

GE Healthcare

ImageQuant TL

簡易マニュアル

Rev. 2005.03



GE imagination at work

イントロダクション	3
1. IMAGEQUANT TL の概要	3
2. 連絡先	3
3. ソフトウェアの起動	4
IMAGEQUANT TL ソフトウェアのインターフェイスについて	5
1. コントロールセンターウィンドウ	5
2. メインウィンドウ	5
3. メインメニューバー	6
4. ツールバーについて	6
5. NAVIGATOR について	7
6. 小ウィンドウについて	8
階調調整と疑似カラーについて	9
1. CONTRAST (階調調整)	9
2. 疑似カラー設定	10
1D 解析モジュール	11
1. 目的のエリアの選択 - AREA OF INTEREST (AOI)	11
2. 解析方法の選択	11
3. レーン作成 - LANE CREATION	11
4. バックグラウンド削除 - BACKGROUND SUBTRACTION	15
5. バンド検出 - BAND DETECT DETECTION	16
6. 分子量、等電点 (PI) の計算 - MW/PI CALIBRATION	17
7. 定量 - QUANTITY CALIBRATION	20
8. 標準化 (NORMALIZATION)	21
9. エクスperiment オーバービュー	22
アレイ解析モジュール	23
1. スポットの検出	23
2. バックグラウンド削除	25
3. 標準化	26
4. フラグの表示	27
5. エクスperiment・オーバービュー	27
TOOLBOX	28
1. バンド/スポットの検出	28
2. バックグラウンドの削除	29
3. エクスperiment・オーバービュー	31
4. 画像の切り出し (CROP)	31



イントロダクション

1. ImageQuant TL の概要

ImageQuant™TLソフトウェアは、画像解析に必要な基本的な機能を兼ね備えています。このソフトウェアは、一次元電気泳動やプロッティング、簡単なアレイ、コロニーカウンティング、その他様々な形態の数値化などの画像解析機能を含み、これらはImageQuant TLコントロールセンターの各モジュールとして解析をスタートします。これらのモジュールはそれぞれ、1D、Array、Colony Counter、Toolboxに分かれています。このソフトウェアは簡単かつフレキシブルに画像解析を行うことが可能です。使用前にこのマニュアルをご一読ください。

2. 連絡先

技術的なご質問は

バイオダイレクトライン:

Tel: 03-5331-9336

e-mail: Tech-JP@amersham.com

Web site:

<http://www.amersham.com>

<http://www.jp.amershambiosciences.com>

修理・保守のご連絡は

技術サービスセンター:

東京技術サービスセンター: 03-5331-9315

大阪技術サービスセンター: 06-6305-4707



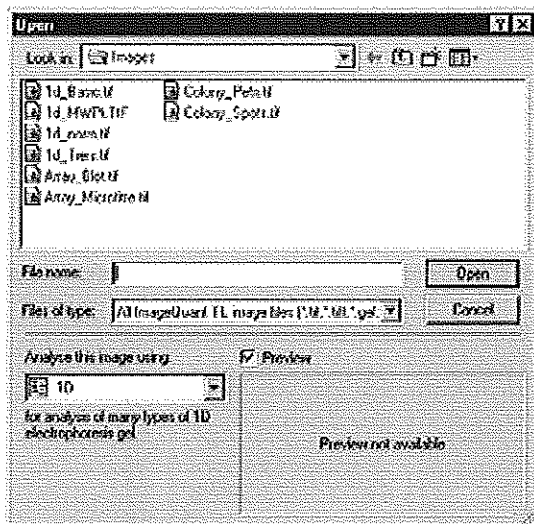
3. ソフトウェアの起動



ImageQuant TLソフトウェアのアイコンをダブルクリックし、起動します。コントロールセンターの画面が立ち上がります。



使用する解析モジュールをクリックすると、画像を呼び出す画面が表示されます。



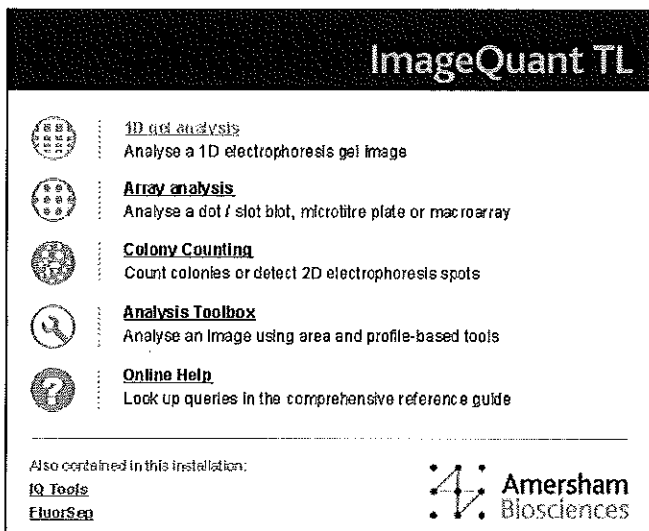
解析する画像ファイルをシングルチャンネルイメージの場合は***.gel ファイルもしくは***.tif ファイルを、マルチチャンネルイメージの場合は、***.ds ファイルを選択し、Openをクリックします。



ImageQuant TL ソフトウェアのインターフェイスについて

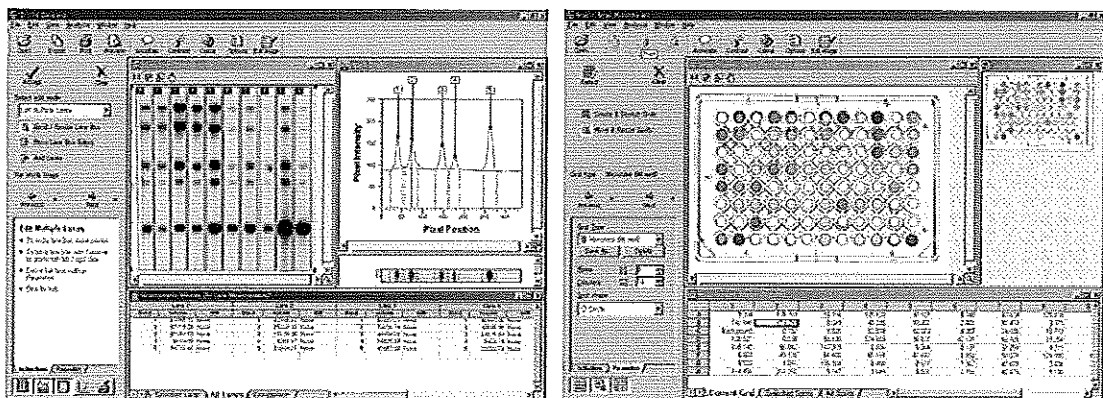
1. コントロールセンターウィンドウ

ImageQuant TLソフトウェアのアイコンを起動すると、コントロールセンターウィンドウが立ち上がります。このウィンドウから1D、Array、Colony Counter、Toolboxの各解析モジュールにアクセスすることができます。また、画像の回転やフィルタリングを行うIQ ToolsやFluorSepソフトウェアもこのウィンドウからアクセス可能です。使用する解析モジュールをクリックすると画像を開くためのダイアログボックスが開きます。使用する画像ファイルを選択しOpenをクリックします。各解析モジュール画面が表示されます。



2. メインウィンドウ

画像の選択を行いOpenボタンをクリックすると、選択した解析モジュールのメインウィンドウが表示されます。メインウィンドウには、メインメニューバー、ツールバー、Navigatorや解析に必要なウィンドウが含まれます。



3. メインメニューバー

メインウィンドウの一番上に位置するメインメニューバーには、このソフトウェアの中で使用する基本的なコマンドやオプションが含まれています。



File メニュー

ファイルを開く (Open Image)、ピクセル強度の反転 (Invert Measurements)、画像情報の確認 (Image Properties)、印刷 (print)、解析モジュールを閉じる (Exit) などの操作を行います。

Edit メニュー

画像および数値データのExport、画像の編集などを行います。

Analysis メニュー

Analysis メニューは解析モジュールごとに異なります。バンド/スポットの検出、バックグラウンド削除、標準化といった解析の各ステップを行います。

View メニュー

画像の拡大/縮小 (Zoom to Fit)、コントラスト調整やカラーセッティング (Contrast、Colour) などを行います。

Window メニュー

Arrange windowsコマンドではデフォルトの小ウィンドウ位置に小ウィンドウを配置します。Close all Windowsコマンドを選択すると全ての小ウィンドウが閉じます。

Help メニュー

Help 検索や、ソフトウェア名、バージョン情報、ライセンス情報の表示を行います。

4. ツールバーについて



Open

ダイアログボックスが表示され、解析を行う画像ファイルやExperimentファイルを選択できます。



Export

アクティブウィンドウになっている画像または数値データをクリップボードにコピーします。



Print

デフォルトプリンターに設定されているプリンターにアクティブウィンドウのデータが排出されます。



Preview

プリントアウトの前に画像や数値データがどのようにプリントされるか確認できます。





Annotate

Annotationモードになり、画像にコメントを入力できます。



Contrast

コントラスト調整と明るさ調整をするダイアログボックスが表示されます。



Colour

擬似カラーを調整するダイアログボックスが表示されます。



Options

オプション設定を行うためのダイアログボックスが表示されます。



Edit Image

画像処理を行うためのダイアログボックスが表示されます。



Channel

Channel ボタンを活用することにより、image window内でマルチカラー表示をコントロールすることができます。

5. Navigator について

メインウィンドウの左端にNavigator機能が表示されます。ここでは、使用する解析モジュールに応じて解析に使用するツールが表示されます。基本的なウィンドウの構造は、どの解析モジュールでも共通です。以下に主な操作方法について記述します。



Clear

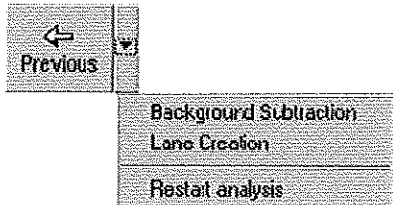
現在解析しているモード内の解析結果が消去されます。



Previous

Navigator内でひとつ前の解析モード状態に戻ります。

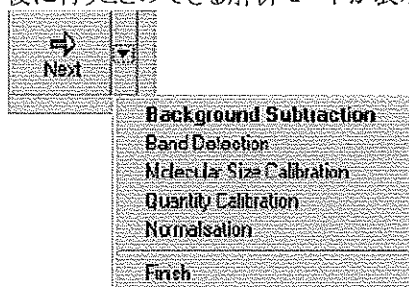
Previousボタンの右側にある下矢印をクリックすると、設定し終わった解析モードのリストが表示されます。モード選択して再度設定を行うことが可能です。





Next

Navigator内で次の解析モード状態に移ります。Nextボタンの右側にある下矢印をクリックすると、その後に行うことのできる解析モードが表示されます。モードを選択して解析を進めることが可能です。



Help

“Click for help”をクリックすると、Navigatorに関連するHelpの表示を行います。



Restart

解析が全て終了すると、Navigator内に、Experiment OverviewページとRestartボタンが表示されます。Restartボタンをクリックすると、解析をし直すか否かを問うメッセージが表示されます。Yesをクリックすると解析モードの一番最初まで戻ります。

パラメータ設定

各解析モジュールの各解析モードによって、それぞれのパラメータ設定画面が表示されます。入力不可の数値を入れた場合は、Text boxが黄色く表示されるか最大値または最小値に自動的に置き換わります。

6. 小ウィンドウについて


メインウィンドウ内はいくつかの小ウィンドウで構成されています。各小ウィンドウはそれぞれ別々の情報を表示します。これらのウィンドウ表示はNavigatorの下のウィンドウセレクトターバーから選択します。小ウィンドウは大きさを自由に変更できます。

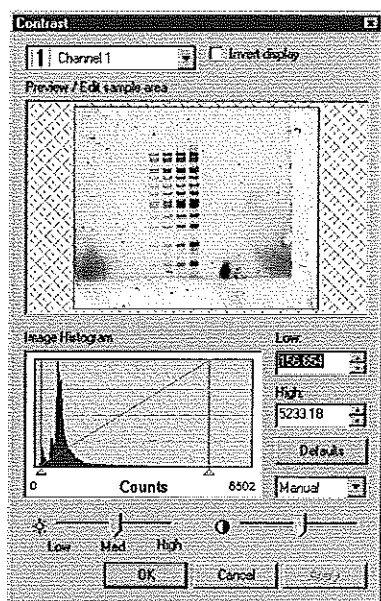


階調調整と擬似カラーについて

階調調整や擬似カラーを付けて見やすくした場合、解析に使用している画像ファイルにのみ適用されます。これはディスプレイ上で見た目にのみ反映され、数値には影響を与えません。

1. Contrast (階調調整)

ツールバーから  Contrast、あるいはメニューバーから View → Contrast を選択します。



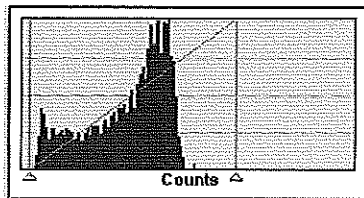
画像の反転

Invert display にチェックを入れると白黒反転します。見た目のみが変更され、数値は変わりません。

Note: この機能は Colony Counter モジュールでは Colour ダイアログボックスに含まれます。

コントラスト調整

Image Histogram は、縦軸がピクセル数、横軸が1ピクセル当りのシグナル強度を示しています。Defaults ボタンの下のプルダウンリストから画像のコントラストの付け方のカーブが選択し、横軸にある左右の△ボタンをクリック&ドラッグすることでコントラストを調整します。また、Low と High のボックスに数値を入力し、表示範囲を決定することもできます。



画像の明るさの調整

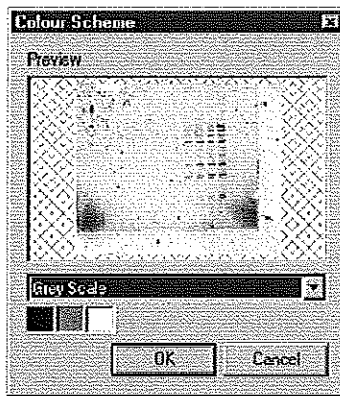
画像の明るさの調整を行います。Low にすると暗く、High にすると明るくなります。



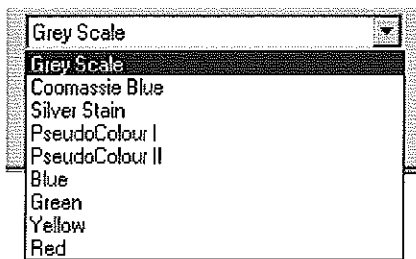
2. 疑似カラー設定



ツールバーから **Colour**、あるいはメニューバーから View → Colour を選択します。



ドロップダウンの Colour Scheme List からカラースキームを選択することができます。



* Colony Counter モジュールでは Reverse colours のチェックボックスにチェックをすると、擬似カラーの色を反転することができます。数値データはそのまま保持されます。



1D 解析モジュール

ImageQuant TLの1D解析モジュールは、ゲルやTLCプレートなどのレーン解析に使用します。様々なツールを使用して、パラメータ調整を行うことが可能です。

1. 目的のエリアの選択 - Area of Interest (AOI)

AOI は自動で解析またはレーン検出を行う場合、目的とするエリアをイメージウインドウ上からクリック&ドラッグして指定します。消したい場合は、イメージ上でクリックしてください。


2. 解析方法の選択

2-1. 自動解析

ImageQuant TLには自動解析モードとマニュアル解析モードがあります。


自動解析モードでは、Navigator中で選択したステップをすべて自動で実行します。マルチチャンネルイメージでは、Navigator中で選択したステップが、すべてのチャンネルに適用されます。



自動解析を行うにはAutomaticボタン  をクリックします。自動解析後、Navigatorに解析の結果が表示されます。レーン設定～バンド検出までを自動で行うことができます。自動解析の後、分子量測定、定量、標準化の解析モードを実行します。

2-2. マニュアル解析



マニュアル解析モードを実行するにはStepwiseボタン  をクリックします。マニュアル解析では、各種パラメータを詳細に設定することができます。

3. レーン作成 - Lane Creation

自動レーン作成とマニュアルレーン作成の双方が可能です。


マルチチャンネルイメージ

マルチチャンネルイメージの場合は、すべてのレーンに対してレーンが作成されます。


作成したレーンには、自動的に各レーンに番号が付けられます。

3-1. 自動レーン作成

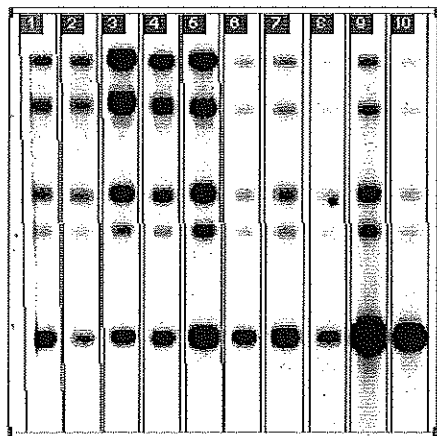


Navigator内のCreateボタン  をクリックします。枠が正確に設定されている場合、Accept ボタン



 をクリックします。もし編集の必要がある場合、Select edit mode > Edit multiple LaneまたはEdit single Laneを用いて編集を行います。これらの機能の詳細は、レーンの編集の項目に記載されています。





Note: 定量解析を行う場合は、レーン幅は厳密に調整してください。

3-2. マニュアルレーン作成

マニュアルでレーン作成を行うために、Navigator内のパラメータ設定を行います。

1. レーンを何段か設定したい場合は、Tierのところに段数を入力します。

Number of Tiers | 1

2. Number of laneの欄にレーン数を入力します。


Number of Lanes | 12

3. Lane % widthを設定します。レーン間の間隔を空けない場合、100%とします。

Lane % width | 90


4. 上記のパラメータ設定が終わったら、イメージウィンドウ上で描きたい位置の左上から右下にクリック&ドラッグしてレーンを作成します。レーン全体を含む外枠をmulti boxと呼びます。



やり直す必要がある場合は、Clearボタン  をクリックしてください。

3-3. レーンの編集

自動またはマニュアルで作成したレーンは、マニュアル編集することができます。電気泳動によるレーンの歪みやバンドの歪みを補正することができます。編集作業はSelect edit mode > Editing multiple

lanesかまたはEditing single lanesを選択して行います。すべての操作を終了したらAcceptボタン  をクリックします。

Editing Multiple Lanes




Lane を一括編集します。Editing Multiple Lanes モードには以下の3つのツールが含まれます。






GE imagination at work

- Bend / Resize Lane box
- Move Lane Box Edges
- Add Lanes

Bend / Resize Lane Box

1. Navigator 内の Bend / Resize Lane Box ボタン  をクリックします。
2. ポインターを multi box (赤線) 上に動かすとポインターが  に、変わります。
3. ポインターが変わったときに線上をクリックするとハンドル  を作成することができます。このハンドルを動かすことにより、レーン全体を歪ませることが可能です。ハンドルを消去する場合は、ポインターをハンドル上に動かし、右クリックをします。
4. また、ポインターを端に合わせると、multi box の大きさを変更することができます。

Move Lane Box Edges

1. Navigator 内の Move Lane Box Edges ボタン  をクリックします。
2. ポインターを multi box (赤線) 上に動かすとポインターが横  と縦  でポインターのアイコンが変わります。クリック&ドラッグして位置を変更します。

Add Lanes



1. Navigator 内の Add Lanes ボタン  をクリックします。
2. イメージの multi box 内でレーンを追加したい部分をクリックすると、レーンが追加されます。

Editing single lanes



個々のレーンを編集します。Editing Single Lanes モードには以下の3つのツールが含まれます。

- Bend / Resize
- Move
- Add Grimaces

Bend


1. Navigator 内の Bend / Resize ボタン  をクリックします。
2. レーンの上下に表示されている白いハンドル  にポインターを動かして左右にクリック&ドラッグすると、レーンの角度を変更することができます。
3. レーン上でクリックするとハンドルを追加(右クリックで削除)することができます。これをクリック&ドラッグすると、レーンを曲げることができます。

Resize

- 1 Navigator 内の Bend / Resize ボタン  をクリックします。
- 2 ポインターを赤いハンドル  上に動かして左右にクリック&ドラッグするとレーン幅を変更することができます。




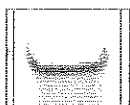
Move

1. Navigator 内の Move ボタン  をクリックします。
2. 動かしたいレーンをクリック&ドラッグします。正確な位置に動かしたらマウスを放します。

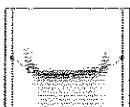
Add Grimaces

バンドがスマイリングを起こしている場合、補正を行うことができます。

1. Navigator 内の Add Grimaces ボタン  をクリックします。
2. スマイリングを起こしているバンドに合わせてクリックするとレーンに対して水平な線が表示されます。この線上をクリックするとハンドルを追加(右クリックで削除)できます。



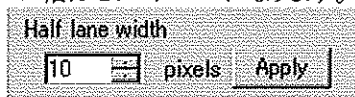
3. これらのハンドルをクリック&ドラッグして動かし、バンドの歪みに合わせます。



この操作は、アナリシスウィンドウに反映されます。

Half Lane Width


レーン作成を行った後、個々あるいはまとめてレーン幅を修正することができます。Editing Multiple Lanes かまたは Editing single lanes のモードを選択した状態で、Navigator の Parameter タブをクリックします。ピクセルサイズを入力します。半値幅を入力するので、10と入力した場合、レーン幅は 20 ピクセルになります。




設定したら Apply ボタンをクリックします。

Delete Current Lane

レーンの削除を行うことができます。Editing Multiple Lanes かまたは Editing single lanes のモードを選択した状態で、Navigator の Parameter タブをクリックします。

消去したいレーンをイメージウィンドウ上で選択し、Delete ボタン  をクリックします。

レーン設定が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を Background Subtraction モードに進めます



4. バックグラウンド削除 – Background Subtraction

ほとんどのイメージは、支持体や染色液などの何らかのバックグラウンドシグナルを含んでいます。従って、数値を算出する前にバックグラウンドの設定を行い、バックグラウンド削除を行うことは非常に重要です。1D解析モジュールでは、6つのマニュアルバックグラウンド消去方法があり、サンプルに応じて選択することができます。ここでは、バックグラウンドの消去方法とパラメータ設定について説明します。


マルチチャンネルイメージ

マルチチャンネルイメージにはすべてのチャンネルに対して同時にバックグラウンドが適用されます。

Navigator 内の Parameter タブをクリックし、バックグラウンドの消去方法を選択します。

1. 使用したいバックグラウンド削除方法を選択します。



2. Subtract ボタン  をクリックし、バックグラウンド削除を行います。

バックグラウンド削除方法は以下の 6 種類です。

Rubber Band

レーンの始点から終点へゴムを伸ばすように、バックグラウンドを引きます。

Minimum Profile

レーン内のシグナルの最小値をバックグラウンドとして引きます。

Rolling Ball

レーンの上にボールを転がすように、バックグラウンドを引きます。Rolling Ballを選択すると、Navigator内に”ボール”の半径の数値(ピクセル値)を入力できます。


Image Rectangle


イメージウィンドウ上でクリック&ドラッグし、バックグラウンドとする任意の枠を作成します。この枠の1ピクセルあたりの平均値がバックグラウンド値としてすべてのレーンに適用されます。

Manual Baseline

アナリシスウィンドウのグラフにバックグラウンドのラインを引きます。このライン上にポインターを動かし、クリックするとハンドルを追加できます。このハンドルをクリック&ドラッグして位置を調整します。

Nonek

None を選択すると、バックグラウンド設定は行われません。Navigator 内の Clear ボタン  と同様の結果が得られます。

バックグラウンド削除が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を Band Detect モードに進めます



5. バンド検出 - Band detect Detection

バンド検出は、自動検出とマニュアル検出があり、検出したバンドの編集も可能です。

ナビゲーター内のDetectボタン  をクリックし、バンド検出を行います。

マルチチャンネルイメージ

マルチカラーチャンネルイメージでは、バンド検出を行うことができません。シングルチャンネルビューモードに切り替えて、個々のチャンネルごとにバンド検出を行ってください。

5-1. バンドの自動検出

バンドの自動検出を行うためには、以下のパラメータの設定を行います。

Minimum slope

このパラメータは、アナリシスウィンドウのグラフのバックグラウンドとピークの勾配の角度の相対値を 0-999 の間で設定します。数値を大きくすればするほど、ピークはシャープでないと認識されないため、バンドは検出されにくくなります。

Noise reduction

このパラメータは、ノイズとしてのピークを削除するために 0-20 の数値を設定します。数値が大きければ大きいほどバンドがノイズとして削除されやすくなります。

Percentage Maximum Peak


このパラメータは、そのレーンで一番高いピークを 100%とした場合、何%以下をバンド検出から削除するかを設定します。このパラメータの設定範囲は、0-100 です。

5-2. イメージウィンドウでのマニュアルバンド編集

バンド検出モードでは、イメージウィンドウ内でバンドの追加や削除を行うことが可能です。また、バンドのエッジを動かすことも可能です。

イメージウィンドウにバンドを追加する


1. ポインターをイメージウィンドウのバンドを追加したい位置に動かします。

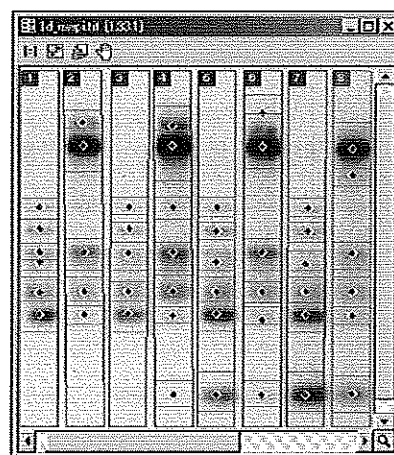
2. ポインターが  の形になったら画面をクリックします。バンドが追加 (右クリックで削除) されます。

バンドが識されると、イメージ上に菱形のマークが表示されます。

イメージウィンドウでエッジを編集する

バンドのエッジを編集することができます。

1. ポインターを編集したいバンドのエッジを示す線上に動かします。
2. ポインターが  の形になったらクリック&ドラッグを行い、幅を変更します。




5-3 アナリシスウィンドウでのマニュアルバンド編集

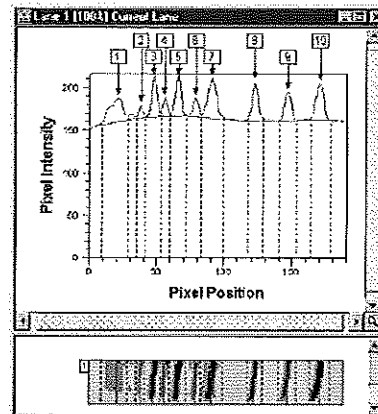
バンド検出モードでは、アナリシスウィンドウ内でバンドの追加や削除を行うことが可能です。また、バンドのエッジを動かすことも可能です。

アナリシスウィンドウにバンドを追加する

1. ポインターをアナリシスウィンドウのバンドを追加したい位置に動かします。

2. ポインターが  の形になったら画面をクリックします。バンドが追加(右クリックで削除)されます。


バンドと認識されると、ピークに左から順番に、自動的に番号がつけられます。




アナリシスウィンドウでエッジを編集する

バンドのエッジを編集することができます。

1. ポインターを編集したいバンドのエッジを示す線上に動かします。

2. ポインターが  の形になったらクリック&ドラッグを行い、幅を変更します。

バンド検出が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を MW/pI calibration モードに進めます

6. 分子量、等電点 (pI) の計算 - MW/pI calibration

分子量/pIキャリブレーションモードでは、標準タンパク質の情報を使用して、未知のタンパク質の分子量やpIを算出することが可能です。標準タンパク質のバンドから標準曲線を作成し、イメージ内の他のレーンのバンドをの数值を算出します。

マルチチャンネルイメージ

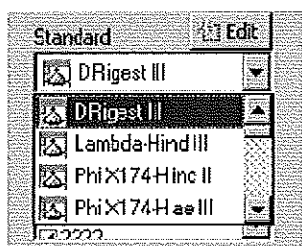
マルチチャンネルイメージでは1つのチャンネルイメージでのみ標準サンプルの設定が可能です。シングルチャンネルビューモードから設定した標準曲線から他のチャンネルイメージのバンド算出を行います。



6-1. 標準レーンの設定

分子量/pIキャリブレーションを行う際には標準レーンのバンドの数値を設定します。

1. Navigatorのパラメータタブを選択し、リストから、使用する標準マーカ名を選択します。



2. 標準マーカを選択すると、設定されている分子量/pIの値が選択リストの下に表示されます。チェックボックスをクリックし、選択するか否かを決定します。



3. イメージウィンドウから標準レーンとして使用するレーンをクリックすると、選択したレーンが標準レーンとして設定されます。


マルチチャンネルイメージ


マルチチャンネルイメージの場合、シングルチャンネルビューモードでのみ設定を行うことが可能です。

6-2. 標準曲線のパラメータ設定と適用

標準レーンの設定が終了したら、ナビゲーターから標準曲線のパラメータ設定を行います。

1. 標準曲線のタイプを選択します。設定した標準サンプルの値をもとに標準曲線の数式が算出され、他レーンの未知のバンドの数値が算出されます。
2. use Rf to propagateにチェックを入れると、絶対的なレーン位置ではなく相対的なレーン位置での分子量が適用されます。


3. Computeボタン  をクリックし、標準曲線を適用し、未知サンプルの分子量/pIの算出を行います。

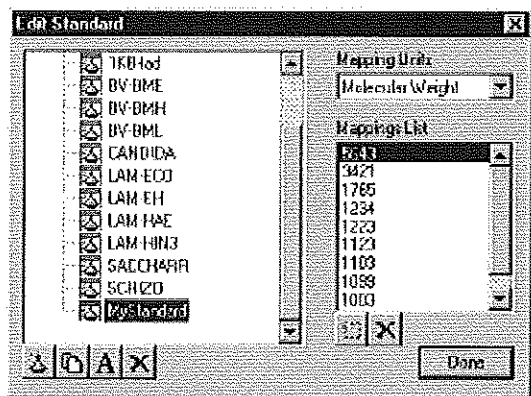
4. 取り消したい場合はclearボタン  をクリックします。




6-3. 標準マーカの新規作成及び編集

このソフトウェアには、一般的な標準マーカリストが含まれています。リストに含まれていない標準マーカを使用する場合、ユーザーが標準マーカの情報をリストに加えて保存することができます。ナ

ビゲーター内のパラメータタブからEdit standardボタン  をクリックすると、Edit standardダイアログボックスが表示されます。

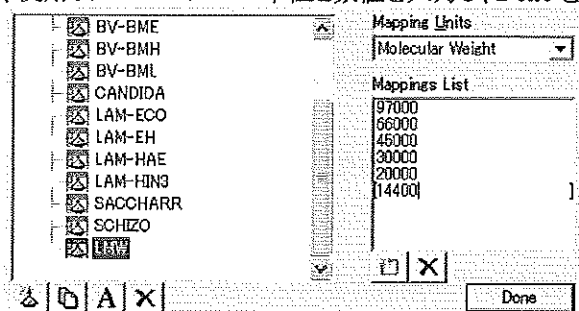



新規標準マーカの追加

1. 新規標準マーカをリストに追加する場合、Create new standard ボタン  をクリックします。リストの中にデフォルトの名前の付いた標準マーカとその数値のリストが表示されます。



2. 名前を付け、使用したいマーカの単位と数値を入力し、Done をクリックします。



分子量、等電点(pI)の計算が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を Quantity Calibration モードに進めます



7. 定量 - Quantity Calibration

定量モードではイメージが持っている数値と既知サンプルの定量値との相関関係をもとに未知のサンプルを定量します。イメージウィンドウ上で既知のバンドの実値を入力します。その数値をもとに標準曲線を作成し、未知サンプルの数値から推定値を算出します。

Note: 1D解析モジュールでは、定量もしくは標準化を行うことが可能ですが、両方同時に同じ experiment ファイル上で行うことはできません。標準化を行った後にこの操作を行おうとすると、標準化した情報が無くなるという警告が表示されます。

7-1. 既知サンプルの値の設定

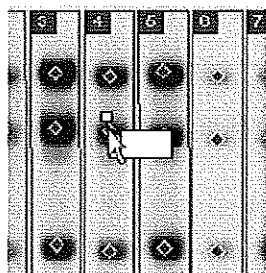
イメージウィンドウから、既知のバンドの値を入力します。

マルチチャンネルイメージ

マルチチャンネルイメージでは、シングルチャンネルビューモードでのみ定量が可能です。個々のチャンネル毎に標準サンプルが必要になります。

ナビゲーター内のパラメータタブを選択します。イメージウィンドウの既知のバンドに数値を入力すると、そのバンドのレーンおよびバンド番号、実値が表示され、あわせて標準曲線がグラフウィンドウに表示されます。

1. メジャーメンツウィンドウに結果が反映されるようにオプション設定を行います。ツールバーのオプションを選択し、Tableタブをクリックします。
2. Calib/Norm Volume, Band Percentage (Calib/Norm)にチェックを入れます。
3. イメージウィンドウから、既知のバンドをクリックするとTextボックスが表示されます。ここに、実値を入力します。



4. Enterキーをクリックすると決定されます。Escキーをクリックすると中止されます。
5. 決定された数値はパラメータタブ内のテーブルに表示されます。
6. 3.-4.の操作を繰り返し、数値入力すると、その度にグラフウィンドウの標準曲線を再計算して表示します。
7. 数値の変更を行いたい場合は、バンドの菱形部分をクリックすると、Textボックスに入力可能になります。





7-2. 標準曲線のパラメータ設定と適用


既知サンプルの定量値の設定が終了したら、Navigatorから標準曲線のパラメータ設定を行います。

1. 標準曲線のタイプを選択します。設定した標準サンプルの値をもとに標準曲線の数式が算出され、未知のバンドの推定値が算出されます。

2. 0点を通過させたい場合は、Force though Originにチェックを入れます。

3. Calibrateボタン  をクリックし、標準曲線を適用し、未知サンプルの推定値の算出を行います。

取り消したい場合はclearボタン  をクリックします。

定量を行わず、標準化を行う場合はNextボタン  をクリックしてNavigatorをNormalizationモードに進めます

8. 標準化 (Normalization)

標準化モードでは、バンドもしくはバンドグループの定量値をもとに、未知のタンパク質の相対値を計算することが可能です。これにより、異なるレーン間やゲル間のタンパク質量の比較を行うことができます。

Note: 1D解析モジュールでは、定量もしくは標準化を行うことが可能ですが、両方同時に同じ experiment ファイル上で行うことはできません。定量を行った後にこの操作を実行すると、定量化した情報が無くなるという警告が表示されます。

マルチチャンネルイメージ

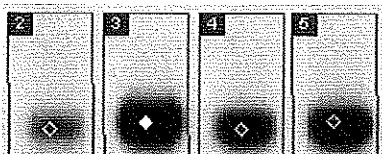
標準化モードはマルチチャンネルイメージでは、シングルチャンネルビューモードでのみ使用可能です。個々のチャンネル毎に標準サンプルが必要になります。

標準化を行うために標準バンドを設定する必要があります。標準化に使用する既知のバンド(グループ)の数値を入力します。


1. メジャーメントウインドウに結果が反映されるようにオプション設定を行います。ツールバーのオプションを選択し、Tableタブをクリックします。


2. Calib/Norm Volume、Band Percentage (Calib/Norm)にチェックを入れます。


3. イメージウインドウ上から、標準バンドとしたい菱形をクリックします。選択したバンドの菱形はデフォルト設定では黄色で表示されます。



4. 3.の操作を繰り返します。
5. ナビゲーター内のパラメータタブを選択します。Normalized Volume parameterに、0.00001から1000000までの数値を入力します。
6. milligram/ microgram/nanogram/ picogram/femtogram/attogram/nanomole/ picomole/ femtomole/ attomoleの中から単位を選択します。
7. 複数のバンドで標準化を行いたい場合は、group average (複数バンドの平均)かcollective option (複数バンドの合計)を選択します。

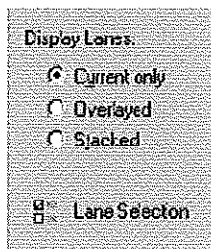
8. 設定が終了したら、Normalizeボタン  をクリックします。

9. やり直す場合は、clearボタン  をクリックします。

標準化が終われば、またはステップするには Next ボタン  をクリックして Navigator を Experiment Overview モードに進めます

9. エクスperiment オーバービュー

エクスperiment オーバービューは解析後の最後に表示されます。ナビゲーターでrestartボタンにチェックを入れると、最初から解析を行います。



1D解析モジュールでは、ナビゲーター内のパラメータタブから、アナリシスウィンドウに表示するレーン設定を変更することが可能です。

1. アナリシスウィンドウを表示します。
2. Current only lane/Overlaid lanes/Stacked lanesのうち、表示したい方法にチェックを入れます。



アレイ解析モジュール

アレイ解析モジュールではマイクロタイタープレート、グリッド入りアレイ、ドットプロットやスロットプロットなどの画像を解析できます。

ここでは画像解析手法の基本的な例について紹介します。解析結果については解析ツールを使って微調整することができます。

1. スポットの検出

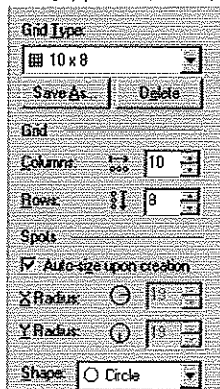
スポット検出のステップは以下の通りです。


1. グリッドタイプを選択するか、新規にグリッドタイプを作成する。
2. 手動または自動でグリッドを作成する。
3. グリッド位置およびスポットサイズを調整する

1-1. グリッドレイアウトの定義

Spot definition ダイアログボックスでは画像のスポットを検出することができます。ダイアログボックス上部にある Grid Type のリストに作成したリストを保存することができます。スポットの検出を始めるにあたり、画像のスポットのサイズと場所を指定します。

1. Navigator 下部のパラメータタブをクリックし、Spot definition ダイアログボックスを表示させます。



2. グリッドタイプを Grid Type リストから選択します。
3. Detect ボタン  をクリックして自動的にグリッドを作成するか、画像上にクリックアンドドラッグで四角形を描き、マニュアルでグリッドを作成します。

ソフトウェアは自動的にスポットを測定し結果をメジャーメンツウィンドウに表示させます。

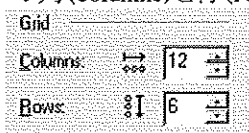


1-2. グリッドタイプの作成

グリッドタイプに目的のグリッドが存在しない場合、作成することができます。

パラメータタブをクリックし、Spot definition モードのパラメータを表示させます。ここでのステップは以下の通りです。

1. グリッドの列 (columns) と行 (rows) の数値を入力します。グリッドの最大数は 48 × 32 です。



2. リストから Spot shape を選択します。


3. Save as ボタンをクリックし、作成したグリッドを保存します。

4. グリッドの名前を入力し OK をクリックします。作成したグリッドはリストに加えられます。


1-3. スポットの移動

グリッド全体や特定のスポットについては、以下の手順で移動することができます。

グリッド全体の移動

1. NavigatorのCreate and stretch gridのボタン  Create & Stretch Grids をクリックします。
2. スポットの上にポインターを合わせ、グリッドを新しい場所へドラッグします。

特定のスポットの移動

1. グループ化したスポットを移動するために、NavigatorのMove and resize spotsボタン  Move & Resize Spots をクリックします。
2. あるスポットを選択、または複数スポットを左上から右下へドラッグして囲むことにより、スポットが強調されます。
3. 選択されたスポットの上にポインターを合わせ、新しい場所へスポットをドラッグします。

斜体画像のグリッドの微調整


斜めになった画像のスポットに合わせてグリッドを調整することができます。グリッドの伸縮によるスポットの移動は以下の通りです。


1. Create and stretch gridsボタン  Create & Stretch Grids をクリックします。
2. グリッドの角のスポットをドラッグして新しい場所へ移動します。スポットの場所はグリッドの4角のハンドル間で均一に伸縮されます。




1-4. スポットのサイズ変更

スポットのサイズ変更には、スポットを伸縮して変更する方法と、スポットの半径を入力する方法の 2 種類あります。スポットを伸縮して半径を変更する方法は以下の通りです。

1. Move and resize ボタン  をクリックします。
2. サイズを変更したいスポットを選択します。
3. スポットの輪郭(上端、下端、左端、右端のいずれか)にポインターを合わせます。ポインターの形が上下の矢印(↑)または左右の矢印(←→)に変更します。
4. 輪郭部をドラッグして選択したスポットのサイズを変更します。

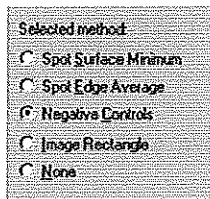
* スポットを選択し、Radius の値  を入力してもスポットサイズが変更されます。

グリッドの検出が十分な場合は Next ボタン  をクリックして Navigator を Background Subtraction モードに進めます

2. バックグラウンド削除

バックグラウンド削除は、画像の一部から測定したバックグラウンド強度を差し引くことです。

Navigator のパラメータタブにある Selected method のリストから適したバックグラウンド削除方法をクリックします。



方法や必要なパラメータを選択すると、メジャーメニューウィンドウに自動的にスポット値が計算され、データが表示されます。

Spot Surface Minimum

この方法はスポット内の最小値のピクセル強度の場所を使用し、各ピクセル値からこの値を引きます。この方法は検出されたスポットが各スポットのバックグラウンド値よりも低い時には確かな方法です。この方法は画像にノイズがほとんど無く、バックグラウンド強度が均一な場合に有効です。

Spot Edge Average

この方法はスポット輪郭の平均強度を計算し、これをスポットのバックグラウンドとします。バックグラウンドはスポット毎に独立して計算します。この方法は局所的にバックグラウンド強度が与えられ、画像のノイズに対して比較的影響を受けないような画像に有効です。

Negative Controls

この方法はフラグが表示されているスポットの内側の総ピクセル強度の平均値を出し、この平均をバックグラウンド強度として適応します。バックグラウンド強度となるスポットを見つける必要があります。この方法ではコントロールとして設定されているウェルと、サンプルを含まないウェルがあるマイ



クロプレート解析に有効です。



1. スポットをクリックするか、スポットの周りをドラッグで選択して、変更したいスポットを選択します。Ctrl キーを押しながら追加することもできます。
2. Navigator の Set native control  を選択します。変更する場合は、Deselect negative control  をクリックします。


Image Rectangle

この方法では画像中に独自の四角形の領域が必要になります。この領域はバックグラウンド強度の平均値が計算されます。この四角形は初期には画像の左上にあり、イメージウィンドウで描くことができます。この方法は画像上に多くのノイズが含まれ、囲んだスポットがしっかりしている場合に有効です。しかしながら、Spot Edge Average の方がよい結果が得られる傾向にあります。

1. バックグラウンドエリアにしたい領域の左上にポインターを合わせます。
2. ポインターを右下へドラッグし、四角形のバックグラウンドを描きます。

None

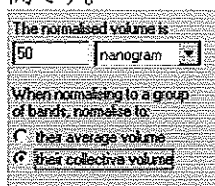
バックグラウンド削除をしない場合に使用します。スポット毎に測定されたボリュームがスポット内の全てのピクセル強度の合計になります。


バックグラウンド削除が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を Normalisation モードに進めます


3. 標準化

選択したスポットのスポット値の標準化は以下の手順で行います。

1. 画面上で標準化に使用するスポットを選択します。
2. パラメータタブに標準化する数値を入力します。入力出来る数値は 0.0001 から 1,000,000 までの間です。



3. 数値の単位をリストより選択します。
4. グループボタン内の、average または collective をクリックします。
5. Navigator 上部の Normalise ボタン  をクリックしメジャーメンツテーブルで表示されるデータを確認します。

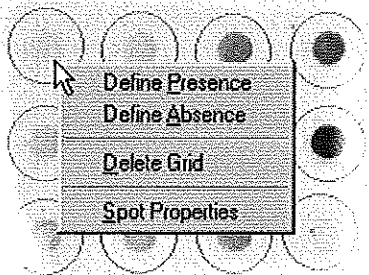
標準化が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を Presence Flagging モードに進めます

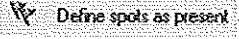



4. フラグの表示

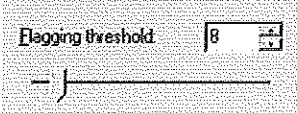
Presence flagging で有用なサンプルの量があるとスポットにフラグを表示させるためにバックグラウンドレベルを設定することができます。Presence Flagging に含まれる基本的な手順は以下の通りです。


1. 閾値の初期設定をする。
 画像上のスポットを右クリックし表示されたメニューから Define Presence または Define Absence を選択します。



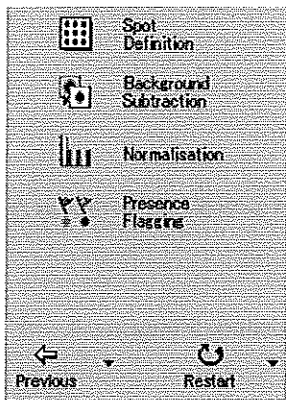
* 画像上のスポットを左クリックで選択し、Navigator から Define Presence  または Define Absence  を選択することでも同様に設定できます。

2. 閾値レベルの微調整をする。
 Flagging threshold のテキストボックスに 0 から 100 までの数値を入力する。または、スライダーを左側 (0) または右側 (100) にドラッグすることで微調整を行います。



フラグ表示が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を Experiment Overview モードに進めます

5. エクスペリメント・オーバービュー









解析が全て終了すると、Navigator内に、Experiment Overviewページとが表示されます。
 各モードのツールボックスをクリックすると、そのモードの解析をやり直すことができます。Restartボタンをクリックすると、解析モードの一番初めまで戻ります。


Toolbox

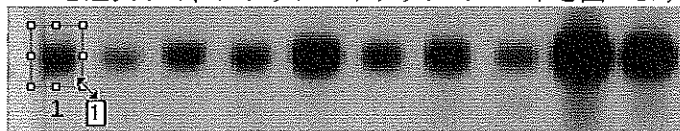
ツールボックスでは、様々な画像を解析することができます。このモジュールでは単一な方法だけでなく、様々な形式で解析ができるため、解析方法として制限を受けずに行えます。解析方法は主にエリア解析とライン解析の二通りがありますが、ここでは一般的なエリア解析の方法について記述します。

1. バンド/スポットの検出

エリアを設定するオブジェクトには Rectangle 、Polygon 、Ellipse 、Closed spline 、Grid 、Autotrace  の 6 種類があります。以降は Rectangle を用いて解析を進めていきます。

1-1. オブジェクトの設定



Rectangle  を選択して、クリック & ドラッグでバンドを囲みます。

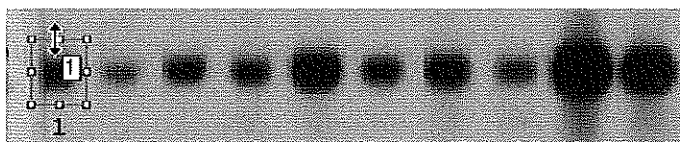


1-2. オブジェクトの編集


画像上にオブジェクトを作成後、オブジェクトのサイズ変更・移動・属性の変更を行うことができます。

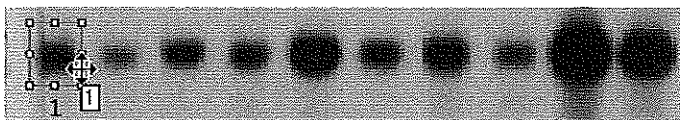
オブジェクトのサイズ変更

1. サイズ変更したいオブジェクトの端にポインターを合わせます。取り扱うオブジェクトの形状によりハンドルにポインターを合わせた時の表示が  または  になります。
2. ハンドルをクリックとドラッグして新しい場所まで移動し、マウスのボタンを離します。



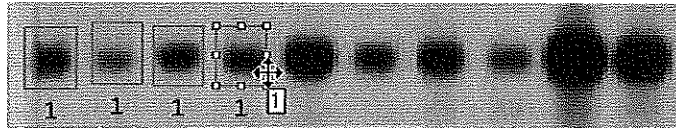
オブジェクトの移動

1. 各オブジェクトやグループのハンドル(小さな四角)以外の輪郭(境)をクリックします。するとポインターの形が変わります()。
2. オブジェクトをドラッグして画面上の新しい場所へ移動します。

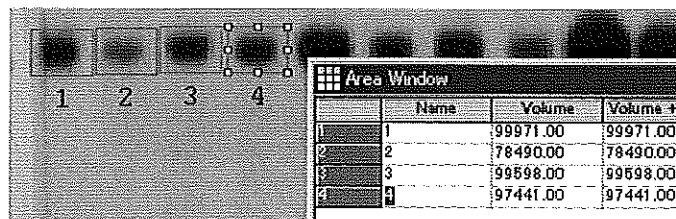



オブジェクトの複製

1. Edit の Copy (Ctrl + C)のコマンドを使用します。選択したコピーはクリップボードに貼り付けられます。Edit の Paste (Ctrl + V)のコマンドを使用すると他の画像や同一の画像の同じ場所にオブジェクトが貼り付けられます。
2. オブジェクトを移動して各バンドを囲みます。



* Area Window の Name を変更すれば、オブジェクトにも同様の名前をつけることができます。

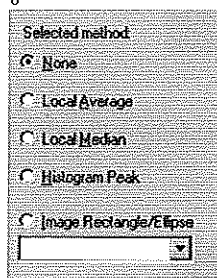


標準化が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を Experiment Overview モードに進めます

2. バックグラウンドの削除

バックグラウンド削除は、画像の一部から測定したバックグラウンド強度を差し引くことです。

1. Navigator のパラメータタブにある Selected method のリストから適したバックグラウンド削除方法をクリックします。



2. 方法や必要なパラメータを選択すると、メジャーメンツウィンドウに自動的にスポット値が計算され、データが表示されます。



None

バックグラウンド削除をしない場合に使用します。測定されたボリュームがエリア内のピクセル強度の合計になります。

Local Average

オブジェクトの外周上の全てのピクセル値を測定し平均値をバックグラウンド値として使用します。

Local Median

オブジェクトの外周上の全てのピクセル値を測定し中央値をバックグラウンド値として使用します。



Histogram Peak

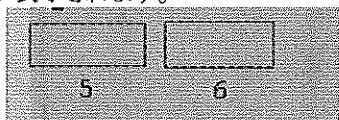
エリア内で出現頻度が高い値をバックグラウンド値として使用します。

Image Rectangle/Ellipse

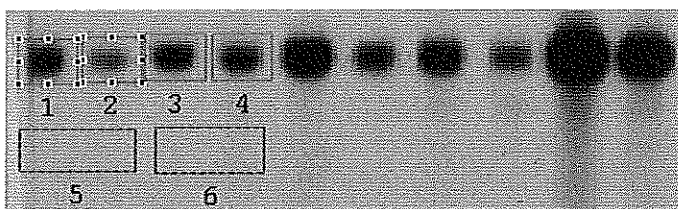
この方法では画像上の特定の四角形や楕円形のエリアが必要になります。そのエリアの平均ピクセル強度をバックグラウンドの強度として使用します。

* 一般的に使用される Image Rectangle/Ellipse の方法について記述します。

1. Navigator の Rectangle  または Ellipse  のボタンをクリックします。
2. 画面上にエリアをドラッグします。ドットで描かれるエリアが表示され、その下には連続したオブジェクト番号が表示されます。




3. バックグラウンド削除の対象となるバンド/スポットについて Ctrl を押しながら複数選択します。




4. Image Rectangle/Ellips をクリックし、選択されたバンド/スポットに用いるバックグラウンドのオブジェクト番号プルダウンから選択します。



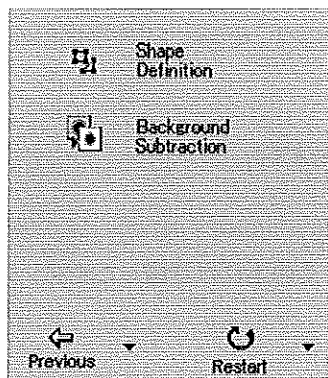
5. Subtract をクリックするとバックグラウンドの値が算出され、Volume 欄にバックグラウンドが差し引かれた値が表示されます。



Name	Volume	Volume - Ba.	Background
1	43227.26	105608.00	62380.74
2	21521.26	83902.00	62380.74
3	105098.00	105098.00	0.00
4	102977.00	102977.00	0.00

バックグラウンド削除が終われば Next ボタン  をクリックして Navigator を Experiment Overview モードに進めます

3. エクスペリメント・オーバービュー




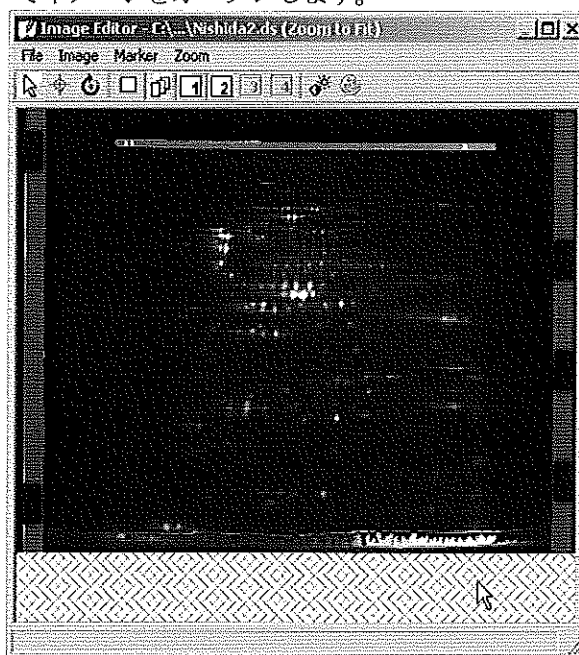
解析が全て終了すると、Navigator内に、Experiment Overviewページが表示されます。

各モードのツールボックスをクリックすると、そのモードの解析をやり直すことができます。Restartボタンをクリックすると、解析モードの一番初めまで戻ります。

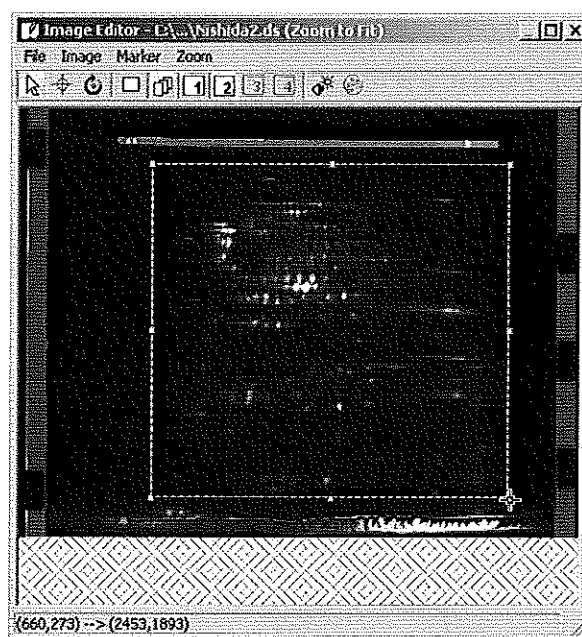


4. ゲル画像の切り取り(Crop)の手順

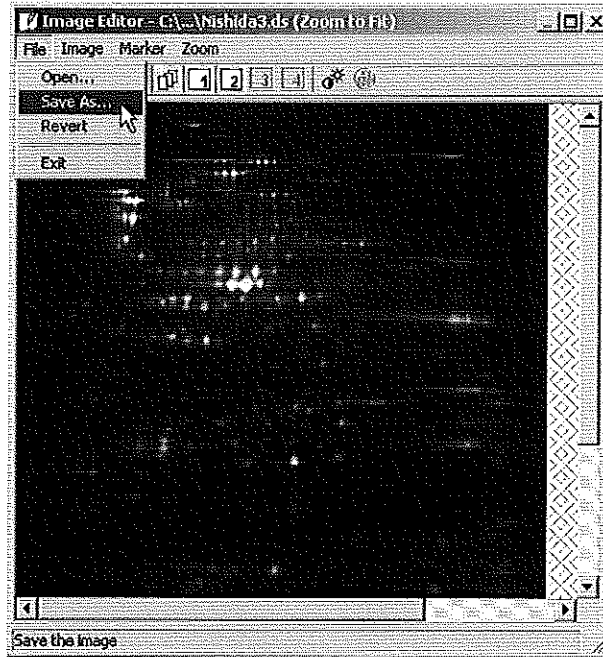
1. ツールバーの Edit Image ボタン  を押して「Image Editor ウィンドウ」を起動し、File/Open メニューでイメージをオープンします。



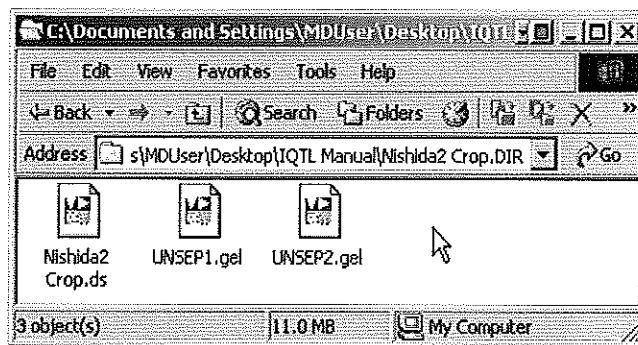
2. 切り取りたいエリアをクリック&ドラッグで囲みます。



3. Image/Crop to area メニューを実行します。
 囲んだ部分が切り取られた画像が表示されます。
4. File/Save as..メニューを実行して切り取ったイメージをデータセットファイル (** *.ds) として保存します。



5. Crop した (切り取った) イメージは、指定したフォルダの中の[***.DIR]フォルダにチャンネルごとに UNSEP1.gel, UNSEP2.gel,... として保存されます。またスキャン時に DIGE File Naming Format を使用して保存した場合、そのときに付けたファイル名で保存されます。





GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000 認証取得

掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。
掲載されている内容は、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。