cytiva

Image Quant TL

（ver.8.2）

Analysis Toolbox 簡易操作手順

20210512

Analysis Toolbox 操作手順書

0
1 イントロダクション....1
2 ImageQuant T ソフトウェアのインターフェイスについて....2
3 階調調整について....6
4 Analysis Toolbox の使い方....7
5 撮影条件の確認....11
6 イメージの重ねあわせ....12
7 .img ファイルを ImageQuant TL で開く....17
8 Data Fields....18

1 イントロダクション

1.1 ImageQuant TL の概要

ImageQuantTMTL 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、一次元電気泳動やブロッティング、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 gel analysis、Analysis Toolbox、Colony Counting、Array analysis 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。

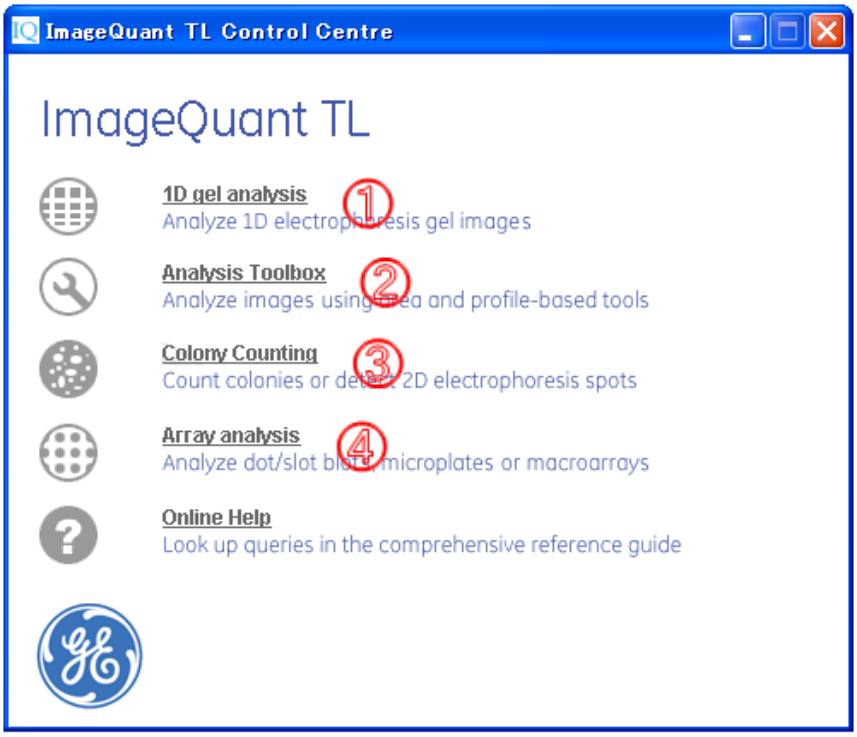
1.2 連絡先

ImageQuant TL に関する技術的なご質問は
バイオダイレクトライン:
Tel: 03-5331-9336 ・・・音声案内が流れますので、続いて 2 番をプッシュしてください。
e-mail： tech-jp@cytiva.com
www.cytivalifesciences.co.jp

2　ImageQuant T ソフトウェアのインターフェイスについて

2.1　ソフトウェア起動と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 をダブルクリックすると、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 gel analysis、Analysis Toolbox、Colony Counting、Array analysis の各解析モジュールにアクセスすることができます。



① 1D gel analysis・・・1 次元電気泳動の画像に対し、自動でバンドやレーンの認識・バックグランドの削除を行い、分子量概算やノーマライズを行うことができます。

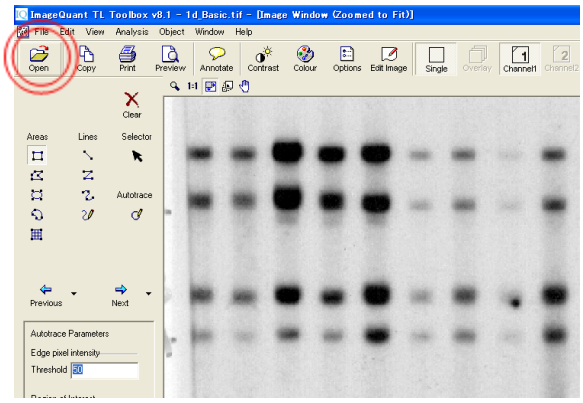
② Analysis Toolbox・・・バンドの認識・バックグランドの削除により、正確なバンド間の比較解析が可能です。

③ Colony Counting・・・大腸菌のコロニーや二次元電気泳動サンプルのスポット数を検出・定量します。

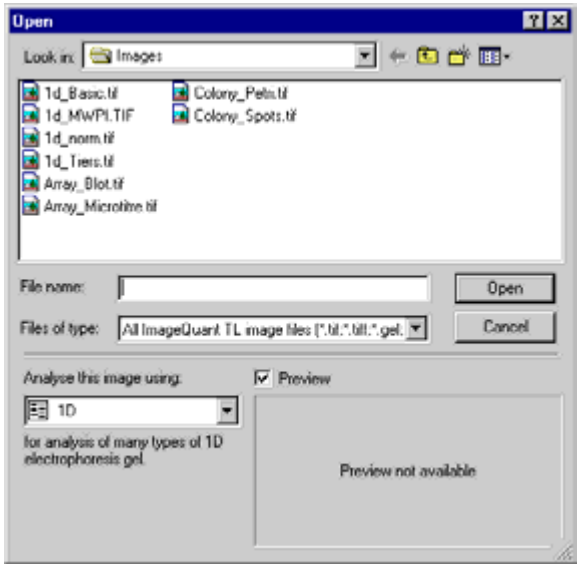
④ Array analysis・・・同じ大きさのサンプルが等間隔で並んでいるようなサンプル（マイクロタイタープレートやスロットブロット、マクロアレイ等）に対し、定量解析を行います。

2.2　解析データの選択

解析モジュールをクリックすると、前回、解析したデータ（データがない場合は、デモイメージ）が表示されます。Window 左上の Open を選択します。この時、イメージの Save をするか、確認メッセージが現れますが、No を選択して進めます。



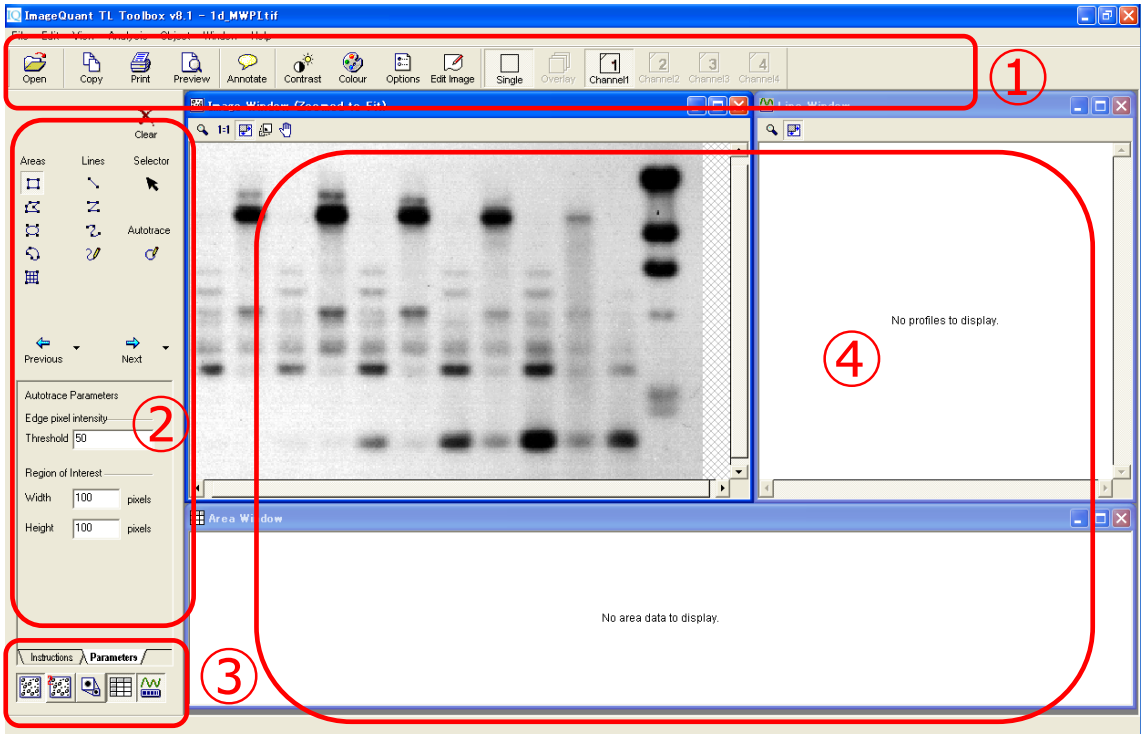
ファイル選択 Window が表示されます。



解析する画像ファイルを開きます。解析可能なファイルの拡張子は、.tif、.tiff、.gel、.ds、.img です。.img ファイルの開き方に関しての詳細は**「.img ファイルを ImageQuant TL で開く」**をご覧ください。

2.3 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。



① ツールバー…ファイルを開く、画像や数値データを export する、コントラスト調整を行う、擬似カラーをつける等のコマンドが使用できます。

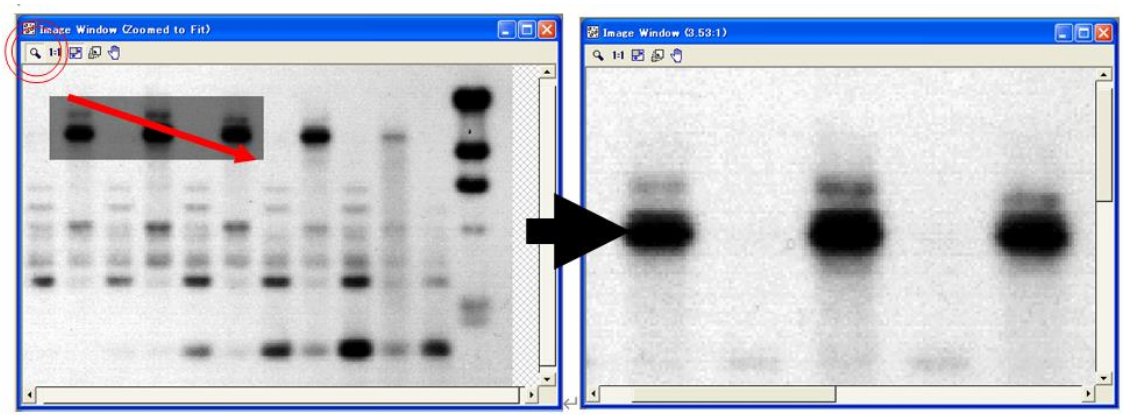
② ナビゲーター…Next ボタンを押し進めていくことで、ステップごとに解析を進めることができます。

③ 小ウィンドウ…各解析ウィンドウに対応したアイコンで、切り換えることで解析ウィンドウの表示を切換えます。

④ 解析ウィンドウ…解析中の画像や解析結果が表示されます。各ウィンドウは最大化・最小化表示が可能です。

2.4 解析画像の拡大表示

画像を開くと、Image Window のサイズにあわせて画像全体が表示されます。Image Window で任意の領域を拡大して見やすくしたい場合には、Image Window 左上の虫眼鏡のアイコン をクリックし、拡大表示したい領域をドラッグで囲い込みます。

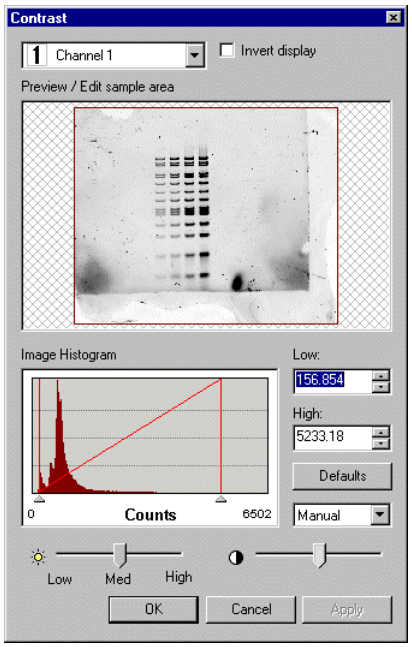


元のサイズに戻したい場合には、Image Window 左上の Zoom to fit のアイコン をクリックすると、Image Window のサイズに合わせた全体表示に切り換わります。

3　階調調整について

ImageQuant TL では画像を開くと自動で階調が調整されて表示されますが、マニュアルで階調調整を行うことも可能です。階調調整はディスプレイ上で見た目にのみ反映され、解析の数値には影響を与えません。

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

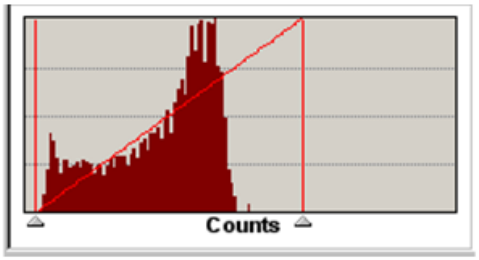


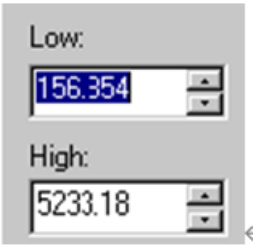
3.1　画像の反転

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。

3.2　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。



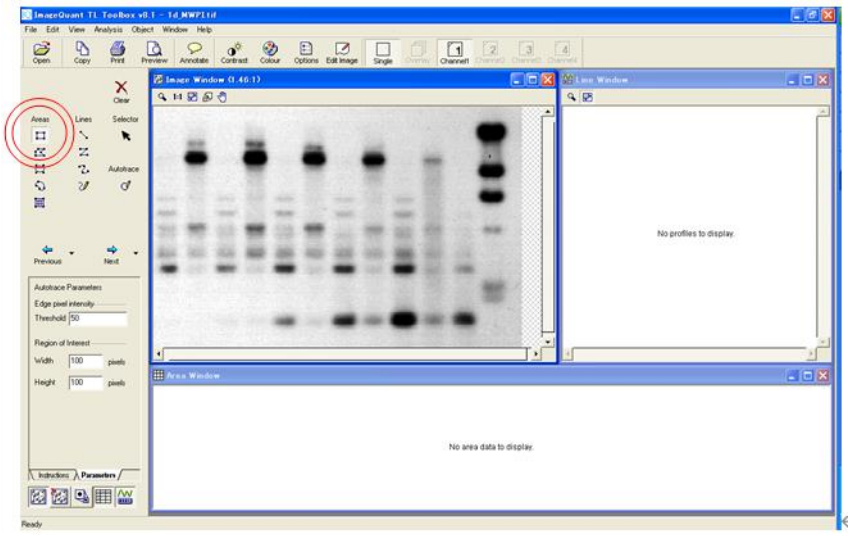


4　Analysis Toolbox の使い方

ツールボックスでは、様々の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。解析のステップは、バンド/スポットの検出とバックグラウンドの削除のわずか 2 ステップでバンド間の比較解析が可能です。

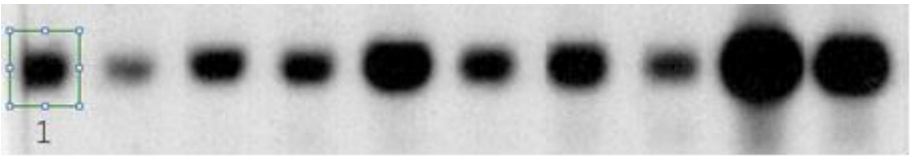
4.1　バンド/スポットの検出

Shape Definition のステップでは、任意のバンドを囲い込み、検出枠とします。バンドを囲い込むオブジェクトは、Rectangle を用います。



オブジェクトの設定

Navigator 左上の Rectangle を選択して、クリック＆ドラッグでバンドを囲います。バンドの検出枠のオブジェクトは緑色で表示されます。アクティブな検出枠にはノードが表示されます。



オブジェクトの編集

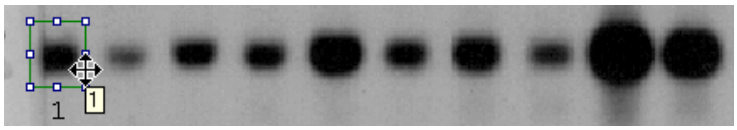
画像上にオブジェクトを作成後、オブジェクトのサイズ変更・移動・コピー・名称の変更を行うことができます。

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. 枠の大きさを変えて、マウスのポインターを離します。

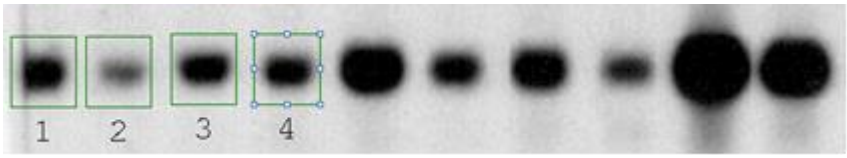
オブジェクトの移動

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。

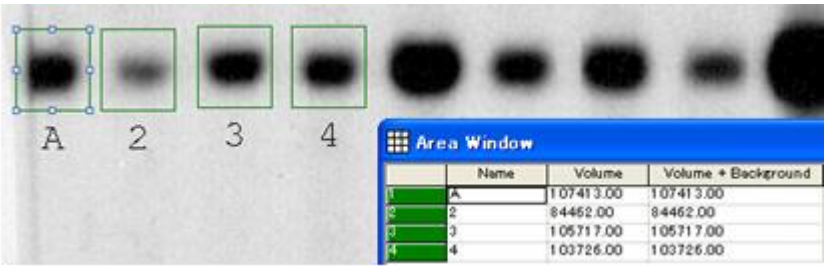


オブジェクトの複製

1. Edit の Copy （もしくは 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 （もしくは 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います。



＊ 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。



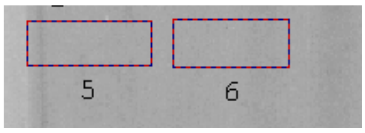
4.2 バックグラウンドの削除

Navigator の Next ボタン をクリックして、Background Subtraction のステップに進みます。

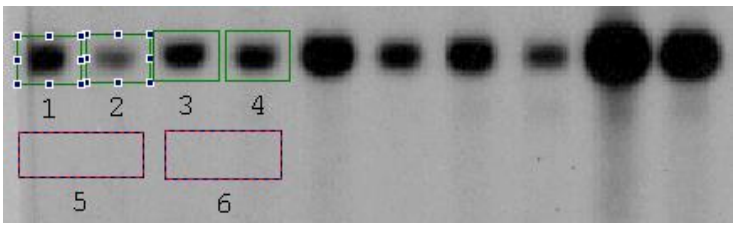
バックグラウンド削除は、画像の一部から測定したバックグラウンド強度を差し引くことです。ここでは一般的に使用される Image Rectangle/Ellipse の方法について記述します。Image Rectangle/Ellipse では、画像上の特定な四角形や楕円形のエリアが必要になります。そのエリアの平均ピクセル強度をバックグラウンドの強度として使用します。

1. Navigator のタブを Parameters に切り換えます。

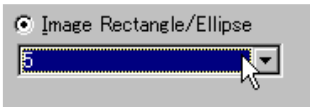
2. Navigator の Rectangle のボタンをクリックします。バックグラウンドとして指定したいエリアをクリック＆ドラッグします。赤いドットで描かれるエリアが表示され、その下には連続したオブジェクト番号が表示されます。



3. バックグランド削除の対象となるバンドの検出枠（緑色のオブジェクト）をクリックします。Ctrl キーを押しながらオブジェクトをクリックすると、複数選択が可能です。



4. Navigator の Image Rectangle/Ellipse をクリックし、選択されたバンドに用いるバックグラウンドのオブジェクト番号をプルダウンから選択します。



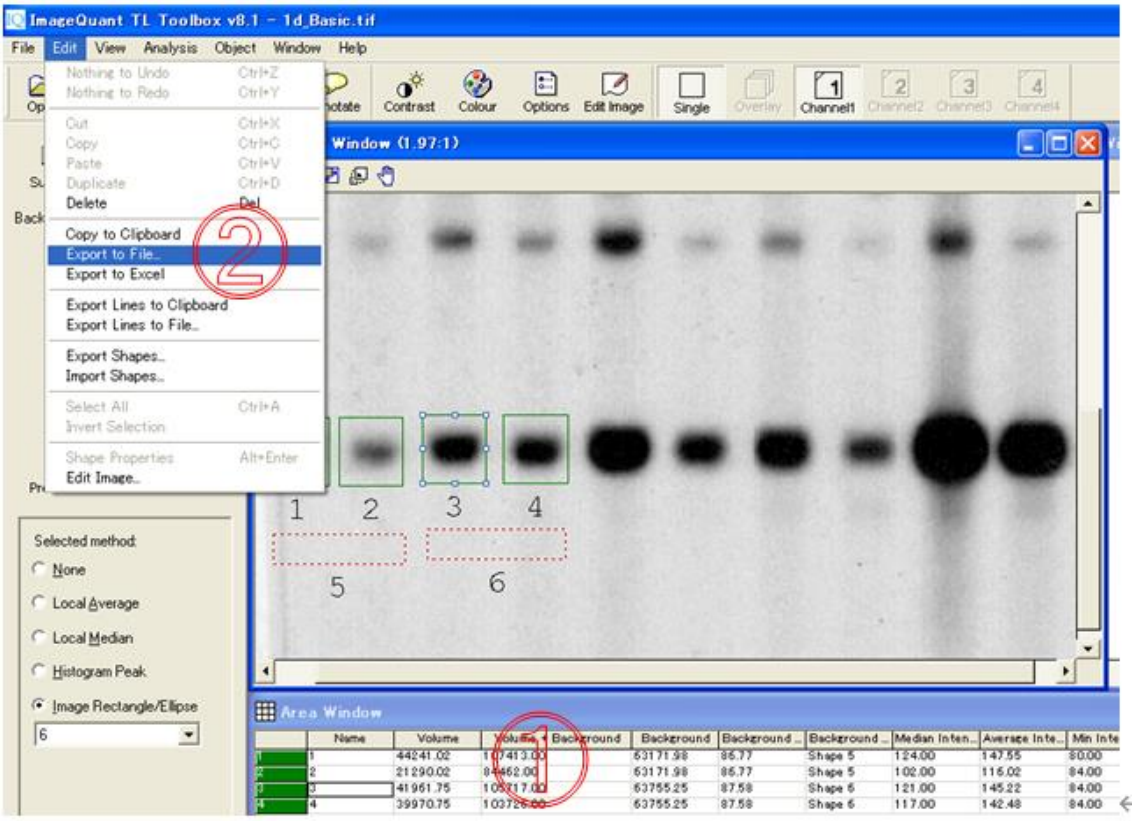
5. Volume 欄にバックグラウンド（バックグラウンド強度×バンド/スポットの検出オブジェクトの面積）が差し引かれた値が表示されます。Volume とは、バックグラウンド削除後の、検出枠内のシグナルの積算値です。

Area Window

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

4.3 解析した画像や解析結果の外部出力

ImageQuant TL では、解析結果や、コントラスト調整や解析を行なった画像を外部のソフトウェア（表計算ソフト、パワーポイントなど）にエクスポートすることが可能です。



1. ImageQuant TL で、エクスポートしたいウィンドウをクリックし、アクティブな状態にします（①）。
2. メニューの Edit で、Export to File を選択します（②）Image Window の保存時は、Enter File DPI という Window が表示されますが、OK を押してそのまま進めてください。
3. 保存する際の拡張子を選択します。

- 表(Analysis window、Measurement window など)の場合・・・txt(テキスト(タブ区切り)または csv(カンマ区切り)形式で保存できます。
- イメージ(解析中の画像、検量線など)・・・bmp(ビットマップ)型式で保存できます。

4.4 エクスペリメント・オーバービュー

バックグラウンド削除後、Next ボタン をクリックして Navigator を Experiment Overview モードに進めます。

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。
バンドの検出やバックグランドのオブジェクトや解析の結果は自動保存されます。解析結果を初期化したい場合には、Navigator 最後のステップにある Restart ボタンをクリックしてください。

5 撮影条件の確認

ImageQuant TL では、.gel ファイルの撮影条件を確認することができます。
画像を任意の解析モジュールで開き、ツールバーの File から Image Properties を選択します。

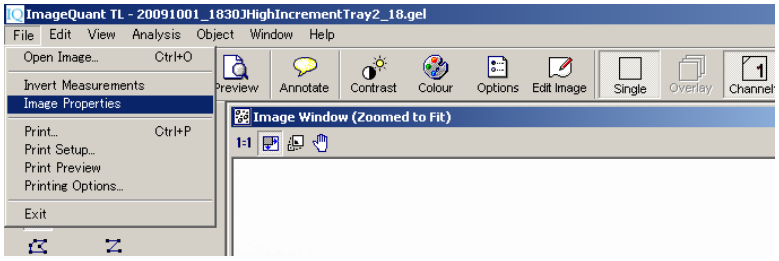
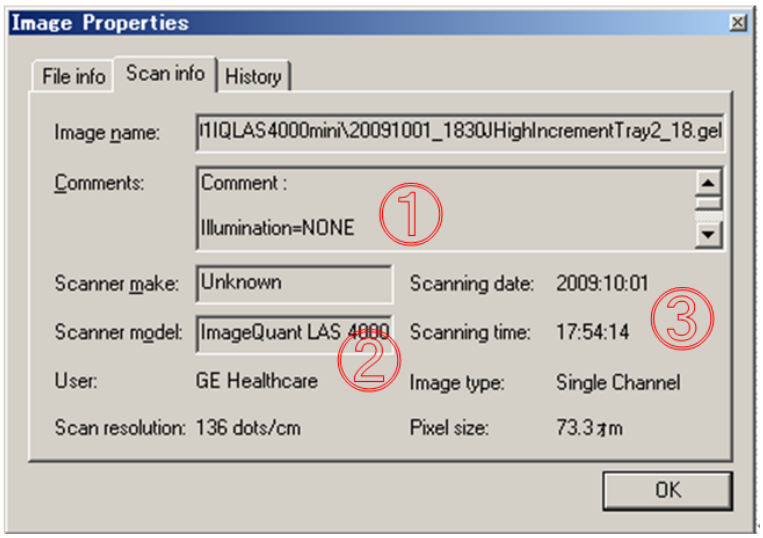


Image Properties の Scan info のタブをクリックします。撮影日時や、撮影条件を確認できます。



① comments・・・感度設定、露光時間、絞り、トレイポジションの等の撮影条件
② Scanner model・・・撮影したシステム名
③ Scanning date/time・・・撮影日時/時刻

6 イメージの重ねあわせ

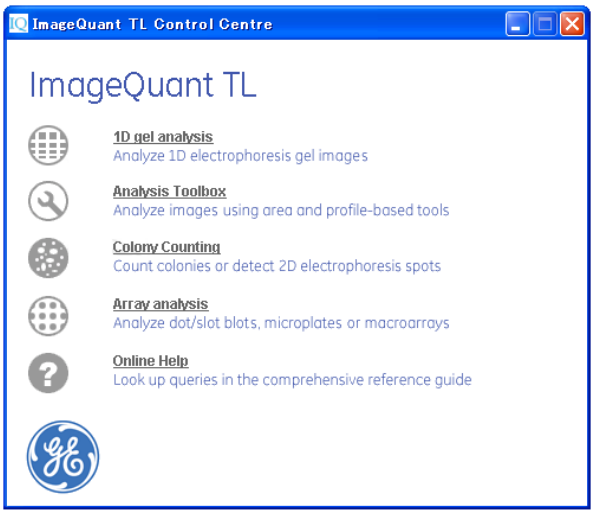
同じサイズの「.gel」イメージを重ねあわせ、新しくデータセット(DS)を作成します。最大 4 枚の「.gel」イメージを重ねあわせられます。

重ねあわせできるイメージの条件

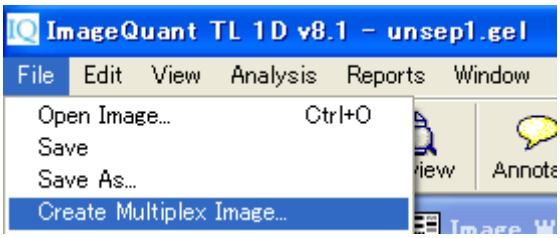
- 同じ解像度で撮影されていること。
- サンプルの大きさ(ImageQuant LAS4000 シリーズの場合はトレイポジション)が変わらないこと。できれば位置が変わらないこと。位置が異なる場合は付録の「イメージの準備-同じサイズに切り出す-」でイメージを切り出します。

イメージの重ね合わせ

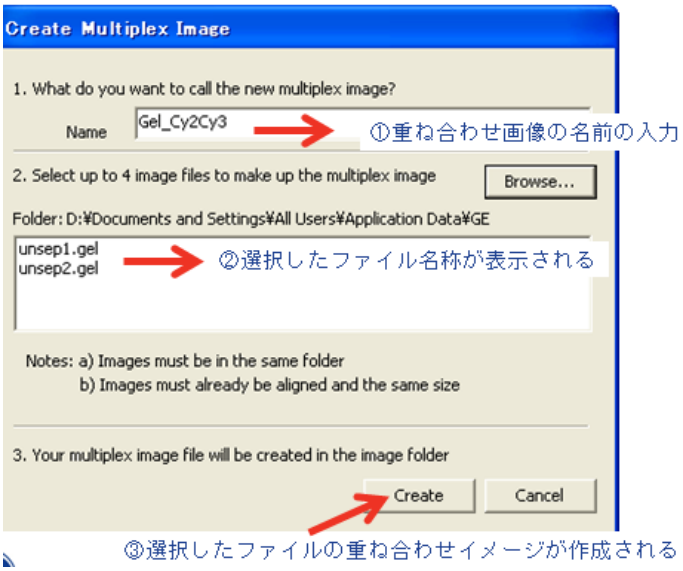
1. ImageQuant TL のコントロールセンターから使用したい解析モードを選択します 。ここでは 1D gel analysis を選択します。Colony Counting は重ね合わせに対応しません。



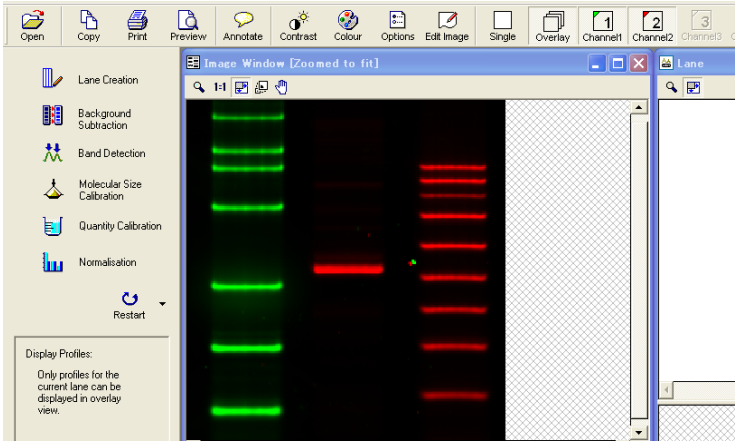
2. File メニューより'Create Multiplex Image'を選択します。



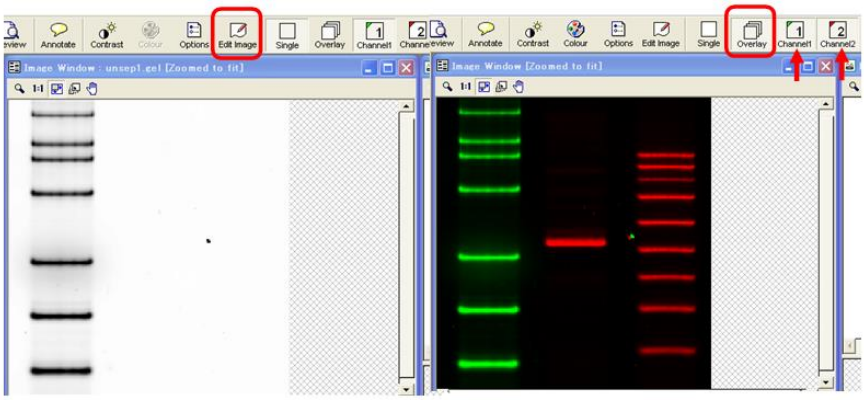
3. ① 重ね合わせに関する情報ファイル(data set, .ds)のファイル名を入力します。
   ② Browse をクリックして、重ね合せをしたい画像（.gel もしくは.tif）を 2-4 枚選択し、Open をクリックすると以下の Window に選択したファイル名が表示されます。
   ③ Create をクリックするとデータセットファイル（.ds）が作成されます。



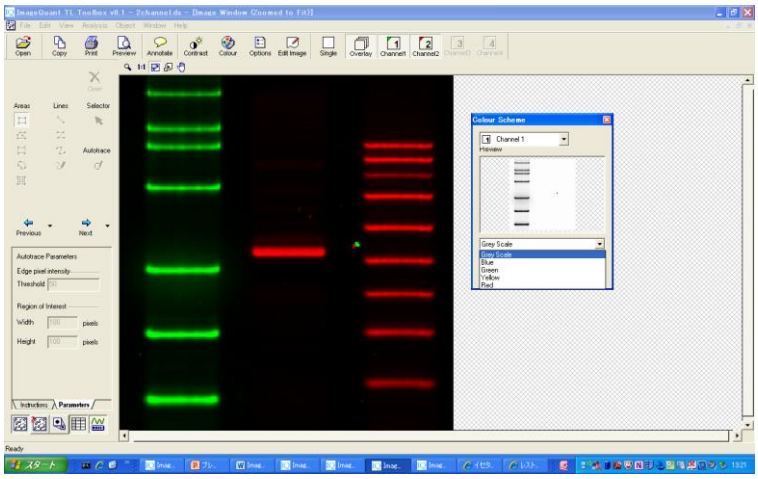
4. 重ねあわせたイメージが開きます。



5. ツールボタンの Overview で重ね合わせたイメージの擬似カラー着色イメージを、Single ボタンで元のグレースケールイメージを表示します。重ね合わせた各画像は、Channel1/Channel2 のボタンを押して、表示を切り替えます。



イメージの色を変更したい場合は、Color ボタンをクリックします。Color Scheme window が開くので、Channel1/Channel2 の指定後、色の変更を行います。モノクロ表示にしたい場合は、Gray Scale を選択します。


Open
Copy
Print
Preview
Annotate
Contrast
Colour
Options
Edit Image
Single
Overlay
Channel1
Channel2
Areas
Lines
Selector
Autotrace
Previous
Next
Autotrace Parameters
Edge pixel intensity
Threshold
Region of Interest
Width
Height
pixels
Instructions
Parameters
Colour Scheme
Channel 1
Grey Scale
Blue
Green
Yellow
Red
Ready

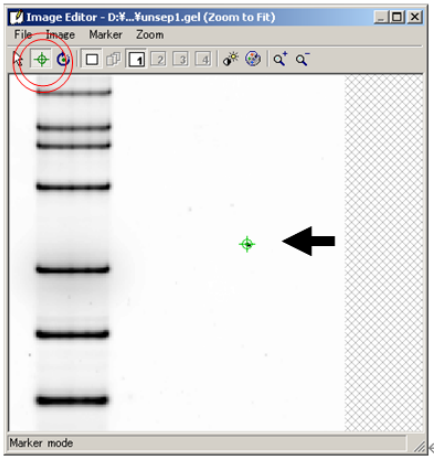
6.1 イメージの準備 - 同じサイズに切り出す-

1. ImageQuant TL にて 1 枚目のイメージを開きます。

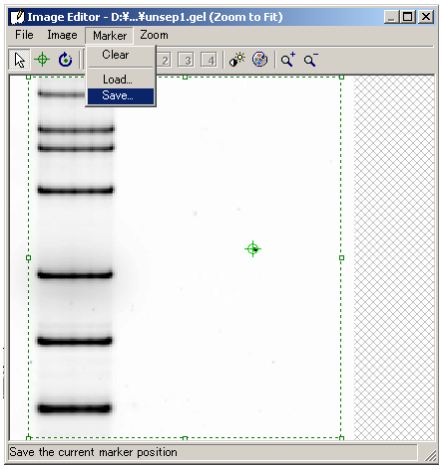
2. ツールバーの Edit Image

をクリックします。

3. Image Editor のカーソルを に切換え、基準点となる部分にマーカーを設定します。



4. カーソルを矢印に戻し、切り出しの枠を設定します。
5. 切り出し枠と基準点の位置情報を、ImageEditor メニューの Maker から save します。



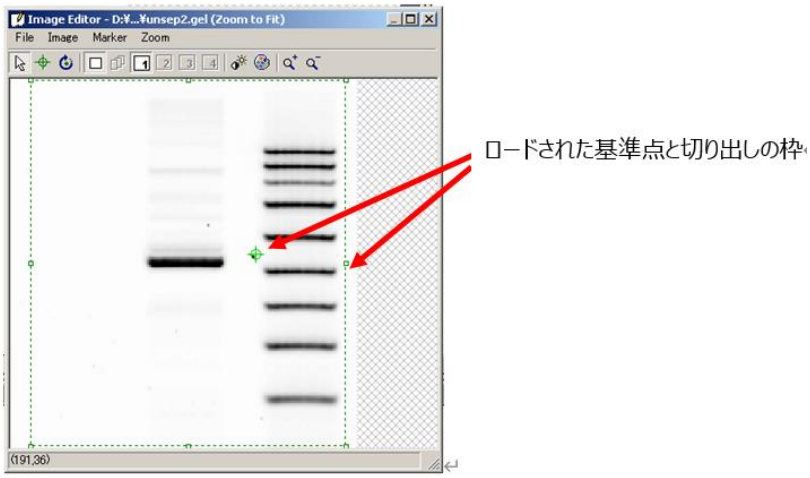
6. Image Editor メニューの Image で、Crop to area で画像を切り出します。
7. 切り出した画像をメニューの File から、Save as で「.gel」ファイルで保存します。

8. ImageQuant TL にて重ねあわせしたい 2 枚目のイメージを開きます。

9. ツールバーの Edit Image

をクリックします。

10. Image Editor メニューの Marker から、先ほど作った.mrk ファイルを Load します。



11. ロードされた基準点を 2 枚目の基準点にあわせて、切り出しの枠を動かします。
12. Image Editor メニューの Image から Crop to area で 2 枚目の画像を切り出します。
13. 切り出した画像をメニューの File から、Save as で「.gel」ファイルで保存します。

基準点を元に、同じサイズに画像を切り出すことができたので、これら 2 枚の.gel ファイルを FluoroSep 上で重ねあわせします。

7　.img ファイルを ImageQuant TL で開く

ImageQuant TL では、富士フィルム社の LAS、FLA、BAS で撮影した画像も開くことができます。.img ファイルと.inf ファイルを同じ階層にコピーしてください。LAS、FLA、BAS の操作 PC の OS および解析ソフトにより注意点が異なりますので、ご参照ください。

LAS、BAS、FLA の PC の OS が Windows、UNIX（BAS2500）の場合

img ファイル、.inf ファイルがそろっているのでそのまま開きます。

LAS、BAS、FLA の PC の OS が Macintosh で、解析ソフトが MultiGauge の場合

.img ファイル、.inf ファイルがそろっているのでそのまま開きます。

LAS、BAS、FLA の PC の OS が Macintosh で、解析ソフトが ImageGauge の場合

→.inf ファイルは.img ファイルの中に隠しファイルとして入っているため、そのままでは開くことができません。
.inf ファイルの作り方は下記の通りです。
作成法 1　ImageGauge の File メニューから Export File→Fuji Exchange Format
作成法 2　ImageGauge の File メニューから File info→File Information の Delimiter Option で LF(Sun)を選んで Export して「ファイル名.inf」作成。その後、File メニューから Export File→RAW と操作し、「ファイル名.img」作成する。

ImageQuant TL で開くファイル名やパス名はすべて半角英数字である必要があります。ファイル名に 2 バイトフォント(漢字、ひらがな、αなど）が含まれていると、ImageQuant TL では開きません。この場合は MultiGauge や ImageGauge でファイルを開いた後、ファイル名を半角英数字で付け換えて下さい。この時同名の.inf ファイルも作られます。

8 Data Fields

ここでは、各解析モジュールで表示できる算出データを表で示します。

Data Field 名:	項目説明	1D gel Analyisis	Analysis Toolbox	Colony Counting	Array Analysis
Area	バンドやスポット、コロニーやその他画像中の解析を行うために設定したエリアのピクセル数を表します。	Y	Y	Y	Y
Area > Background	バックグラウンドの数値よりも大きいエリアを示します。	N	Y	N	N
Average Intensity	目的値の Volume を Area で割ったピクセルの数値を表します。	N	Y	Y	N
Background	バンドやスポット、コロニーやその他画像中のバックグラウンドの総量を示します。	N	Y	Y	Y
Background Level	Toolbox モジュールで、指定したバックグラウンドの平均値を示します。	N	Y	N	N
Background Type	バックグラウンドの取り方のタイプを示します。	N	Y	N	N
Band Index	各レーン中のバンドの番号です。	Y	N	N	N
Band Percentage	各レーン中のバンド総量に対する 1 バンドのパーセンテージを示します。	Y	N	N	N
Band Percentage (Calib/Norm)	標準化や公正化した数値の各レーン中のバンド総量に対する 1 バンドのパーセンテージを示します。	Y	N	N	N
Calib/Norm Volume	標準化や公正化した数値を示します。	Y	N	N	N
Centre	画像の X, Y 軸の始点を示します。(position 0,0)は、画像の左上です。	N	Y	N	N
Circularity	Colony Counter モジュールでは、丸さを 0 から 1.0 の数値で示します。1.0 は真円を示しています。	N	N	Y	N

Colony Number	Colony Counter モジュールでは左上から右に順番に下に向かってコロニーに番号をふります。	N	N	Y	N
Comment	コメント欄に必要な情報を入力することができます。	N	Y	N	N
Coordinates	全体の中央の座標を整数で示します。	Y	N	Y	Y
Height	サンプル位置の枠の縦の長さを示します。	N	Y	N	N
Lane Percentage	全レーンのバンド総量の中の各レーンのパーセンテージを示します。	Y	N	N	N
Max Intensity	サンプル位置の枠中のピクセルの最大値を示します。	N	Y	N	N
Median Intensity	サンプル位置の枠中のピクセルの中央値を示します。	N	Y	N	N
Min Intensity	サンプル位置の枠中のピクセルの最小値を示します。	N	Y	N	N
Mode Intensity	サンプル位置の枠中のピクセルの出現頻度の最大値を示します。	N	Y	N	N
Molecular Size	カラムヘッダーに示された単位での分子量を示します。	Y	N	N	N
Name	サンプル枠名を示します。 Note: カラム内をダブルクリックして名前を書き換えることが可能です。名前を変更すると、Image Window のサンプル枠名も変更されます。	N	Y	N	N
Normalised Volume	スポットの標準化した数値を示します。	N	N	Y	N
Peak + Background	バックグラウンドを含むバンド総量を示します。	Y	N	N	N
Peak Height	Analysis window に示されたバンドの一番高い位置の数値を示します。	Y	N	N	N
Percent	全てのサンプル枠中のバックグラウンドを引いた数値に対する各サンプル枠のパーセンテージを示します。	N	Y	N	N

Position	レーンの最初の位置からの距離を示します。	Y	N	N	N
Presence / Absence	Array モジュールで Flag の設定で閾値を決定し、閾値以上は 1、以下は 0 で示します。	N	N	N	Y
Rf	Rf (Retardation Factor)はレーン内の距離の相対値を示します。0 は始点を 1 は終点を示します。	Y	N	N	N
Std Dev	サンプル枠内のピクセルの数値の標準偏差を示します。	N	Y	N	N
Spot Label	Array モジュールで Spot Label を入力することが可能です。	N	N	N	Y
Spot Quality	Array モジュールではスパイクやノイズが含まれるものを表示します。	N	N	N	Y
Spot Radious	スポットの半径を示します。	N	N	N	Y
Variance	サンプル枠中のピクセルの分散を示します。	N	Y	N	N
Volume	バックグラウンドを引いた後のサンプル値を示します。	Y	Y	Y	Y
Volume + Background	バックグラウンドを引く前のサンプル値を示します。	Y	Y	Y	Y
Width	サンプル枠の幅を示します。	N	Y	N	N

お問合せ先

Cytiva（サイティバ）

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問い合わせ：バイオダイレクトライン

Tel：03-5331-9336

e-mail： tech-jp@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp