

## Protocollo utilizzo ImageJ – quantificazione proteica su gel

Una volta installato Fiji-ImageJ è possibile utilizzarlo per l'analisi delle immagini.

- Acquisire l'immagine del gel: è importante averla a disposizione in formato TIF
- Aprire ImageJ
- Aprire l'immagine in formato TIF tramite ImageJ
- Convertire l'immagine in 8-bit (*Type > 8-bit*)
- Quando vengono acquisiti i gel, le immagini sono su fondo chiaro, mentre le bande su fondo scuro; per poter analizzarle è però necessario invertirle tramite il comando "Invert" (*Edit > Invert*)
- Tramite *Image > Transform > Rotate* è necessario raddrizzare l'immagine rispetto all'asse x; se fosse necessario, tramite lo stesso comando (*Transform*) deve essere anche capovolta, così da avere le zone dei pozzetti nell'area superiore. Questa operazione serve per poter tracciare i rettangoli per identificare i tracciati elettroforetici.
- Dalla finestra dei comandi, impostare la selezione rettangolare
- Creare un rettangolo sulla prima lane **di campione**, localizzata nella porzione più a sinistra del gel: è fondamentale cercare di includere nel rettangolo solo il tracciato elettroforetico sotto indagine. (Se questo non fosse possibile per una forte distorsione del gel allora si può diminuire la larghezza del tracciato oppure anche decidere di utilizzare solo una porzione del tracciato stesso, ma le stesse dimensioni e posizioni devono essere mantenute per tutti i tracciati che si vuole analizzare).
- Una volta creato il rettangolo, premere ctrl + 1 per selezionarlo come prima lane (nel caso di Mac: cmd + 1): al centro del rettangolo dovrebbe apparire il numero 1
- Trascinare il cursore all'interno del rettangolo, premere al centro (solo se il cursore è una freccia, se è una mano sposterete altrimenti la selezione senza copiarla) e trascinare: in questo modo verrà copiata la selezione, ottenendo un rettangolo delle stesse dimensioni del primo che sarà possibile localizzare sulla lane accanto.
- Una volta posizionato il rettangolo, premere ctrl + 2 al centro per selezionarlo come lane successiva; ripetere l'operazione così da selezionare tutte le lane contenenti campione (sempre premendo ctrl + 2)
- Quando tutte le lane di campione saranno state selezionate e numerate, creare una nona lane (con lo stesso metodo delle precedenti, così da poter avere la stessa area) e ripetere la selezione, ma in una porzione di gel **libera dal campione** (è fondamentale che venga fatto in una porzione di gel. Questa zona verrà utilizzata per determinare i valori del background

- Una volta che tutte le lane saranno posizionate e selezionate tramite la voce *Analyze* selezionare *Set measurements* e flaggare le voci di *Area* e *Integrated density* (fino alla terza cifra decimale)
- Posizionarsi col cursore sulle singole lane e premere ctrl + m (o in alternativa *tasto destro* > *measure*): il software acquisirà automaticamente i valori di area e integrated density delle regioni selezionate, riportando i valori in una nuova finestra. Ripetere l'operazione per tutte le lane. Attenzione all'ordine con cui effettuate queste operazioni in quanto poi questi dati dovremmo essere copiati per effettuare i calcoli con excel.
- Copiare i valori ottenuti in un foglio di calcolo (attenzione all'indicazione del decimale: excel usa la virgola, mentre ImageJ il punto)
- Se il valore dell'area del bianco e delle altre lane corrispondono, sottrarre il valore di Inden (Integrated Density) del bianco a quelli delle singole lane, ottenendo i valori reali di intensità. Altrimenti è necessario calcolare il valore del background con l'integrated density e l'area.
- Riportarsi i volumi caricati per ogni lane rispetto all'intensità
- Costruire la retta di calibrazione utilizzando i valori di V e Inden di una singola linea cellulare (consiglio: scegliere come standard quella che mostra le lane più definite, di norma quella con valori meno intensi).
- Calcolare a che volume corrispondono i segnali della seconda linea cellulare utilizzando i valori di Inden e interpolando la retta di calibrazione.

A questo punto voi avrete il dato sperimentale (voi avete caricato xy microL e questi corrispondono a zw microL. In questo modo potete calcolare un coefficiente di diluizione.

**Che volume della seconda linea cellulare è necessario caricare su gel perché sia normalizzata rispetto alla prima?**