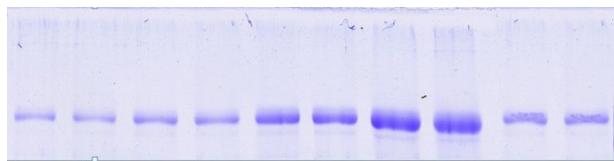


PAGE digital auswerten mit ImageJ: Quantitative Auswertung einer Elektrophorese

Folgende Lactoferrin-Konzentrationen wurden jeweils in Doppelbestimmungen (benachbarte Spuren) aufgetragen. Das Auftragungsvolumen betrug jeweils 5 μL : 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ und 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Die letzten beiden Spuren zeigt die Trennergebnis einer Probe unbekannter Lactoferrin-Konzentration (Doppelbestimmung)



Kalibrierlösungen

Link zum Bild: http://laborberufe.de/sonstiges/lactoferrin_standardkurve.jpg

Bestimmen Sie die ungefähre Lactoferrin-Konzentration in der unbekannt Probe. Nutzen Sie dazu folgende Anleitung:

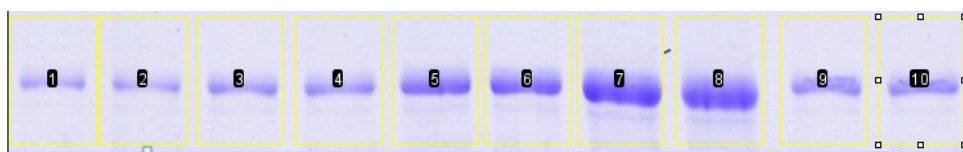
- Bilddatei in herunterladen und in ImageJ öffnen: http://laborberufe.de/sonstiges/lactoferrin_standardkurve.jpg

Variante 1 nach „Quantifying bands on SDS-PAGE using ImageJ.“: <https://youtu.be/t9k8HFL88kk>.

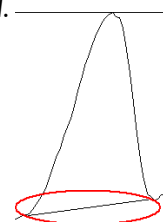
- Voreinstellung: → Analyze → Set Measurement → „Integrated density“ auswählen. Alles andere abwählen. *Integrated intensity: Misst die Farbintensität auf jeder Flächeneinheit (Pixel) innerhalb der ausgewählten Bereichs. Summiert alle gemessenen Werte auf.*
- in Graustufen umwandeln: → Image → Type → 16 bit. Danach mit → Image → Adjust → Brightness/Contrast so optimieren, dass nur die gefärbten Banden zu sehen ist, diese aber vollständig:
- Banden einzeln mit dem Rechteckwerkzeug möglichst genau (ohne Reste) markieren. → Analyze → Measure. Es öffnet sich ein Results-Fenster mit dem Ergebnis(sen). „IntDens“ (integrated density“).
- Schritte mit der nächsten Bande wiederholen.
- Werte abschreiben ODER im Resultsfenster „Save as“ als „csv-Datei“ speichern.

Variante 2 nach „Using ImageJ to quantify protein bands on a PAGE gel“ : <https://youtu.be/JIR5v-DsTds>

- Erste Bande mit dem Rechteckwerkzeug auf der Spur großzügig markieren. Das Rechteck muss in Laufrichtung des Gels deutlich länger sein als breit (vgl. Abb unten), damit die Laufrichtung richtig zugeordnet wird → Analyze → Gels → Select First Lane.
- Das Rechteck durch Maus gedrückt halten auf die zweite Bande schieben → Analyze → Gels → Select Next Lane usw



- Am Ende: → Analyze → Gels → Plot Lanes. Aus Banden sind Peaks geworden, deren Fläche bestimmt werden kann.
- Fläche des Peaks bestimmen => Grundlinie der Peak-Dreiecke mit der Linien-Werkzeug vorgeben. (vgl. Abb. rechts, eingekreister Bereich). Beachten Sie, dass lückenlos geschlossene Flächen entstehen!
- Mit dem Zauberstab (wand tool) auf jede Peakfläche klicken, beginnend mit dem ersten (oberen Peak). Der Zauberstab misst Peakflächen und gibt sie im Result-Fenster an.
- Werte abschreiben ODER im Resultsfenster „Save as“ als csv-Datei speichern.



Auswertung mit LibreOffice CALC

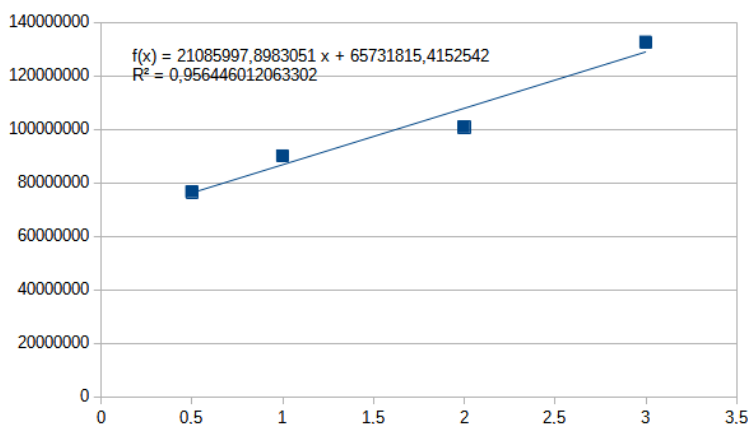
- In LibreOffice CALC die csv-Datei öffnen, dabei „erweitere Zahlenerkennung“ aktivieren. ODER mit Copy-and-Paste aus dem Resultsfenster hinein kopieren.
- Kalibriergerade mit Tabellenkalkulationsprogramm erstellen.

Musterlösung

Variante 1

Nach Umwandlung in Graustufen

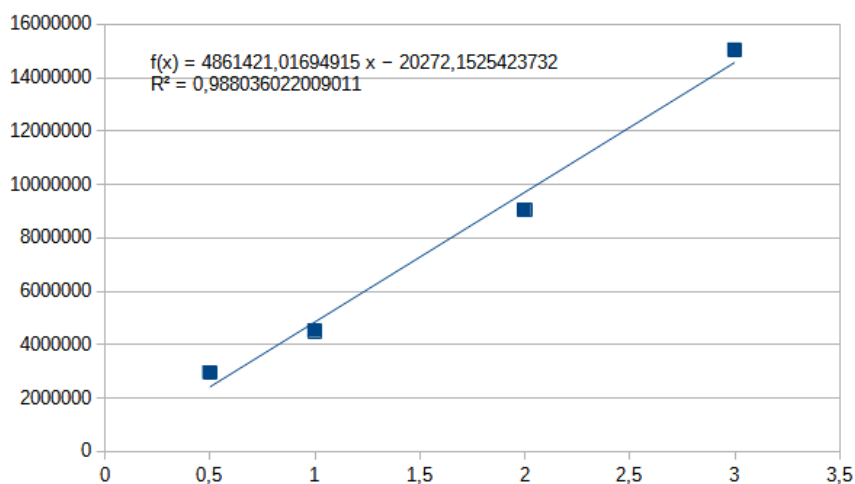
| Banden-Nr. | Gehalt | Integrated Density | Mittelwerte |
|------------|--------|--------------------|-------------|
| 1 | 0,5 | 67153760 | 76549398,5 |
| 2 | | 85945037 | |
| 3 | 1 | 87410299 | 90043476 |
| 4 | | 92676653 | |
| 5 | 2 | 105543198 | 100766025,5 |
| 6 | | 95988853 | |
| 7 | 3 | 147265759 | 132627348 |
| 8 | | 117988937 | |
| 9 | Probe | 78845825 | 81898548 |
| 10 | | 84951271 | |



Gehalt der Probe berechnen: $81898548 = 21085998 \cdot x - 65731815 \Rightarrow x \approx 0,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

Variante 2

| Banden-Nr. | Gehalt | Area | Mittelwerte |
|------------|--------|----------|-------------|
| 1 | 0,5 | 3027518 | 2942397 |
| 2 | | 2857276 | |
| 3 | 1 | 4565882 | 4509675 |
| 4 | | 4453468 | |
| 5 | 2 | 8985803 | 9035621 |
| 6 | | 9085439 | |
| 7 | 3 | 15447480 | 15030455 |
| 8 | | 14613430 | |
| 9 | Probe | 5588589 | 5425175 |
| 10 | | 5261761 | |



Gehalt der Probe berechnen: $5425175 = 4861421 \cdot x - 20272 \Rightarrow x \approx 1,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$