

Analiza prążków na przykładzie RAPD

Grzegorz Góralski

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin
Instytut Botaniki
Uniwersytet Jagielloński
[www: ggoralski.pl](http://www.ggoralski.pl)

1. RAPD - Teoria

2. Część praktyczna

Dane do pobrania: ggoralski.pl

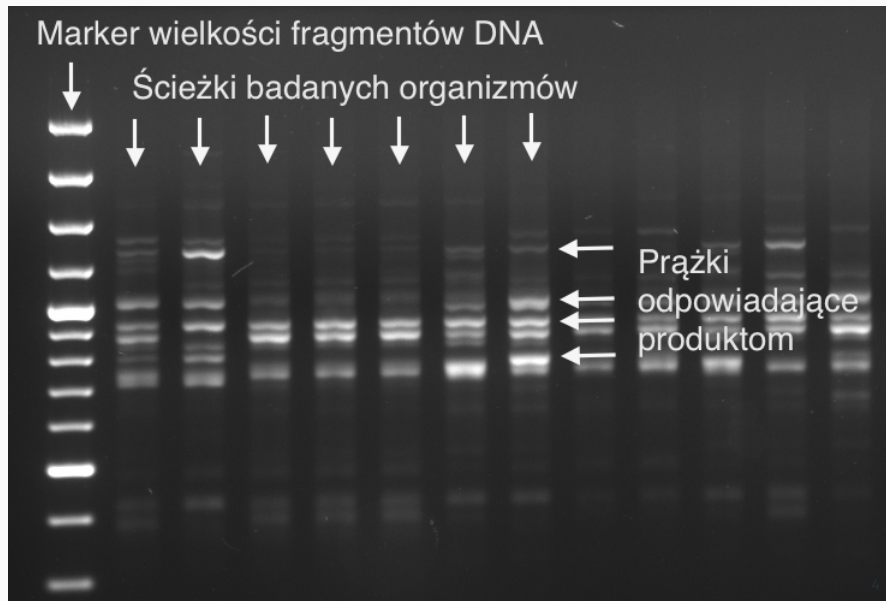
zakładka: Metody laboratoryjne w badaniach genetycznych I

RAPD - Teoria

Czym jest RAPD?

- RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) to metoda badania zróżnicowania genetycznego organizmów
- Krótkie startery umożliwiają amplifikację losowych fragmentów genomów, których zestaw jest charakterystyczny dla poszczególnych organizmów - im bardziej się różnią od siebie tym więcej różnic można znaleźć w otrzymanych zestawach zamplifikowanych fragmentów.
- W wyniku elektroforezy otrzymujemy obraz elektroforetyczny, który pokazuje zamplifikowane fragmenty genomów badanych organizmów.
- Dalsza analiza polega na porównywaniu zestawu otrzymanych prążków.
- Wyniki można przedstawić np. w formie drzewa filogenetycznego.

Jak czytać obraz elektroforetyczny



- Ścieżki różnią się od siebie występowaniem prążków na określonych wysokościach, co odpowiada obecności produktów o określonej długości cząsteczki DNA.
- Można to przedstawić za pomocą matrycy, w której 1 oznacza występowanie prążka a 0 jego brak:

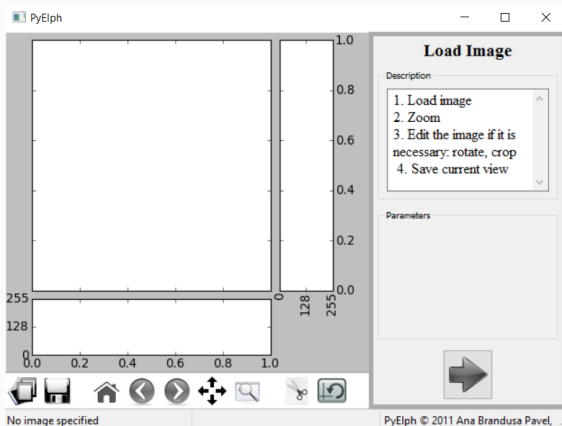
Produkt (starter/bp)	Lp.	1	2	3	4	5	6
RAPD1/2800	1	1	1	1	1	1	1
RAPD1/2200	2	1	1	1	1	1	1
RAPD1/2000	3	1	1	1	1	0	0
RAPD1/1800	4	1	0	0	0	0	0
RAPD1/1750	5	0	1	0	0	0	0
RAPD1/1700	6	1	1	1	1	1	1
RAPD1/1650	7	1	1	1	1	1	1

- Dalej taką matrycę się odpowiednio formatuje i używa do wygenerowania drzewa.
- Drzewo jest generowane na podobnej zasadzie jak drzewo budowane na podstawie sekwencji DNA, z tym, że w tym przypadku zamiast czterech znaków odpowiadających nukleotydom (A, C, G, T) bierze się pod uwagę dwa znaki odpowiadające występowaniu lub nie prążków (1, 0).
- Matryce można tworzyć „ręcznie” poprzez wizualną identyfikację prążków i wpisywaniu znaków do matrycy albo użyć odpowiedniego programu, co pozwala znacznie zautomatyzować pracę.
- Do takich programów należy darmowy PyE1ph.

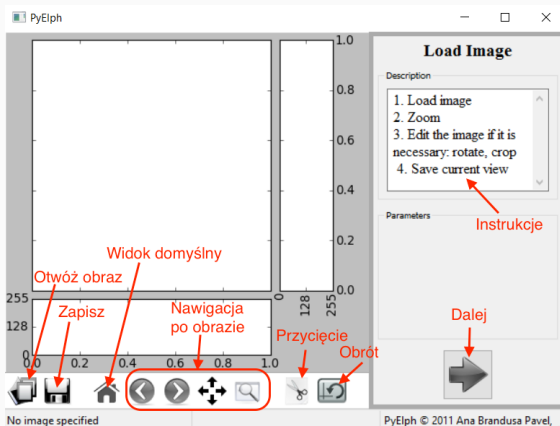
Część praktyczna

- Program **PyElph** służy do analizy obrazów żeli oraz filogenetyki.
- Można go zainstalować pod systemami Windows oraz (wg. autorów) Linux.
- Artykuł zawierający opis funkcjonalności oraz linki do materiałów pomocniczych można znaleźć tutaj:
<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-13-9>
- Strona domowa projektu z której można pobrać program znajduje się pod adresem:
<https://sourceforge.net/projects/pyelph/>
- Aby uniknąć problemów (o czym później) program należy zainstalować w swoim katalogu domowym.

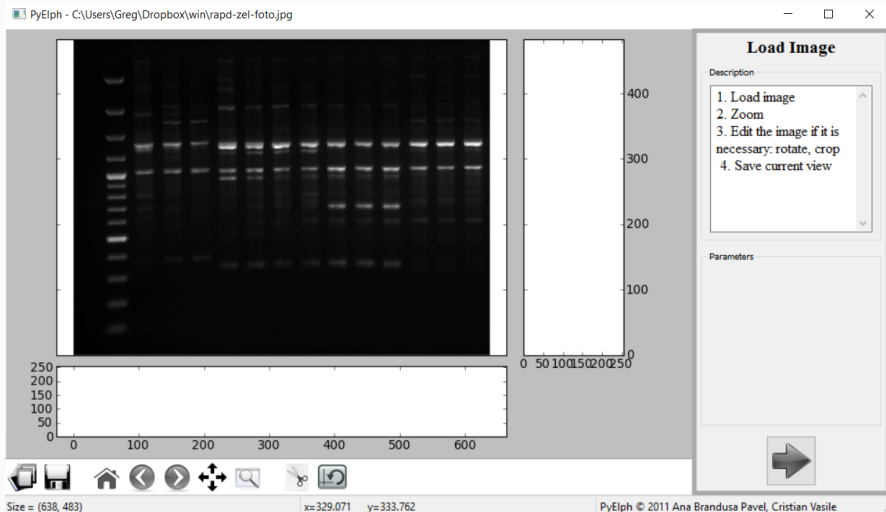
- Po otwarciu programu pokazuje się okno:



- Ważniejsze elementy interfejsu:



- Otwórz zdjęcie `rapd-zel-foto.jpg`:



- Po wciśnięciu „Dalej” pokazuje się na dole wykres pokazujący jasność elementów na zdjęciu oraz pokazują się opcje wykrywania ścieżek:

The screenshot displays the PyElph software interface. The main window shows a gel electrophoresis image with several lanes. Below the image is a plot of intensity versus lane position, showing a series of peaks corresponding to the bands in the lanes. To the right of the image is a vertical axis labeled from 0 to 400. The bottom of the window features a toolbar with various icons for file operations and navigation.

Lane Detection

Description

1. "Detect" button is for automatic lane detection
2. If automatic lane detection does not work properly, you can:
 - a. manually select or remove lanes
 - b. manually define the

Parameters

Lane width: Auto : 0

Width deviation: 25 %

Background subtraction

Detect

← →

Size = (638, 483)

PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

PyElph - wykrywanie ścieżek

- Wciskamy „Detect”. Pokazują się wykryte przez program ścieżki. Na dole pojawiają się ikony służące do usuwania i dodawania ścieżek. Można też poeksperymentować z ustawieniem wartości „Width deviation”.

The screenshot displays the PyElph software interface. The main window shows a gel image with 14 lanes, each labeled with a number from 1 to 14. The lanes are separated by vertical blue lines. Below the gel image is a plot showing the intensity profile of the lanes, with the x-axis ranging from 0 to 600 and the y-axis from 0 to 250. To the right of the gel image is a vertical plot showing the intensity profile of the lanes, with the x-axis ranging from 0 to 250 and the y-axis from 0 to 400. The right sidebar contains the "Lane Detection" panel, which includes a description, parameters, and a "Detect" button. The parameters section shows "Lane width" set to "Auto : 23" and "Width deviation" set to "25 %". There is also a checkbox for "Background subtraction" which is currently unchecked. At the bottom of the interface, there are several icons for navigation and editing, including a home icon, a back icon, a forward icon, a zoom icon, a pan icon, a plus icon, a minus icon, and a delete icon.

PyElph - C:\Users\Greg\Dropbox\win\rapd-zel-foto.jpg

Lane Detection

Description

1. "Detect" button is for automatic lane detection
2. If automatic lane detection does not work properly, you can:
 - a. manually select or remove lanes
 - b. manually define the

Parameters

Lane width: Auto : 23

Width deviation: 25 %

Background subtraction

Detect

Size = (638, 483)

PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

PyElph - usunięcie tła

- Po kliknięciu na pole przy „Background subtraction” (w prawym panelu) zostają usunięte zbędne elementy tła:

The screenshot displays the PyElph software interface. The main window shows a grayscale image of a road with 14 vertical lanes detected, numbered 1 to 14 at the top. Below the image is a plot of the lane width profile, showing a series of peaks corresponding to the lanes. To the right of the image is a vertical plot showing the lane width profile. The bottom of the window features a toolbar with icons for file operations, navigation, and zooming.

The right panel is titled "Lane Detection" and contains the following information:

- Description:**
 - "Detect" button is for automatic lane detection
 - If automatic lane detection does not work properly, you can:
 - manually select or remove lanes
 - manually define the
- Parameters:**
 - Lane width: Auto : 23
 - Width deviation: 25 %
 - Background subtraction
- Buttons:** Detect, Left Arrow, Right Arrow

A red arrow points to the "Background subtraction" checkbox, which is checked.

PyElph - Zaznaczanie ścieżki

- Po kliknięciu na wykrytą ścieżkę, zostaje zaznaczona.

PyElph - C:\Users\Greg\Dropbox\win\rapsd-zel-foto.jpg

Lane Detection

Description

1. "Detect" button is for automatic lane detection
2. If automatic lane detection does not work properly, you can:
 - a. manually select or remove lanes
 - b. manually define the

Parameters

Lane width: Auto : 23

Width deviation: 25 %

Background subtraction

Detect

Size = (638, 483) x=191.016 y=94.9268

PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

PyElph - Usuwanie ścieżki

- Po kliknięciu na ikonę z X zaznaczenie ścieżki zostaje usunięte.

The screenshot displays the PyElph software interface. The main window shows a gel electrophoresis image with 13 lanes, numbered 1 to 13 at the top. Vertical blue lines indicate the detected lane boundaries. Below the image is a plot of intensity versus lane number, showing a series of peaks corresponding to the lanes. To the right of the main image is a vertical plot with a y-axis from 0 to 400 and an x-axis from 0 to 50. On the far right, there is a 'Lane Detection' control panel. It includes a 'Description' section with instructions: '1. "Detect" button is for automatic lane detection', '2. If automatic lane detection does not work properly, you can: a. manually select or remove lanes, b. manually define the'. Below this are 'Parameters' for 'Lane width' (set to 'Auto : 23'), 'Width deviation' (set to 25%), and a checkbox for 'Background subtraction'. A 'Detect' button is located at the bottom of the panel. At the very bottom of the interface is a toolbar with icons for file operations, navigation, and a red 'X' icon for removing a lane.

PyElph - dodawanie ścieżki

- Usuniętą albo niewykrytą ścieżkę można ręcznie zaznaczyć rysując na niej prostokąt:

PyElph - C:\Users\Greg\Dropbox\win\rp-d-ze-foto.jpg

Lane Detection

Description

1. "Detect" button is for automatic lane detection
2. If automatic lane detection does not work properly, you can:
 - a. manually select or remove lanes
 - b. manually define the

Parameters

Lane width: Auto + 23

Width deviation: 25 %

Background subtraction

Detect

Size = (638, 483) add lane, x=215.866 y=213.654 PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

- Jeśli jednak decydujemy się trwale usunąć ścieżkę powtórnie klikamy przy „Background subtraction”, ścieżka znika ze zdjęcia:

The screenshot displays the PyElph software interface. The main window shows a gel electrophoresis image with 13 lanes labeled 1 through 13. Vertical blue lines indicate detected lanes. Below the image is a plot of intensity versus lane number, showing peaks for each lane. To the right is a 'Lane Detection' control panel with a description, parameters (Lane width: Auto = 23, Width deviation: 25%, Background subtraction: checked), and a 'Detect' button. At the bottom, there are navigation icons and a 'remove lane' button.

PyElph - C:\Users\Greg\Dropbox\win\rabd-zel-foto.jpg

Lane Detection

Description

1. "Detect" button is for automatic lane detection
2. If automatic lane detection does not work properly, you can:
 - a. manually select or remove lanes
 - b. manually define the

Parameters

Lane width: Auto = 23

Width deviation: 25 %

Background subtraction

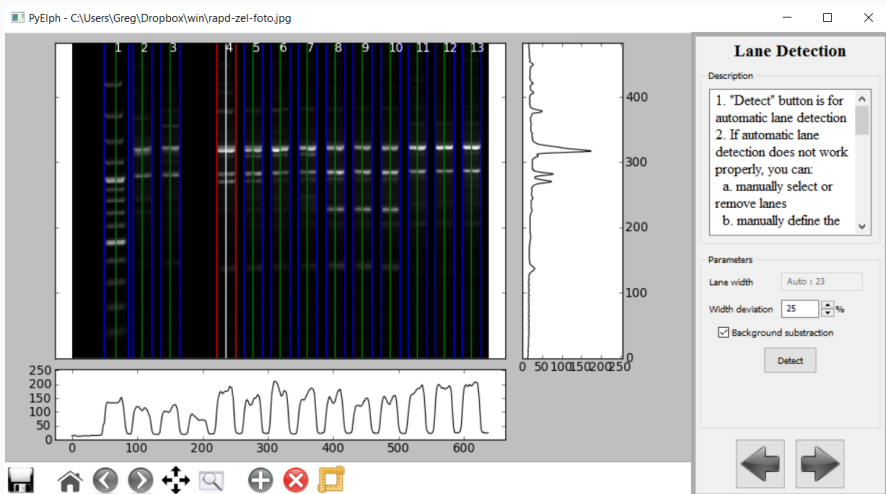
Detect

Size = (638, 483) remove lane

PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

PyElph - jasność prążków w ścieżce

- Po zaznaczeniu ścieżki po prawej stronie pokazuje się wykres jasności prążków w ścieżce. Może pomóc przy zaznaczaniu prążków:



PyElph - detekcja prążków

- Po wciśnięciu „Dalej” przechodzimy do etapu detekcji prążków. Po prawej stronie znajdują się opcje ustawień „czułości” wykrywania prążków. Po wciśnięciu „Detect” pojawiają się zaznaczenia znalezionych prążków.

The screenshot displays the PyElph software interface. The main window shows a grayscale image of a document with vertical lines. The detected bands are highlighted with vertical lines of various colors (red, green, blue). A small window titled "Band Detection" is open on the right, showing a description of the detection process and parameters. The parameters are: Threshold: 20, Filter width: 2, and Filter passes: 5. A "Detect" button is visible below the parameters. The interface also includes a toolbar at the bottom with icons for file operations and navigation.

PyElph - C:\Users\Greg\Dropbox\win\rapd-zel-foto.jpg

Band Detection

Description

- "Detect" button is for automatic band detection
- If automatic band detection does not work properly, you can:
 - manually select or remove bands

Parameters

Threshold: 20

Filter width: 2

Filter passes: 5

Detect

Size = (638, 483)

PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

PyElph - detekcja prążków ustawienia

- Jeśli domyślne ustawienia nie dają zadowalających wyników, należy spróbować innych. Jeśli chcemy usunąć zaznaczenia prążków, należy je zaznaczyć a następnie kliknąć na ikonę X:

The screenshot displays the PyElph software interface. The main window shows a grayscale image of a document with vertical lines. The image is overlaid with a grid of vertical lines, numbered 1 through 13. A white box highlights a specific band, and a red 'X' icon is visible in the bottom toolbar, indicating the removal of a band. Below the image is a line graph showing the intensity profile of the document. To the right of the image is a vertical axis with numerical values from 0 to 400. The bottom toolbar contains various icons, including a red 'X' icon for removing bands. The status bar at the bottom shows the coordinates of the selected band: "remove band, x=511.304 y=365.515".

Band Detection

Description

1. "Detect" button is for automatic band detection
2. If automatic band detection does not work properly, you can:
 - a. manually select or remove bands

Parameters

Threshold

Filter width

Filter passes

Size = (638, 483)

remove band, x=511.304 y=365.515

PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

PyElph - usuwanie prążków

- Zaznaczenia na prążkach znikają:

PyElph - C:\Users\Greg\Dropbox\win\rpdp-zele-foto.jpg

Band Detection

Description

- "Detect" button is for automatic band detection
- If automatic band detection does not work properly, you can:
 - manually select or remove bands

Parameters

Threshold: 12

Filter width: 2

Filter passes: 2

Detect

Size = (638, 483) remove band, x=511.304 y=365.515

PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

PyElph - dodawanie prążków

- Niewykryte prążki można dodawać klikając na ikonę + a następnie zaznaczając prążek:

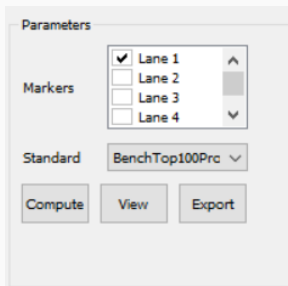
The screenshot displays the PyElph software interface. The main window shows a spectrogram of a signal with several vertical bands highlighted in blue. A green vertical line is positioned at approximately x=236.692. Below the spectrogram is a time-domain plot showing the amplitude of the signal over time. To the right of the spectrogram is a vertical axis labeled from 0 to 450. On the right side of the interface is a 'Band Detection' control panel. It includes a 'Description' section with instructions: '1. "Detect" button is for automatic band detection' and '2. If automatic band detection does not work properly, you can: a. manually select or remove bands'. Below this are 'Parameters' for 'Threshold' (set to 12), 'Filter width' (set to 2), and 'Filter passes' (set to 2). A 'Detect' button is located below the parameters. At the bottom of the control panel are two large grey arrows pointing left and right. The bottom status bar shows the file path 'C:\Users\Greg\Dropbox\win\rabd-zel-foto.jpg', the current coordinates 'add band, x=236.692 y=378.858', and the copyright information 'PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile'.

Size = (638, 483)

add band, x=236.692 y=378.858

PyElph © 2011 Ana Brandusa Pavel, Cristian Vasile

- Po wciśnięciu „Dalej” przechodzimy do ustawienia masy cząsteczkowej markerów. Dzięki temu ustalamy „skalę”, która pozwala oszacować masę cząsteczkową produktów. Najpierw zaznaczamy w której ścieżce (*Lane*) znajdują się markery. W naszym przypadku jest to pierwsza ścieżka:



Parameters

Markers

- Lane 1
- Lane 2
- Lane 3
- Lane 4

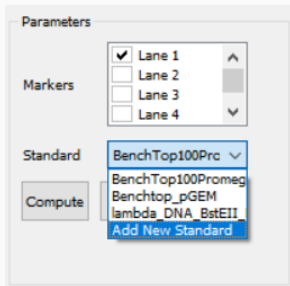
Standard

BenchTop100Prc

Compute View Export

PyElph - standard markerów

- Następnie należy ustawić standard zastosowanych markerów. Ponieważ żaden z domyślnych nie odpowiada użytemu w opracowywanym zdjęciu, wybieramy „Add New Standard”.



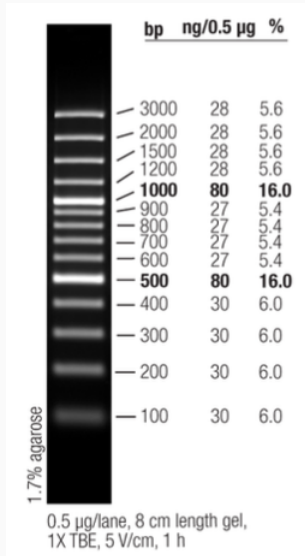
- Jeśli PyElph nie został zainstalowany w katalogu w którym użytkownik ma prawo zapisu plików, nie będzie można zapisać nowego standardu. Dlatego zasugerowałem aby zainstalować program w katalogu domowym użytkownika.

- Informacje na temat masy cząsteczkowej i liczby zastosowanych markerów można znaleźć w dokumentacji. W tym przypadku znajduje się ona pod adresem:

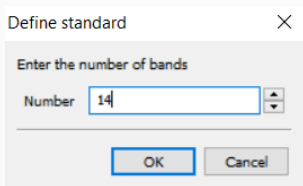
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013032_0GeneRuler_100bp_Plus_DNALadder_RTU_UG.pdf

PyElph - masy cząsteczkowe markerów

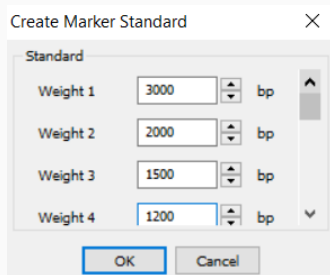
- Tam znajdziemy ilustrację opisującą prążki markerów:



- Ustawiamy liczbę markerów.
- W dokumentacji jest ich 14 i wszystkie znajdują się na zdjęciu, zatem ustawiamy taką wartość:



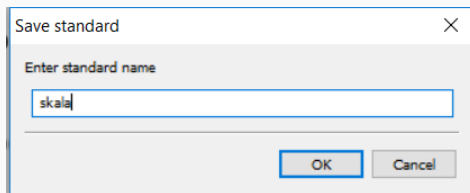
- Wpisujemy wartości dla każdego markera, zaczynając od największej:



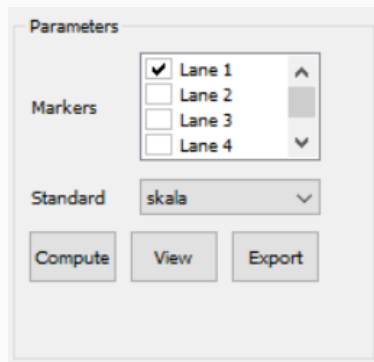
Standard

Weight 1	<input type="text" value="3000"/>	<input type="button" value="▲"/> <input type="button" value="▼"/>	bp
Weight 2	<input type="text" value="2000"/>	<input type="button" value="▲"/> <input type="button" value="▼"/>	bp
Weight 3	<input type="text" value="1500"/>	<input type="button" value="▲"/> <input type="button" value="▼"/>	bp
Weight 4	<input type="text" value="1200"/>	<input type="button" value="▲"/> <input type="button" value="▼"/>	bp

- Nadajemy nazwę:

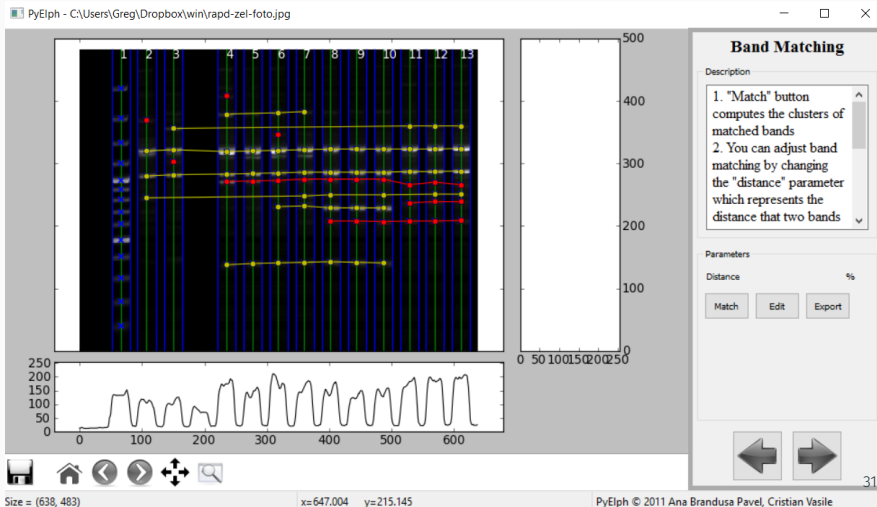


- Wpisana skala pojawiła się w menu:

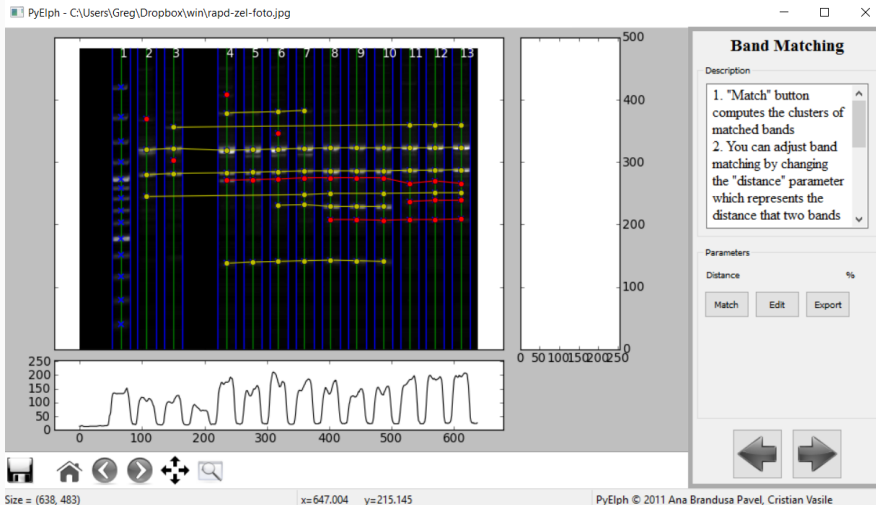


PyElph - znajdowanie klastrów prążków.

- Następnie wybieramy „Compute” i po zatwierdzeniu ścieżki z markerami pojawia się okno w którym zaznaczone są klastry prążków odpowiadające rzędom prążków.



- Detekcja klastrów niekoniecznie jest właściwa. Automatyczne ich wykrywanie można regulować przez ustawienia „Distance”:



PyElph - klastry: poprawki

- Poprawki można też przeprowadzić w inny sposób.
- Po kliknięciu w „Edit” pojawia się tabela.


Edit Match Matrix

Match Matrix

	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	La
Cluster 1			Band 1		
Cluster 2			Band 2		Ba
Cluster 3	Band 1				
Cluster 4		Band 1			
Cluster 5					Ba
Cluster 6	Band 2	Band 2	Band 3	Band 1	Ba
Cluster 7		Band 3			
Cluster 8	Band 3	Band 4	Band 4	Band 2	Ba
Cluster 9			Band 5	Band 3	Ba
Cluster 10	Band 4				
Cluster 11					
Cluster 12					Ba
Cluster 13					
Cluster 14			Band 6	Band 4	Ba

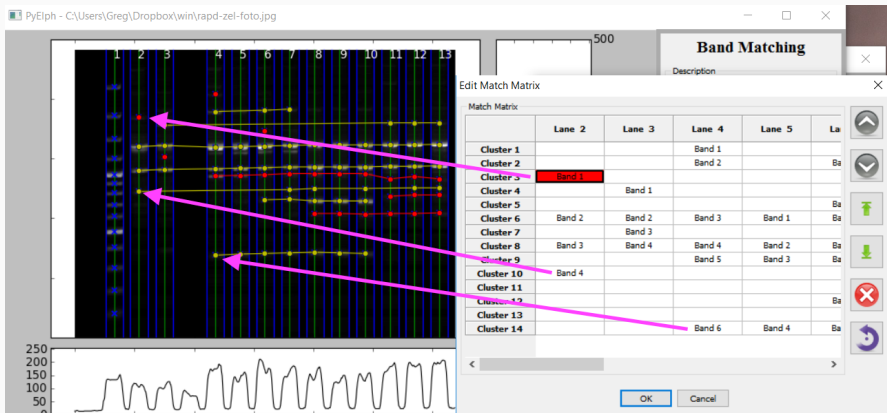
< >

OK Cancel



PyElph - klastry: poprawki

- Poprawki można też przeprowadzić w inny sposób.
- Komórki z wartościami w tabeli odpowiadają zidentyfikowanym prążkom. Są one ułożone w rzędy odpowiadające klastrom.



PyElph - klastry: poprawki







- Korzystając z ikon po prawej stronie można przenosić prążki między klastrami, także tworzyć nowe klastry wstawiając nowe rzędy a następnie przenosząc tam wartości odpowiadające prążkom.

Edit Match Matrix ×

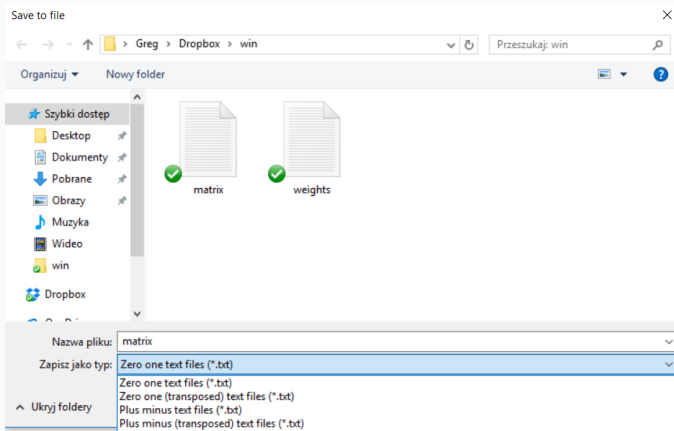
Match Matrix

	Lane 10	Lane 11	Lane 12	Lane 13
Cluster 1				
Cluster 2				
Cluster 3				
Cluster 4		Band 1	Band 1	Band 1
Cluster 5				
Cluster 6	Band 1	Band 2	Band 2	Band 2
Cluster 7				
Cluster 8	Band 2	Band 3	Band 3	Band 3
Cluster 9	Band 3	Band 4	Band 4	Band 4
Cluster 10				
Cluster 11	Band 4		Band 5	Band 5
Cluster 12		Band 5	Band 6	Band 6
Cluster 13	Band 5			
Cluster 14	Band 6	Band 6	Band 7	Band 7
Cluster 15	Band 7			

< >

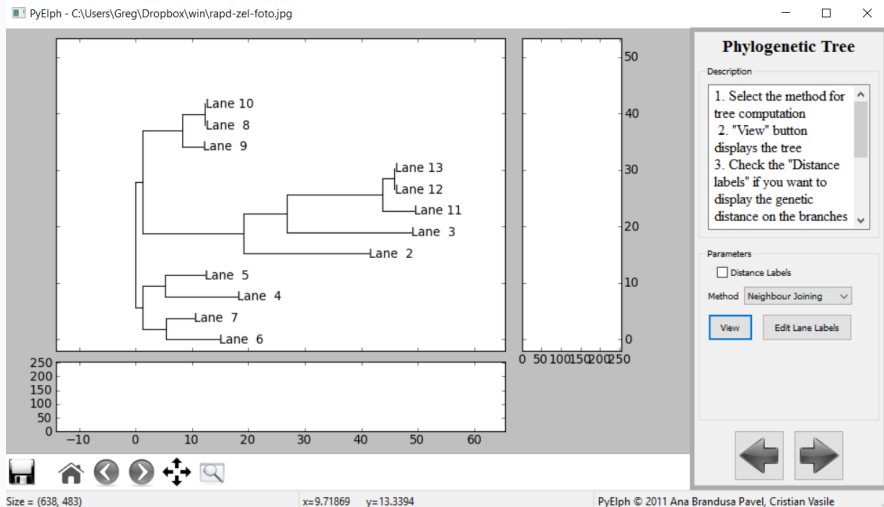







- Dane można zapisać (w różnych formatach), a później użyć ich do wygenerowania drzew filogenetycznych w innych programach.

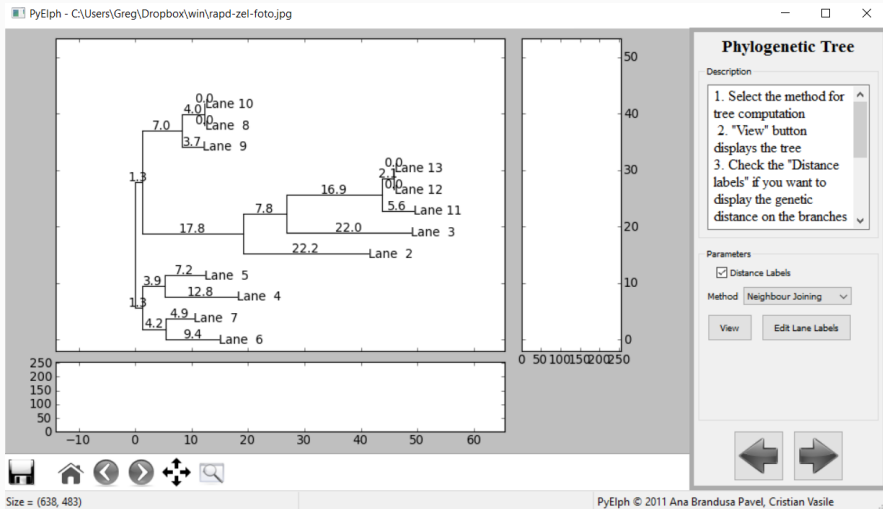


- Teraz jednak pozostaniemy przy PyElph.

- Po kliknięciu w oknie głównym na „Dalej” możemy obejrzeć drzewo:



- Po kliknięciu na pole „Distance Labels” pojawiają się wartości odległości:



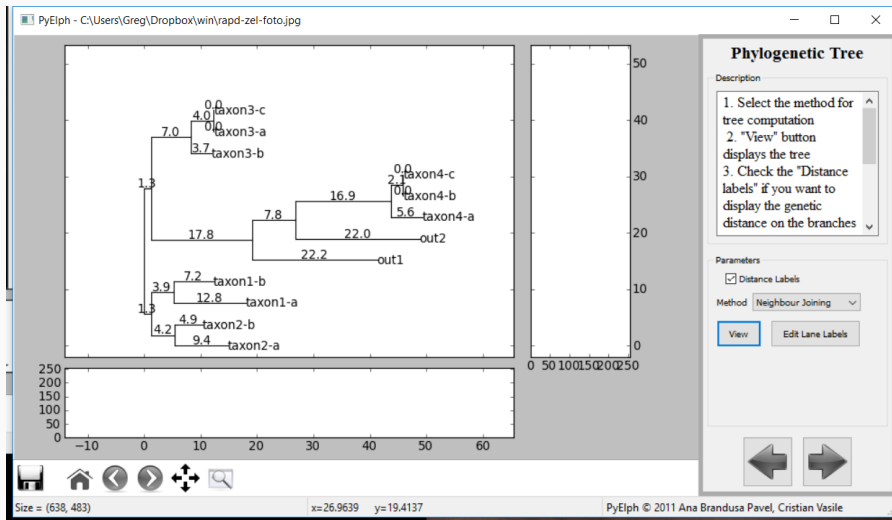
- Następnie po kliknięciu w „Edit Lane Labels” otwiera się okno, w którym można wpisać odpowiednie nazwy próbek (taksonów), które odpowiadają poszczególnym ścieżkom:

The image shows a dialog box titled "Edit Lane Labels" with a close button (X) in the top right corner. The dialog contains a section labeled "Lane Labels" with a vertical scrollbar on the right. There are four rows, each with a label and a text input field:

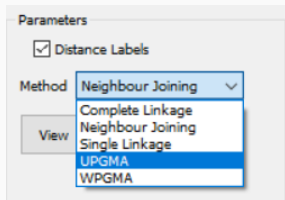
Lane	Label
Lane 2	out1
Lane 3	out2
Lane 4	taxon1-a
Lane 5	taxon1-b

At the bottom of the dialog are two buttons: "OK" and "Cancel". The "OK" button is highlighted with a blue border.

- Teraz na drzewie pojawiają się nazwy:



- Do wygenerowania drzewa można użyć kilku metod:



- Niestety program nie udostępnia wielu opcji edycji drzewa, nie można np. ukorzenić drzewa.

- Ostatnim etapem jest zapis filogramu. Można wybrać spośród kilku formatów.

