



CEITEC

Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

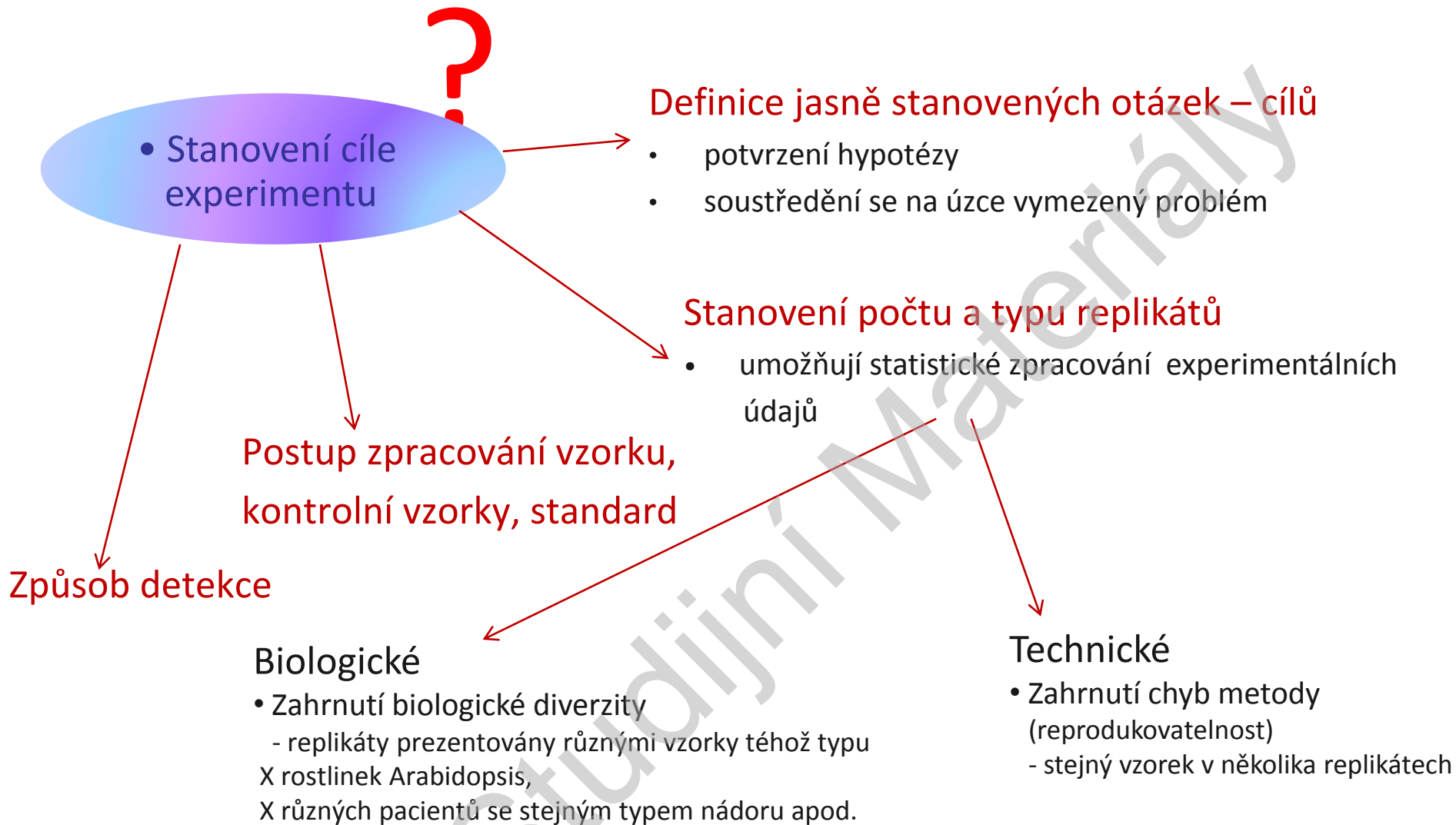
MUNI

Analýza obrazu

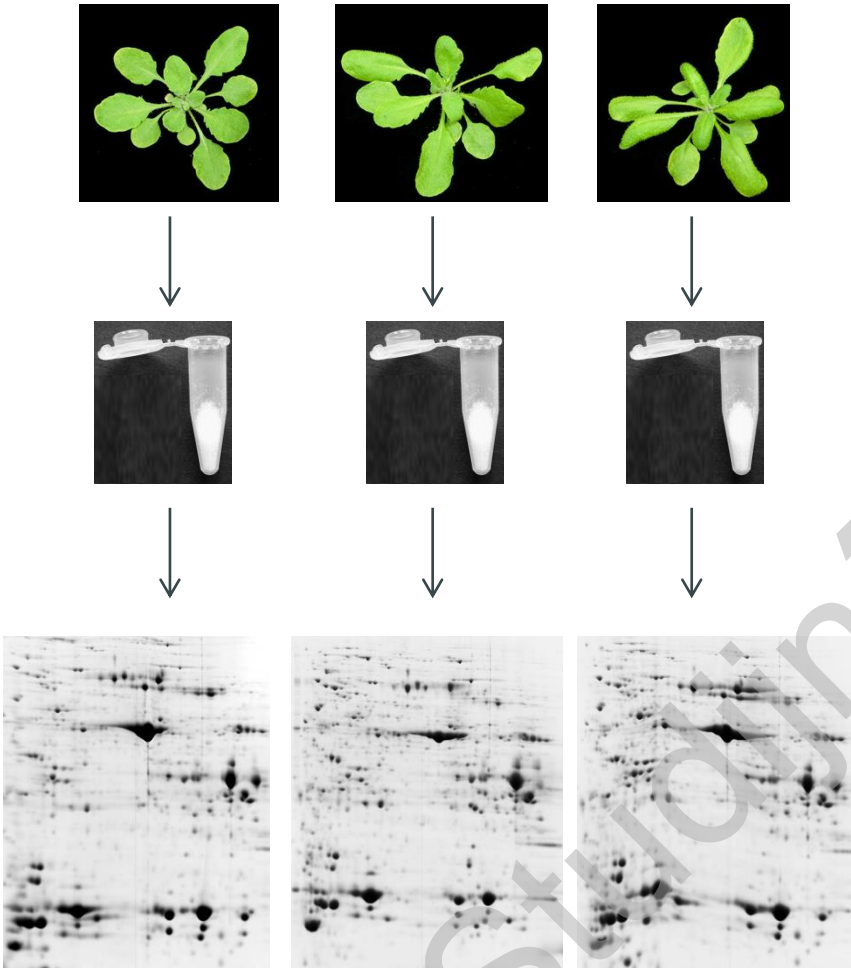
Gabriela Lochmanová



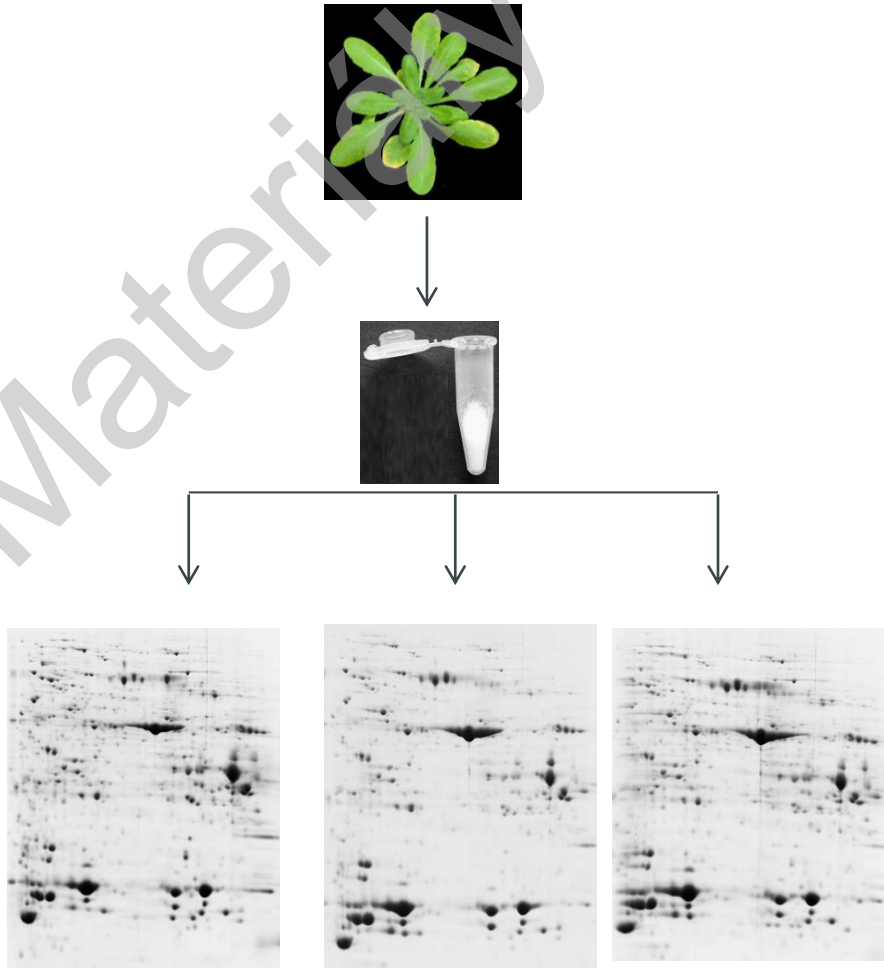
Studijní Materiál



Biologické replikáty



Technické replikáty



Experiment

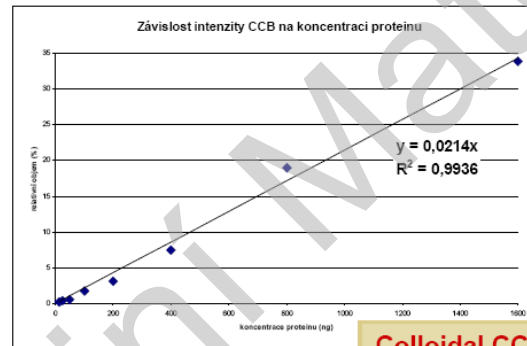
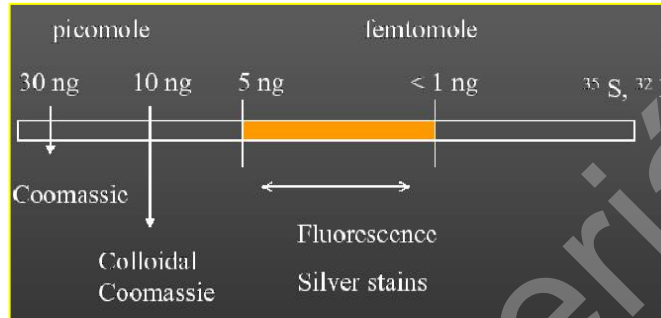


- vysoká citlivost
- kvantitativní barvení
- široký lineární rozsah závislosti intenzity barvičky na množství proteinu v gelu

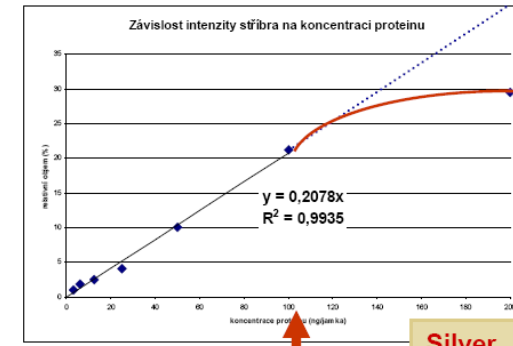
Dynamický rozsah

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

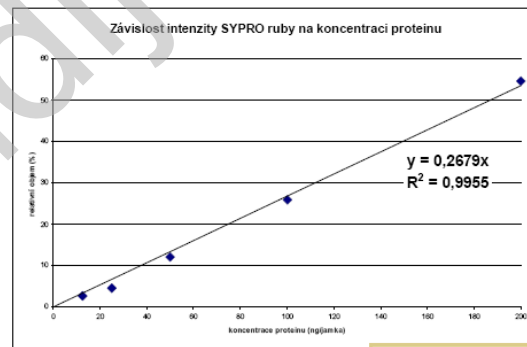
- end-point
- trvanlivost
(např. zhášení fluorescenčních barviček!)
- kompatibilita s následnými analýzami
(např. stříbro - glutaraldehyd!)



Colloidal CCB



Silver



SYPRO Ruby

Barvení stříbrem

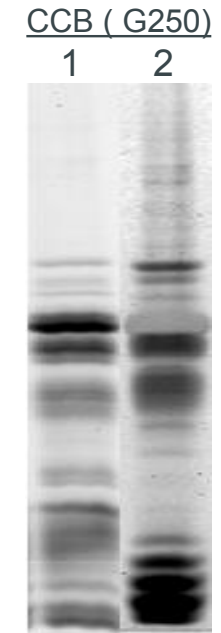
– lineární závislost pouze v rozmezí do 100 ng proteinu.
Při vyšších množstvích odklon od linearity.

Značení před analýzou (DIGE – CyDye, radioaktivní značení)

Barvení po analýze

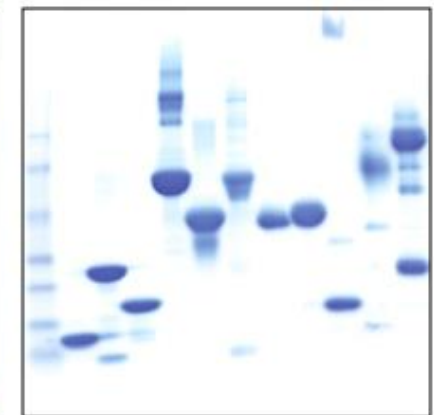
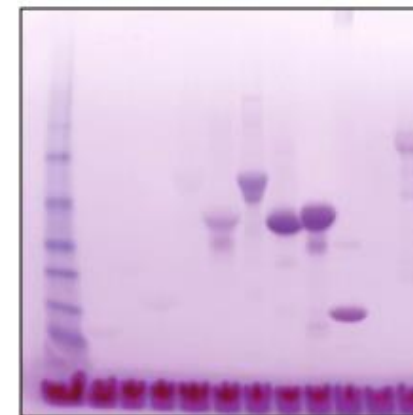
Nespecifické barvení: všechny proteiny

- **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)

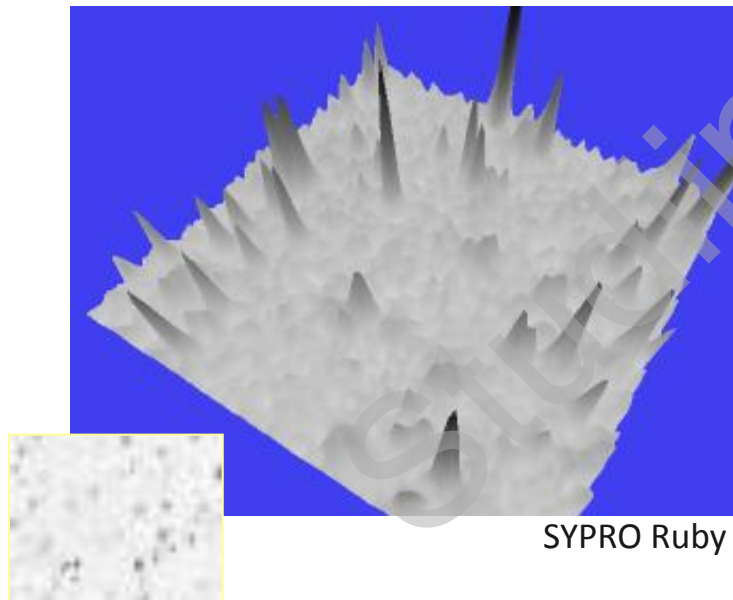
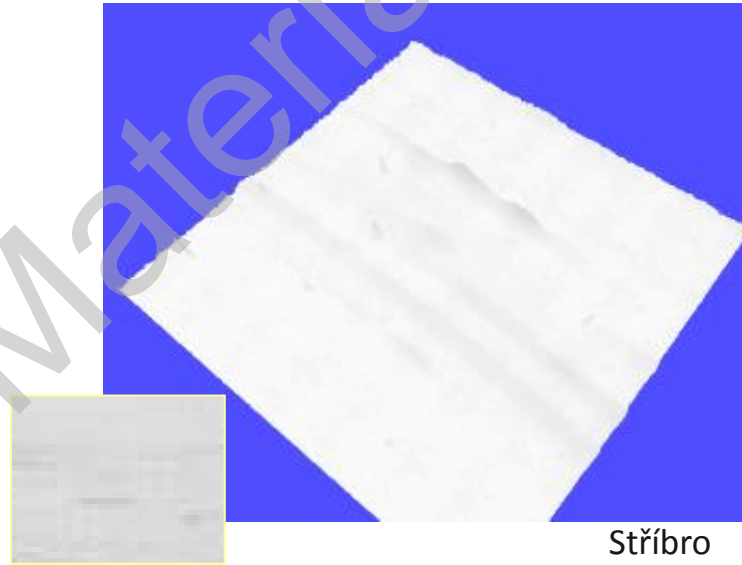
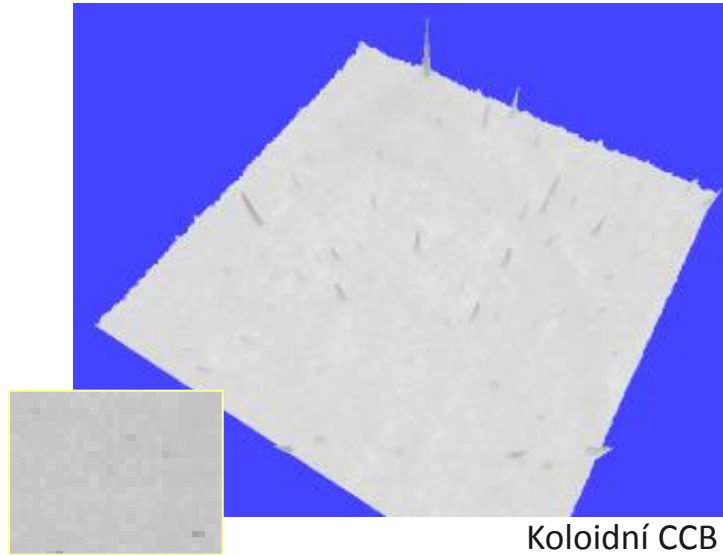


Specifické barvení: posttranslační modifikace (PTM)

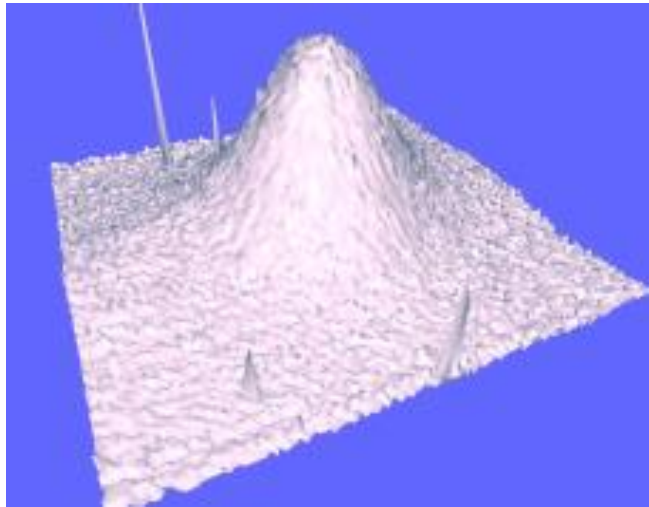
- fosforylace: Pro-Q Diamond (pSer, pThr, pTyr), Pierce phosphoprotein staining kit (pSer, pThr)
- glykosylace: Pro-Q Emerald, Pierce glycoprotein staining kit
- Radioaktivní značení



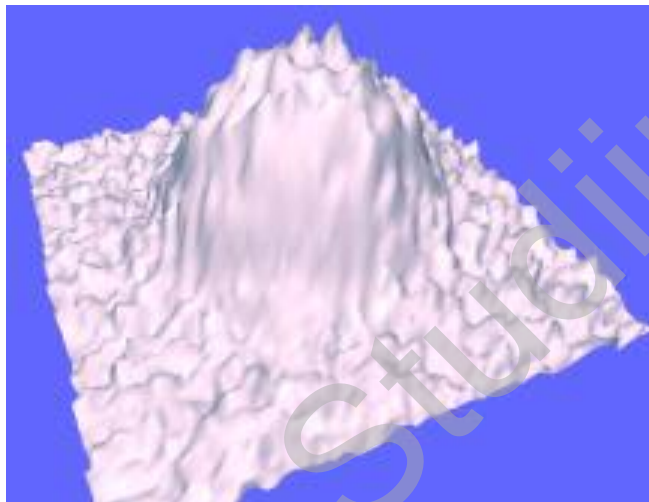
POZADÍ – 3D náhled



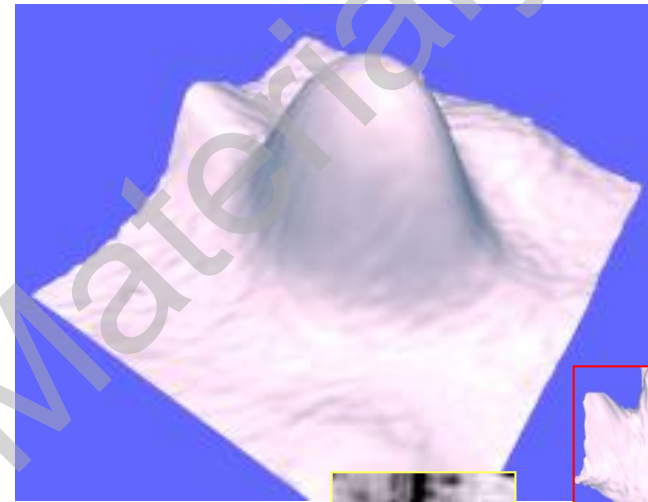
Proteinový spot – 3D náhled



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

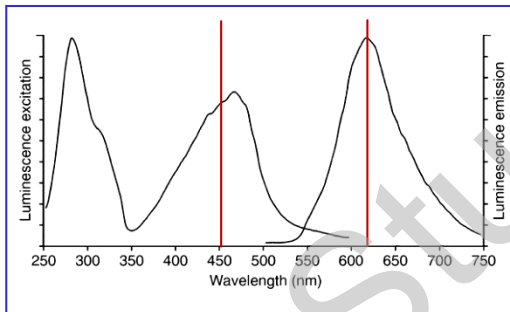
- formát TIFF, vysoké rozlišení

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



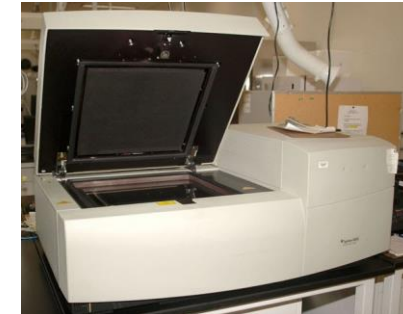
Molecular Imager GS-800



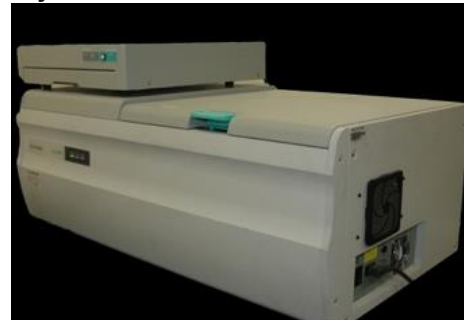
Image Scanner III



Typhoon 9200 Imager



Fuji FLA-3000



PharosFX™ and PharosFX Plus Systems



Experiment



- Analýza obrazu



- Lidské oko dokáže rozlišit

500 stupňů šedi
10 milionů barev

Pouze viditelné světlo o **vlnové délce 380–760 nm** vyvolává v lidských očích zrakový vjem.

Skoro **1/2 lidského mozku** se podílí na řízení zraku a vidění.

Analýza pomocí speciálního SW

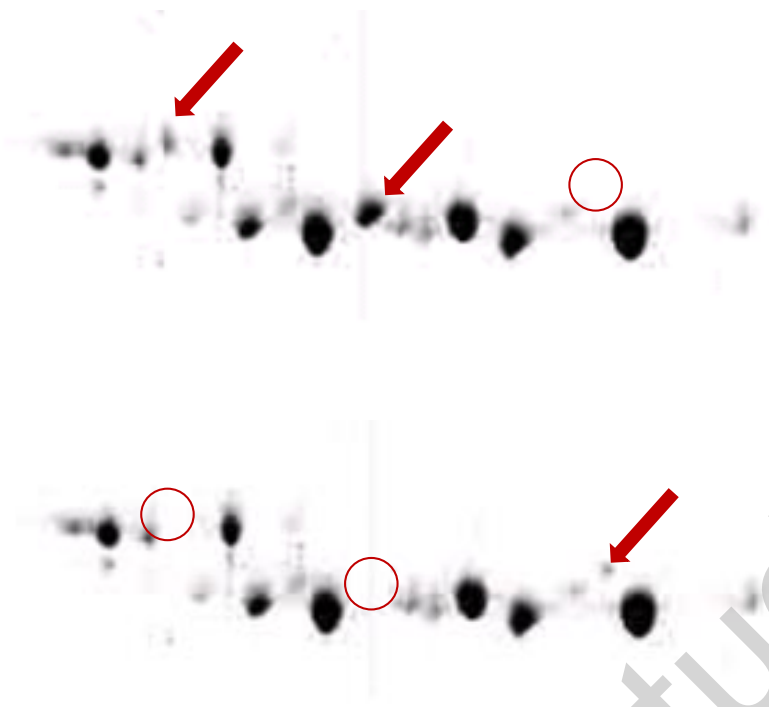
- Porovnání a vyhodnocení 2D gelů
(vizuální vyhodnocení 2D gelů není možné)



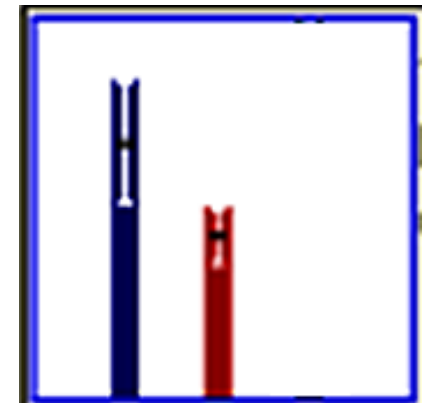
• Analýza obrazu

→ Analýza pomocí speciálního SW

Kvalitativní vyhodnocení



Kvantitativní vyhodnocení / Statistická analýza

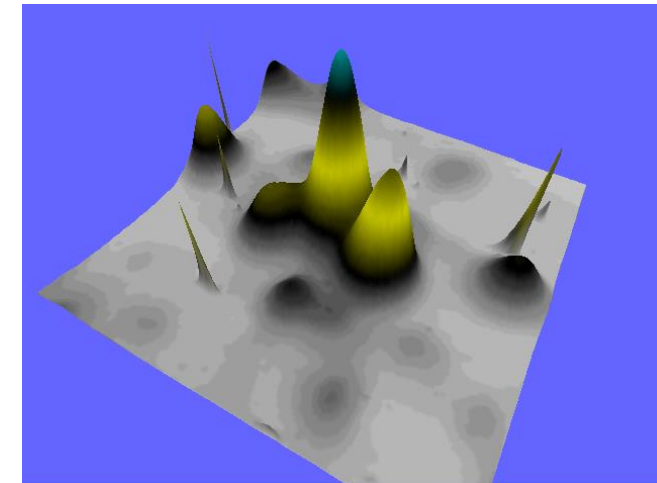
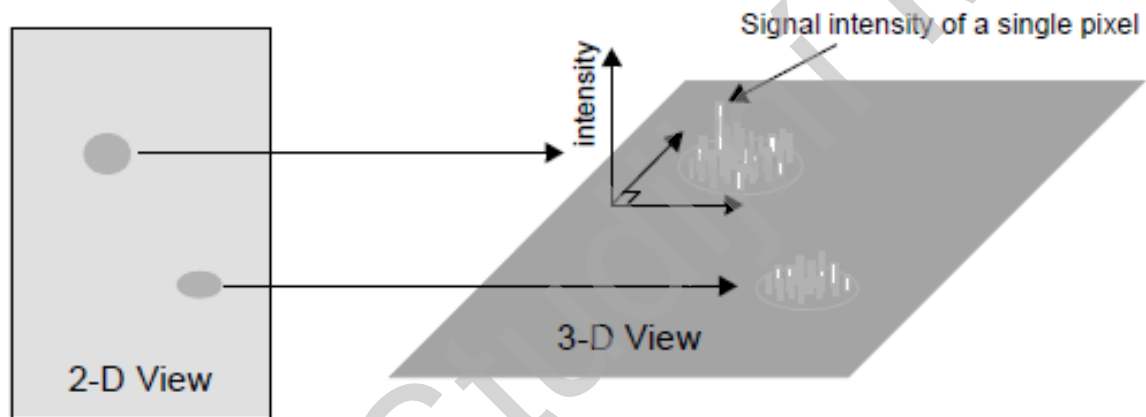


- Analýza obrazu

- **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

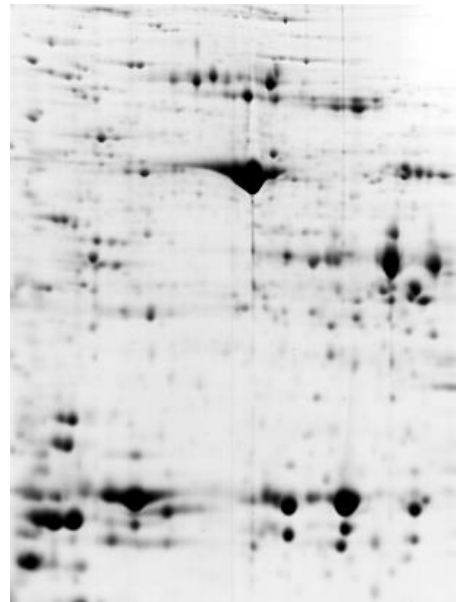
→ Přístup dle předem stanoveného cíle

- ovlivněný vzorek x kontrola
- projev určitého zásahu v čase

Kvalita obrazové analýzy je přímo odvislá od kvality separace.

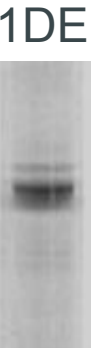
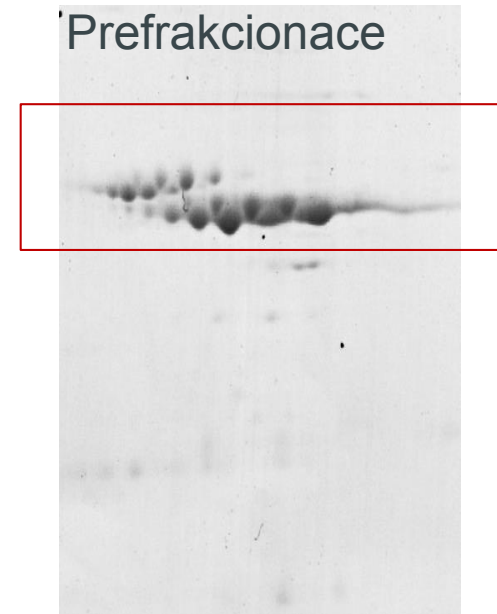
- Výběr všech spotů, které se významně liší podle daného „designu“ experimentu

– detekce „up and down“ regulovaných proteinů



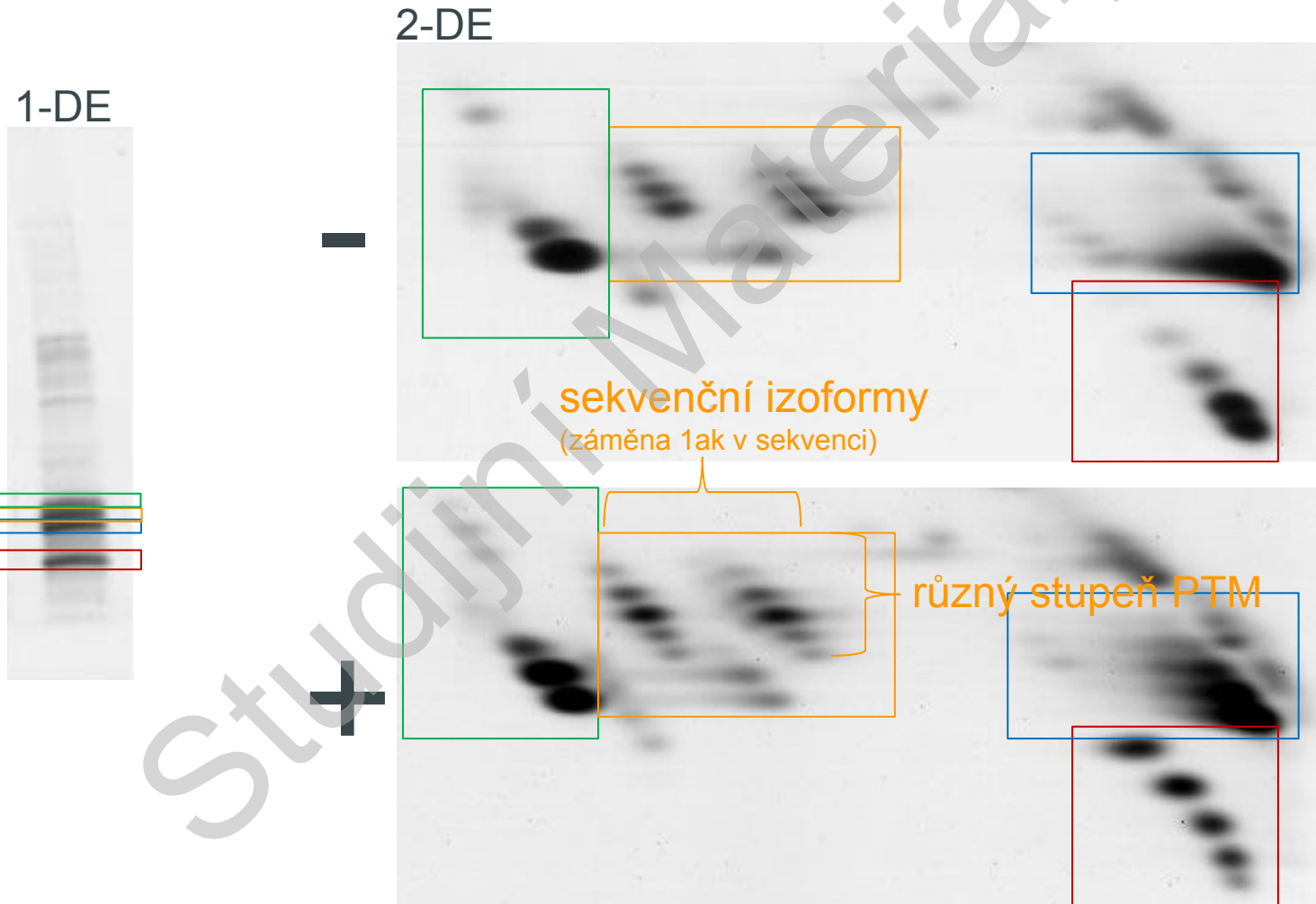
- Výběr pouze několika cílových proteinových spotů
- sekvenční izoformy
- posttranslační modifikace

– kvantitativní změny v profilu určitých spotů



- Analýza obrazu

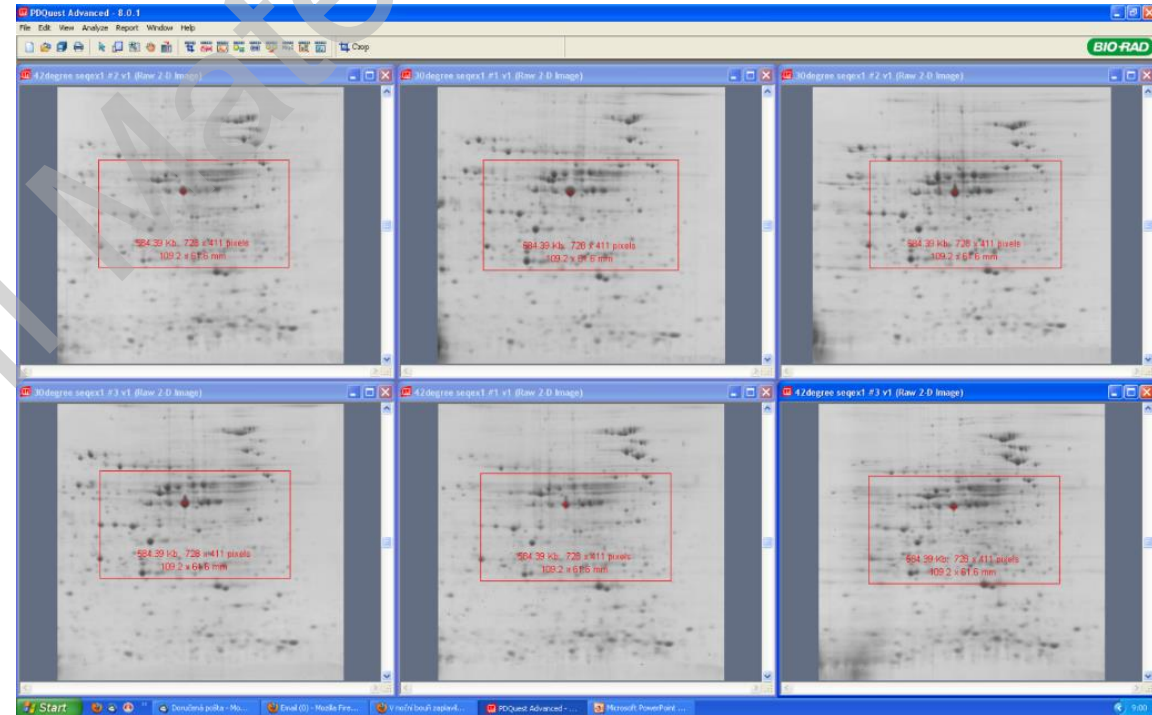
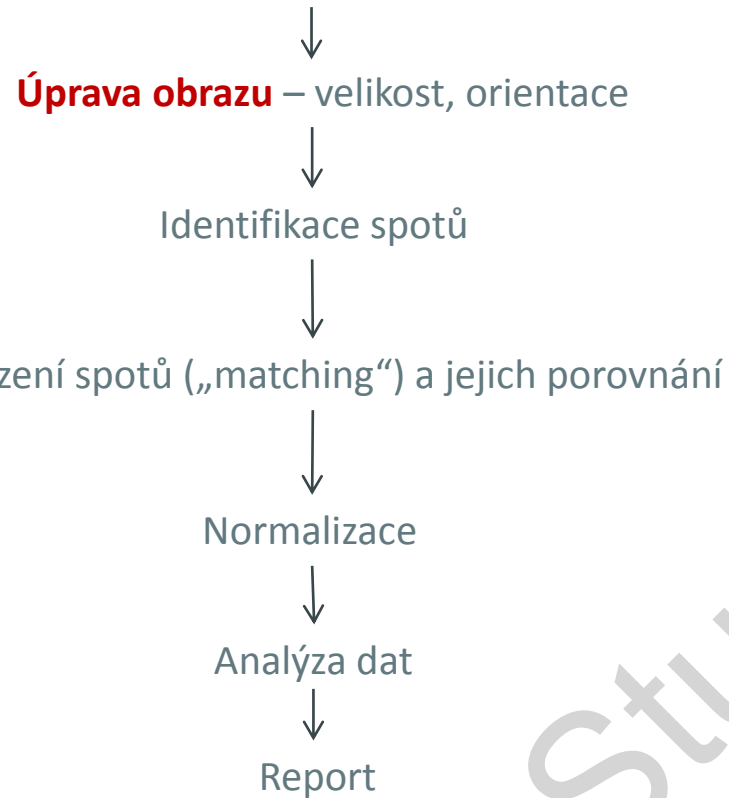
Přístup dle předem stanoveného cíle



- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuest

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



Vyhodnocování pomocí PDQuest

Sejmutí obrazu



Úprava obrazu



Identifikace spotů



Přiřazení spotů („matching“) a jejich porovnání



Normalizace

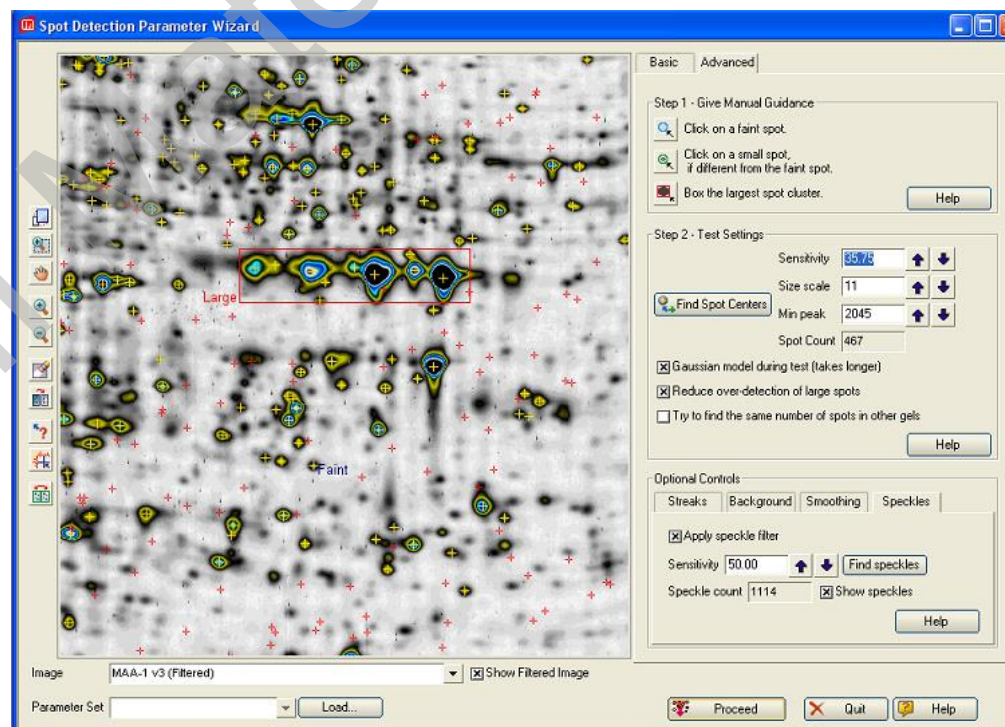


Analýza dat



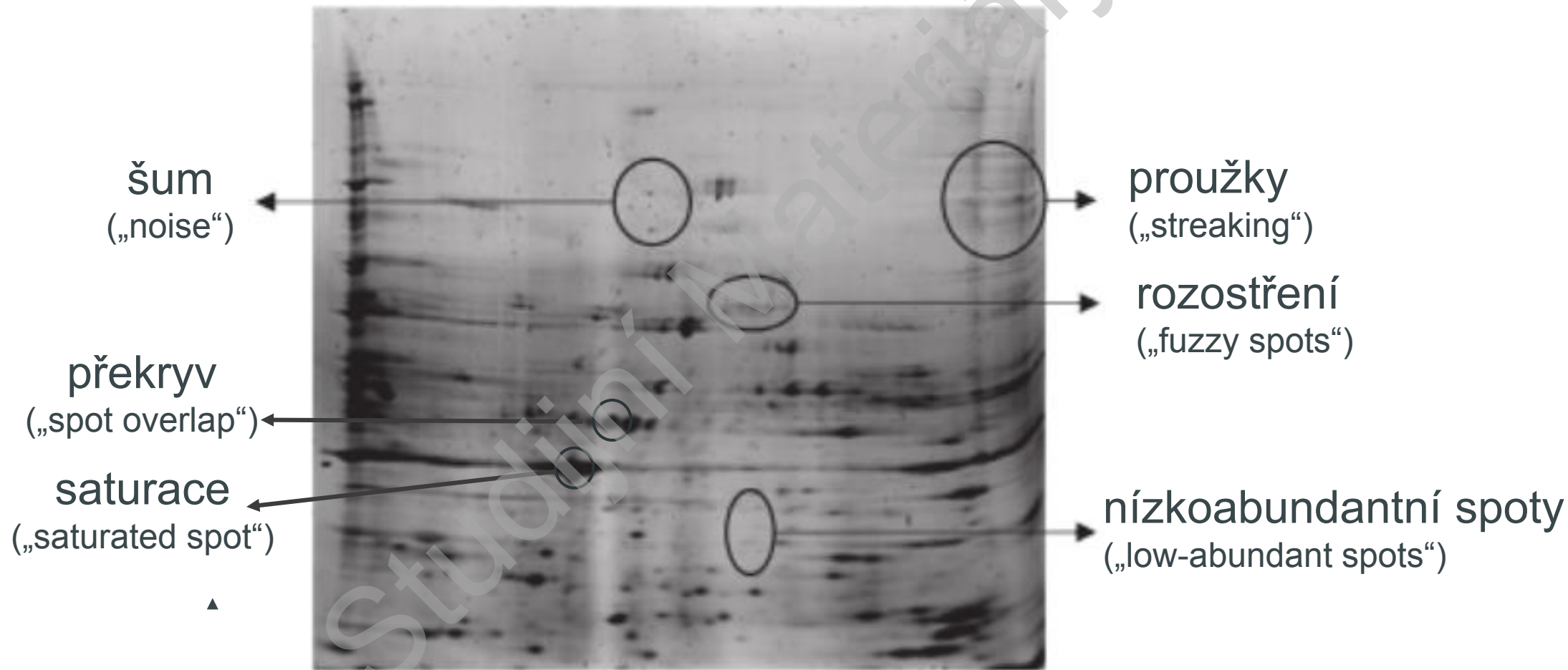
Report

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



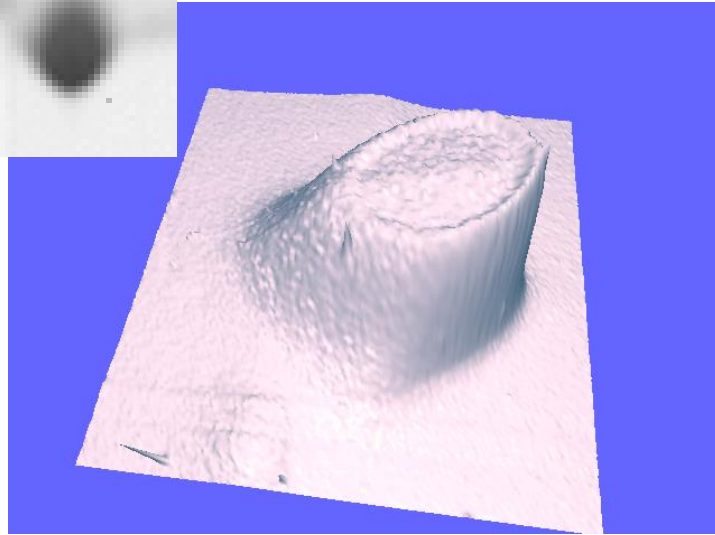
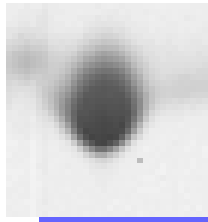
• Analýza obrazu

→ Běžné anomálie 2D separace

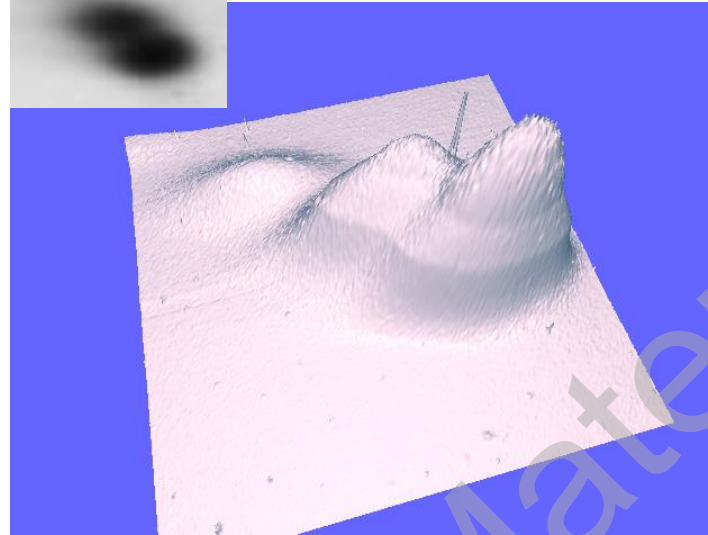
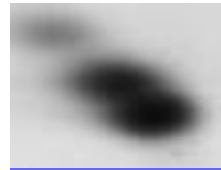


Goez et al. 2017 (upraveno)

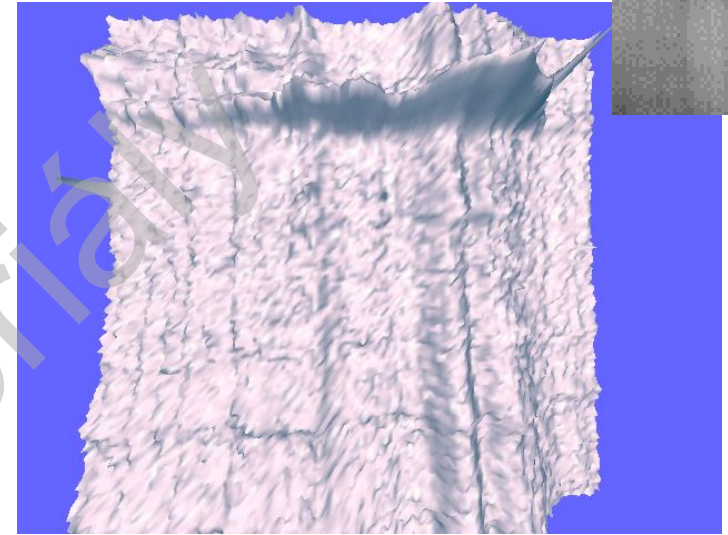
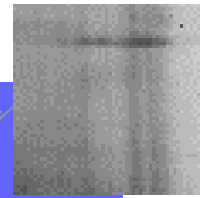
Saturace



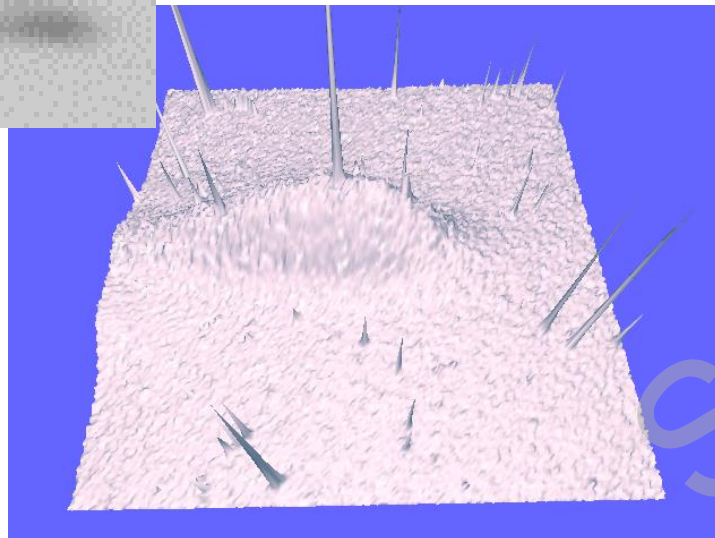
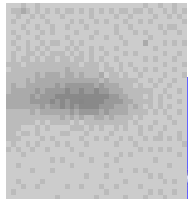
Překry spotů



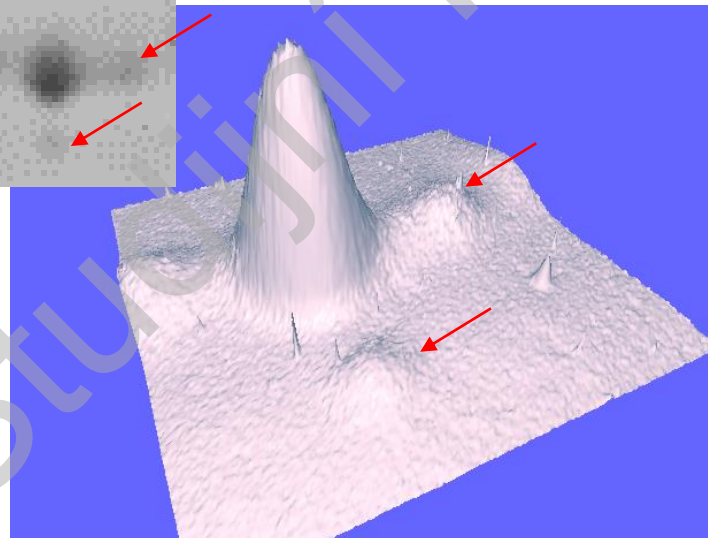
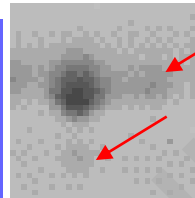
Proužky



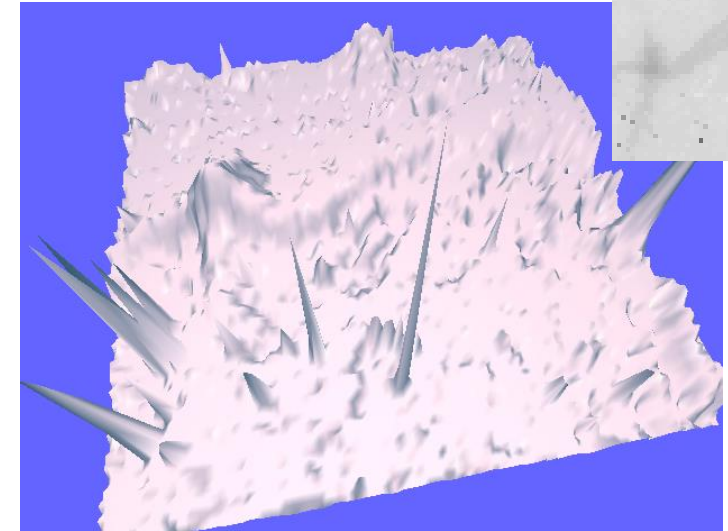
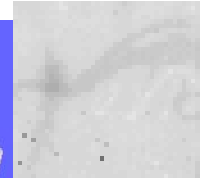
Rozostření



Nízkoabundantní spoty



Šum



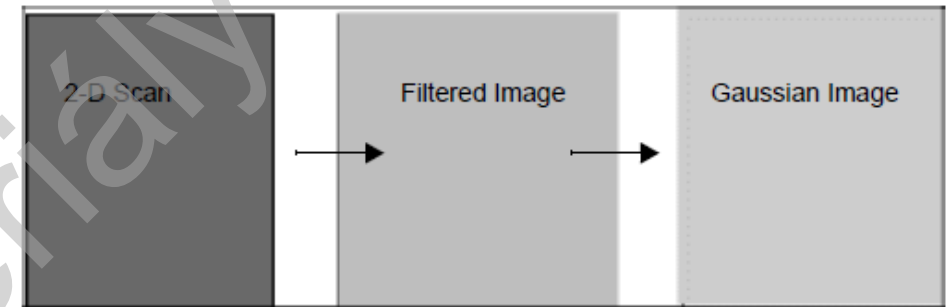
Vyhodnocování pomocí PDQuest

Detekce spotů a filtrace pozadí

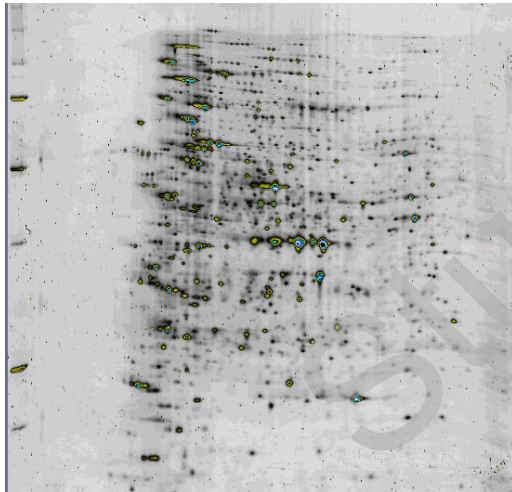
Pozadí se lokálně mění dle intenzity přítomných proteinových spotů (intenzivnější spoty ~ vyšší pozadí) → chyby v detekci.

- Scanset**

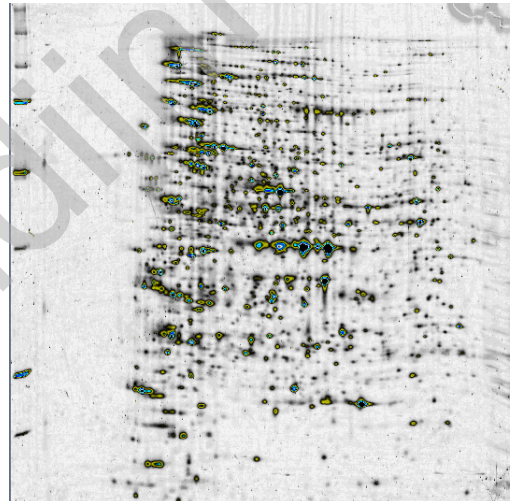
= soubor obrazů, které vycházejí z jednoho základního gelu (3 zobrazení každého gelu)



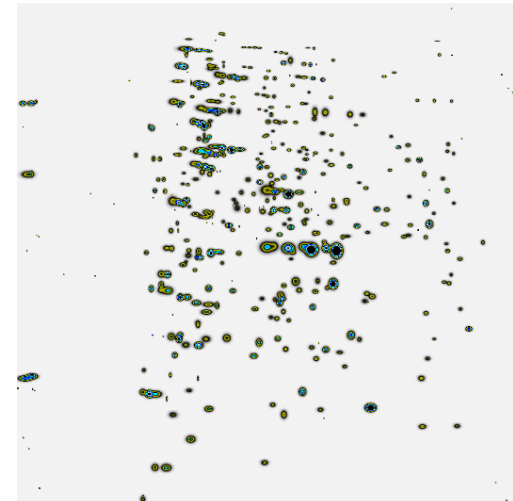
Raw 2D image



Filtered

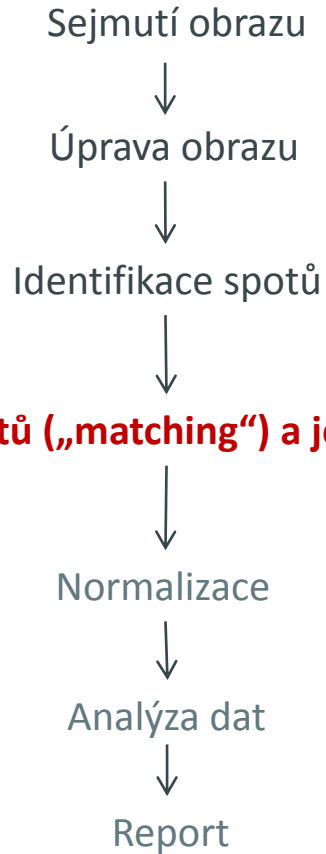


Gaussian

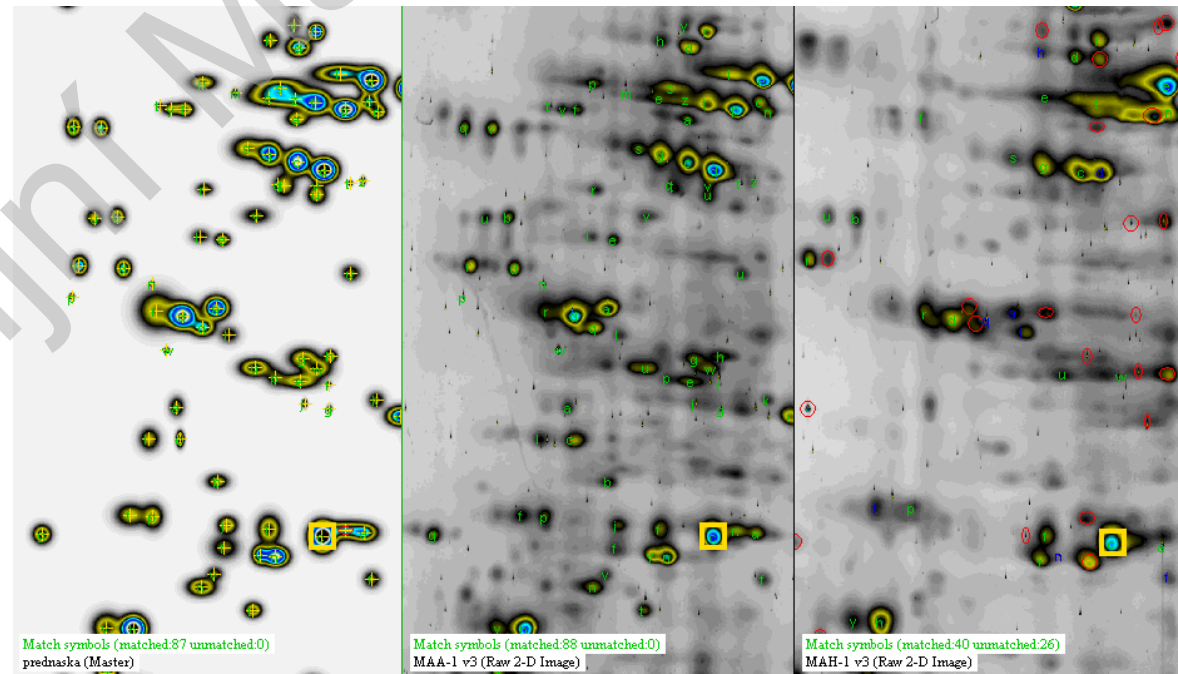


Vyhodnocování pomocí PDQuest

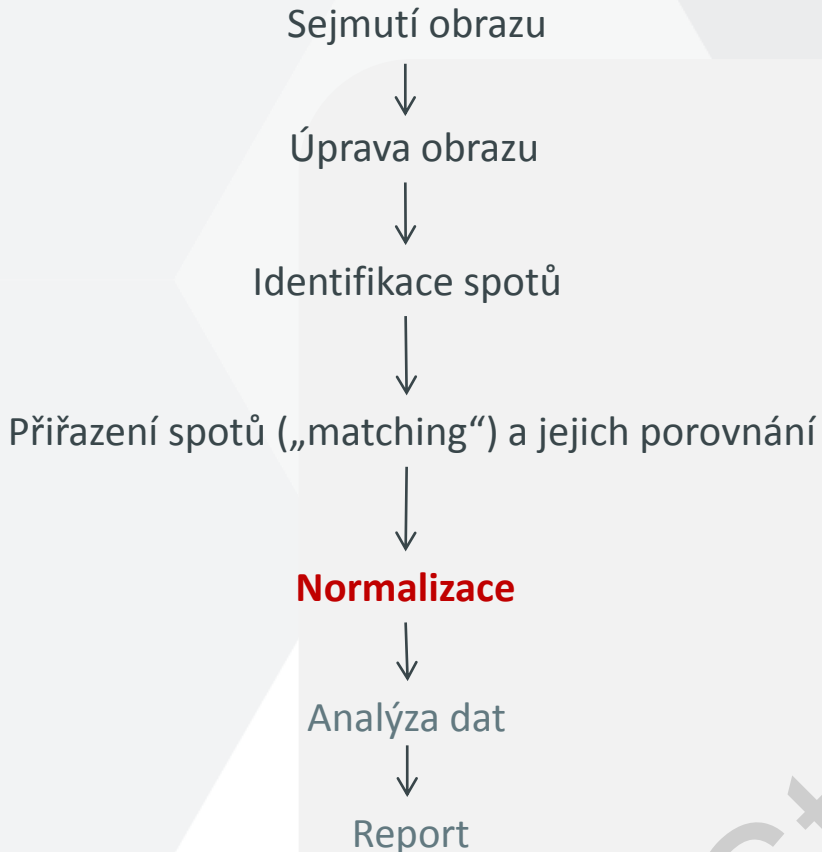
- Zásadní problém analýzy obrazu: rozdíly v pozici spotu mezi gely – třeba provést „alignment“



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



Vyhodnocování pomocí PDQuest



- Normalizace = kompenzace rozdílů ve velikosti a intenzitě spotů mezi gely, které nesouvisí s expresí
- nutná podmínka pro správné porovnání 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 regresion model

- Analýza obrazu

Vyhodnocování pomocí PDQuest

- Report

Image report

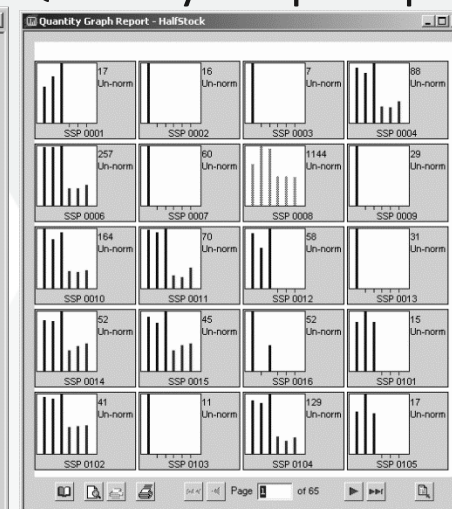
Image Report For: half3 v1 x3 (Raw 2-D Image)

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

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	88.4	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)



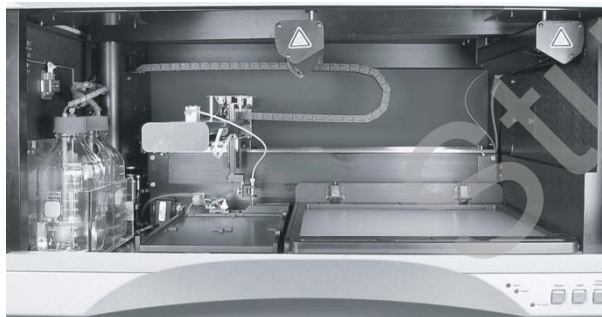
Dark Reader
(Ex: 490 nm)



→ **Automaticky**

- Spot cutter

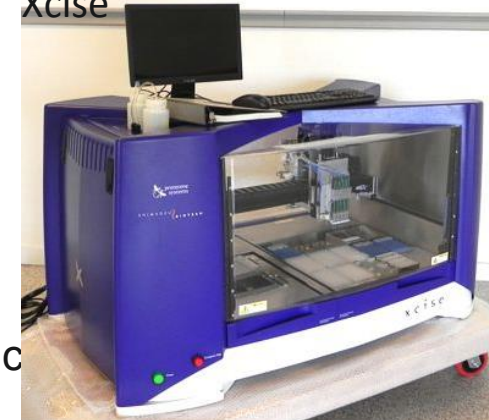
Exquest

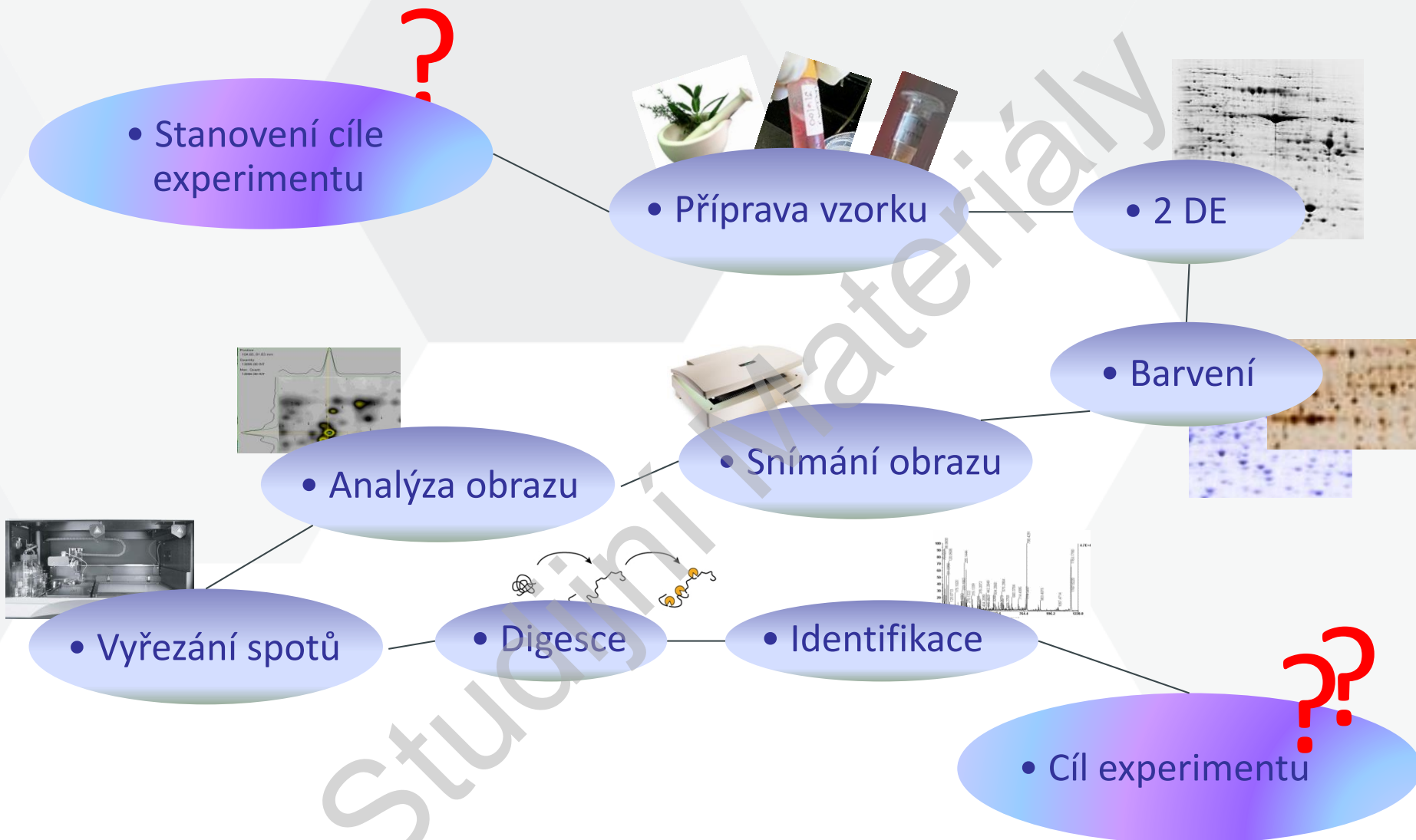


Ettan Spot picker



Xcise





2-DE

- Nejlepší metoda vizualizace proteinů v podobě spotu, který může být charakterizován svojí abundancí, polohou, přítomností / absencí.
- Nejčastější abnormality ovlivňující obrazovou analýzu: vertikální a horizontální proužkování, rozostření spotů, saturace spotů, spoty o nízké intenzitě, překryv spotů, šum pozadí.
- Laboratorní a časová náročnost, omezená reprodukovatelnost, omezené rozlišení (1 spot \neq 1 protein!).



CEITEC

Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

Děkuji za pozornost.

Studijní Materiály

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

www.ceitec.eu | info@ceitec.cz