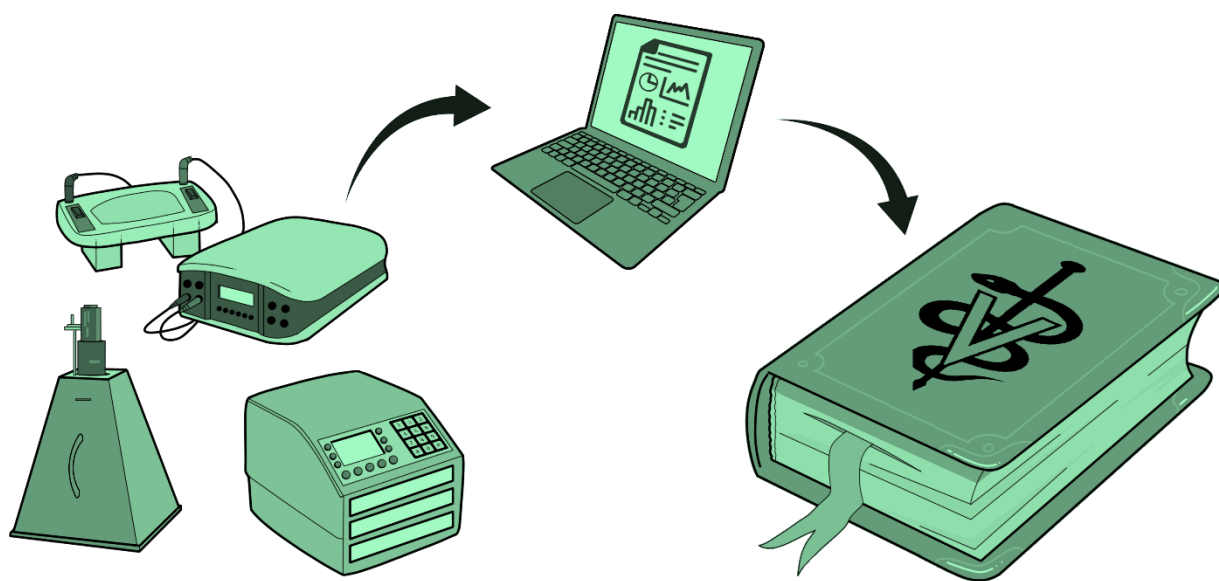


АНАЛИЗ И ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ ГЕЛЕЙ И МЕМБРАН В ПРОГРАММНОМ ОБЕСПЕЧЕНИИ «IMAGE LAB» ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ И БЛОТТИНГЕ

(учебно-методическое пособие)



КАЗАНЬ – 2021

**ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной
медицины им. Н.Э. Баумана»**

Н.Д. ШАМАЕВ, Э.А. ШУРАЛЕВ, М.А. ЕФИМОВА

**АНАЛИЗ И ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ ГЕЛЕЙ И
МЕМБРАН В ПРОГРАММНОМ ОБЕСПЕЧЕНИИ
«IMAGE LAB» ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ И
БЛОТТИНГЕ
(учебно-методическое пособие)**

Казань – 2021

УДК 619:502.085:004.932.2

ББК 48.4:28.07

*Одобрено на заседании методической комиссии и утверждено ученым советом факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»,
протокол № 3, от 19 апреля 2021г.*

Авторы:

Шамаев Н.Д. – аспирант ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»;

Шуралев Э.А. – канд. ветеринар. наук, доц. каф. прикладной экологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»;

Ефимова М.А. – д-р. биол. наук, проф. каф. эпизоотологии и паразитологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», профессор **А.К. Галиуллин**;

доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», профессор **М.Н. Мукминов**

Шамаев Н.Д.

Анализ и документирование гелей и мембран в программном обеспечении «Image Lab» при электрофорезе и блоттинге: учебно-методическое пособие / Н.Д. Шамаев, Э.А. Шуралев, М.А. Ефимова. – Казань: Казанская ГАВМ, 2021. – 84 с.

Внедрение методов электрофореза и блоттинга в таких областях, как ветеринарная иммунология и биохимия, требует решения задач анализа и документирования широкого спектра образцов, от полиакриламидных и агарозных гелей до мембранных блотов. С этой целью используются такие методы детекции, как денситометрия, флуоресценция и колориметрия, а полная автоматизация всех процессов и программное обеспечение Image Lab позволяют быстро получать точные и воспроизводимые результаты.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов очного, заочного обучения по направлению подготовки 36.05.01 «Ветеринария», для бакалавров и магистрантов по направлению подготовки 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза», и аспирантов в областях ветеринарных и биологических наук, а также для обучающихся по смежным направлениям, с целью повышения их умений и навыков по обработке изображений электрофоретических гелей и блотов при иммунологических и биохимических исследованиях.

© Шамаев Н.Д., Шуралев Э.А., Ефимова М.А., 2021

© Казанская ГАВМ, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1. Применение методов электрофореза и блоттинга	6
Глава 2. Установка и запуск программного обеспечения Image Lab.....	13
Установка Image Lab.....	14
Панель инструментов Main Toolbar	21
Инструменты для анализа изображения	22
Строка состояния (Status Bar)	23
Основные команды окна меню	24
Команды меню «Edit».....	26
Команды меню «View».....	27
Команды экрана меню	27
Вопросы для самоконтроля.....	28
Глава 3. Настройка протоколов	30
Окно настройки протокола.....	30
Этапы настройки протокола.....	32
Сбор данных	32
Анализ изображения «Analyse image»	34
Отчет о работе	35
Обнаружение стрипов и белковых групп	37
Анализ молекулярной массы	39
Запуск протокола.....	43
Методы регрессионного анализа	44
Вопросы для самоконтроля.....	47
Глава 4. Просмотр изображений и данных о изображениях	48
Преобразование в трехмерную модель.....	53
Информация об изображении	54
Отображение многоканальных изображений.....	55
Нормализация данных	58

Обнаружение полос движения в каналах	61
Свойства инструмента «Таблица анализа».....	62
Отображение данных в таблице анализа	63
Обозначения в графе измерений объема колонны	64
Просмотр данных в таблицах анализа	65
Вопросы для самоконтроля.....	67
Глава 5. Создание отчетов и экспорт результатов.....	68
Экспорт изображений гелей.....	68
Экспорт изображений гелей для публикации	69
Нормативные документы.....	71
Список рекомендованной литературы	76

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие содержит описание работы с программным обеспечением Image Lab™ для обучения способам обработки и распознавания изображений, полученных после проведения электрофоретического разделения белков или нуклеиновых кислот, а также иммуноблоттинга. Выполнение исследований на основе самостоятельно разрабатываемых программных моделей, дополнительно позволит студенту (аспиранту) совершенствовать навыки обработки изображений для создания протоколов – воспроизводимых и автоматизированных, для экономии времени рабочего процесса при визуализации и анализе результатов, полученных в ходе гель-электрофореза и блоттинга. В ходе проработки методического материала станет возможным создавать протоколы для обеспечения воспроизводимых результатов, оптимизировать данные захвата изображений, а также редактировать, анализировать и создавать пользовательские отчеты. При этом в предлагаемых разделах подробно изложены теоретические сведения с описанием, как самостоятельно реализовать необходимый метод обработки изображения в виде программной модели, что дает исчерпывающее представление о структуре ПО. Ознакомление с самых простых методов автоматического анализа изображений дает обучающимся возможность самостоятельно убедиться в доступности программы и понять важность применения рассмотренных более сложных инструментов обработки изображений.

Учебно-методическое пособие предназначено в качестве дополнительного материала по дисциплинам «Биохимия» и «Ветеринарная иммунология» основных образовательных программ высшего образования по специальности – 111201 «Ветеринария» и аспирантуры в областях ветеринарных и биологических наук.

ГЛАВА 1. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И БЛОТТИНГА

Физико-химические методы анализа и исследования – это условное название большого числа способов количественного и качественного определения веществ, которые предполагают, как правило, применение различных, часто довольно сложных, измерительных приборов. За рубежом в большом распространении термин «инструментальные методы анализа» или «приборные методы». В основе физико-химических методов лежат законы физики и физической химии, а аппаратное оформление основано на применении современных достижений оптики и электроники. Общее число физико-химических методов анализа довольно велико – оно составляет несколько десятков. Наибольшее практическое значение среди них имеют следующие:

- 1) спектральные и другие оптические методы;
- 2) электрохимические методы;
- 3) хроматографические методы анализа.

Электрофоретические методы. Электрофорезом называют движение заряженных коллоидных частиц в постоянном электрическом поле к противоположно заряженному электроду. Биологические макромолекулы находятся в растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам. Кроме того, белки и нуклеиновые кислоты содержат ионизирующиеся группы, вследствие чего в растворе они могут существовать в заряженной форме, в виде катионов или анионов. Молекулы с близкими по величине зарядами, но различающиеся молекулярными массами, отличаются друг от друга отношением заряда к массе. На указанных различиях основано разделение ионов при их движении в растворе под действием электрического поля. В этом и состоит принцип электрофореза.

Электрофорез на бумаге – самый простой из электрофоретических методов. Носителем служит, как правило, специальная хроматографическая бумага, которая не требует никакой подготовки: ее просто нужно разрезать на куски требуемого размера. В зависимости от типа прибора и условий опыта электрофорез на бумаге длится от 4 до 16 часов. После электрофореза белки фиксируют высушиванием, а затем красят красителями, специфичными для белков. Окрашенные полосы белковых фракций можно хранить или, разрезав на участки, элюировать для фотометрического определения каждой фракции. При электрофорезе на бумаге белков сыворотки крови удастся получить до 5 фракций. Бумага не является абсолютно инертным носителем и может адсорбировать некоторые вещества (это нежелательное ее свойство удастся устранить при использовании ацетата целлюлозы). Кроме того, при электрофорезе на бумаге вследствие особенностей ее химического состава в той или иной степени проявляется электроэндоосмос (то есть возникновение заряда между молекулами буферного раствора и поверхностью носителя), что резко снижает разрешающую способность метода.

Электрофорез в гелях. В этом методе в качестве опорной среды используют крахмальный, агаровый, полиакриламидный гели. Характерной особенностью данной разновидности зонального электрофореза является высокая разрешающая способность. Дело в том, что гели являются не только поддерживающей средой, они функционируют как молекулярные сита. Принцип действия молекулярного сита состоит в том, что крупные молекулы двигаются через него тем медленнее, чем меньше размер пор в геле. Гель-электрофорез особенно ценен для разделения смесей веществ, имеющих одинаковые заряды, но слегка различающихся по массе. Электрофорез в ПААГе в настоящее время является самым эффективным из существующих методов и широко используется в различных областях биологии. Этот метод обладает большей разрешающей способностью по сравнению с методами, где используются другие гели. Полиакриламидный гель прозрачен, обладает значительной механической

прочностью, однороден по составу, химически инертен. Размер пор у ПААГа можно варьировать в широких пределах, его можно применять с самыми различными буферами, удобно использовать для количественного определения разделяемых веществ. Метод электрофореза в полиакриламидном геле широко используется в различных отраслях биологических, медицинских, ветеринарных, экологических исследований. Вот лишь некоторые примеры его применения: 1) в ветеринарной медицине (диагностика заболеваний – изучение белков и ферментов различных органов и тканей в норме и патологии); 2) в серологии (разделение белков сыворотки крови для определения родов и видов и их идентификации); 3) в генетике (выявление мутаций путем изучения белковых спектров); 4) в гистологии и цитологии (анализ компонентов клеточных фрагментов и тканей); 5) в ветеринарной микробиологии (изучение белков бактерий, вирусов и фагов, определение принадлежности микроорганизмов к определенному штамму); 6) в биохимии (изучение белковых спектров, множественных молекулярных форм ферментов, разделение смесей нуклеиновых кислот в различных органах и тканях организмов).

Метод электрофореза также прописан и в некоторых нормативных документа, например в ГОСТ Р 53761-2009 «Молоко. Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле (Переиздание)»; ГОСТ Р 54414-2011 «Рыба и продукция из нее. Видовая идентификация рыбы методом электрофореза с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле»; МР 1.2.0053-11 «Оценка воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы в тестах на лабораторных животных».

Область применения геля электрофореза в микробиологических исследованиях. Методы изоляции микроорганизмов предоставляют подробные сведения об отдельных видах с точки зрения морфологии, биохимии, а также генетики. На сегодняшний день выделено 19 000 видов микробов, однако считается, что это число составляет лишь небольшую часть реального

разнообразия. Используя молекулярные инструменты в природных и технических системах, мы можем найти ответы на такие вопросы, как «Какие виды существуют?», «Какие виды активны?», «Сколько микроорганизмов существует?», «Какие виды используют определенные соединения для существования?».

Исследования микробной экологии требуют идентификации видов на основе всеобъемлющей системы классификации, которая идеально отражает эволюционные отношения между микроорганизмами. Сообщалось, что нуклеиновые кислоты могут документировать историю эволюции. Благодаря новаторским исследованиям нуклеиновые кислоты, особенно 16S рРНК, являются основными биомаркерами и наследственными молекулами, вероятно, из-за их важной роли в синтезе белка, что делает их одной из самых ранних эволюционных функций у всех клеточных форм жизни. В частности, 16S рРНК и 16S рДНК были использованы в филогенетическом анализе и признаны идеальным эволюционным хронометром. Методы генетического анализа на основе 16S рРНК широко применяются в исследованиях микробной экологии (денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE), гель-электрофорез в температурном градиенте (TGGE), рестрикция амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA) или полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (RFLP), концевой полиморфизм длины рестрикционного фрагмента (T-RFLP) и одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP), были разработаны для оценки разнообразия в экосистемах, скрининга библиотек клонов с учетом изменений разнообразия в зависимости от времени и местоположения, а также для идентификации видов. Этот подход получил известность из-за быстрых и менее трудоемких функций.

Эти методы использовались для характеристики микробного разнообразия в различных средах, таких как активный ил, анаэробные реакторы, отложения, озерная вода, горячие источники, биопленка. Метод может использоваться как

для качественного, так и для полуколичественного подходов к оценке биоразнообразия.

Например, DGGE – это метод гель-электрофореза для разделения фрагментов ДНК одинаковой длины на основе различий в их последовательностях оснований. Теоретически важно наблюдать даже одно базовое различие в последовательности из-за характера плавления фрагментов. Этот метод обеспечивает быстрый и трудоемкий подход для определения разнообразия и микробного сообщества в экосистеме, для отслеживания изменений в динамике, а также для проверки библиотек клонов. Кроме того, DGGE можно использовать как качественный и полуколичественный подход для оценки биоразнообразия.

Оптимальный градиент является основной проблемой для экспериментов с DGGE / TGGE, поскольку основной целью является разделение фрагментов ДНК в соответствии с их поведением при плавлении. Перпендикулярные полиакриламидные гели используются в соответствии с возрастающими градиентами денатурирующих веществ или температуры. Образец, содержащий смеси фрагментов ДНК одинаковой длины, загружают в гель для проведения электрофореза. После завершения электрофореза гель окрашивают красителем, например бромидом этидия, золотом SYBR, зеленым SYBR и т. д. Для получения образца образца. В то время как линейный градиент создается химическими денатурантами, такими как мочевины и формамид для DGGE, временной градиент температуры используется для разделения фрагментов ДНК в TGGE. Характер плавления двухцепочечных фрагментов ДНК основан на содержании в них водородных связей: GC-богатые фрагменты ДНК плавятся в более высокой денатурантной / температурной области градиента. Полное разделение двухцепочечной ДНК предотвращается с помощью праймера GC-clamp во время амплификации целевой области ДНК.

DGGE / TGGE используется для нескольких целей в микробной экологии. Первое и наиболее распространенное применение - выявить и сравнить комплекс

микробного разнообразия сообществ в различных средах. Используется этот метод и для того, чтобы показать бактериальную сложность различных образцов активного ила. Метод ПЦР-DGGE использовался для определения структуры бактериального и архейного сообщества в высокоскоростном анаэробном реакторе, работающем при 18 °С. Этот метод был использован для выявления микробного сообщества в лабораторном термофильном капельном биофильтре, производящем водород. Другое исследование биопленок показало бактериальное разнообразие в реке методом 16S рДНК ПЦР-DGGE. В другом исследовании авторы показали, что разные профили бактерий и архей в сильно загрязненных бескислородных морских отложениях в разных местах Мраморного моря. Показана временная изменчивость цианобактерий в воде и донных отложениях озера.

Кроме того, ученые используют эти методы, в основном DGGE, для анализа изменений сообщества с течением времени. Метод ПЦР-DGGE использовался для мониторинга изменений содержания сульфатредуцирующих бактерий в биопленке. Применялся аналогичный подход для выявления сезонных изменений в бактериальном сообществе микробного мата горячих источников. Метод 16S рДНК ПЦР-DGGE использовали для представления местных и сезонных бактериальных и архейных сдвигов в бескислородных морских отложениях, загрязненных углеводородами.

Это один из методов обнаружения для анализа подходов к культивированию / изоляции и определения обогащающих культур.

DGGE / TGGE обычно выбирают для сравнения эффективности протоколов экстракции ДНК и скрининга библиотек клонов, поскольку быстрые и надежные результаты требуют меньше времени.

Методы блоттинга. Блоттинг (от англ. *Blot*) – общее название методов молекулярной биологии по переносу определённых белков или нуклеиновых кислот из раствора, содержащего множество других молекул, на какой-либо

носитель (мембрану из нитроцеллюлозы, PVDF или нейлона) в целях последующего анализа. В одних случаях молекулы предварительно подвергаются геле-электрофорезу, в других – переносятся непосредственно на мембрану. После блоттинга молекулы визуализируются посредством различных методов:

1. Окрашивание (например, окрашивание белков серебром).
2. Авторадиографическая визуализация.
3. Специфическое маркирование с помощью иммунохимических методов или гибридизации.

Также имеется классификация методов по изучаемому веществу:

1. Саузерн-блоттинг (англ. *Southern blot*) – определение последовательности ДНК в образце.
2. Соуэстерн-блоттинг (англ. *Southwestern blot*) – определение белков, связанных с ДНК.
3. Нозерн-блоттинг (англ. *Northern blot*) – определение последовательности РНК в образце.
4. Вестерн-блоттинг (англ. *Western blot*) – определение специфичных белков в образце.
5. Истерн-блоттинг (англ. *Eastern blotting*) – определение посттрансляционных модификаций белков.

ГЛАВА 2. УСТАНОВКА И ЗАПУСК ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ IMAGE LAB

Программное обеспечение Image Lab™ может быть установлено на компьютере с операционной системой Microsoft Windows или Mac. Объем памяти, необходимый для запуска Lab изображения зависит от размера сканируемых и анализируемых изображений. Следует учитывать, что изображения, отсканированные с высоким разрешением, может быть довольно большим.

Производитель предлагает 5 основных типов установочных программ:

- Image Lab™ Software for PC Version 6.0.1 для операционных систем Windows 7 (32- и 64-разрядные) и Windows 10 (64-разрядные) для работы с изображениями с помощью оборудования ChemiDoc XRS +, Gel Doc XR +, Gel Doc EZ и GS-900 Imaging Systems;

- Image Lab™ Software for Mac Version 6.0.1 для Mac (OS 10.11 или 10.12) для анализа изображений с помощью систем GelDoc XR + и Gel Doc EZ Imaging Systems;

- Image Lab™ Touch Software for ChemiDoc™ MP Imagers Version 2.3 для обработки изображений в системах ChemiDoc MP и ChemiDoc Imaging Systems с примечаниями для пользователя;

- Image Lab™ Touch Software for ChemiDoc™ Touch Imager Version 2.3 для обработки изображений в системе ChemiDoc Touch с примечаниями для пользователя;

- Image Lab™ Software for Mac Version 5.2.1 для анализа изображений в компьютерах Mac (OS 10.8 или 10.9). Это более ранняя версия для работы с изображениями с использованием ChemiDoc™ XRS +, GS-900™ и ChemiDoc MP (экран без сенсора, модель 2011 года).

Установка Image Lab

Для установки Image Lab на ПК с операционными системами Mac или Windows скачиваем оригинальное программное обеспечение. Открываем папку с программой инсталляции. Запускаем программу инсталляции ImageLab Setup. Для работы в программе лицензионный код не требуется. Однако, во время установки, для доступа к расширенным параметрам стандартного издания приложения, предлагается ввести лицензионный код. При этом необходимо сначала удалить стандартную версию приложения. При работе в режиме администратора в Image Lab компьютер не должен быть подключен к сети.

При запуске программы инсталляции откроется мастер установки Image Lab. На экране запуска инсталлятора нажимаем кнопку «Next» (рисунок 2.1).

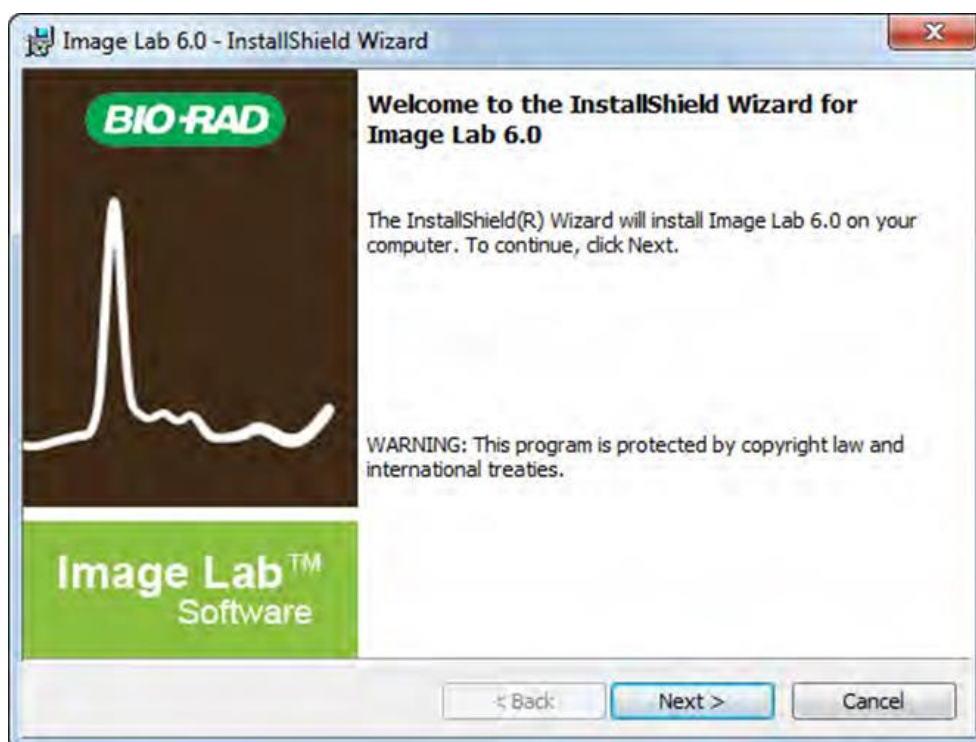


Рисунок 2.1. Экран запуска инсталлятора Image Lab

Далее принимаем условия лицензионного соглашения и нажимаем кнопку «Next». На экране выбора издания выбираем издание, которое хотим установить (рисунок 2.2).



Рисунок 2.2. Экран выбора издания

Если указана версия Security, вводим свой 18-значный код лицензии на экране Validate Code (рисунок 2.3).

После этого программа проверяет код (если вы не вводите лицензионный код, Image Lab работает только в стандартном режиме).

Далее нажимаем «Next», появится экран папки установки ПО «Destination Folder» (рисунок 2.4). Здесь можно выбрать местоположение по умолчанию или изменить его, перейдя к папке, которую вы хотите использовать для хранения программных файлов.

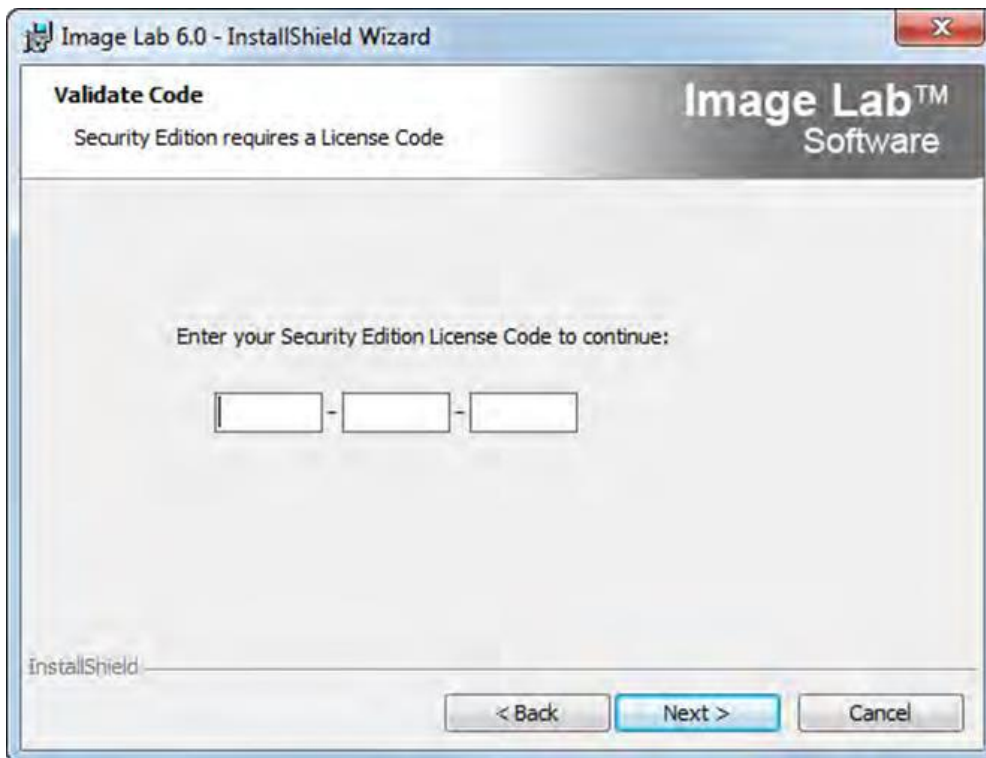


Рисунок 2.3. Экран ввода лицензированного кода



Рисунок 2.4. Экран выбора папки установки изображения

Далее нажимаем «Next» и видим экран готовности установки программы (рисунок 2.5).



Рисунок 2.5. Экран готовности установки программы

Далее запускаем установку и ждем ее окончания (рисунок 2.6). В ходе процесса инсталляции могут появляться второстепенные окна согласия на установку комплектующих ПО. Выбираем установить «Install».

При завершении установки появится экран завершения процесса установки ПО (рисунок 2.7). При желании можно открыть журнал установщика программы и получить доступ к данным о ее выпуске выбором соответствующих пунктов в инсталляторе. В Windows 7, драйвер устройства устанавливается во время установки Image Lab.

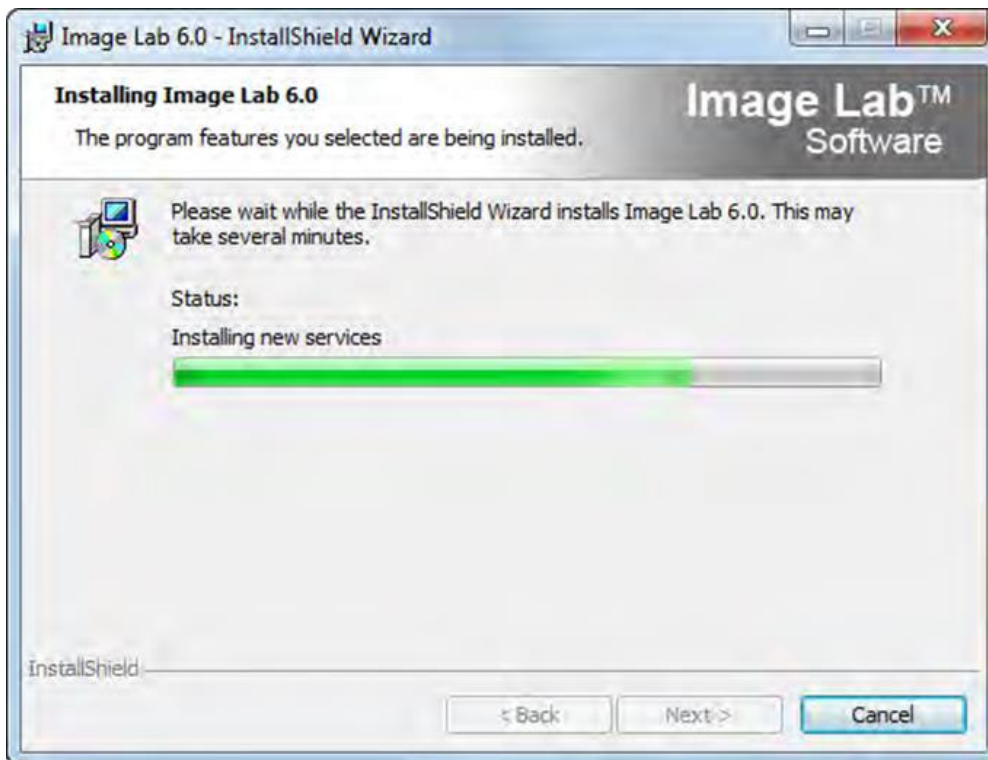


Рисунок 2.6. Экран процесса установки программы



Рисунок 2.7. Экран завершения загрузки

Во время установки может появиться предупреждающее сообщение, даже если прибор подключен к сети USB (рисунок 2.8). После установки появится сообщение, подтверждающее установку драйвера программного обеспечения устройства. При возникновении неполадок доступна техническая поддержка компании Bio-Rad по почтовому адресу LSG.TechServ.US@Bio-Rad.com.

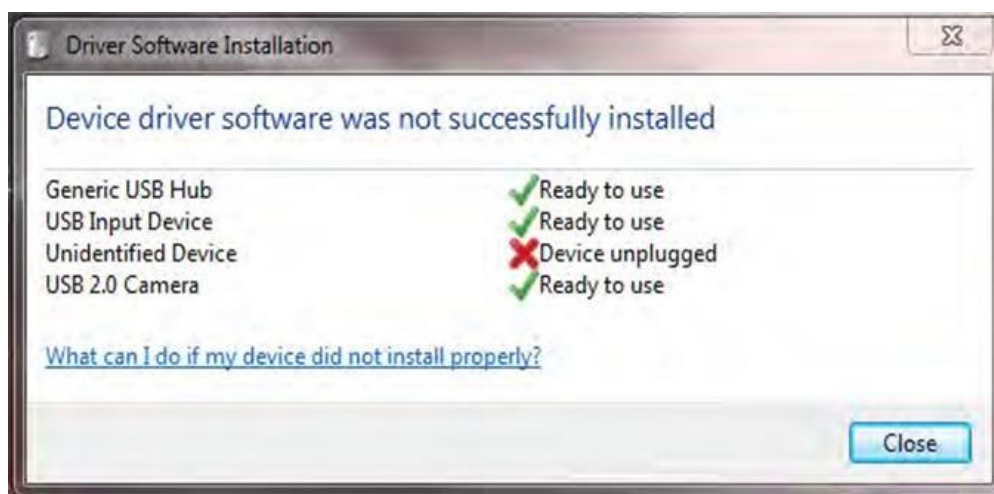


Рисунок 2.8. Экран установки драйвера устройства

Основные команды меню главного окна позволяют просматривать и использовать несколько экранов в рабочей области, так что вы можете сравнить результаты визуализации. Имена протоколов и графических файлов, открытых в рабочей области, появятся в меню «Window». Чтобы сделать изображение активным, достаточно щелкнуть имя протокола или файла. При запуске Image Lab, появляется главное окно (рисунок 2.9).

При запуске по умолчанию появится диалоговое окно «Start Page» (рисунок 2.10), где вы сможете выбрать создания нового протокола, открыть файл протокола или изображения, а также просмотреть списки недавно сохраненных протоколов и графических файлов. Для работы доступны 8- и 16-битные, черно-белые изображения, хранящиеся в формате «tif». Для того, чтобы в последующем запуск программы проходил без отображения начальной страницы, достаточно снять флажок в левом нижнем углу диалогового окна.

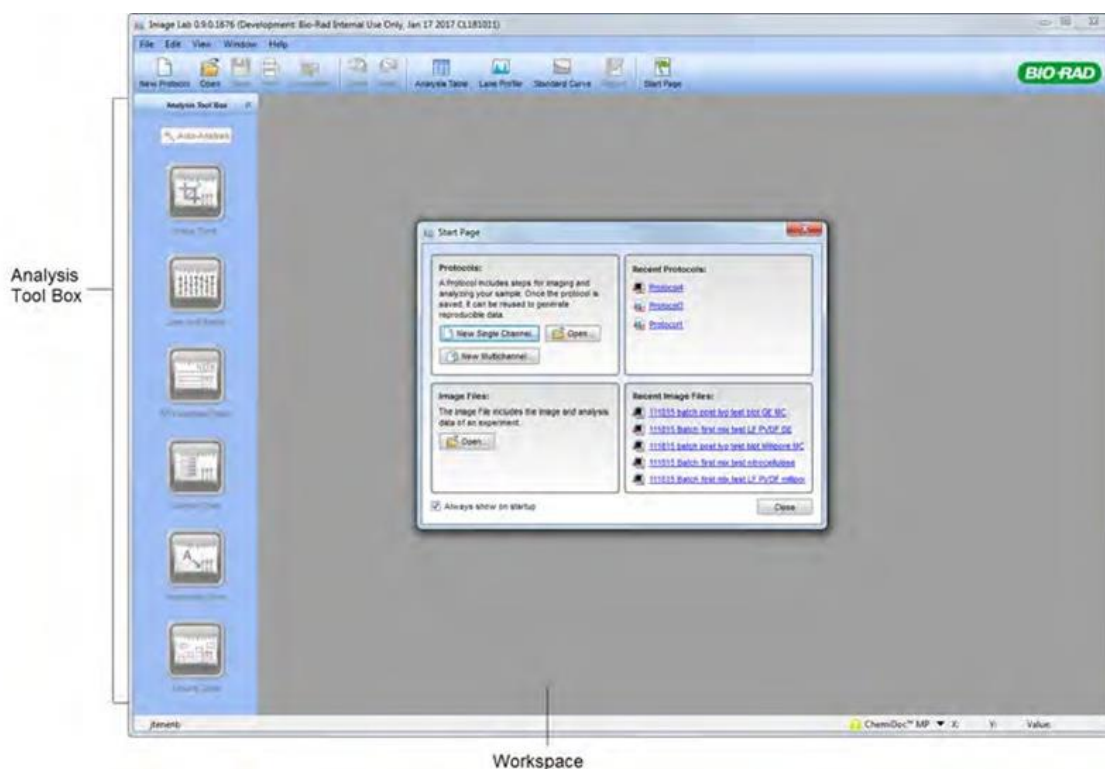


Рисунок 2.9. Главное окно при запуске программы

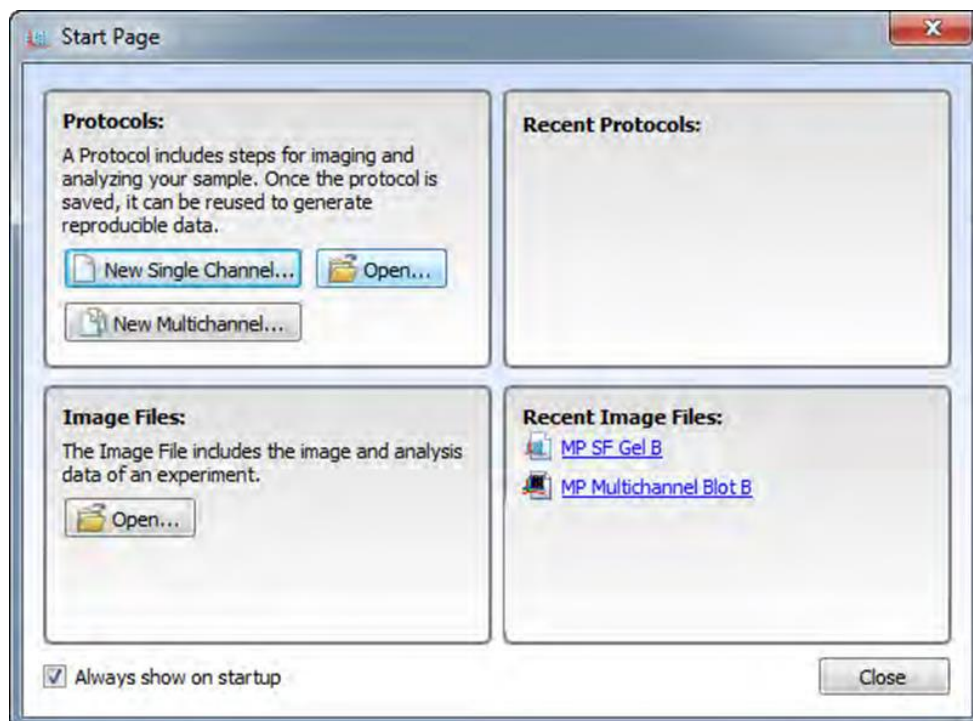


Рисунок 2.10. Диалоговое окно «Start Page»

Панель инструментов Main Toolbar

Главная панель инструментов поможет получить доступ к большинству инструментов Image Lab (рисунок 2.11). Значки «Undo» и «Redo» позволяют легко исправить и изменить порядок действий в ходе работы в программе.



Рисунок 2.11. Главная панель инструментов Image Lab

Значки на главной панели инструментов открывают доступ к отдельным отображениям полученных результатов (рисунок 2.12). Для их сохранения можно как сделать скриншот текущего изображения в буфер обмена, так и сохранить в качестве файла.



Рисунок 2.12. Значки отображения полученных результатов

С помощью команды «Analysis Table» вам будут представлены все указанные измерения по изображению в числовом формате, значки «Lane Profile» и «Standart Curve» визуальнo отобразят полученные измерения и отличия между ними, команда «Report» выведет все перечисленные результаты анализа в отдельное окно, с их одновременным отображением.

Ниже главной панели инструментов располагается рамка «Display Toolbox» (рисунок 2.13), который позволяет отображать изображения в наиболее удобном виде.



Рисунок 2.13. Рамка «Display Toolbox»

Инструменты для анализа изображения

На панели «Analysis Tool Box» расположены инструменты для анализа изображения (рисунок 2.14).



Рисунок 2.14. Панель «Analysis Tool Box»

Выбор команды «Auto-analysis» позволит провести быстрый анализ изображения.

С помощью команды «Image Tools» можно поворачивать и обрезать изображения, преобразовывать графические файлы.

Команда «Lane and Bands» выявляет группы стрипы в загруженном снимке геля или блота. Заложенные опции позволят изменять размеры, регулировать изгиб полос; обнаруживать, настраивать, добавлять или удалять группы найденных белков. Также доступна нормализация объемных данных в многоканальных изображениях для коррекции ошибок при загрузке образца.

«MW Analysis Tools» проводит анализ молекулярного веса. Для этого достаточно выбрать один из приложенных стандартов для анализа, назначать стрипы, которые будут служить стандартами, а также выбрать метод регрессии.

В команду «Quantity Tools» входит автоматически определять количество полос с использованием относительных или абсолютных значений.

Команда «Annotation Tools» добавляет форматированный текст и стрелки в области снимка геля или блота.

Команда «Volume Tools» позволяет вручную выделить заинтересовавшие объекты внутри границ каждого стрипа.

Строка состояния (Status Bar)

Строка состояния в нижней части главного окна отображает типы систем работы с гелями и блотами, а также значения X и Y в зависимости от позиции курсора на изображении (рисунок 2.15). Строка состояния также отображает интенсивность (Int) или оптическую плотность (OD) значения изображения из позиции курсора. Максимальный диапазон данных составляет 0-65,535 (INT) или 0.0-4.0 (OD). Однако фактический диапазон варьирует в зависимости от значений, содержащихся в каждом изображении.

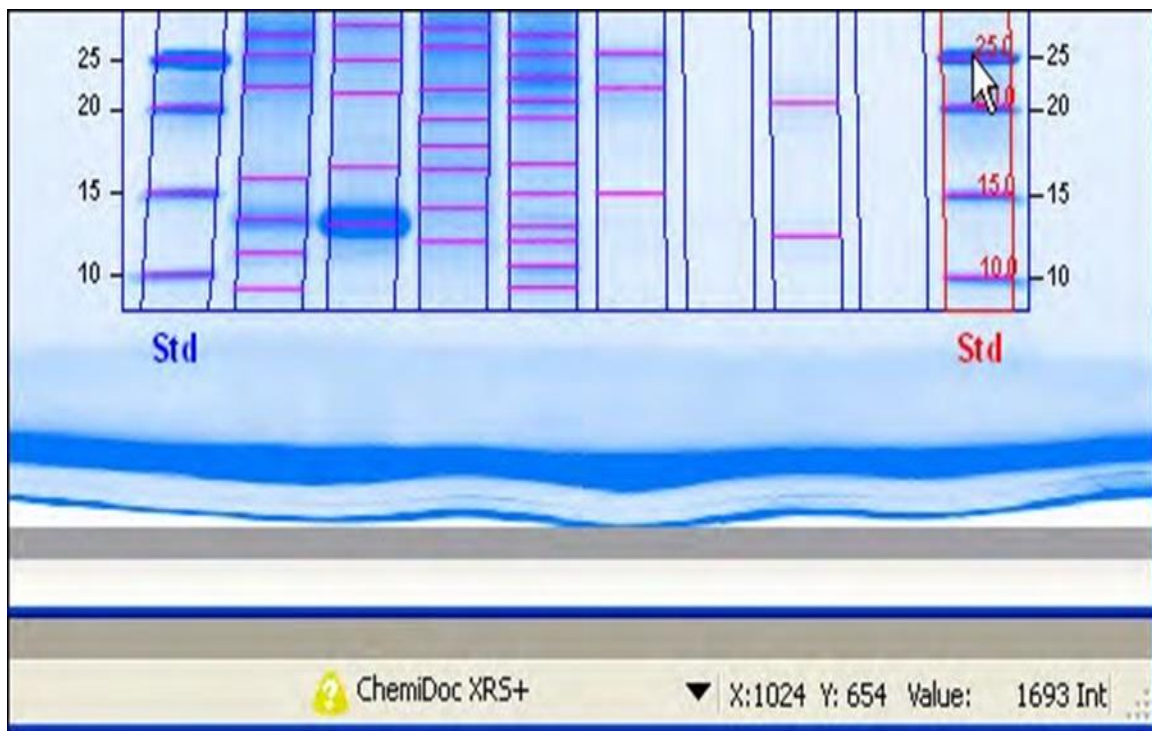


Рисунок 2.15. Строка состояния

Для многоканальных изображений необходимо привести курсор на составное изображение для отображения интенсивности окрашивания каждого из каналов.

Основные команды окна меню

Теперь остановимся на командах меню: «File», «Edit», «View», «Window» и «Help menus». Многие команды также доступны на панели инструментов или стартовой странице при запуске программы.

В команду меню «File» входят следующие опции:

1. Создание нового протокола «New Protocol». Новый протокол хранит свои настройки для получения изображений, их анализа и создания

пользовательских отчетов.

2. Опция «Open» позволяет просматривать файловую систему для извлечения файла протокола или изображений.

3. Опция «Recent Images» открывает последний файл изображения, с которым была работа в программе. Опция «Recent Protocols» позволяет открыть последний протокол.

4. Опция «Save» сохраняет имя протокола или файл изображения. Опция «Save As» сохраняет протокол или изображение. Для хранения доступны расширения «.ptl» и «.sptl». Графические файлы сохраняются в расширениях «.scn» или «.sscn».

5. Опции «Close» и «Close All» либо закрывают активное окно, либо закрывает все окна.

6. Опция «Export» выгружает снимки гелей или блотов, а также таблицы с анализами. Доступны следующие альтернативные настройки данной опции:

- «Export for Publication» - выгрузка отображаемого изображения в файл в удобном формате изображения («.bmp», «.png», «.jpg», «.tif») с любыми дорожками, полосами и аннотациями, которые появляются на экране.

- «Export for Analysis» - создание файла формата «.tif», который сохраняет все данные изображения для последующего анализа в других программных обеспечениях («Quantity One», «ImageJ»).

- «Export for PulseNet» - уменьшение изображения до размера 8-бит в формате «.tif». При этом разрешение и размер файла ограничены до 300 точек на дюйм (dpi).

- «Lane and Band Table to Excel» - преобразует группы стрипов в загруженном снимке геля или блота в таблицы Excel.

- «Lane and Band Table to File» - выгружает в файл значения, разделенные запятыми (CSV), так что отдельный стрип и обнаруженная группа белков могут быть открыты в базе данных приложения.

Важно помнить, что совершения перечисленных операций программное

обеспечение Excel или Numbers (в случае работы на Mac) должны быть установлены на вашем компьютере.

«Volume Table to File» - выгружает файл в формате CSV.

7. Опция «Image Info» отображает информацию об отдельных снимках гелей и блотов. Данная опция доступна при нажатии на одну из вкладок, открывающих доступ к деталям изображения («Image Details», «Notes tabs»), параметрам анализа («Analysis Settings»).

8. «Page Setup» - настройка страницы, параметров печати, ориентации изображения (пейзаж или портрет), полей, используемого принтера и размера бумаги.

9. «Print» - предварительный просмотр информации о снимке геля/блота и заголовка, включающего в себя имя файла изображения, имя пользователя, а также дату и время печати. Нажмите Print в диалоговом окне предварительного просмотра печати, чтобы выбрать принтер и количество копий для печати.

10. «Exit» - выход из программы Image Lab.

Команды меню «Edit»

Команда «Undo» отменяет последнее действие. Команда Redo восстанавливает последнее действие после отмены действий.

Команда «Screenshot» делает захват изображения. Далее вы можете отправить скриншот в буфер обмена или сохранить его в файле.

«Instrument Setup» отображает информацию о приборе, его название, серийный номер, серийный номер камеры, параметры освещения и последнюю калибровку. Возможен сброс калибровки системы в данном диалоговом окне.

«Report Settings» – это настройка отчетов. Это диалоговое окно содержит три вкладки. По умолчанию выбраны все галочки. Снимите флажки, чтобы исключить информацию из отчетов. Ваш выбор применяется ко всем отчетам. В

главной вкладке есть опции для исключения или представления информации о вашем снимке геля/блота.

Вкладка «Volume Table» позволяет исследователю выбирать соответствующие идентификаторы для измерений и обеспечивает возможность исключить таблицу из отчетов.

«Preferences» - диалоговое окно с двумя вкладками. Одна позволяет добавлять префикс, имя пользователя, дату и время в имя файлов изображений. Другая вкладка представляет на выбор цвета для графических элементов в гелях/блотах.

Команды меню «View»

Команда «Image Overview» отображает изображение геля/блота с красным прямоугольником вокруг области, видимой в более широком главном окне.

«Image Transform» отображает гистограммы, позволяет регулировать светлые и темные значения снимка. Данная настройка изменяет способ отображения данных на экране монитора.

«Operations History» отображает последовательность действий, выполняемых для пользователя и программного обеспечения.

«View System Log» отображает журнал событий, связанный с запуском программного обеспечения.

Команды экрана меню

Данные команды позволяют показать и скрывать несколько открытых файлов изображений в рабочей области. Это меню также содержит список всех открытых в данный момент изображений и протоколов.

Команда «Tile» выравнивает все открытые файлы изображений, чтобы они были видны в одно время. Команды «Tile Horizontal» и «Tile Vertical» выравнивает все открытые файлы изображений сверху вниз или слева направо.

Команда «Cascade» укладывает все открытые файлы изображений и протоколы с перекрывающимися заголовками, так что каждый из них могут быть легко выбраны для просмотра.

Команда «Imitate Zoom» объединяет настройки масштабирования всех открытых изображений в соответствии с размерами текущего файла изображения. Команда «Imitate Transform» изменяет яркость и контрастность всех открытых изображений.

Команды «Next» и «Previous» позволяют переключать все открытые файлы изображений от старого к новому и от нового к старому.

В командах меню «Помощь» можно посмотреть оригинальное руководство пользователя на английском языке, отобразить регистрационную форму, версию программного обеспечения, дату выпуска.

Вопросы для самоконтроля

1. Что входит в заложенные опции при быстром анализе изображения?
2. Какая функция поможет определить стрипы в загруженном снимке геля или блота?
3. Чем полезна нормализация объемных данных в многоканальных изображениях?
4. Строка состояния в нижней части главного окна отображает типы систем работы с гелями и блотами
5. Какие опции входят в команду меню «File»?
6. Как преобразовать файл снимка геля или блота для последующего анализа в других программных обеспечениях?

7. Что позволяет отображение гистограммы?
8. Как объединить настройки масштабирования всех открытых изображений в соответствии с размерами текущего файла изображения?
9. Что такое CSV файл и почему он важен в базе данных приложения Image Lab?
10. Что входит в команду меню «Edit»?

ГЛАВА 3. НАСТРОЙКА ПРОТОКОЛОВ

Подключение к компьютеру денситометра автоматически отображается в строке состояния (рисунок 3.1). Зеленый флажок рядом с названием оборудования указывает на то, что прибор подключен к компьютеру и производит обмен данными с Image Lab. Для создания протоколов с другим устройством, выберите другое имя оборудования в списке.



Рисунок 3.1. Экран состояния

Окно настройки протокола

На левой панели отображаются заголовки основных команд при настройке протокола (рисунок 3.2). Номерные шаги настройки протокола появляются под заголовками. Вы можете включить или отключить шаг, установив или сняв соответствующий флажок. При выборе шага в правой панели отображаются подробные параметры для этого шага. Использование другого оборудования может повлиять на структуру основных команд.

Вы можете просмотреть параметры протокола, щелкнув «Protocol Summary» в левой панели окна настройки протокола (рисунок 3.3). В правой панели резюме перечислены параметры для каждого шага.

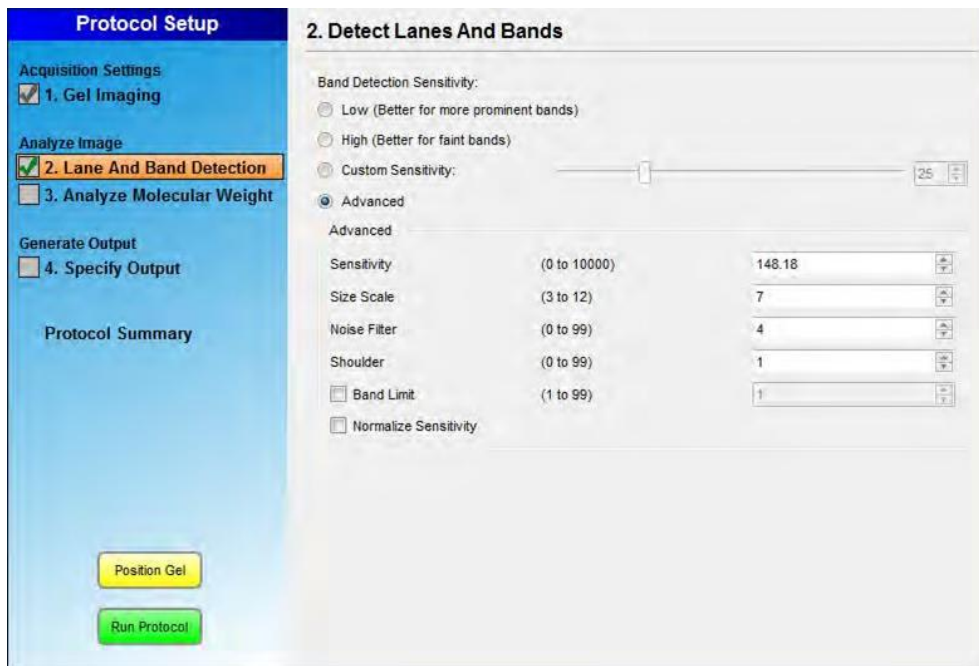


Рисунок 3.2. Экран настройки протокола



Рисунок 3.3. Просмотр параметров протокола

Этапы настройки протокола

Создание протокола состоит из настройки трех основных этапов: сбор данных; анализ изображения (обнаружение полос и групп белков, определение молекулярного веса); отчет о работе.

На каждом экране в левой панели перечислены задачи каждого основного шага протокола. Экраны настройки протокола появляются в порядке, указанном в левой панели. Между этапами можно переключаться, возвращаясь к предыдущему шагу и изменяя его параметры.

Сбор данных

Сбор данных осуществляется в пункте под названием «Acquisition settings» (рисунок 3.4) в котором представлены настройки типа загружаемого изображения (гель, блот). Здесь выбираются оптимальные параметры изображения, задаются параметры для области изображения, устанавливается время экспозиции изображения с оптимизацией для слабо и интенсивно окрашенных стрипов, также выбирается цветовой фильтр изображения.

Меню позволяет создавать протоколы с персональными настройками (рисунок 3.5), которые можно повторно использовать или редактировать в соответствии с типом используемого денситометра.

Для анализа нескольких изображений одновременно предусмотрено создание многоканальных протоколов.

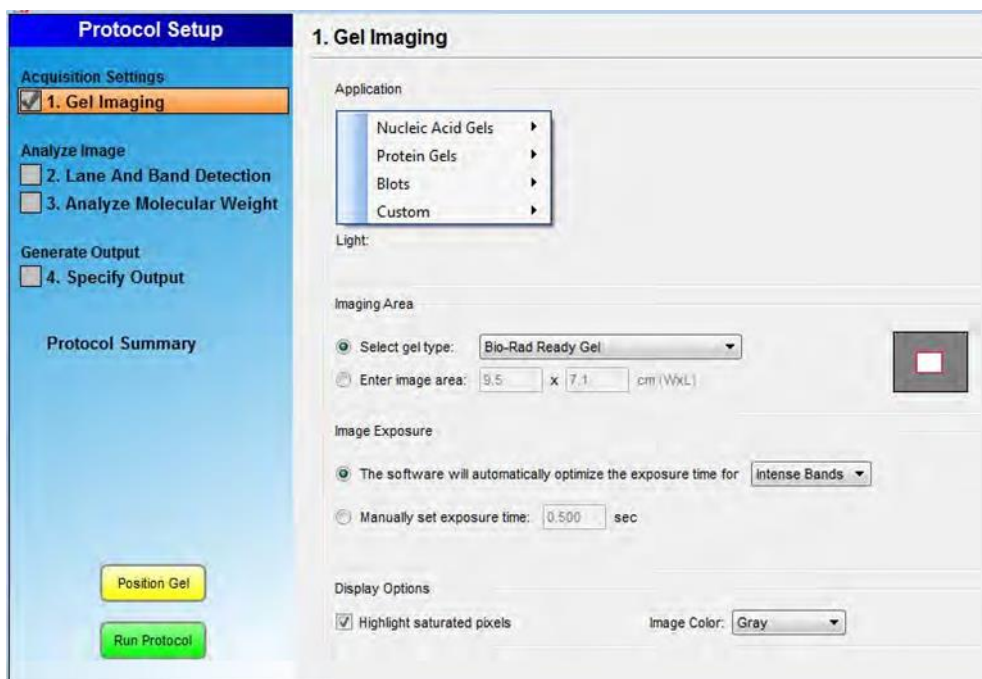


Рисунок 3.4. Сбор данных в Acquisition settings

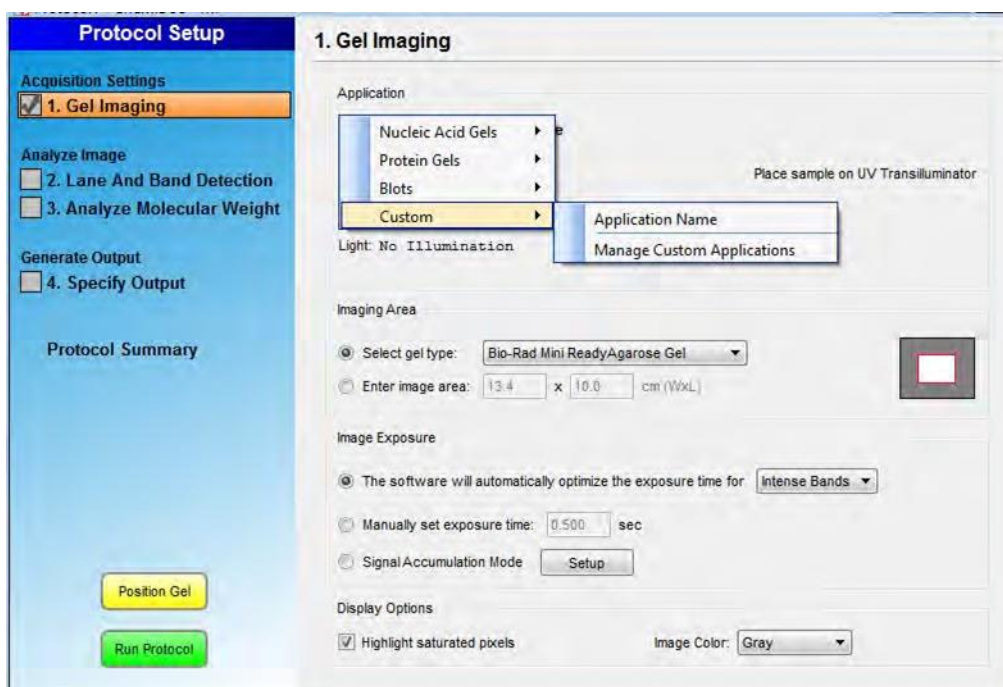


Рисунок 3.5. Персональная настройка протокола

Анализ изображения «Analyse image»

На втором этапе анализа изображения вы используете два параметра: обнаружение стрипов и белковых групп и анализ молекулярной массы. Image Lab автоматически обнаруживает стрипы и группы белков, вычитая фон (рисунок 3.6). Однако и здесь возможно внесения правок с использованием персональных настроек. Достаточно задать параметры чувствительности для обнаружения стрипов и выбрать варианты нормализации для одно-/многоканальных протоколов.

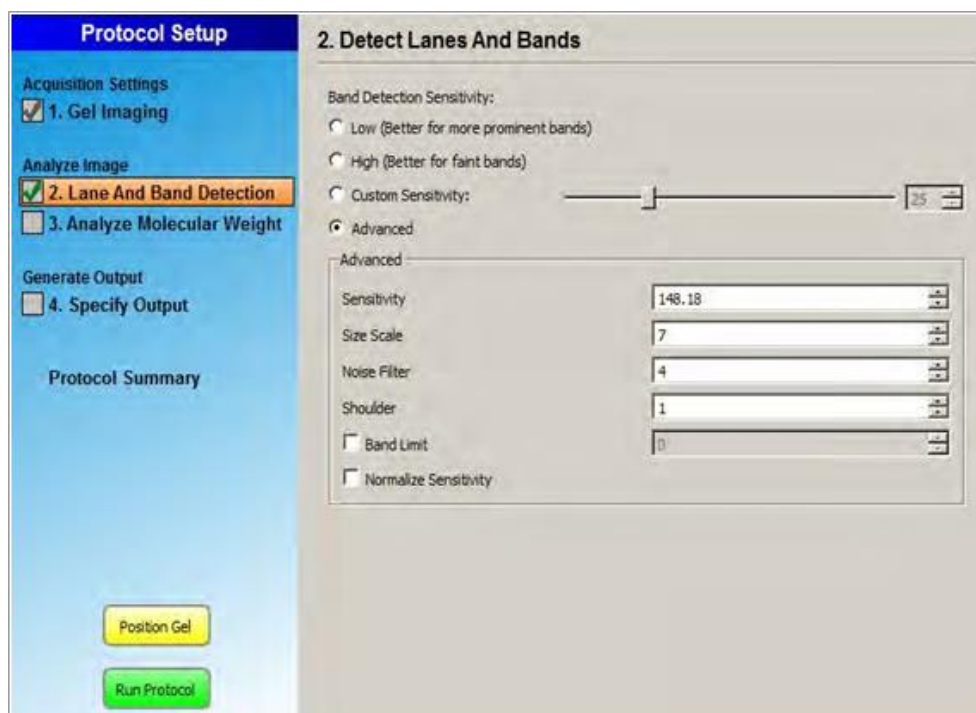


Рисунок 3.6. Этап анализа изображения

Определение молекулярной массы белков проходит для каждой полосы на основе стандарта, который вы укажете (рисунок 3.7). Расположение стрипов,

которые будут служить маркерами (стандартами) на этапе анализа изображения, лучше всего установить так, чтобы они находились в первом и последнем стрипе. Image Lab использует метод регрессии для расчета молекулярной массы белковых групп.

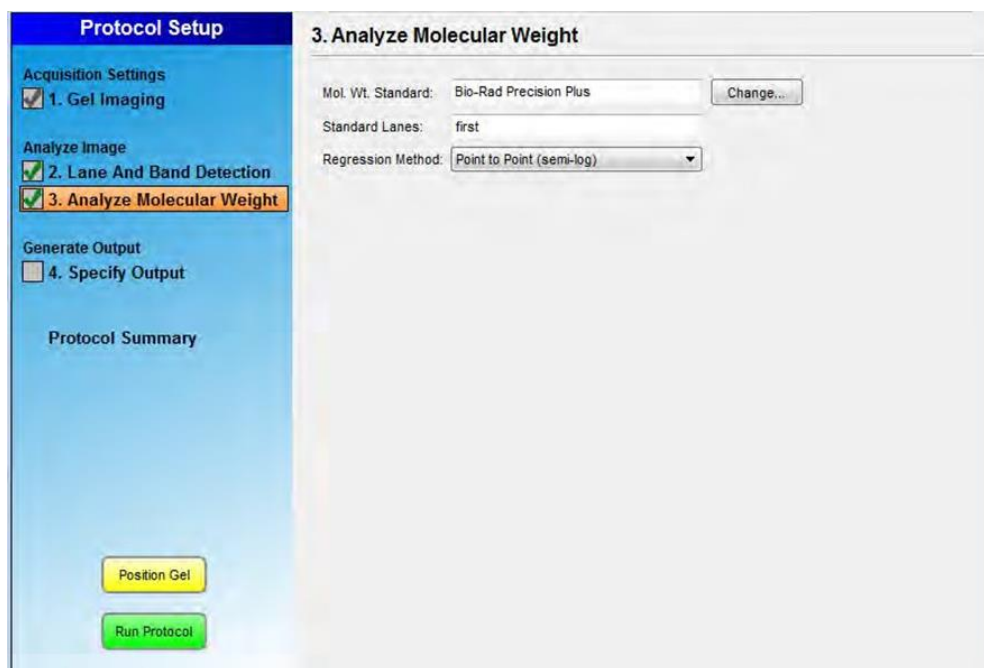


Рисунок 3.7. Определение молекулярной массы

Отчет о работе

При выборе способа отображения отчета о работе, вы можете выбрать автоматическую печать изображения и отчета, либо вывести полученные данные на дисплее (рисунок 3.8, рисунок 3.9). Вы можете выбрать параметры на панели инструментов экрана отчета, чтобы настроить или распечатать отчет, создать файл PDF или настроить параметры принтера.

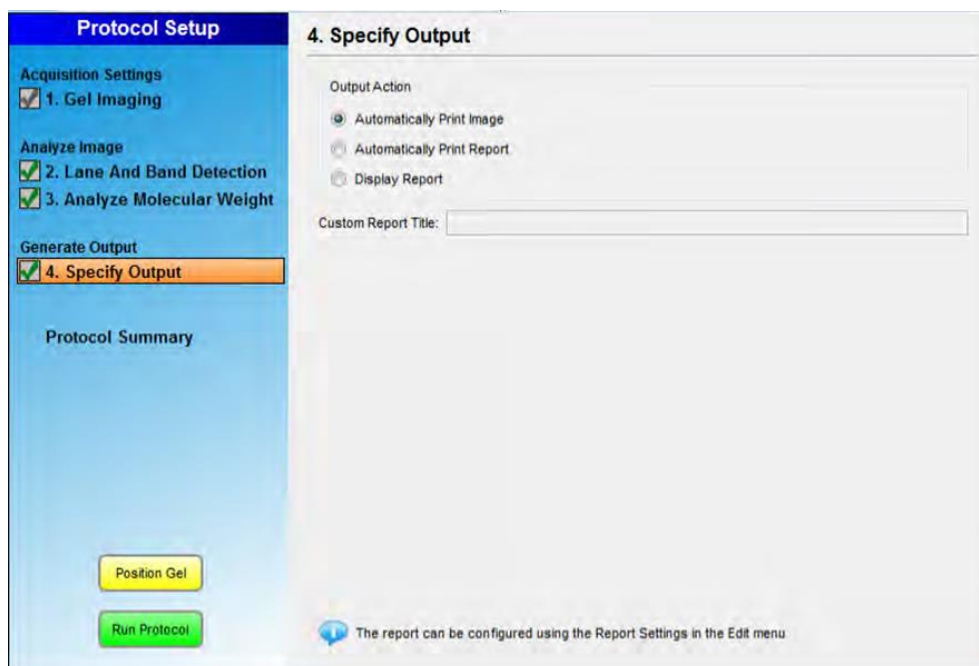


Рисунок 3.8. Этап отчета о работе

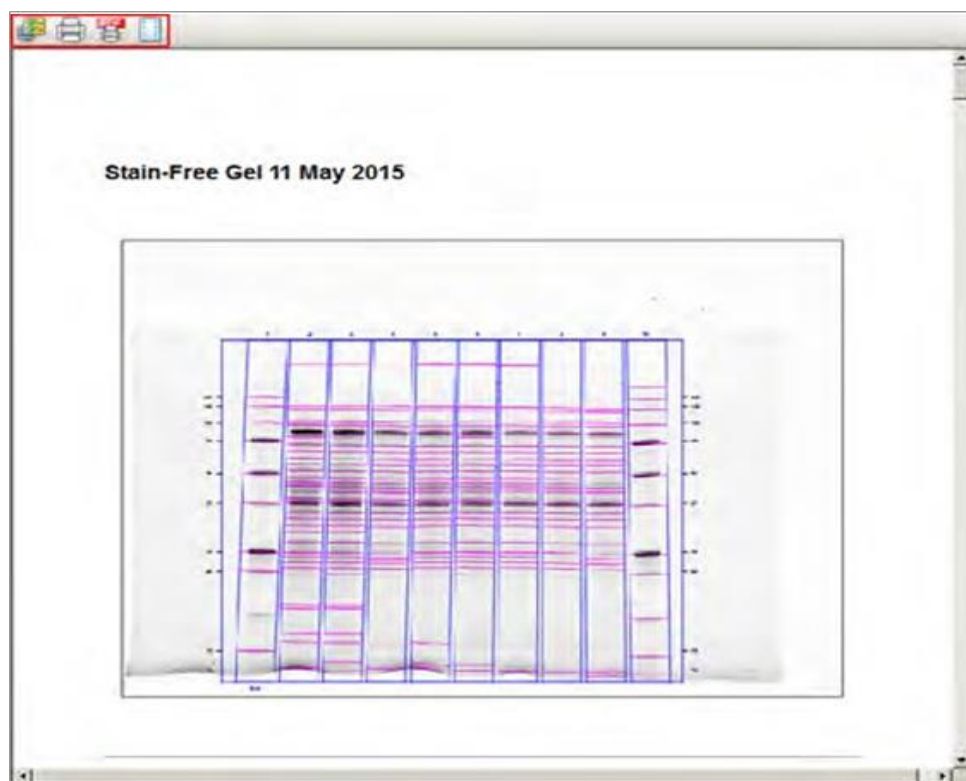


Рисунок 3.9. Вывод отчета на дисплее

Обнаружение стрипов и белковых групп

Для анализа геля/блота, Image Lab должен обнаружить стрипы на изображении. Вы можете установить обнаружение стрипов с высоким уровнем чувствительности так, что программное обеспечение обнаружит даже слабые полосы на изображении с автоматическим вычитыванием фона. Если чувствительность установлена слишком высоко, фоновое окрашивание может быть обнаружено в виде полос. Если значение слишком мало, представляющие интерес полосы могут быть не обнаружены.

Для настройки параметров обнаружения нужно отметить флажком графу «Lane and Band Detection» в левой панели окна настройки протокола (рисунок 3.10).

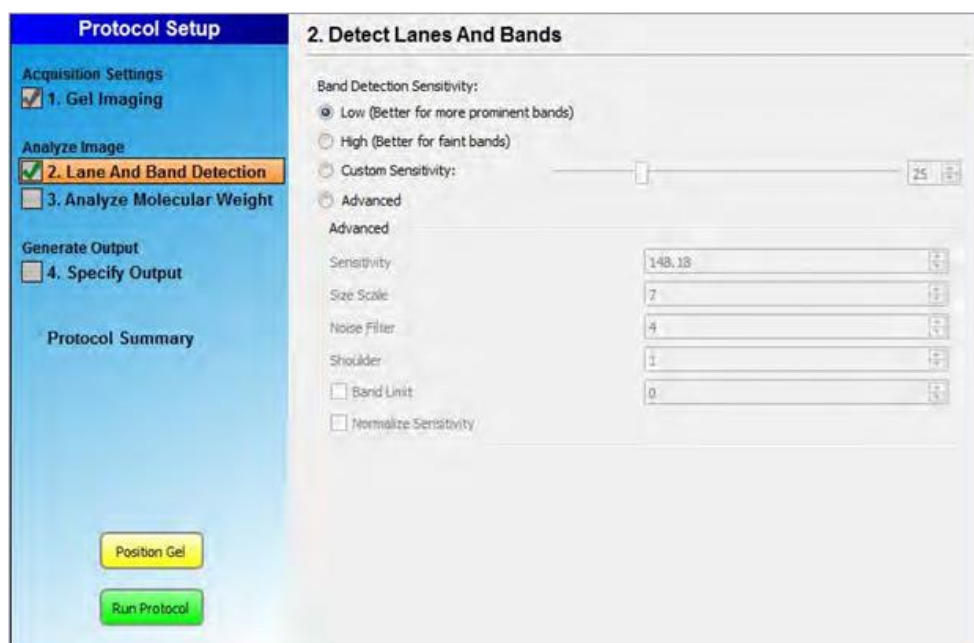


Рисунок 3.10. Обнаружение стрипов и бандов

Низкий диапазон чувствительности устанавливает обнаружение на низком уровне (25) для снимков с известными полосами и высокой молекулярной массой. Слабые полосы здесь не обнаруживаются.

Высокий диапазон чувствительности устанавливает обнаружение на более высоком уровне (75) для снимков с едва различимыми белками. Возможна установка числового значения чувствительности от 1 до 100 с помощью ползунка. Доступ к дополнительным настройкам устанавливает более точные значения чувствительности, при этом настраивается шум, пределы обнаружения для каждого из бандов и т.д.

Вы можете выбрать и настроить любую полосу в многоканальном изображении через канал нормализации (рисунок 3.11).

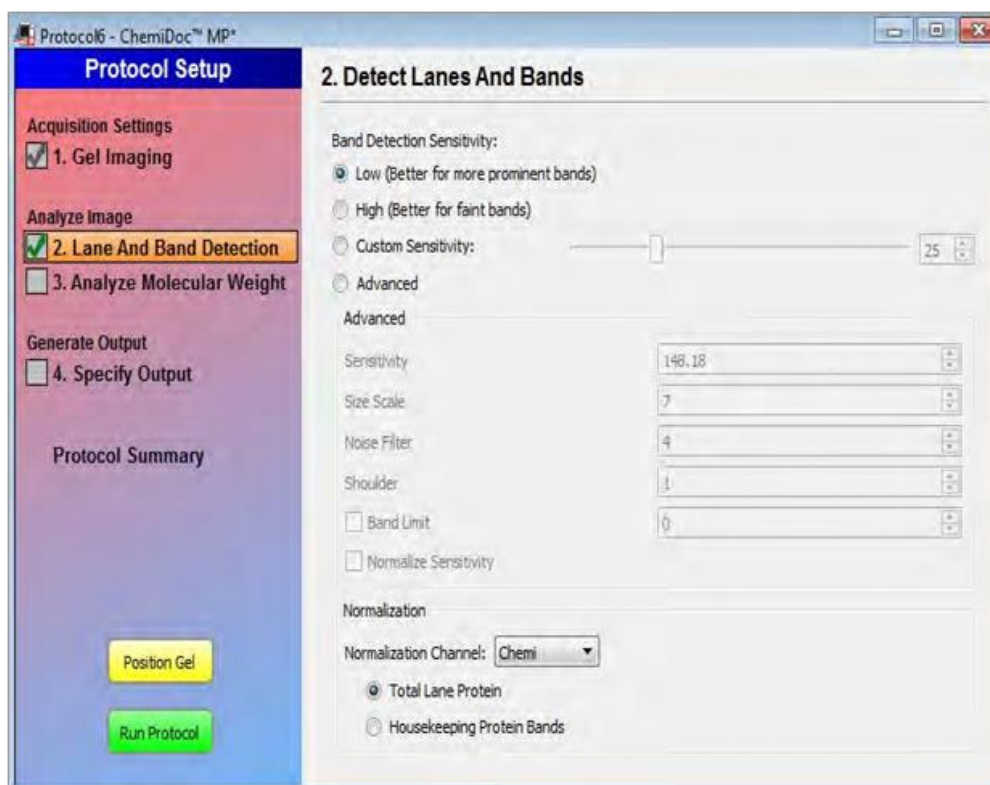


Рисунок 3.11. Канал нормализации

Анализ молекулярной массы

Определение молекулярной массы зависит от выбора стандартов определения белков (рисунок 3.12). Программа вычисляет молекулярный вес для каждого диапазона на основе указанного белкового стандарта.

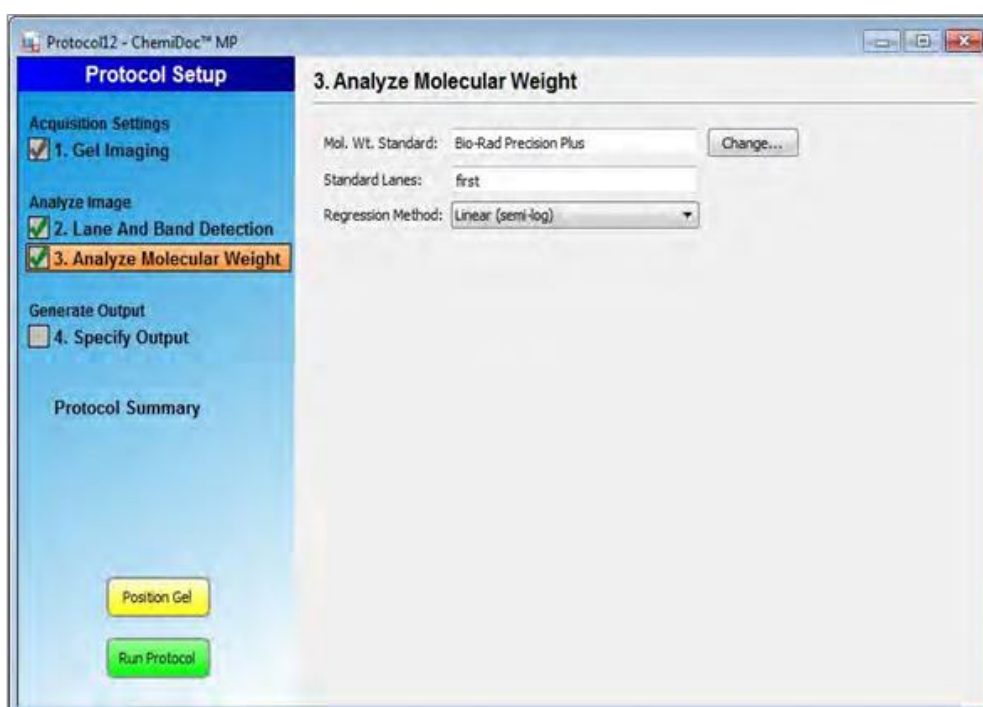


Рисунок 3.12. Анализ молекулярной массы

Для анализа молекулярного веса нужно отметить соответствующий флажок в левой панели окна настройки протокола. Нажмите кнопку «Change» для просмотра списка доступных стандартов (рисунок 3.13).

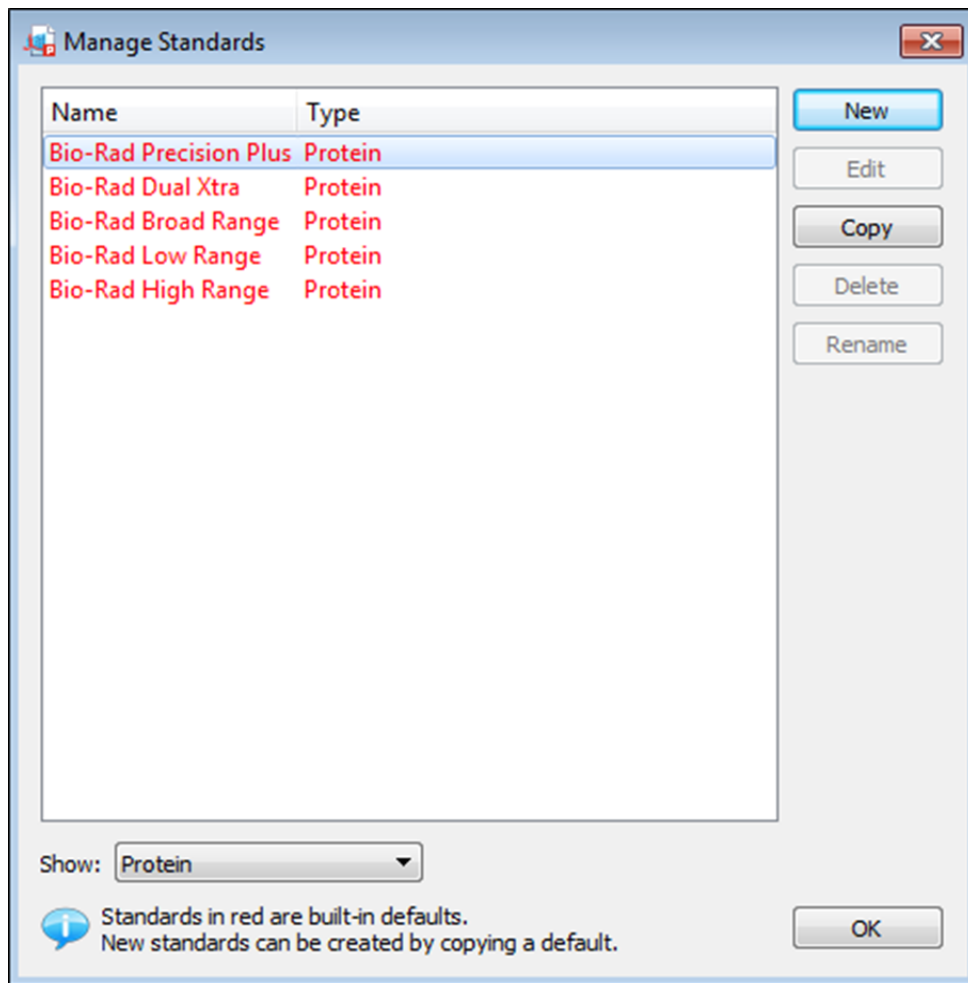


Рисунок 3.13. Список доступных стандартов обнаружения белков

Выбрав стандарт, нажмите кнопку «ОК». Если нужного стандарта нет в списке, выполните одно из следующих действий:

- 1) Откройте список и выберите все стандарты. Выберите стандарт, который вы используете, и нажмите кнопку «ОК».
- 2) Добавив стандарт, выберите его и нажмите кнопку «ОК».
- 3) Выберите стрип, содержащий нужный вам стандарт, набрав его номер в поле «Standard Lanes» с обозначением номера стандарта на английском. Формат должен быть вида «xx xx xx», и так далее, где «xx» - это номер стрипа. Например, если вы используете 18-луночный гель и хотите, чтобы ваши стандарты были дорожки 1, 10 и 18. Для этого введите 1, с подписью «First», 10 с подписью «Last» и т. д.

Обнаружение полос работает лучше всего, когда стандарты находятся в первых и последних полосах. Для образцов нуклеиновых кислот нужно использовать этот шаг, чтобы определить размер полос в парах оснований.

Чтобы скопировать стандарт и добавить его в список программных стандартов нажмите кнопку изменить. Откроется диалоговое окно управления стандартами. Выберите стандарт, который точно соответствует тому, который вы используете. Нажмите кнопку «Сору» и копия добавится в список. Выберите копию стандарта и нажмите «Edit». Появится диалоговое окно «Edit Standard». Измените имя, тип, единицы и значения в соответствии со стандартом, который вы используете. Нажмите кнопку «ОК».

Чтобы изменить стандарт в список predetermined стандартов нажмите кнопку «Change», чтобы отобразить диалоговое окно управления стандартами. Нажмите кнопку «New» и появится диалоговое окно «Edit Standard». Введите название стандарта, который вы используете.

В раскрывающемся списке выберите стандарт. В раскрывающемся окне Units выберите единицу измерения для маркеров молекулярного веса. Нажмите «Add» (рисунок 3.14). Появится диалоговое окно «Edit».

Введите значение для каждого из маркеров молекулярной массы и нажмите кнопку «ОК» (рисунок 3.15).

Вы должны ввести по крайней мере два значения молекулярных размеров весов маркеров (рисунок 3.16). Добавление описания не является обязательным. Когда вы закончите ввод значения, нажмите кнопку «ОК».

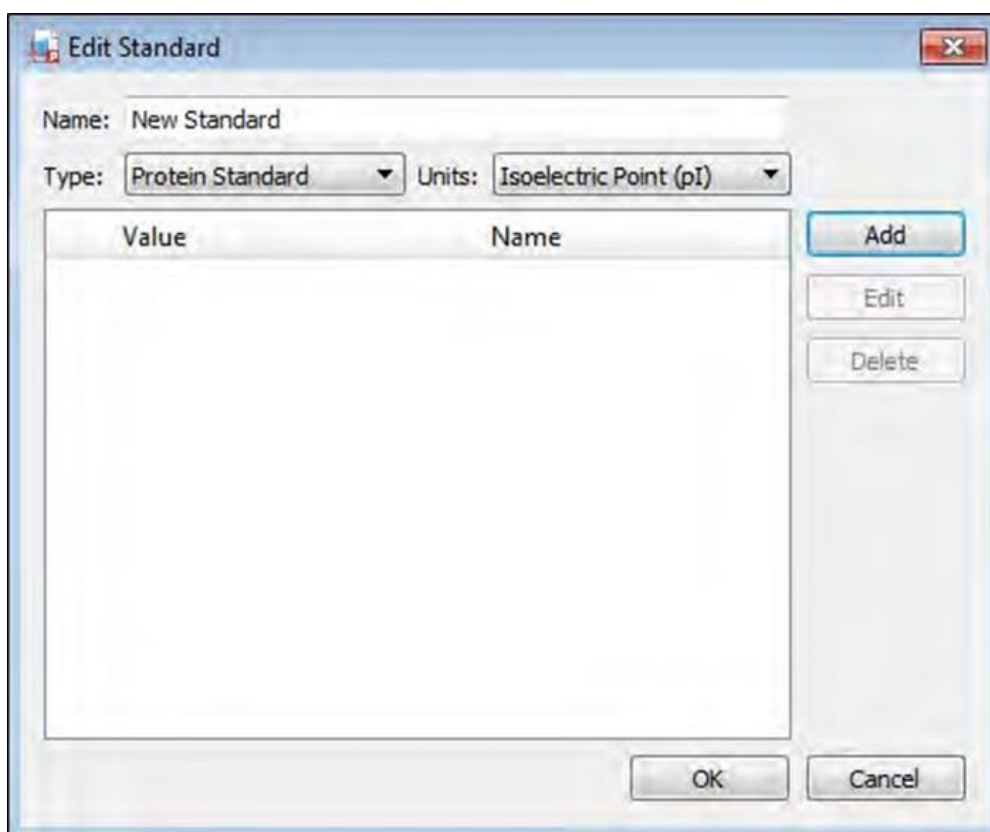
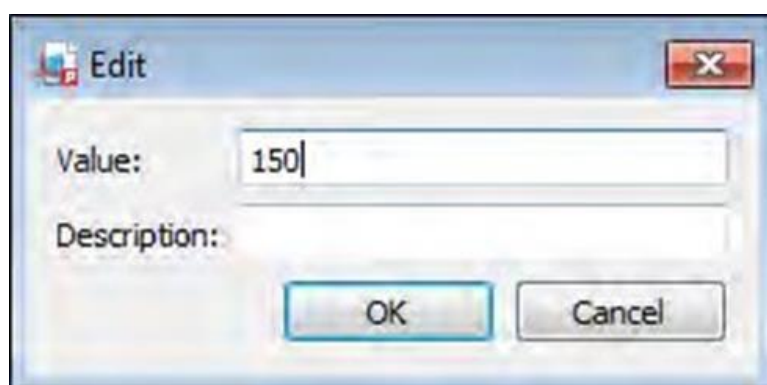


Рисунок 3.14. Экран изменения стандартов



**Рисунок 3.15. Окно введения единицы измерения для маркеров
молекулярного веса**

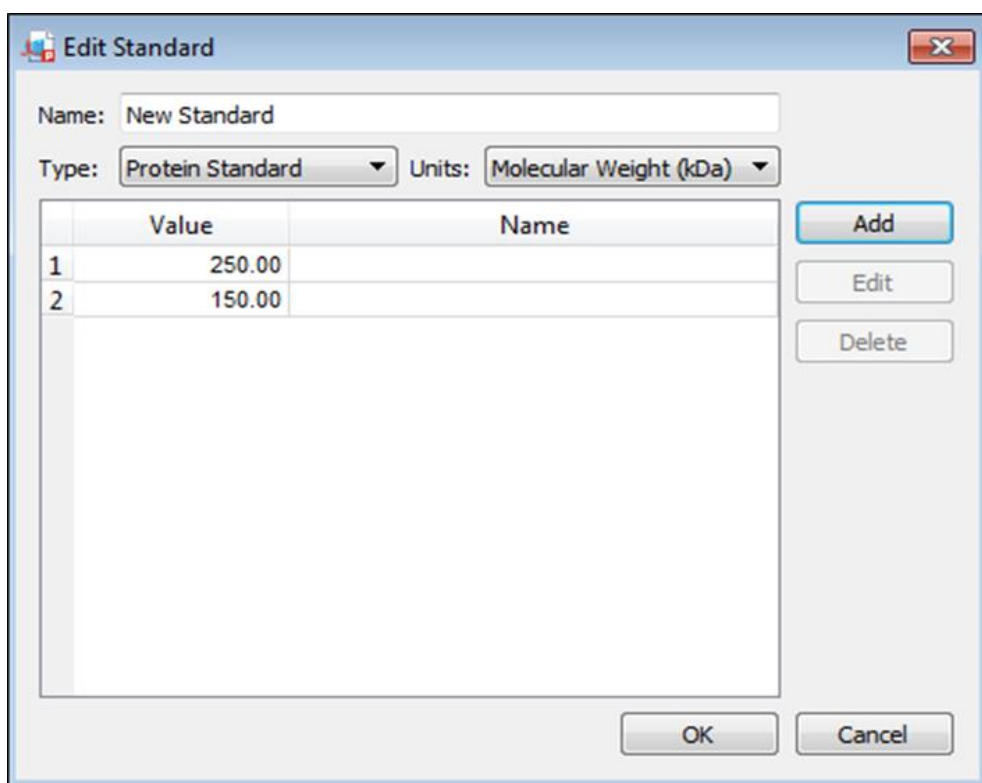


Рисунок 3.16. Введенные значения маркеров молекулярного веса

Запуск протокола

Поместите гель/блот в денситометр. На экране настройки протокола, нажмите кнопку «Run Protocol» (рисунок 3.17).

Image Lab запускает протокол в режиме визуализации. После получения изображения ПО продолжает работать в соответствии с выбранными во время установки протокола параметрами.

Когда протокол выполнен, изображение появляется в рабочей области. Вы можете редактировать и сохранять изображение или анализировать его дальше. Для отмены протокола нужно снять соответствующий флажок.

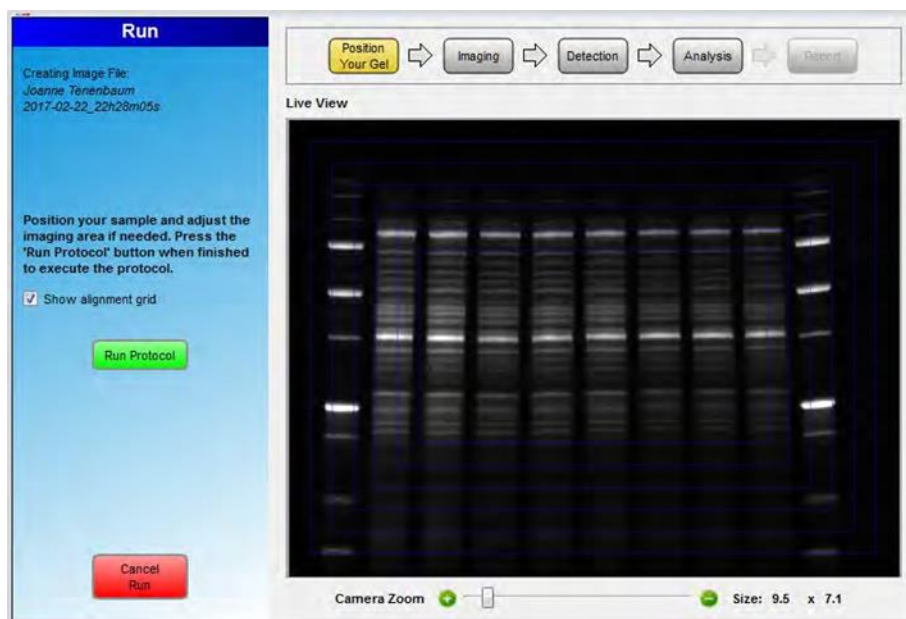


Рисунок 3.17. Экран запуска протокола

Методы регрессионного анализа

Метод регрессии используется для расчета молекулярной массы неизвестных групп. Image Lab использует относительные значения стандартных диапазонов для расчета стандартной кривой. Стандартная кривая затем используется для расчета значений неизвестных групп.

Во время создания протокола вы должны выбрать один из методов регрессии (рисунок 3.18). Доступны следующие методы:

- Point to Point (semi-log)
- Linear (semi-log)
- Logistic
- Cubic Spine

Regression Method	Minimum number of standard bands
Linear (semi-log)	2
Point-to-point (semi-log)	2
Logistic	5
Cubic spline	5

Рисунок 3.18. Панель выбора методов регрессии

Молекулярная масса каждой полосы появляется в колонке «Mol. Wt./Base Pair» в таблице анализа. Для отображения стандартной кривой нажмите «Standard Curve» на панели инструментов (рисунок 3.19). В диалоговое окно «Standard Curve», выберите вкладку «Standard Curve Volume». Кривая графика начинается с 0,0, независимо от подбора кривой.

В диалоговом окне стандартной кривой "Standard Curve" отображается наиболее подходящая кривая для определенных стандартов и полосы относительно этой кривой для полосы, выбранной на изображении. На вкладках под диалоговым окном отображаются стандартные кривые для трех различных анализов.

Стандарты отображаются зеленым цветом. Неизвестные полосы отображаются красным цветом. Вы можете переключать отображение молекулярной массы на оси Y между линейной и логарифмической шкалой, щелкнув поле Логарифм оси Y в верхнем левом углу. Появится метод регрессии, выбранный вами в инструментах анализа молекулярной массы, а также формула (если применимо) и значение R² метода регрессии.

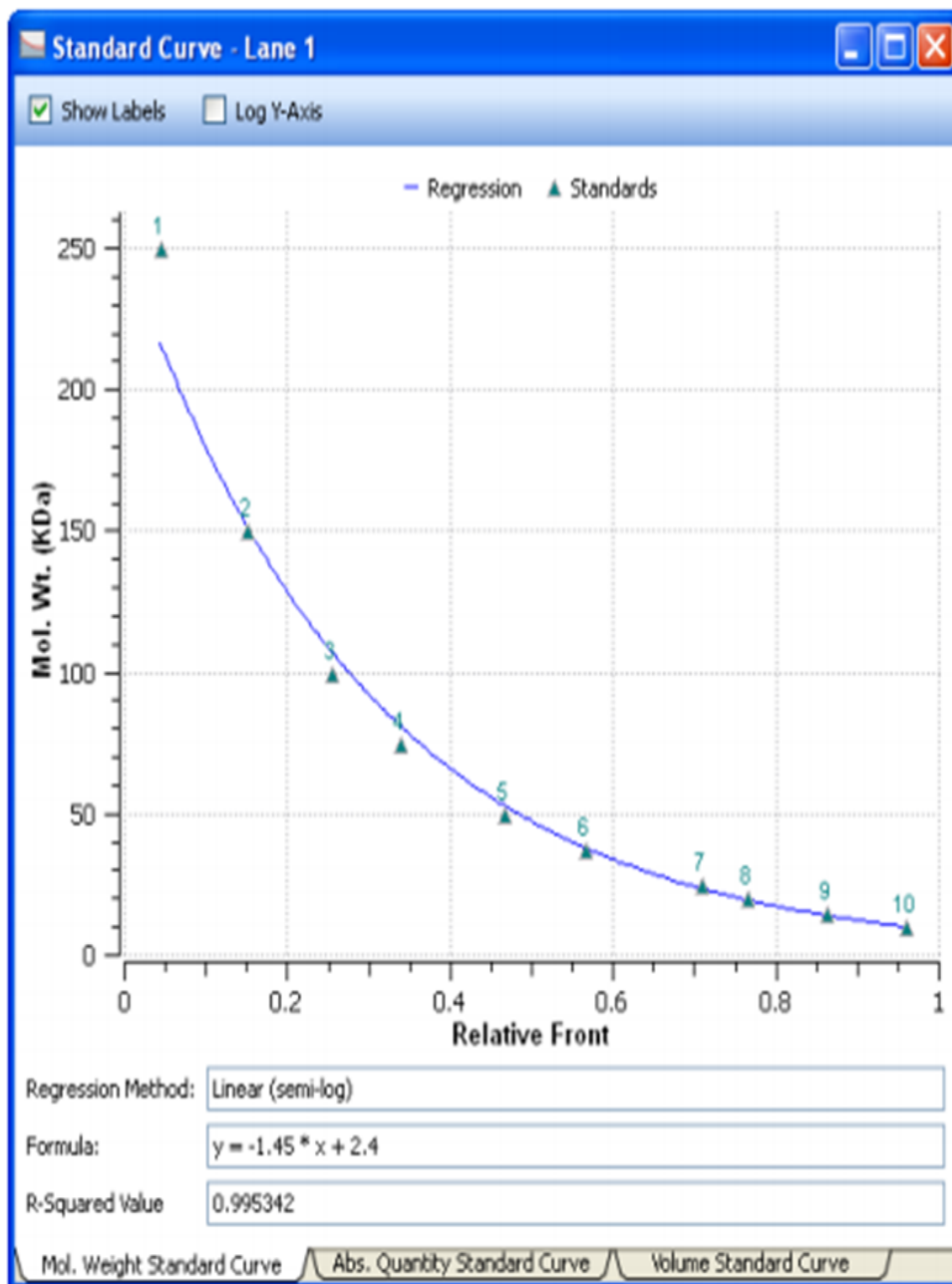


Рисунок 3.19. Диалоговое окно стандартной кривой "Standard Curve"

Вкладки в этом окне позволяют просматривать стандартную кривую молекулярной массы, стандартную кривую абсолютного количества или стандартную кривую объема.

Вопросы для самоконтроля

1. Что позволяет пункт «Acquisition settings»?
2. Какие параметры используются при анализе изображения?
3. Как лучше всего установить расположение стрипов при анализе изображения?
4. Что произойдет с фоновым окрашиванием, если чувствительность установлена слишком высоко?
5. В чем преимущество низкого диапазона чувствительности?
6. На основе чего программа вычисляет молекулярный вес для каждого диапазона?
7. Какая функция на панели инструментов необходима для отображения стандартной кривой?
8. Как вывести на экране выбранный при анализе метод регрессии, формулу и значение R^2 метода регрессии?
9. Какие разновидности стандартных кривых доступны для построения при анализе изображения?
10. При работе с доступными стандартами обнаружения белков, какое наименьшее число значений молекулярных размеров весов маркеров необходимо ввести?

ГЛАВА 4. ПРОСМОТР ИЗОБРАЖЕНИЙ И ДАННЫХ О ИЗОБРАЖЕНИЯХ

После того как сделан снимок геля, он появляется в рабочем пространстве. Вы можете оптимизировать просмотр и анализ изображения во многих отношениях.

На рисунке 4.1 показан снимок геля с стрипами и бандами. Подписи к стрипам можно отобразить или скрыть. Есть много способов просмотра полученных данных. Вы можете просматривать данные в виде таблицы анализа, стандартной кривой, и отчета.

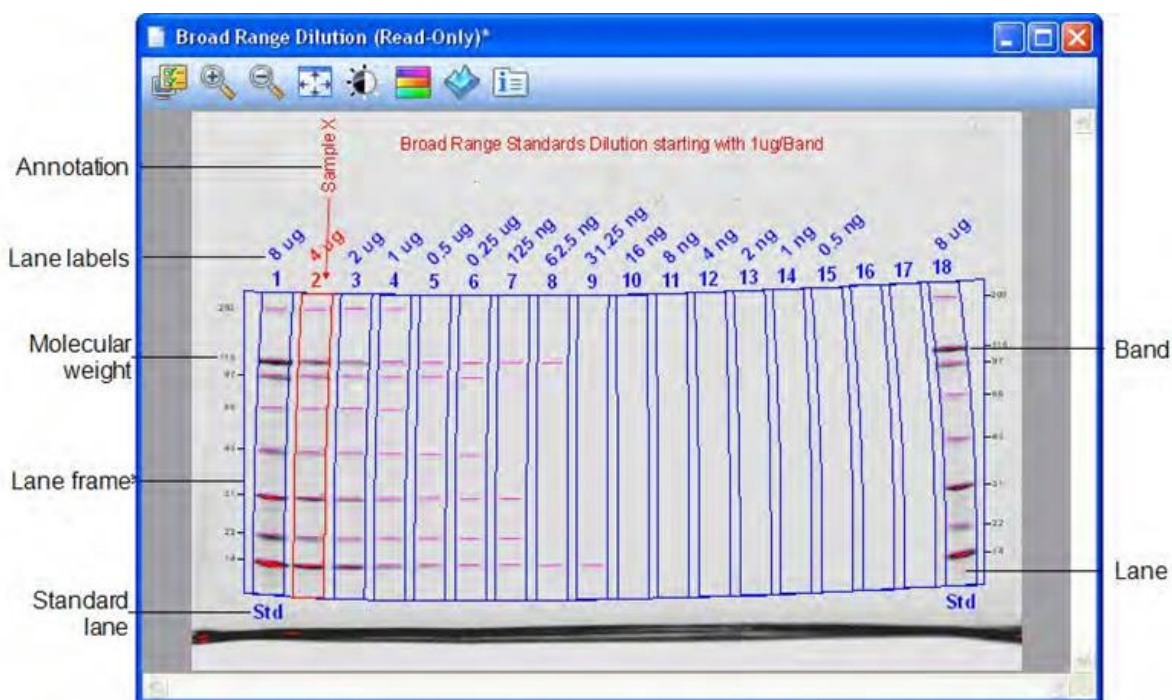


Рисунок 4.1. Снимок геля с подписями

В разделе «Annotations, Lanes and Bands» вы можете выбрать, следует ли отображать обозначения, которые были сделаны на изображении (рисунок 4.2).

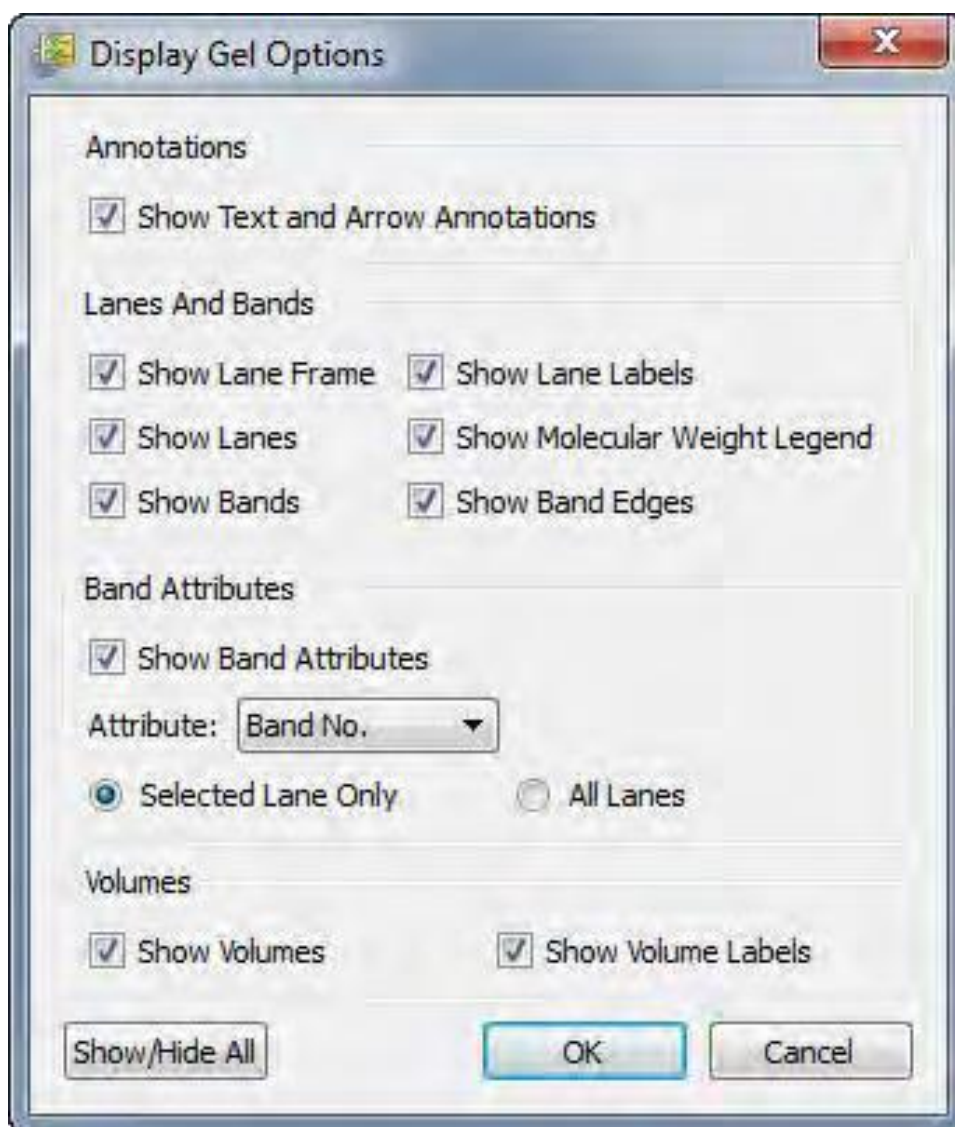


Рисунок 4.2. Доступные подписи в окне настроек геля

В разделе «Band Attributes» вы можете выбрать один из пунктов (номер белковой группы, молекулярная масса, относительное расстояние, уровень, абсолютное и относительное количество, % групп, % стрипов) для отображения в выбранном банде или для всех полос.

В этом диалоговом окне «Transform» можно настроить яркость и контрастность изображения для оптимизации отображения его слабо видимых участков (рисунок 4.3). Данные преобразования не изменяют данных. Они меняют только способ их отображения.

При нажатии галочки в окне «Image Transform» появляется окно

оптимизации отображения снимка. Значения минимального и максимального диапазона варьируются в зависимости от светлых и темных значений, присутствующих в изображении. Гистограммы распределения частот показывают общий диапазон данных в изображении и объем данных в каждой точке в диапазоне. Функция «Auto Scale» автоматически определяет оптимальные настройки для изображения. Светлая часть изображения устанавливается на минимальную интенсивность. Темная часть устанавливается на максимум (рисунок 4.3).

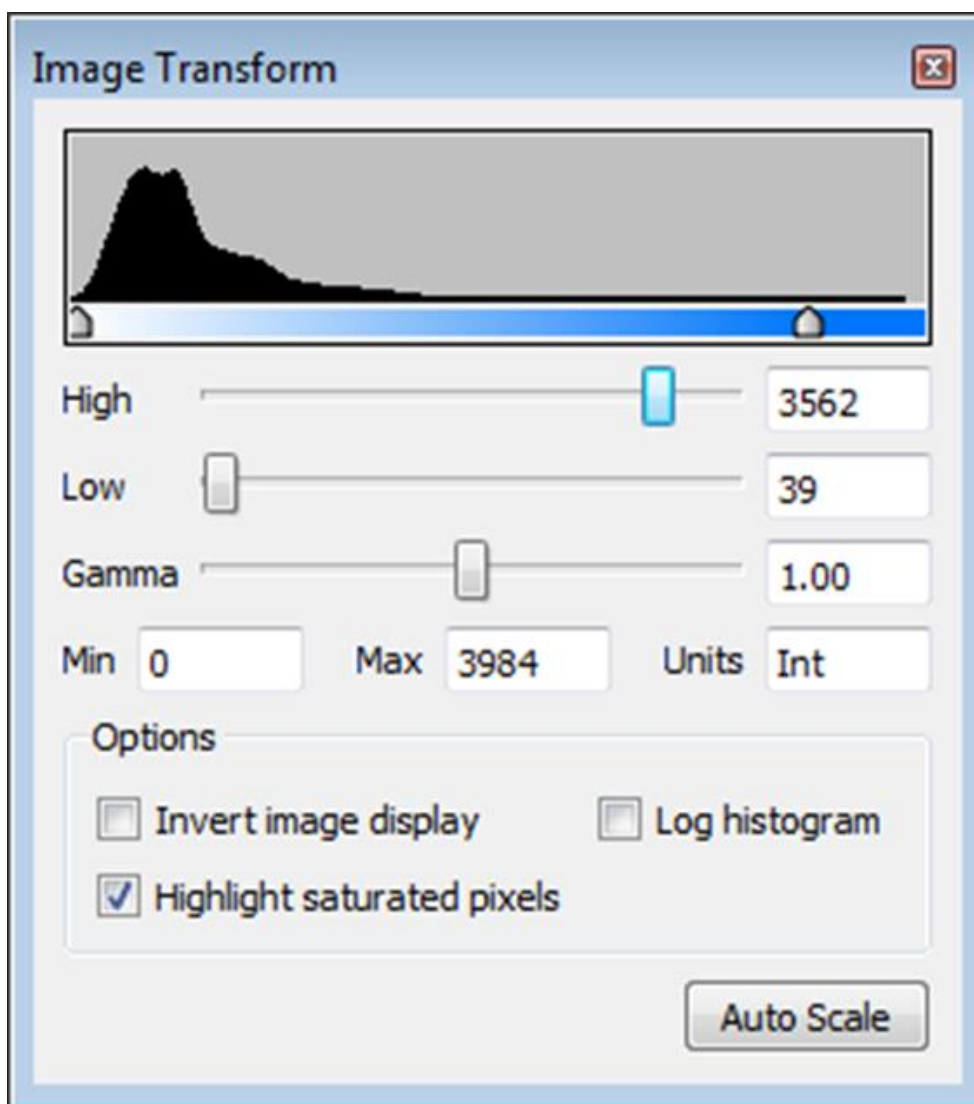


Рисунок 4.3. Окно «Image Transform»

Параметр «Invert image display» инвертирует темных полос на светлом фоне для осветления полос на темном фоне. Светлые полосы на темном фоне инвертируются в темные полосы на светлом фоне. «Highlight saturated pixels» выделяет участки изображения с насыщенной интенсивностью сигнала красным цветом. В многоканальных изображениях можно выделить красным цветом отдельные пиксели в канале. Параметр «Log histogram» изменяет ось ординат на гистограмме, чтобы отобразить число пикселей при каждом значении интенсивности, используя линейную или логарифмическую шкалу.

В диалоговом окне «Image Transform» вы можете изменить настройки для каждого канала в многоканальном изображении. Для этого выберите канал в нижней части диалогового окна и измените настройки для этого канала. При изменении цвета выбранного канала в «Image Transform», его цвет изменяется и в составном изображении (рисунок 4.4).

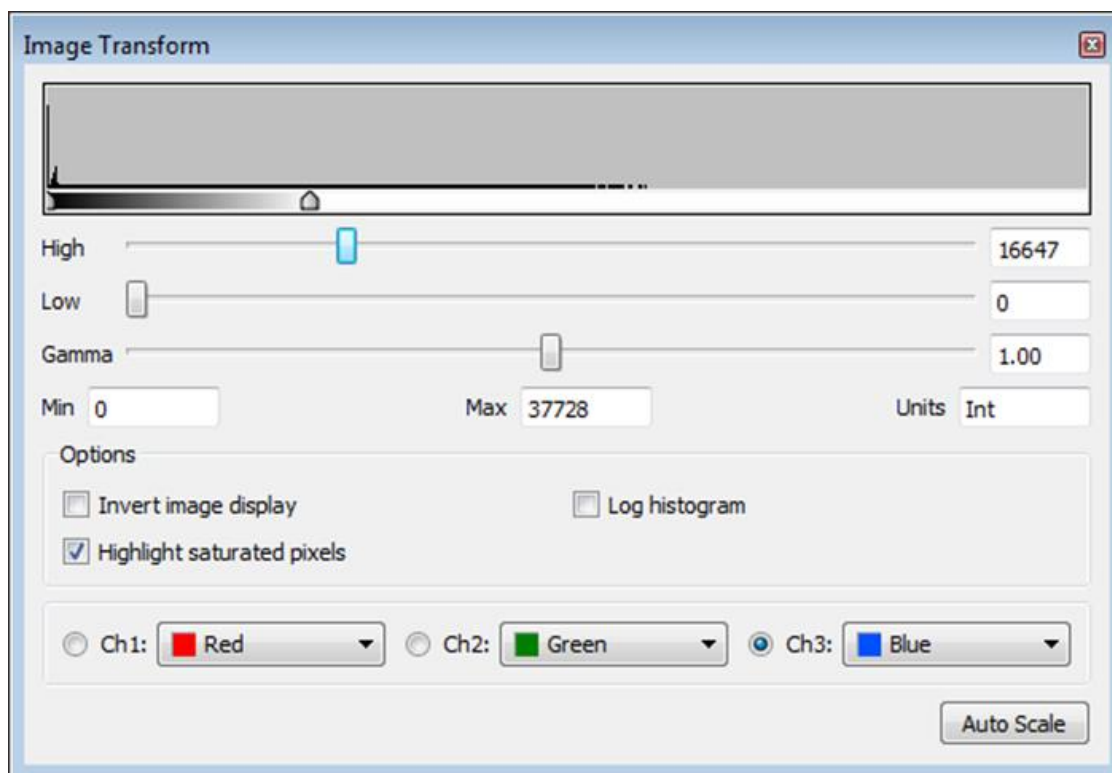


Рисунок 4.4. Изменение цвета канала в окне «Image Transform»

Окно «Image Colors» открывает цветовую карту изображения (рисунок 4.5). Просмотр изображения с разной цветовой гаммой может сделать все элементы в изображении более заметными. В многоканальных снимках можно изменять цвета в отдельных каналах, однако вы не можете изменять цвета в комбинированном изображении. Изменение цвета карты для изображения не изменяет данные. Оно изменяет только способ их отображения.



Рисунок 4.5. Окно «Image Colors»

Преобразование в трехмерную модель

Функция 3D преобразует снимок геля/блота в трехмерную модель. Акцентировать или уменьшить относительные высоты точек данных можно при перемещении ползунка в нижней части окна вправо или влево.

Для просмотра интенсивности различных полос нажмите 3D в «Display Toolbox» над изображением. Изображение появится в 3D (рисунок 4.6). Нажмите на полученную модель, чтобы повернуть ее с нужной стороны.

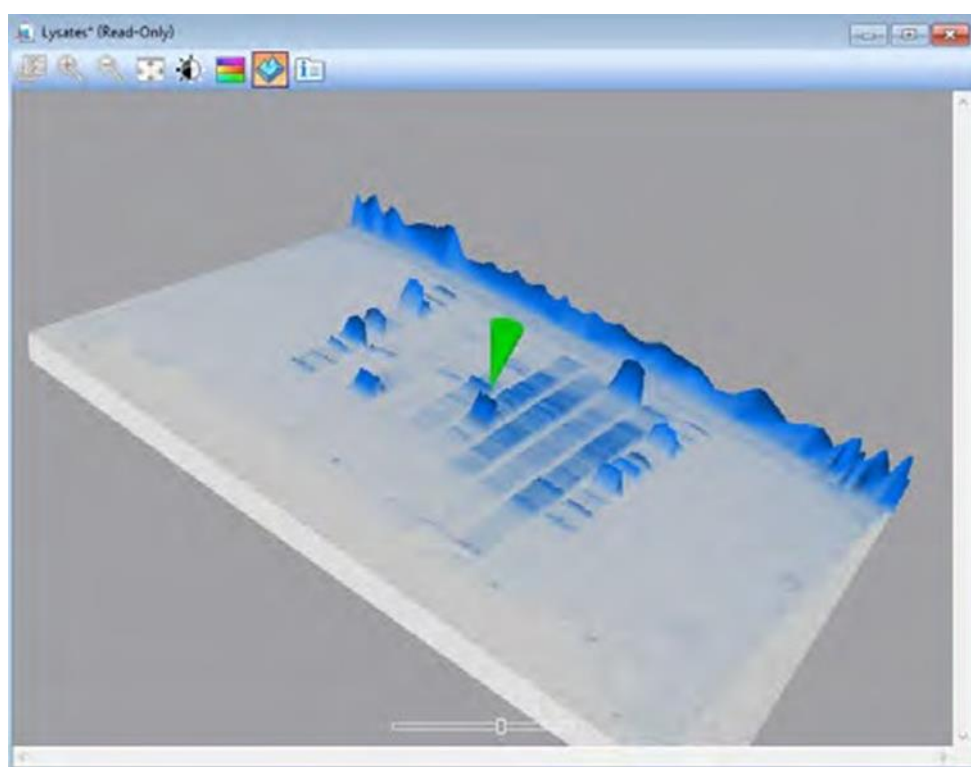


Рисунок 4.6. Трехмерная модель снимка геля

Для оценки интенсивности различных полос на клавиатуре нажмите клавишу С. Щелкните по интересующему участку. Значение интенсивности в месте нажатия появляется в правом углу строки состояния. Для того, чтобы оценить интенсивность различных полос, нажмите С на клавиатуре. На трехмерном изображении будет отображаться перевернутый зеленый конус.

Информация об изображении

Диалоговое окно «Image Info» сообщает информацию об активном изображении. Чтобы получить к ней доступ нажмите соответствующий значок в панели инструментов над изображением. Появится диалоговое окно «Image Info» (рисунок 4.7).

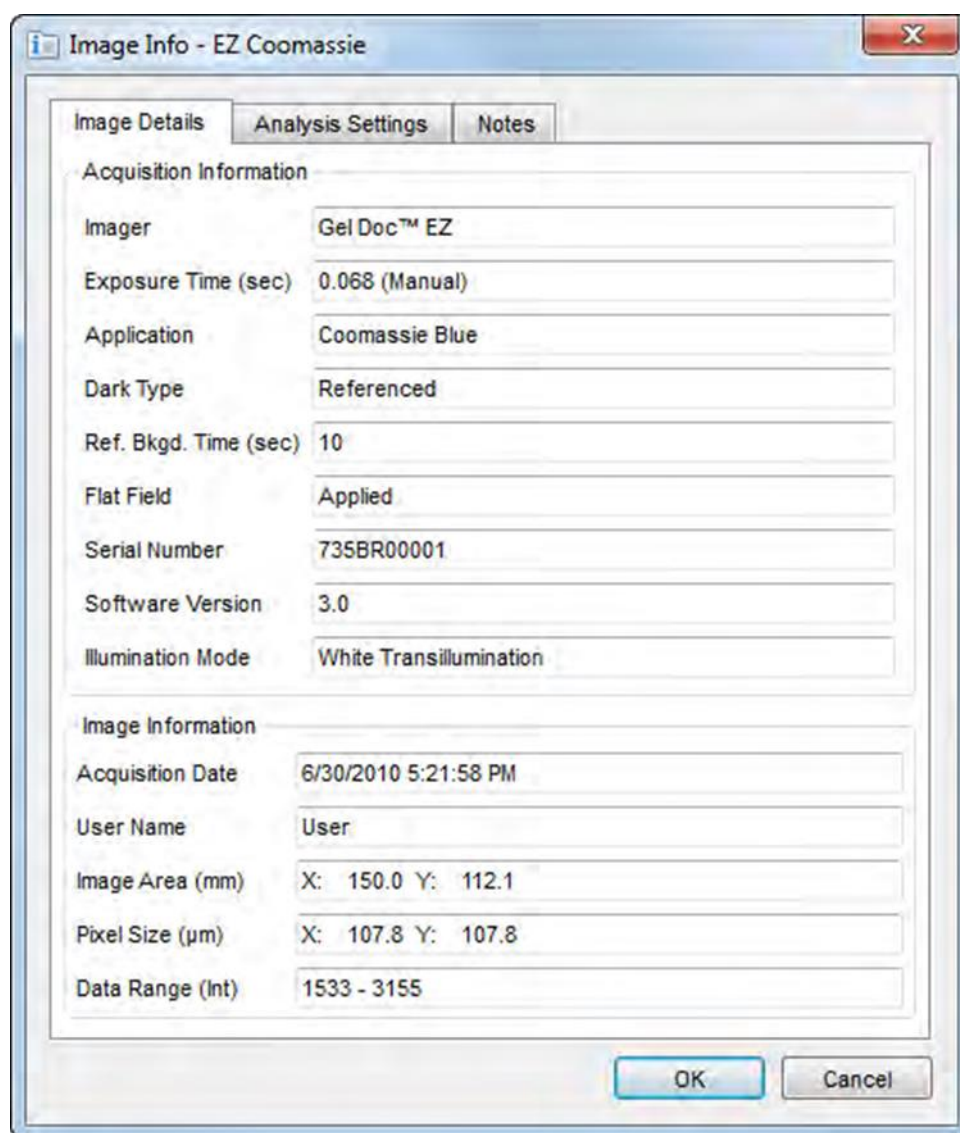


Рисунок 4.7. Окно «Image Info»

Отображение многоканальных изображений

Многоканальный вид отображает все каналы в файле изображения, а также изображение каждого канала. Имя многоканального изображения появляется в строке заголовка композита. Имя приложения отображается в строке заголовка каждого канала изображения. Желтое обрамление окружает активное изображение (рисунок 4.8).

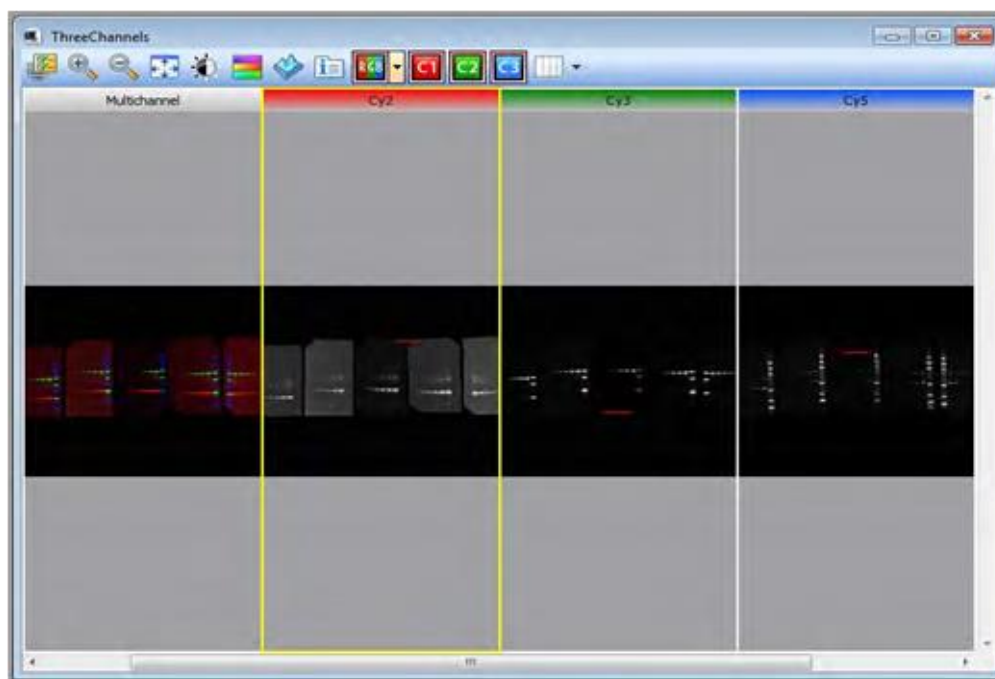


Рисунок 4.8. Отображение многоканальных изображений

Окно «Display Toolbox» открывает доступ к многоканальным настройкам. Эти параметры позволяют просматривать многоканальное изображение в цвете или в оттенках серого, показать или скрыть каналы в многоканального или комбинированного изображения, изменить расположение дисплея. Чтобы отобразить или скрыть канал, изменить цвет в многоканальном изображении, в «Display Toolbox» нажмите на пронумерованный канал (C1, C2, C3) (рисунок 4.9).



Рисунок 4.9. Нумерация каналов в Display Toolbox

Нажатие или снятие галочки позволит настроить отображение каналов (рисунок 4.10).

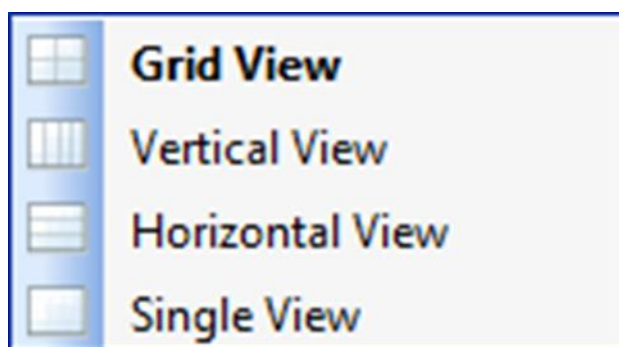


Рисунок 4.10. Макеты отображения снимков

Вы можете просматривать многоканальные изображения в четырех различных режимах просмотра. Чтобы выбрать вид дисплея, щелкните значок изменения макета «Change Layout icon» на панели отображения инструментов «Display Toolbox», расположенной над изображением. Появится список видов компоновки, где нужно будет выбрать нужный вам вид. По умолчанию многоканальные изображения отображаются в виде сетки.

Вы можете разделить многоканальное изображение на отдельные файлы изображений. Когда вы разделяете многоканальное изображение, Image Lab создает новый файл для каждого канала, кроме канала RGB. Каждый новый файл имеет то же имя, что и многоканальное изображение, плюс имя приложения в

круглых скобках. Все настройки сбора данных и наложения копируются в новые файлы. Чтобы разделить многоканальное изображение на отдельные файлы, откройте многоканальное изображение и в меню "File" выберите функцию разделения многоканального изображения "Split Multichannel Image".

Каждый канал, кроме канала RGB, отображается в отдельном окне. Изображение первого канала появится в рабочей области. Сохраните изображение канала как новый файл. Чтобы просмотреть изображение другого канала, выберите его в меню «Windows». Наконец, сохраните изображение каждого канала в отдельном файле.

Вы можете создать несвязанное многоканальное изображение из полученных одиночных изображений или из одиночных каналов в многоканальном изображении, открытых в программном обеспечении Image Lab. Важно помнить, что в многоканальном изображении можно объединить только изображения с одинаковым соотношением сторон. Поскольку изображения не связаны, вы вносите изменения в одно изображение и не влияете на другие.

Тип многоканального изображения отличается от многоканального изображения, которое создается во время получения с помощью формирователя изображения с возможностью многоканального просмотра. Любой сканер может получать отдельные изображения, которые можно объединить с помощью параметра создания многоканального изображения «Create a Multichannel Image» в Image Lab.

Чтобы создать многоканальное изображение из одиночных изображений откройте отдельные изображения, из которых вы хотите создать многоканальное изображение. В меню «File» выберите «Create Multichannel Image». Список открытых изображений появится в соответствующем диалоговом окне. Перетащите каждое изображение в поле канала на правой панели. После выбора первого файла из списка доступных открытых изображений «Available Open Images», у вас будут отображаться только файлы с таким же соотношением

сторон. Далее щелкните ОК, чтобы сохранить многоканальное изображение.

Чтобы заменить канал в многоканальном изображении, откройте многоканальное изображение и новое изображение, которое вы хотите использовать. В меню «File» выберите «Create Multichannel Image». Открытые файлы изображений появятся в списке совместимых открытых изображений «Compatible Open Images». Перетащите изображения, которые вы хотите сохранить, из списка доступных открытых изображений «Available Open Images» (левая панель) в каналы на панели нового многоканального изображения «New Multichannel Image» (правая панель). Перетащите новое изображение, которое вы хотите использовать, в одно из доступных окон каналов. Щелкните ОК, чтобы сохранить новое многоканальное изображение.

Нормализация данных

Вы можете обнаружить полосы в многоканальном изображении автоматически или вручную. Если многоканальное изображение состоит из несвязанных изображений, убедитесь, что обнаруженные полосы правильно отображаются для каждого канала. Вы можете скопировать полосы в одном канале на карту полосы движения в другом канале (рисунок 4.11).

Обнаружение полос в каналах Lane Finder можно выполнить автоматически или вручную (рисунок 4.12).

На рисунке 4.13 полосы были обнаружены автоматически. Некоторые из полос движения исключают материал, который должен быть включен. Также Image Lab автоматически исключает пробелы между полосами.

Полосы на изображении могут быть исправлены автоматически или вручную (рисунок 4.14).

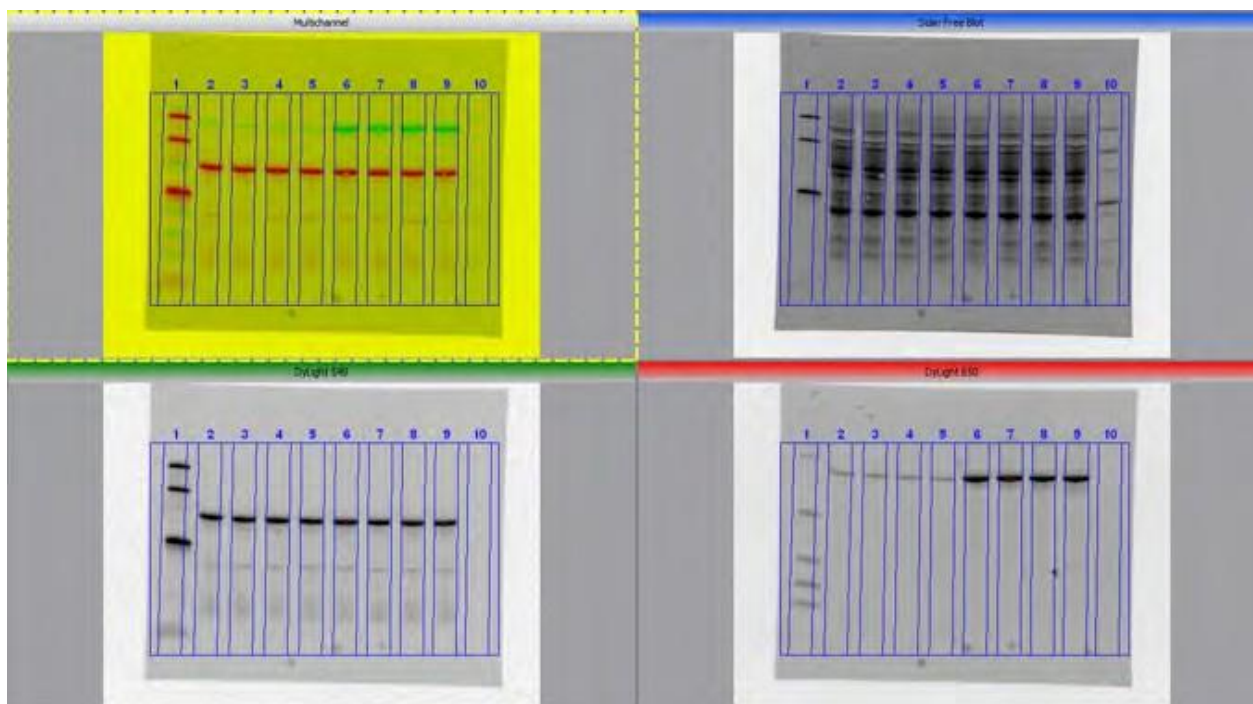


Рисунок 4.11. Нормализация многоканального изображения



Рисунок 4.12. Панель «Lane Finder»

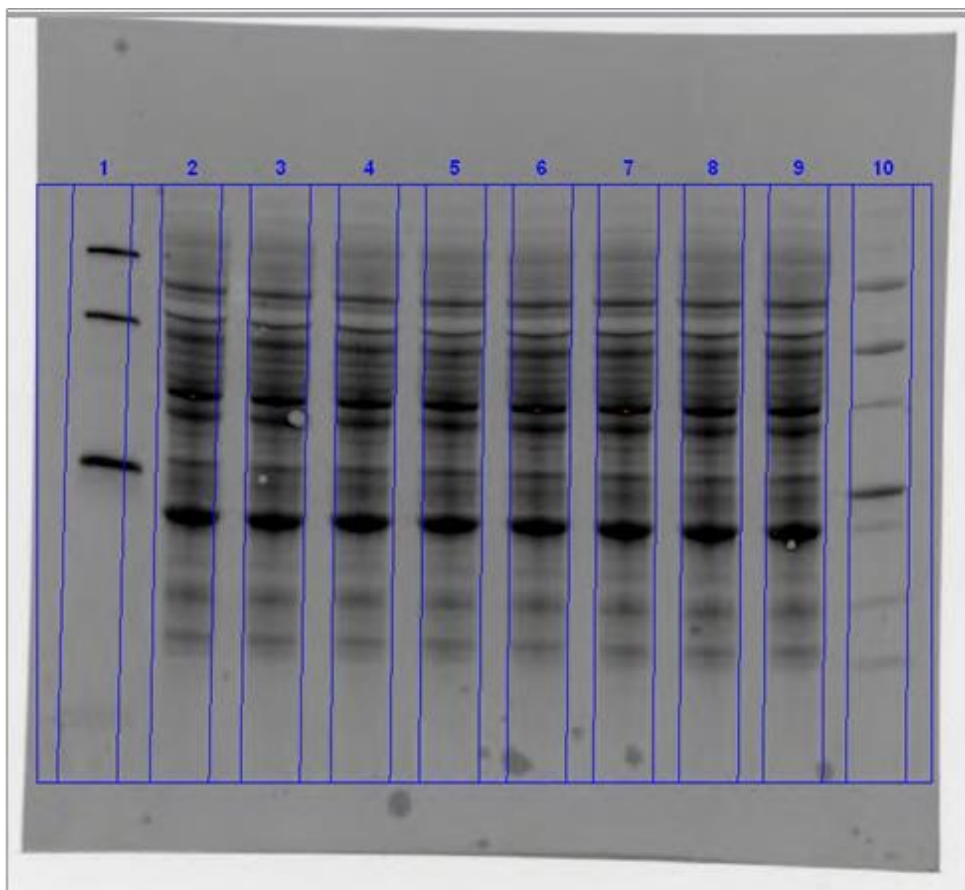


Рисунок 4.13. Автоматическое обнаружение полос в многоканальном изображении

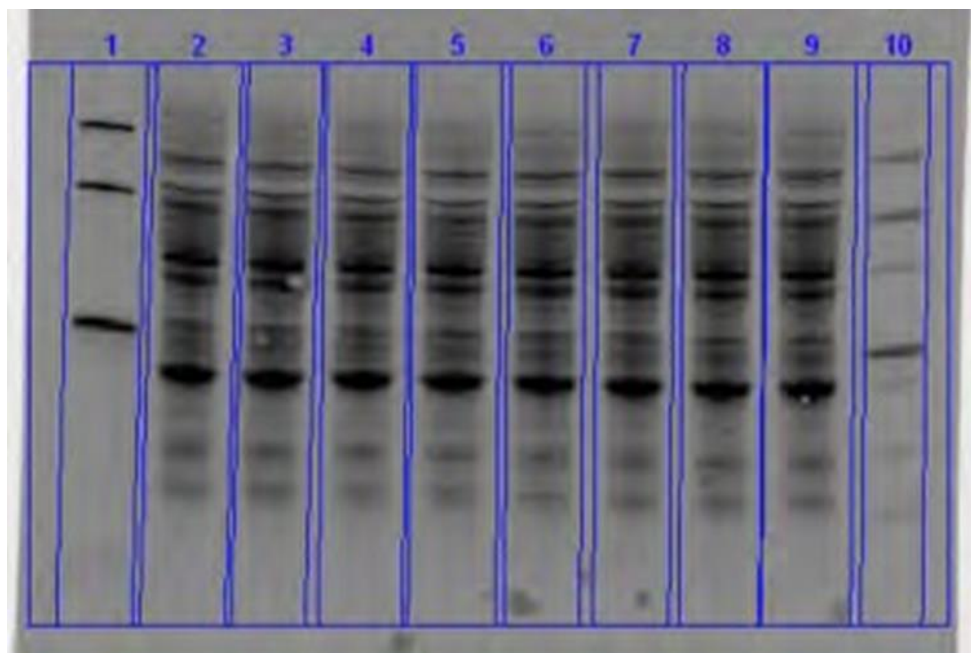


Рисунок 4.14. Исправление положения полос в многоканальном изображении

Обнаружение полос движения в каналах

Настройки на вкладке диапазона позволяют обнаружить полосы в каналах изображения. Обнаружение полосы на канале нормализации не рекомендуется при выборе общей нормализации полосы белка. Обнаружение полос с помощью этого метода нормализации генерирует большое количество избыточных данных в таблице анализа. Для того, чтобы исключить все другие группы белков из расчета, нажмите кнопку удаления во вкладке групп. Удаление полос и постороннего фона возможно автоматически и вручную (рисунок 4.15). Первые полосы в выбранном канале используется в качестве коэффициента нормализации, против которого все остальные полосы во всех каналах будут сравниваться.

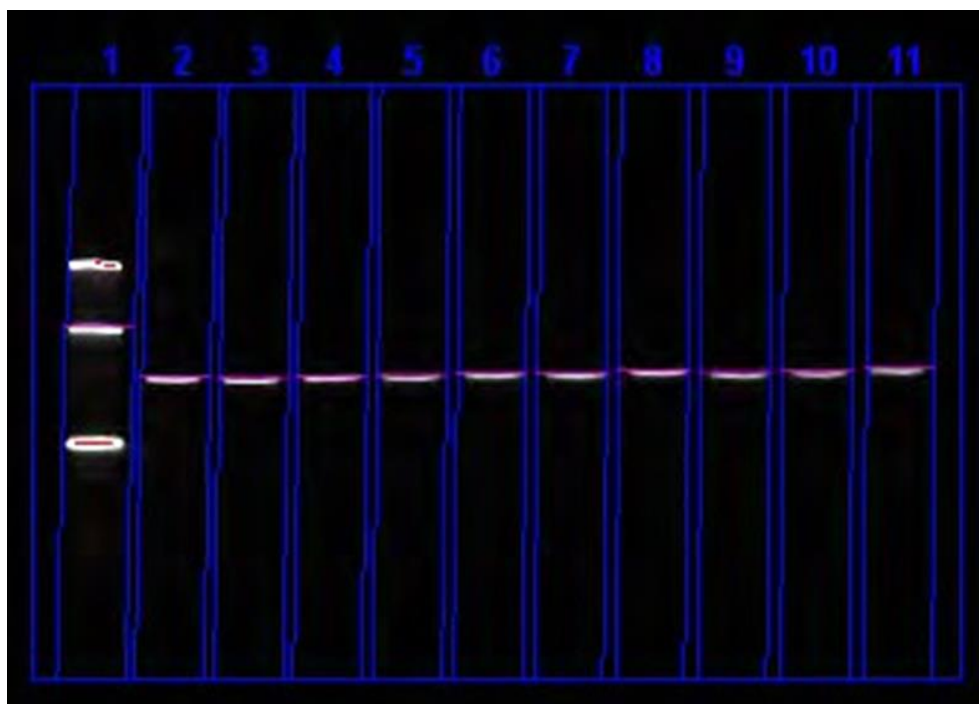


Рисунок 4.15. Автоматическое обнаружение полос в многоканальном изображении

Ее можно удалить из канала или выбрать другую полосу.

Дорожки могут содержать насыщенные пиксели. Необходимо проверить изображения на насыщенные пиксели, указанные в красном цвете (рисунок 4.16). Эти точки не могут быть считаны и не могут быть использованы в количественной оценке. Если качество передачи изображения плохое (пятнистые или размытые области), то нужно удалить полосы.

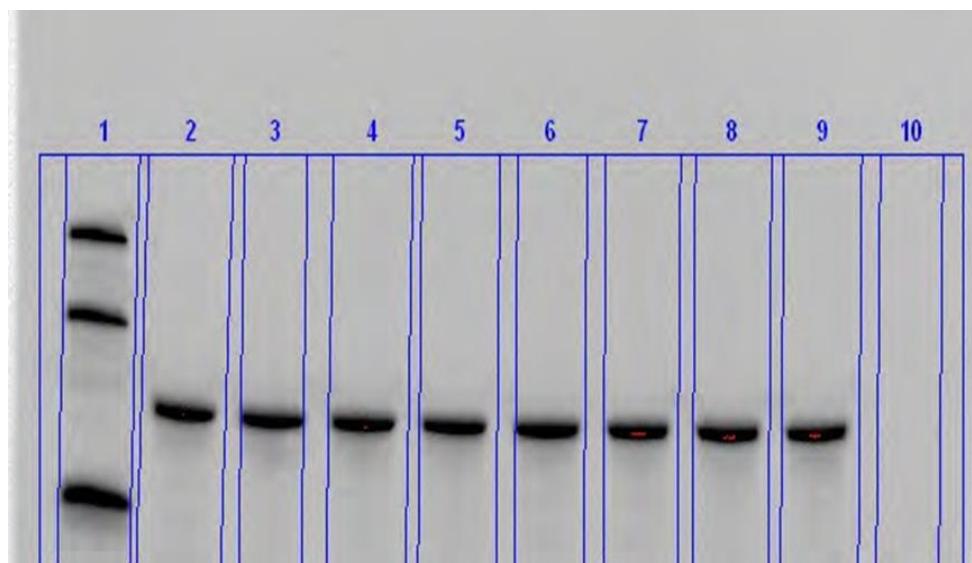


Рисунок 4.16. Изображения с насыщенными пикселями, указанные в красном цвете

Свойства инструмента «Таблица анализа»

Таблица анализа «Analysis Table» это инструмент, который появляется в разделе данных результатов «Results Data» на главной панели инструментов. Таблица анализа отображает данные для выбранного изображения в таблицах результатов, которые отображаются на трех вкладках. В таблице дорожек и полос «Lane and Band Table» отображаются объемы дорожек и полос, отсортированные по номерам дорожек. Для многоканального изображения

таблица отображает данные для каждого канала в его цвете канала.

В столбцах измерения дорожек и полос «Lane and Band Measurement Columns» отображаются следующие элементы:

- Канал «Channel» - канал, содержащий уровень.
- Дорожка «Lane» - номер полосы, на которой находится банд.
- Номер банды «Band No.» - номер банды в полосе.
- Метка полосы «Band Label» - назначение настраиваемой метки для каждой полосы.

- Молекулярная масса «Molecular Weight» - молекулярная масса полосы, рассчитанная на основе стандартного и регрессионного методов. Значения, написанные курсивом, обозначают экстраполированные значения. Для гелей нуклеиновых кислот полоса с размером банды появляется в парах оснований.

- Приложенный уровень «Adj. Volume» - уровень с вычтенным фоном.
- Уровень «Volume» - сумма всех интенсивностей в уровне.
- «Abs. Quant.» - абсолютная количественная оценка диапазона.
- «Rel. Quant.» - относительная количественная оценка диапазона по сравнению с эталонным диапазоном.

Отображение данных в таблице анализа

% банды «Band%» - процент объема банды по сравнению со всеми уровнями всех бандов в полосе/дорожке.

% полосы «Lane %» - процент объема банды по сравнению со всем уровнем полосы.

Нормализованный фактор «Norm. Factor» - поправочный коэффициент для полосы, содержащей банд.

Нормализованный уровень «Norm. Vol. (Int)» - скорректированный уровень с поправкой на коэффициент нормализации.

В таблице уровней «Volume Table» отображаются значения анализа объема, полученные произвольно, то есть немного более ручным способом, чем в автоматическом анализе. Можно выбрать большее разнообразие форм. Объемный анализ также включает два способа управления фоном, отличные от тех, которые используются при анализе дорожек и бандов.

Обозначения в графе измерений объема колонны

Номер уровня «Volume Number» - уникальный номер, присвоенный каждому уровню.

Пометка уровня «Volume Label» - ярлыки, созданные программным обеспечением для разных типов объемов. (U - неизвестно, B - фон, S - стандарт). Вы также можете изменить метки в свойствах тома.

Уровень «Volume» - сумма всех интенсивностей в границах полосы.

Скорректированный уровень «Adjusted Volume» - интенсивность уровня с регулировкой фона.

Усредненный фон «Mean Background» - средняя интенсивность фона полосы.

Абсолютное количественное значение уровня «Absolute Quantity Volume» - количественный показатель уровня, основанный на стандартных уровнях и регрессионном методе оценке интенсивности.

Относительное количественное значение уровня «Relative Quantity Volume» - отношение полосы к контрольному объему.

Пиксели «Pixels» - количество пикселей в уровне.

Минимальное значение «Minimum Value» - минимальное значение пикселя в уровне.

Максимальное значение «Maximum Value» - максимальное значение пикселей в уровне.

Среднее значение «Mean Value» - среднее значение всех значений пикселей в уровне.

Стандартное отклонение «Standard Deviation» - стандартное отклонение всех значений пикселей в уровне.

Площадь «Area» - площадь объема в квадратных миллиметрах.

Просмотр данных в таблицах анализа

Первая нестандартная полоса в выбранном канале используется в качестве коэффициента нормализации, против которого все остальные полосы во всех каналах сравниваются. Значения нормализации рассчитывается на основе общей фоновой коррекции сигнала в выбранном канале. В таблице анализа показаны нескорректированные и нормализованные объемы, а также коэффициент нормализации, используемый для вычисления нормализованного объема. Вкладка Статистика показывает подробные данные полосы (рисунок 4.17).

Channel	Lane No.	Adj. Total Band Vol. (Int)	Total Band Vol. (Int)	Adj. Total Lane Vol. (Int)	Total Lane Vol. (Int)	Bkgd. Vol. (Int)	Norm. Factor
Colorimetric	1	55,629,000	78,044,925	69,035,250	143,317,800	74,282,550	1.000
Colorimetric	2	115,071,975	148,996,050	141,824,025	206,041,650	64,217,625	0.487
Colorimetric	3	113,952,825	145,636,425	143,851,350	207,537,525	63,686,175	0.480
Colorimetric	4	78,335,250	106,958,100	102,738,900	164,657,775	61,918,875	0.672
Colorimetric	5	81,327,300	110,054,775	106,342,350	169,253,325	62,910,975	0.649
Colorimetric	6	80,115,075	108,952,500	104,782,125	167,759,700	62,977,575	0.659
Colorimetric	7	60,177,525	86,039,625	81,262,350	143,757,600	62,495,250	0.850
Colorimetric	8	59,203,575	84,586,425	80,746,725	142,268,100	61,521,375	0.855
Colorimetric	9	58,277,850	83,812,650	78,707,775	139,701,150	60,993,375	0.877
Colorimetric	10	56,073,825	75,223,350	73,884,975	137,772,525	63,887,550	0.934

Рисунок 4.17. Просмотр данных в таблицах анализа

Добавить канал в одно изображение можно через настройки. Нормализация может быть использована только для многоканальных изображений, но вы можете добавить канал в одно изображение с помощью параметра нормализации. Изображения в многоканальном изображении должны иметь такое же соотношение сторон. Изображения, созданные с использованием различных систем формирования изображений, а также обрезанное изображение не может иметь тот же формат, что и первое изображение. Здесь поможет функция проверки пропорции каждого изображения в дополнительной вкладке настроек. Изображения с соотношением сторон, отличающимся от первого изображения, не отображаются в списке совместимых открытых изображений.

Инструменты анализа позволяют определить молекулярную массу (или пар оснований, при использовании гелей нуклеиновых кислот) путем сравнения испытуемого образца с известными стандартами молекулярного веса (рисунок 4.18).

Lane 1 - Precision Plus								
Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250.0	0.096	177,345	N/A	N/A	6.1	5.3
2		150.0	0.195	155,799	N/A	N/A	5.4	4.6
3		100.0	0.290	149,184	N/A	N/A	5.2	4.4
4		75.0	0.367	543,501	N/A	N/A	18.8	16.1
5		50.0	0.480	593,271	N/A	N/A	20.5	17.6
6		37.0	0.567	215,145	N/A	N/A	7.4	6.4
7		25.0	0.694	556,416	N/A	N/A	19.2	16.5
8		20.0	0.743	173,250	N/A	N/A	6.0	5.1
9		15.0	0.831	148,239	N/A	N/A	5.1	4.4
10		10.0	0.913	181,062	N/A	N/A	6.3	5.4

Рисунок 4.18. Просмотр данных молекулярного веса в таблицах анализа

Вопросы для самоконтроля

- 1). В зависимости от чего варьируются значения минимального и максимального диапазона в изображении?
- 2). Что показывают гистограммы распределения частот?
- 3). Какой параметр изменяет ось ординат на гистограмме? Что используется для отображения числа пикселей при каждом значении интенсивности?
- 4). Может ли многоканальное изображение состоять из несвязанных изображений? Для чего служат первые полосы и что такое коэффициент нормализации?
- 5). Что такое насыщенные пиксели в снимке блота или геля?
- 6). Что делать, если качество передачи изображения плохое (пятнистые или размытые области)?
- 7). На основе чего рассчитывается молекулярная масса полосы?
- 8). В чем программа измеряет размер банды для гелей нуклеиновых кислот?
- 9). Что такое абсолютное количественное значение уровня? На основе чего рассчитываются значения нормализации в выбранном канале?
- 10). Что нужно сделать при работе с многоканальными изображениями, у которых первоначальные снимки имеют разное соотношение сторон? Какая функция помогает в решении данной проблемы?

ГЛАВА 5. СОЗДАНИЕ ОТЧЕТОВ И ЭКСПОРТ РЕЗУЛЬТАТОВ

После просмотра результатов вы можете создать отчет, в котором будут отображаться проанализированные изображения гелей, все настройки, используемые в протоколе, и столько информации о данных, сколько вы хотите включить. Вы можете выбрать параметры печати в диалоговом окне параметров отчета «Report Settings» в меню правки «Edit» или выбрав вкладку для создания отчета «Report» на главной панели инструментов.

Наиболее удобный способ архивирования полной информации об экспериментах – это создание отчетов. Можно экспортировать изображения гелей или данные таблиц анализа для анализа в других программах, например Quantity One и ImageJ. Также можно экспортировать файлы для презентации или публикации.

Экспорт изображений гелей

При экспорте изображений геля вы можете выбрать вариант, соответствующий вашим целям:

- Экспорт отображаемых данных изображения в публикацию (Экспорт для публикации «Export for Publication»);
- Экспорт необработанных данных изображения в виде 16-битного файла формата «.tif» (Экспорт для анализа «Export for Analysis»);
- Экспорт данных изображения в PulseNet. Это уменьшает изображение «.tif» до 8-бит, ограничивая его разрешение и размер файла до 300 Кб;
- Экспорт таблиц бандов и полос, а также таблиц в программу для работы с электронными таблицами.

Чтобы выбрать вариант экспорта в меню «File» щелкните «Export» и выберите параметр в контекстном меню (рисунок 5.1).

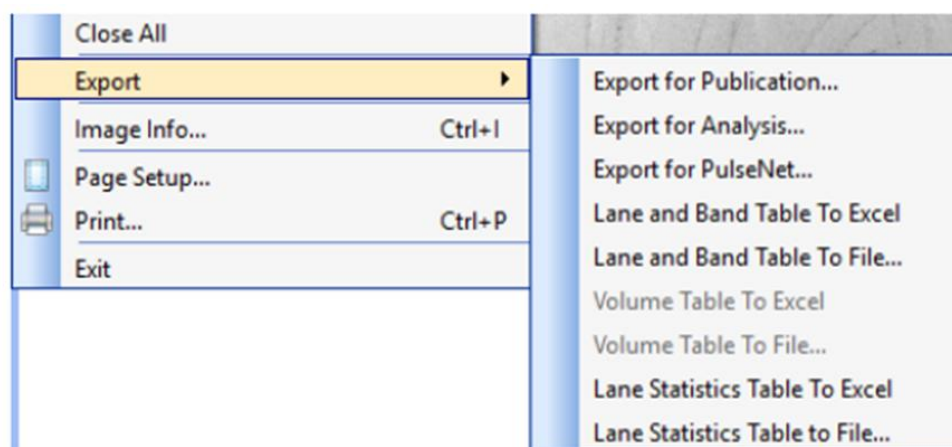


Рисунок 5.1. Экспорт изображений

Экспорт изображений гелей для публикации

Выбирайте этот вариант экспорта, только если вы хотите экспортировать визуальную информацию в презентацию или публикацию для обработки в программном обеспечении, таком как PowerPoint или Word. Вы можете выбрать форматы «.bmp», «.png», «.jpg» или «.tif». Гель отображается с бандами, полосами и аннотациями.

Для многоканальных изображений программа Image Lab экспортирует активный канал в многоканальное изображение. Нужно выбрать канал, который вы хотите опубликовать перед экспортом изображения. Перед экспортом вы можете увеличить область в текущем виде и экспортировать только эту область или экспортировать все изображение (рисунок 5.2).

Вы можете исключить аннотации или наложения, отобразив параметры геля при нажатии «Display Gel Options» на панели инструментов «Display Toolbox», чтобы осуществить доступ к соответствующим настройкам (рисунок 5.3).

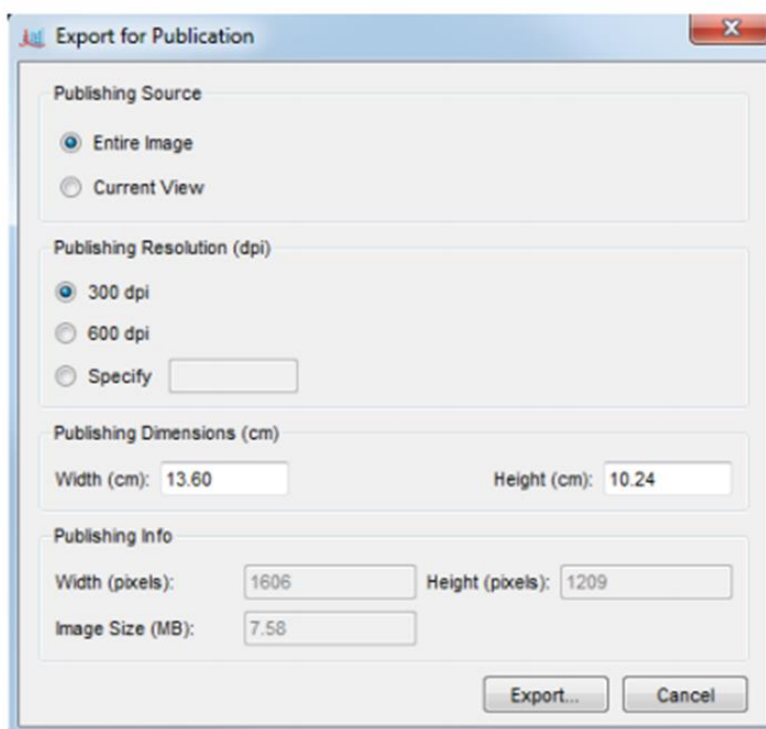


Рисунок 5.2. Экспорт изображения в файл

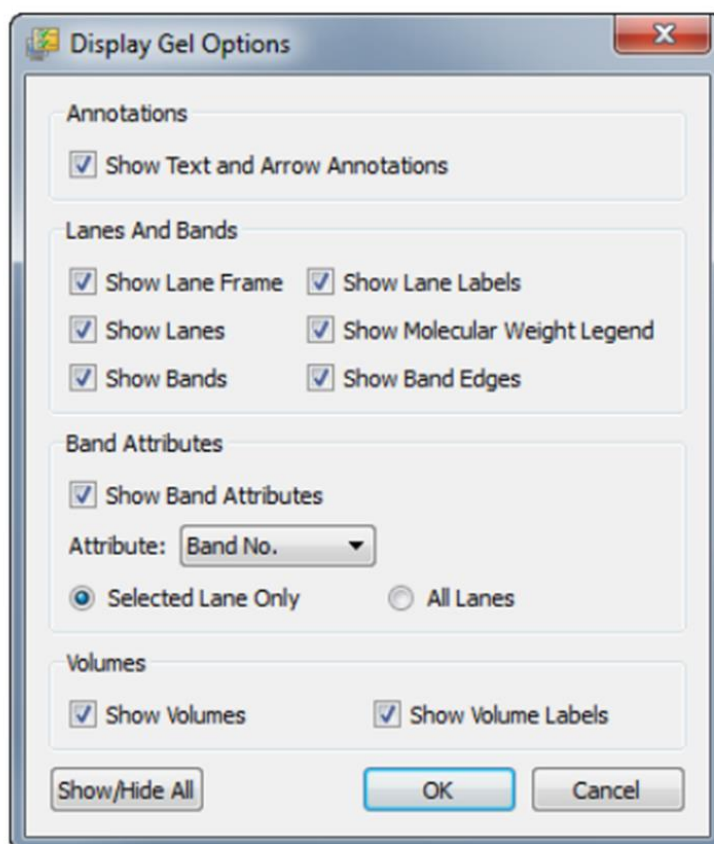


Рисунок 5.3. Отображение параметров геля при экспорте

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

- ГОСТ 12.0.003-2015 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Опасные и вредные производственные факторы. Классификация (с Поправкой).
- ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (с Изменением N 1).
- ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1, 2).
- ГОСТ 12.1.008-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Биологическая безопасность. Общие требования.
- ГОСТ 12.1.009-2017 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Термины и определения (с Поправкой).
- ГОСТ 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты (с Поправкой).
- ГОСТ 12.2.003-91 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Оборудование производственное. Общие требования безопасности.
- ГОСТ 12.2.032-78 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования.
- ГОСТ 12.2.049-80 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Оборудование производственное. Общие эргономические требования.
- ГОСТ 12.4.001-80 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Очки защитные. Термины и определения.
- ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства защиты работающих. Общие требования и классификация.

ГОСТ 12.4.103-83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация.

ГОСТ 12.4.103-2020 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация (вступает в силу 01 октября 2022).

ГОСТ 12.4.113-82 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Работы учебные лабораторные. Общие требования безопасности.

ГОСТ 61-75 (СТ СЭВ 5375-85) Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3).

ГОСТ 450-77 Кальций хлористый технический. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3).

ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия (с Изменениями N 1-10).

ГОСТ 2603-79 Реактивы. Ацетон. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3).

ГОСТ 3118-77 (СТ СЭВ 4276-83) Реактивы. Кислота соляная. Технические условия (с Изменением N 1).

ГОСТ 31475-2012 Мясо и мясные продукты. Определение массовой доли растительного (соевого) белка методом электрофореза.

ГОСТ 3769-78 Аммоний серноокислый. Технические условия (с Изменением N 1, Поправкой).

ГОСТ 5860-75 (СТ СЭВ 1753-79) Реактивы. Кислота аминоксусная. Технические условия (с Изменениями N 1, 2).

ГОСТ 5867-90 Молоко и молочные продукты. Методы определения жира.

ГОСТ 5962-2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия.

ГОСТ 6259-75 Глицерин. Технические условия (с Изменениями N 1, 2).

ГОСТ 6691-77 Карбамид. Технические условия (с Изменениями N 1, 2).

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия (с Изменениями N 1, 2).

ГОСТ 7730-89 Пленка целлюлозная. Технические условия (с Изменением N 1).

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3).

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3, 4).

ГОСТ 13928-84 Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу (с Изменением N 1).

ГОСТ 14919-83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия (с Изменениями N 1-7).

ГОСТ 16317-87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3).

ГОСТ 20478-75 Аммоний надсернистый. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3).

ГОСТ 23932-90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия.

ГОСТ 25011-2017 Мясо и мясные продукты. Методы определения белка.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры (с Изменениями N 1-4).

ГОСТ 25794.1-83 Реактивы. Методы приготовления титрованных растворов для кислотно-основного титрования (с Изменением N 1).

ГОСТ 26809.1-2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты (с Поправкой).

ГОСТ 27752-88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия (с Изменением N 1).

ГОСТ 28498-90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний (Переиздание).

ГОСТ 29169-91 (ИСО 648-77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой.

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования (Переиздание).

ГОСТ 29230-91 (ИСО 835-4-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные.

ГОСТ Р 52054-2003 Молоко коровье сырое. Технические условия (с Изменениями N 1, 2).

ГОСТ Р 52349-2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением N 1).

ГОСТ Р 52738-2007 Молоко и продукты переработки молока. Термины и определения (Издание с Изменением N 1).

ГОСТ Р 53228-2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания (с Изменением N 1).

ГОСТ Р 53761-2009 Молоко. Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле (Переиздание).

ГОСТ Р 54414-2011 Рыба и продукция из нее. Видовая идентификация рыбы методом электрофореза с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле.

ГОСТ Р 58144-2018 Вода дистиллированная. Технические условия (вступает в силу 01 июля 2021).

ГОСТ Р 59123-2020 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства индивидуальной защиты. Общие требования и классификация (вступает в силу 01 октября 2021).

ГОСТ Р ИСО 13688-2016 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Одежда специальная защитная. Общие технические требования.

- ГОСТ Р ИСО 16602-2010 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Одежда специальная для защиты от химических веществ. Классификация, маркировка и эксплуатационные требования (Переиздание) (прекращает действие 01 сентября 2020).
- ГОСТ ISO 374-5-2020 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства индивидуальной защиты рук. Перчатки для защиты от химических веществ и микроорганизмов. Часть 5. Терминология и требования к эксплуатационным характеристикам перчаток для защиты от микроорганизмов (вступает в силу 01 октября 2021).
- ГОСТ ISO 4007-2016 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства индивидуальной защиты глаз и лица. Словарь.
- ГОСТ ISO 7218-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям.
- ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий (Переиздание).
- MP 1.2.0053-11 Оценка воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы в тестах на лабораторных животных.
- Р 50.2.066-2009 ГСИ. Анализаторы иммуноферментные. Методика поверки.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамова, З.И. Исследование белков и нуклеиновых кислот: Учебное пособие / З.И. Абрамова. – Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2006. – 157 с.
- Алимов, А.М. Биохимия в вопросах и ответах / А.М. Алимов, А.М. Галиева, Л.А. Закирова. – Казань: КГАВМ им. Баумана, 2016. – 96 с.
- Анисимова, И.Н. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле: методические указания / Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Абдуллаев Р.А., и др. – СПб.: ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, 2018. – 47 с.
- Баушева, Н.П. Лабораторный практикум по дисциплине «Биологическая химия»: учебное пособие / Н.П. Баушева. – Ярославль: Ярославская ГСХА, 2016. – 106 с.
- Беккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Беккер. – М.: Техносфера, 2009. – 472 с.
- Белан, Э.Б. Лабораторные методы оценки гуморального звена иммунитета: учебно-методическое пособие / Э.Б. Белан, С.А. Осипов, Т.Л. Садчикова. – Волгоград: ВолгГМУ, 2019. – 72 с.
- Васильева, С.В. Клиническая биохимия крупного рогатого скота: учебное пособие / С.В. Васильева, Ю.В. Конопатов. – 2-е изд., испр. – Санкт-Петербург: Лань, 2017. – 188 с.
- Жуков, М.Ю. Математическое моделирование процессов электрофореза / М.Ю. Жуков, Е.В. Ширяева, Н.М. Полякова. – Ростов-на-Дону: Южный федеральный университет, 2019. – 160 с.
- Иммунодиагностические реакции: учебное пособие / сост.: Г.К. Давлетшина, З.Г. Габидуллин, А.А. Ахтариева, и др. – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ

- Минздрава России, 2016. – 86с.
- Иммунология: учебно-методическое пособие / А.К. Галиуллин, Ф.М. Нургалиев, П.В. Софронов, А.Ю. Шаева. – Казань: КГАВМ им. Баумана, 2019. – 17 с.
- Кармалиев, Р.С. Ветеринарная токсикология: учебное пособие / Р.С. Кармалиев. – Уральск: ЗКАТУ им. Жангир хана, 2017. – 282 с.
- Карпенко, Л.Ю. Биохимия белка / Л.Ю. Карпенко, С.В. Васильева. – Санкт-Петербург: СПбГАВМ, 2016. – 44 с.
- Кассимерис, Л. Клетки по Льюину / Л. Кассимерис; перевод с английского И.В. Филипповича. – 3-е изд. – Москва: Лаборатория знаний, 2018. – 1059 с.
- Керв, Ю.А. Анализ и регистрация линий, сортов и гибридов кукурузы методом электрофореза зерна: методические указания / Ю.А. Керв, В.В. Сидорова. – СПб.: ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, 2018. – 27 с.
- Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум: учебное пособие / В.Н. Кисленко. – СПб.: Лань, 2012. – 368 с.
- Климов, В.В. Основы иммунологии: учебное пособие / В.В. Климов. – Томск: СибГМУ, 2017. – 169 с.
- Клиническая биохимия в диагностике болезней лошадей: учебно-методическое пособие / Л.Ю. Карпенко, А.А. Бахта, А.И. Козицына, В.В. Крюкова. – Санкт-Петербург: СПбГАВМ, 2019. – 65 с.
- Клиническая эндокринология / Л.Ю. Карпенко, С.В. Васильева, А.А. Бахта [и др.]. – Санкт-Петербург: СПбГАВМ, 2018. – 126 с.
- Ключникова, А.А. Основы протеомики / А.А. Ключникова, К.Г. Кузнецова, А.О. Гончаров, и др. – М.: Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 2018. – 36 с.
- Конопатов, Ю.В. Биохимия животных: учебное пособие / Ю.В. Конопатов, С.В. Васильева. – Санкт-Петербург: Лань, 2015. – 384 с.
- Конопатов, Ю.В. Основы экологической биохимии: учебное пособие / Ю.В. Конопатов, С.В. Васильева. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2018.

– 136 с.

Кутлунина, Н.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учеб.-метод. пособие / Н.А. Кутлунина, А.А. Ермошин; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 142 с.

Лакиза, Н.В. Электрохимические методы анализа. Лабораторный практикум: учеб. пособие для академического бакалавриата / Н.В. Лакиза, Л.К. Неудачина, Е.Л. Лебедева, Ю.С. Петрова. – М.: Юрайт, 2020. – 133 с.

Медицинская биохимия: принципы измерительных технологий в биохимии: учебное пособие / Г.А. Суханова, Л.В. Спирина, Д.И. Кузьменко, О.Е. Акбашева; под редакцией В.Ю. Сереброва. – Томск: СибГМУ, 2018. – 133 с.

Методология научного исследования: учебник / Н.А. Слесаренко, Е.Н. Борхунова, С.М. Борунова [и др.]; под редакцией Н.А. Слесаренко. – 4-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2020. – 268 с.

Методы диагностики болезней сельскохозяйственных животных: учебное пособие / А.П. Курдеко, С.П. Ковалев, В.Н. Алешкевич [и др.]; под редакцией А.П. Курдеко, С.П. Ковалева. – 2-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2020. – 208 с.

Микрюкова, Е.Ю. Учебное пособие по общей, неорганической и аналитической химии: учебное пособие / Е.Ю. Микрюкова. – Казань: КГАВМ им. Баумана, 2020. – 145 с.

Мухамадьярова, А.Л. Инфекционные болезни кошек: диагностика, профилактика и лечение: учебное пособие / А.Л. Мухамадьярова. – Киров: Вятская ГСХА, 2014. – 76 с.

Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: учебное пособие. Том 1: Основы биохимии, строение и катализ / Д. Нельсон, М. Кокс; перевод с английского Т.П. Мосоловой [и др.]. – 4-е изд. – М.: Лаборатория знаний, 2020. – 749 с.

- Никонович, Т.В. Сельскохозяйственная экотоксикология. Лабораторный практикум: учебное пособие для студентов вузов по специальностям «Экология сельского хозяйства», «Ветеринарная медицина», «Зоотехния», «Биология», «Биоэкология», «Радиобиология» / Т.В. Никонович, М.О. Моисеева, М.М. Федоряк. – Минск: ИВЦ Минфина, 2018. – 124 с.
- Основы биологической химии: учебное пособие / Э.В. Горчаков, Б.М. Багамаев, Н.В. Федота, В.А. Оробец. – 2-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2019. – 208 с.
- Основы ветеринарной микробиологии, микологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие / И.В. Савина, Р.М. Нургалиева, О.Л. Карташова, Е.Ю. Исайкина. – Оренбург: Оренбургский ГАУ, 2015. – 253 с.
- Родин, В.В. Биохимия мяса и молока: учебное пособие / В.В. Родин, В.А. Эльгайтаров. – Ставрополь: СтГАУ, 2007. – 120 с.
- Соколова, Н.А. Химия биополимеров: электронное учебно-методическое пособие / Н.А. Соколова, В.Г. Кочетков, О.М. Новопольцева, В.Ф. Каблов. – Волжский: Волгоградский государственный технический университет, 2018. – 127 с.
- Соколова, О.Я. Биохимия сельскохозяйственных животных. Лабораторный практикум: учебное пособие / О.Я. Соколова. – Оренбург: ОГУ, 2014. – 109 с.
- Спиридович, Е.В. Электрокинетические явления: теория и методы: учеб.-метод. пособие / Е.В. Спиридович, Л.В. Гончарова, А.Б. Власова, И.И. Смолич. – Минск: БГУ, 2011. – 63 с.
- Степанов, В.Г. Ветеринарная радиология: учебное пособие / В.Г. Степанов. – СПб.: Лань, 2018. – 348 с.
- Стручкова, И.В. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле / И.В. Стручкова, Е.А. Кальясова: Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 60 с.

- Уилсон, К. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии: учебное пособие / К. Уилсон, Д. Уолкер; под редакцией А.В. Левашова, В.И. Тишкова; перевод с английского Т.П. Мосоловой, Е.Ю. Бозелек-Решетняк. – 2-е изд. (эл.). – М.: Лаборатория знаний, 2015. – 855 с.
- Улащик, В.С. Электрофорез лекарственных веществ: руководство для специалистов: руководство / В.С. Улащик. – Минск: Белорусская наука, 2010. – 404 с.
- Хасаева, Ф.М. Иммунология: методические указания / Ф. М. Хасаева. – Нальчик: Кабардино-Балкарский ГАУ, 2017. – 18 с.
- Шапиро, Я.С. Биологическая химия: учебное пособие / Я.С. Шапиро. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2020. – 312 с.
- Шлейкин, А.Г. Биохимия. Лабораторный практикум: Часть 1. Методические основы и правила работы в лаборатории биохимии: Учеб. пособие / А.Г. Шлейкин, Н.Н. Скворцова, А.Н. Бландов. – СПб.: Университет ИТМО; ИХиБТ, 2015. – 70 с.
- Якупов, Т.Р. Биохимия / Т.Р. Якупов. – Казань: КГАВМ им. Баумана, 2015. – 108 с.
- Якупов, Т.Р. Физико-химические аспекты биологической жизнедеятельности: учебное пособие / Т.Р. Якупов, Г.Н. Зайнашева. – Казань: КГАВМ им. Баумана, 2020. – 47 с.
- Asif M.B., Maqbool T., Zhang Z. Electrochemical membrane bioreactors: State-of-the-art and future prospects // *Sci Total Environ.* 2020. 741: 140233. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140233.
- Balbi T., Auguste M., Ciacci C., Canesi L. Immunological responses of marine bivalves to contaminant exposure: contribution of the -omics approach // *Front Immunol.* 2021. 12: 618726. doi: 10.3389/fimmu.2021.618726.
- Cetecioglu Z., Ince O., Ince B. Gel electrophoresis based genetic fingerprinting techniques on environmental ecology // In: *Gel Electrophoresis – Advanced Techniques.* By S. Magdeldin, IntechOpen. 2012. 51-66. DOI: 10.5772/37063.

- Chiu F.W.Y., Stavrakis S. High-throughput droplet-based microfluidics for directed evolution of enzymes // *Electrophoresis*. 2019. 40(21): 2860-2872. doi: 10.1002/elps.201900222.
- Duerr J.S. Immunohistochemistry // *WormBook*. 2006: 1-61. doi: 10.1895/wormbook.1.105.1.
- El-Sabrouit K., Aggag S., Souza J.B.F. Jr. Some recent applications of rabbit biotechnology – a review // *Anim Biotechnol*. 2020. 31(1): 76-80. doi: 10.1080/10495398.2018.1539005.
- Fratamico P.M., DebRoy C., Liu Y., et al. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli* // *Front Microbiol*. 2016. 7: 644. doi: 10.3389/fmicb.2016.00644.
- Gebreyes W.A., Jackwood D., de Oliveira C.J.B., et al. Molecular epidemiology of infectious zoonotic and livestock diseases // *Microbiol Spectr*. 2020. 8(2). doi: 10.1128/microbiolspec.AME-0011-2019.
- Ghudasara P., Sadowski P., Satake N., et al. Clinical veterinary proteomics: Techniques and approaches to decipher the animal plasma proteome // *Vet J*. 2017. 230: 6-12. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.10.022.
- Gorr T.A., Vogel J. Western blotting revisited: critical perusal of underappreciated technical issues // *Proteomics Clin Appl*. 2015. 9(3-4): 396-405. doi: 10.1002/prca.201400118.
- Katsafadou A.I., Tsangaris G.T., Billinis C., Fthenakis G.C. Use of proteomics in the study of microbial diseases of small ruminants // *Vet Microbiol*. 2015. 181(1-2): 27-33. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.017.
- Kim Y.I., Cho J.Y. Gel-based proteomics in disease research: Is it still valuable? // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019. 1867(1): 9-16. doi: 10.1016/j.bbapap.2018.08.001.
- Küçük N. Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm // *Turk J Urol*. 2018. 44(1): 1-5. doi: 10.5152/tud.2018.49321.
- Liu S., Li Z., Yu B., et al. Recent advances on protein separation and purification

- methods // *Adv Colloid Interface Sci.* 2020. 284: 102254. doi: 10.1016/j.cis.2020.102254.
- Massing M.W., Robinson G.A., Marx C.E., et al. Applications of proteomics to nerve regeneration research // In: Alzate O., editor. *Neuroproteomics*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 15.
- Ma T., Xia T. Nanoparticle-based activatable probes for bioimaging // *Adv Biol (Weinh)*. 2021. 5(1): e2000193. doi: 10.1002/adbi.202000193.
- Mejía-Carmona K., Maciel E.V.S., Lanças F.M. Miniaturized liquid chromatography applied to the analysis of residues and contaminants in food: A review // *Electrophoresis*. 2020. 41(20): 1680-1693. doi: 10.1002/elps.202000019.
- Moore A.R., Avery P.R. Protein characterization using electrophoresis and immunofixation; a case-based review of dogs and cats // *Vet Clin Pathol*. 2019. 48 Suppl 1: 29-44. doi: 10.1111/vcp.12760.
- Morris J.S. Genomic and proteomic profiling for cancer diagnosis in dogs // *Vet J*. 2016. 215: 101-109. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.01.003.
- Motlagh A.M., Yang Z. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens // *Water Environ Res*. 2019. 91(10): 1402-1408. doi: 10.1002/wer.1238.
- Ode P.J. Plant toxins and parasitoid trophic ecology // *Curr Opin Insect Sci*. 2019. 32: 118-123. doi: 10.1016/j.cois.2019.01.007.
- Shao B., Li H., Shen J., Wu Y. Nontargeted detection methods for food safety and integrity // *Annu Rev Food Sci Technol*. 2019. 10: 429-455. doi: 10.1146/annurev-food-032818-121233.
- Sun Y., Zhao J., Liang L. Recent development of antibiotic detection in food and environment: the combination of sensors and nanomaterials // *Mikrochim Acta*. 2021. 188(1): 21. doi: 10.1007/s00604-020-04671-3.
- Treder N., Bączek T., Wychodnik K., et al. The influence of ionic liquids on the effectiveness of analytical methods used in the monitoring of human and veterinary pharmaceuticals in biological and environmental samples-trends and

- perspectives // *Molecules*. 2020. 25(2): 286. doi: 10.3390/molecules25020286.
- Udroiu I., Sgura A. Cytogenetic tests for animal production: state of the art and perspectives // *Anim Genet*. 2017. 48(5): 505-515. doi: 10.1111/age.12581.
- Zhang K., Banerjee K. A review: Sample preparation and chromatographic technologies for detection of aflatoxins in foods // *Toxins (Basel)*. 2020. 12(9): 539. doi: 10.3390/toxins12090539.
- Zhu C., Yang G., Ghulam M., et al. Evolution of multi-functional capillary electrophoresis for high-efficiency selection of aptamers // *Biotechnol Adv*. 2019. 37(8): 107432. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107432.

ДЛЯ ЗАМЕТОК