

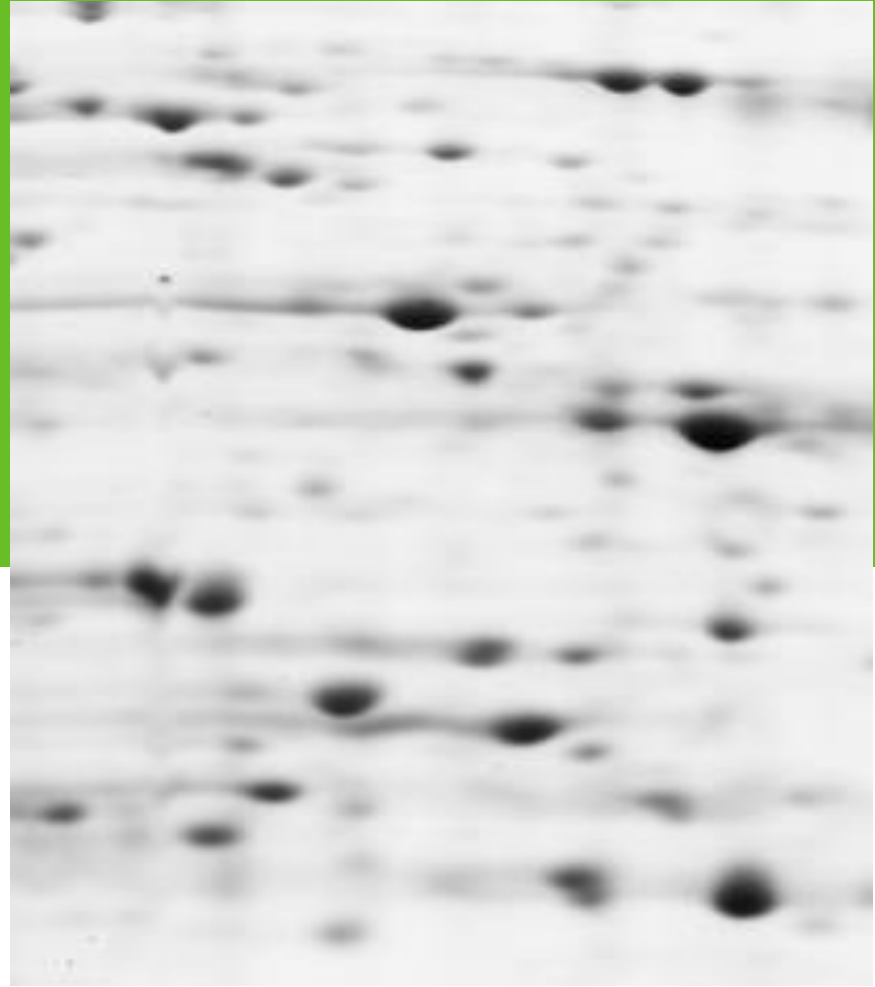


CEITEC

Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

Analýza obrazu

Gabriela Lochmanová



esf european
social fund in the
czech republic



EUROPEAN UNION



MINISTRY OF EDUCATION,
YOUTH AND SPORTS

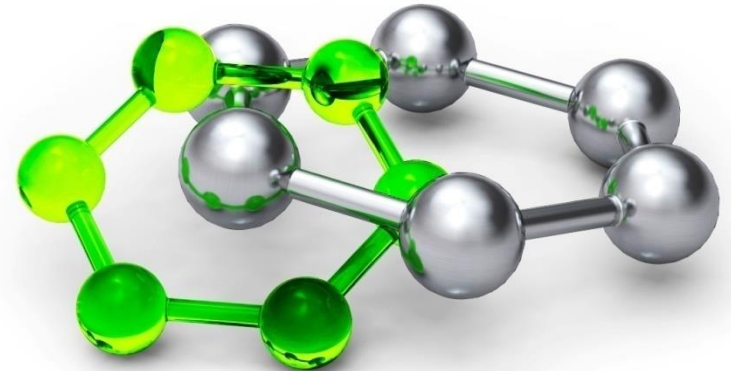


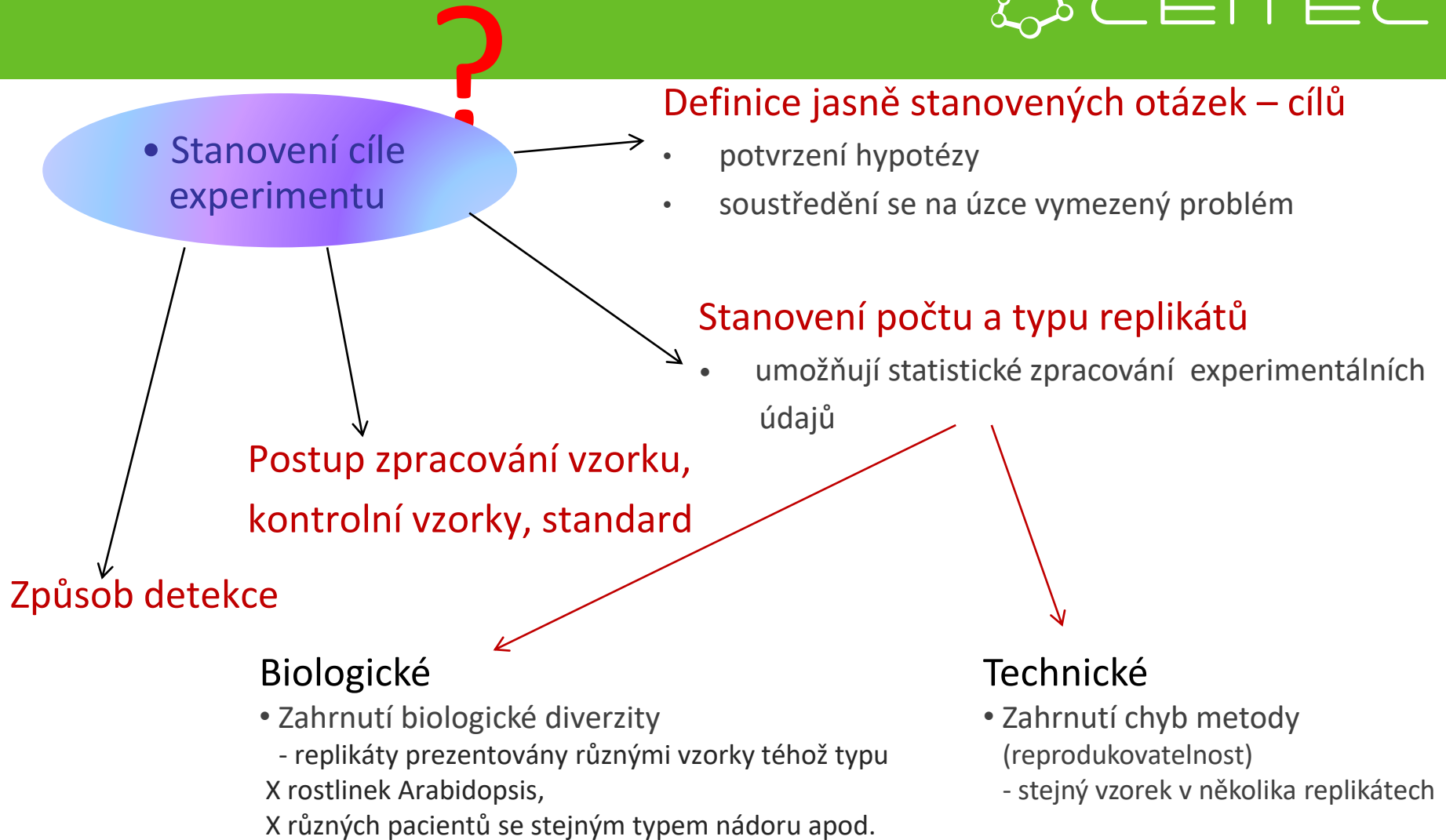
OP Education
for Competitiveness



UNIVERSITAS
MASARYKIANA BRUNENSIS

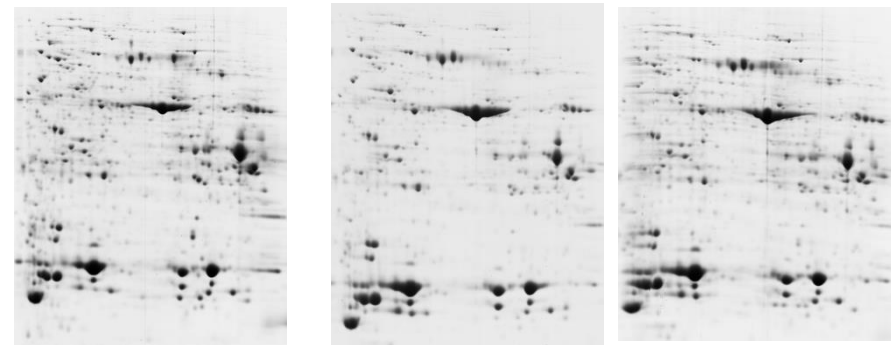
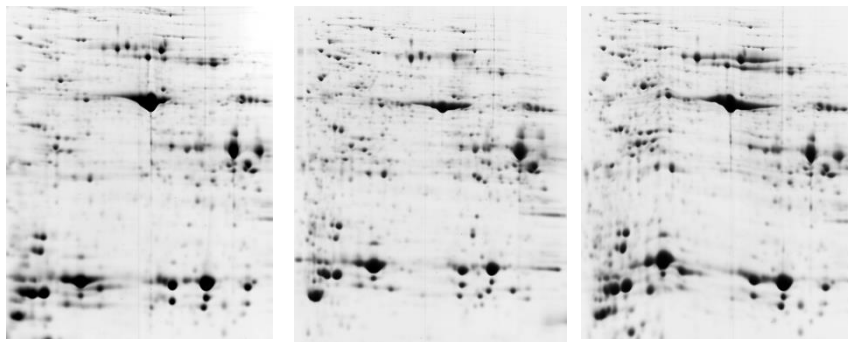
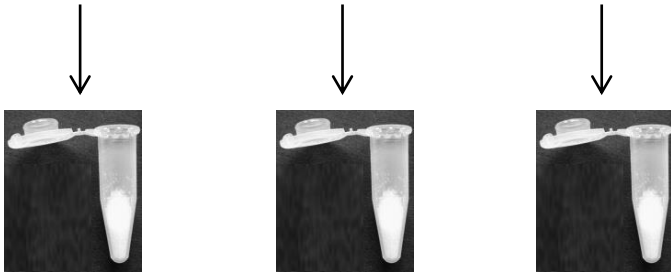
INVESTMENTS IN EDUCATION DEVELOPMENT





Biologické replikáty

Technické replikáty



Experiment



Obecné požadavky na vizualizaci proteinů

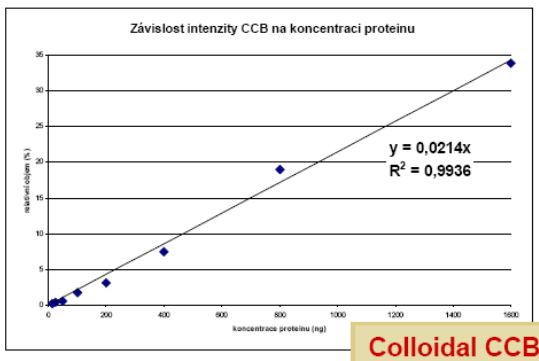
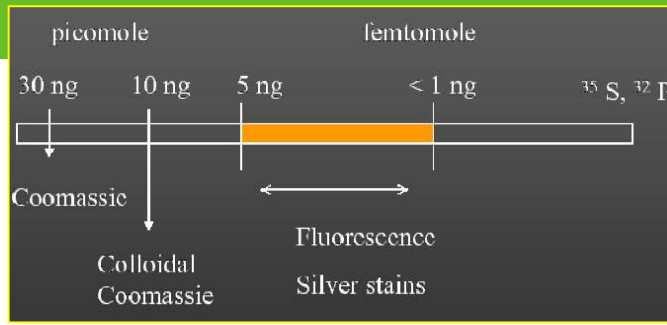


• Detekce

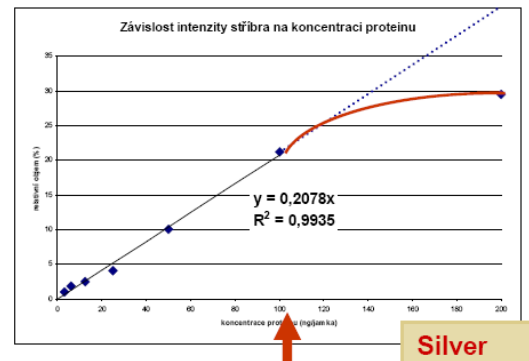
- vysoká citlivost
- kvantitativní barvení
- široký lineární rozsah závislosti intenzity barvičky na množství proteinu v gelu

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

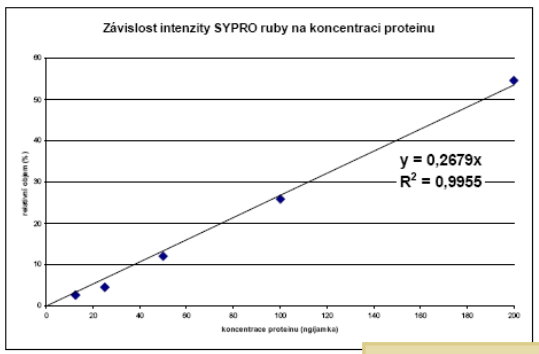
- end-point
- trvanlivost
(např. zhášení fluorescenčních barviček!)
- kompatibilita s následnými analýzami
(např. stříbro - glutaraldehyd!)



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)

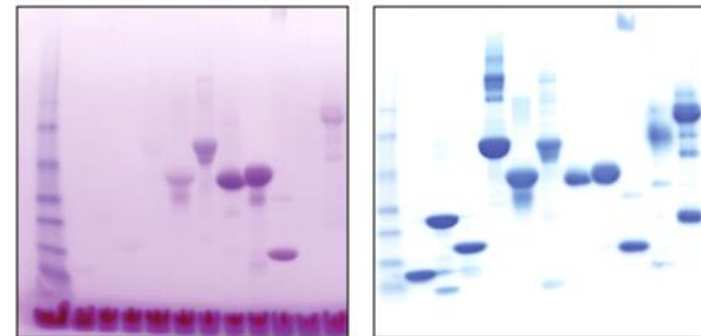
Barvení po analýze

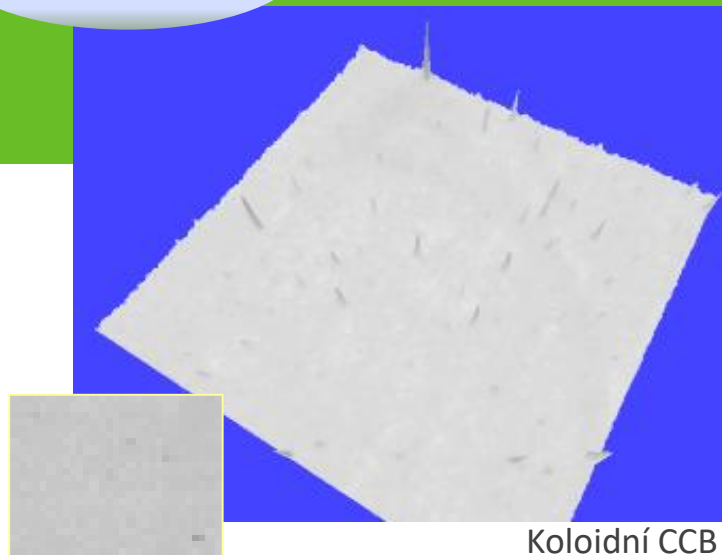
Nespecifické barvení: všechny proteiny

- **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)

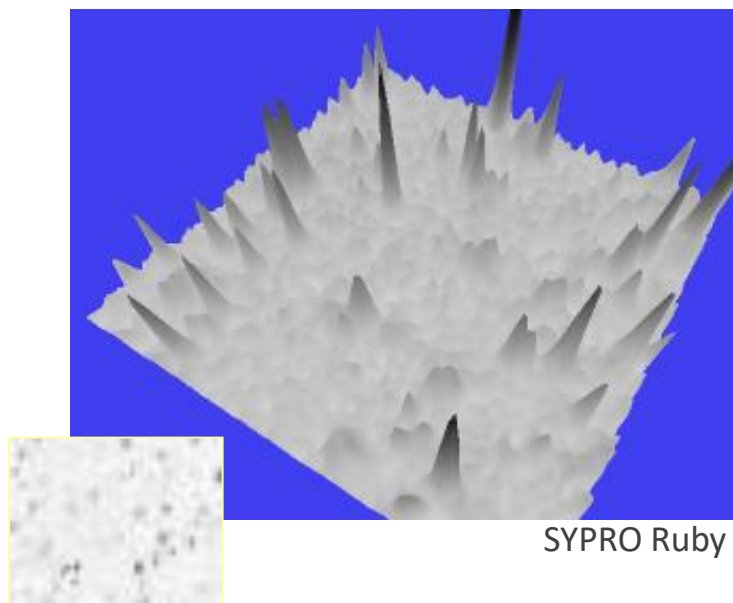
Specifické barvení: post-translační modifikace (PTM)

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

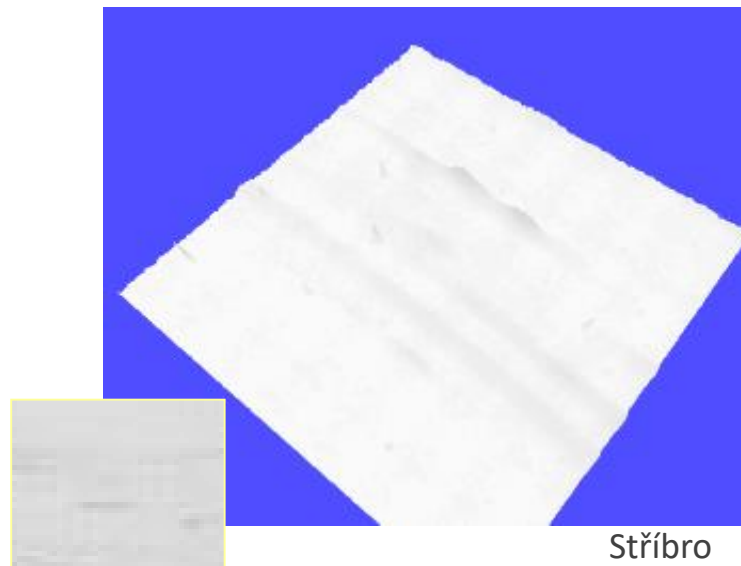




Koloidní CCB

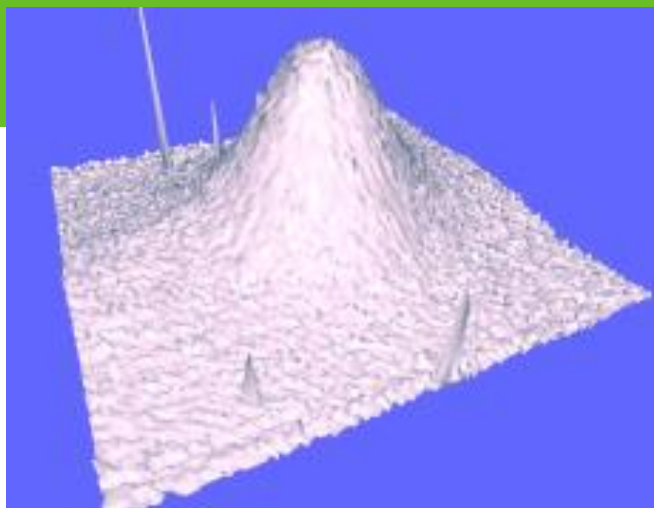


SYPRO Ruby

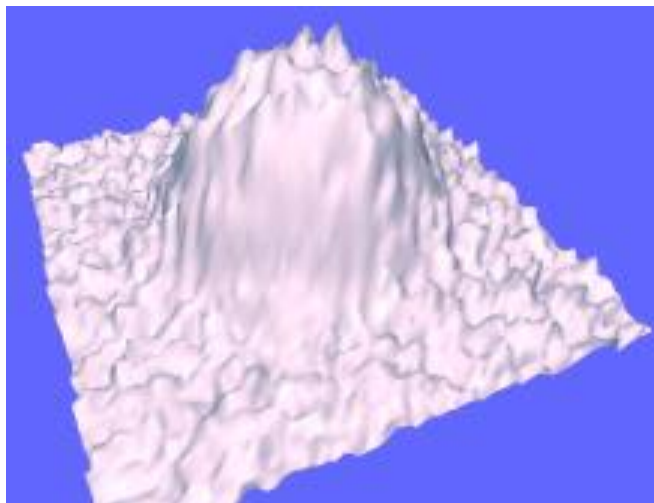


Stříbro

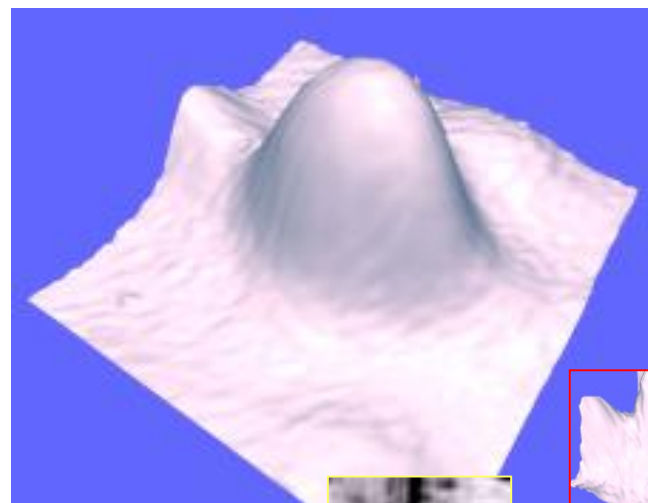
Proteinový spot – 3D náhled



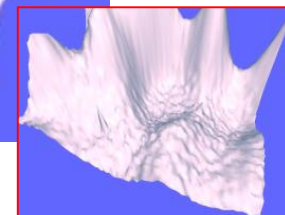
Koloidní CCB



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

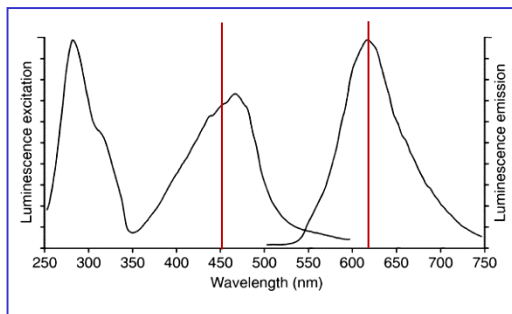


Přístroje pro snímání obrazu

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



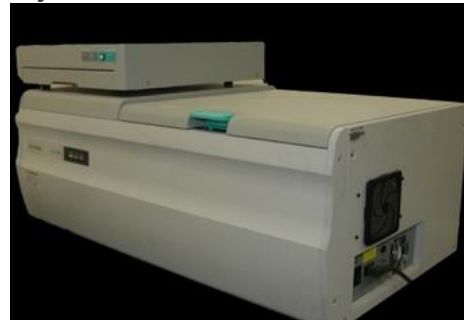
Image Scanner III



Typhoon 9200 Imager



Fuji FLA-3000



PharosFX™ and PharosFX Plus Systems





- 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

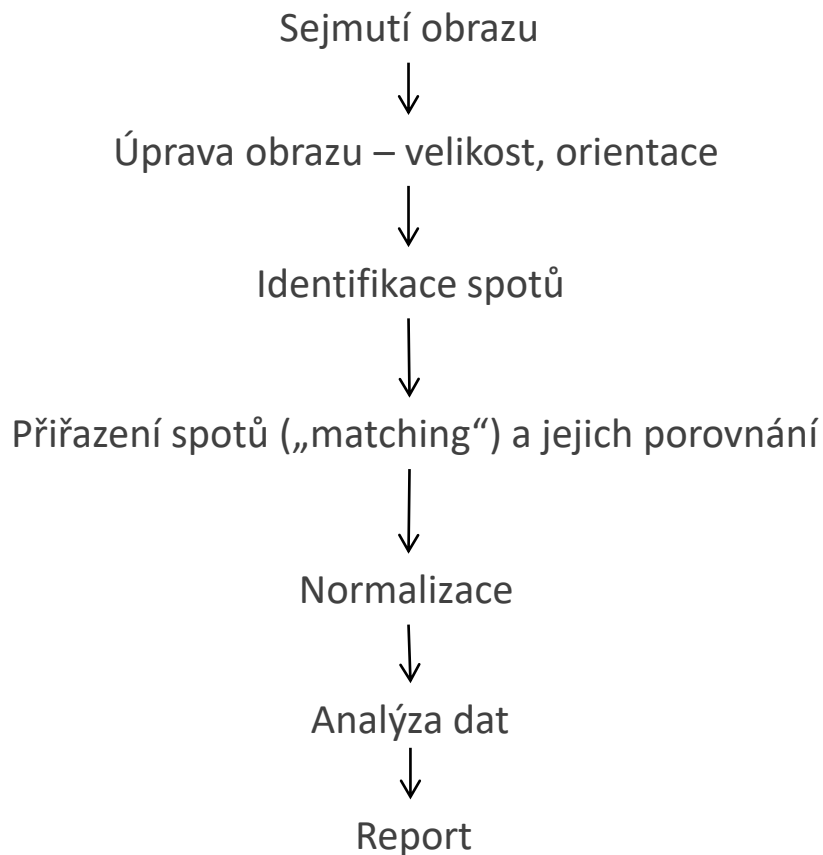
- Různé typy SW se liší:
filozofií, stupněm možností zasahovat do vyhodnocení,
možnostmi statistických vyhodnocení, cenou.
- Příklady SW: Delta 2D, ImageMaster, Melanie, Progenesis,
PDQuest

Výsledky analýzy jsou ovlivněny:

- kvalitou a filozofií daného programu
- uživatelem - manuální editace

- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuest



Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

Sejmutí obrazu



Identifikace spotů



Normalizace

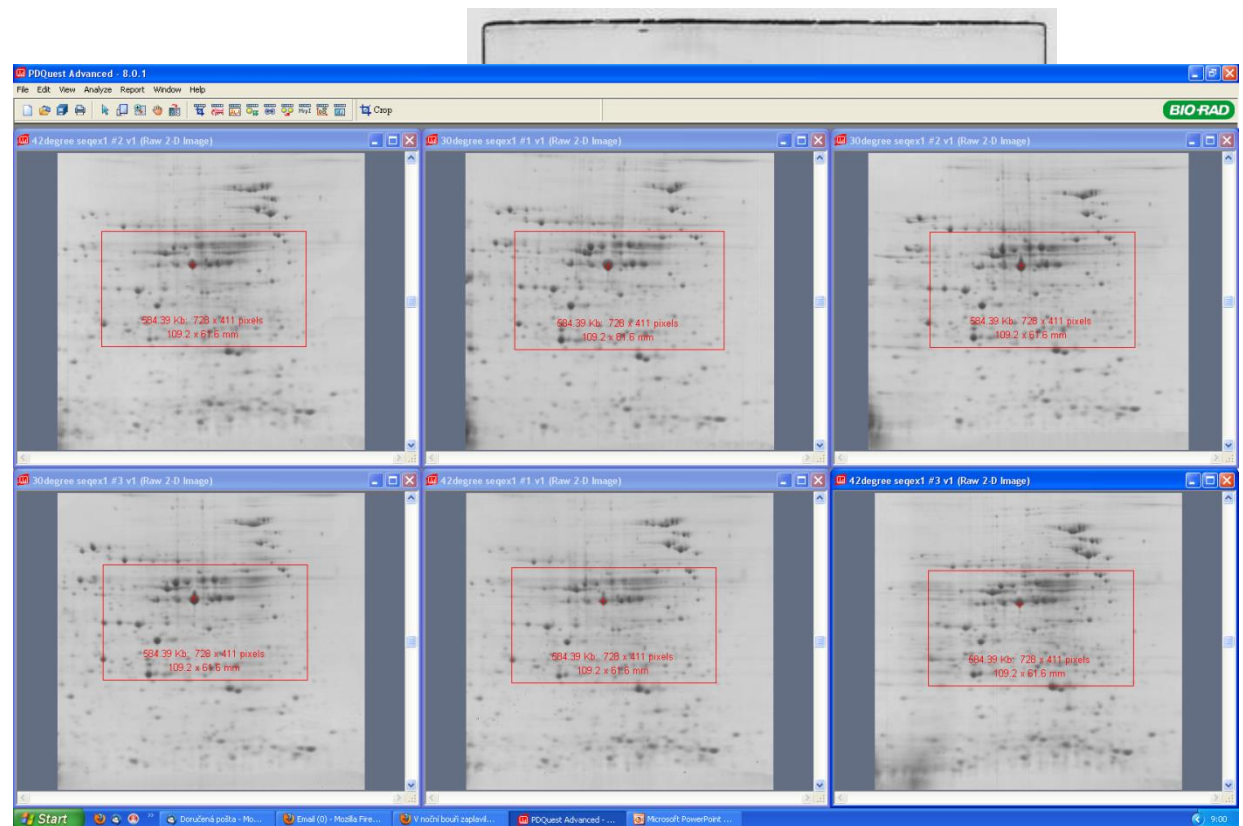


Analýza dat



Report

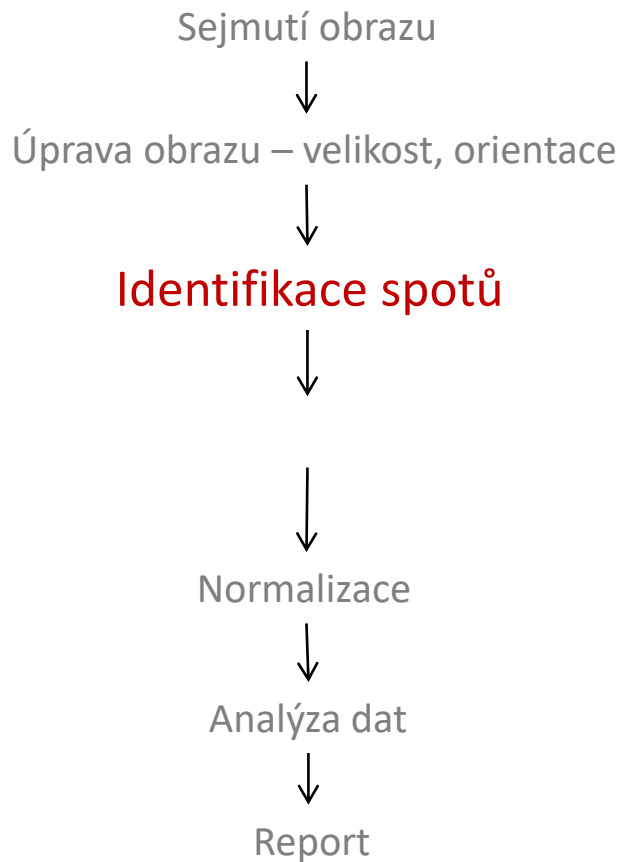
- velké rozlišení (tiff)
- všechny srovnávané gely musí mít stejnou velikost



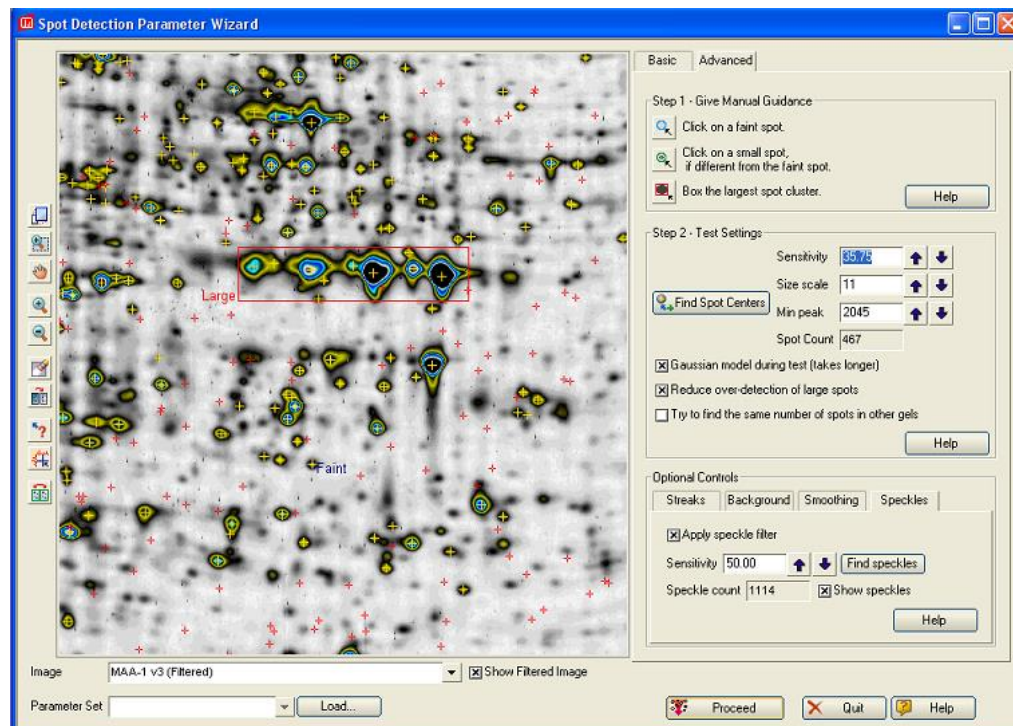
Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu



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



Vyhodnocování pomocí PDQuest

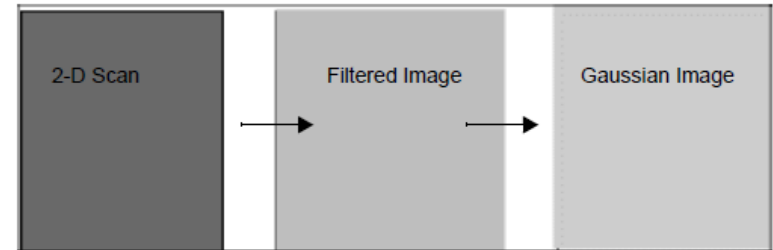


- Analýza obrazu

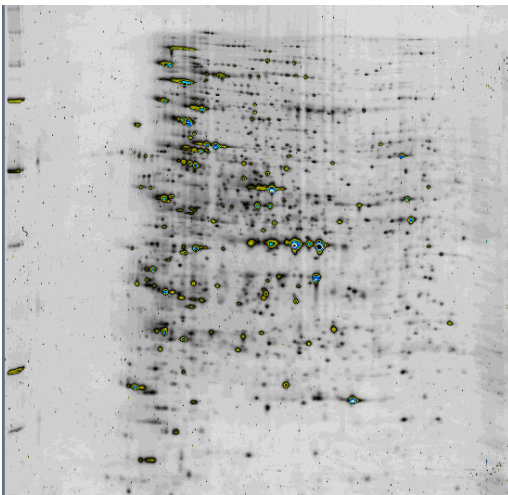
Detekce spotů a filtrace pozadí

- **Scanset**

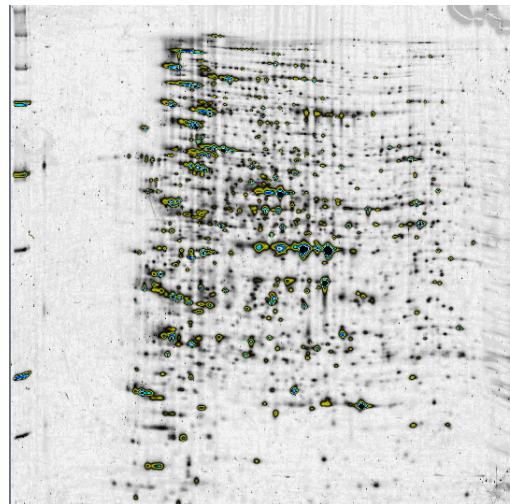
= soubor obrazů, které vycházejí z jednoho základního gelu (3 zobrazení každého gelu)



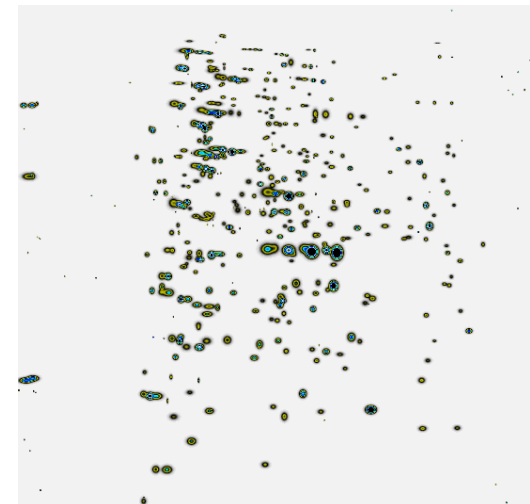
Raw 2D image



Filtered



Gaussian



Vyhodnocování pomocí PDQuest

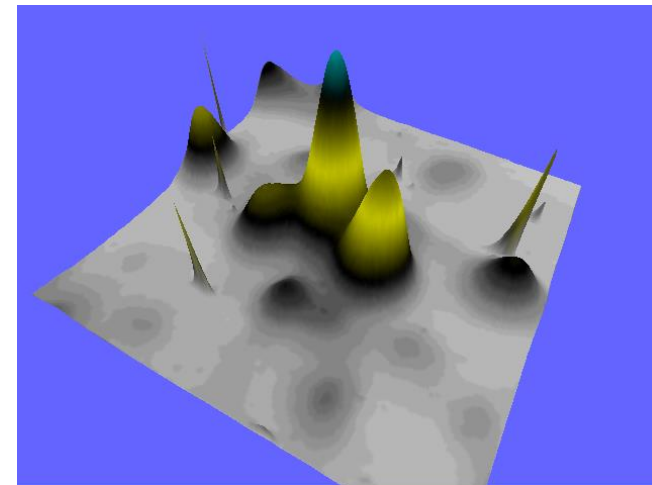
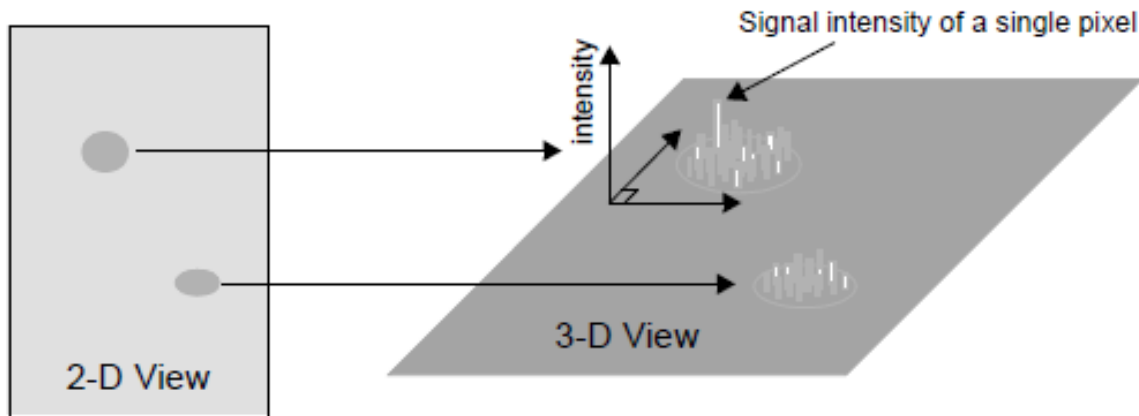


- Analýza obrazu

- **Kvantita spotu**

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

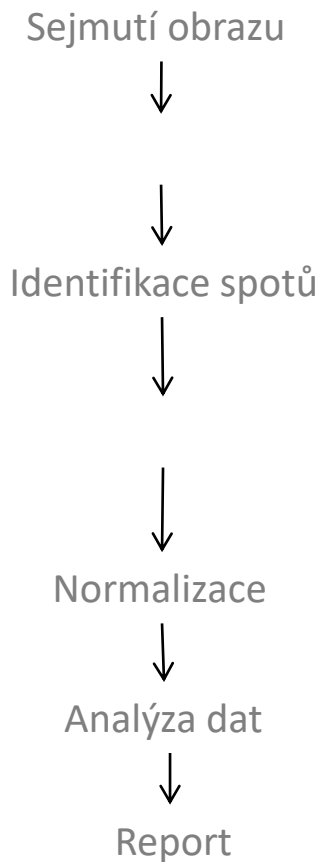
- koresponduje s množstvím proteinu v aktuálním spotu



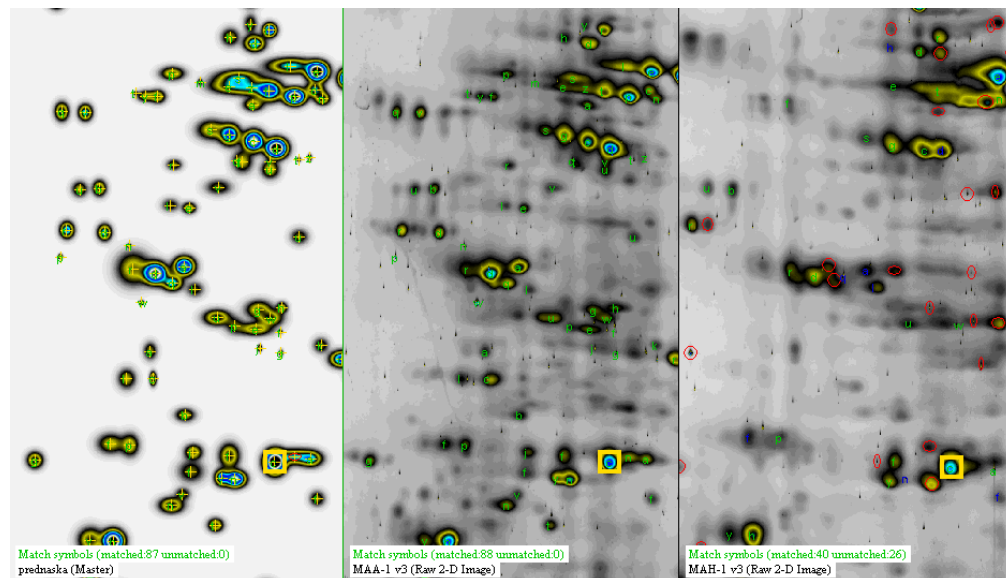
Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

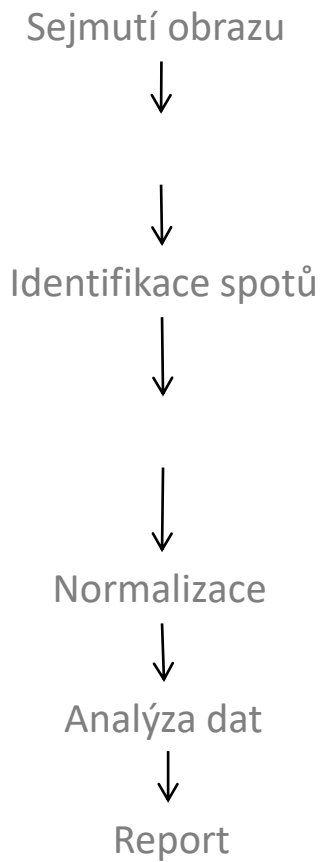


- **Matchset** = soubor gelů porovnávaných navzájem v rámci experimentu
- Master gel = uměle vytvořený gel, zahrnuje spoty ze všech srovnávaných gelů

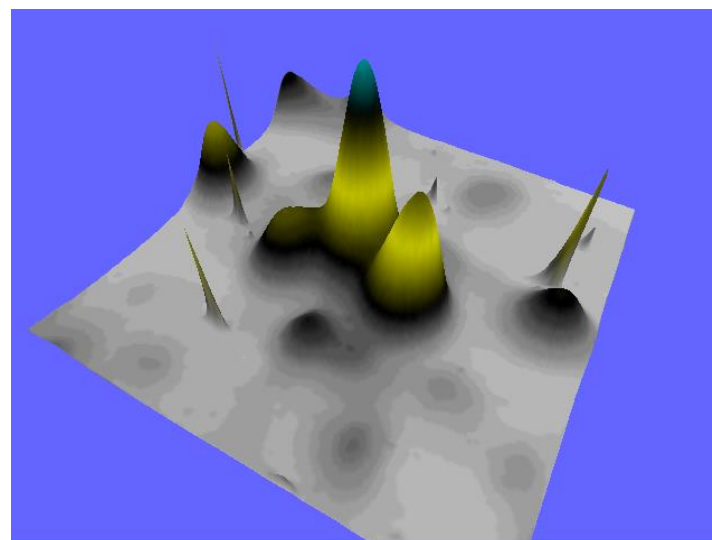
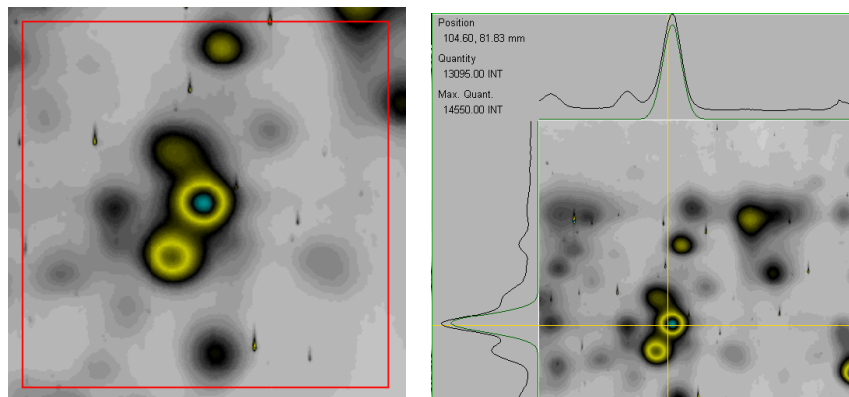


- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuest



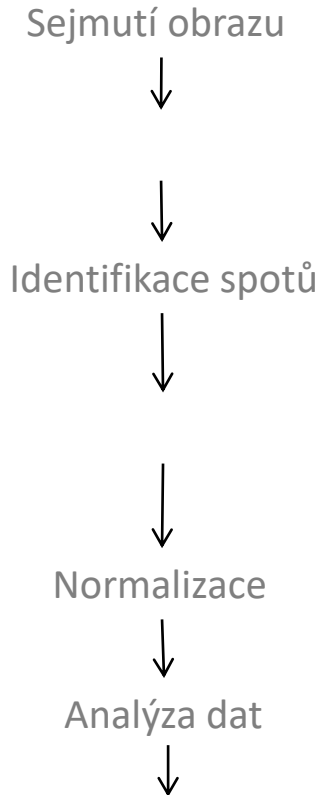
Editace spotů



Vyhodnocování pomocí PDQuest

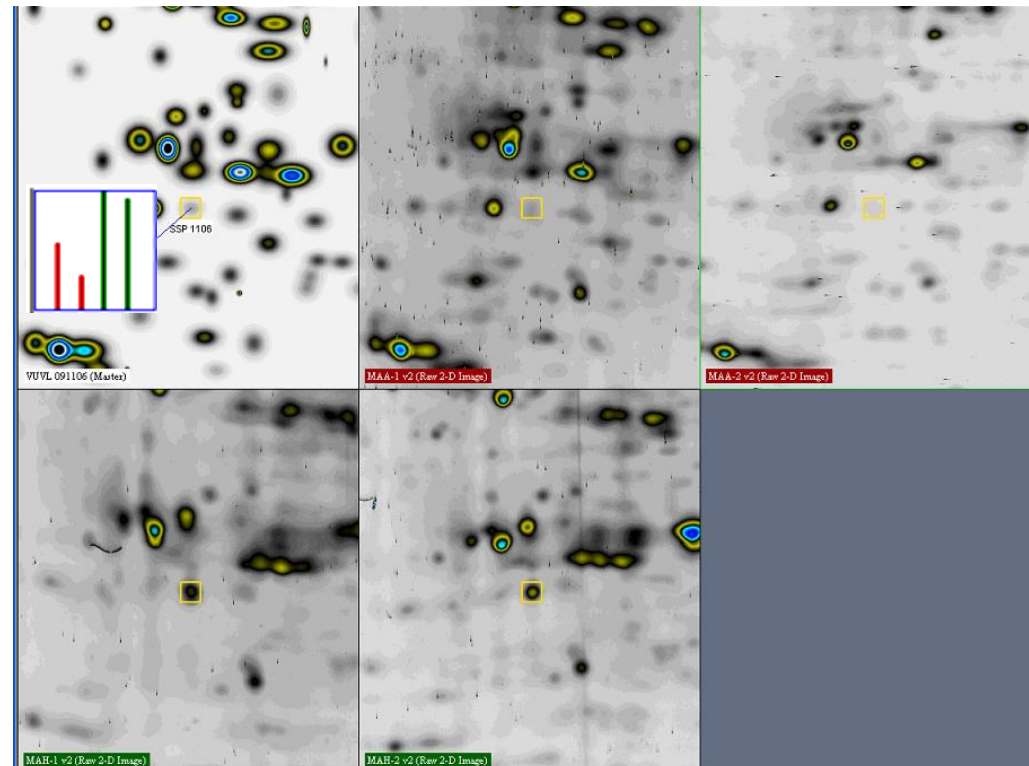


- Analýza obrazu



Replikativní skupiny

- máme-li 2 a více gelů od jednoho vzorku (replikáty)
- 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)

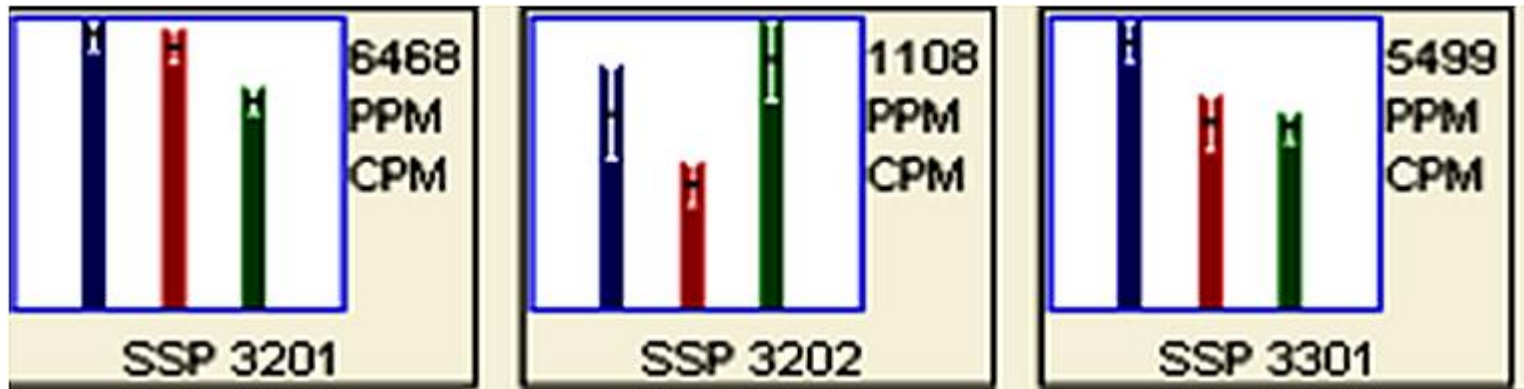
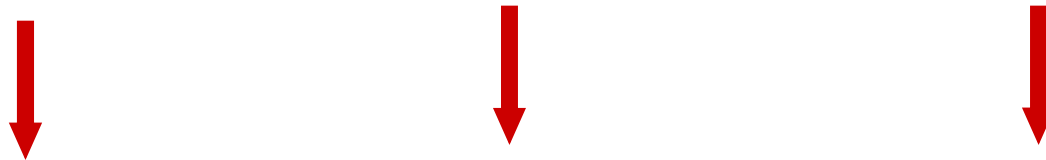
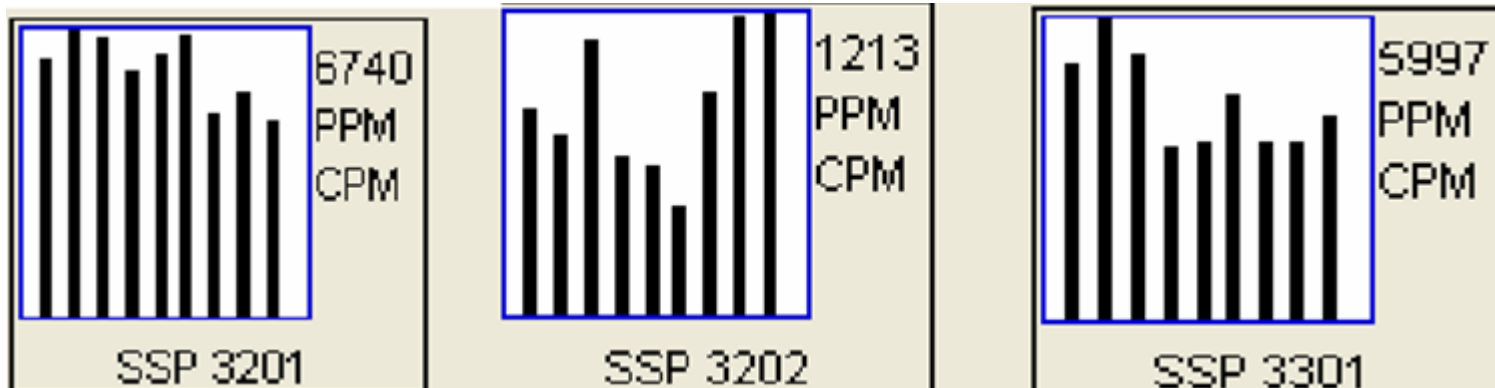


Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

- Replikativní skupiny

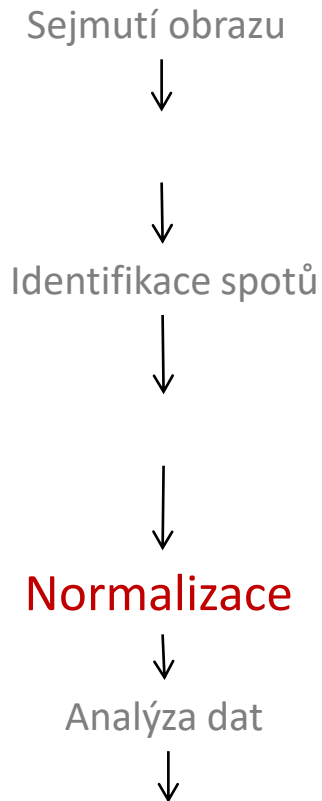


celkem

Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu

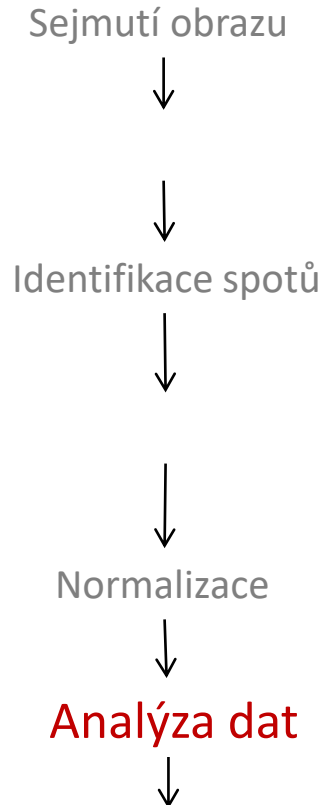


- **Normalizace = kompenzace rozdílů ve velikosti spotů a intenzitě mezi gely, které nesouvisí s expresí**
- nutná podmínka pro správné srovnání kvantity spotů
 - Variace způsobené různými faktory:
 - chyby pipetování během přípravy vzorku
 - chyby při přípravě a zpracování vzorku
 - ztráta vzorku během 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. A text field for 'Min. fold over background' is set to 10.0.

- Kvantitativní

Method dialog box for quantitative analysis. It includes a histogram view with a vertical line at 1.0. The 'Upper limit' is set to 2.00 and the 'Lower limit' is set to 0.50. The 'Log scale' checkbox is checked.

- Statistické

Method dialog box for statistical analysis. It lists several tests: Student's t-test, Mann-Whitney Signed-Rank Test, Wilcoxon Paired-Sample Test, and Partial Least Squares (selected). It also includes checkboxes for 'Iteratively remove insignificant spots', 'Scale spots to ignore size differences', and 'Log transform'. A 'Significance' section has a 'Level(%)' slider set to 90.

- Booleovy

Method dialog box for Boolean analysis. It shows set theory options: In A and not in B, Not in A and in B, In only A or only in B, Intersection, and Union.

- Výběrové

- Matching

Method dialog box for matching. It has two options: Spots matched to every member and Spots unique to member.

Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Analýza obrazu



Vyhodnocování pomocí PDQuest

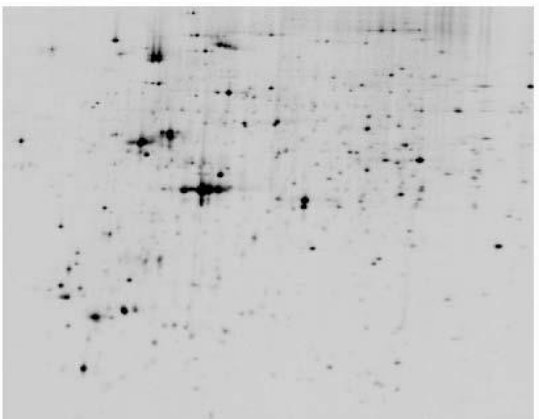


- Analýza obrazu

- 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)

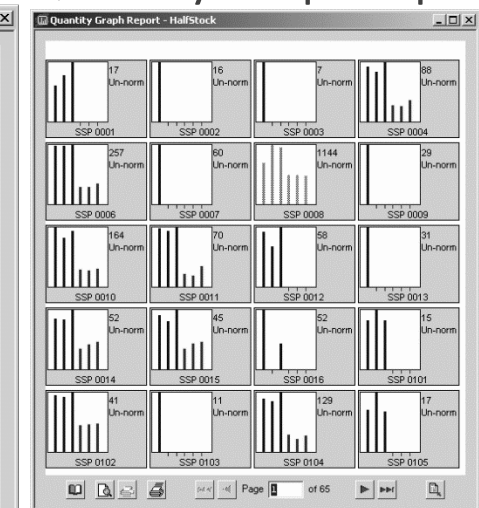
Acquisition Parameters
Gain Setting: 0.0
Size Mode: absolute
Ref Bkgd Time: 0.00 sec.
PMT Voltage: (0%)

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



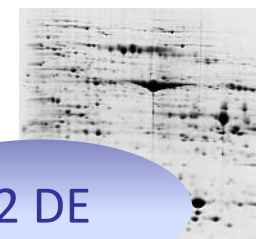
Experiment



- Stanovení cíle experimentu

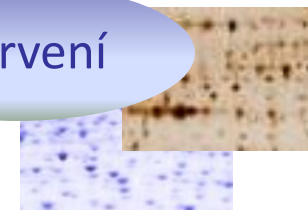


- Příprava vzorku



- 2 DE

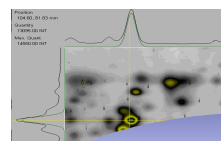
- Barvení



- Snímání obrazu



- Analýza obrazu



- Vyřezání spotů



• Vyřezání spotů

→ **Manuálně** (skalpel, spot picker)



- viditelné barvičky
- fluorescenční barvičky
- transiluminátor

OneTouch Plus spot picker



UV-transilluminator

Dark Reader

(Ex: 302, 365 nm)

(Ex: 490 nm)



Automaticky

- Spot cutter

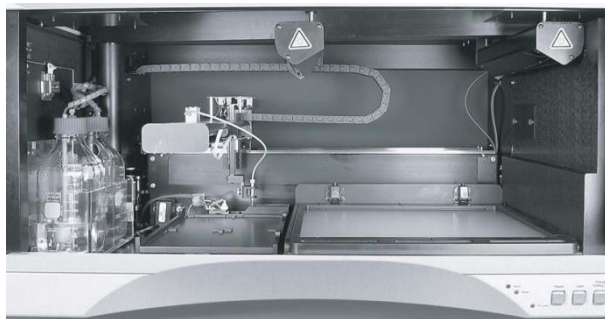
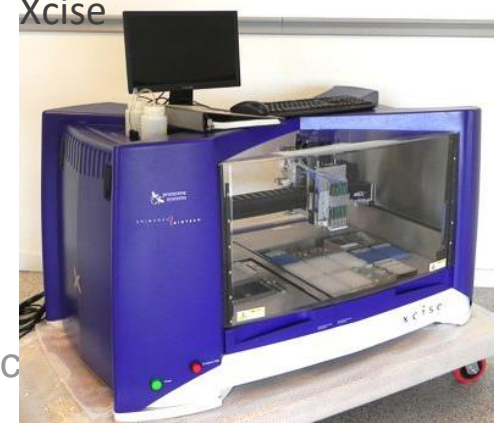
Exquest



Ettan Spot picker



Xcise





• Stanovení cíle experimentu

• Příprava vzorku

• 2 DE

• Barvení

• Snímání obrazu

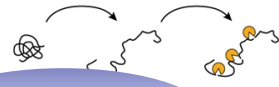
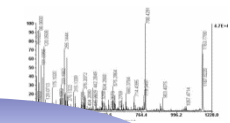
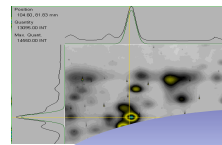
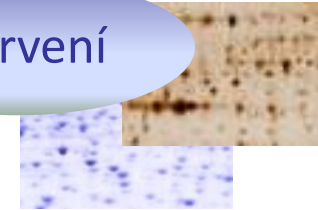
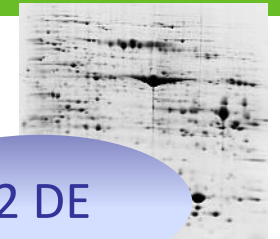
• Analýza obrazu

• Identifikace

• Digesce

• Vyřezání spotů

• Cíl experimentu



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

