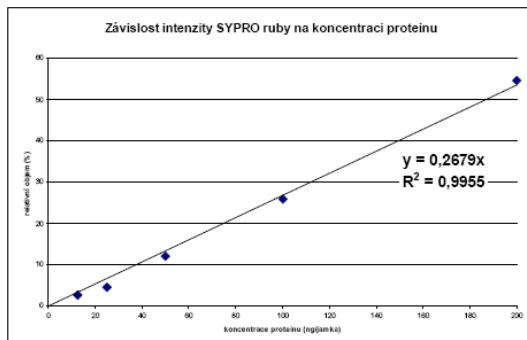
(např. stříbro - glutaraldehyd!)



Colloidal CCB



Silver



SYPRO Ruby

Barvení stříbrem

– lineární závislost pouze v rozmezí do 100 ng proteinu.

Při vyšších množstvích odklon od linearity.

• Detekce**Typy detekce**

Značení před analýzou (DIGE – CyDye, radioaktivní značení)

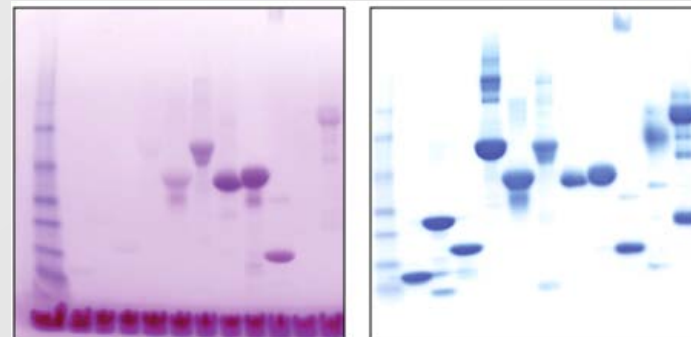
Barvení po analýze

Nespecifické barvení: všechny proteiny

- **Viditelné barvení:** **Coomassie brilliant blue** (R250, G250), **stříbro** (kyselá x amoniakální varianta)
- **Fluorescenční barvení:** **Sypro Ruby** (Ex/Em = 280, 450/610 nm), **Lucy** (Ex/Em = 506/520 nm), **Flamingo Pink** (Ex/Em = 512/535 nm), **Oriole** (Ex/Em = 270/604 nm), **Krypton** (Ex/Em = 520/580), **Deep Purple** (Ex/Em = 365, 520/610 nm), **Lumitein** (Ex/Em = 280, 450/610 nm)

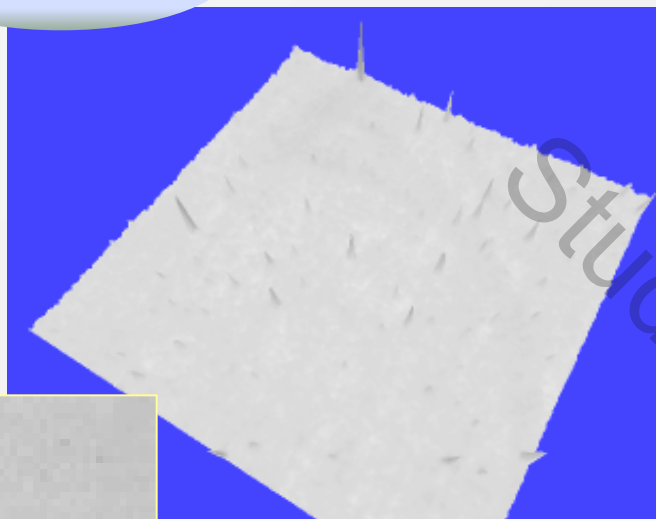
Specifické barvení: post-translační modifikace (PTM)

- fosforylace: Pro-Q Diamond (pSer, pThr, pTyr), Pierce phosphoprotein staining kit (pSer, pThr)
- glykosylace: Pro-Q Emerald, Pierce glycoprotein staining kit
- Radioaktivní značení

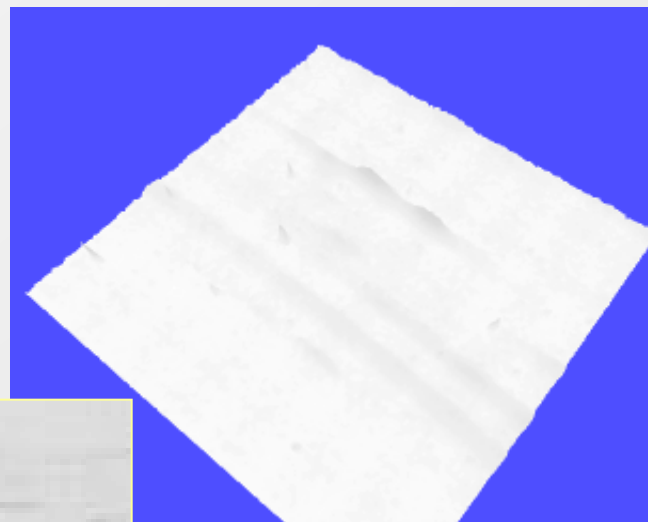


• Detekce

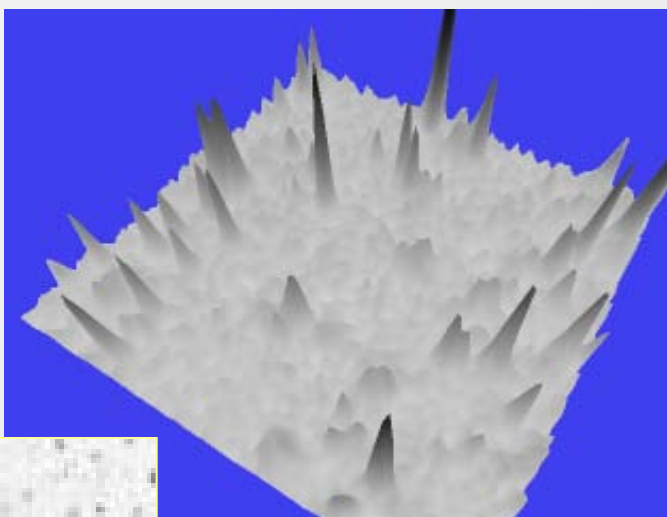
POZADÍ – 3D náhled



Koloidní CCB



Stříbro

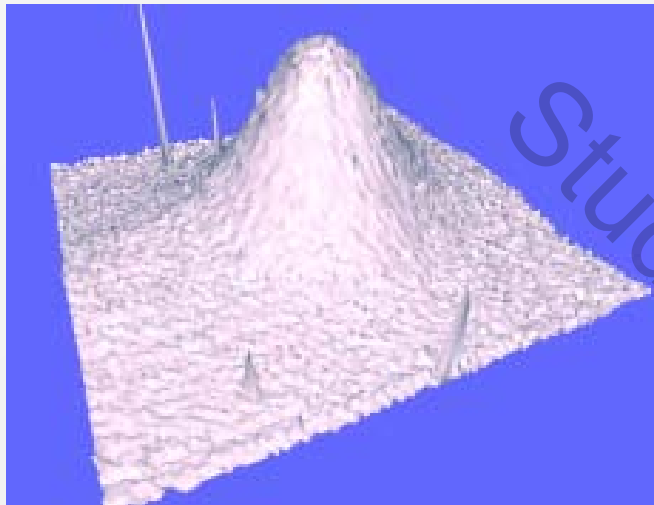


SYPRO Ruby

Studijní materiály

• Detekce

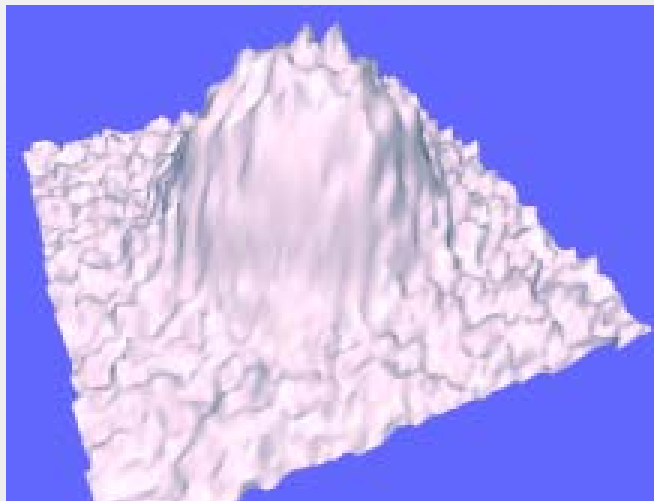
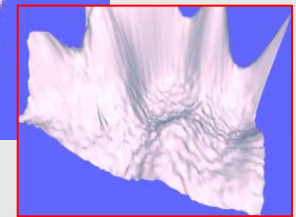
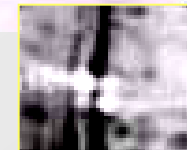
Proteinový spot – 3D náhled



Koloidní CCB



Stříbro



SYPRO Rubry

Při analýze obrazu pracujeme s denzitou barvičky.

Experiment

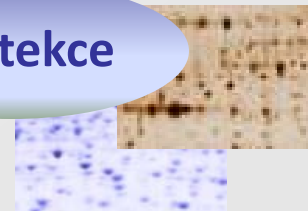
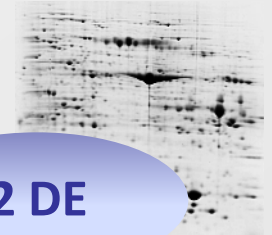
- Stanovení cíle experimentu

- Příprava vzorku

- 2 DE

- Detekce

- Snímání obrazu



• Snímání obrazu

Signály z biologických vzorků jsou konvertovány do digitálních dat v odstínech šedé barvy

- formát TIFF, vysoké rozlišení

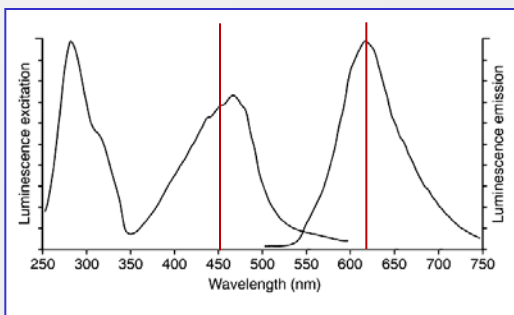
Přístroje pro snímání obrazu

Volba přístroje dle použitého typu detekce proteinů

- Viditelné barvičky : denzitometry
- Fluorescenční barvičky: fluorescenční skenery, kamery

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

S. Ruby: Ex/Em: 280, 450/610 nm



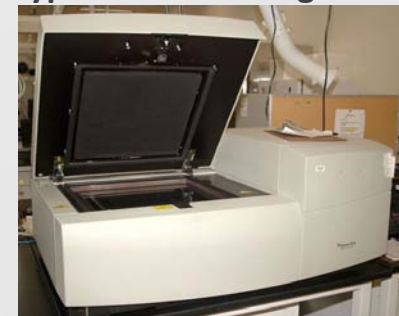
Molecular Imager GS-800



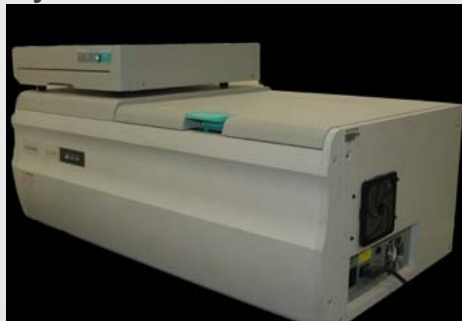
Image Scanner III



Typhoon 9200 Imager



Fuji FLA-3000



PharosFX™ and PharosFX Plus Systems



Experiment

- Stanovení cíle experimentu

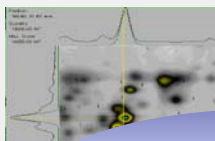
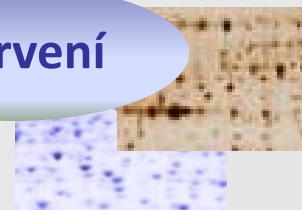
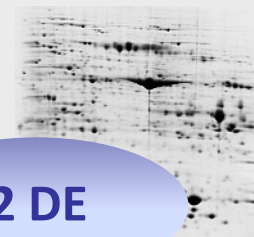
- Příprava vzorku

- 2 DE

- Barvení

- Snímání obrazu

- Analýza obrazu





- **Analýza obrazu**

Analýza pomocí speciálního SW

- **Porovnání a vyhodnocení 2D gelů**
(vizuální vyhodnocení 2D gelů není možné)
 - Kvalitativní vyhodnocení
 - Kvantitativní vyhodnocení
 - Statistická analýza

Přístup dle předem stanoveného cíle

- **Výběr spotů, které se významně liší podle daného „designu“ experimentu** (srovnání ovlivněný vzorek x kontrola – detekce „up and down“ regulovaných proteinů)
- **Výběr pouze několika velmi významných spotů, které budou případně použity jako budoucí marker**

• Analýza obrazu

SW

- Srovnání gelů různých velikostí, tvarů
- Nesmí modifikovat „raw“ data

- Vývoj – kontinuální proces
- Spolehlivost
- Reprodukovatelnost
- Automatizace

• Různé typy SW se liší:

filozofií, stupněm možností zasahovat do vyhodnocení, možnostmi statistických vyhodnocení, cenou.

- Příklady SW: Delta 2D, ImageMaster, Melanie, Progenesis, PDQuest, Redfin Ludesi

Výsledky analýzy jsou ovlivněny:

- kvalitou a filozofií daného programu
- uživatelem - manuální editace

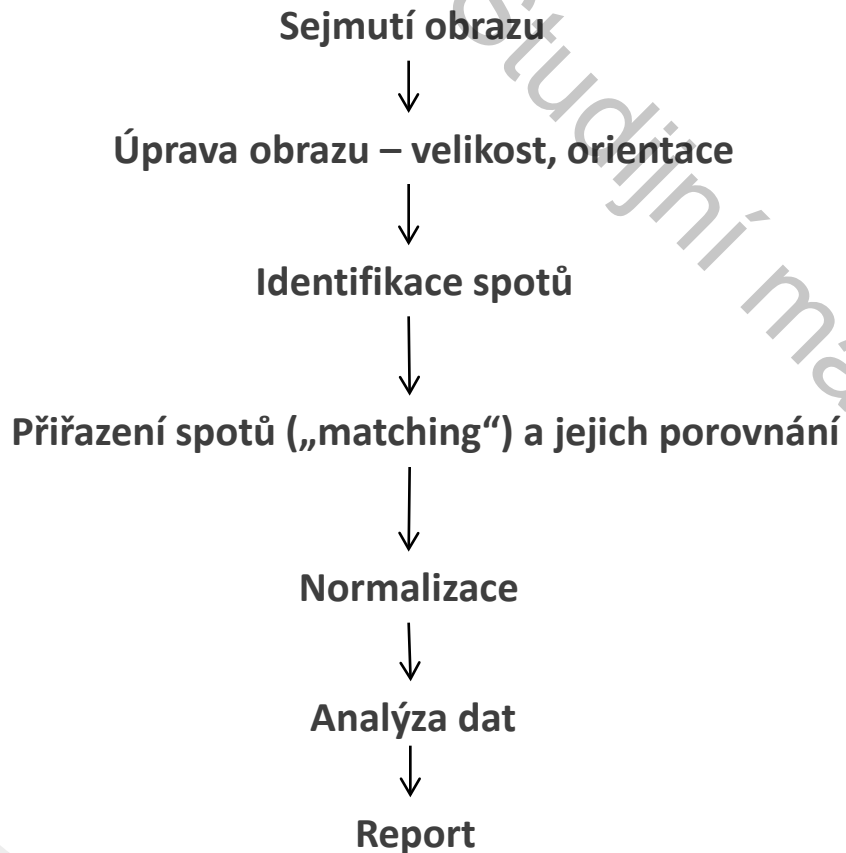
Přesná a správná práce v laboratoři je základem experimentu.

Sebelepší SW nedovede ze špatných podkladů vytvořit dobré výsledky.

Špatné vyhodnocení může zmařit předchozí dobrou práci.

- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu



- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

Sejmutí obrazu



Úprava obrazu – velikost, orientace



Identifikace spotů



Přřazení spotů („matching“) a jejich



Normalizace

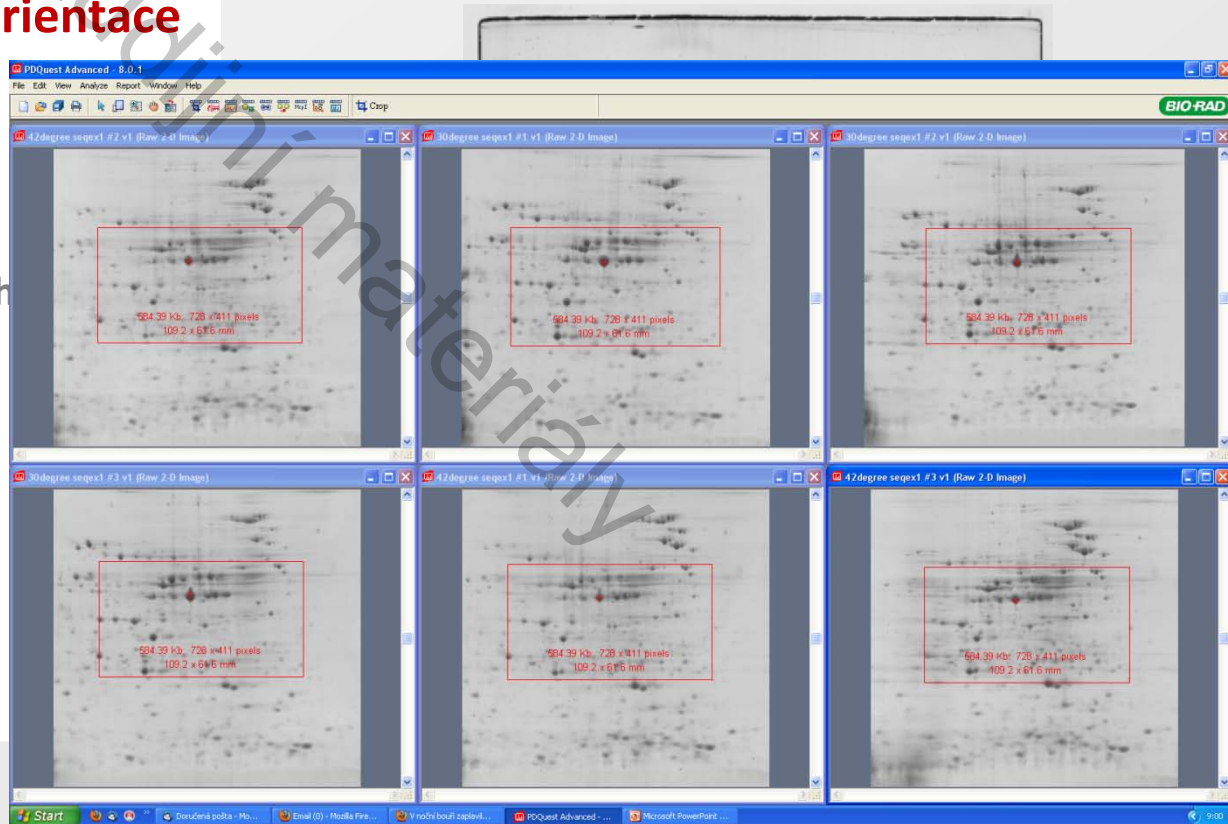


Analýza dat



Report

- velké rozlišení (tiff)
- všechny srovnávané gely musí mít stejnou velikost



- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

Sejmutí obrazu



Úprava obrazu – velikost, orientace



Identifikace spotů



Přiřazení spotů („matching“) a jejich porovnání



Normalizace

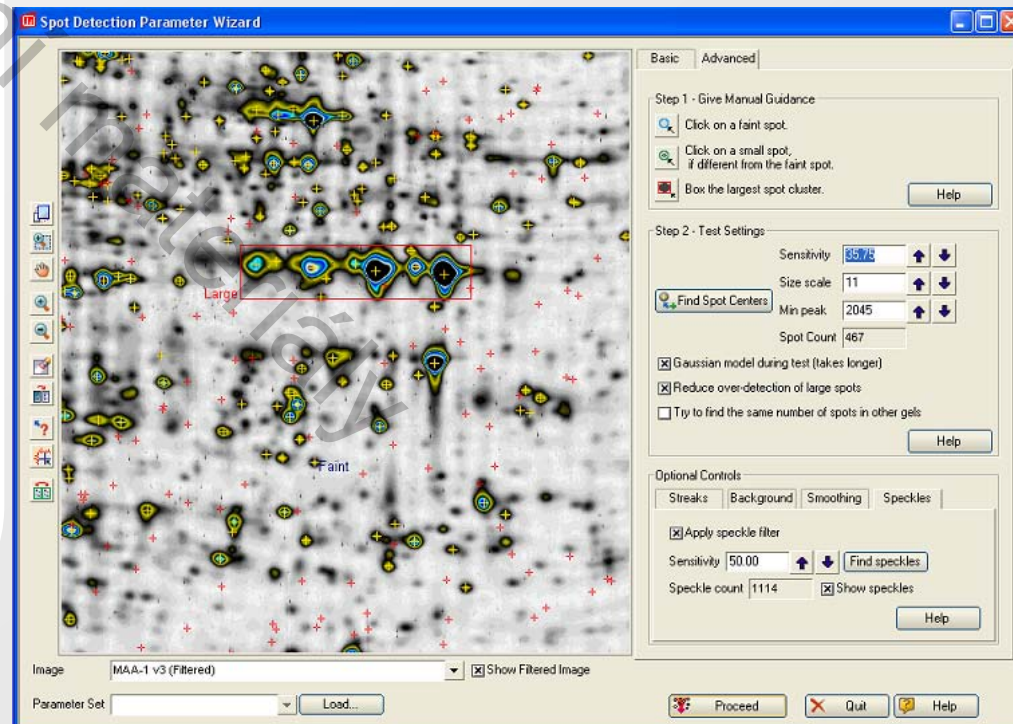


Analýza dat



Report

- Spot detection wizard**
 - průvodce nastavením parametrů pro vyhledání spotů a odfiltrování pozadí
- Různé gely – různé parametry nastavení



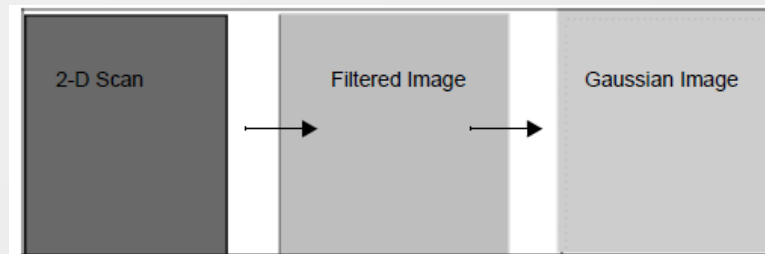
• Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

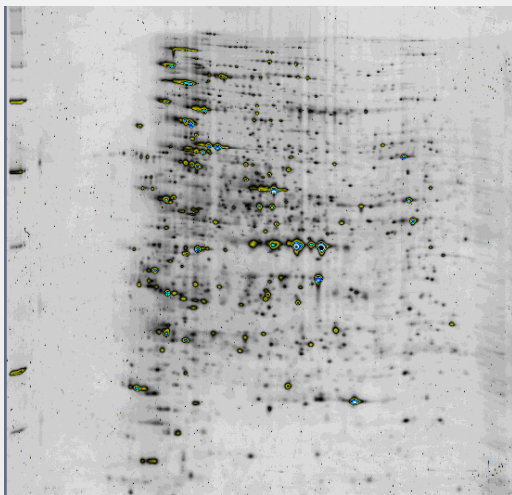
Detekce spotů a filtrace pozadí

• **Scanset**

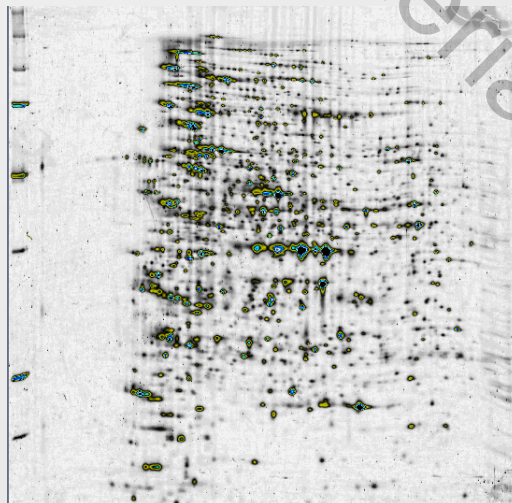
= soubor obrazů, které vycházejí z jednoho základního gelu (3 zobrazení každého gelu)



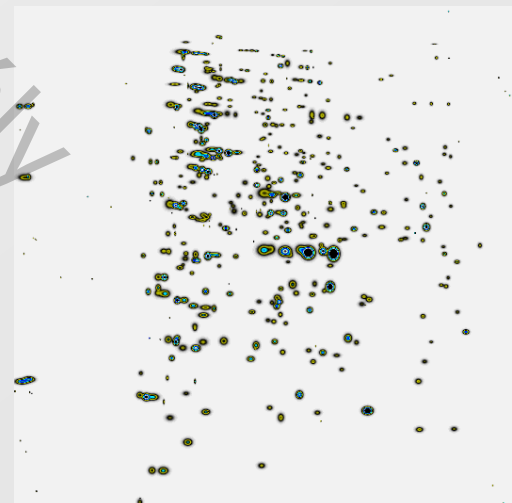
Raw 2D image



Filtered



Gaussian



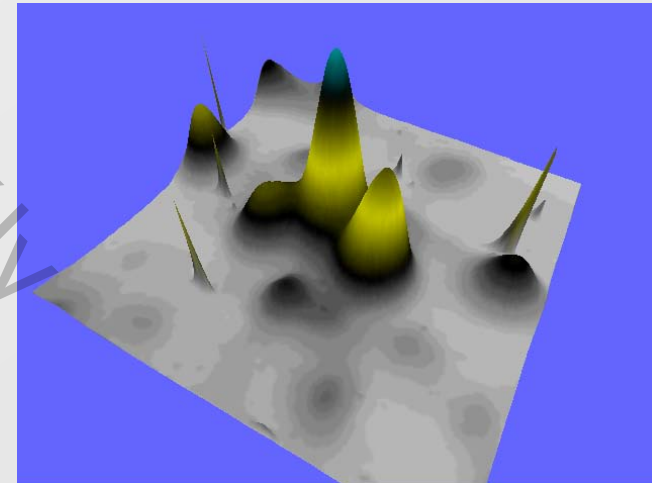
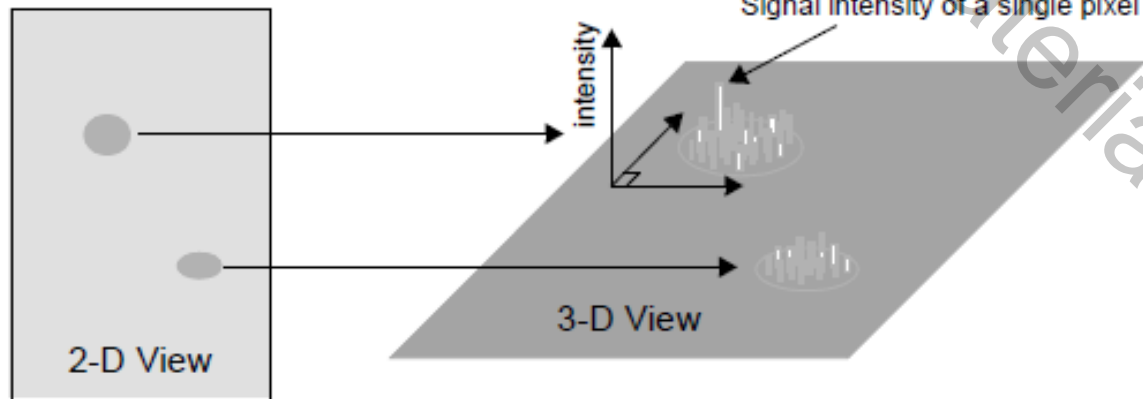
Vyhodnocování pomocí PDQuestu

- **Analýza obrazu**

- **Kvantita spotu**

= celková intenzita definovaného spotu v daném zobrazení gelu
(pro výpočet se používá gaussovské zobrazení)

- koresponduje s množstvím proteinu v aktuálním spotu

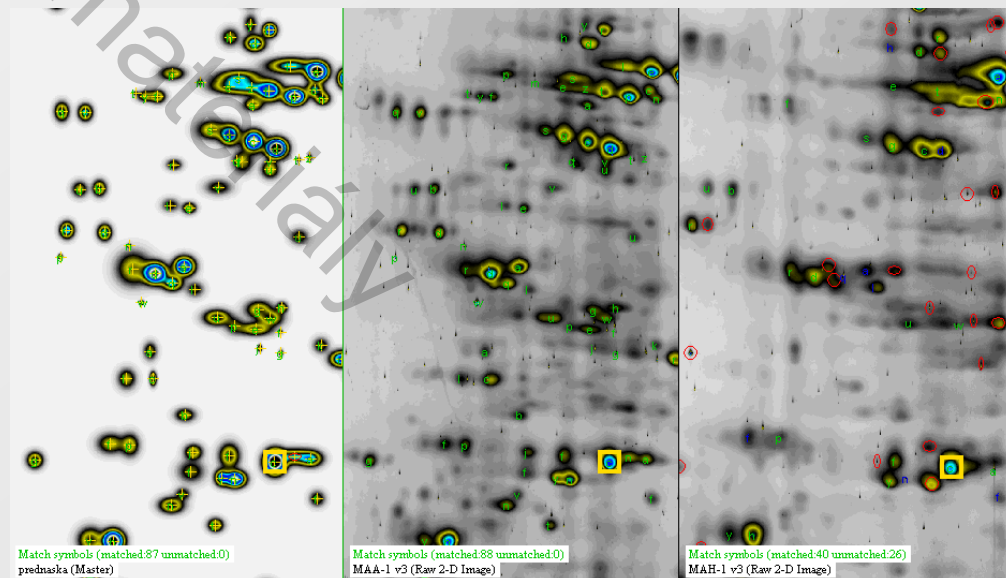


• Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu



- **Matchset** = soubor gelů porovnávaných navzájem v rámci experimentu
- **Master gel** = uměle vytvořený gel, zahrnuje spoty ze všech srovnávaných gelů



• Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

Sejmutí obrazu



Úprava obrazu – velikost, orientace



Identifikace spotů



Přiřazení spotů a jejich porovnání



Normalizace

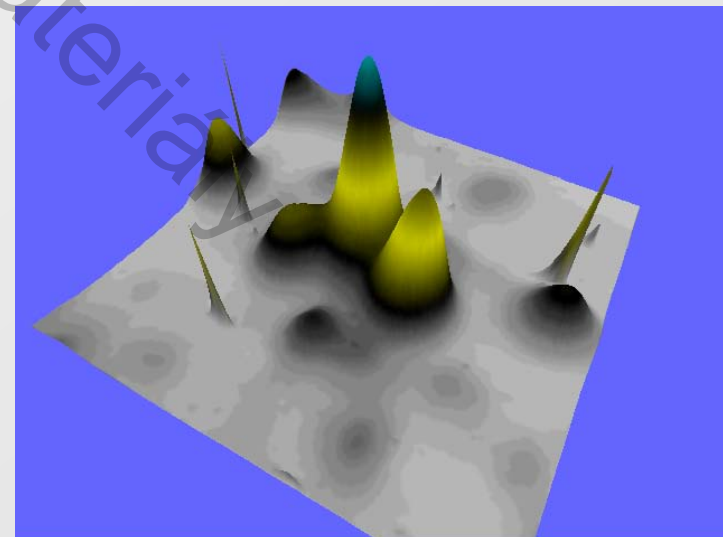
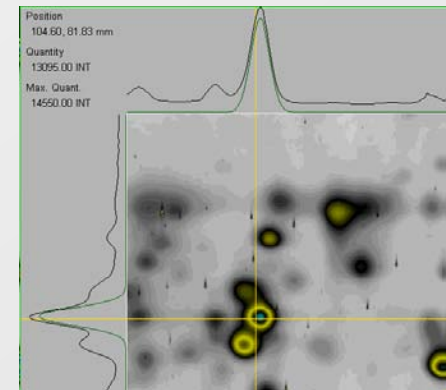
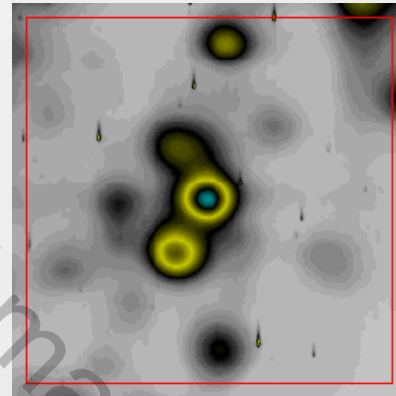


Analýza dat



Report

Editace spotů



• Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

Sejmutí obrazu



Úprava obrazu – velikost, orientace



Identifikace spotů

**Přiřazení spotů a jejich porovnání**

Normalizace



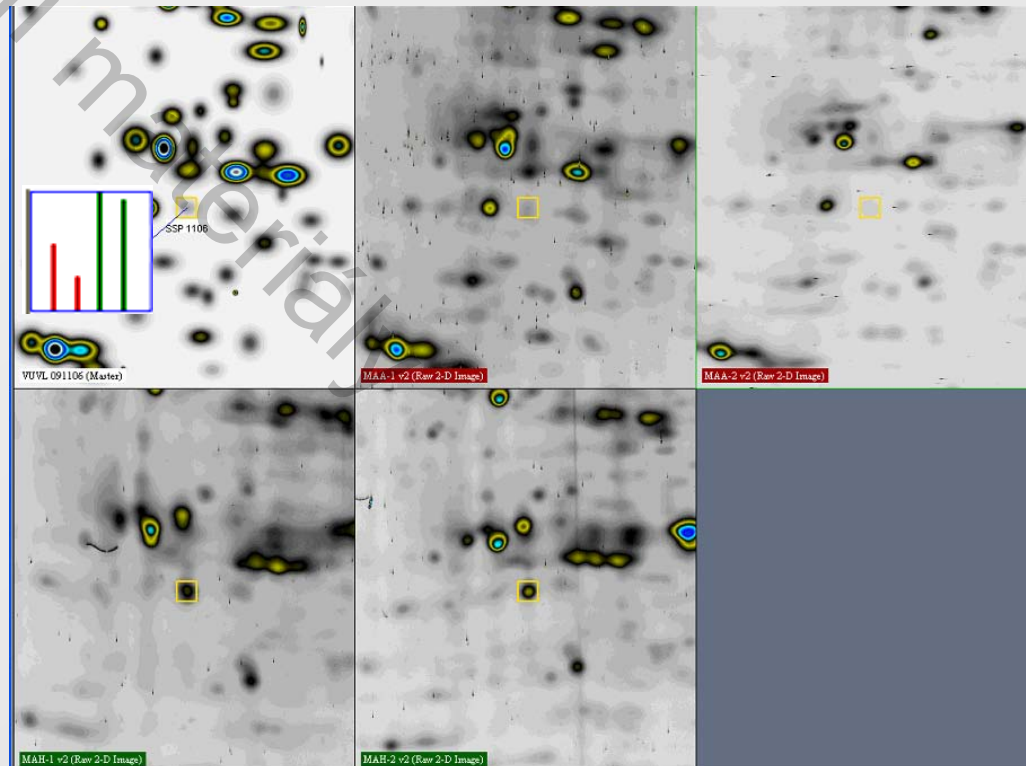
Analýza dat



Report

Replikativní skupiny

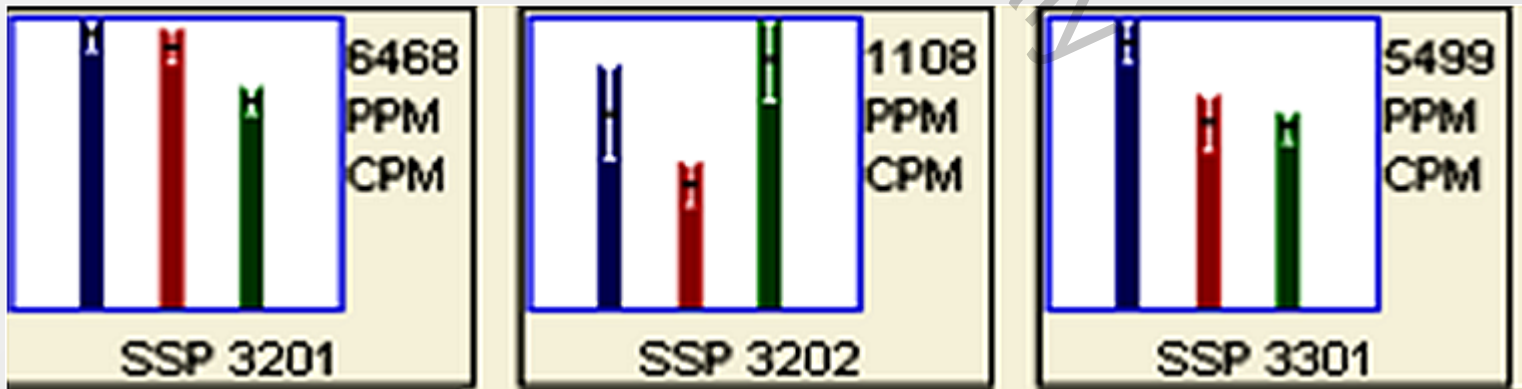
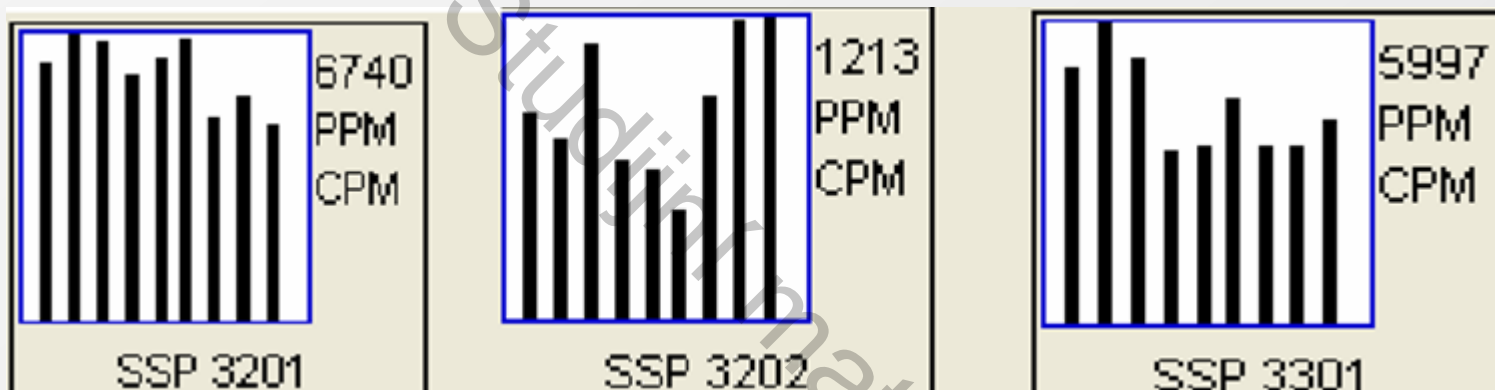
- máme-li 2 a více gelů od jednoho vzorku (repliky)
- umožňují seskupit kopie gelů daného vzorku a určit průměrnou kvantitu každého spotu
- analýza gelů v replikách je podmínkou pro aplikaci statistických nástrojů (např. Student T-test)



• Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

- Replikativní skupiny



- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

- Normalizace = kompenzace rozdílů ve velikosti spotů a intenzitě mezi gely, které nesouvisí s expresí
- nutná podmínka pro správné srovnání kvantity spotů
 - Variace způsobené různými faktory:
 - chyby pipetování během přípravy vzorku
 - chyby při přípravě a zpracování vzorku
 - ztráta vzorku během přenosu na gel (precipitace)
 - nekonzistence v barvení/značení
 - nekonzistence při snímání obrazu
 -
- Normalizační faktor (dle zvolené metody)
 - Total quantity in analysis set
 - Total quantity in valid spots
 - Total density in gel image
 - Specified value
 - Mean of log ratios
 - Local regression model

Sejmutí obrazu



Úprava obrazu – velikost, orientace



Identifikace spotů



Přiřazení spotů a jejich porovnání



Normalizace



Analýza dat



Report



- **Analýza obrazu**

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

Sejmutí obrazu



Úprava obrazu – velikost, orientace



Identifikace spotů



Přiřazení spotů a jejich porovnání



Normalizace



Analýza dat



Report

- **Analytický set**
= soubor spotů vybraných pro studium
- umožňuje vytvářet soubory spotů se statistickou a biologickou významností

- Kvalitativní
- Kvantitativní
- Statistické (pouze pro replikativní skupiny)
- Booleovy
- Výběrové
- Matching

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

Analýza obrazu

Kvalitativní

Kvantitativní

Statistické

Booleovy

Výběrové

Matching

The screenshot displays several configuration panels in the PDQuest software:

- Method Panel (Top):** Shows options for 'On in B' and 'On in A' with radio buttons. A text field for 'Min. fold over background' is set to 10.0.
- Method Panel (Middle):** Includes a histogram visualization with two bars labeled A and B. The y-axis ranges from 0.0 to 1.0. The x-axis has labels 'A' and 'B'. A vertical line is at 2.00 (+2.0 fold), and another is at 0.50 (-2.0 fold). There are radio buttons for 'Above upper limit', 'Below lower limit', 'Between limits', and 'Outside limits'. Below the histogram are radio buttons for 'Histogram' and 'Scatterplot', a checked 'Log scale' checkbox, and sliders for 'Upper limit' (set to 2.00) and 'Lower limit' (set to 0.50). A 'Table' button is present.
- Method Panel (Bottom):** Lists statistical tests: 'Student's t-test', 'Mann-Whitney Signed-Rank Test', 'Wilcoxon Paired-Sample Test', and 'Partial Least Squares' (selected). There are checkboxes for 'Prefilter noisy data', 'Iteratively remove insignificant spots', 'Compute confidence values', 'Scale spots to ignore size differences', and 'Log transform'.
- Significance Panel:** Features a 'Level(%)' slider with radio buttons for 90, 95, 98, and 99.
- Method Panel (Bottom-Right):** Shows Boolean set operations with Venn diagrams: 'In A and not in B' (selected), 'Not in A and in B', 'In only A or only in B', 'Intersection', and 'Union'.
- Method Panel (Bottom):** Shows matching options: 'Spots matched to every member' and 'Spots unique to member' (selected).

- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

Sejmutí obrazu



Úprava obrazu – velikost, orientace



Identifikace spotů



Přiřazení spotů a jejich porovnání



Normalizace



Analýza dat



Report

Studijní materiály

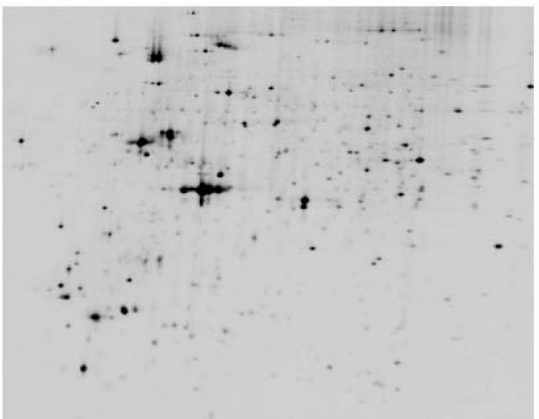
• Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuestu

• Report

Image report

Image Report For: half3 v1 x3 (Raw 2-D Image)



Description N/A
 Directory C:\PDQuest Data\MatchSets_MS00017 2003-07-08 Data
 Filename half3 v1 x3.gsc

Image Date unknown
 Imager GS-710 Pixel size(um) X: 176.0, Y: 176.0
 Image Area(mm)X: 178.6, Y: 140.2 Data Range 2.00 OD
 Image Pixels X: 1015, Y: 797 Memory Size 791.94 Kb

Image History
 11-Nov-1999 10:29 : Power Mean (3X3)

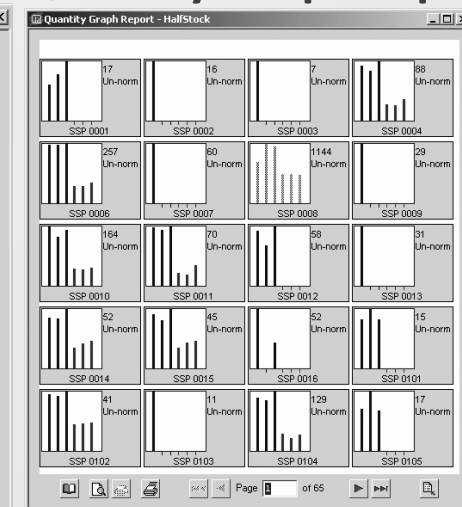
Acquisition Parameters
 Gain Setting: 0.0
 Size Mode: absolute
 Ref Bkgd Time: 0.00 sec.
 PMT Voltage: (0%)

Quantity Table report

Quantity Table Report - HalfStock

| SSP | stock1 | stock2 | stock3 | half1 | half2 | half3 |
|------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| 0001 | 10.2 | 13.4 | 16.9 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0002 | 16.4 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0003 | 7.2 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0004 | 82.3 | 75.0 | 86.4 | 24.6 | 22.8 | 31.6 |
| 0006 | 256.4 | 256.5 | 257.2 | 74.1 | 73.9 | 88.9 |
| 0007 | 59.5 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0008 | 791.7 | 1143.5 | 1100.5 | 569.0 | 565.4 | 544.8 |
| 0009 | 29.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0010 | 163.6 | 135.8 | 155.8 | 45.9 | 44.1 | 48.2 |
| 0011 | 69.5 | 66.3 | 70.2 | 15.2 | 12.7 | 24.6 |
| 0012 | 54.1 | 40.0 | 57.9 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0013 | 30.8 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0014 | 44.9 | 43.8 | 52.2 | 18.2 | 22.0 | 24.4 |
| 0015 | 40.7 | 36.1 | 44.5 | 15.6 | 19.2 | 20.5 |
| 0016 | 52.5 | 1.3 | 22.8 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0101 | 12.1 | 14.6 | 12.1 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0102 | 39.7 | 38.2 | 40.9 | 18.3 | 18.8 | 19.3 |
| 0103 | 10.8 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0104 | 116.6 | 110.3 | 128.9 | 36.7 | 27.1 | 34.7 |
| 0105 | 12.3 | 17.2 | 11.6 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 0106 | 34.8 | 36.2 | 34.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |

Quantity Graph report



Experiment



• Vyřezání spotů

→ **Manuálně** (skalpel, spot picker)

- viditelné barvičky
- fluorescenční barvičky
- transiluminátor

OneTouch Plus spot picker



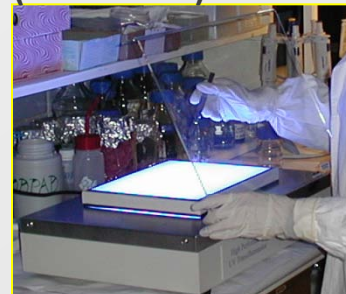
UV-transilluminator

(Ex: 302, 365 nm)



Dark Reader

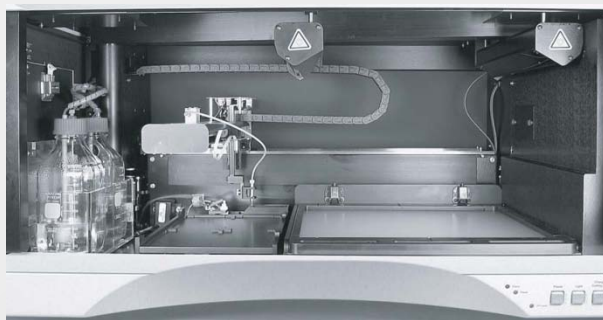
(Ex: 490 nm)



Automaticky

- Spot cutter

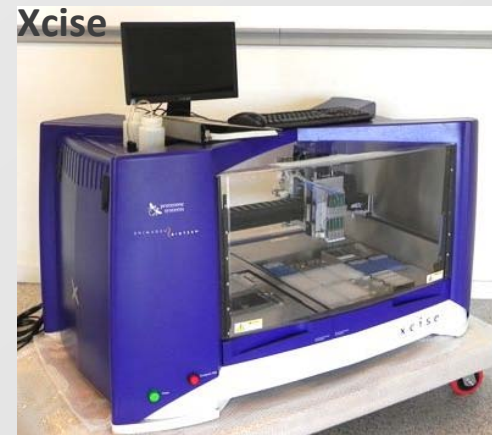
Exquest



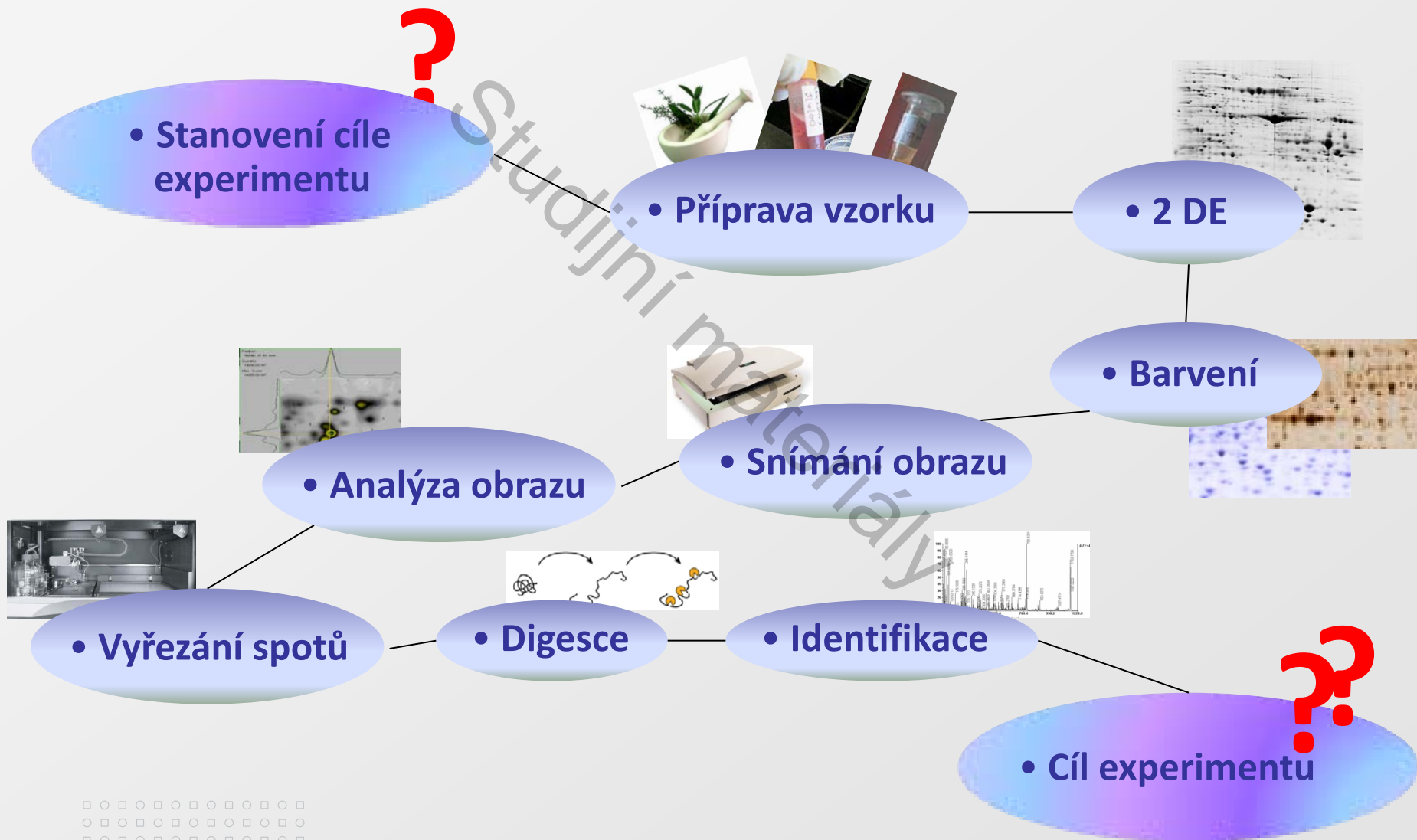
Ettan Spot picker



Xcise



Experiment



Děkuji za pozornost.

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ