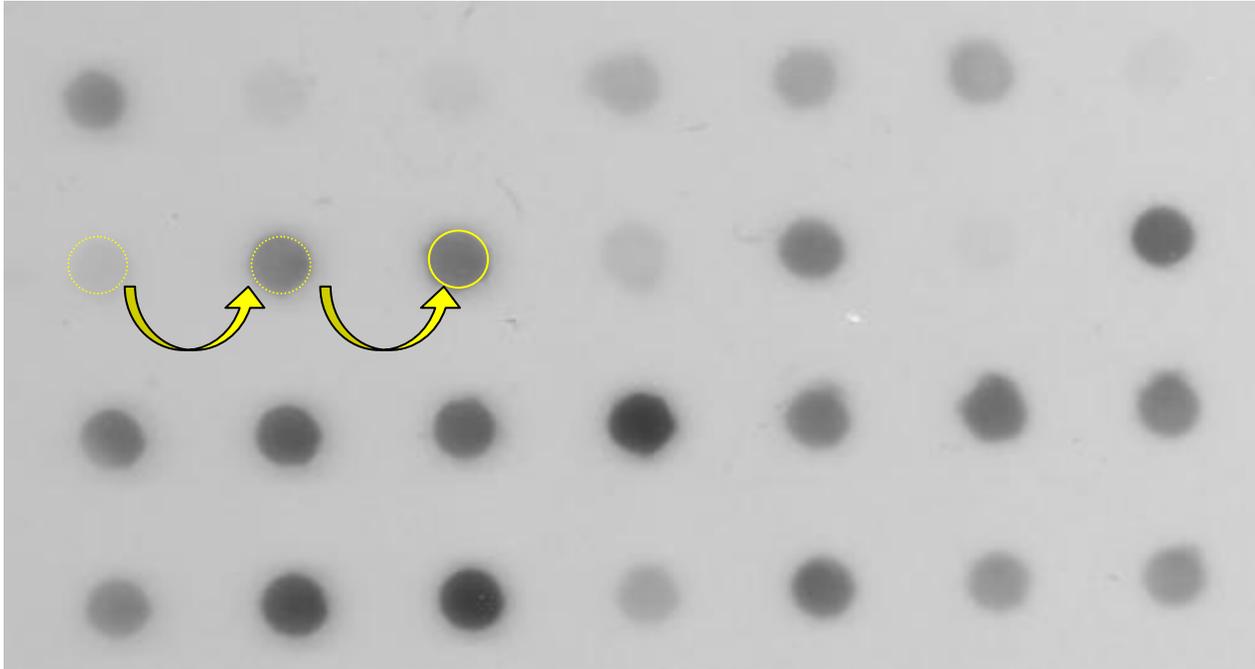


Misure di densità

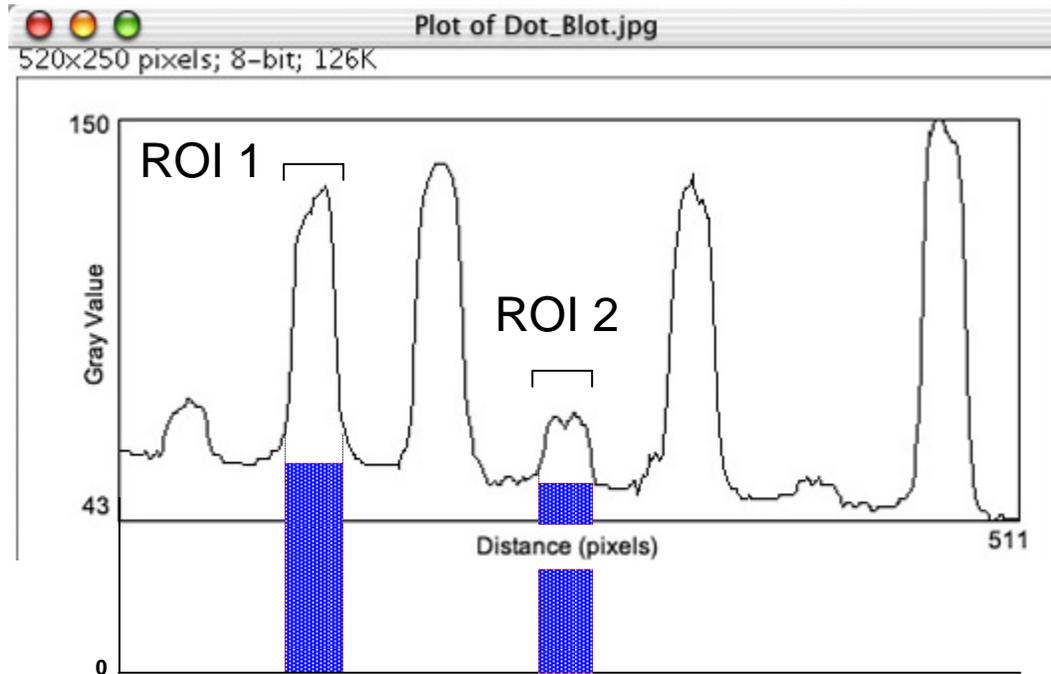
E se ora volessimo calcolare delle percentuali di espressione relativa da questo dot-blot?



Abbiamo 2 possibilità concettualmente diverse tra loro:

- 1) Conteggio tramite Region Of Interest (ROI) e determinazione della densità tramite **analyze>measure**
- 2) Conteggio tramite la funzione **analyze>Gels** (v. poi).

Misure di densità tramite ROI

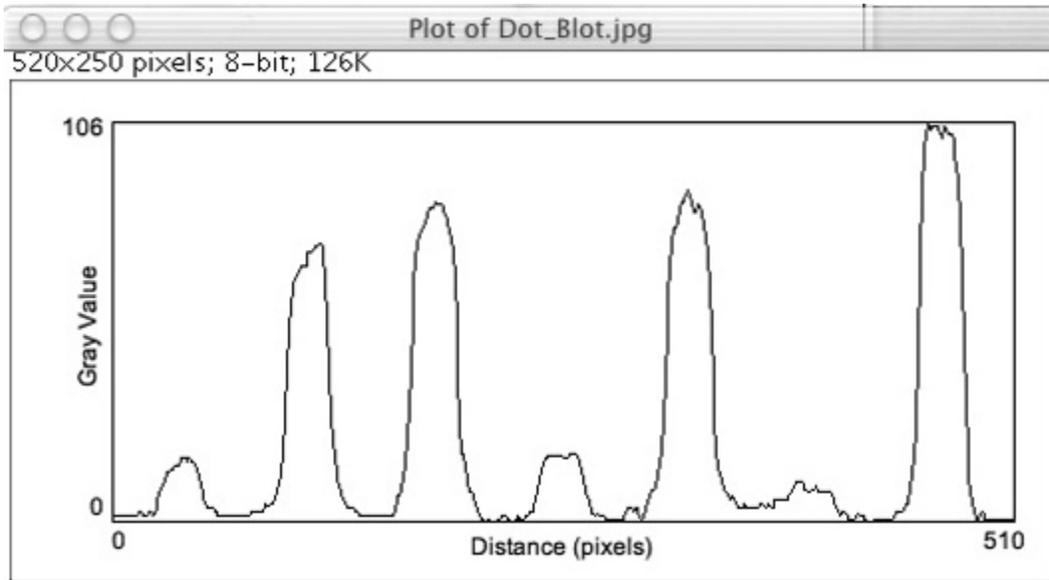


In figura, il background è riportato a pallini bianchi su fondo blu

Quando utilizziamo il calcolo della densità integrata sull'area di una ROI noi facciamo riferimento al valore assoluto dei pixels, e quindi comprendiamo anche una quota di background, se questo non è stato completamente eliminato.

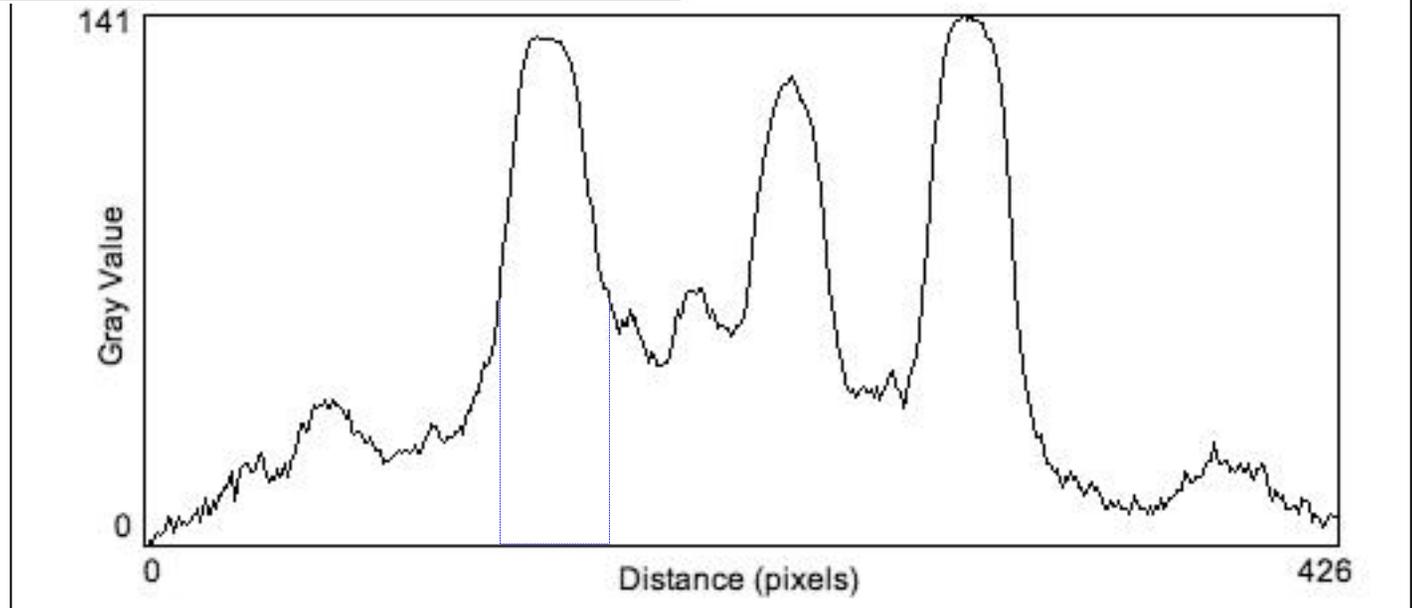
Il rapporto ROI 1/ROI 2 sarà ben diverso a seconda che venga, o non venga preso in considerazione il background.

Misure di densità tramite ROI

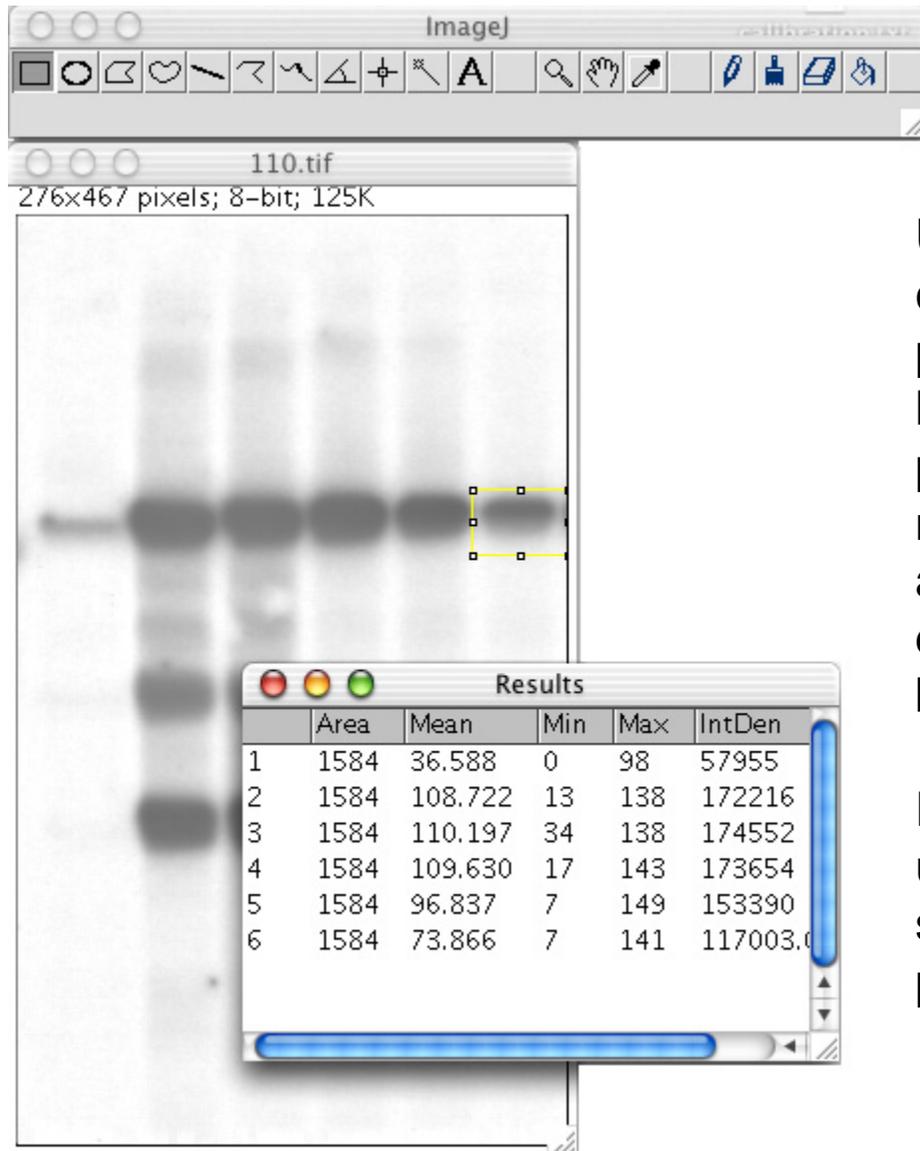


Se abbiamo visto che eliminare il background è semplice per un dot-blot ben fatto, non è detto che lo sia altrettanto per un gel.

L'importante, quindi, è essere coscienti che verrà calcolata anche la porzione sottostante al picco.



Misure di densità tramite ROI



Un altro problema è dato dal fatto che le regioni da paragonare possono non essere uniformi e che le ROI selezionate possono prendere in considerazione pixels non appartenenti alla banda in analisi. In questo caso bisognerà definire ROI adatte banda per banda.

Praticamente possiamo anche usare il ROI manager per selezionare tutte le regioni in analisi prima di cliccare **measure**.

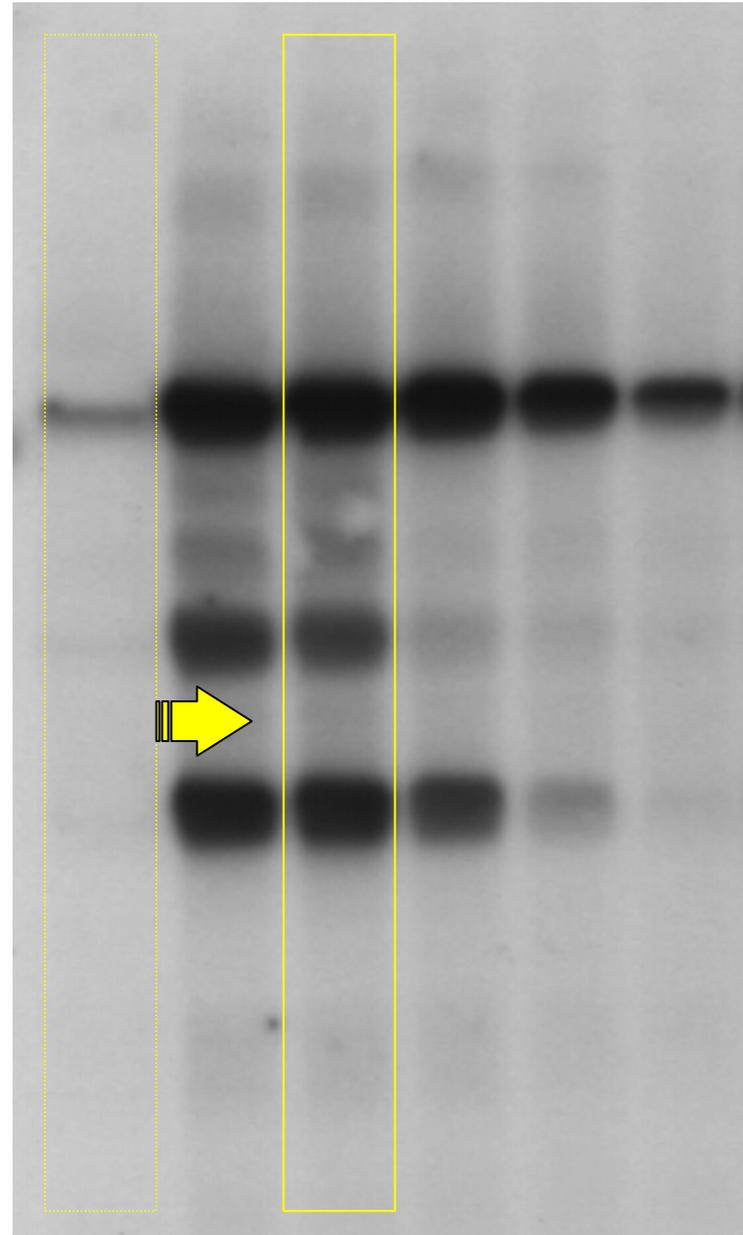
Misure di densità

2) Conteggio tramite la funzione *analyze>Gels*.

Questo approccio richiede la determinazione delle lanes da paragonare, ma NON è limitato ai gels. Si possono analizzare anche i dot blots o altri campioni organizzabili in regioni da paragonare.

Per un risultato ottimale il gel dovrebbe essere calibrato.

118.tif



Misure di densità

Per comparare i dati:

analyze>Gels>select first lane.

Poi spostate la selezione:

analyze>Gels>select next lane.

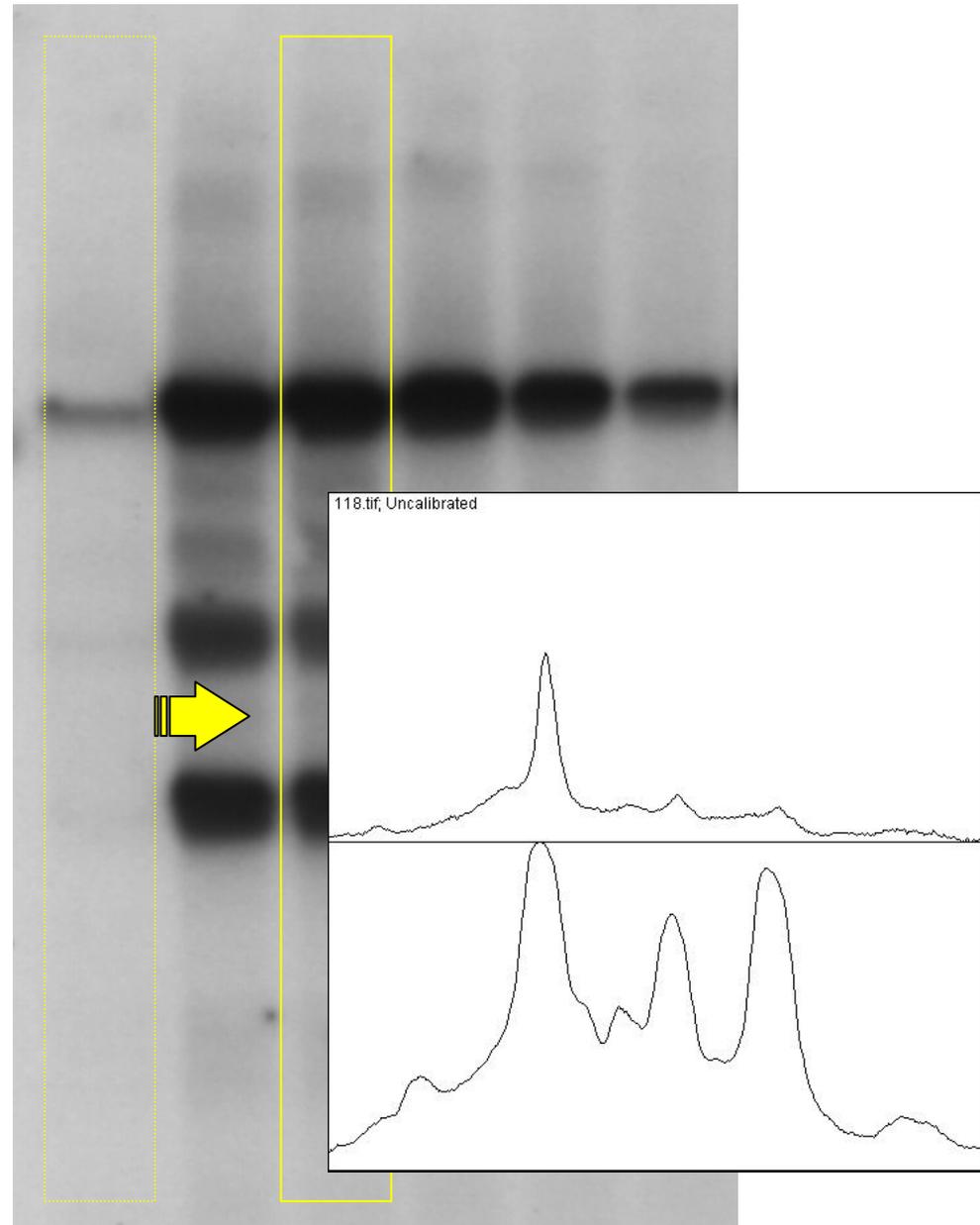
(quante volte volete)

Poi:

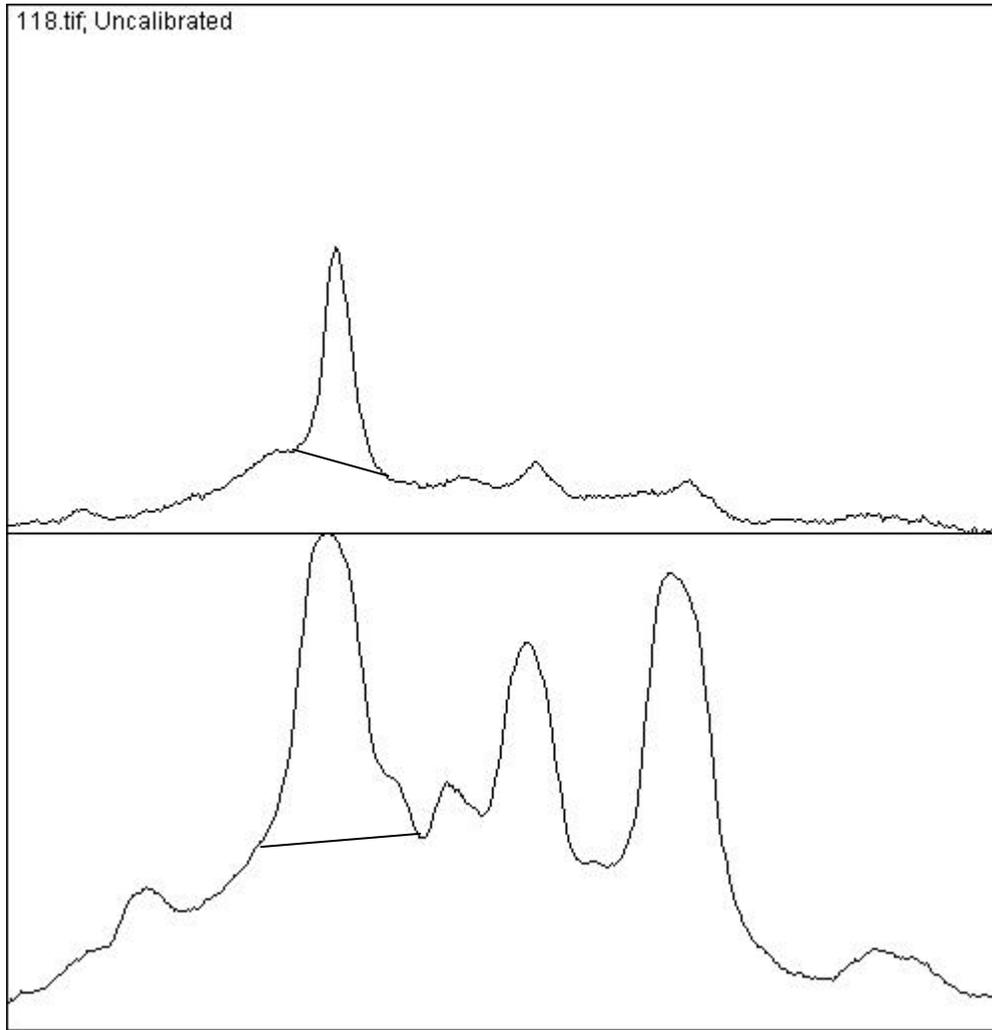
analyze>Gels>plot lanes.

>>>

118.tif



Misure di densità



Ora utilizzando lo strumento riga tracciamo la base del picco (a ns. scelta!).

Verrà identificata un'area che potremo selezionare con lo strumento bacchetta magica. Contestualmente alla selezione verrà misurata l'area e la percentuale.

Il comando:

Analyze>Gels>Label peaks

scriverà i dati in corrispondenza di ogni picco analizzato.

Verificate che l'area sia ben delimitata! Se no verranno selezionate altre porzioni.

Misure di densità

Tenete presente l'arbitrarietà del posizionamento delle linee di base che riduce l'utilità del procedimento.

