



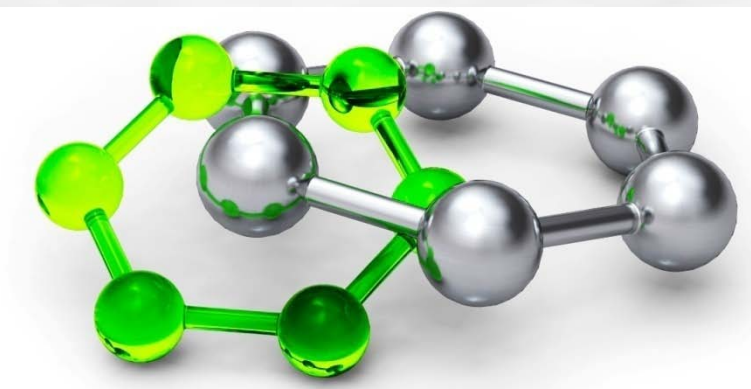
CEITEC

Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

Analýza obrazu

Gabriela Lochmanová

Studijní materiály



esf european social fund in the czech republic



EUROPEAN UNION



MINISTRY OF EDUCATION, YOUTH AND SPORTS



OP Education for Competitiveness



UNIVERSITAS-SINENSIS MARYKIANA BRUNENSIS

INVESTMENTS IN EDUCATION DEVELOPMENT

• Stanovení 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

Postup zpracování vzorku,
kontrolní vzorky, standard

Způsob detekce

Biologické

- Zahrnutí biologické diverzity
 - repliky prezentovány různými vzorky téhož typu
 - X rostlinek Arabidopsis,
 - X různých pacientů se stejným typem nádoru apod.

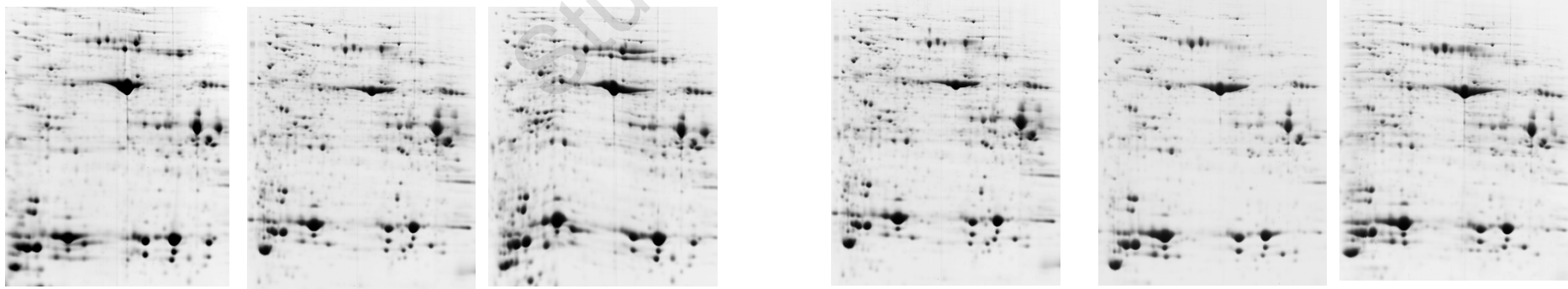
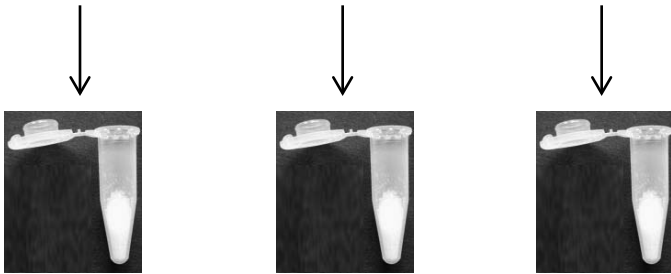
Technické

- Zahrnutí chyb metody (reprodukovatelnost)
 - stejný vzorek v několika replikách

CZ.1.07/2.3.00/30.0009

Biologické repliky

Technické repliky



CZ.1.07/2.3.00/30.0009

Experiment

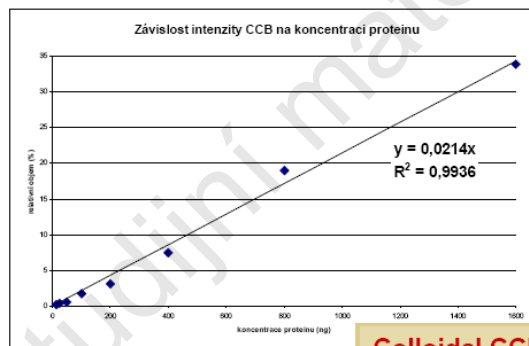
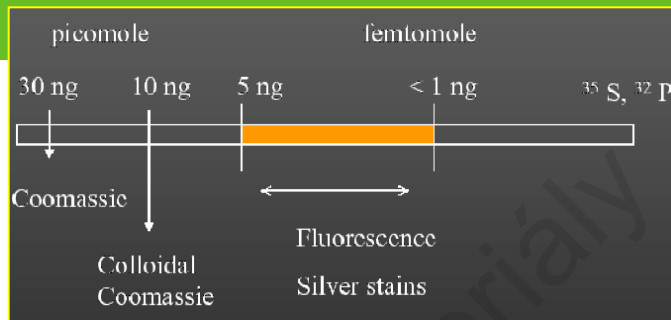


Obecné požadavky na vizualizaci proteinů

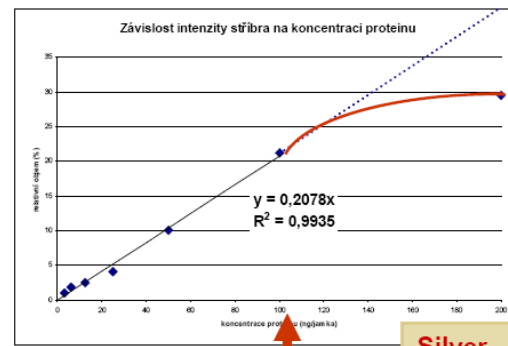


• Detekce

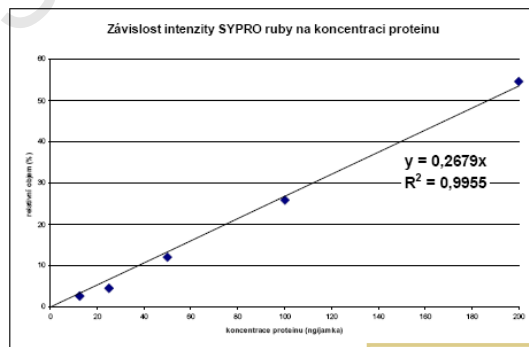
- vysoká citlivost
- kvantitativní barvení
- široký lineární rozsah závislosti intenzity barvičky na množství proteinu v gelu
- Dynamický rozsah
= graf závislosti intenzity barvičky (osa y) na koncentraci proteinu (osa x)
- end-point
- trvanlivost
(např. zhášení fluorescenčních barviček!)
- kompatibilita 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.

Značení před analýzou (DIGE – CyDye, radioaktivní značení)

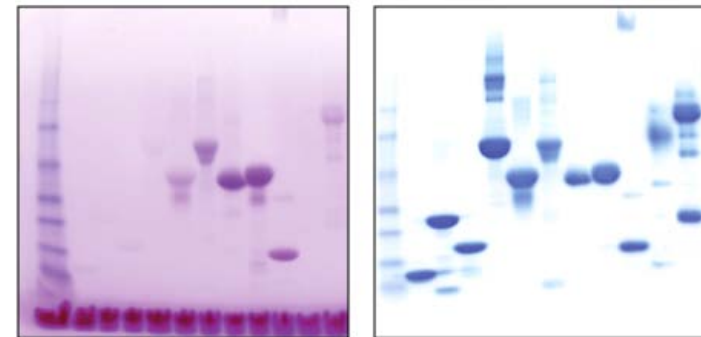
Barvení po analýze

Nespecifické barvení: všechny proteiny

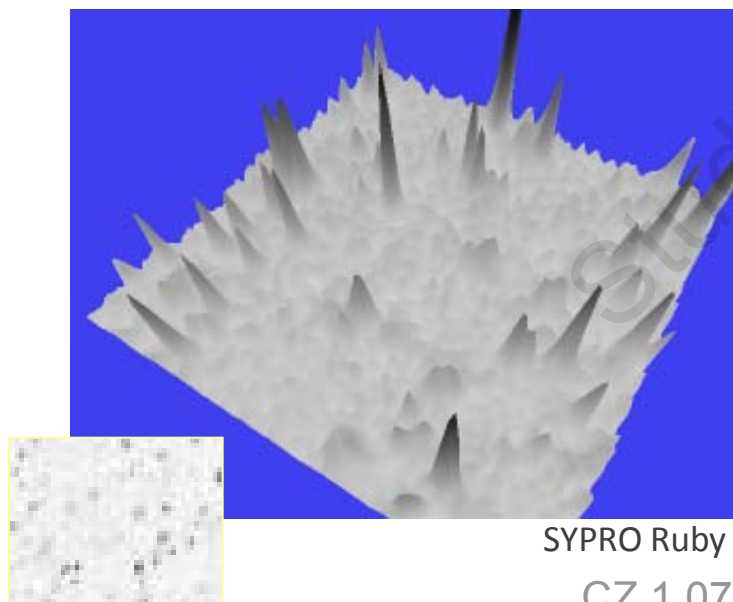
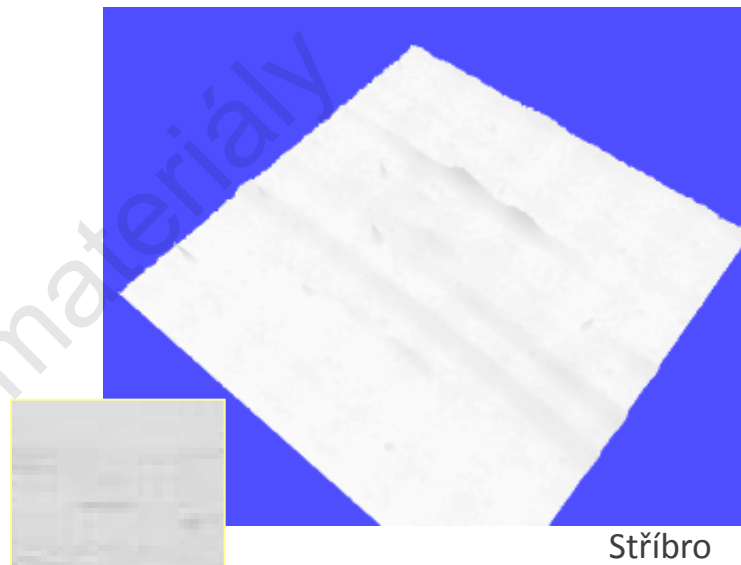
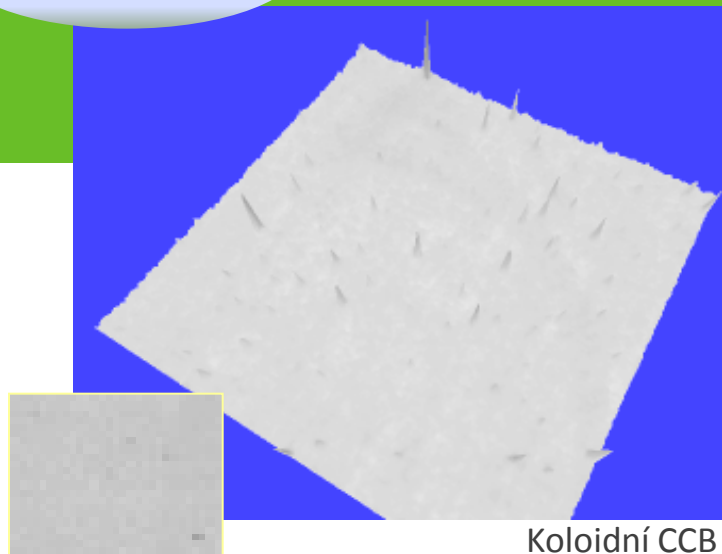
- **Viditelné barvení:** Coomassie brilliant blue (R250, G250), stříbro (kyselá x amoniakální varianta)
- **Fluorescenční barvení:** Sypro Ruby (Ex/Em = 280, 450/610 nm), Lucy (Ex/Em = 506/520 nm), Flamingo Pink (Ex/Em = 512/535 nm), Oriole (Ex/Em = 270/604 nm), Krypton (Ex/Em = 520/580), Deep Purple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

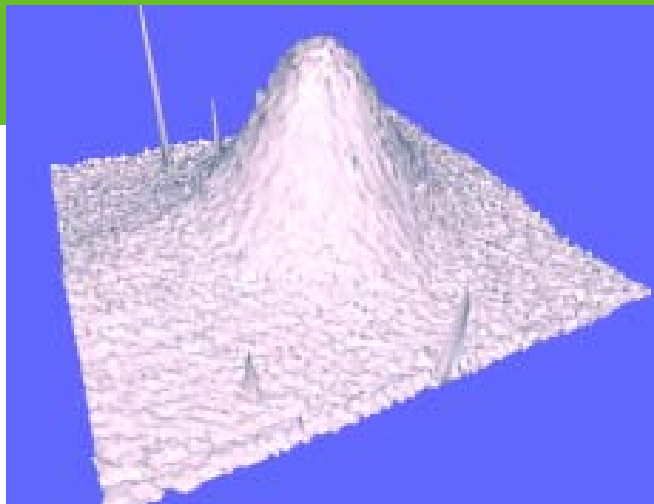


6



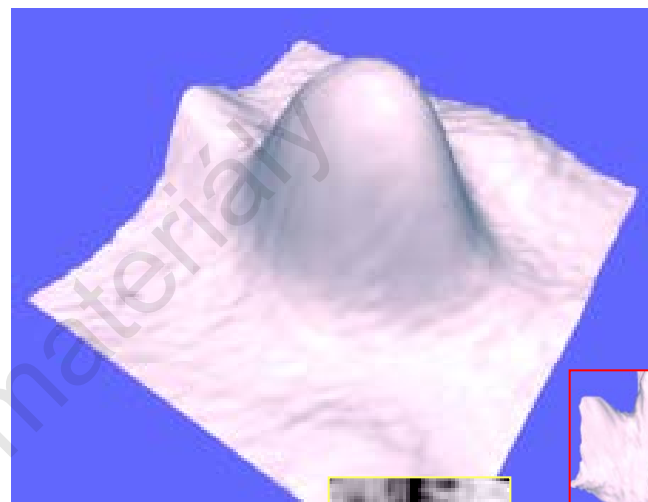
CZ.1.07/2.3.00/30.0009

Proteinový spot – 3D náhled

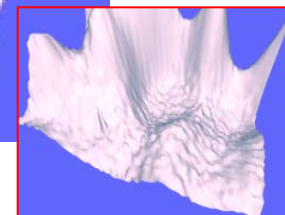
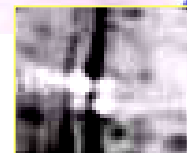


Koloidní CCB

SYPRO Ruby



Stříbro



Při analýze obrazu pracujeme s denzitou barvičky.

Experiment



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

• Snímání obrazu

- formát TIFF, vysoké rozlišení

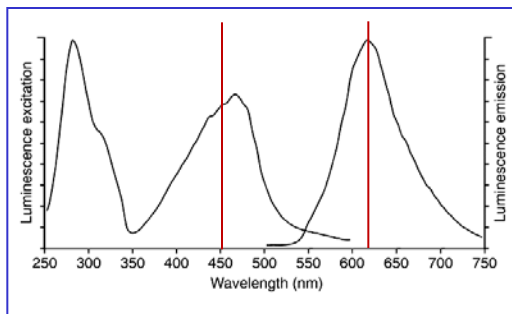


Přístroje pro snímání obrazu

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



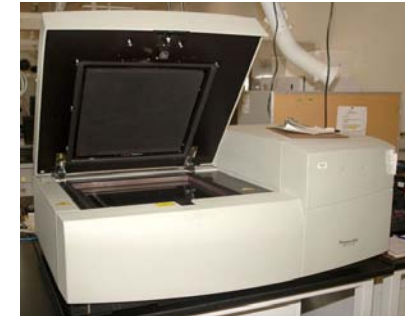
Molecular Imager GS-800



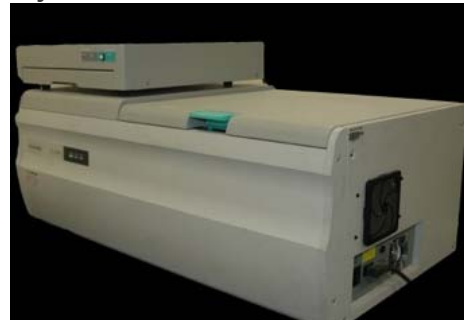
Image Scanner III



Typhoon 9200 Imager



Fuji FLA-3000



PharosFX™ and PharosFX Plus Systems



Experiment



- 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.

Výsledky analýzy jsou ovlivněny:

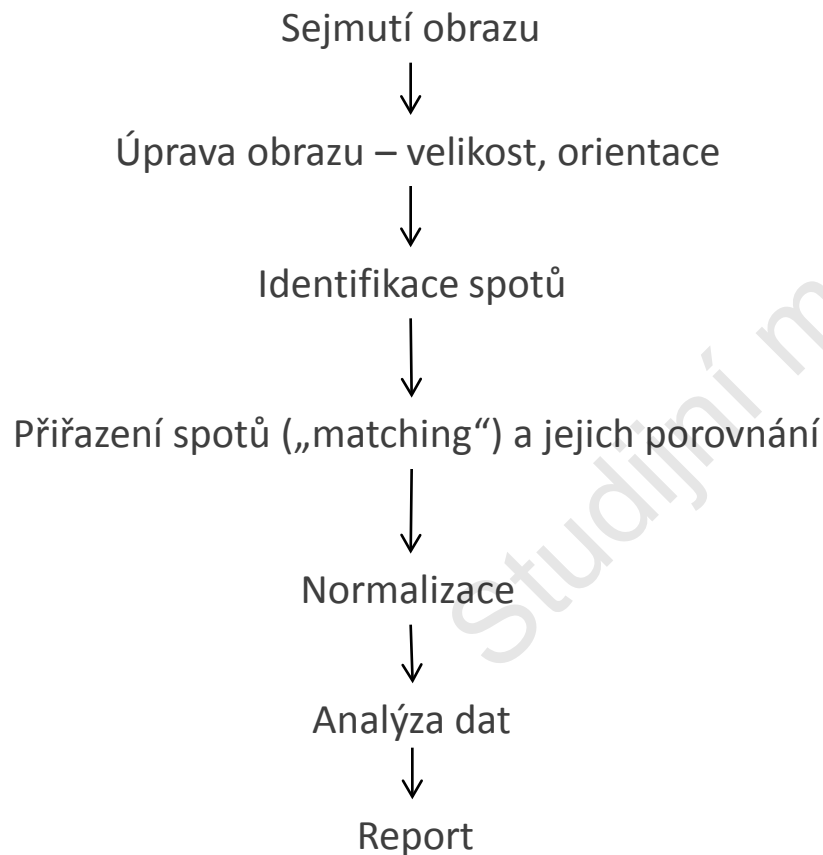
- kvalitou a filozofií daného programu
- uživatelem - manuální editace

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

Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu



CZ.1.07/2.3.00/30.0009

Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

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

Sejmutí obrazu



Identifikace spotů



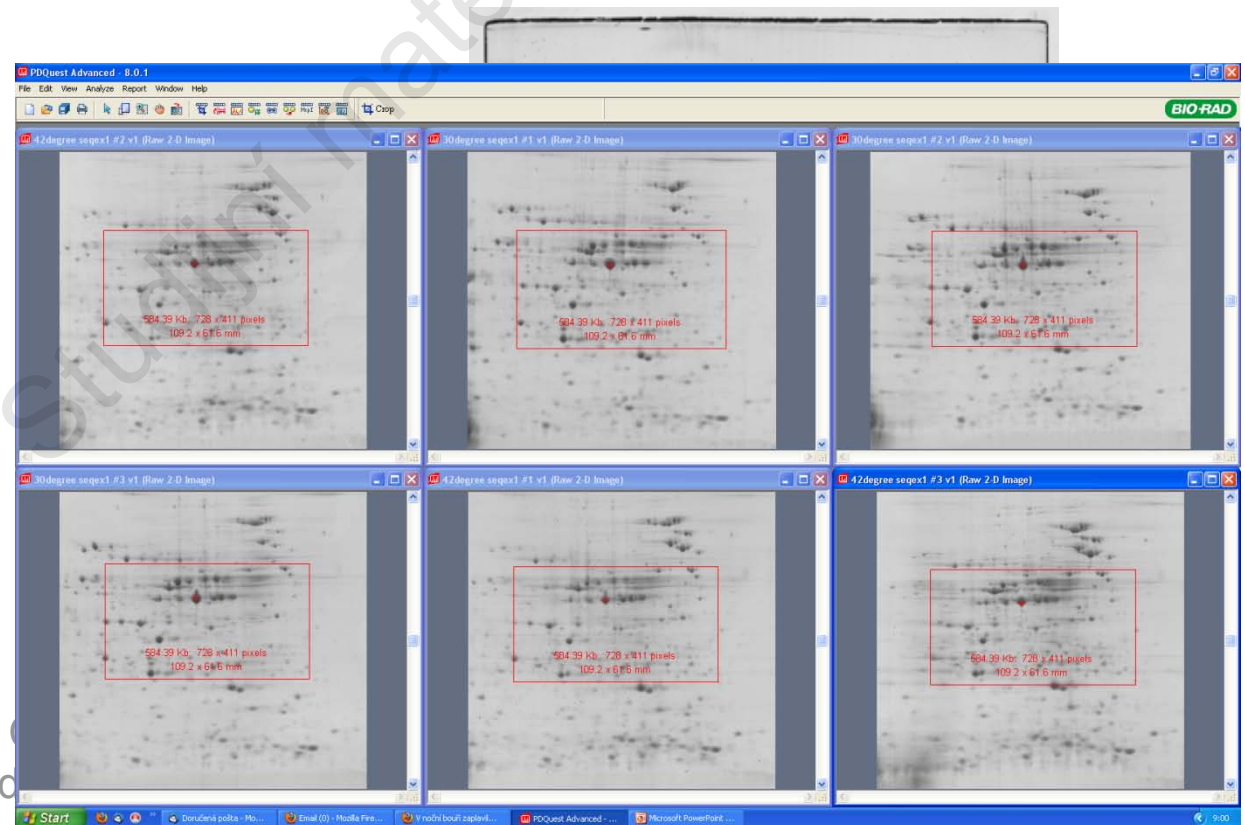
Normalizace



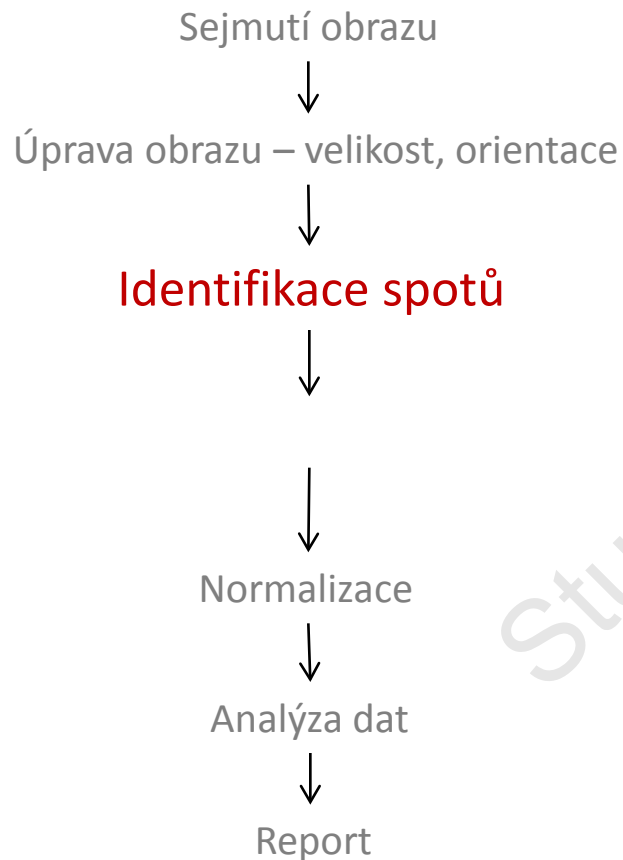
Analýza dat



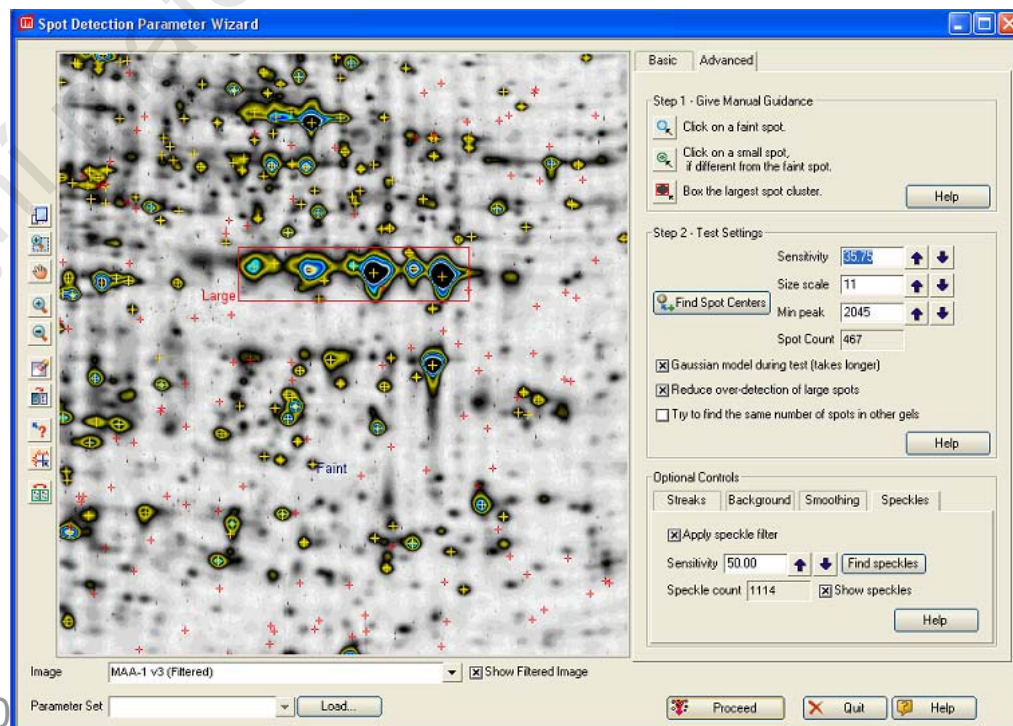
Report



Employment of Newly Grad



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



CZ.1.07/2.3.0

Vyhodnocování pomocí PDQuest

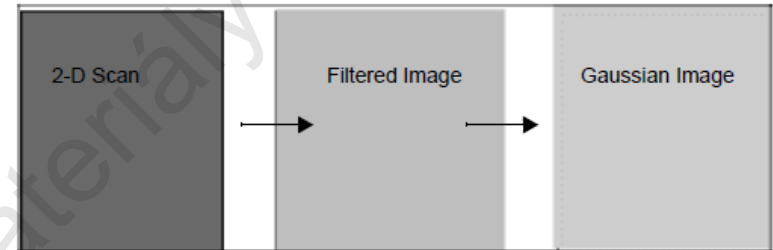


- Analýza obrazu

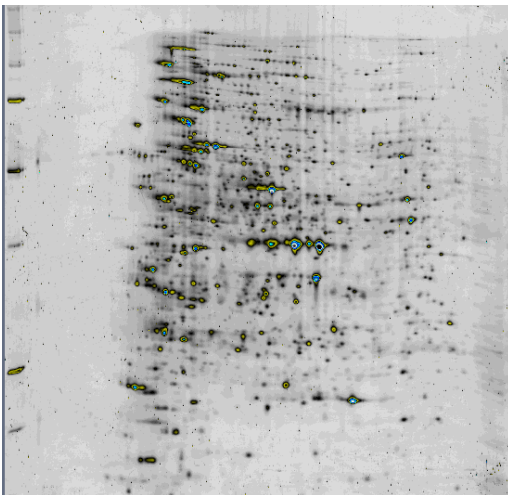
Detekce spotů a filtrace pozadí

- **Scanset**

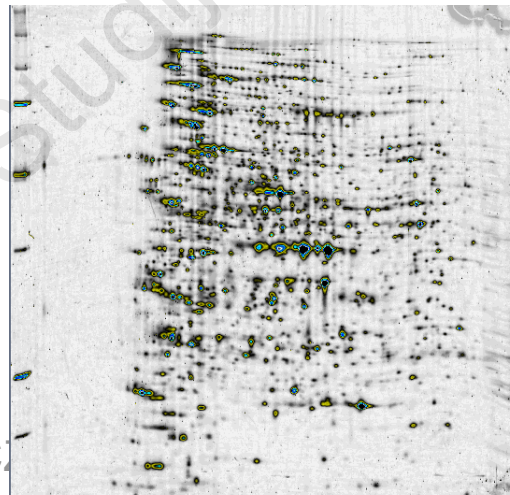
= soubor obrazů, které vycházejí z jednoho základního gelu (3 zobrazení každého gelu)



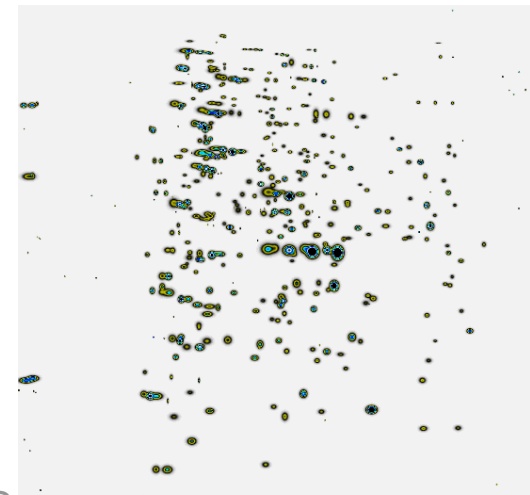
Raw 2D image



Filtered



Gaussian



Vyhodnocování pomocí PDQuest

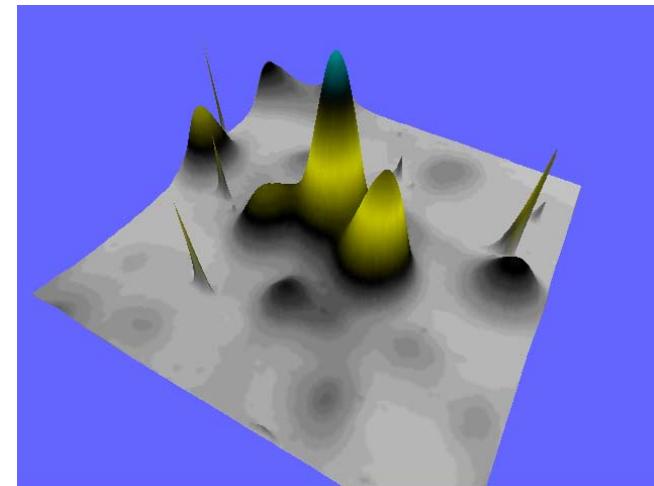
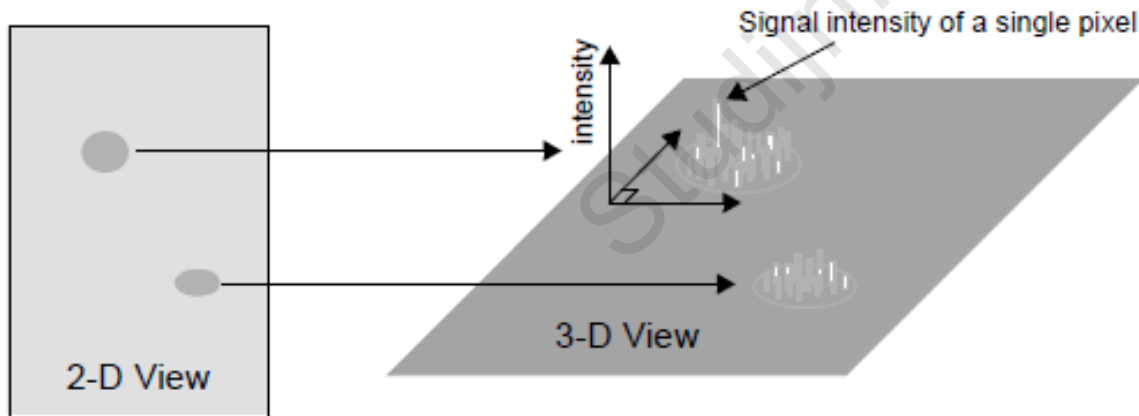


- Analýza obrazu

- **Kvantita spotu**

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

- koresponduje s množstvím proteinu v aktuálním spotu



CZ.1.07/2.3.00/30.0009

Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

Sejmutí obrazu



Identifikace spotů



Normalizace



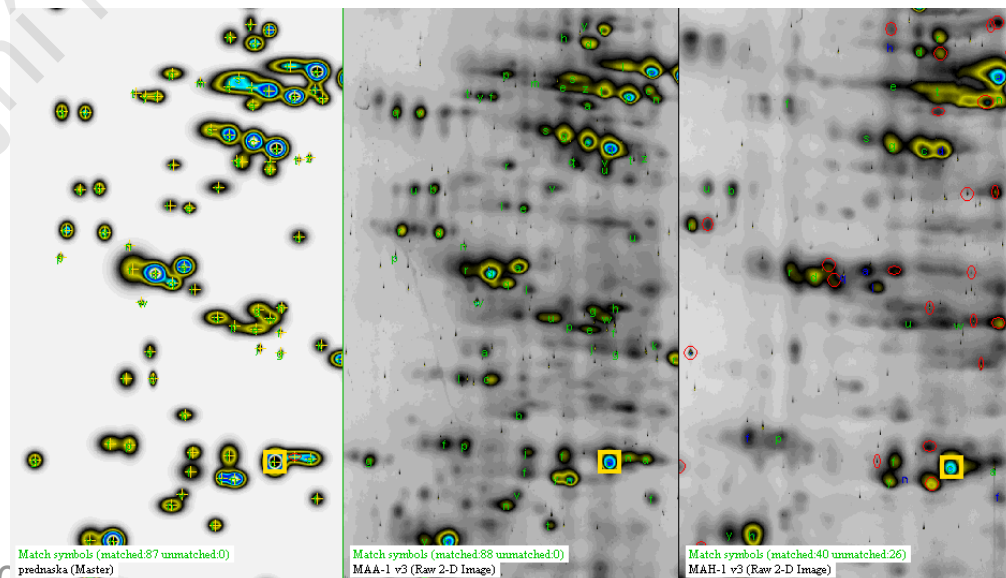
Analýza dat



Report



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



CZ.1.07/2.3.00/05/0000

Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

Sejmutí obrazu



Identifikace spotů



Normalizace

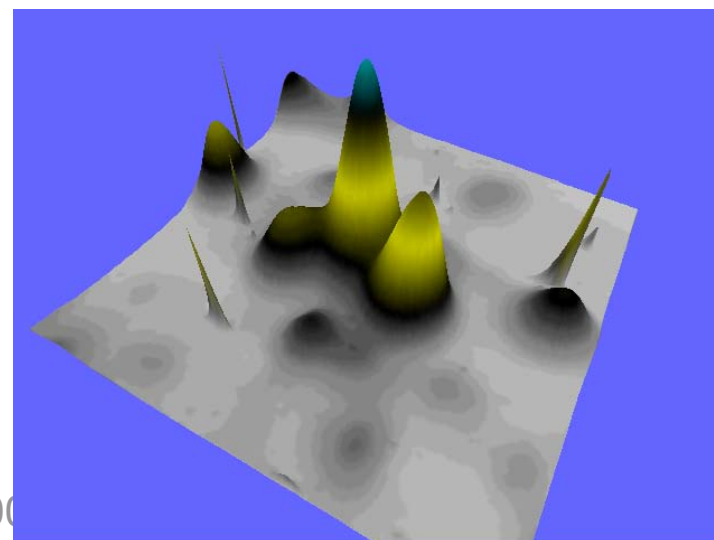
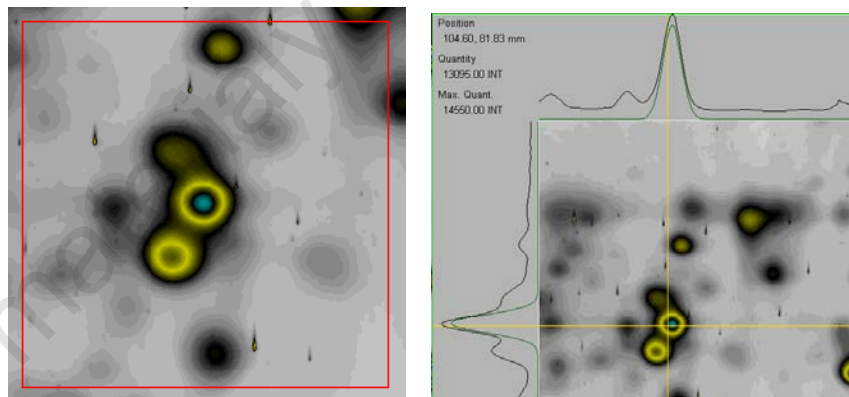


Analýza dat



Report

Editace spotů

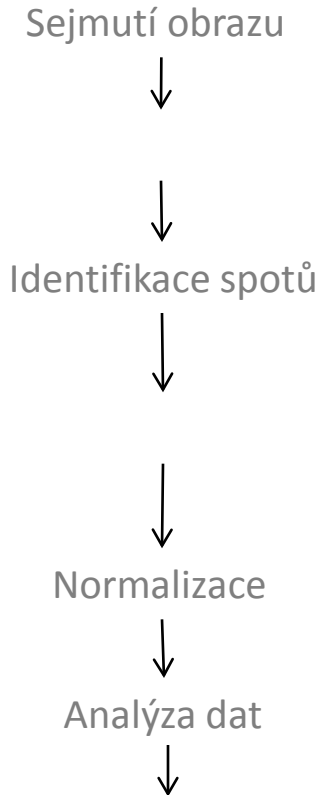


CZ.1.07/2.3.00/30.00

Vyhodnocování pomocí PDQuest

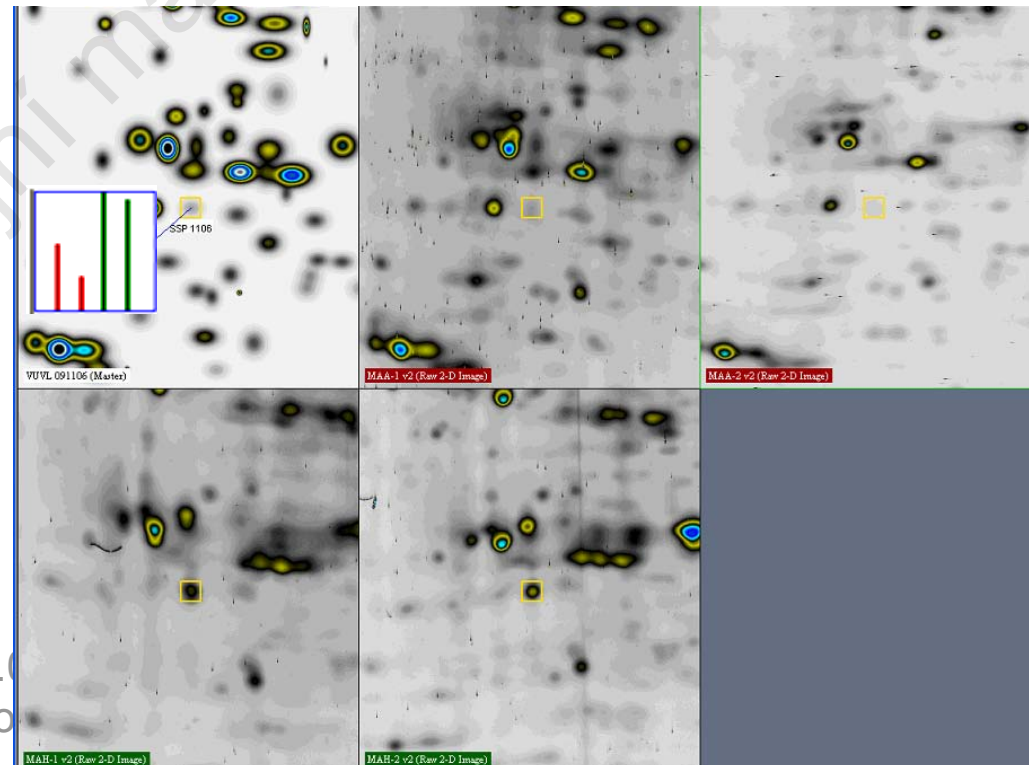


- Analýza obrazu



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)

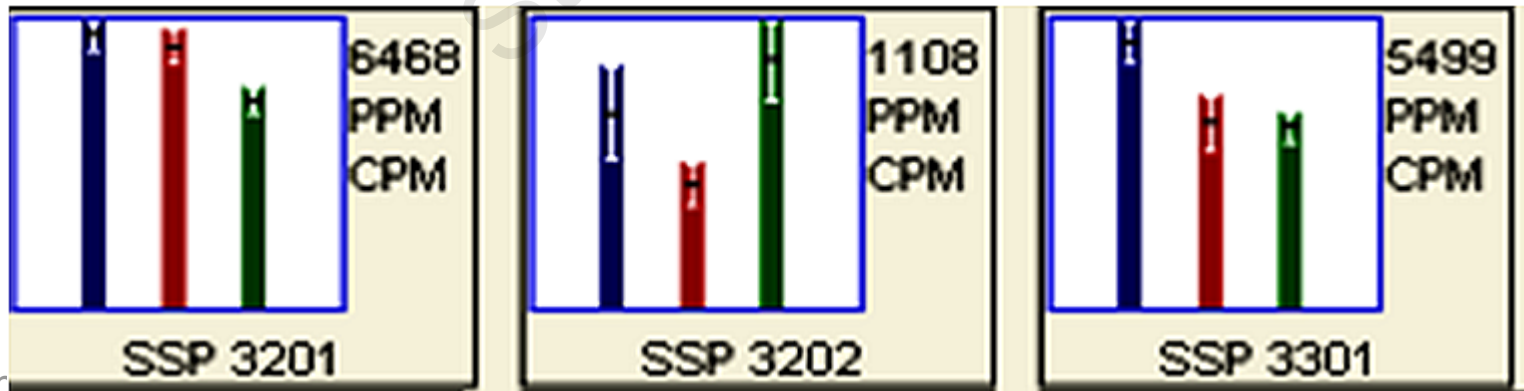
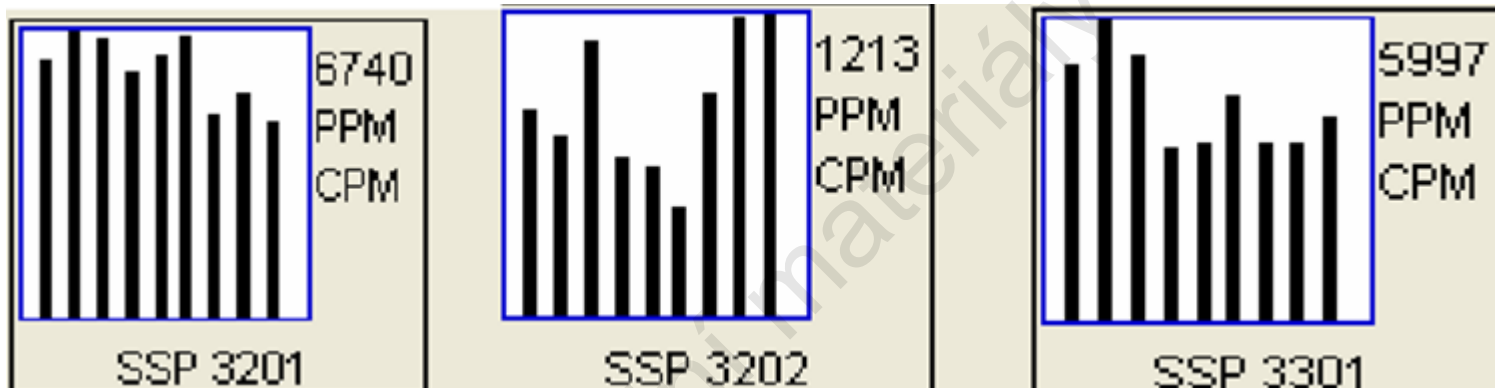


Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

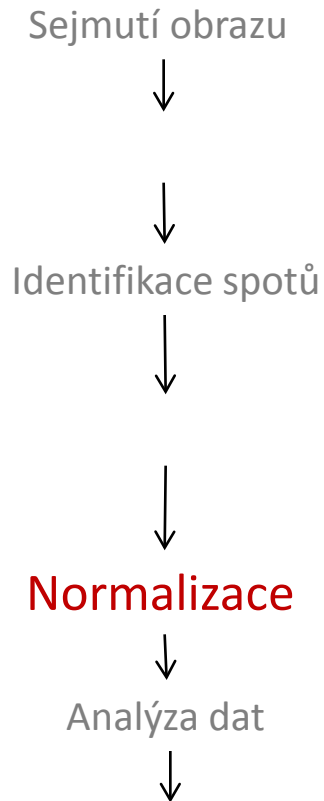
- Replikativní skupiny



Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

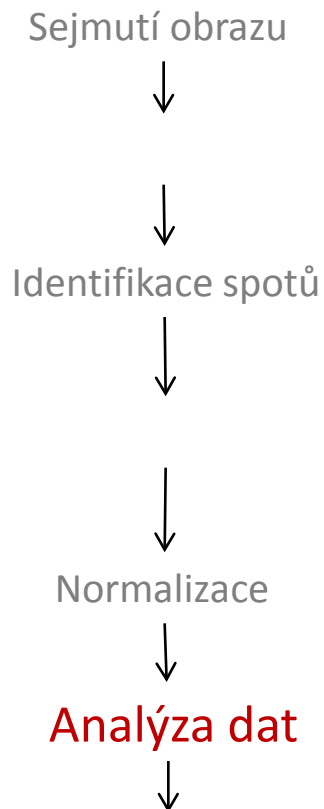


- **Normalizace = kompenzace rozdílů ve velikosti spotů a intenzitě mezi gely, které nesouvisí s expresí**
- nutná podmínka pro správné srovnání kvantity spotů
 - Variace způsobené různými faktory:
 - chyby pipetování během přípravy vzorku
 - chyby při přípravě a zpracování vzorku
 - ztráta vzorku během 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

Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu



- 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 PDQuest

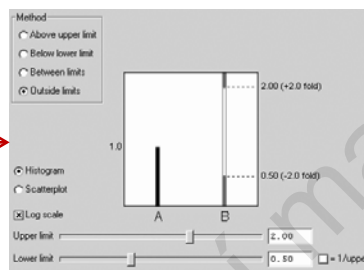


- Analýza obrazu

- Kvalitativní

Method dialog box showing two methods: 'On in B' and 'On in A'. The 'On in A' method is selected. A text field shows 'Min. fold over background' set to 10.0.

- Kvantitativní



- Statistické

Method dialog box for statistical analysis. It lists several methods: Student's t-test, Mann-Whitney Signed-Rank Test, Wilcoxon Paired-Sample Test, and Partial Least Squares. The 'Partial Least Squares' method is selected. There are checkboxes for 'Prefilter noisy data', 'Iteratively remove insignificant spots', 'Compute confidence values', 'Scale spots to ignore size differences', and 'Log transform'. A 'Significance' section shows a 'Level(%)' slider set to 90.

- Booleovy

Method dialog box for Boolean analysis. It shows three methods: 'In A and not in B', 'Not in A and in B', and 'In only A or only in B'. The 'In A and not in B' method is selected. There are also two Venn diagram icons: 'Intersection' and 'Union'.

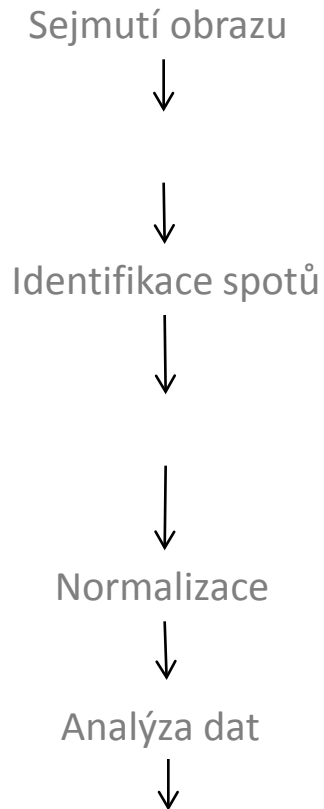
- Výběrové

- Matching

Method dialog box for matching analysis. It shows two methods: 'Spots matched to every member' and 'Spots unique to member'. The 'Spots unique to member' method is selected.

- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuest



Studijní materiály

Vyhodnocování pomocí PDQuest

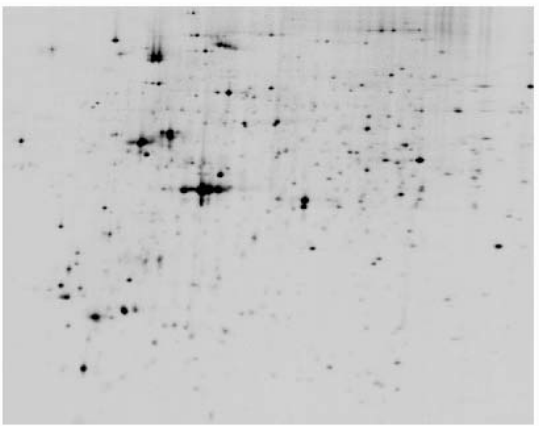


- Analýza obrazu

- Report

Image report

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



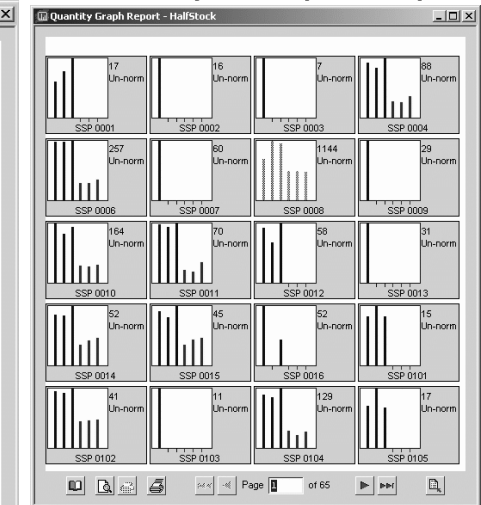
Description N/A
 Directory C:\PDQuest Data\MatchSets_MS00017 2003-07-08 Data
 Filename half3 v1 x3.gsc
 Image Date unknown
 Imager GS-710 Pixel size(um) X: 176.0, Y: 176.0
 Image Area(mm)X: 178.6, Y: 140.2 Data Range 2.00 OD
 Image Pixels X: 1015, Y: 797 Memory Size 791.94 Kb
 Image History
 11-Nov-1999 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



07/2.3.00/30.0009

Experiment



• Vyřezání spotů

→ **Manuálně** (skalpel, spot picker)



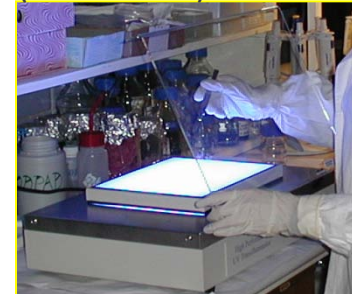
- viditelné barvičky
- fluorescenční barvičky - transiluminátor

OneTouch Plus spot picker



UV-transilluminator
(Ex: 302, 365 nm)

Dark Reader
(Ex: 490 nm)



Automaticky

- Spot cutter

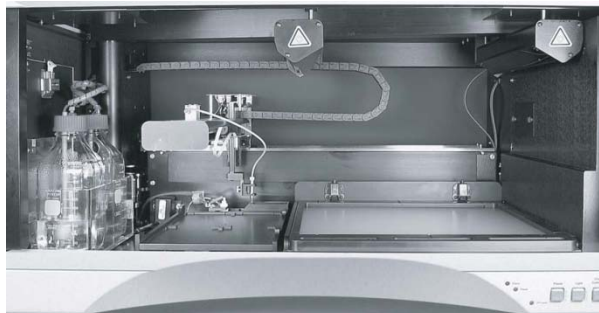
Exquest



Ettan Spot picker



Xcise



1.
te

C



Děkuji za pozornost.



Central European Institute of Technology
c/o Masaryk University
Žerotínovo nám. 9
601 77 Brno, Czech Republic

www.ceitec.eu | info@ceitec.cz



EUROPEAN UNION
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND
INVESTING IN YOUR FUTURE



**OP Research and
Development for Innovation**

