



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/

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

Barvení proteinů

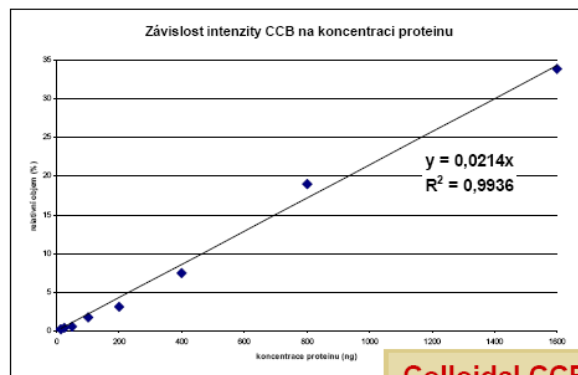
- ✚ Viditelné barvení – Coomassie brilliant blue, stříbro
- ✚ Fluorescenční barvení – Sypro Ruby, Flamingo Pink, Deep Purple, Oriole, Lumitein
- ✚ Radioaktivní značení

Barvení proteinů

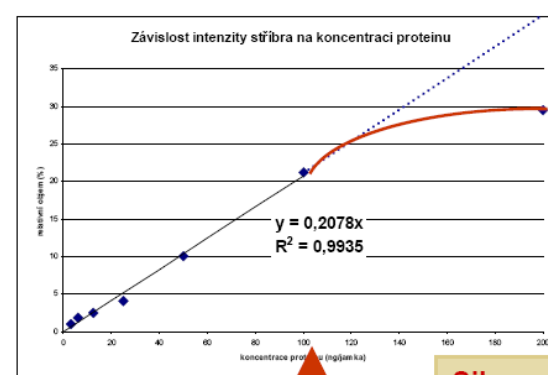
Obecné požadavky na vizualizaci proteinů:

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

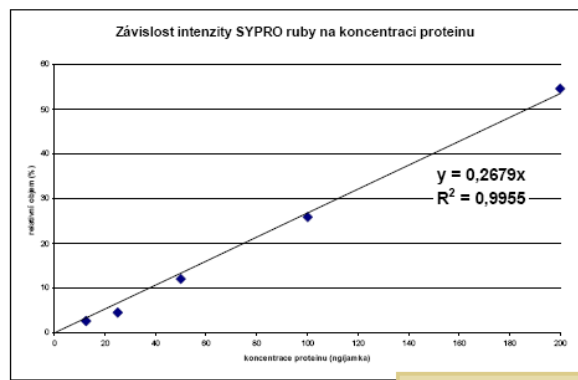
Barvení – rozsah lineární závislosti intenzity barvičky na koncentraci proteinu



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

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

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



Od analýzy obrazu očekáváme:

- ✚ srovnání gelů „treated“ a non-treated“ vzorků,
- ✚ interpolaci izoelektrických bodů a MW,
- ✚ detekci nových, chybějících nebo modifikovaných proteinů,
- ✚ kvantifikaci spotů,
- ✚ určení pozice spotu pro následné vyřezání,
- ✚ detekci a charakterizaci skupin proteinů, drah a řetězců,
- ✚ statistickou analýzu experimentálních dat.

SW

- ✚ Vývoj - kontinuální proces
- ✚ Spolehlivost
- ✚ Reprodukovatelnost
- ✚ Automatizace
- ✚ Srovnání gelů různých velikostí, tvarů, poškozených gelů

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
- ✚ Ludesi

Různá filozofie, různý stupeň možností zasahovat do vyhodnocení.

Nejkritičtější části analýzy obrazu

- ✚ Správná detekce spotů
- ✚ Odečet pozadí
- ✚ Nesmí být modifikována základní data

2 koncepty 2D

- ✚ 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.

2D elektroforéza

Neexistuje standardizace pro přípravu vzorků a průběh elektroforézy.

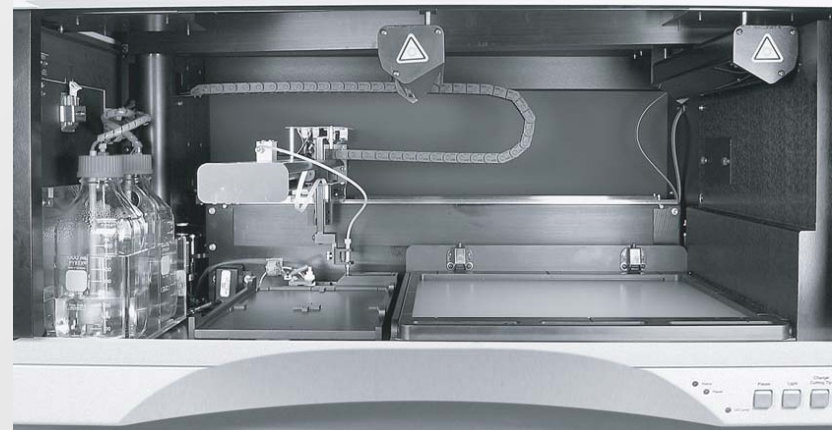
Není snadné srovnávat výsledky z různých laboratoří.

Protein nelze identifikovat pouze na základě jeho pozice v gelu.

Musí následovat identifikace – MS.

Řezání spotů

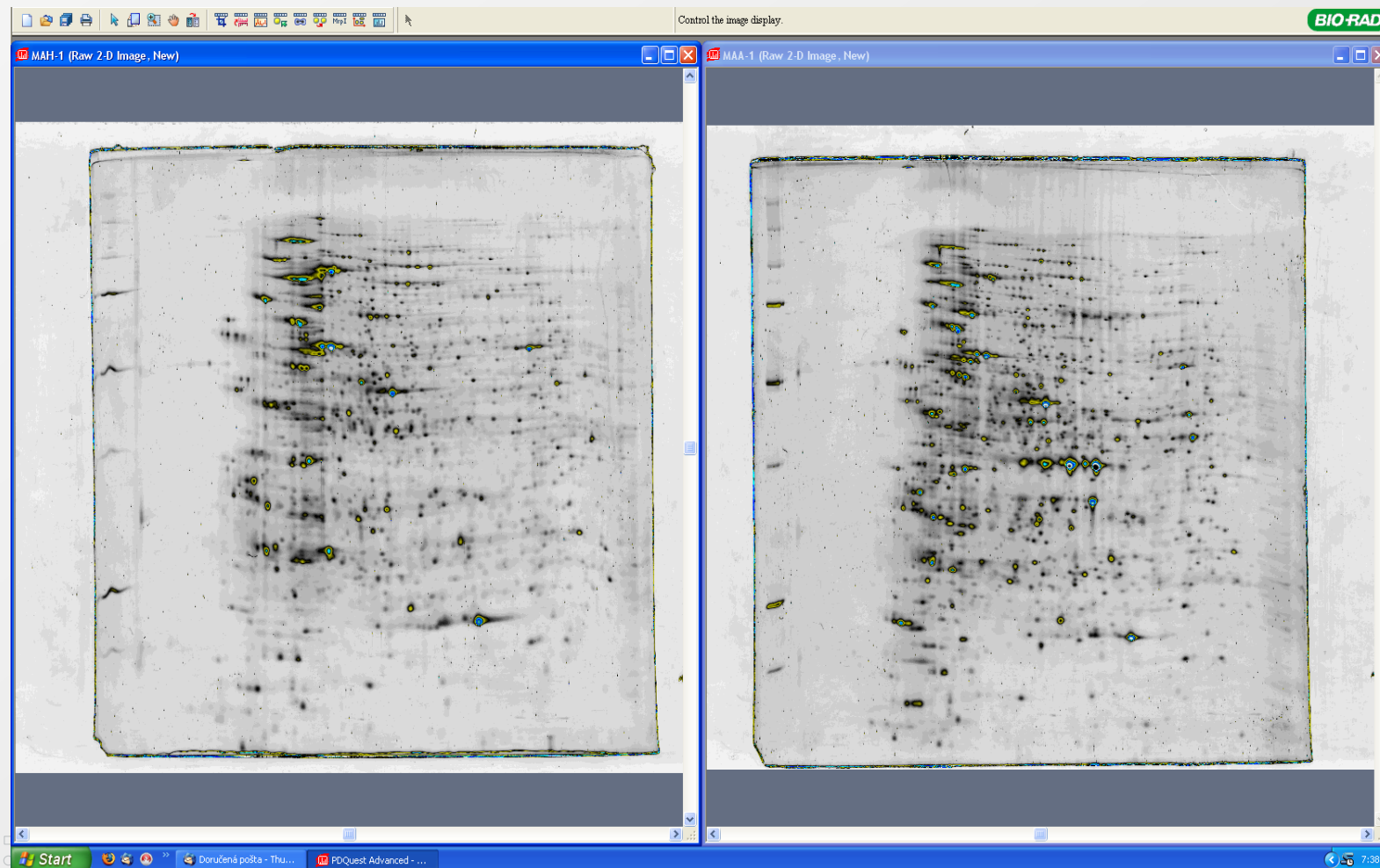
- Manuálně
(viditelné barvičky,
transiluminátor)
- Automaticky
(spot cutter)



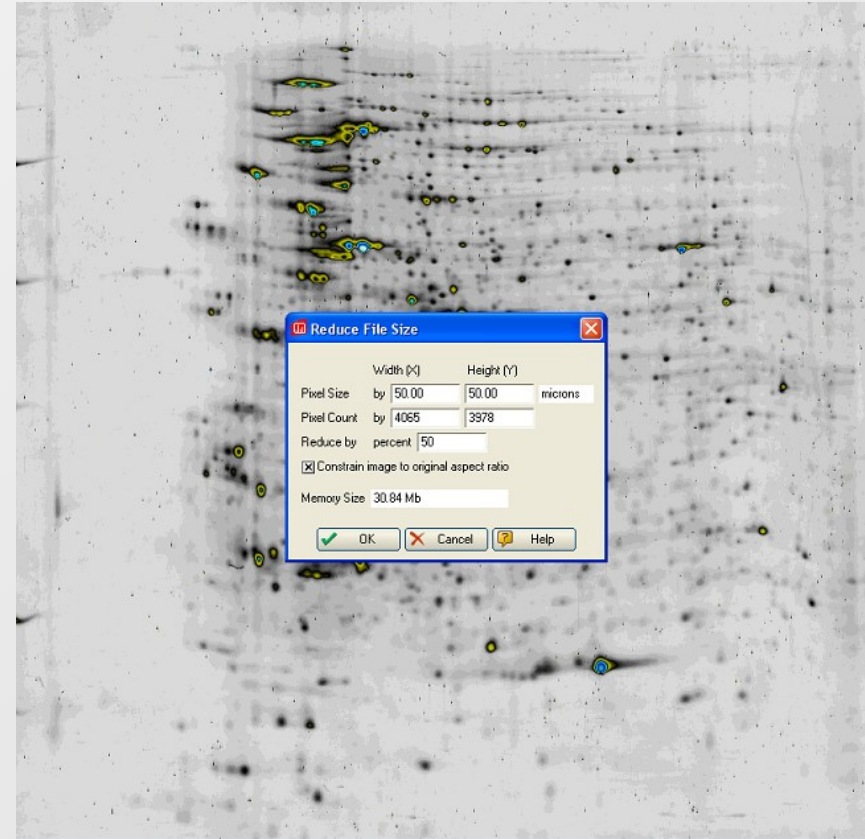
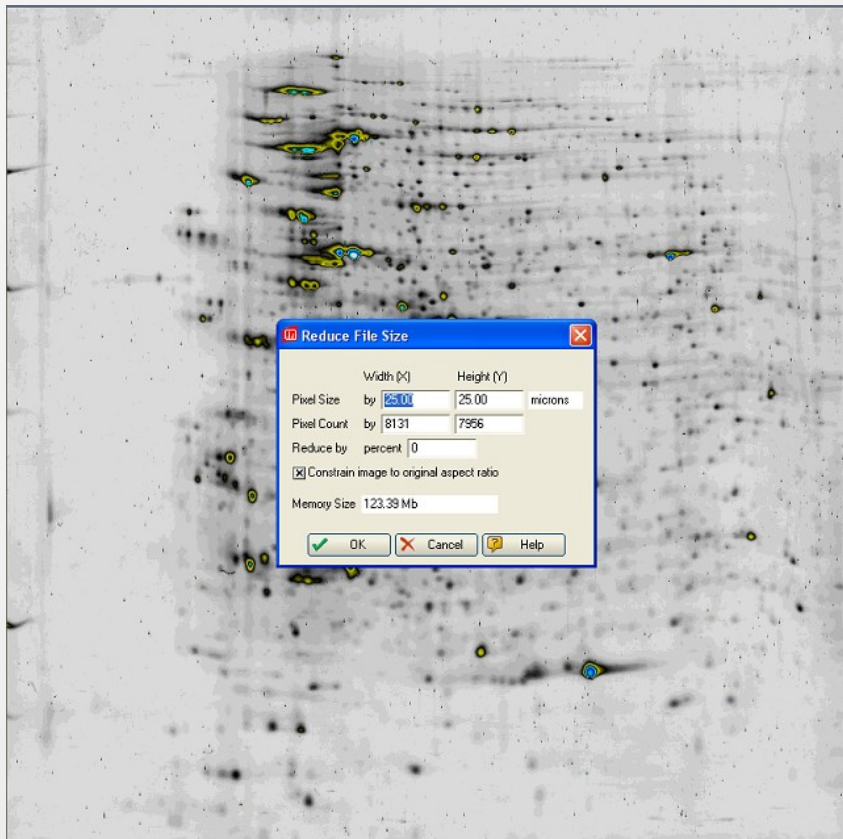
Vyhodnocování pomocí PDQuestu

- ✚ Skenování gelu
- ✚ Úprava obrázku
- ✚ Detekce spotů a analýza pozadí
- ✚ Vytvoření „master“ gelu a přiřazení spotů
- ✚ Editace
- ✚ Normalizace
- ✚ Analytické sety
- ✚ Výběr spotů pro další analýzu

PDQuest - načtení obrázku ve formátu TIFF



Redukce obrázků



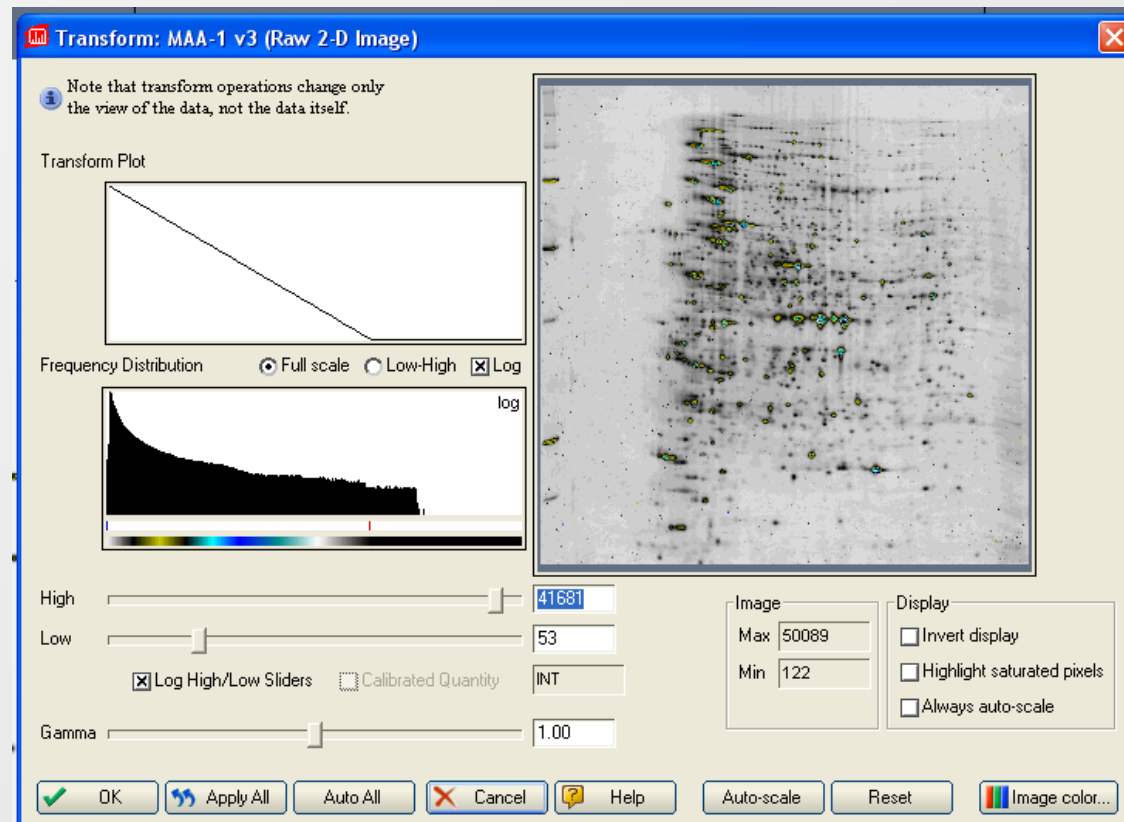
Úprava

+ Vertical/horizontal flip

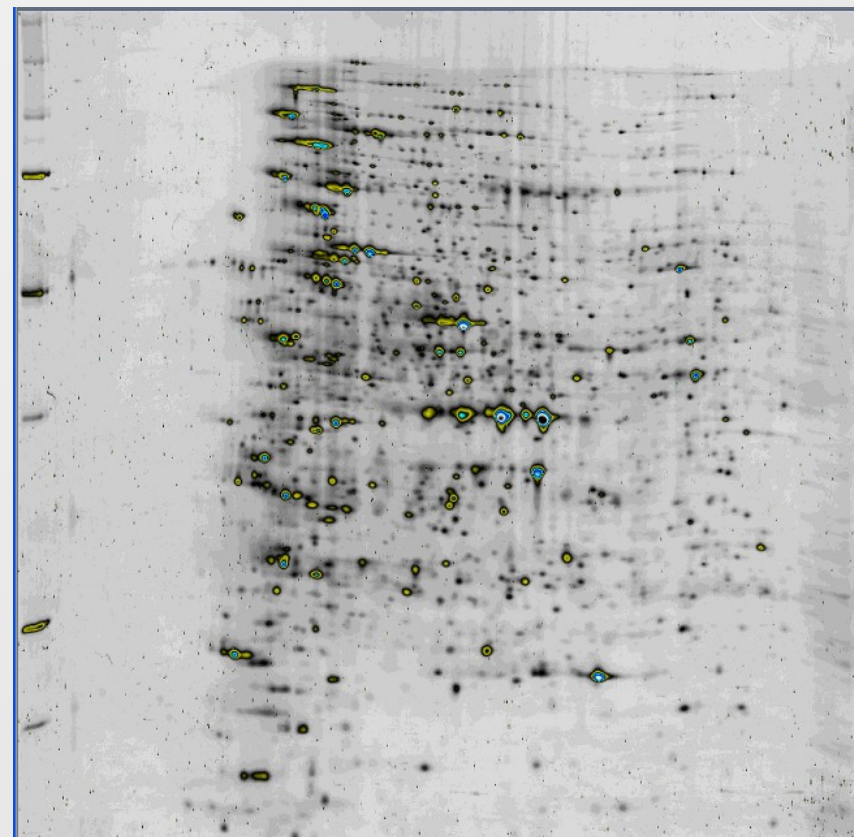
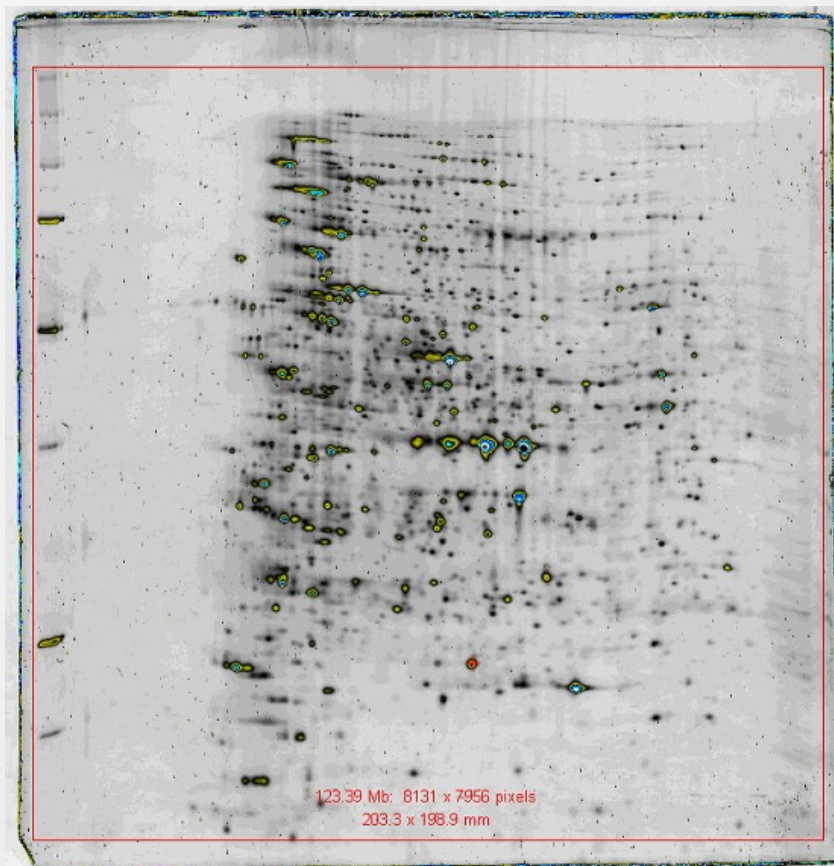
+ Transform

+ Rotation

+ Image cropping



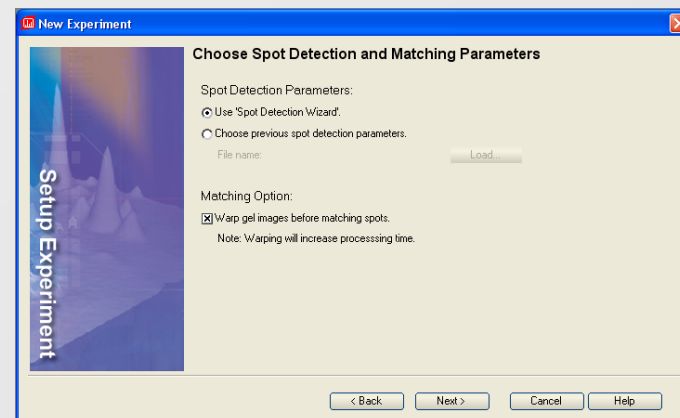
Úprava obrázku - cropping



Detekce spotů a filtrace pozadí

Spot detection wizard
– průvodce nastavením
parametrů (step by
step)




Nastavení parametrů
pro vyhledání spotů a
odfiltrování pozadí



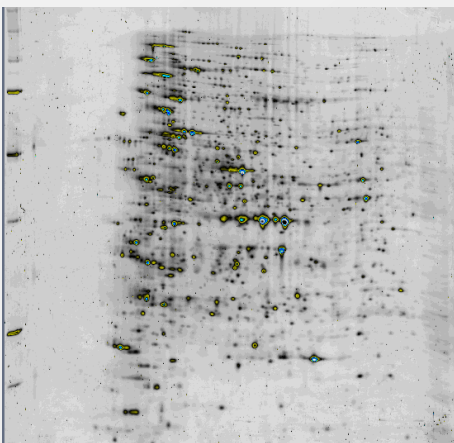
Detekce spotů a filtrace pozadí

Scanset

3 zobrazení každého gelu

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

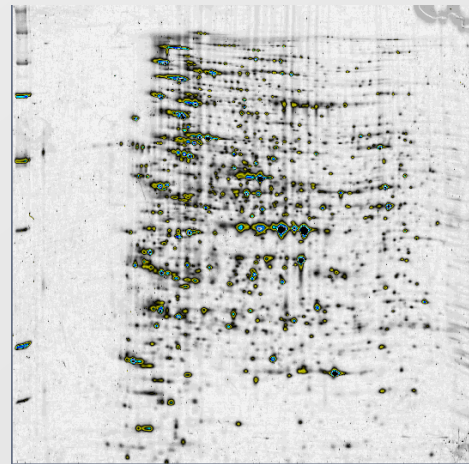
Raw 2D image



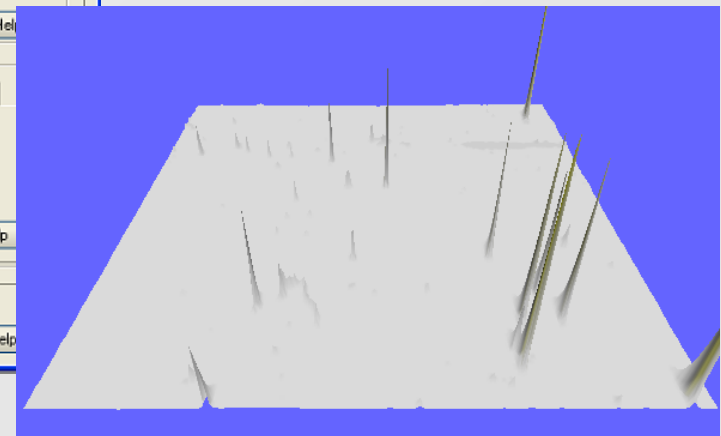
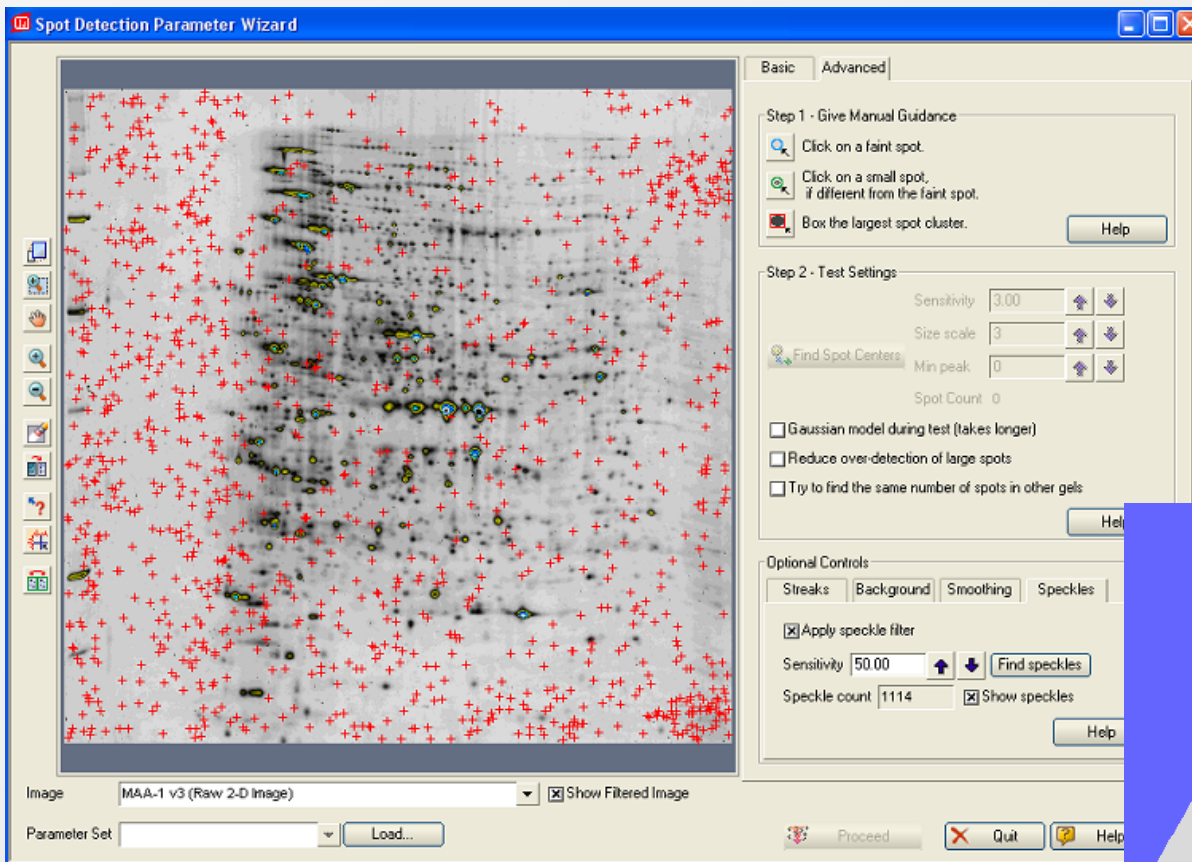
Gaussian



Filtered



Detekce - speckle



Detekce spotů a filtrace pozadí

Spot Detection Parameter Wizard

Basic | Advanced

Step 1 - Give Manual Guidance

- Click on a faint spot.
- Click on a small spot, if different from the faint spot.
- Box the largest spot cluster.

Help

Step 2 - Test Settings

Sensitivity: 35.75

Size scale: 11

Min peak: 2045

Spot Count: 467

Gaussian model during test (takes longer)

Reduce over-detection of large spots

Try to find the same number of spots in other gels

Help

Optional Controls

Streaks | Background | Smoothing | Speckles

Apply speckle filter

Sensitivity: 50.00

Speckle count: 1114

Show speckles

Help

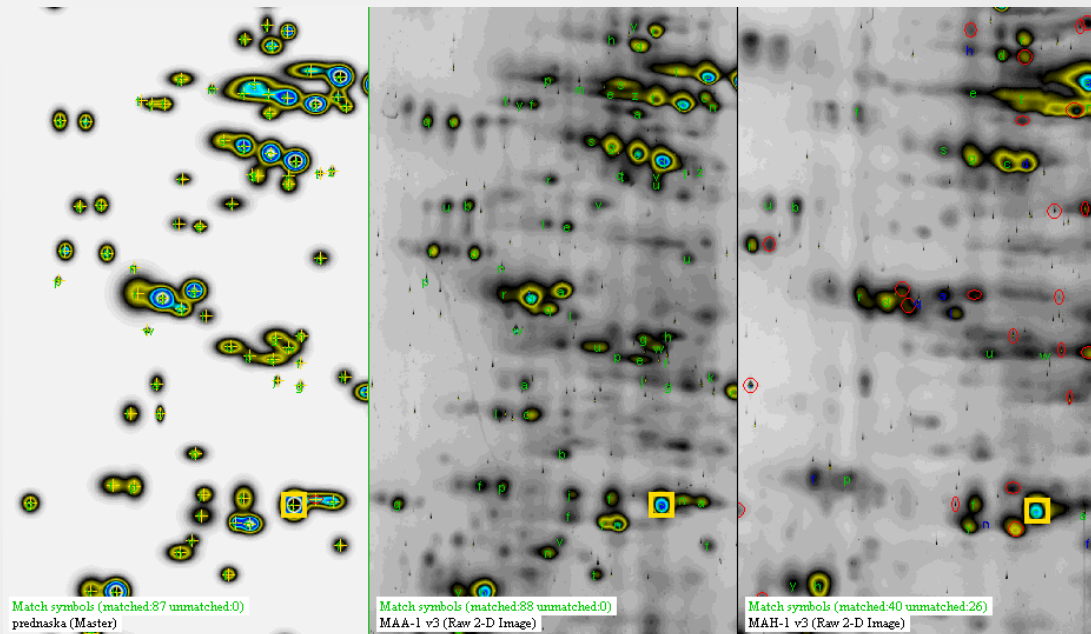
Image: MAA-1 v3 (Filtered) Show Filtered Image

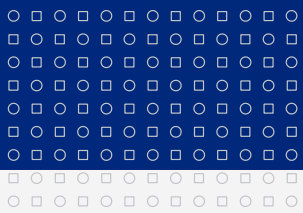
Parameter Set: Load...

Proceed Quit Help

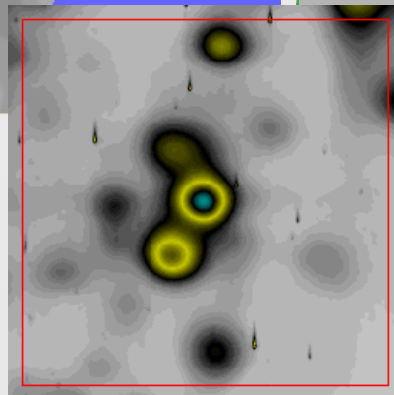
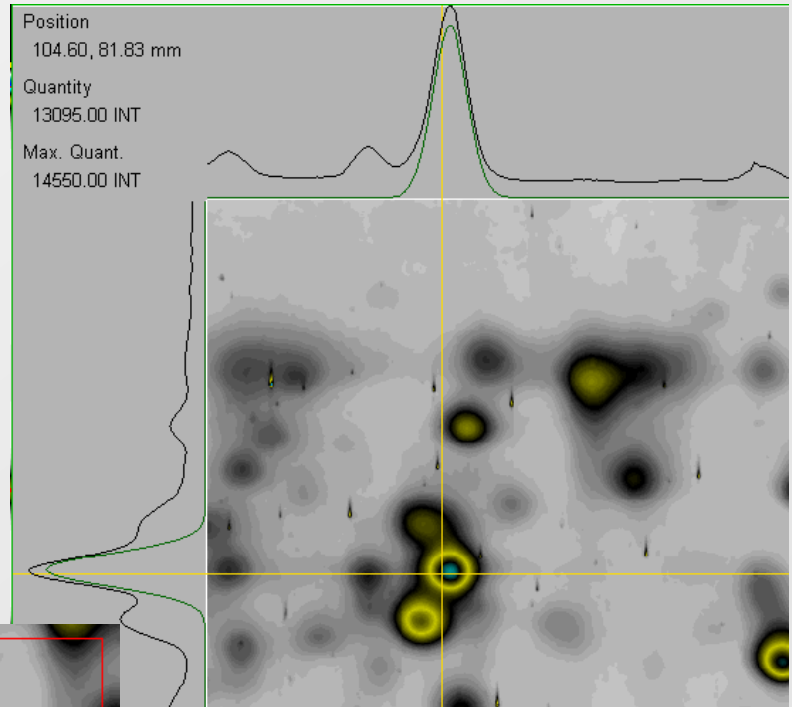
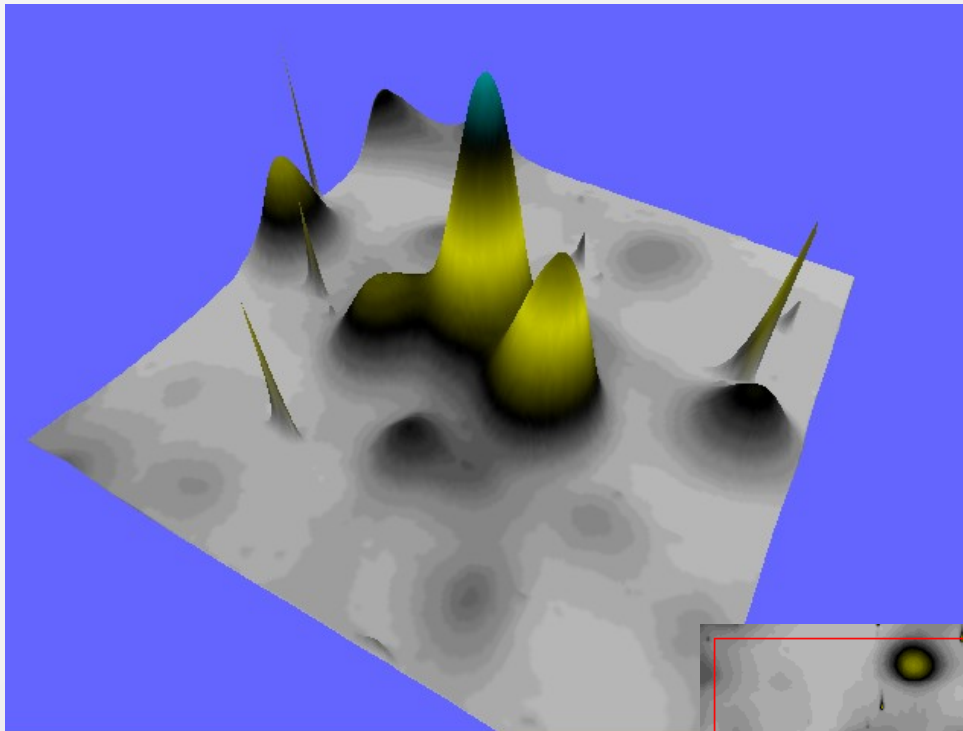
Match Set

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





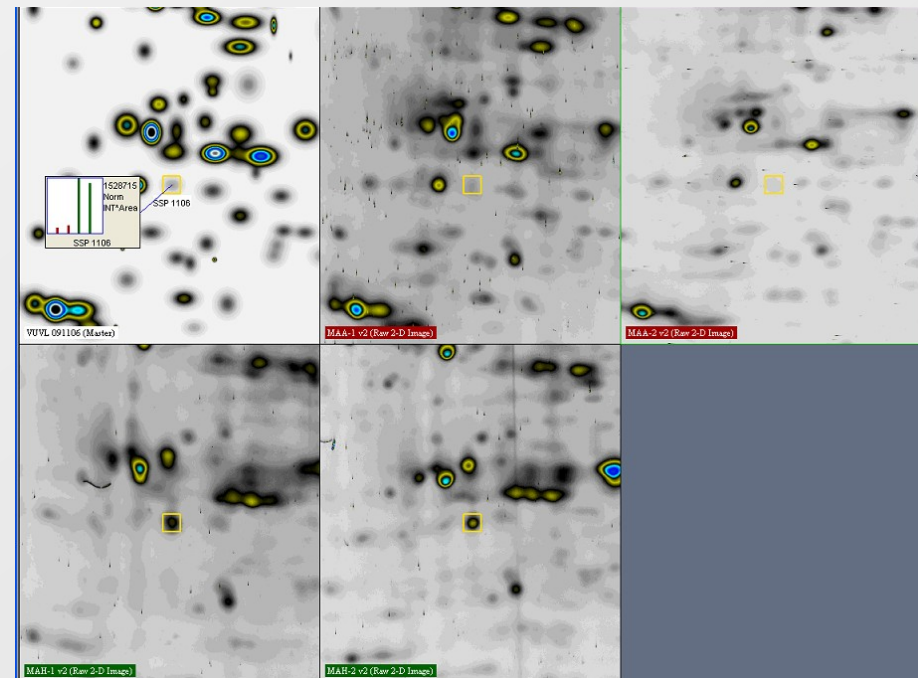
Editování



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)



Biologické a technické repliky

- ✚ Biologická - vzorky z různých organismů, stejný „treatment“
(x rostlinek Arabidopsis, x různých pacientů se stejným typem nádoru apod.),
- ✚ Technická - stejný vzorek, stejný „treatment“
(reprodukovatelnost)

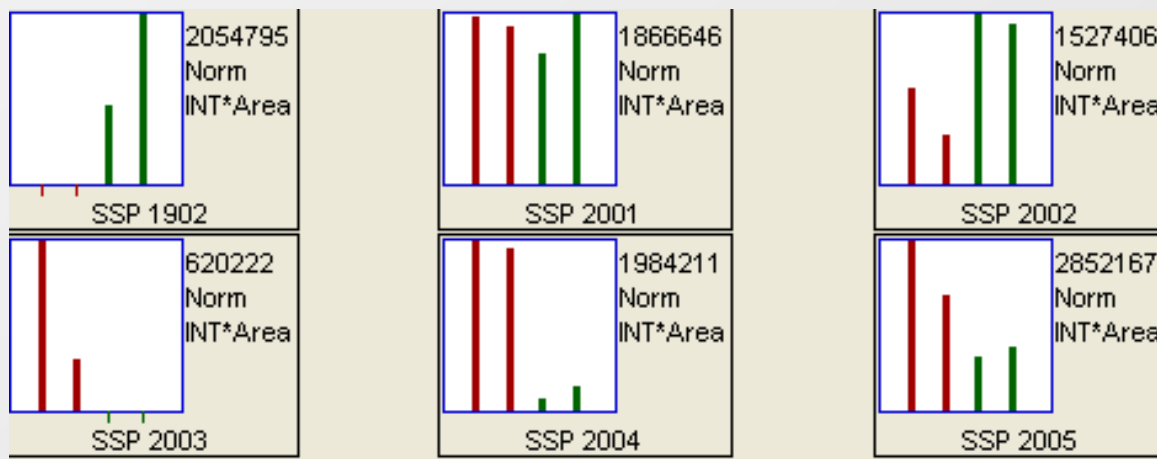
Normalizace

- ✚ 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



Normalizace

je 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 regresion model

Analytické sety

Tři typy analytických setů:

- ✚ kvalitativní,
- ✚ kvantitativní,
- ✚ statistické (pouze pro replikativní skupiny)
- ✚ Booleův analytický set

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

Mark spots on:

- Master gel
- Operand gels
- All gels

Show:

- Window labels
- SSP number

Format

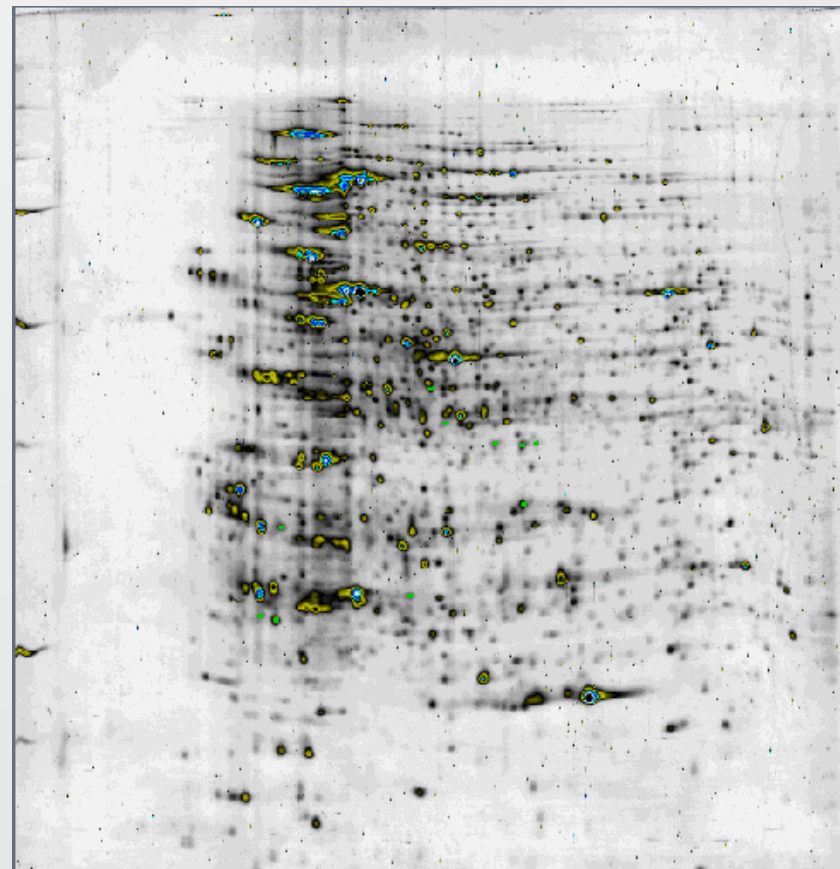
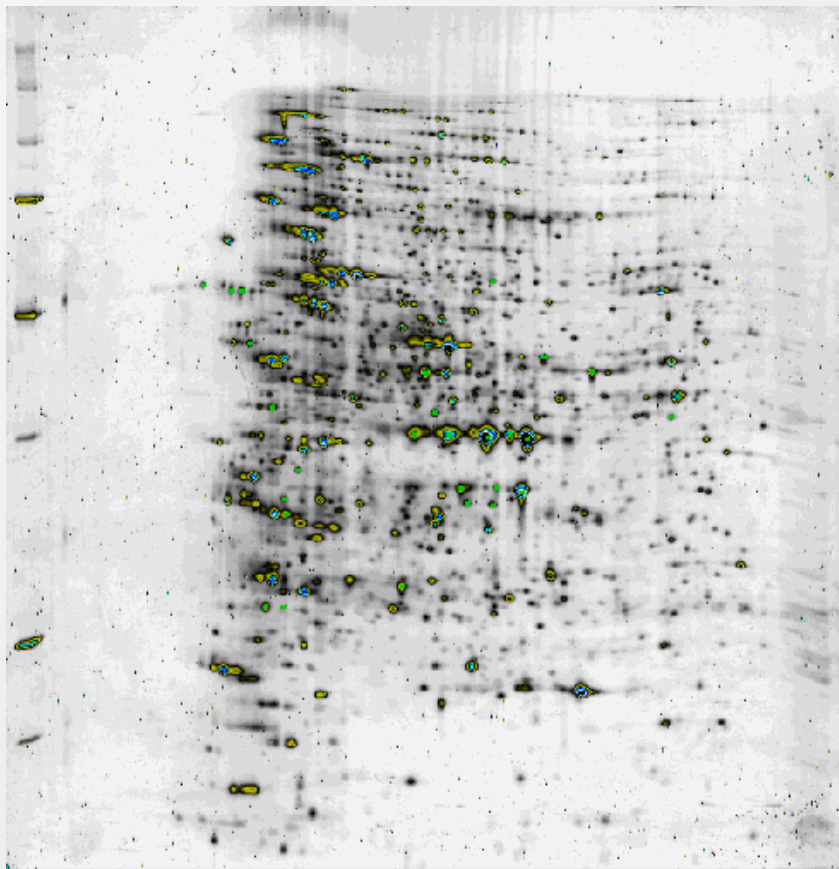
Spot count:

Upper limit:

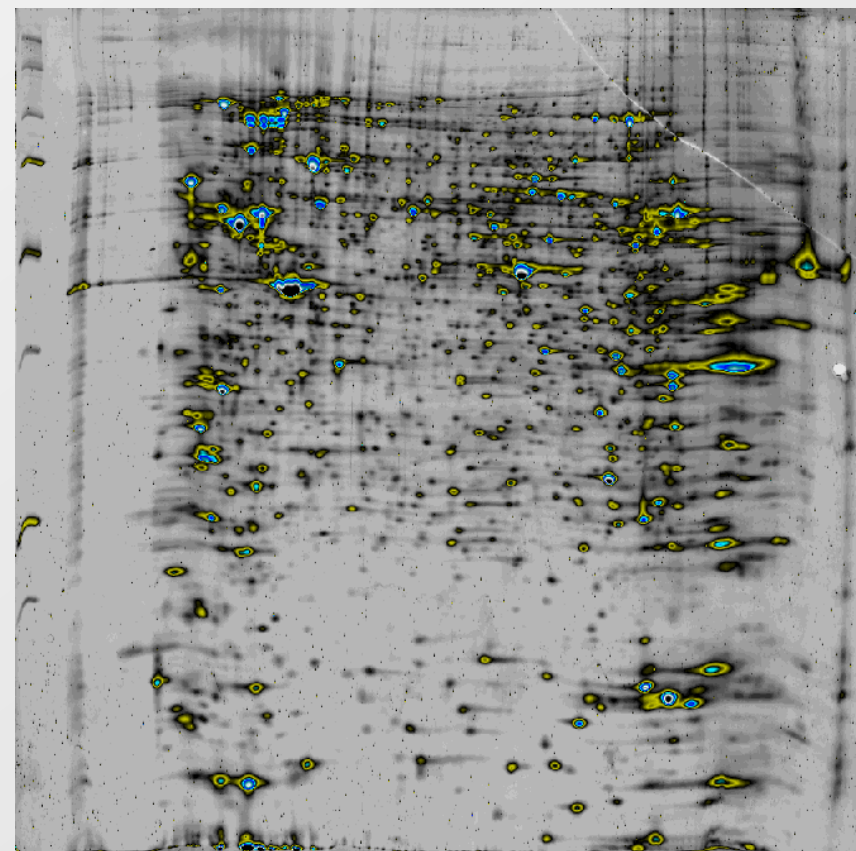
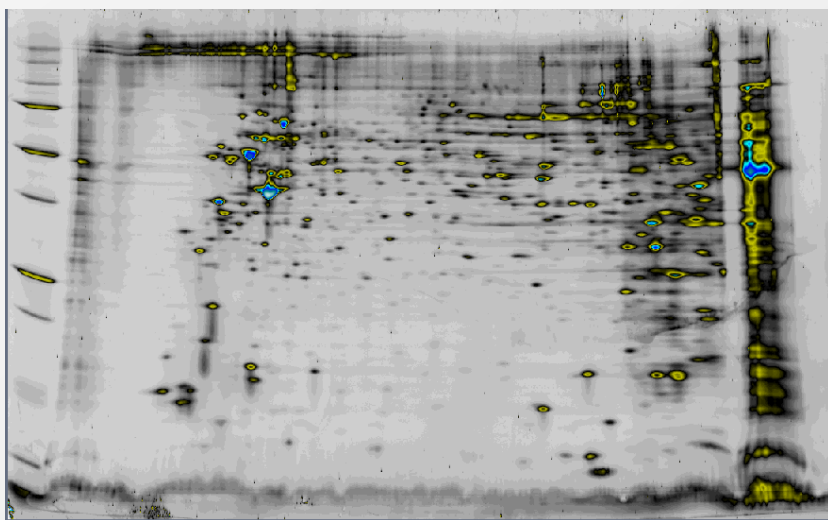
Lower limit: = 1/upper

Log scale

Příklady

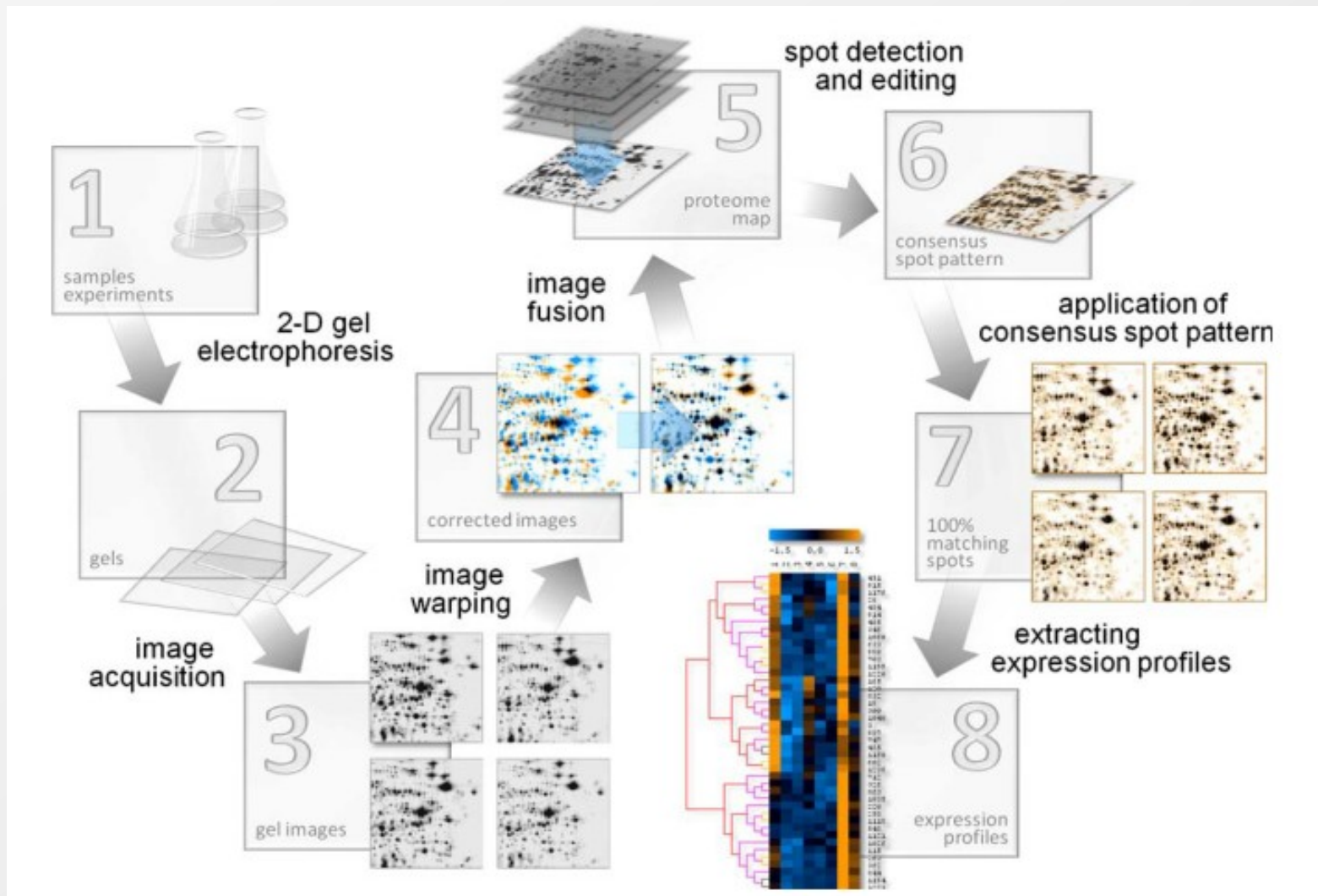


Příklady



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

