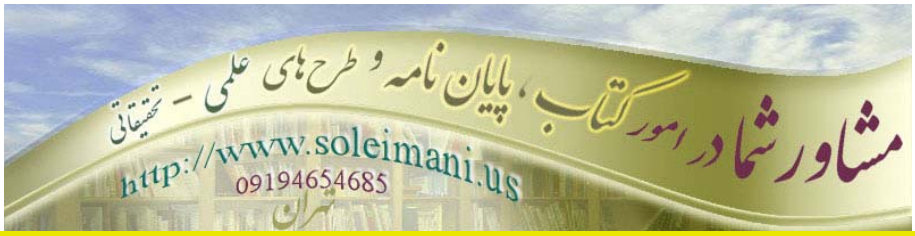
ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)

۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی



این راهنما توسط دفتر ترجمه و تألیف استیار تهیه شده و به صورت رایگان در اختیار همکاران محقق قرار می‌گیرد. لطفاً نظرات اصلاحی خود را با ما در میان بگذارید.

جزوه مختصر و مفید نرم‌افزار EndNote نیز به زودی تقدیم علاقمندان خواهد شد.

ترجمه متون علمی – پزشکی تخصص ما است.

تهیه و تنظیم پروپوزال علمی و پایان نامه‌ای، مشاوره در امور پژوهشی، مقاله ISI ، انجام محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS ، ترجمه و تألیف کتاب، ویراستاری کتاب‌های علمی

Http://www.soleimani.us
S_rasoul@yahoo.com
09194654685

با نام و یاد خدا

تبدیل داده‌های تصویری به داده‌های کمی (عددی)

آنالیز ژل الکتروفورز یا وسترن بلات با نرم افزار ImageJ

نرم افزار ImageJ توسط دانشکده ملی بهداشت امریکا (NIH) در اختیار محققین گذاشته شده است. برای داونلود کردن خود نرم افزار و پلاگین‌های آن و فایل‌های کمکی دیگر (به زبان انگلیسی) می‌توانید به آدرس زیر مراجعه کنید

http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html

این نرم افزار تحت برنامهٔ Jawa کار می‌کند، به این معنی که برای استفاده از آن بایستی نرم افزار جاوا نیز بر روی ویندوز نصب شده باشد. پلاگین‌های متنوعی برای استفاده‌های متنوع برای آن نوشته شده است که می‌توانید از لینک‌های متصل به صفحه فوق الذکر دریافت کنید.

ابتدا نرم افزار را (که رایگان است) داونلود کرده و نصب کنید. اگر آخرین نسخه جاوا بر روی کامپیوتر شما نصب نشده است، بهتر است بسته حاوی جاوا (حدود ۳۵ مگابایت) را داونلود کرده و هر دو را با هم نصب کنید. از این صفحه انتخاب کرده داونلود کنید:

http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html

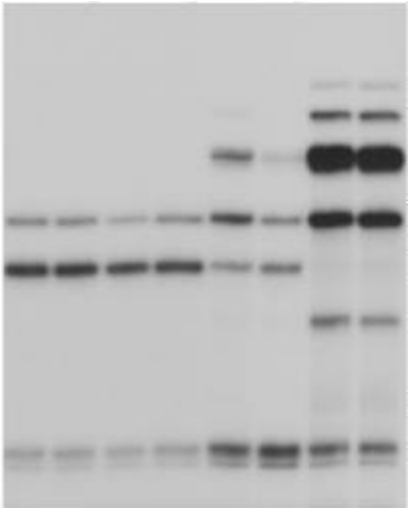
برای آنالیز ژل الکتروفورز یا غشاء رنگ‌آمیزی شدهٔ وسترن بلات از نرم افزارهای متنوعی مثل فتوشاپ و ... استفاده شده است، اما ما در اینجا طرز کار با نرم افزار ImageJ را توضیح می‌دهیم.

نرم افزار ImageJ کاربردهای گسترده‌ای دارد و چون متخصصین و محققین روزبه‌روز پلاگین‌های بیشتری برای آن می‌نویسند کارایی آن هر روز بهتر و بیشتر می‌شود. ما فقط عملکردهایی از آن را که مربوط به آنالیز ژل می‌باشد، توضیح می‌دهیم.

هدف از آنالیز ژل یا وسترن بلات:

حتماً اطلاع دارید که:

الکتروفورز عبارت است از تفکیک مولکول‌های مخلوط موجود در یک نمونه با استفاده از روش الکتروفورز. این مولکول‌ها می‌توانند پروتیئن‌ها یا DNA یا RNA یا ... باشند مهم این است که پس از الکتروفورز، مخلوط مولکول‌ها از هم جدا شده و بر اساس وزن مولکولی یا بار الکتریکی یا ویژگی‌های دیگر، **به صورت باندهای مشخص و ردیف شده در یک ستون** ظاهر می‌شوند. تصویر زیر ۸ ستون مربوط به باندهای ۸ نمونه را نشان می‌دهد.



با این مقدمه کوتاه، به اینجا رسیدیم که ما در مرحله آخر الکتروفورز یا وسترن بلات، برای هر نمونه لود شده، باندهایی داریم در یک ستون ردیف شده‌اند و از زمینهٔ تقریباً بی‌رنگشان به واسطه شدت رنگشان متمایز هستند و این باندها از نظر مساحت و شدت رنگ متفاوت هستند و حال، می‌خواهیم از نرم افزار استفاده کنیم تا شدت رنگ باندها و میزان کل رنگ موجود در باندها را به صورت کمی و عددی تبدیل نموده و با هم دیگر مقایسه نماییم.

پس: هدف ما

۱ - به دست آوردن میانگین رنگ موجود در باندها است.

۲ – به دست آوردن کل رنگ موجود در هر باند است، چون علی رغم یکسان بودن میانگین رنگ در دو باند، یکی از باندها ممکن است بزرگ (عریض) بوده و مساحت بیشتری را اشغال کرده باشد.

۳ – **در نهایت** هدف ما از تبدیل شدت و مساحت رنگ به کمیت عددی، مقایسه دو باند (یا بیشتر) و نتیجه‌گیری قطعی و مطمئن (یا همان قضاوت آماری) است.

پیشفرض ما این است که شما الکتروفورز یا وسترن را انجام داده‌اید و تصویر دیجیتال آن را به یکی از فرمت‌های (tif, ipg, png, ...) بر روی کامپیوتر دارید. ذخیره کردن تصویر با فرمت tif بهتر است چون علی‌رغم حجم زیاد فایل، اطلاعات بیشتری از تصویر اصلی را در بر دارد.

برای نوشتن این رهنمود از محتویات صفحه واقع در این آدرس نیز استفاده شده است.

ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی

این رهنمود با نسخه 1.42q از نرم افزار ImageJ نصب شده بر روی ویندوز ۷ شصت و چهار بیتی تهیه شده است.

توصیف واژه‌ها و اصطلاحات

ژل یا **وسترن**: منظور ما در این توضیحات از کلمه ژل یا وسترن، تصاویر تهیه شده از محصول نهایی عمل الکتروفورز و وسترن بلاتینگ می‌باشد.

لودینگ کنترل (Loading control): از میزان پروتئین خاصی که مطمئناً در اثر مداخلات دارویی و تجربی بیان آن تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد (مثلاً Actin) به عنوان کنترل کننده داخلی برای پی بردن به صحت حجم و غلظت پروتئینی منتقل شده به همه چاهک‌های یک ژل (تفاوت در میزان نمونه ریخته شده) استفاده می‌شود. کنترل داخلی پروتئینی است که بیان آن ثابت است. کنترل داخلی برای اصلاح انحرافات ناشی از عدم صحت در انتقال نمونه در **بین ستون‌های یک ژل** استفاده می‌شود.

کنترل استاندارد: این کنترل داخلی نیست به این معنی بیان آن در همه نمونه‌ها وجود ندارد بلکه نمونه پروتئینی استانداردی است که خریداری شده و یا توسط آزمایشگاه تهیه می‌شود و برای هر ژلی که بارگذاری می‌شود یک ستون آن به کنترل استاندارد اختصاص داده می‌شود (پیشفرض این است که همیشه و برای هر ژل مقدار کاملاً دقیقی از آن به یک چاهک منتقل می‌شود). کنترل استاندارد برای اصلاح تفاوت‌ها و انحرافات موجود **بین چند ژل** به کار می‌رود

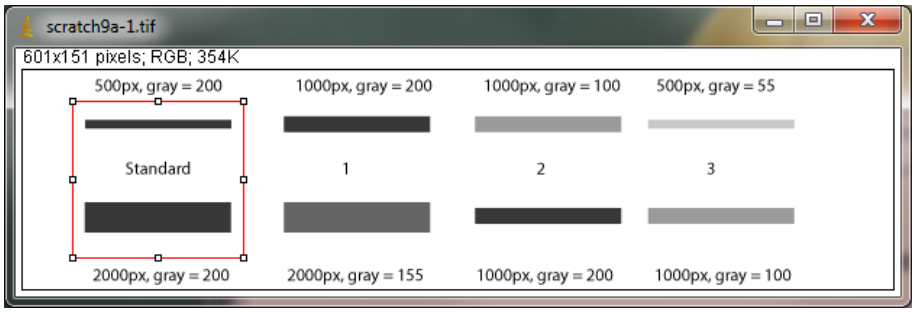
روش نرم‌افزاری کمی سازی باندهای ژل یا وسترن:

۱ - برای باز کردن تصویر ذخیره شدهٔ ژل یا وسترن، در پنجره نرم افزار ImageJ ، از منوی File گزینه Open را انتخاب کنید.

۲ – اگر تصویر ذخیره شده به صورت سیاه و سفید نمی‌باشد ابتدا باید به سیاه و سفید تبدیل کنید. برای تبدیل تصویر به حالت سیاه و سفید، در نرم افزار ImageJ از منوی Image زیرمنوی Type گزینه 8-bit را انتخاب کنید. تصویر شما مشابه تصویر زیر خواهد بود.

توضیح شکل ۱) یک تصویر ساخته شدهٔ وسترن بلات، باز شده در نرم افزار ImagJ .
در نوار عنوان، نام تصویر بازشده، در ردیف پایین آن، هشت بیت بودن تصویر و طول و عرض تصویر برحسب پیکسل، نشان داده شده است (تصویر به حالت LUT تبدیل شده است که باندهای آن به صورت خانه‌های جدول و مستطیلی نمایش داده شده‌اند). تبدیل تصویر به حالت LUT اطمینان می‌دهد که باندهای تیره‌تر با دانسیته بالایی ثبت شده‌اند.

۳– از نوار ابزار ImageJ ابزار Rectangular Selections را انتخاب کنید. در اطراف Lane اول یک مستطیل بکشید (به هر ستون از الکتروفوروگرام که مربوط به باندهای تفکیک شده از یک نمونه است Lane گفته می‌شود). نرم افزار فرض می‌کند که Lane ها عمودی و باندهای تفکیک شده افقی هستند و بر این اساس lane ترسیم شده بایستی ارتفاع زیاد و عرض کمی داشته باشد در غیر این صورت ممکن است پیشفرض نرم افزار به صورت Lane افقی و باندهای عمودی تغییر کند و موجب گرفتن نتایج اشتباه گردد.



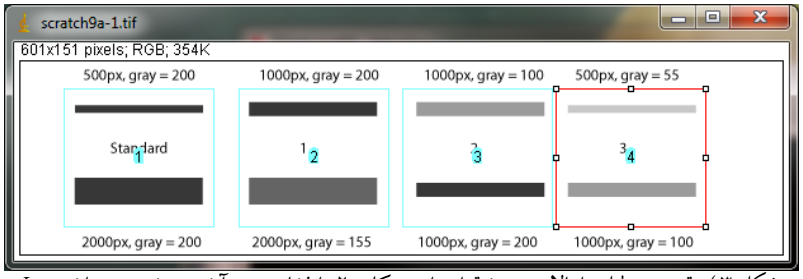
توضیح شکل ۲) ستون اول با ابزار *انتخاب چارگوش* انتخاب شده است.

۴– پس از آنکه با ابزار انتخاب چارگوش محدودهٔ ستون اول را مشخص کردید، کلید ۱ را فشار دهید (یا از منوی Analyze زیرمنوی Gels گزینه Select Fiest Lane را کلیک کنید) تا مستطیل رسم شده در جای خود میخکوب شود. با این کار ستون اول پر رنگ می‌شود و شماره Lane یعنی عدد ۱ در وسط آن ظاهر می‌شود.

۵– از ماوس استفاده کرده و از وسط مستطیل گرفته و آنرا به روی Lane دوم بکشید (برای جابه‌جا کردن مستطیل از کلیدهای جهت‌دار نیز می‌توانید استفاده کنید منتها کُند عمل می‌کنند.). مستطیل را از نظر افقی درست روی ستون دوم تنظیم کنید، اما در مورد تنظیم عمودی آن نگران نباشید، چون خود نرم‌افزار این کار را (قبل از مرحلهٔ بعدی) برایتان انجام می‌دهد.

۶– کلید ۲ را فشار دهید (یا از منوی Analyze زیرمنوی Gels گزینهٔ Select Next Lane را کلیک کنید.) با این کار عدد ۲ در میان ستون دوم ظاهر می‌شود.

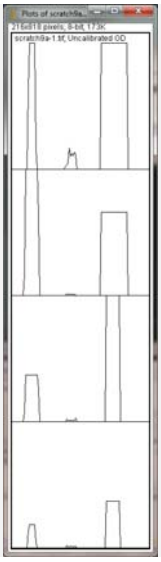
۷– مرحلهٔ ۵ و ۶ را برای Lane های بعدی نیز تکرار کنید و فراموش نکنید که وقتی مستطیل در بالای هر یک از ستون‌های مورد نظر قرار گرفت فقط عدد ۲ را فشار دهید.



شکل ۳) وقتی مستطیل را بالای ستون قرار داده و کلید ۲ را فشار دهید آن ستون به عنوان Lane جدید ثبت می‌شود.

۸– وقتی آخرین Lane را با فشار دادن کلید ۲ تثبیت کردید آن وقت عدد ۳ را فشار بدهید (یا از منوی Analyze زیرمنوی Gels گزینه Plot Lanes را انتخاب کنید) تا نمودار دانسیته برای هر یک از ستون‌ها ترسیم شوند.

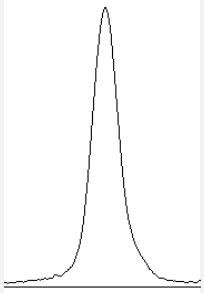
ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی



شکل ۴) نمودار دانسیته بر اساس تصویر باندها

۹ – نمودار دانسیته، محتوای هر ستون را به صورت برجسته‌ای به نمایش می‌گذارد. مستطیل‌های روی تصویر از بالا به پایین ردیف شده‌اند. قله‌های منحنی‌های روی نمودار (شکل ۴) متناسب با باندهای پر رنگ روی تصویر (شکل ۳) هستند. چون چهار ستون انتخاب شده داریم، بنابر این، در نمودار نیز چهار ناحیه مشخص وجود دارد. قله‌های مرتفع‌تر نمایانگر باندهای پر رنگ‌تر هستند. منحنی‌های پهن نمایانگر باندهایی هستند که مساحت بیشتری را در ژل اصلی اشغال می‌کنند.

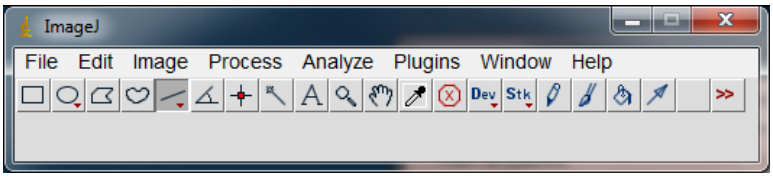
۱۰ – تصاویر ثبت شده از ژل‌ها یا وسترن بلات‌های واقعی، معمولاً اندکی رنگ زمینه دارند، لذا منحنی‌های به‌دست آمده، از خط صفر زمینه شروع نمی‌شوند. شکل ۵ منحنی مربوط به یک وسترن‌بلات واقعی را نشان می‌دهد. چنان‌که می‌بینید به دلیل وجود رنگ زمینه به نظر می‌رسد که منحنی به‌دست آمده بالاتر از خط زمینه قرار گرفته است و اگر نسبت به منحنی کناری آن در نظر بگیریم این دو ستون از منحنی به هم می‌پیوندند و اندازه‌گیری ارتفاع و حجم آنها در این حالت امکان‌پذیر نیست. بنابر این، ضروری است که این دو منحنی از هم سوا شوند تا اندازه‌گیری تک تک آنها ممکن گردد.



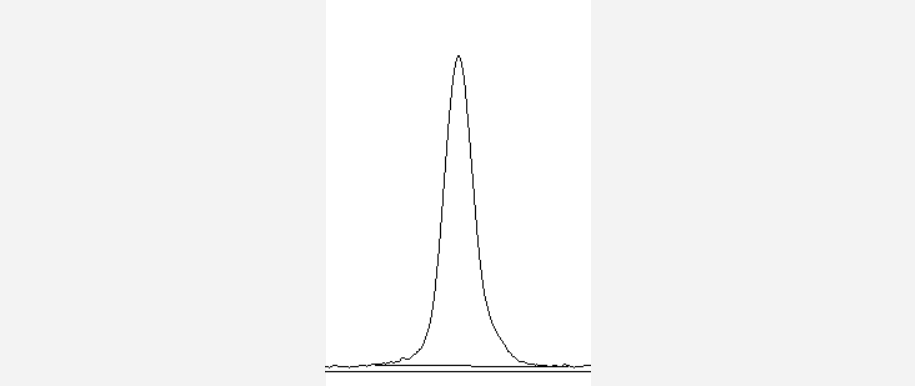
شکل ۵) وسترن بلات‌های واقعی اندکی رنگ زمینه دارند
که باعث می‌شود در آنها نمودار به خط زمینه متصل نشود.

۱۱ – از نوار ابزار نرم افزار، ابزار Straight Line را انتخاب کنید (شکل ۶). برای هر قله‌ای که در نمودار موجود است و می‌خواهید آنالیز شود یک خط در قاعدهٔ منحنی بکشید (تقریباً افقی)

به‌طوری که آن منحنی با منحنی‌های کناری خود نقطه به هم پیوسته‌ای نداشته باشد. این مرحله به قضاوت خود شما در این مورد بستگی دارد که در کجا منحنی تمام می‌شود و زمینه از کجا آغاز می‌شود.



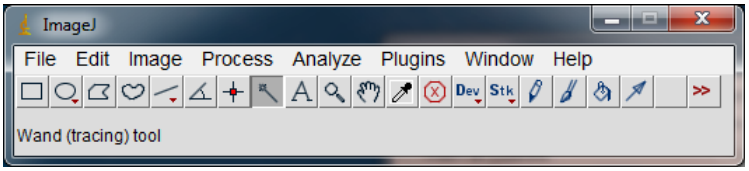
شکل ۶) برای بستن انتهای پایینی هر کدام از منحنی‌ها از ابزار Straight Line استفاده کنید.



شکل ۷) همان منحنی موجود در شکل ۵ است که قاعدهٔ آن با ترسیم یک خط مسدود شده است.

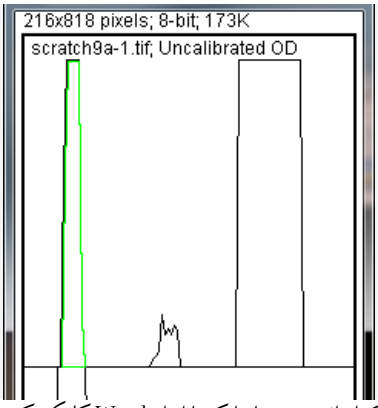
۱۲ – توجه داشته باشید که اگر شما ستون‌های زیادی را انتخاب کرده باشید، در این صورت منحنی‌های آخری به صورت مخفی مانده و در نمودار نمایش داده نمی‌شوند. برای مشاهده این منحنی‌ها کلید Spacebar را فشار داده و پایین نگه دارید و از ماوس استفاده کرده و منحنی را به طرف بالا Drag بکنید.

۱۳ – وقتی همهٔ منحنی‌ها را با استفاده از ابزار Straight Line از طرف قاعده مسدود کردید، ابزار Wand را انتخاب کنید (شکل ۸).



شکل ۸) ابزار Wand را انتخاب کرده و با آن هر منحنی را که می‌خواهید پر رنگ کنید

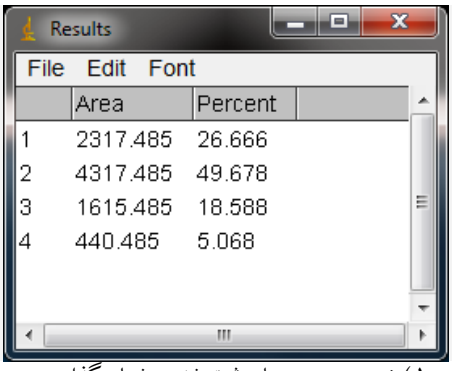
۱۴ – اگر منحنی مربوط به Lane اول مشاهده نمی‌شود، کلید Spacebar را پایین نگه داشته و منحنی را پایین بکشید تا Lane اول آشکار گردد. در این حالت با ابزار Wand داخل آن را کلیک کنید (شکل ۹). در حالی که به طرف پایین نمودار حرکت می‌کنید همه منحنی‌ها را به حالت انتخاب شده درآورید. هر کدام از منحنی‌ها را که کلیک می‌کنید اندازه‌گیری‌های مربوط به آن در پنجرهٔ فرعی (پنجرهٔ نتایج) نرم افزار نمایش داده می‌شود.



شکل ۹) هر کدام از منحنی‌ها را که با ابزار Wand کلیک کنید آن منحنی پر رنگ شده و نتایج اندازه‌گیری‌های مربوط به آن در پنجرهٔ نتایج وارد می‌شود.

۱۵ – وقتی همهٔ منحنی‌ها پر رنگ شدند، از منوی Analyze زیرمنوی Gels گزینهٔ Label Peaks را کلیک کنید. این انتخاب همهٔ منحنی‌ها را نامگذاری می‌کند و اندازهٔ آن را به عنوان درصدی از اندازه کل مناطق پر رنگ شده نشان می‌دهد.

۱۶ – نتایج مشاهده شده در پنجرهٔ نتایج (شکل ۱۰) را می‌توان به برنامه‌های صفحه گسترده منتقل کرد. برای اینکار در پنجرهٔ نتایج از منوی Edit گزینهٔ Copy All را انتخاب کنید و سپس در برنامه صفحه گسترده مورد نظرتان Paste کنید.



	Area	Percent
1	2317.485	26.666
2	4317.485	49.678
3	1615.485	18.588
4	440.485	5.068

شکل ۱۰) خروجی منحنی‌های ثبت شده و شماره‌گذاری منحنی‌ها.
در اینجا چهار ناحیه مربوط به چهار باند ردیف بالایی در شکل ۱ می‌باشند.

نکته: اگر شما اشتباه کرده و با ابزار Wand جای دیگری به غیر از داخل منحنی‌های مورد ارزیابی را کلیک کنید، نرم افزار باز هم ناحیه کلیک شده را به عنوان یک منحنی حساب کرده و اندازه‌گیری‌های مربوط به آن ناحیه را ثبت خواهد کرد و در زمرهٔ مناطق ثبت شده وارد خواهد کرد که در این صورت، درصد محاسبه شده برای منحنی‌های واقعی کمتر از مقدار واقعی گزارش شده و داده‌ها انحراف پیدا خواهند کرد. اگر شما ناحیهٔ اشتباهی را کلیک کردید می‌توانید ادامه دهید و از منوی Analyze زیرمنوی Gels گزینه Label Peaks را کلیک کنید تا نتایج فعلی (که اشتباه هستند)، نمایش داده شوند، اما بهترین کار این است که شما شمارشگر را از نو راه‌اندازی کنید. وقتی شمارشگر را صفر نمودید به پنجره نمودار برگردید و از اول شروع به کلیک با ابزار Wand نمایید. هر گاه مطمئن شدید که همه نواحی انتخاب شده واقعاً جزو منحنی‌ها بوده‌اند

ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی

می‌توانید به منوی آنالیز رفته و از زیرمنوی ژل گزینه Label Peaks را انتخاب کنید تا نتایج صحیح را دریافت کنید.

آنالیز بیشتر

وقتی داده‌های عددی نمایش داده شده در پنجرهٔ نتایج را کپی کرده و در برنامه‌ای مانند Excel وارد کردید آماده هستید که محاسبات بیشتری بر روی آنها انجام دهید، مثلاً می‌توانید چگالی نسبی هر کدام از منحنی‌ها را به‌دست آورید. یادآوری می‌کنیم که اعداد محاسبه شده توسط نرم‌افزار ImageJ صرفاً رقم هستند و فقط نشان دهندهٔ مختصات خاصی از منحنی‌های انتخاب شده توسط شما هستند. به عبارت دیگر، آنها پروتئین‌های موجود در باندها را برحسب میلی‌گرم یا هر واحد فرضی دیگری بیان نمی‌کنند. در این مرحله، روند معمول این است که شما دانسیتهٔ باندهای مجهول را با دانسیتهٔ باندهای استاندارد معلوم (که همراه با نمونه‌ها و بر روی یک ژل کار کرده‌اید) مقایسه کرده و غلظت پروتئین‌ها را محاسبه نمایید. برای این کار:

۱- داده‌های خود را در برنامه Excel وارد کنید (از طریق Copy و Paste شکلی مشابه شکل ۱۱ حاصل می‌شود). یکی از قله‌ها استاندارد می‌باشد. در اینجا ما قله شمارهٔ ۱ را استاندارد در نظر گرفته‌ایم.

۲- در ستون خالی بعد از ستون Percent ، عدد درصد بدست آمده برای هر یک از باندها را به عدد باند استاندارد تقسیم کنید (در اینجا همه را به عدد 26.666 تقسیم کرده‌ایم).

۳- اعداد جدید به‌دست آمده، دانسیتهٔ نسبی باندها را نسبت به باند استاندارد نشان می‌دهد، اما هنوز هم نشان دهنده غلظت پروتئینی نیست.

Sample	Area	Percent	Relative Density
1	2317.485	26.666	1.00
2	4317.485	49.678	1.86
3	1615.485	18.588	0.70
4	440.485	5.068	0.19

شکل ۱۱) محاسبه دانسیتهٔ نسبی برای چهار منحنی انتخاب شده.

در اینجا منحنی یک استاندارد می‌باشد و همه اعداد ستون percent به عدد 26.666 تقسیم شده است.

۴- در این مثال باند دوم دانسیتهٔ نسبی بیشتری در مقایسه با استاندارد داشته است (1.86) که اگر به شدت رنگ این باند در شکل ۱ توجه کنید چنین دانسیتهٔ نسبی انتظار می‌رود. باز هم یادآوری می‌کنیم که ردیف اول از شکل ۱ وارد آنالیز شده است.

۵- اگر شما در نظر دارید که باندهای موجود در دو یا چند ژل (یا بلات) را با هم مقایسه کنید لازم است که از یک استاندارد واحد در همه آن ژل‌ها استفاده شده باشد. در این صورت است که دانسیتهٔ نسبی محاسبه شده برای هر کدام از باندها قابل مقایسه خواهد بود. برای توضیح بیشتر به ادامهٔ بحث توجه نمایید.

۶- برای ارزیابی اختلافات و به‌دست آوردن تفاوت‌های معنی‌دار ناشی از مداخلات انجام شده در طی تحقیقات اصلی، ضروری است که همه ژل‌ها و یا بلات‌های شما توسط یک دستگاه اسکن شوند و از یک نرم‌افزار واحد نیز برای تبدیل آنها به داده‌های کمی استفاده شده باشد و واحدهای

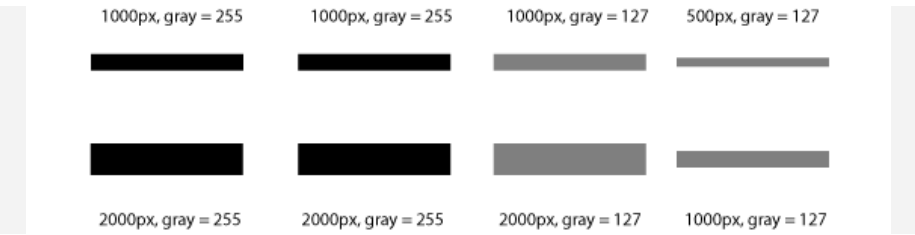
ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی

گزارش شده نیز بایستی یکسان باشند مثلاً برای همهٔ باندها دانسیته نسبی محاسبه شده باشد (یا برای همه آنها اختلاف دانسیته نسبی [Relative Density Difference] محاسبه شده باشد مثلا اختلاف دانسیته نسبی ۲ نشان میدهد که بیان پروتئین تست در مقایسه با کنترل دو برابر بوده است). اگر شما در حال مقایسه چند تکنیک برای یک مورد خاص هستید بایستی مطمئن شوید که اعداد دانسیته نسبی توزیع نرمالی دارد و واریانس مربوط به آن در تکنیک‌های مختلف با هم همخوانی دارد (نرمال بودن توزیع داده‌ها و هموژن بودن واریانس‌ها بحث آماری هستند خیلی سخت نگیرید).

۷- باید خاطر نشان کنیم که بعضی محققین سخت‌گیری‌های بیشتری می‌کنند و رقت‌های مختلفی از استاندارد را در بلات خود به کار می‌گیرند. استفاده از منحنی رقت‌های سریال به همراه روش کمی سازی گفته شده در بالا این امکان را فراهم می‌کند که شما بتوانید غلظت پروتئین‌های موجود در باندها را به صورت پیکوگرم یا نانوگرم بدست آورید.

روش پیچیده‌تر استفاده از Loading-Controls

برای این روش از تصویر ۱۲ به عنوان یک وسترن بلات استفاده خواهیم کرد. در این بلات ما ادعا می‌کنیم که چهار نمونه تکراری از یک نمونه پروتئینی هموژن شده را در چاهک‌های الکتروفورزی Load کرده‌ایم، بنابراین انتظار داریم دانسیته همه Lane ها با هم برابر باشند. میله‌های بالایی نشانگر پروتئین مورد نظر ما می‌باشد. میله‌های پایینی نشانگر لودینگ کنترل (مثلا Actin) می‌باشند، بدین معنی که می‌خواهیم مطمئن شویم که پروتئین کل بارگیری شده برای همه lane ها یکسان بوده است. پروتئین مربوط به لودینگ کنترل پروتئینی است که علی‌رغم مداخلات انجام شده توسط ما در طی تحقیقات تجربی بیان آن ثابت بوده است (حداقل ادعای ما این است چون خیلی‌ها تشکیک می‌کنند که از کجا معلوم مواد و داروهای استفاده شده تأثیری در بیان اکتین نداشته است.)



شکل ۱۲) تصویر یک وسترن بلات که ردیف پایین آن مربوط به loading-control می‌باشد. اغلب این پروتئین کنترل علی رغم مداخلات انجام شده بیان ثابتی دارد مثل اکتین.

اگر به تصویر ۱۲ دقت کنید علی‌رغم اینکه ما تصور می‌کردیم مقادیر پروتئینی یکسانی را در هر چهار چاهک ریخته‌ایم اما بعد از انجام الکتروفورز و وسترن بلات مشاهده می‌کنیم که اندازه و شدت رنگ میله‌های پایینی تفاوت آشکاری با یکدیگر نشان می‌دهند. چنانکه مشاهده می‌شود دو باند سمت چپ یکسان هستند اما در مورد باند سوم دانسیته نصف شده است (gray value) و در مورد باند چهارم نیز هم دانسیته نصف شده و هم پهنای باند نصف شده است. چون کنترل داخلی به کار گرفته شده اینقدر نتایج متفاوتی داده است لذا مقادیر دانسیته محاسبه شده با استفاده از یک استاندارد منفرد صحیح نبوده و مستقیماً قابل مقایسه نیستند. بنابراین، در اینجا ما آنالیز معمول

ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی

دانسیته و اندازه بلات‌ها را با استفاده از ImageJ انجام می‌دهیم و سپس از نتایج حاصل از کنترل داخلی (باندهای پایینی) برای رتبه‌بندی مقادیر مربوط به هر یک از پروتئین (باندهای بالایی) استفاده می‌کنیم.

۱- تصویر وسترن بلات را در ImageJ باز کنید.

۲- اگر تصویر سیاه سفید نیست از منوی Image زیرمنوی Type گزینهٔ 8-bit را کلیک کنید.

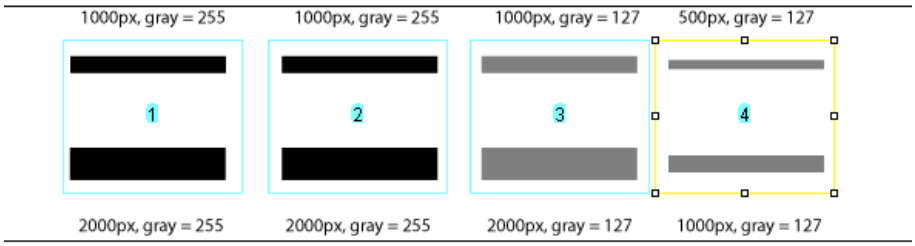
۳- با ابزار انتخاب چارگوش دور تا دور Lane اول را یک مستطیل بکشید (از بالای بالاترین باند تا پایین پایین‌ترین باند).

۴- کلید ۱ را فشار دهید تا عدد ۱ در میانه مستطیل ظاهر شود.

۵- از ناحیه وسط مستطیل گرفته و آن را به روی Lane جابه‌جا کنید.

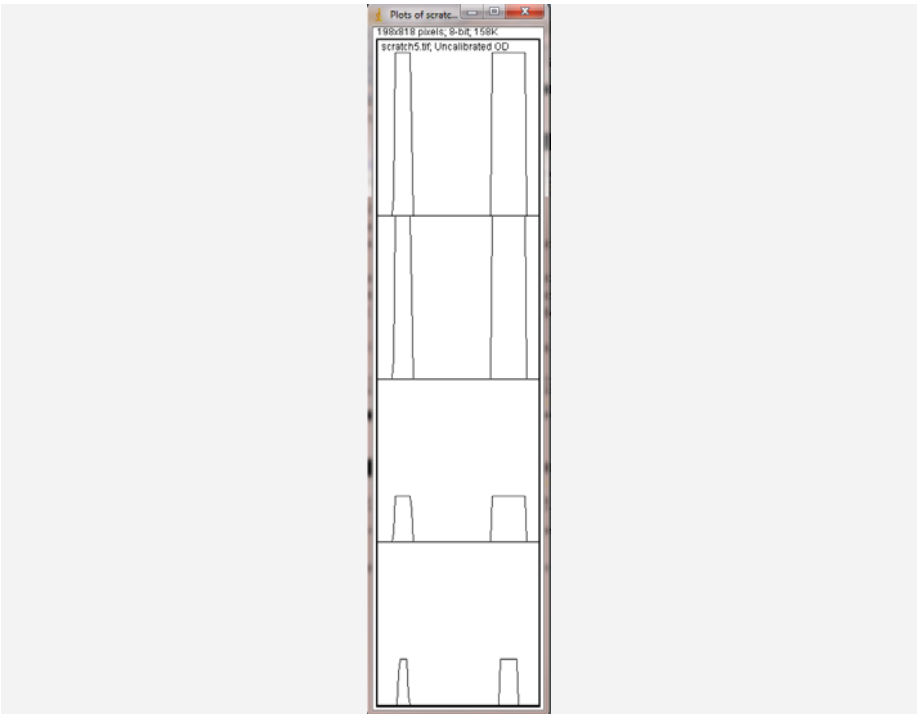
۶- کلید ۲ را فشار دهید تا عدد ۲ در میانه ظاهر شود.

۷- مراحل ۵ و ۶ را عیناً در مورد Lane های دیگر تا آخرین Lane تکرار کنید و هر بار فقط عدد ۲ را فشار دهید (شکل ۱۳).



شکل ۱۳) هر یک از Lane ها از طریق جابه‌جا کردن مستطیل بر روی آن و فشار دادن کلید ۲ در جای خود به حالت انتخاب شده در می‌آید.

۸- وقتی آخرین Lane را از طریق فشار دادن کلید ۲ انتخاب کردید حال کلید ۳ را فشار دهید تا نمودار Lane های انتخاب شده ترسیم شود (شکل ۱۴).



شکل ۱۴) نمودار دانسیتهٔ همهٔ Lane ها (ستون یک در بالا و ستون ۴ در پایین). اگر تعداد ستون‌ها زیاد باشد لازم می‌شود که برای دیدن نمودارهای بعدی تصویر نمودار جابه‌جا شود.

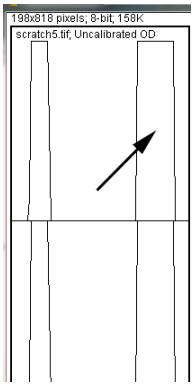
۹ – اساساً نمودار دانسیته نمایانگر میزان دانسیته متوسط در یک سری برش‌های افقی برای هر ستون می‌باشد. باندهایی که تیره‌تر هستند قله‌های بلندتری دارند و باندهایی که اندازه بزرگی دارند منحنی عریض‌تری می‌سازند. در نمونه توضیح داده شده باندها کاملا مستطیلی هستند ولی مشاهده می‌کنید که منحنی‌های رسم شده دارای شیب مختصری هستند و این به خاطر عملکرد تعدیلی نرم‌افزار ImageJ در میزان دانسیته از بالا به پایین می‌باشد. در نتیجه عبور تیز از منطقه کاملاً سیاه به منطقه کاملاً سفید، مشاهده شده در باند شماره ۱ به دلی اثر تعدیلی نرم‌افزار به صورت منحنی با شیب مناسب نمایش داده شده است.

۱۰- در تصویر وسترن بلات استفاده شده در این تمرین، رنگ زمینهٔ مزاحمی وجود ندارد، لذا همه منحنی‌ها با خط زمینه برخورد می‌کنند. اما در وسترن بلات‌های واقعی رنگ زمینه مختصری وجود خواهد داشت (رنگ زمینه کاملاً سفید نخواهد بود) و لذا منحنی‌ها با خط زمینه برخوردی نخواهند داشت و بایستی خطی در قاعدهٔ هر منحنی رسم شود تا آنها را از همدیگر جدا کرده و اندازه‌گیری‌ها را امکان‌پذیر نماید.

۱۱- برای این کار ابزار Straight Line را انتخاب کنید و برای هر یک از منحنی‌هایی که قرار است در آنالیز وارد کنید در قاعدهٔ آن یک خط راست ترسیم کنید به‌طوری که مطمئن شوید منحنی‌های مجاور (از نظر مکانی) از هم تفکیک شده‌اند (شکل ۷). این مرحله از کار نیازمند قضاوت شما در این مورد است که در کجا منحنی پایان یافته و زمینه شروع می‌شود.

۱۲- وقتی از مجزا شدن منحنی‌ها اطمینان حاصل کردید ابزار Wand را انتخاب کنید. با استفاده از ابزار Wand داخل منحنی‌های دلخواه را کلیک می‌کنید و نرم‌افزار دانسیته و مساحت نسبی را در پنجره نتایج به نمایش می‌گذارد.

۱۳- در آغاز ما باندهای مربوط به Loading-control موجود در تصویر وسترن نمونه را انتخاب می‌کنیم (ردیف پایین). از بالای نمودار دانسیته شروع کرده و با ابزار Wand داخل قله اول کلیک کنید (تصویر ۱۵). به محض کلیک کردن، رنگ آن قله تغییر می‌کند. باندهای بعدی مربوط به کنترل داخلی را به ترتیب از بالا به پایین کلیک کنید. اگر قله یا قله‌هایی قابل مشاهده نیست با پایین نگهداشتن کلید Spacebar و همزمان با بالا یا پایین کشیدن از طریق ماوس، نمودارها را نمایش دهید بعد کلیک کردن با Wand را تا آخرین باند کنترل ادامه دهید.



شکل ۱۵) کلیک در داخل قلهٔ کنترل داخلی با ابزار Wand
تک تک منحنی‌های مربوط به کنترل داخلی را از بالا به پایین کلیک کنید و فعلا کاری
به باندهای پروتئینی دیگر نداشته باشید.

۱۴- وقتی همه منحنی‌های مربوط به کنترل داخلی انتخاب شد از منوی Analyze زیرمنوی Gels گزینهٔ Label Peaks را کلیک کنید هر کدام از منحنی منحنی‌های بر اساس اندازه نسبی که به صورت درصد می‌باشد نامگذاری می‌شود در این مرحله می‌توانید به پنجره نتایج رفته و از منوی Edit گزینه Copy All را انتخاب کرده و سپس داده‌ها را در برنامه Excel با انتخاب Paste یا Ctrl+V برجای می گذارید.

stds	Area	Percent
1	8398.657	40.828
2	8398.657	40.828
3	2476.657	12.04
4	1296.657	6.303

شکل ۱۶) مقادیر مساحت و درصد برای منحنی‌های مربوط به کنترل داخلی رسم شده از تصویر ژل یا بلات.
چنان‌که مشاهده می‌کنید Lane های ۱ و ۲ مساوی هستند و این نتیجه با شدت رنگ مشاهده شده در تصویر همخوانی دارد (شکل ۱۲).

۱۵- حالا مراحل ۱۳ و ۱۴ را برای منحنی‌های مربوط به باندهای پروتئینی تکرار کنید. ما انتخاب منحنی‌های پروتئینی را جدای از منحنی‌های مربوط به کنترل داخلی عمل می‌کنیم بنابراین، محاسبات انجام شده در مورد کنترل داخلی در محاسبات منحنی‌های پروتئینی تداخلی ایجاد نمی‌کنند. همان‌طور که قبلاً نیز انجام دادیم با ابزار Wand داخل تک تک منحنی‌های مربوط به پروتئین‌های اصلی را از بالا به پایین کلیک کنید و در مرحله آخر از منوی Analyze زیرمنوی Gels گزینه Label Peaks را انتخاب کنید. در این مرحله نیز نتایج نشان داده شده در پنجره نتایج را کپی کرده و در کنار داده‌های قبلی در برنامه Excel جایگذاری کنید (شکل ۱۷).

ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی

stds	Area	Percent
1	8398.657	40.828
2	8398.657	40.828
3	2476.657	12.04
4	1296.657	6.303
Samples	Area	Percent
1	4265.485	40.585
2	4265.485	40.585
3	1284.485	12.222
4	694.485	6.608

شکل ۱۷) نتایج مربوط به کنترل داخلی با برچسب stds و نتایج مربوط به پروتئین‌های اصلی با برچسب samples نشان داده شده‌اند.

تعیین مقادیر نسبی پروتئین‌ها

اینک براساس داده‌های جمع‌آوری شده در برنامه Excel ما می‌توانیم مقادیر نسبی پروتئین‌ها را در وسترن بلات انجام شده، محاسبه نماییم. به یاد داشته باشید که Area و Percent حاصل از برنامه ImageJ به صورت مقادیر نسبی هستند و منعکس کنندهٔ قله‌های انتخاب شده می‌باشند.

۱- آنالیز را با محاسبه مقدار دانسیته نسبی برای کنترل‌های داخلی شروع کنید. در این مثال Lane یک کنترل ما محسوب می‌شود و داده‌های سه کنترل دیگر را نسبت به آن می‌سنجیم. برای این کار مقدار درصد هر کدام را به مقدار درصد Lane 1 تقسیم کنید (شکل ۱۸).

stds	Area	Percent	Rel. Density
1	8398.657	40.828	1
2	8398.657	40.828	1
3	2476.657	12.04	0.294896
4	1296.657	6.303	0.154379

شکل ۱۸) برای محاسبی دانسیته نسبی کنترل‌های داخلی نسبت به کنترل ۱ مقدار درصد هر کدام را به مقدار درصد Lane 1 تقسیم کنید.

۲ – حال برای محاسبه مقادیر دانسیته نسبی برای باندهای پروتئینی اصلی نیز همین کار را تکرار می‌کنیم، یعنی مقدار درصد هر یک را به مقدار درصد Lane 1 تقسیم می‌کنیم.

stds	Area	Percent	Rel. Density
1	8398.657	40.828	1
2	8398.657	40.828	1
3	2476.657	12.04	0.294896
4	1296.657	6.303	0.154379
Samples	Area	Percent	Rel. Density
1	4265.485	40.585	1
2	4265.485	40.585	1
3	1284.485	12.222	0.301146
4	694.485	6.608	0.162819

شکل ۱۹) مقادیر دانسیته نسبی را برای منحنی‌های مربوط به پروتئین‌های اصلی نیز محاسبه کنید. در این کار درصد مربوط به Lane 1 را به عنوان کنترل در نظر بگیرید (در این مثال برابر 40.585).

ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی

یادآوری: به خاطر اینکه باندهای مربوط به کنترل داخلی در چهار بار نمونه‌گذاری یکسان نتایج یکسانی ایجاد نکرده اند (پهنای باند و شدت رنگ متفاوت است) لذا نتایج بدست آمده از مرحله دوم (در مورد باندهای تست) را نمی‌توانیم به عنوان نتایج نهایی مستقیماً برای مقایسه باندهای تست به کار ببریم بلکه لازم است بر اساس مقادیر محاسبه شده برای کنترل‌های داخلی (در هر ستون) مقادیر حاصل برای تست‌ها را اصلاح نماییم. توجیه ما برای انجام چنین عملکردی این است که ما فرض می‌کنیم که تفاوت‌های مشاهده شده در درصد مربوط به کنترل‌های داخلی، نشانگر تفاوت‌ها در مقدار کل پروتئین وارد شده به آن چاهک‌ها بوده است.مثلا در همین تصویر وسترن نمونه که ما در اینجا آنالیز کردیم تفاوت‌های واضحی در مقدار پروتئین کل لود شده برای هر ستون مشاهده می‌شود که شاید به دلیل نقص در عملکرد پی‌پت‌ها باشد.

۳- مرحله آخر در این تبدیل داده‌ها، دخالت دادن اختلاف دانسیته مشاهده شده برای کنترل داخلی (در ستون‌های مختلف) بر دانسیته نسبی بدست آمده برای تست‌ها (در آن ستون‌ها) می‌باشد. برای این کار در برنامه Excel مقدار دانسیته نسبی تست را (در هر ستون) به دانسیته نسبی محاسبه شده برای کنترل در آن ستون تقسیم می‌کنیم.

stds	Area	Percent	Rel. Density	
1	8398.657	40.828	1	
2	8398.657	40.828	1	
3	2476.657	12.04	0.294896	
4	1296.657	6.303	0.154379	
Samples	Area	Percent	Rel. Densi	Adj. Density
1	4265.485	40.585	1	1
2	4265.485	40.585	1	1
3	1284.485	12.222	0.301146	1.021194
4	694.485	6.608	0.162819	1.054667

شکل ۲۰) برای محاسبهٔ مقادیر دانسیته متعادل شده برای تست‌ها (خانه‌های زرد) دانسیته نسبی هر کدام از تست‌ها را به دانسیته نسبی کنترل در همان ستون تقسیم می‌کنیم. مثلاً دانسیته نسبی برای نمونه تست ۴ (عدد 0.1628) بر دانسیته نسبی کنترل ۴ (عدد 0.154379) تقسیم شده است تا دانسیته نسبی متعادل شده یعنی عدد 1.054 حاصل شود.

۴- به این دلیل که ما در هنگام لود کردن نمونه‌ها و کنترل داخلی، تلاش می‌کنیم که مقادیر یکسانی را (از نظر غلظت پروتئین) وارد چاهک‌ها نماییم، بنابراین، انتظار داریم همه باندهای گرفته شده از کنترل داخلی در همه ستون‌ها نتایج یکسانی ایجاد نمایند (از نظر شدت رنگ و پهنای باند). اما همه چیز طبق پیش‌بینی ما پیش نمی‌رود و در عمل تفاوت‌های جزئی یا واضح در میان باندهای مربوط به کنترل داخلی (و به همان نسبت در میان نمونه‌های تست) اتفاق می‌افتد. حال بعد از انجام اصلاحات (از طریق محاسبه) دانسیته متعادل شده نمونه‌ها همگی به عدد ۱ نزدیک شده‌اند لذا نشان می‌دهد که نسبت پروتئین تست به پروتئین کنترل داخلی در نمونه‌ها یکسان بوده است یعنی اصلاحات انجام شده مفید فایده و اطمینان بخش بوده‌اند.

مثال‌های ارائه شده در بالا فقط به عنوان آموزش بود و در عمل شما تمهیداتی را به کار می‌گیرید که پروتئین لود شده به همه چاهک‌ها مقادیر یکسانی داشته باشند. مثلاً از طریق روش BCA

غلظت نمونه‌ها را اندازه می‌گیرید و مقدار مناسبی از نمونه را با دقت به چاهک‌ها اضافه می‌کنید. ابزارها و پی‌پت‌های دقیقی را به کار می‌گیرید و مهارت لازم را در این زمینه کسب می‌کنید.

استفاده از این روش متعادل سازی برای آنالیز چند ژل

برای متعادل سازی داده‌های مربوط به چند ژل (برای انجام مقایسه بین آنها) لازم است که اولاً روش دقیق و مطمئنی برای انتقال مقدار معینی از پروتئین به یکی از چاهک‌های همه ژل‌ها داشته باشیم سپس بایستی از یک محلول پروتئینی استاندارد در همه ژل‌های تهیه شده (از اول تا آخر روند الکتروفورز و وسترن بلاتینگ) استفاده کنیم و یک چاهک را برای آن اختصاص دهیم. برای مثال می‌توان از HSP انسانی تخلیص شده برای اینکار استفاده کرد و ۱ میکرولیتر به همه ژل‌ها در یکی از چاهک‌ها منتقل کرد. یا اگر مشکل هزینه مطرح باشد می‌توانید این استاندارد بین ژلی را خودتان از طریق مخلوط و هموژن کردن چندین ترکیب پروتئینی درست کرده و الیکوت نمایید. اگر چه ما در این حالت غلظت واقعی پروتئین را نمی‌دانیم اما قادر خواهیم بود مقادیر یکسانی را برای ژل‌های متفاوت در نظر بگیریم تا عمل متعادل سازی و مقایسه به راحتی قابل انجام باشد.

هدف:

تفاوت‌های و انحرافات در مقایسه بین چندین ژل از آنجا ناشی می‌شود که: کارآیی آنتی‌بادی برای ژل‌های مختلف ممکن است متفاوت باشد (مثلاً اگر به خاطر مسائل مالی مجبور هستید از یک مخلوط آنتی‌بادی برای چندین ژل استفاده کنید)، در مراحل شستشو و بلوکینگ ژل‌ها ممکن است تفاوت های باشد و یا ممکن است تفاوت‌ها به دلیل استحالهٔ تدریجی کمی‌لومینسانس مورد استفاده در آشکارسازی آنتی‌بادی‌ها اتفاق بیفتد و یا ممکن است ژل‌های متفاوت زمان‌های متفاوتی را با فیلم اشعه ایکس روبرو شده‌اند. همه این تفاوت‌ها منجر به تفاوت در شدت و مساحت باندهای ایجاد شده در بین دو یا چند ژل می‌گردد. اگر از پروتئین استاندارد استفاده شود ابتدا همه باندهای روی یک ژل نسبت به باند استاندارد سنجیده می‌شوند پس اختلاف بین ژل‌ها عملاً حذف خواهد شد (شکل ۲۱).

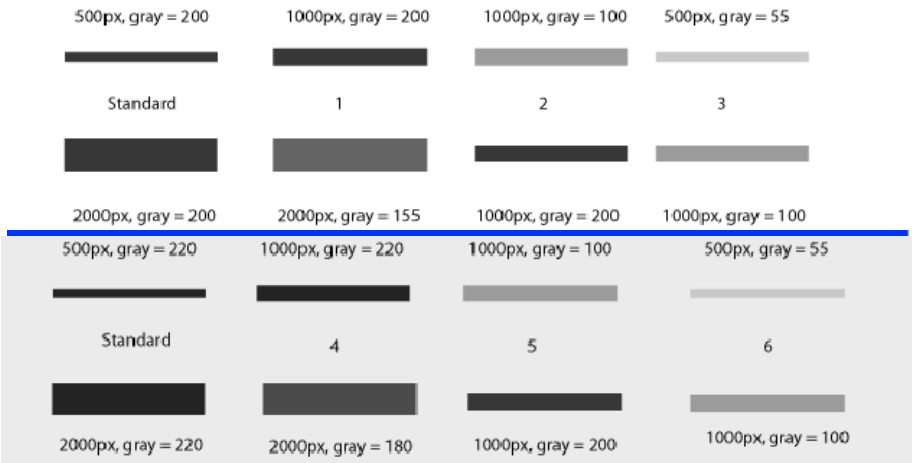


Figure 21. Two example western blots with a common standard sample (Lane 1). The binding/incubation/development steps of these

ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵ - سلیمانی

two blots varied slightly, resulting in a different final exposure which alters the absolute densities on the two blots. Because we have a standard sample on both blots, which is an identical volume of an identical protein sample (i.e. drawn from a common aliquot of homogenate), we can express the densities of the other lanes on each gel relative to the standard sample, eliminating the effects of the differing exposures.

Finally, if you are using a loading-control protein band (lower row on these blots) on each gel, and a standard protein sample on multiple gels, you can correct both for differences in total protein loaded in a lane (using the loading-control band) and for differences in exposure between gels (using the standard sample).
For example, consider the two gels in Figure 22. The 1st (white) gel has minimal background noise, and there is some variation the amount of protein loaded in each lane, as revealed by the size and density of the loading control bands of the samples. The 1st lane on the left is our standard sample used on each gel. The 2nd (gray) gel has more background noise due to a different exposure time, poor washing, or any number of possible problems. Again, there are different protein quantities loaded in the 4 lanes, based on the size and density of the loading-control bands on the lower half. The 1st lane on the left is the same standard protein sample as that used on the 1st gel.
We would start by analyzing the two gels separately, using the protocol in the loading-control portion of this document.

1. Calculate the relative density of the loading-control bands (lower row on this gel). Use the loading-control band for the standard in lane 1 to do this calculation.
2. Calculate the relative density of the bands for the protein band of interest (upper row on this gel). Use the protein band of interest for the standard in lane 1 to do this calculation.
3. Adjust the relative densities calculated in Step 2 using the relative densities for the loading-control bands calculated in Step 1. Simply divide the relative density from Step 2 for each lane by the corresponding relative density from Step 1.

After you've scaled the density of the protein of interest for each sample to the standard sample, and adjusted the relative density based on the loading-control band, you are left with an estimate of the relative density of the protein of interest in each lane on your gel (relative to the standard in lane 1). Repeat this for each separate gel. When finished, you'll note that because every sample lane is normalized to the standard sample in Lane 1 on that particular gel, and every gel contains the same standard sample, your cross-gel comparison is already accomplished, since every sample is now normalized to the same standard sample (Figure 22).

ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
سلیمانی - ۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵

Load-control band	Area	Percent	Rel. Density
Standard	8398.657	42.335	1
1	5458.657	27.515	0.649935
2	4398.657	22.172	0.523727
3	1582.657	7.978	0.188449

Sample band	Area	Percent	Rel. Density	Adj. Density
Standard	2311.485	26.809	1	1
1	4309.485	49.983	1.864411	2.868612
2	1571.485	18.227	0.679884	1.298163
3	429.485	4.981	0.185796	0.98592

Load-control band	Area	Percent	Rel. Density
Standard	8398.657	45.041	1
4	5542.657	29.725	0.659954
5	3562.657	19.106	0.424191
6	1142.657	6.128	0.136054

Sample band	Area	Percent	Rel. Density	Adj. Density
Standard	2297.485	28.812	1	1
4	4301.485	53.944	1.872275	2.836978
5	1135.485	14.24	0.494239	1.165131
6	239.485	3.003	0.104227	0.766075

Figure 22. Example data from two western blots. The Relative Densities of the loading-control bands (lower bands on each gel, red and yellow lines) was calculated, using the value for the standard in Lane 1 (lower band) on each gel. The Relative Densities for the sample bands (upper row on each gel, blue and green lines) were calculated separately, and were normalized relative to the standard in Lane 1 (upper band). The "Adjusted Density" for each sample lane was calculated by dividing the sample relative density by the loading-control relative density for each lane separately (i.e. for sample 3, 0.185796/0.188449 = 0.98592).

After all of this work, you're left with (adjusted) Relative Densities for each of your samples (the yellow cells in Figure 22). At this point you can ignore the values of the standard samples, since you only needed those to ensure that your cross-gel comparisons were scaled properly. Now you can finally begin calculating average relative density values for your experimental control samples (maybe these are samples 3+6) and your experimental treatment samples (perhaps these are samples 1+4 and 2+5) to carry out the real comparison of protein expression under your treatment conditions. Because your relative density values are all normalized to the standard sample, you may wish to eventually re-scale your relative density values once again using your experimental controls' average value as a baseline.

A few extra details:
With regard to the ImageJ gel analysis routine, there has been some question of what the values reported by ImageJ correspond to. The images below may help illustrate what Image-J is measuring.

ترجمه و تألیف تخصص ماست. (فایل آماده چاپ کتاب را از ما تحویل بگیرید)
سلیمانی - ۰۹۱۹۴۶۵۴۶۸۵

Figure 25. A comparison of "area" values returned by ImageJ.

In Figure 25 above, I have drawn out a set of fake “bands” in Adobe Illustrator. The gray value and area of each band are listed above the band (in this case a lower pixel value = darker band). Additionally, I have included the “area” value returned by Image-J after plotting the bands and clicking in each peak with the Wand tool. Note that these “area” values are a RELATIVE measure of the size and density of each peak you clicked with the wand tool. When you halve the area of a band, but maintain the same gray value (compare lanes 1+2), the value reported by ImageJ is half as large. By the same token, if you halve the gray value but maintain the same area (compare lanes 1+5), the value reported by Image-J is halved.

Figure 26. Image-J will return similar area values when bands have equivalent numbers of pixels of equal darkness, but vary in shape.

The same holds true for bands of different shapes. In Figure 26 above, altering the shape of the band, but maintaining the same gray value and area (compare lanes 1+3) yields an equivalent value from ImageJ.

Figure 27. Image-J deals with gaps in bands just fine. Note however that the "area" values returned by ImageJ are different compared to Figure 26 and Figure 27, because the number of lanes, size of the bands, and density of the bands has changed.

Image-J also accounts for gaps in a band, as shown in Figure 27 above. Compare lanes 1+3, which both have an equal number of gray pixels and equal gray values (i.e. equal amounts of protein on the gel). ImageJ reports the same “area” value for both of these lanes. It is worth reiterating that the “area” values and percentages reported by Image-J are always relative to the total size and density of bands that you have selected in a particular image. In the image immediately above, the band in column 1 returns an “area” value of 4000, while in the previous two images column 1 had the same size band, but with twice the gray value, which in both cases also returned a value of 4000. The raw values returned by Image-J are meaningless for

comparing across different gels, since they are only a relative measure of the bands you've highlighted on a particular gel image. This is why we need to standardize to some common standard loaded onto all of the gels