TotalLab
LIFE SCIENCE ANALYSIS

CLIQS v1.6

1D ゲル & ウェスタンブロット解析ガイド

REV. 20231221

輸入元 株式会社スクラム

目次

0.　はじめに 2
1.　一次元電気泳動ゲル／ウェスタンブロットのバンド分子量とバンド濃度の定量 3
　1－1.　ソフトウェアの起動 3
　1－2.　画像の取り込みと修正 4
　1－3.　レーン検出 7
　1－4.　バックグラウンド補正 10
　1－5.　バンド検出 12
　1－6.　分子量の算出 16
　1－7.　ガウシアン・フィッティング 19
　1－8.　バンド量のキャリブレーション 22
　1－9.　ノーマライゼーション 29
　1－10.　Rf キャリブレーション 34
　1－11.　バンドマッチング 37
　1－12.　アノテーション 42
　1－13.　レポート 43
　1－14.　自動解析 44
2.　一次元電気泳動ゲルからの系統樹解析 46
3.　マルチプレックスデータの解析 48
　3－1.　マルチプレックス画像の作成と保存 48
　3－2.　マルチプレックス画像の取り込みとカラーチャンネルの切り替え 50
　3－3.　バンド検出 51
　3－4.　分子量の算出 52
　3－5.　ガウシアン・フィッティング 52
　3－6.　バンド量のキャリブレーション 53
　3－7.　ノーマライゼーション 53
4.　ウェスタンブロットからのバンド濃度の定量（Analysis Toolbox） 56
　4－1.　ソフトウェアの起動 56
　4－2.　画像の取り込みと修正 57
　4－3.　ROI の設定 57
　4－4.　バックグラウンド補正 59
　4－5.　アノテーション 61
5.　解析ファイルの保存と呼び出し 62
6.　解析結果のエクスポート 62
　6－1.　数値データのエクスポート 62
　6－2.　画像データのエクスポート 63

0. はじめに

本ガイドでは、CLIQS v1.6 を使って、一次元電気泳動ゲルあるいはウェスタンブロットの画像から、分子量やバンドボリュームの定量を行う方法を説明いたします。実際の操作手順にしたがって記載されていますので、本ガイドの手順に従って操作を進めていいただければ、 ひととおりの解析を行うことが可能です。

下の表のように CLIQS v1.6 は様々な用途にお使いいただくことが可能です。この中で、本ガイドでは、一元電気泳動ゲルからの DNA/タンパク質バンドの検出と分子量およびバンド量の定量、ウェスタンブロットからのタンパク質定量、DGGE ゲルや RFLP ゲルからのレーン間バンドパターンマッチングと系統樹解析、について説明させていただきます。その他の解析の方法や本ガイドに書かれていない詳細な機能についてお知りになりたい方は英語版マニュアルをお読みください。

解析モード	用途	本ガイドでの説明
1D Gel / Western Blot analysis	サイズ未知バンドの分子量の算出	○
	既知濃度のバンドから未知バンドのタンパク質/DNA 量を定量	
	ゲル内でのバンドパターンマッチングと系統樹解析	
Analysis Toolbox	一次元電気泳動ゲルあるいはウェスタンブロット上の特定のバンドの相対定量	○
	スロットブロットやドットブロット上のタンパク質/DNA 量の相対定量	
Array analysis	マクロタイタープレートからのウェル定量	
	マクロアレイからの定量	
Colony Counting	ディッシュ上のコロニー数のカウント、ボリュームの算出	
	二次元電気泳動ゲルからのスポット定量 (ゲル間マッチングには非対応)	

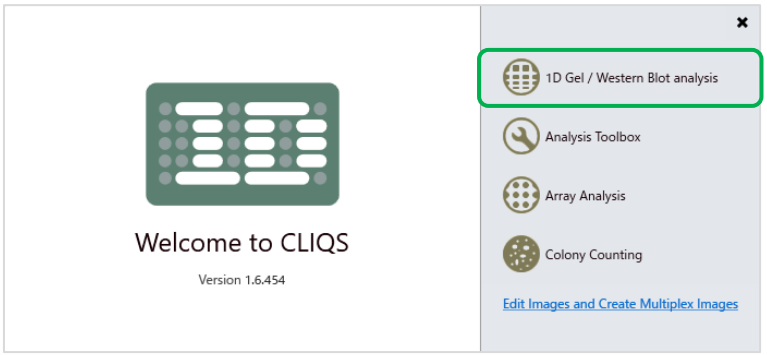
CLIQS ソフトウェアは電子ライセンスで供給されます。電子ライセンスではインターネット経由でライセンスの管理を行います。ソフトウェアをインストールできる PC は 1 ライセンスあたり 1 台までです。

1.　一次元電気泳動ゲル／ウェスタンブロットのバンド分子量とバンド濃度の定量

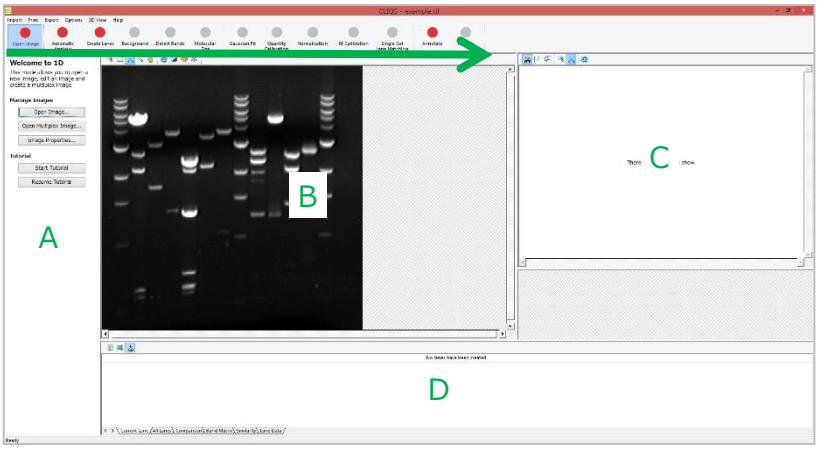
1D ゲル画像あるいはウェスタンブロット画像からのバンド分子量やバンド濃度を定量するには 1D Gel / Western Blot analysis を使用します。ここでは単一染色画像の解析方法を解説します。

1－1.　ソフトウェアの起動

(1) デスクトップの アイコンをダブルクリックしてください。



(2) コントロールセンターが開きます。4 つの解析モードがあります。「1D Gel / Western Blot analysis」を選んでクリックしてください。



(3) 解析画面が開きます。解析はスクリーン上部のナビゲートにしたがって左から右に向かって順に進めていきます。各画面については 下記をご参照ください。

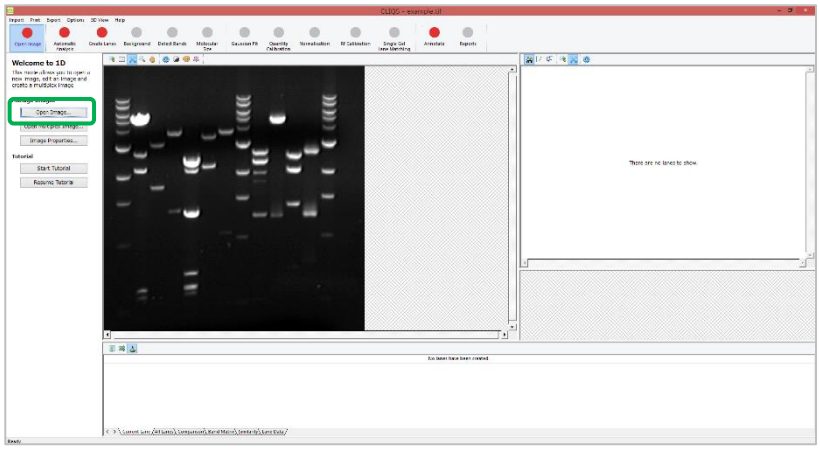
A) ツールダイアログ
　解析を実施するためのツール

B) イメージウィンドウ
　ゲルやブロットの画像

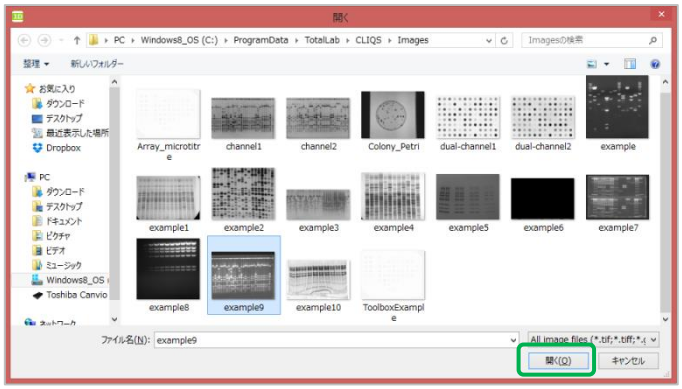
C) レーンプロファイルウィンドウ
　各レーンの縦断プロファイル

D) メジャーメントウィンドウ
　数値データ（定量結果）

1－2.　画像の取り込みと修正



(4) ツールダイアログの「Open Image...」を押してください。



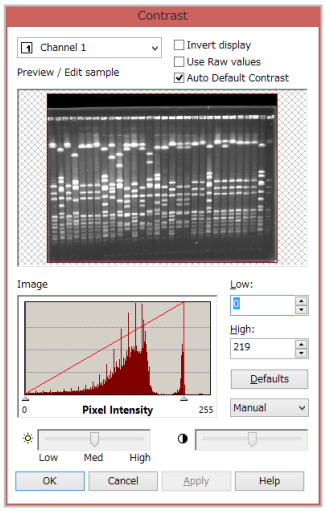
(5) 解析したい画像を１つ選んで「開く」を押してください。

(6) 画像が開き、自動的に「Create Lanes ステップ」に進みます。

画像の白黒反転やコントラスト調整を行いたい場合は、イメージウィンドウの ボタンを押してください。

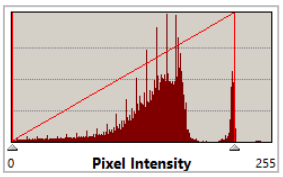
画像が左右反転している、上下反転している、撮影角度が斜めにずれていたなどの場合は、コントロールセンターに戻って「Edit Images and Create Multiplex Images」を押してください。

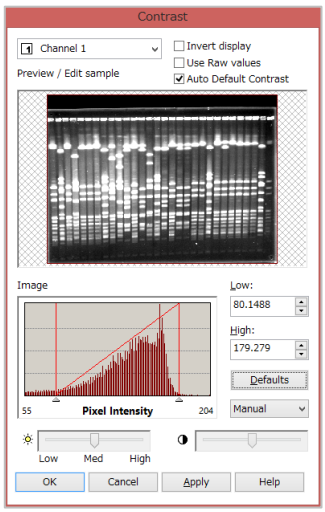
画像を修正する必要がない場合は、本ガイド 1-3 に進んで、そのまま解析を進めてください。



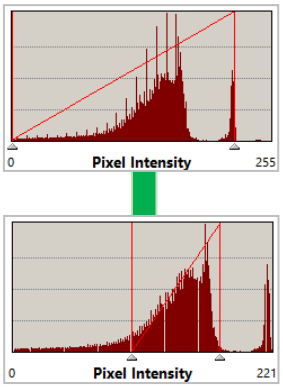
(7) を押すとコントラスト調整画面が現れます。

コントラストの調整は、主に画面中央のヒストグラムを使って行います。ヒストグラムは、横軸がピクセルのシグナル強度（つまり濃淡、 右にいくほど濃い）、縦軸がその強度を持つ ピクセルの数です。

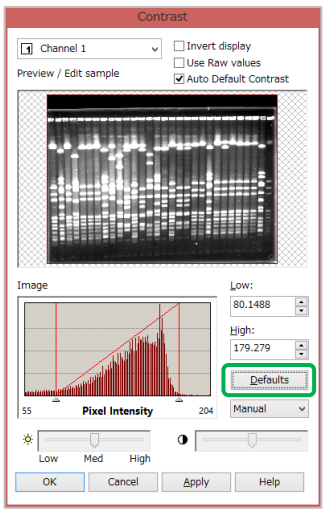




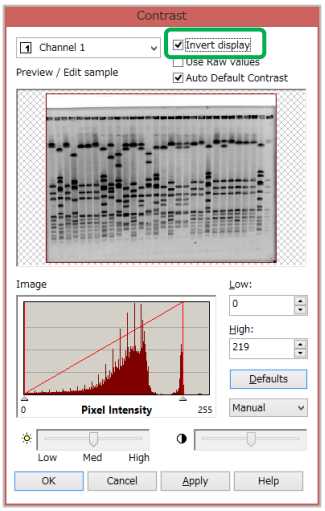
(8) ヒストグラムの山を左右のスライダーで狭くはさむとコントラストが上がります。



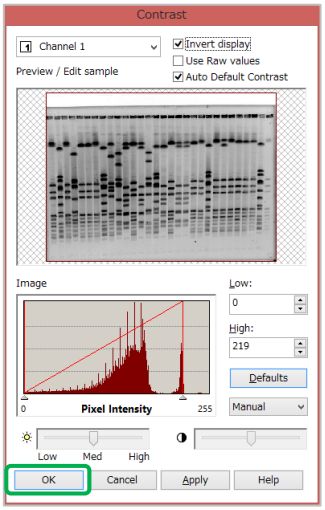
また、スライダーを全体的に左に寄せると画像が暗くなります。逆に右に寄せると画像が明るくなります。



(9) 一度変更したコントラストを元に戻すには「Defaults」を押してください。



(10) 画像を白黒反転させたい場合は、右上の「Invert display」を押してください。

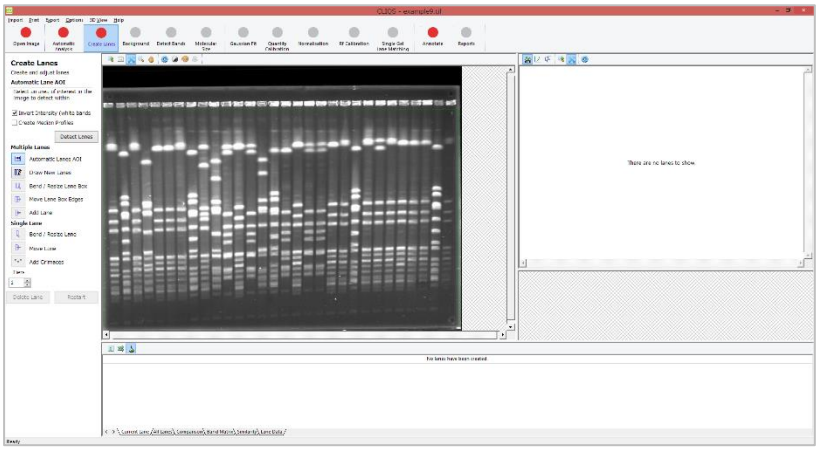


(11) 「OK」ボタンを押すと、変更がイメージウィンドウに反映されます。

(12) 変更が反映されました。

解析する画像の調整が終わったらレーン検出に進みます。

1−3.　レーン検出



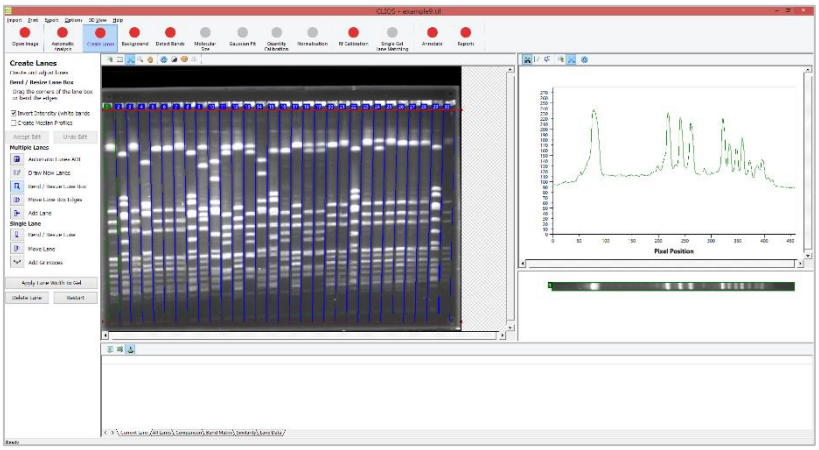
(13) イメージウィンドウのゲル画像上でクリック&ドラッグすると、緑色のボックスが現れ、レーン検出の範囲を選択することができます。

- 一度作った検出範囲をクリアしたい場合は、 画像上のどこかで右クリックしてください。緑の枠が消えます。

(14) 自動レーン検出を行います。

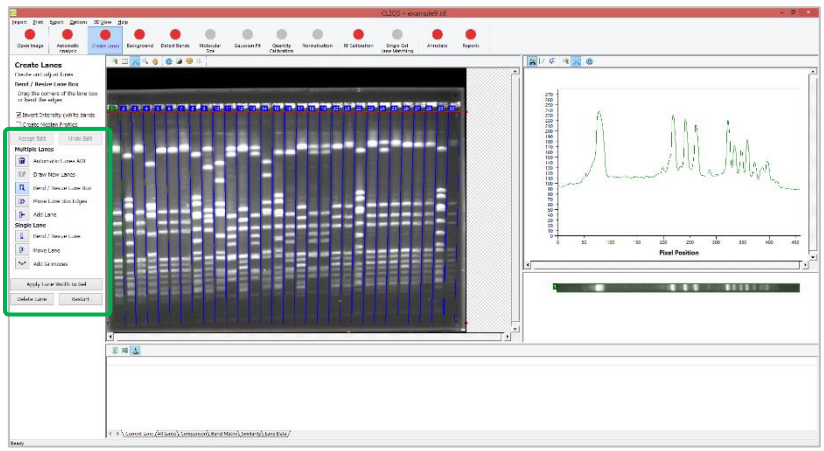
Automatic Lanes AOI が選択されていることを確認し、「Detect Lanes」ボタンを押してください。

- 1 枚の画像に 1 つのゲルの場合は Titer 数(左 側の点線のところ)は 1 にしてください。1 枚の画像に複数のゲルを撮影した画像の場合は ゲル枚数を Titer 数に設定します。ピンク色の線が現れますので、クリック&ドラッグでゲルの境目を指定してください。



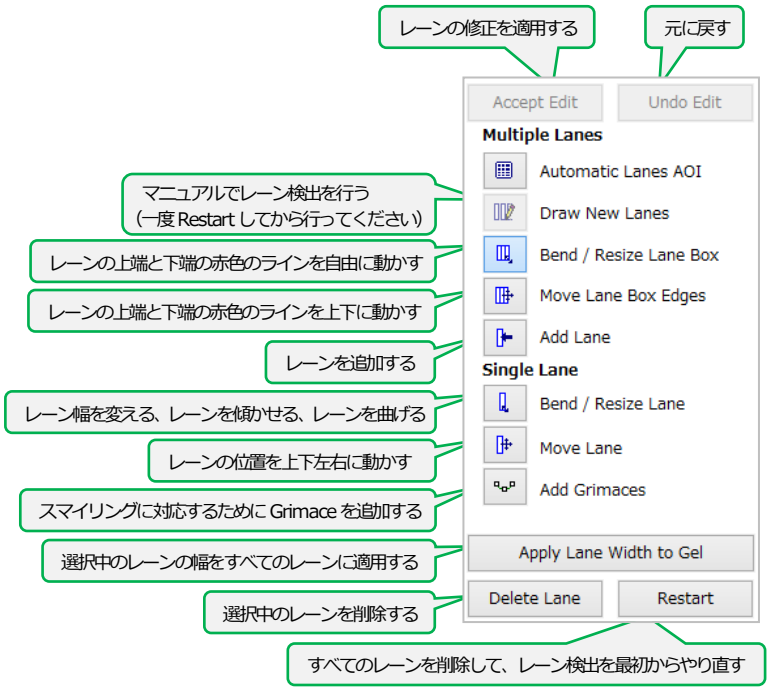
(15) レーンが自動検出されました。

レーンにはレーン番号が自動的に割り振られます（左から順番）。赤色のラインがレーンの上端と下端（Lane Box と呼ばれます）、緑色のラインが現在選択されているレーン、青色のラインが選択されていないレーンです。レーン番号をクリックすると、選択レーンを変更できます。

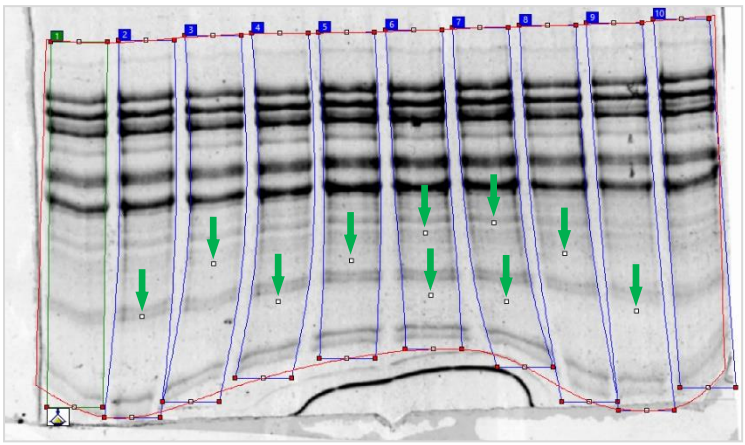


(16) レーンが正しく検出されているか確認してく ださい。

正しく検出されていない場合は、手作業で修正を加えることが可能です。操作（17）を参考に、ツールダイアログの各種ツールを使用して、修正を行ってください。

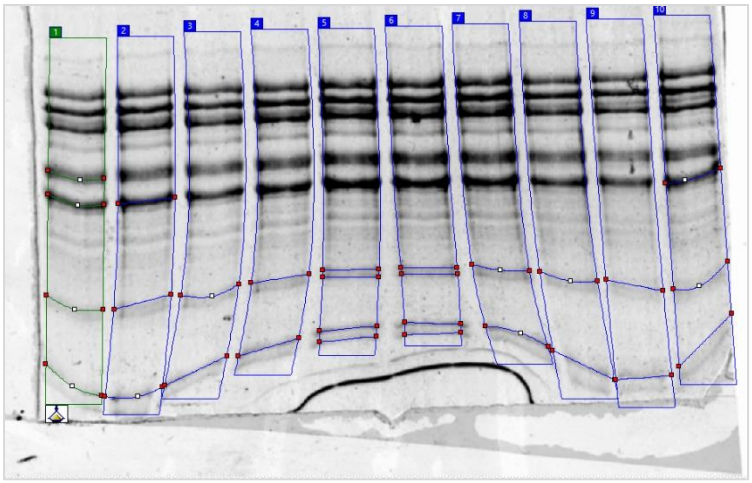


(17) マニュアル修正の各ツールの簡単な説明については、左の説明をご参照ください（詳細につきましては英語版マニュアルをお読みください）。



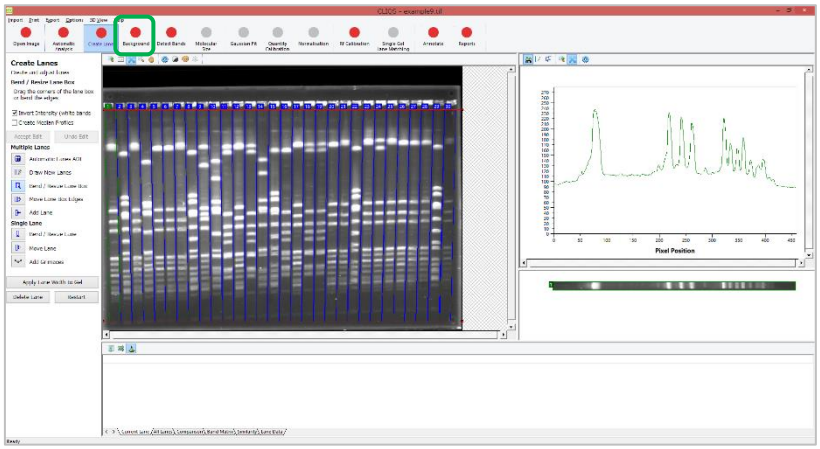
補足 ①
歪んだレーンに合わせてレーン検出枠を曲げたい。

左側のパネルで「Bend / Resize Lane」を選んでください。次に、ゲル画像上で左クリックすると、その位置に□が現れます。この□を動かすことでレーン検出枠を曲げることができます。



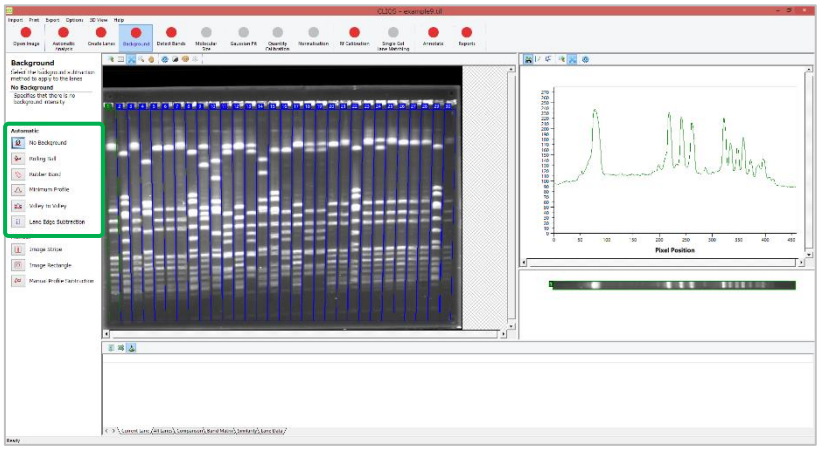
補足 ②
斜めになったバンドやスマイリングしたバンドを正確に検出するために。

左側のパネルで「Add Grimaces」を選択します。斜めになったバンドやスマイリングしたバンドに沿うように線を曲げることで、バンド検出と定量を正確に行うことが可能になります。



(18) レーン作成と修正が終わったら、ナビゲーターの Background ボタンを押して次に進んでください。

1−4.　バックグラウンド補正



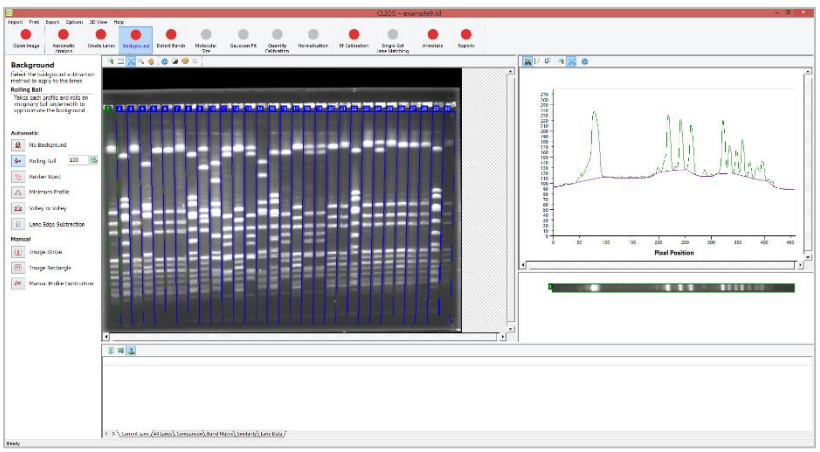
(19) バックグラウンド・レベルの検出と補正を行います。

すべてのゲルやブロットにはバックグラウンドがあります。バンドボリュームを正しく定量するためには、バックグラウンド補正は重要です（バンド分子量を定量するだけなら、バックグラウンド補正は必ずしも必要ではありません）。

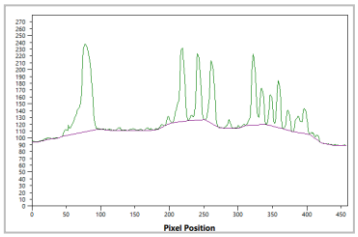
本ソフトウェアでは、５種類の自動バックグラウンド補正メソッドが用意されています。５つの中から１つを選択して、ボタンを押してください。各メソッドの詳細については、ツールダイアログに現れる説明書をお読みいただくか、英語版マニュアルをご参照ください。

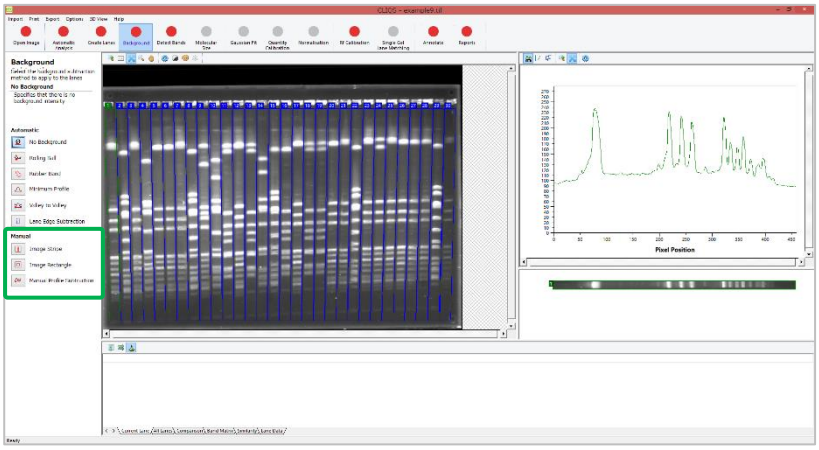
通常は Rolling Ball メソッドを推奨しています。Rolling Ball を選択した場合は、右側に現れるボックスに数値を入力して、 ボタンを押してください（数値は 200 から始めてみてください）

- バックグラウンド補正を行わない場合は、「No Background」を選択してください。
- Valley to Valley メソッドは、先にバンド検出を行う必要があります。



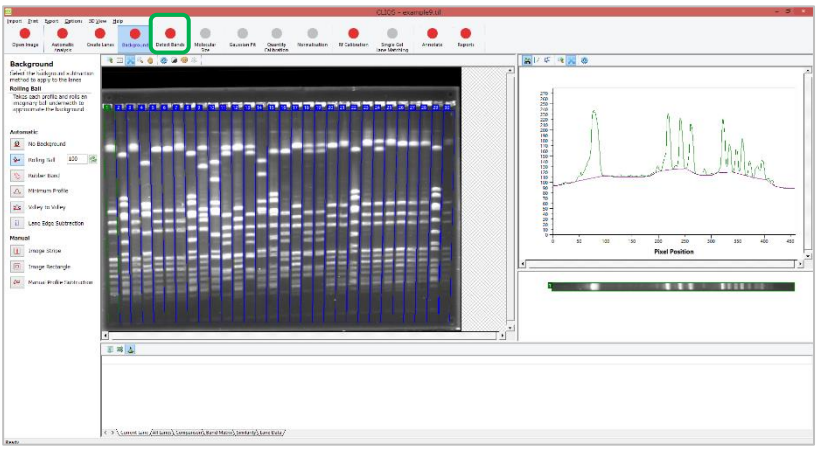
(20) バックグラウンド補正を行うと、レーンプロファイルウィンドウに紫色のバックグラウンドラインが表示されます。





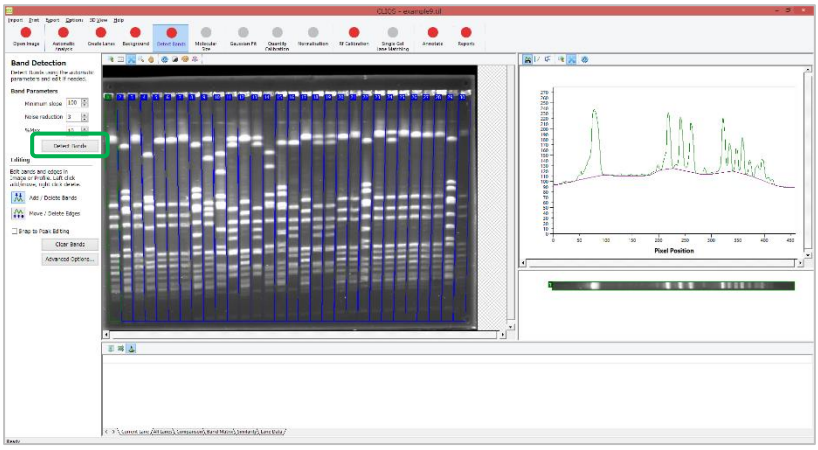
(21) バックグラウンド補正はマニュアルで行うことも可能です。

マニュアルによるバックグラウンド補正では、３つの方法を選択することができます。それぞれの詳細については、ツールダイアログに現れる説明書きをお読みいただくか、 英語版マニュアルをご参照ください。



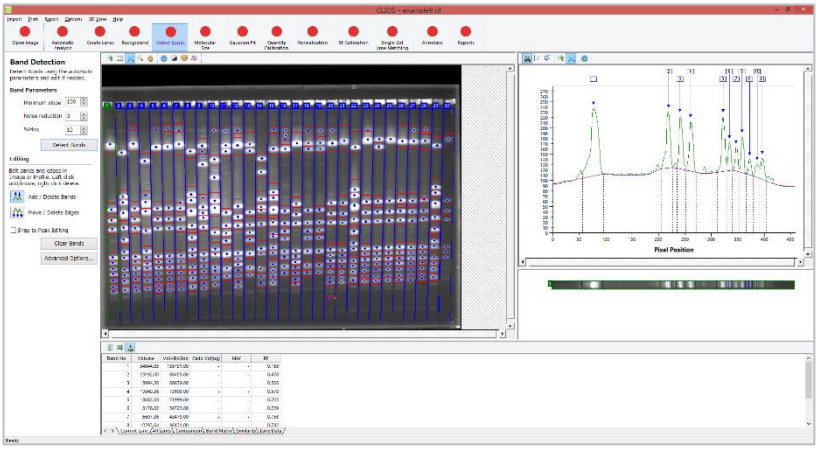
(22) バックグラウンド補正が終わったら、ナビゲーターの Detect Bands ボタンを押して次に進んでください。

1−5.　バンド検出



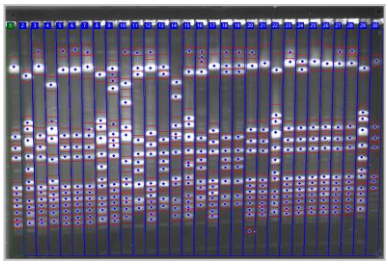
(23) バンドの検出を行います。

ツールダイアログの「Detect Bands」ボタンを押して、バンドの自動検出を行ってください。

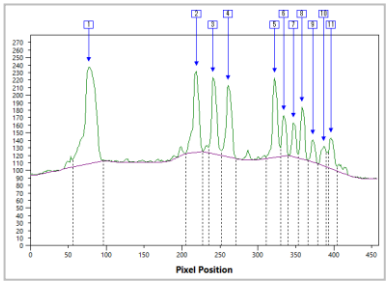


(24) バンドが自動で検出されました。

イメージウィンドウの◆が、検出されたバンドのピークです（バンドピークとは、最もシグナル強度が強いところのことです）。



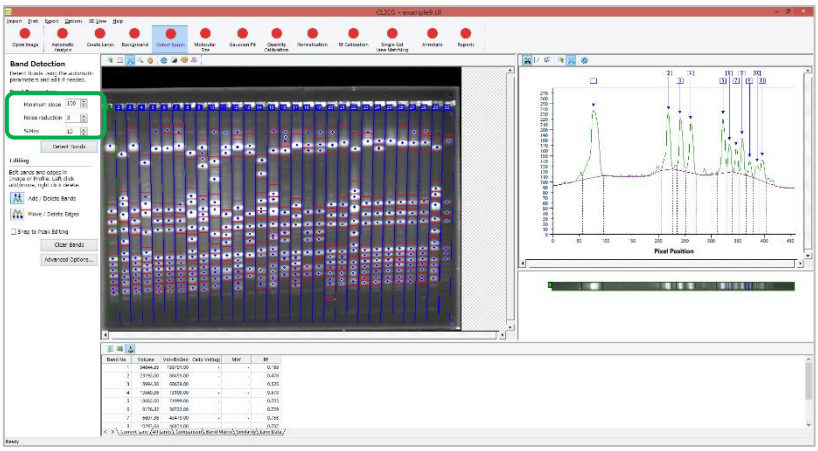
レーンプロファイルウィンドウでは、検出されたバンドピークに→が示され、分子量の大きい方から順にバンド番号が割り振られます。



メジャーメントウィンドウには各バンドの定量値が表示されます。

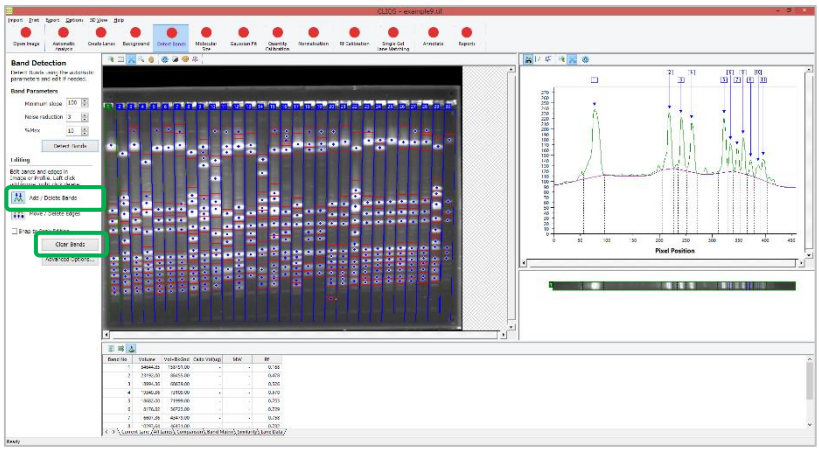
Band No	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	54644.85	158791.00	-	-	0.168
2	23192.00	88455.00	-	-	0.478
3	18994.36	68639.00	-	-	0.526
4	19349.36	73109.00	-	-	0.570
5	18682.00	71999.00	-	-	0.703
6	8176.82	36723.00	-	-	0.729
7	6607.36	43479.00	-	-	0.758
8	10293.64	46131.00	-	-	0.782

Current Lane | All Lanes | Comparison | Band Matrix | Similarity | Lane Data



(25) バンドの検出が上手くいっていない（バンドではないところがバンドとして検出されている、バンドがあるのに検出されていない）場合は、ツールダイアログのパラメーターを調整してバンド検出感度を変更してください。パラメーターは３種類あります。

- Minimum slope
  Slope とはプロファイル中のカーブの立ち上がり角度のことです。Minimum slope はその最小値です。数値を大きくすると検出感度が下がり、薄いバンドが検出されなくなります。
- Noise reduction
  ノイズの閾値です。数値を大きくするほど、検出されるバンド数が少なくなります。
- % Max
  ゲル中の最も濃いバンドのピークに対するピーク強度のパーセンテージです。数値を大きくするほど、検出されるバンド数が少なくなります。



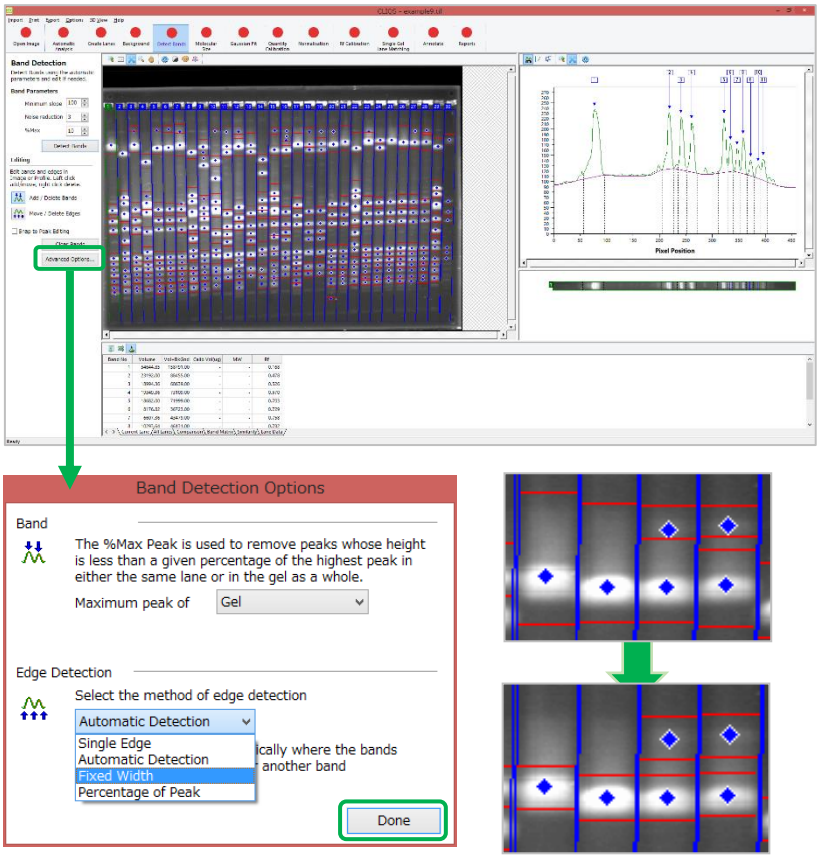
(26) バンドを手動で追加したり、削除したりすることもできます。

ツールダイアログの Add / Delete Bands を押してください。

バンドを削除するには、イメージウィンドウ上で削除したいバンドの◆の上にカーソルを合わせ、右クリックしてください。

右クリック&ドラッグで囲むとその範囲のバンドをまとめて消すこともできます。
また、ゲル上のすべてのバンド検出をやりなおすには、「Clear Bands」を押してください。

バンドを追加するには、イメージウィンドウ上で追加したいバンドの上にカーソルを合わせて左クリックしてください。



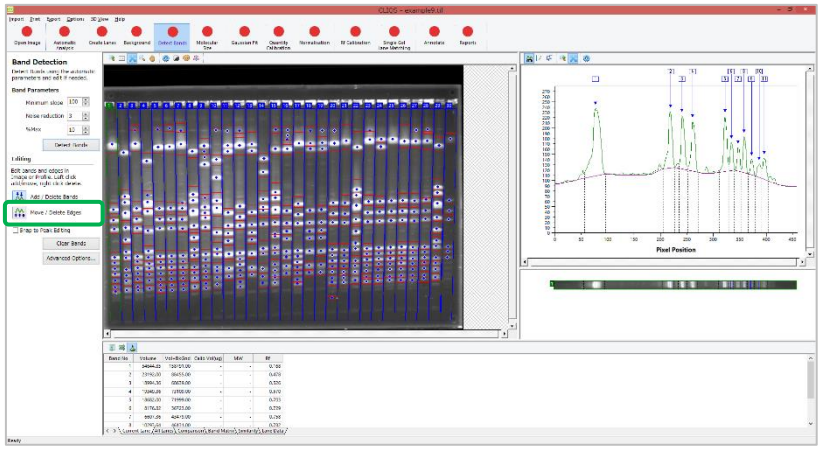
(27) バンドボリュームの定量を行う場合、バンドエッジ（バンドの境界）を正しく検出することも重要です。バンドエッジはイメージディスプレイ上で赤色のラインで表示されています。

デフォルトでは、バンドエッジは Automatic Detection 法により検出されていますが、別の方法を選択することも可能です。

別の方法を選択するには、ツールダイアログの「Advanced Options...」を押してください。

Band Detection Options ボックスが現れます。Edge Detection のドロップダウンメニューからメソッドを選択してください。

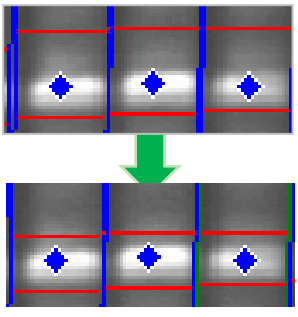
メソッドを選択すると、イメージディスプレイ上のバンドエッジ（赤色のライン）がリアルタイムに変わります。イメージディスプレイを確認して「Done」を押してください。

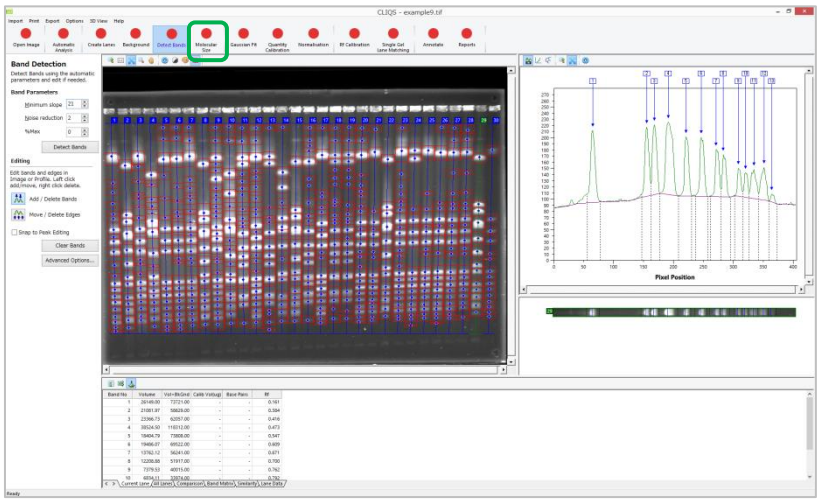


(28) バンドエッジはマニュアルで修正することもできます。

ツールダイアログの Move / Delete Edges を押してください。

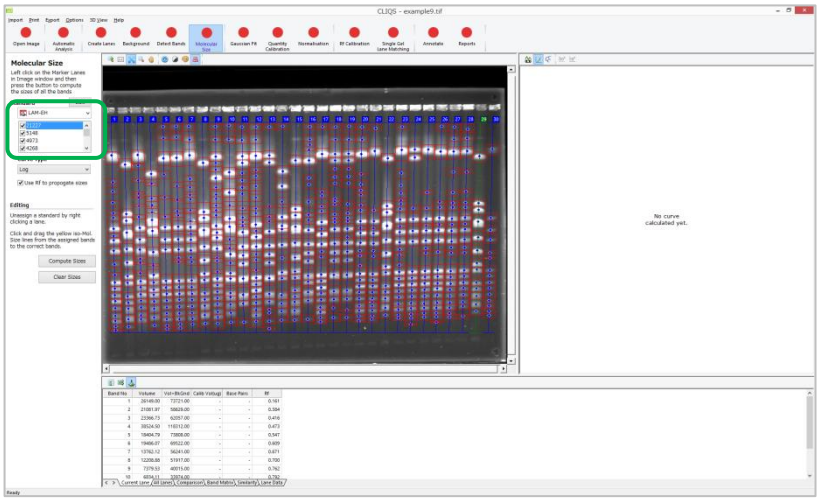
イメージウィンドウのバンドエッジ（赤色のライン）の上にカーソルを合わせると、⇔が現れます。⇔を動かしてエッジラインを調整してください。





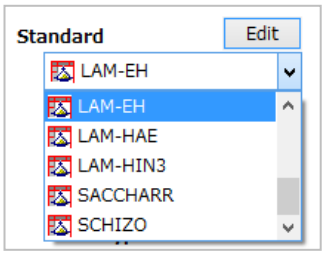
(29) バンドピークの検出とバンドエッジの調整が終わったら、ナビゲーターの Molecular Size ボタンを押して次に進んでください。

1−6.　分子量の算出

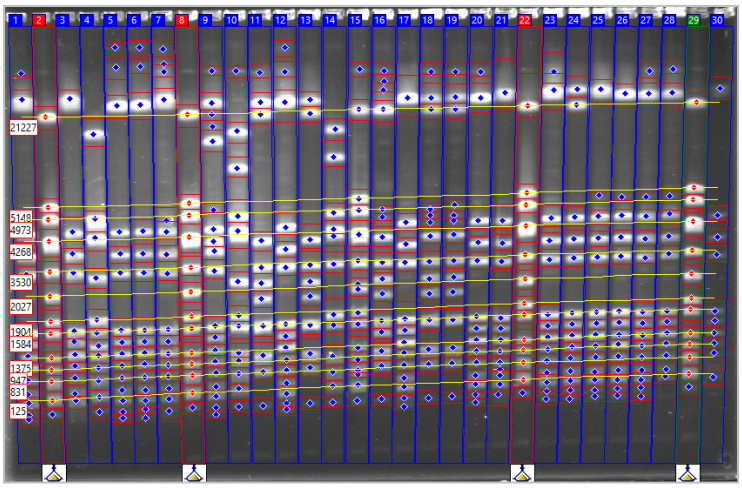


(30) 分子量マーカーから各バンドの分子量の算出を行います。

ツールダイアログのドロップダウンメニューから使用している分子量マーカーを選んでく ださい。

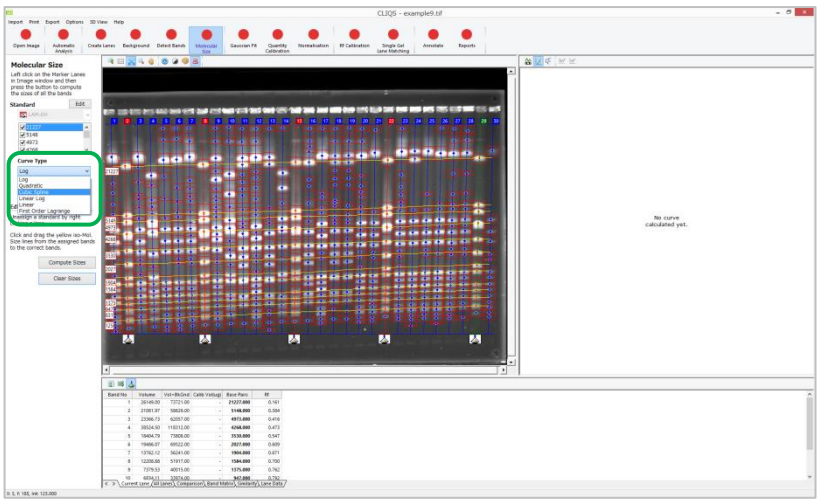


リストに目的の分子量マーカーがないときは、設定していただくことができます。操作（37）をご参照ください。

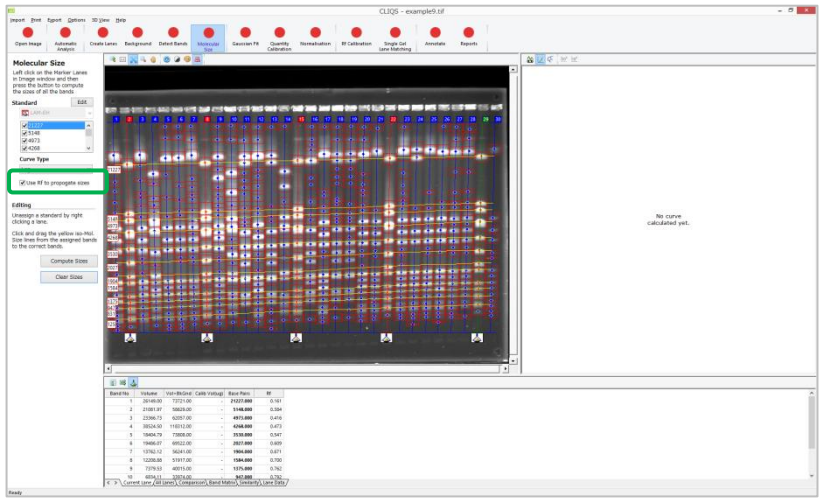


(31) イメージウィンドウで、同じ分子量マーカーを流したすべてのレーンをクリックで選択してください（マーカー番号やバンドの上をクリックすると選択できませんので、レーンの何もないところをクリックしてください）。

マーカーレーンを選択すると、そのレーンの バンドピークが◆から◆に変わります。複数のマーカーレーンを選んだ場合は等分子量ライン（黄色のライン）が引かれます。

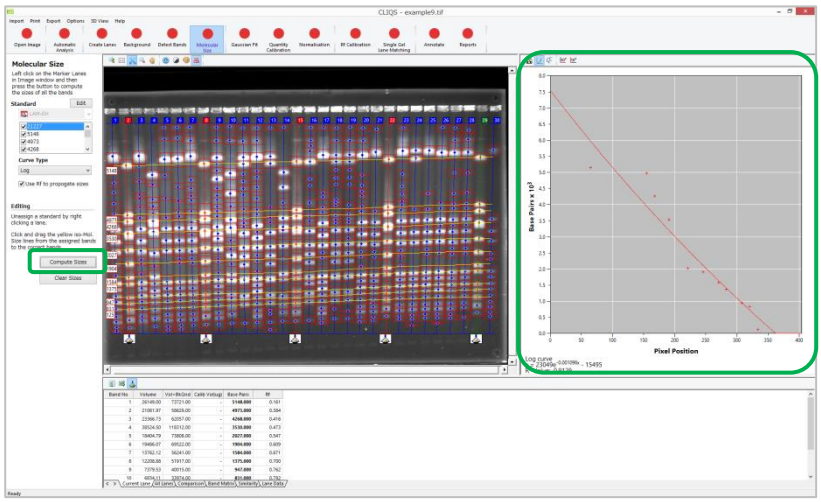


(32) Curve Type を選択してください。Cubic Spline がお奨めです。各アルゴリズムの詳細につきましては英語版マニュアルをご参照ください。



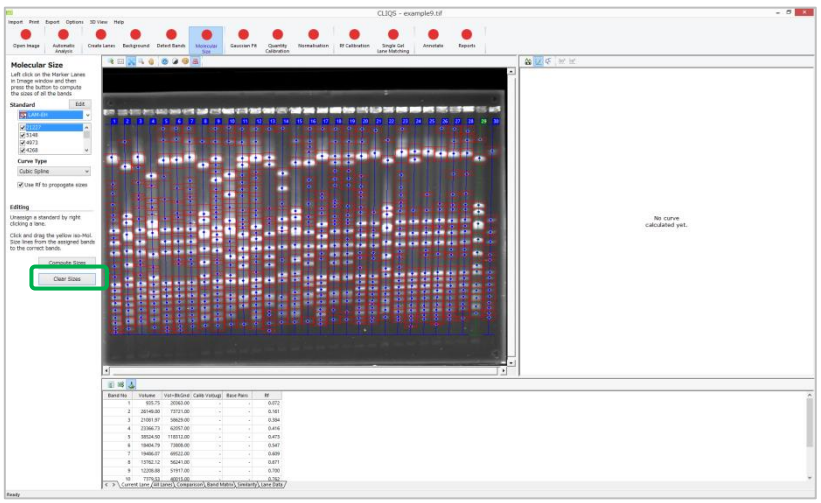
(33) 分子量の算出に Rf 値(相対移動度)を使用する場合は、「Use Rf to propagate sizes」にチェックを入れてください。

Rf 計算の基準（Rf =1.0 となるところ）は、レ ―ン検出の下端です。

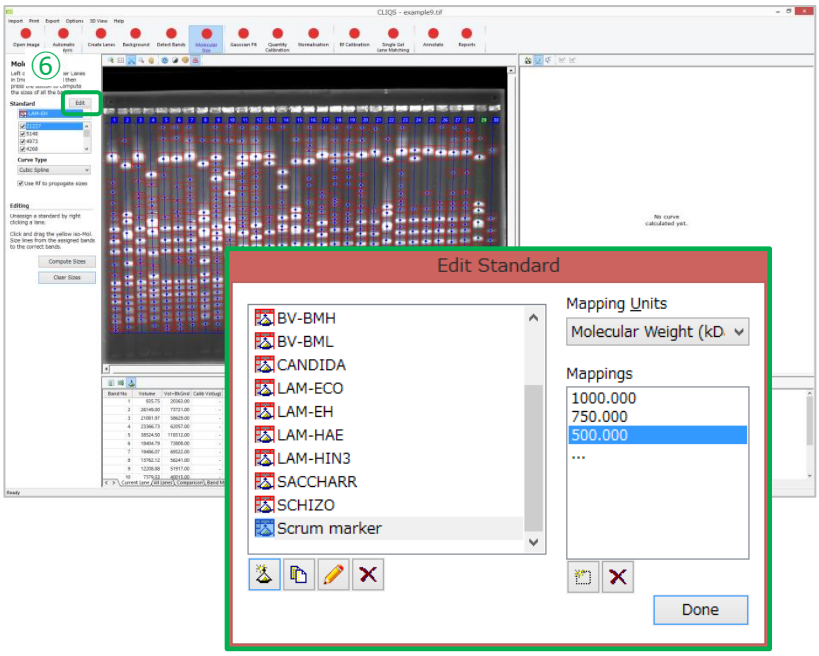


(34) 「Compute size」を押すと分子量が計算され、メジャーメントウィンドウの MW 欄に計算結果が表示されます。赤字は分子量マーカーの範囲から外れているバンドです。

グラフウィンドウには分子量キャリブレーションカーブが表示されます。



(36) 分子量計算をやり直したいときは、「Clear sizes」を押すと、計算結果をクリアすることができます。



(37) お使いの分子量マーカーが登録されていない場合は新たに作成することができます。

① 「Edit」ボタンを押すと Edit Standard ボックスが開きます。

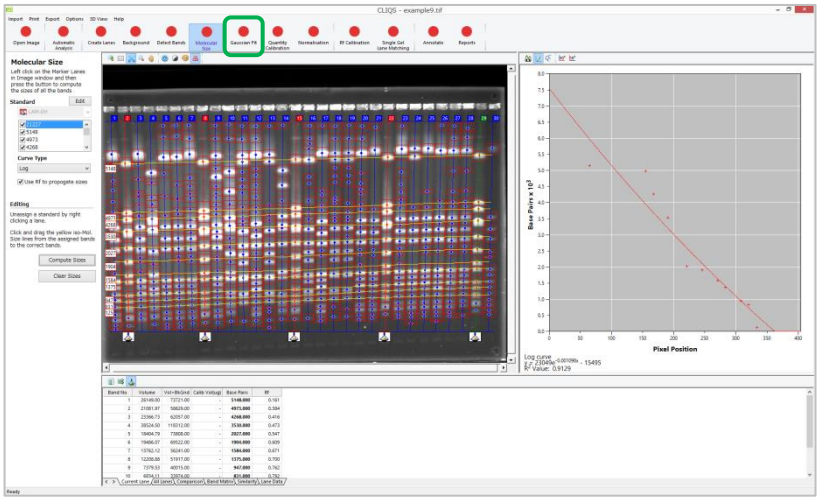
② ボタンを押すと新たなマーカー を追加することができます。

③ 追加するマーカーの名前を入力してください。

④ 分子量の単位をドロップダウンから選んでください。

⑤ 各バンドの分子量を大きい方から順に入力してください。

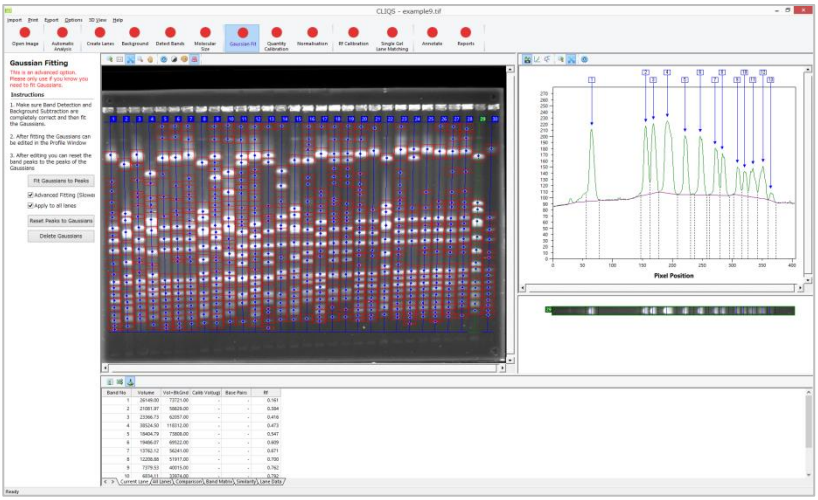
⑥ 「Done」を押して終了してください。

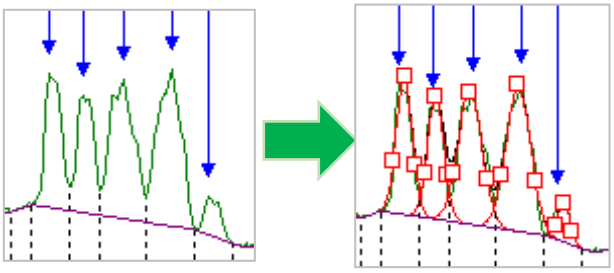


(38) 分子算出が終わったら、ナビゲーターの

ボタンを押して次に進んでください。

1−7.　ガウシアン・フィッティング

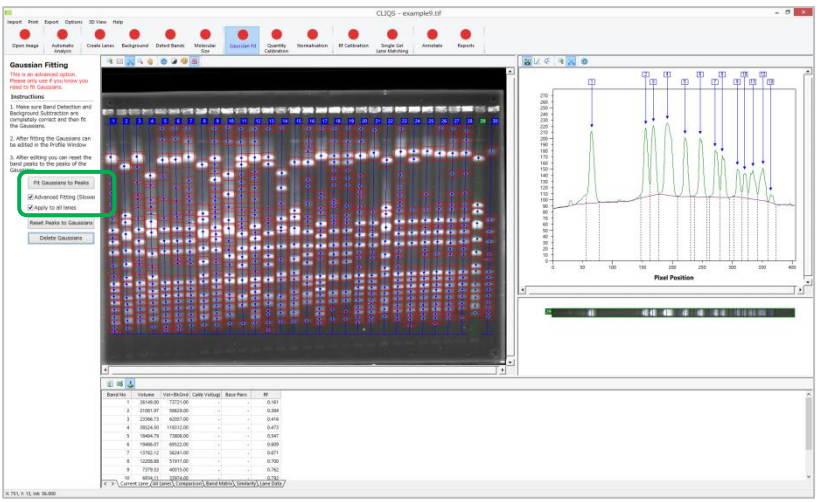




フィッティング前　　フィッティング後

(39) ガウシアン・フィッティング（正規フィッティング）は、バンド同士が近接して重なり合っているときに有効なオプション機能です。バンドが近接していると、それぞれのバンド濃度を正確に算出するのが困難ですが、ガウシアン・フィッティングを用いると、重なり合ったバンドをそれぞれのバンドに分解してバンドボリュームを算出することが可能になります。

ガウシアン・フィッティングを行うには、バンドピークの検出とバックグラウンド補正が終わっている必要があります。また、精確なフィッティングのためには、バンドピーク（レーンプロファイリングウィンドウの → とイメージウィンドウの◆）が、本来のピーク位置に正確に検出されている必要があります。

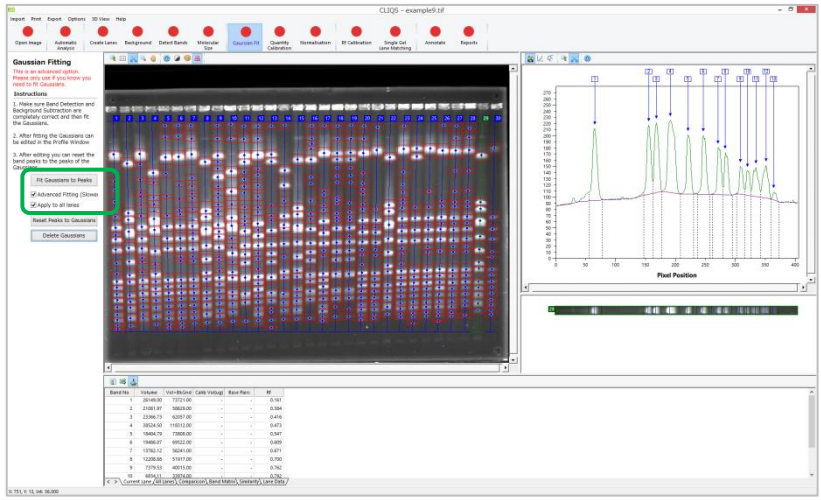


(40) ガウシアン・フィッティングには、Basic と Advanced の 2 つがあります。

バックグラウンド補正が行われ、バンドピークが正確な位置に検出されていれ ば、Advanced の方が精確です。ただし、 Advanced フィッティングは、バンド数が多いときには処理に時間がかかります。

Advanced フィッティングを行うには、ツールダ イアログの「Advanced Fitting」にチェックを入れ、その上の「Fit Gaussians to Peaks」ボタンを押してください。

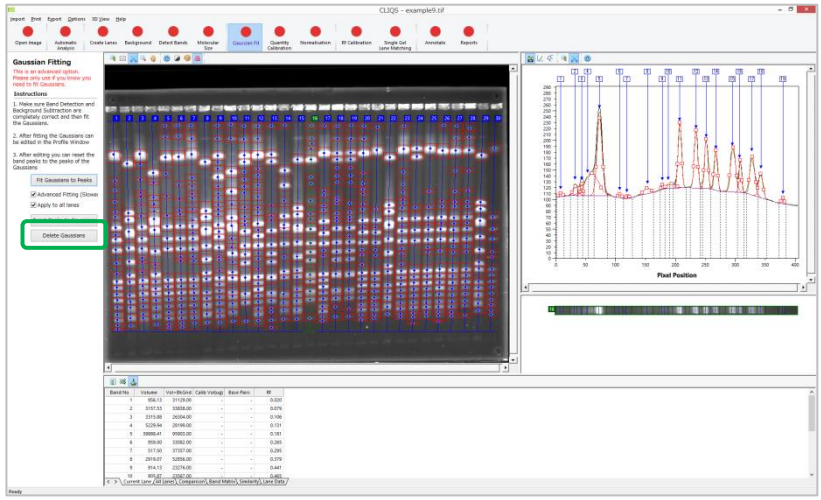
「Apply to all lanes」にチェックを入れるとすべてのレーンのフィッティングが行われます。チェックを入れないとイメージウィンドウで緑色に選択されているレーンだけ行われます。



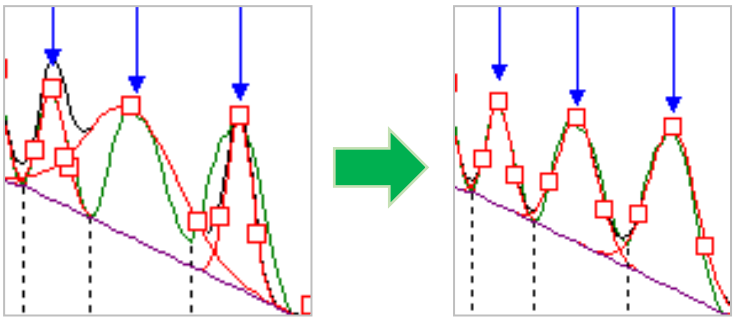
(41) Basic フィッティングは、Advanced フィッティングに較べるとフィッティング精度は劣りますが、短時間で処理することができます。

Basic フィッティングを行うには、「Advanced Fitting」にチェックを入れずに、「Fit Gaussians to Peaks」ボタンを押してください。選択中のレーンのフィッティングが行われます。

「Apply to all lanes」にチェックを入れるとすべてのレーンのフィッティングが行われるのは、Advanced フィッティングと同様です。



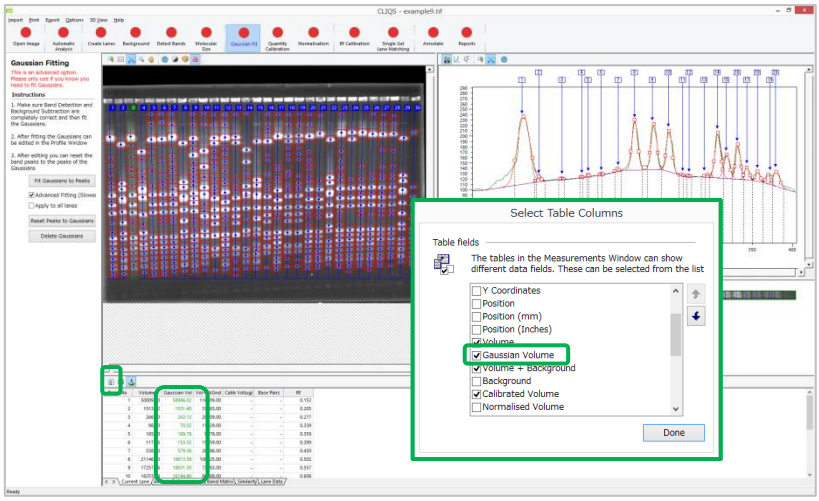
(43) 「Delete Gaussians」タンを押すと、最初からフィッティングをやり直すことができます。



(44) フィッティングをマニュアルで修正することもできます。

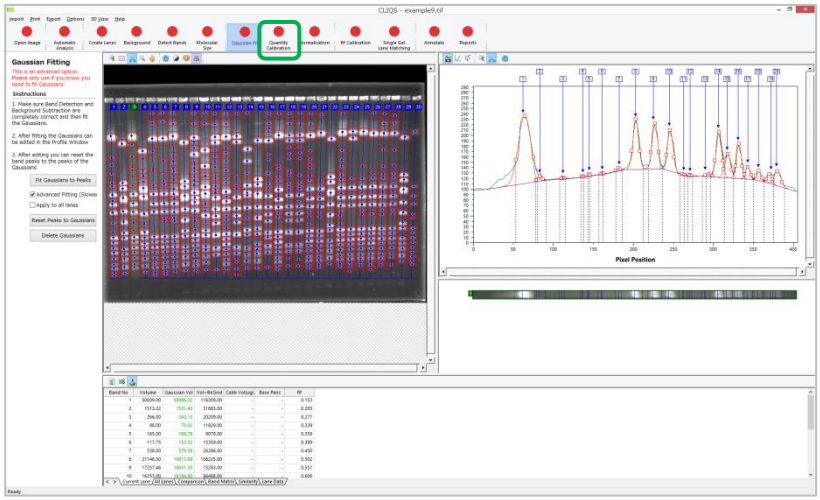
ガウシアンカーブ（赤色のライン）の上にある□をクリック&ドラッグで動かしてフィッティングを調整してください。

カーブのピークにある□を動かすと、カーブを上下左右に動かすことができます。カーブの左右の裾にある□を動かすと、カーブの幅を調整することができます。



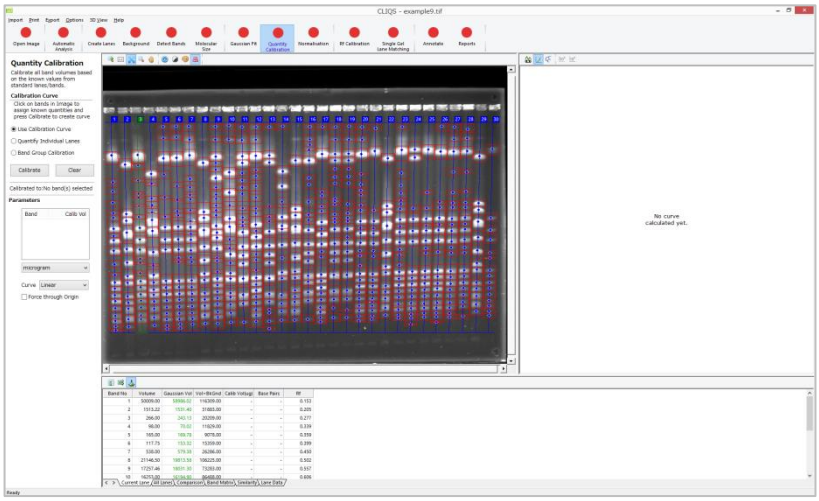
(45) ガウシアンカーブによって得られたバンドボリュームは、メジャーメントウィンドウに緑色で表示されます。

表示されない場合は、メジャーメントウィンドウの ボタンを押して、Select Table Column ボックスを表示させ、「Gaussian volume」にチェックを入れてください。



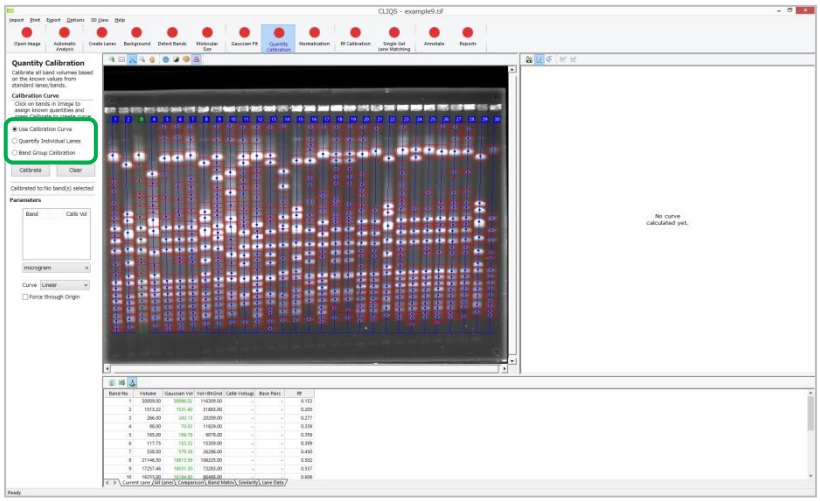
(46) ガウシアン・フィッティングが終わったら、ナビゲーターの ボタンを押して次に進んでください。

1−8.　バンド量のキャリブレーション



(47) バンド量のキャリブレーションを行います。 個々のバンドボリュームは既に計算され、メジャーメントウィンドウの Volume 欄に黒字で、あるいはガウシアン・フィッティングを行った場合は Gaussian Vol 欄に緑字で表示されています。

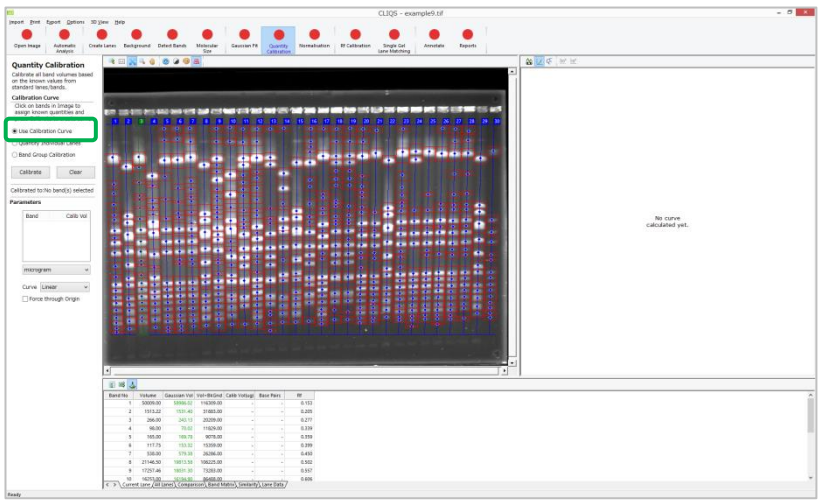
ここでは、いくつかのバンドの濃度が既にわかっている場合に、その値から未知バンドの濃度を計算する方法を説明します。



(48) 計算には3つの方法があります。どれか1つを選択してください。

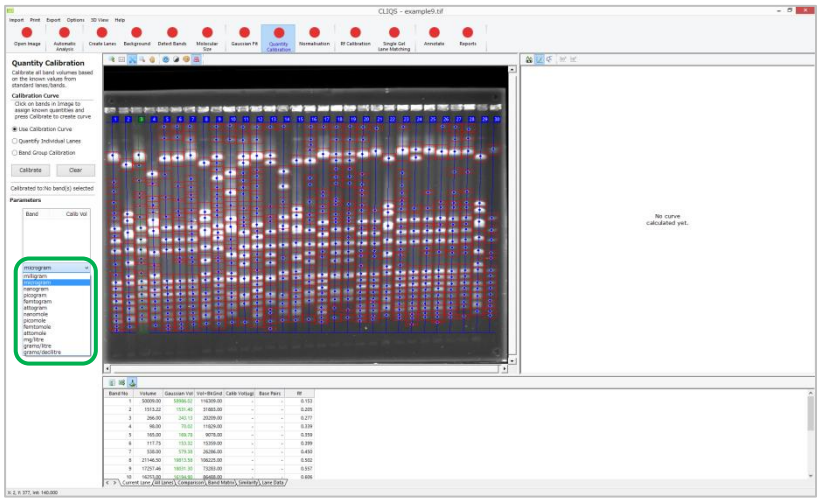
- Use Calibration Curve
  いくつかの濃度既知のバンドからスタンダードカーブを作成し、未知バンドの濃度を定量します。
- Quantify Individual Lanes
  各レーンの合計のバンド量を入力し、その値から各バンドのバンド濃度を定量します。
- Band Group Calibration
  いくつかのバンドの平均バンド濃度あるいは合計バンド濃度から、未知バンドの濃度を定量します。

操作（49）～（67）で各方法の操作方法を順に説明します。

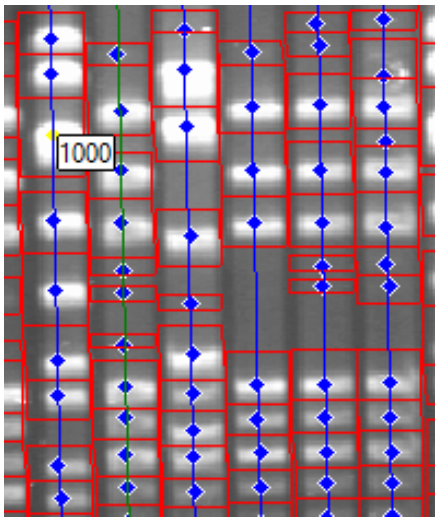


(49) Use Calibration Curve の使い方を説明します。

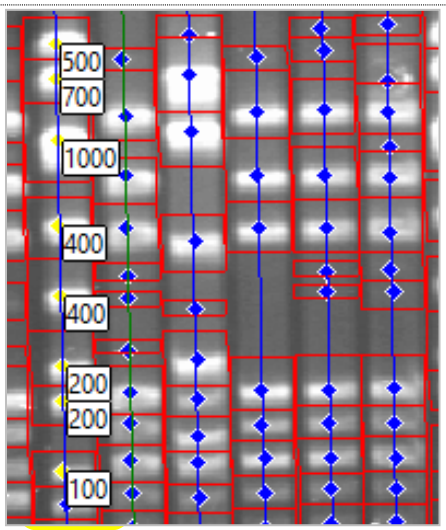
「Use Calibration Curve」を選んでください。



(50) ツールダイアログにあるドロップダウンメニューで単位を選択してください。

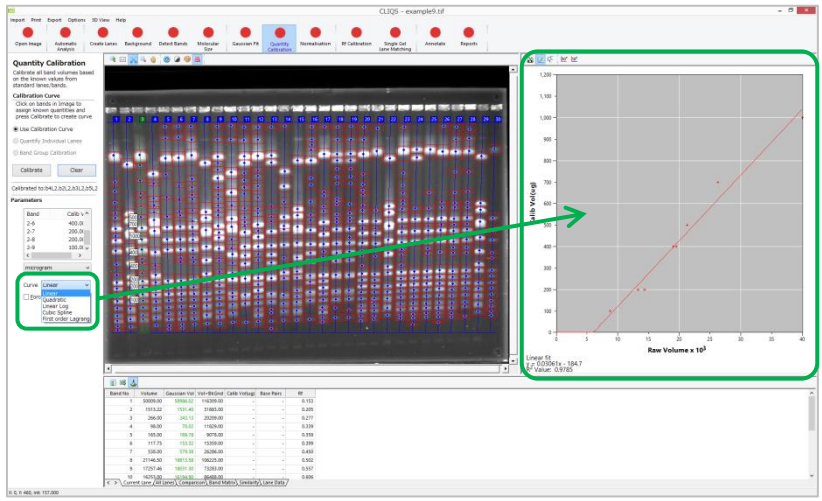


(51) イメージウィンドウで濃度既知のバンドの上をクリックし、ボックスにバンド量 (バンド濃度) を入力してください。バンド上のマークが◆から◆に変わります。



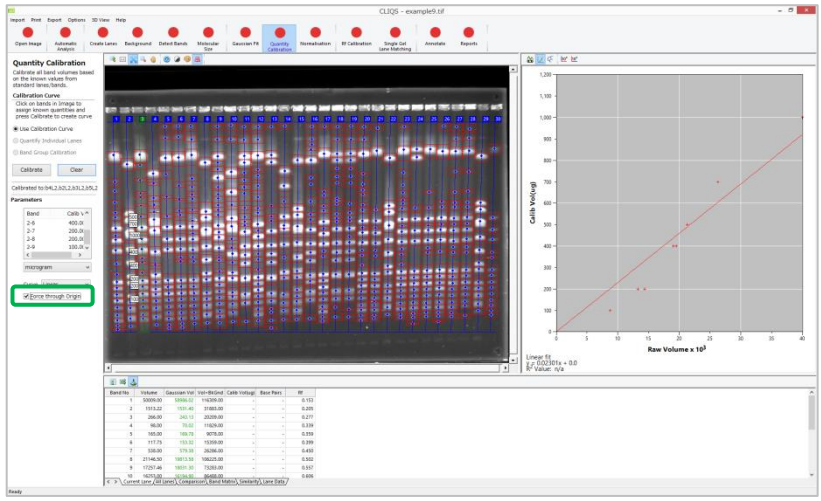
(52) スタンダードカーブに使用するすべての既知濃度バンドに数値を入力してください。

間違ったバンドを選択してしまった場合は、バンド上で右クリックすると解除することができます。

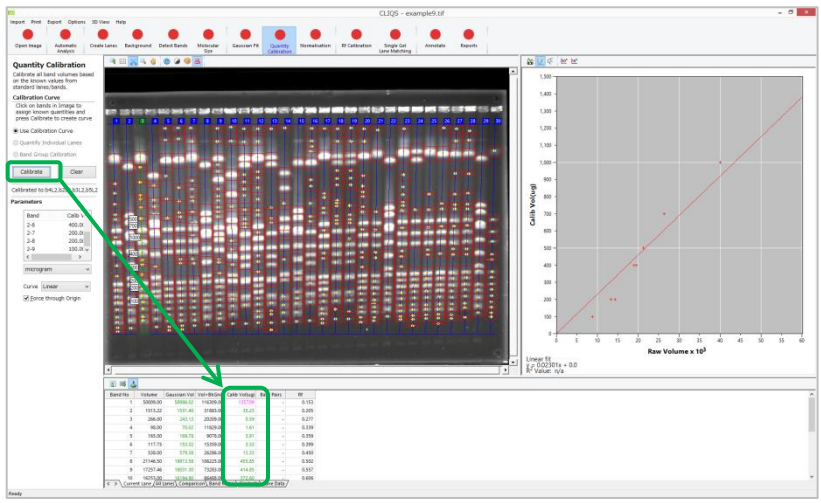


(53) 入力した値に基づき、グラフウィンドウにスタンダードカーブが作られます。

ドロップダウンメニューで、カーブの種類を選択してください。

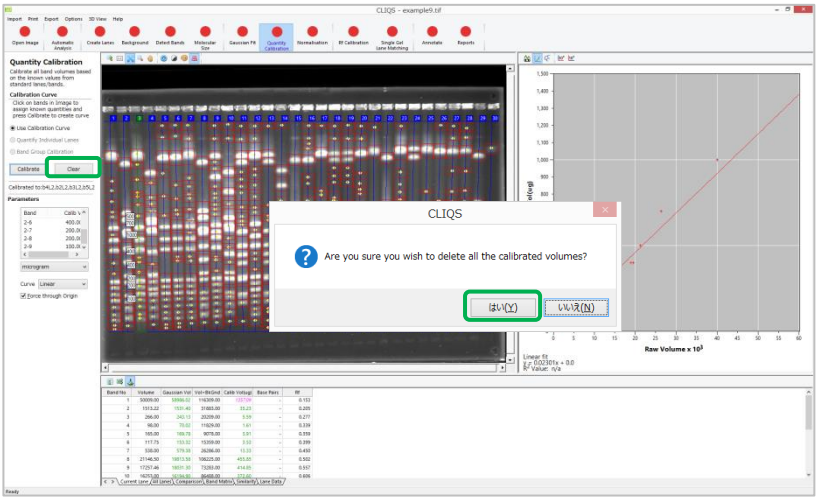


(54) グラフの 0 点を通す場合は、「Force through Origin」にチェックを入れてください。



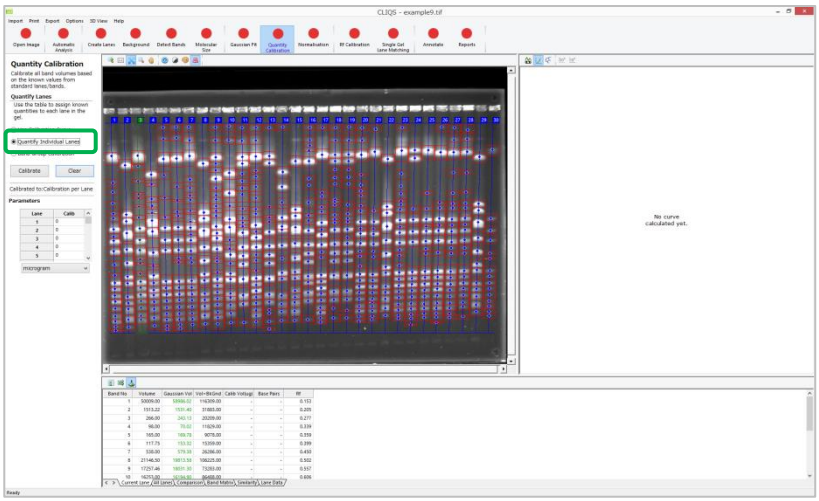
(55) 「Calibrate」ボタンを押すと、スタンダードカー ブに基づき、未知バンドのバンド量 (バンド濃度) が計算されます (ガウシアン・フィッティングを行っている場合は Gaussian Vol から、そうでない場合は Volume から計算されます)。

計算結果は、メジャーメントウィンドウの Calib Vol 欄に表示されます。



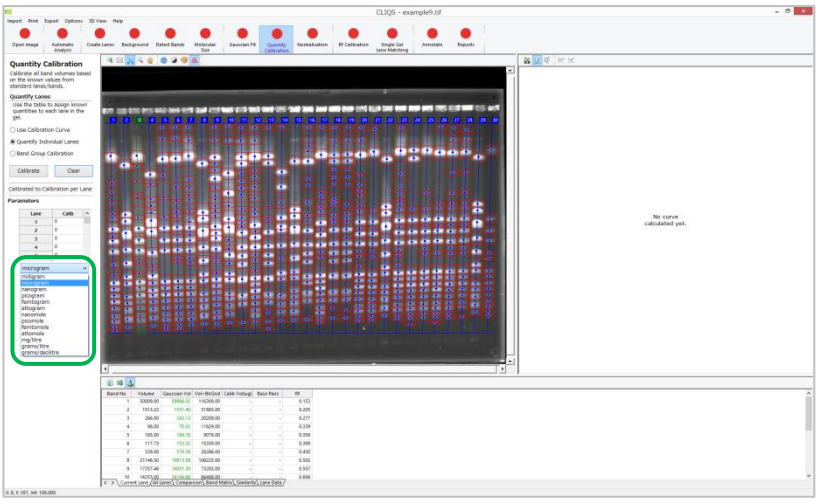
(56) やり直したい時は「Clear」ボタンを押してください。確認画面が出ますので「はい」を押してください。

そのままで良ければ、操作 (67) に進んでください。

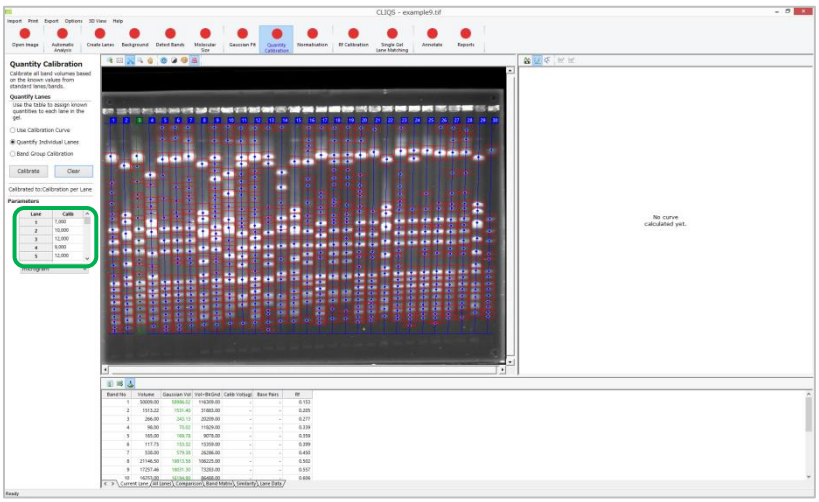


(57) Quantify Individual Lanes の操作方法を説明し ます。

「Quantify Individual Lanes」を選択してください。

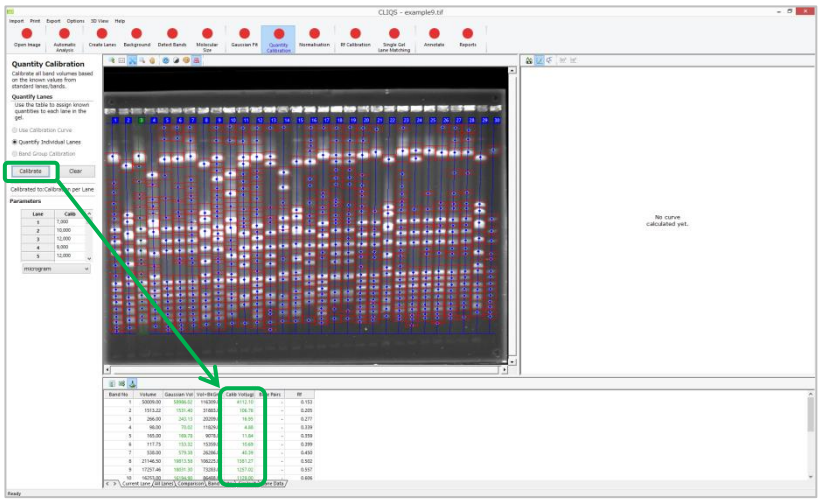


(58) ツールダイアログにあるドロップダウンメニューで単位を選択してください。



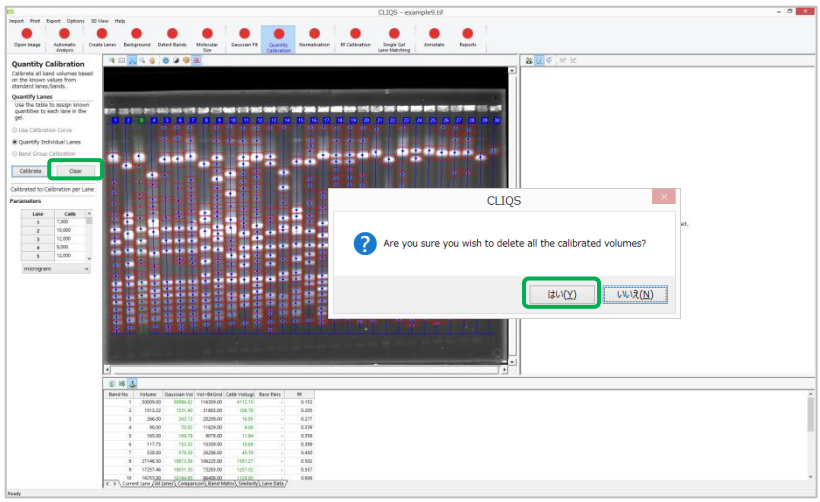
(59) ツールダイアログのボックスに各レーンの総バンド量を入力してください（単位は操作（58）で設定した単位です）。

Lane	Calib
1	7,000
2	10,000
3	12,000
4	9,000
5	12,000



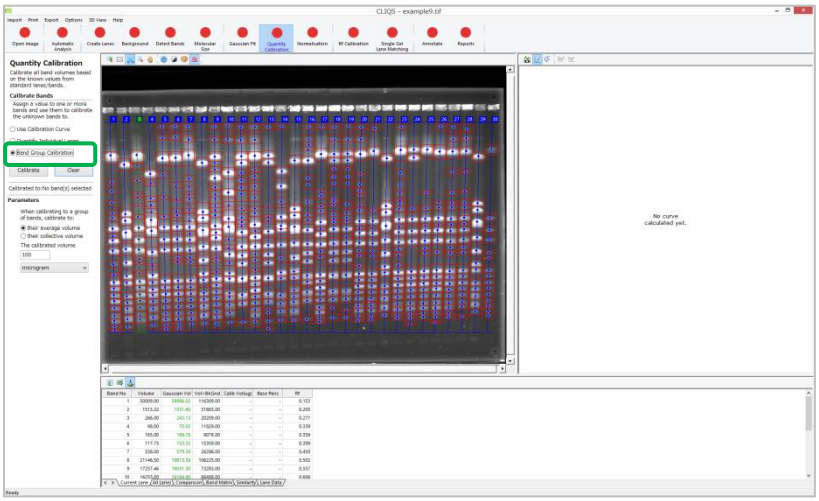
(60) 「Calibrate」ボタンを押すと、未知バンドのバンド量（バンド濃度）が計算されます（ガウシアン・フィッティングを行っている場合は Gaussian Vol から、そうでない場合は Volume から計算されます）。

計算結果は、メジャーメントウィンドウの Calib Vol 欄に表示されます。



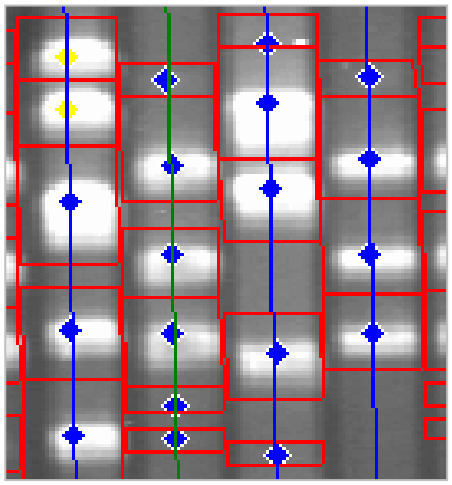
(61) やり直したい時は 「Clear」ボタンを押してください。確認画面が出ますので 「はい」を押してください。

そのままで良ければ、操作 (67)に進んでください。

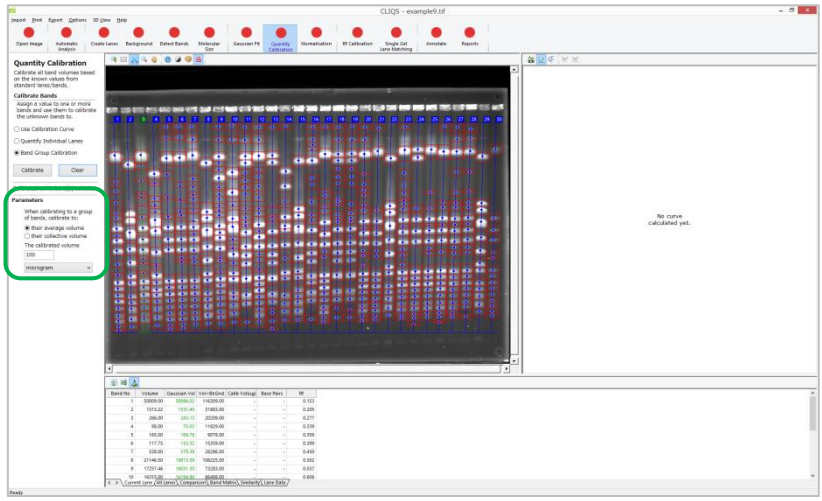


(62) Band Group Calibration の操作方法を説明し ます。

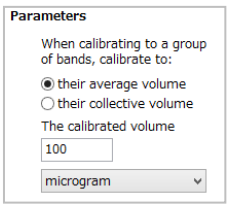
「Band Group Calibration」を選択してください。



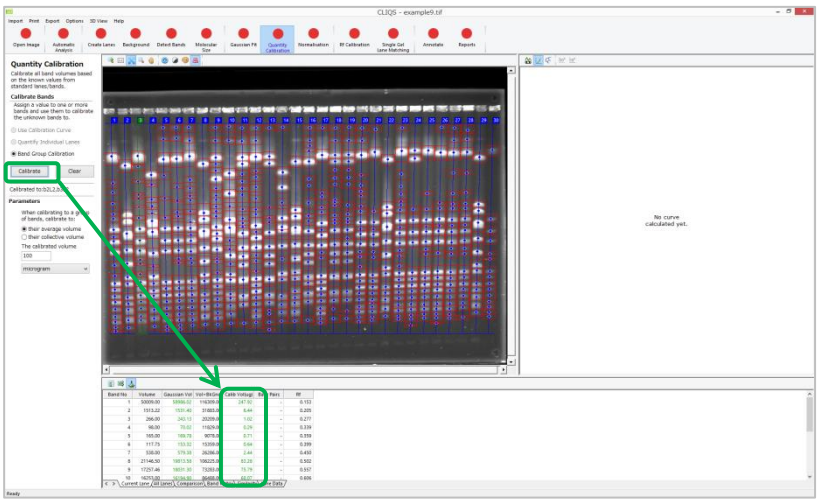
(63) 計算に使用する複数のバンドをイメージウィンドウ上でクリックして選択してください。選択した バンドのマークが◆から◆に変わります。



(64) ツールダイアログ で、「their average volume」あるいは「their collective volume」を選択してください。ドロップダウンメニューから単位を選び、ボックスにノーマライゼーション後のボリュームを入力してください。

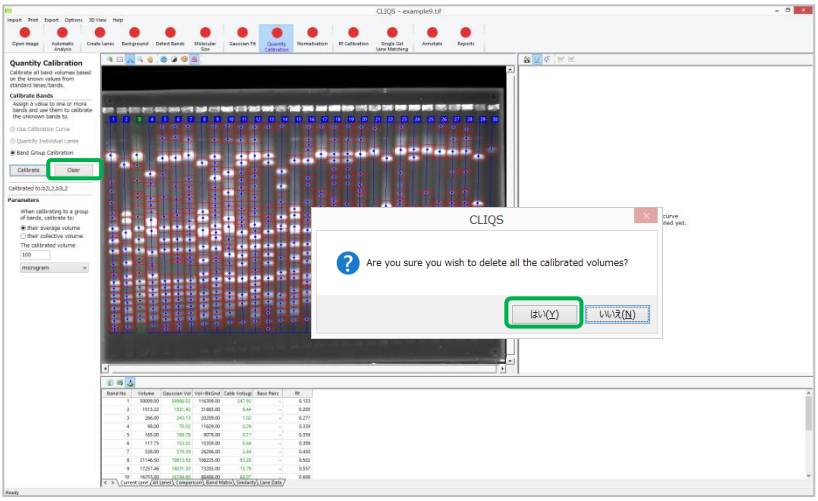


例えば「their average volume」を選び 100 を入力すると、操作（63）で選んだバンドの平均値が 100 になるように計算されます。「their collective volume」を選ぶと、合計が 100 になるように計算されます。



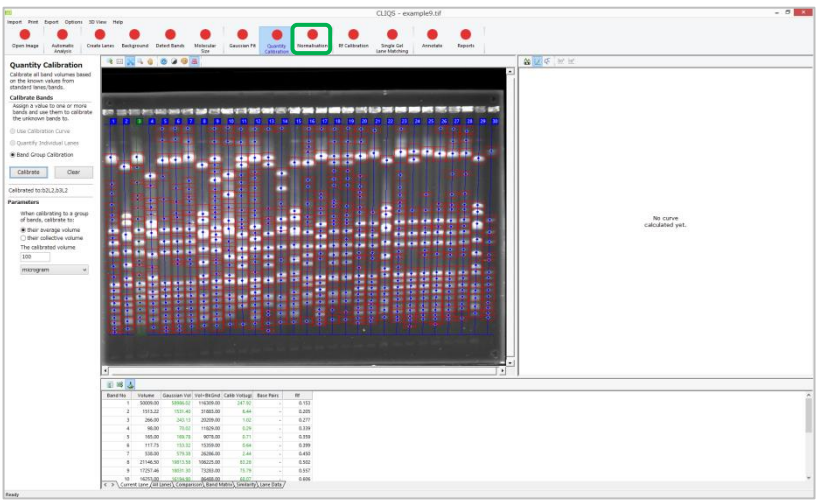
(65) 「Calibrate」ボタンを押すと、未知バンドのバンド量（バンド濃度）が計算されます（ガウシアン・フィッティングを行っている 場合は Gaussian Vol から、そうでない場合は Volume から計算されます）。

計算結果は、メジャーメントウィンドウの Calib Vol 欄に表示されます。



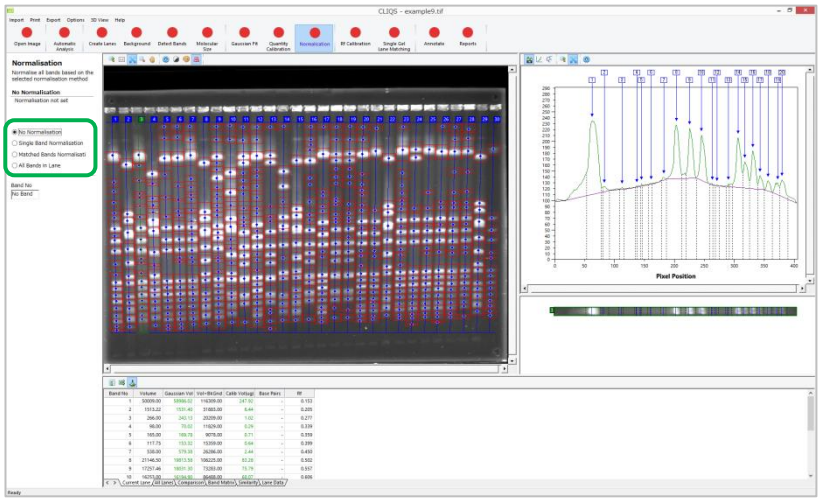
(66) やり直したい時は「Clear」ボタンを押してください。確認画面が出ますので「はい」を押してください。

そのままで良ければ、操作 (67) に進んでください。



(67) バンド量のキャリブレーションが終わったら、 ナビゲーターの Normalisation ボタンを押して次に進んでください。

1−9.　ノーマライゼーション

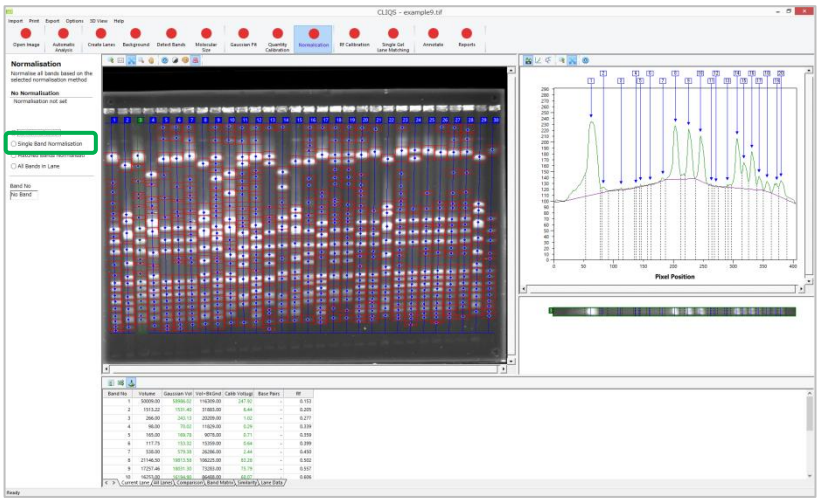


(68) バンドボリュームのノーマライゼーションを行います。レーン間でのローディングのバラつきを補正することができるため、サンプル間でのバンドボリュームの比較定量を行いたい場合に便利な機能です。

3 つのノーマライゼーション方法をご選択いただけます。

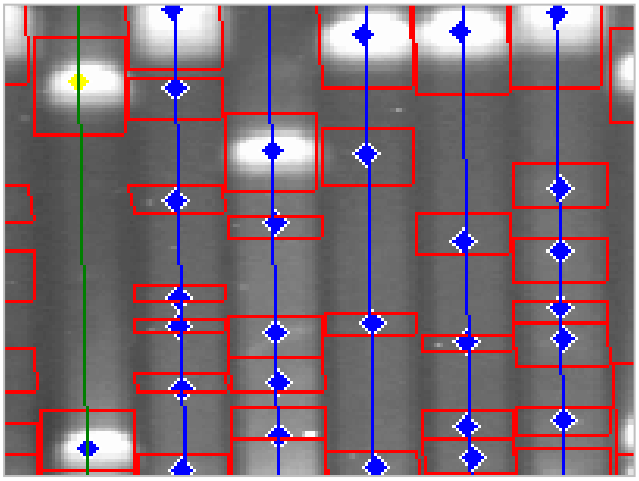
- Single Band Normalisation
  特定の（1 つの）バンドを指定し、そのバンドボリュームを 100 としたときの、その他のバンドの相対値を算出します。ゲル上で検出されているすべてのバンドの相対値を返します。
- Matched Bands Normalisation
  特定の（1 つの）バンドを指定し、そのバンドボリュームを 100 としたときの、その他のバンドの相対値を算出します。そのバンドにマッチするバンドが存在するレーンのみついて、相対値が与えられます。マッチするバンドがないレーンについては、すべてのバンドの数値が 0（ゼロ）になります。この機能をお使いいただくためには事前にレーン間でのバンドマッチングが必要です。
- All Bands in Lane
  指定したレーンに属する全てのバンドボリュームを 100 とし、それぞれのバンドにマッチするバンドがその他のレーンにある場合には、その相対量（100 に対する相対値）を算出します。マッチするバンドがない場合は値が 0（ゼロ）になります。この機能をお使いいただくためには事前にレーン間でのバンドマッチングが必要です。

尚、ノーマライゼーションを行わない場合は、「No Normalisation」を選択していただくことができます。

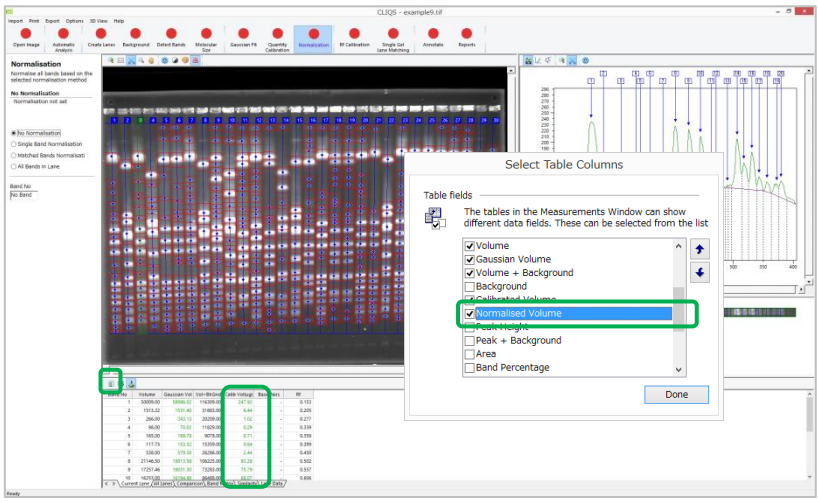


(69) Single Band Normalisation の操作方法を説明します。

「Single Band Normalisation」を選択してください。

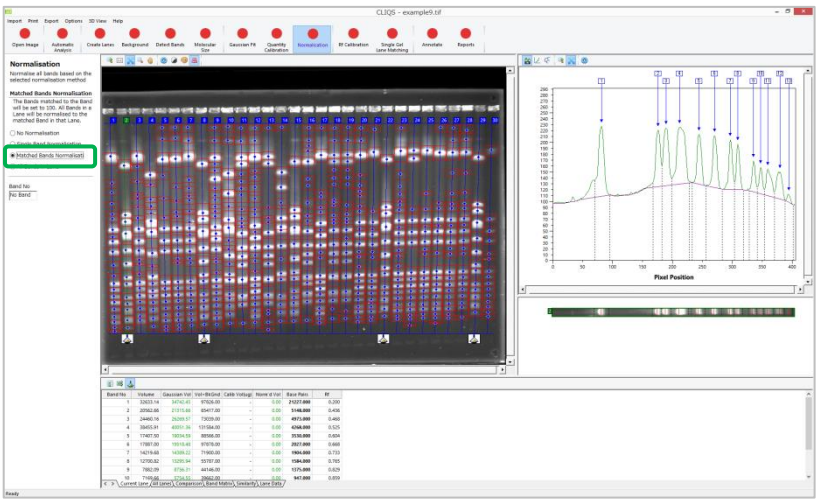


(70) イメージウィンドウでノーマライゼーションの 基準とするバンドをひとつ選んでクリックしてください。選択したバンドのマークが◆から◆に変わります。



(71) ノーマライゼーション後のバンドボリュームは、メジャーメントウィンドウの Norm'd Vol 欄に表示されます。

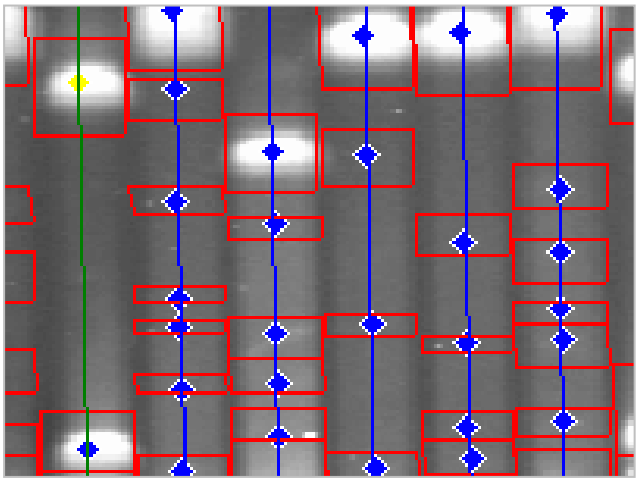
表示されない場合はメジャーメントウィンドウの ボタンを押して、Select Table Column ボックスを表示させ、「Normalised Volume」にチェックを入れてください。



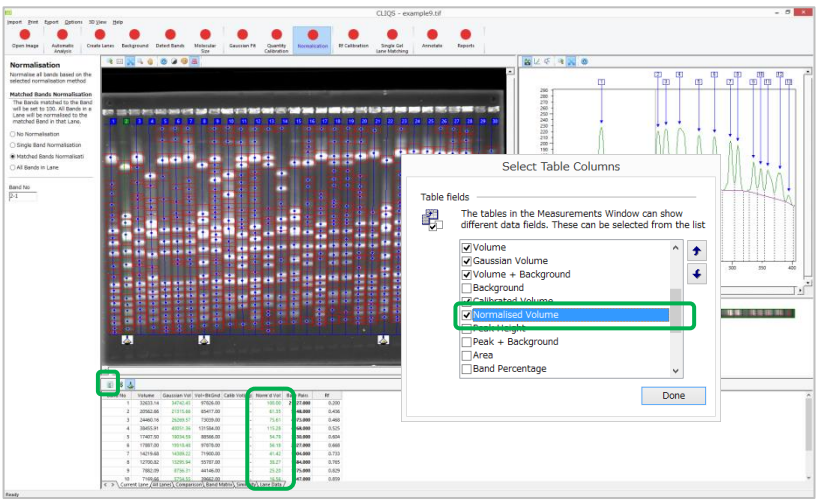
(72) Matched Bands Normalisation の操作方法を説明します。

「Matched Bands Normalisation」を選択してください。

このノーマライゼーション法を行うためには、事前にレーン間でのバンドのマッチングが必要です。マッチングの方法については、「1-10. Rf キャリブレーション」と「1-11. バンドマッチング」をご参照ください。



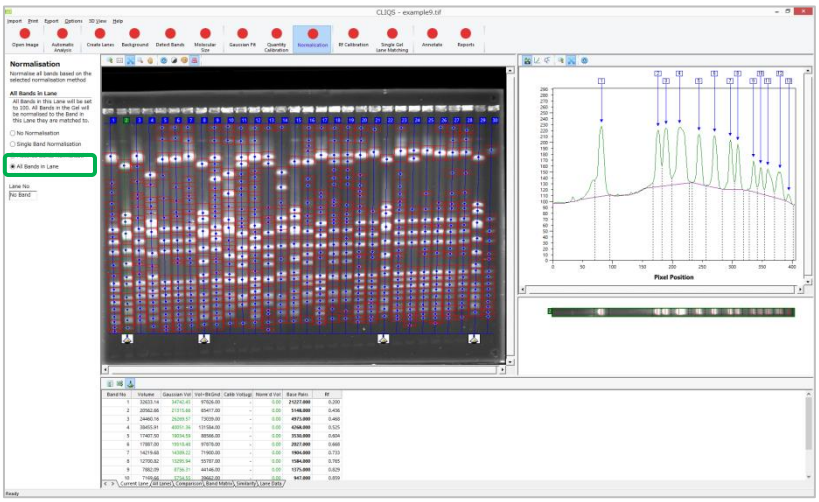
(73) イメージウィンドウでノーマライゼーションの 基準とするバンドをひとつ選んでクリックしてください。選択したバンドのマークが◆から◆に変わります。



(74) ノーマライゼーション後のバンドボリュームは、メジャーメントウィンドウの Norm'd Vol 欄に表示されます（表示誰ない場合は ボタンを押して選択）。

(73)で選択したバンドにマッチするバンドがないレーンはすべてのバンドの Norm'd Vol が 0（ゼロ）になります（下記参照）。

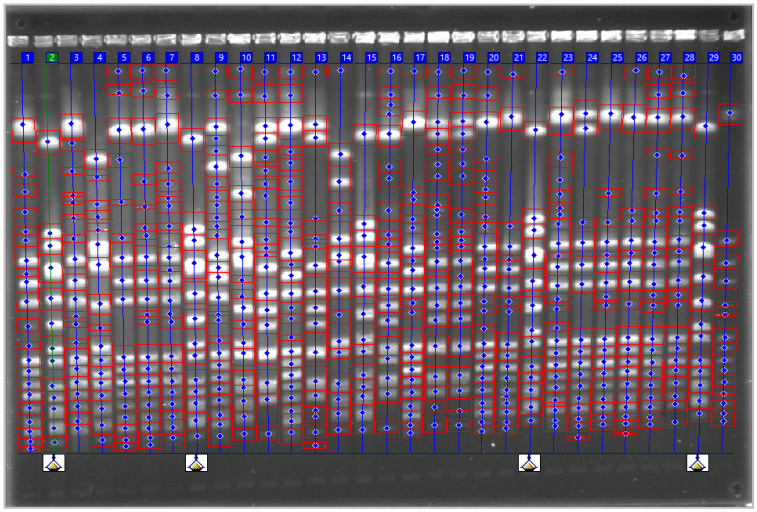
Band No	Volume	Gaussian Vol	Vol+BkGnd	Calib Vol(ug)	Norm'd Vol	Base Pe
1	26454.40	25222.48	91427.00	-	0.00	
2	189.54	305.28	19474.00	-	0.00	
3	694.00	745.60	37493.00	-	0.00	
4	264.40	225.54	31111.00	-	0.00	
5	1265.50	765.69	29228.00	-	0.00	
6	40150.25	39982.02	137056.00	-	0.00	
7	30015.75	27158.31	98317.00	-	0.00	
8	19385.36	20100.26	87370.00	-	0.00	
9	154.00	222.30	15754.00	-	0.00	
10	18934.94	20742.90	82404.00	-	0.00	



(75) All Bands in Laneの操作方法を説明します。

「All Bands in Lane」を選択してください。

このノーマライゼーション法を行うためには、事前にレーン間でのバンドのマッチングが必要です。マッチングの方法については、「1-10. Rfキャリブレーション」と「1-11. バンドマッチング」をご参照ください。



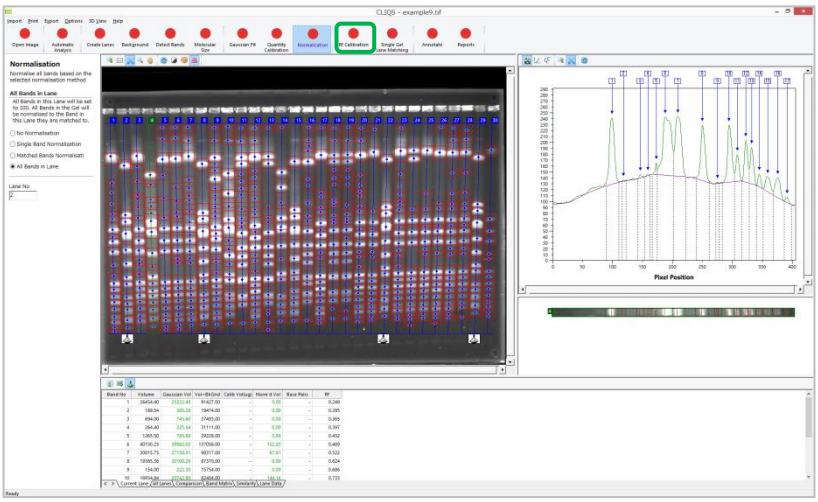
(76) イメージウィンドウでノーマライゼーションの 基準とするレーンをクリックしてください。何もないところではなく、バンドの◆の上をクリックする必要があります。

選択したレーンのすべてのバンドのNorm'd Volが100になります（下記参照）

Band No	Volume	Gaussian Vol	Vol+BkGnd	Calib Vol(ug)	Norm'd Vol
1	32633.14	34742.45	97826.00	-	100.00
2	20562.66	21315.66	65417.00	-	100.00
3	24460.16	26269.57	73039.00	-	100.00
4	38455.91	40051.36	131584.00	-	100.00
5	17407.50	19034.59	88566.00	-	100.00
6	17887.00	19518.48	97878.00	-	100.00
7	14219.68	14389.22	71900.00	-	100.00
8	12700.82	13295.94	55787.00	-	100.00
9	7882.09	8756.31	44146.00	-	100.00

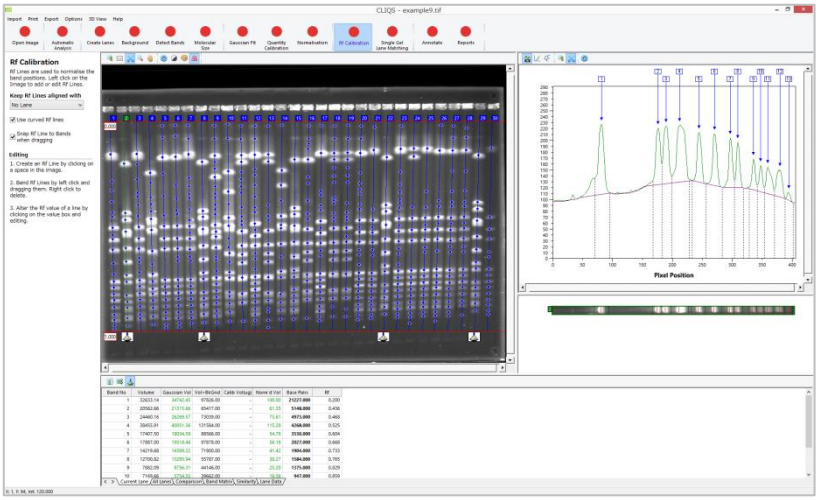
別のレーンの数値をご覧ください。リファレンスレーンにマッチしない（リファレンスレーンいない）バンドのNorm'd Volは0（ゼロ）になります。

Band No	Volume	Gaussian Vol	Vol+BkGnd	Calib Vol(ug)	Norm'd Vol
1	26454.40	25222.48	91427.00	-	0.00
2	189.54	305.28	19474.00	-	0.00
3	694.00	745.60	37493.00	-	0.00
4	264.40	225.54	31111.00	-	0.00
5	1265.50	765.69	29228.00	-	3.59
6	40150.25	39982.02	137056.00	-	152.20
7	30015.75	27158.31	98317.00	-	67.81
8	19385.36	20100.26	87370.00	-	0.00
9	154.00	222.30	15754.00	-	0.00



(77) バンド量のキャリブレーションが終わったら、ナビゲーターのボタンを押して次に進んでください。

1－10.　Rf キャリブレーション

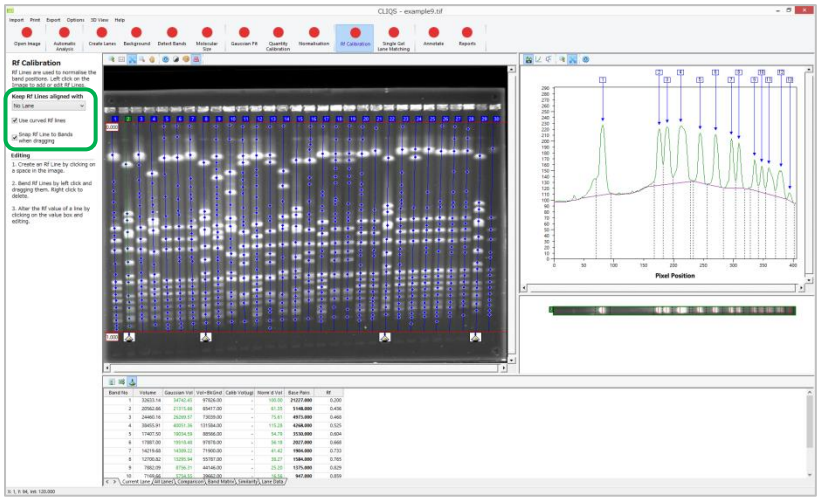


(78) Rf キャリブレーションを行います。

Rf（Retardation Factor）とは、レーン全体の長さを１としたときの相対的な長さ（相対移動度）です。したがって Rf は０～１の数値となります。

Rf キャリブレーションを行うとゲルの歪みやレーン間での同一バンドの移動度の違いを補正することが可能になります。このことにより分子量の正確な算出が可能になります。

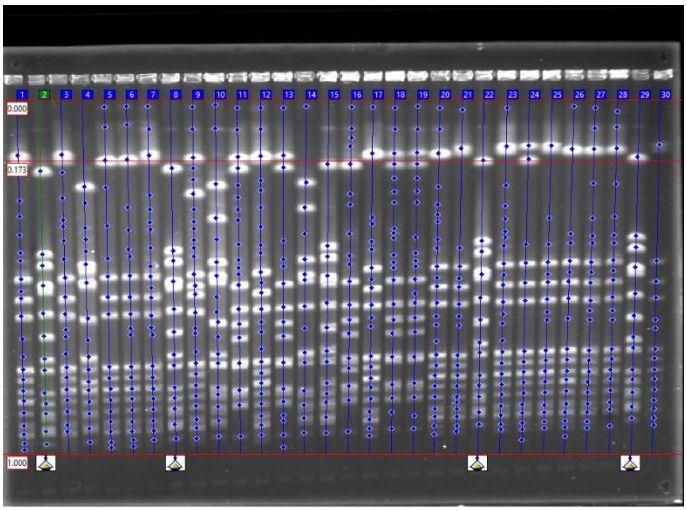
また、バンドマッチング（１－１１）を行うためには、必ず Rf のキャリブレーションを行ってください。



(79) Rf キャリブレーションを行うためには、まずツールダイアログで各種の設定を行います。

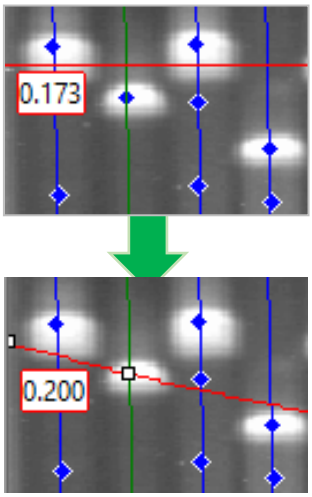
- Keep Rf Lines aligned with
  (79) 以降の操作で Rf ラインを作成すると各ラインの Rf 値（０～１）が入力されますが、その数値をどのレーンから算出するかを選択します。分子量マーカーレーンを選ぶことをお奨めします。
- Use curved Rf lines
  (79) 以降の操作で Rf ラインを作成する際に、Rf ポイント間を曲線にしたい場合はチェックを入れてください（通常はチェックを入れます）。
- Snap Rf Line to Bands when dragging
  (79) 以降の操作で Rf ラインを作成する際に、追加した Rf ポイントがバンド検出ポイントに重なりやすいようにします。

上記の設定は Rf ライン追加中にも変更することができます。



(80) Rf ラインを作成（追加）します。

カーソルが表示されていることを確認し、Rf ラインを追加したい任意の場所で左クリックしてください。赤い Rf ラインが新たに追加されます。

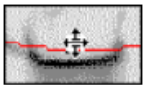


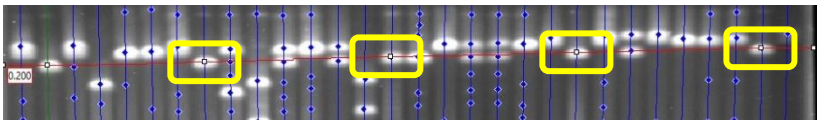
(81) Rf ポイントを追加します。

カーソルが表示されていることを確認し、「keep Rf Lines aligned with」で指定したレーンのバンドの上をクリックしてください。

□がそのバンドの上に追加されます。

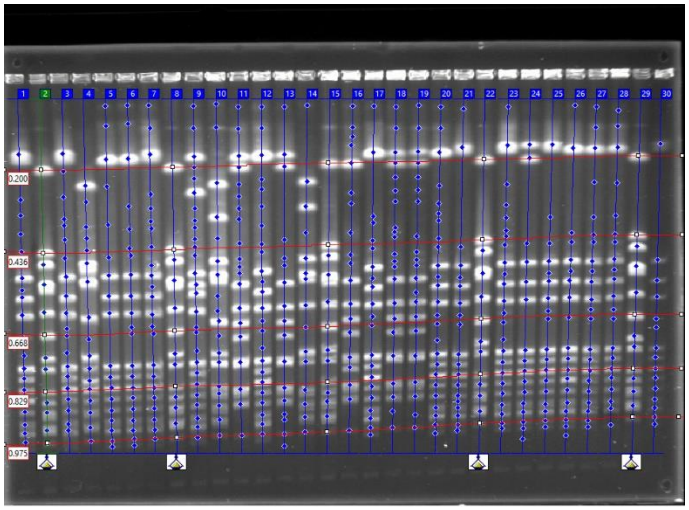
バンド検出ポイントからずれた場合は、左クリックしながらドラッグすると動かすことができます（下図参照）。





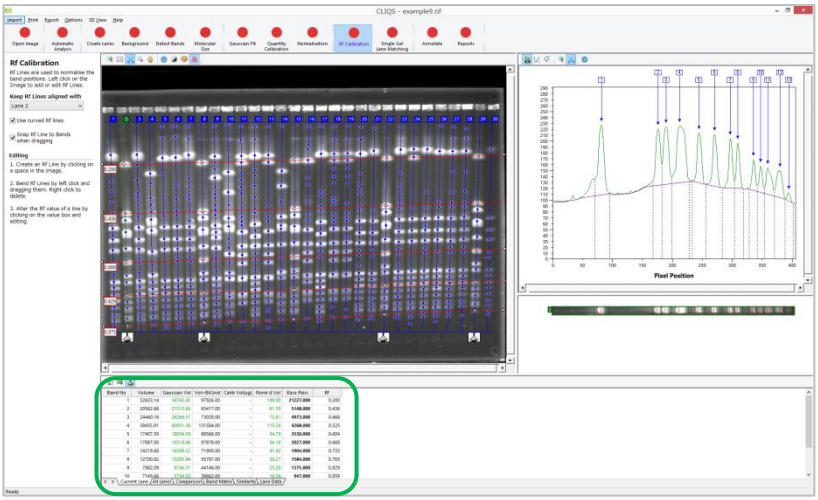
(82) 同様に、別のレーンの同一のバンドにも Rf ポイントを追加していってください（分子量マーカー同士を結ぶと良いです）。

赤いラインがなるべく直線になるようにしてください。

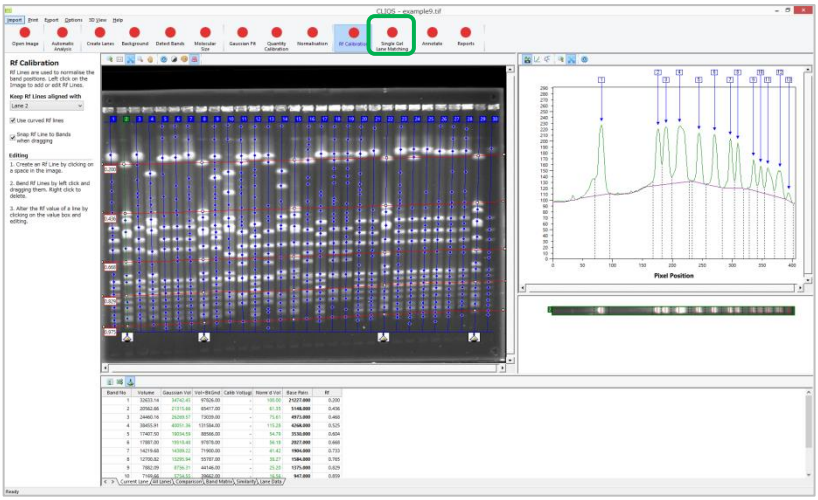


(83) (81)と(82)の操作を繰り返し、Rf ラインを追加していってください。

間違ったRfラインや不要なRfラインは、ライン上で右クリックすると消すことができます。

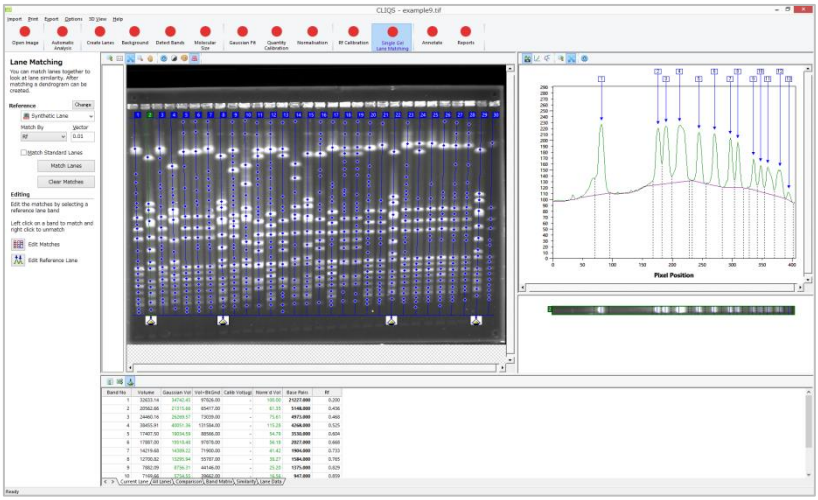


(84) それぞれのバンドのRf値はメジャーメントウィンドウの Rf欄に表示されます。

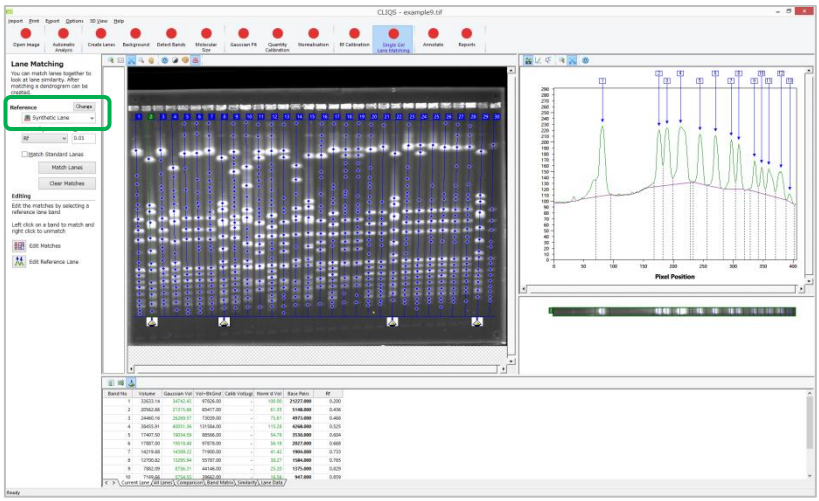


(85) Rf キャリブレーションが終わったら Single Gel Lane Matching ボタンを押して次に進んでください。

1－11.　バンドマッチング



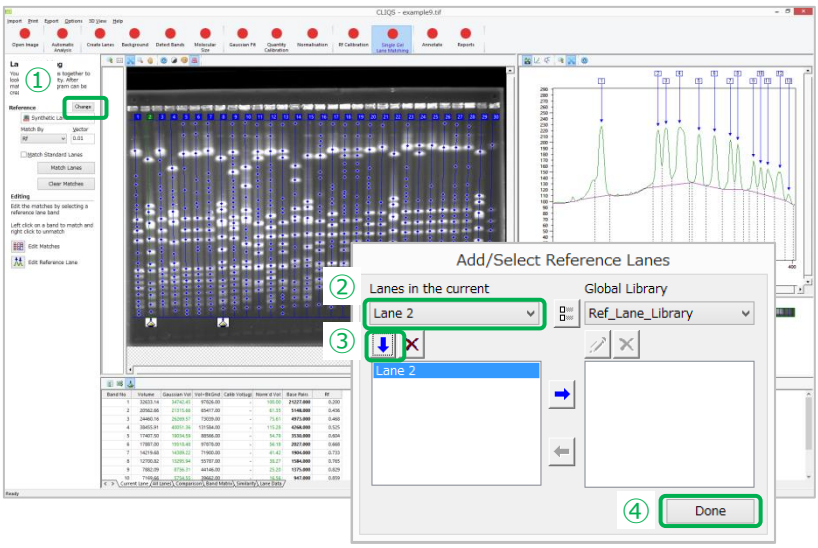
(86) レーン間でのバンドマッチングを行います。マッチングとは同一のバンドをレーン間で紐づけして同じ分子のバンドとしてデータを扱えるようにすることです。



(87) まずは Reference レーンの選択を行います。Reference レーンとはマッチングの基準となるレーンです。

デフォルトでは「Synthetic Lane」が選択されています。Synthetic Lane とはすべてのサンプルレーンをマージした人工的なレーンのことを言います。Synthetic Lane には、どれか 1 つのレーンにでも存在するバンドはすべて反映されます。

- 分子量マーカーを Synthetic Lane に入れないためには、1-6 で分子量マーカーレーンをすべて選択しておく必要があります。



(88) Synthetic Lane 以外を Reference レーンにしたいときには下記の操作を行ってください。

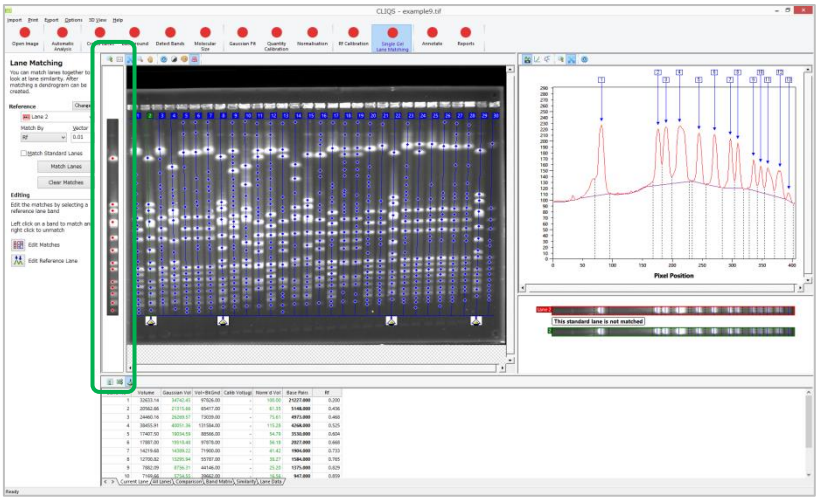
① 「Change」を押してください。

② Add/Select Reference lanes が開きます。左側の Lane in the current のドロップダウンから Reference とするレーンを選んでください（分子量マーカーのレーンを選ぶのが通常です）。

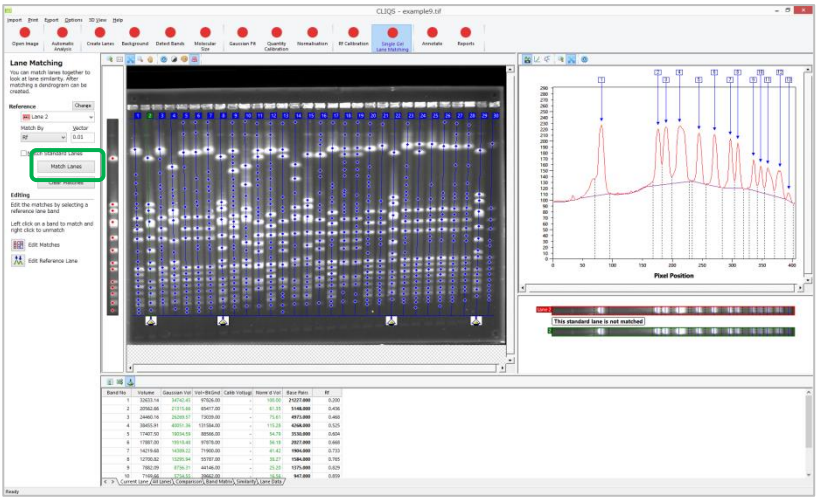
③ ↓ボタンを押して下に加えてください。

④ 「Done」を押してください。

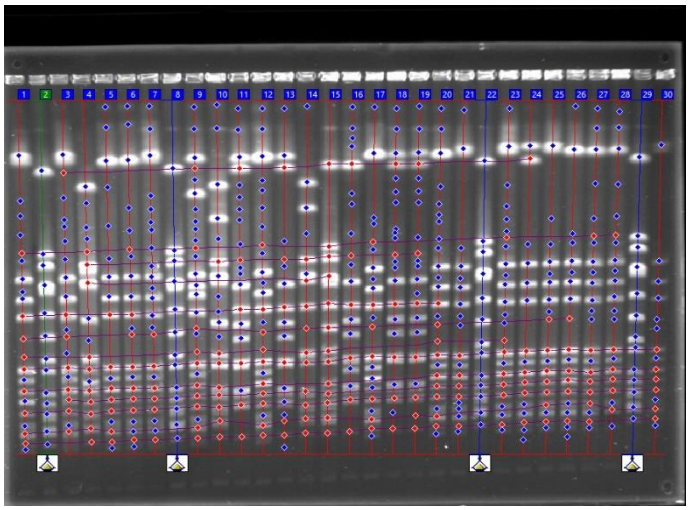
- 右側の Global Library に追加すると Reference レーン候補の一覧を作ることができます。



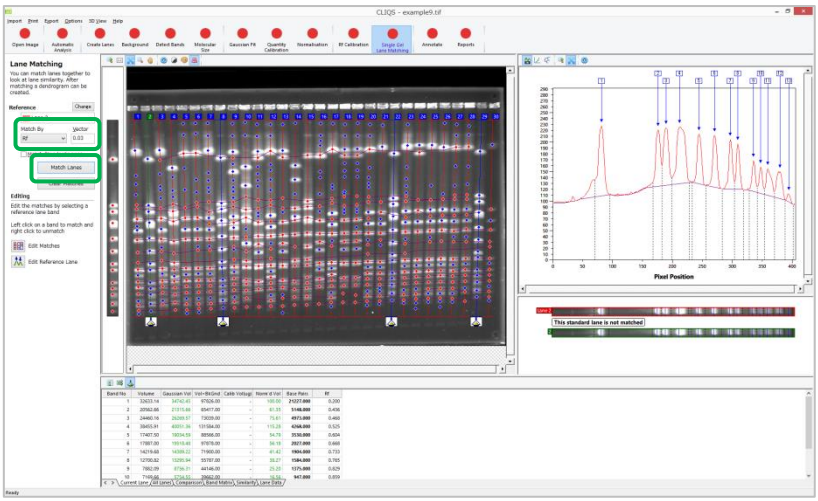
(89)　Reference レーンが選択されました。



(90)「Match Lanes」を押すとマッチングが実行されます。

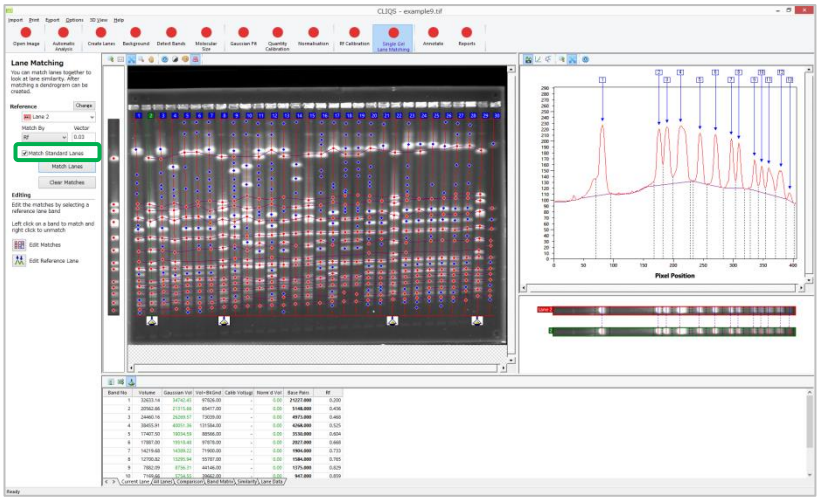


(91) マッチングが行われました。紫色のラインで結ばれた◆のバンドが「同一」として認識されたバンドです。



(92) どれくらい離れたバンドまで同一のバンドとして認識するかを調整するためには、ツールダイアログの下記の部分で「Vector」の数字を変更してください。数字を大きくすればするほど離れたバンドも同一のバンドとして認識されます。

変更を反映するには、再度「Match Lanes」を押してください。

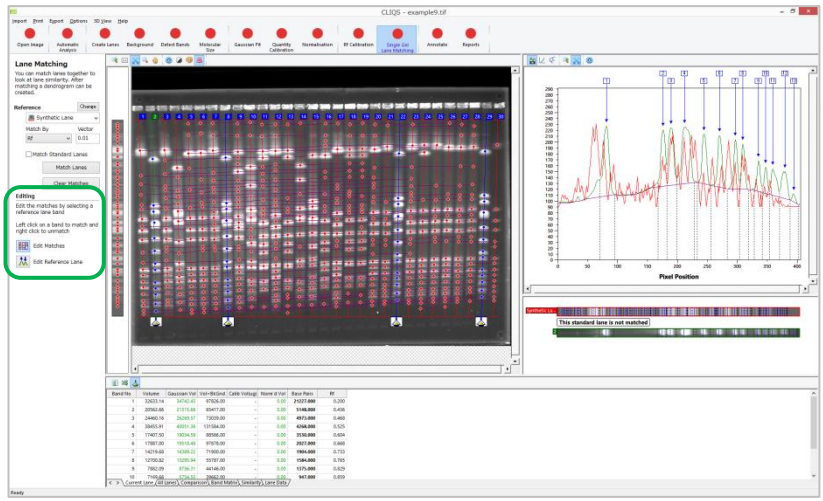


(93) 「Match Standard Lanes」にチェックを入れると、スタンダードレーンもマッチングの対象になります。

- スタンダードレーンとは の印がついたレーンです。

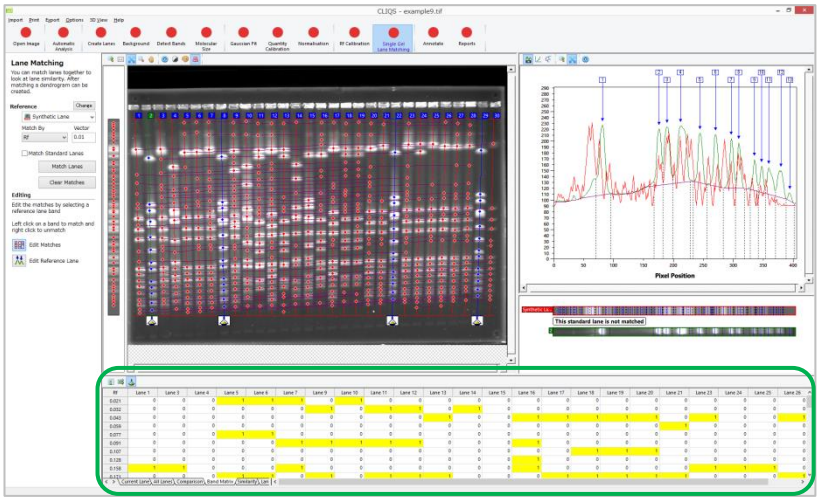
変更を反映するには、再度「Match Lanes」を押してください。

- 「1-9. ノーマライゼーション」で、「Matched Bands Normalisation」あるいは「All Bands in Lane」を選ぶときには必ずチェックを入れてください。

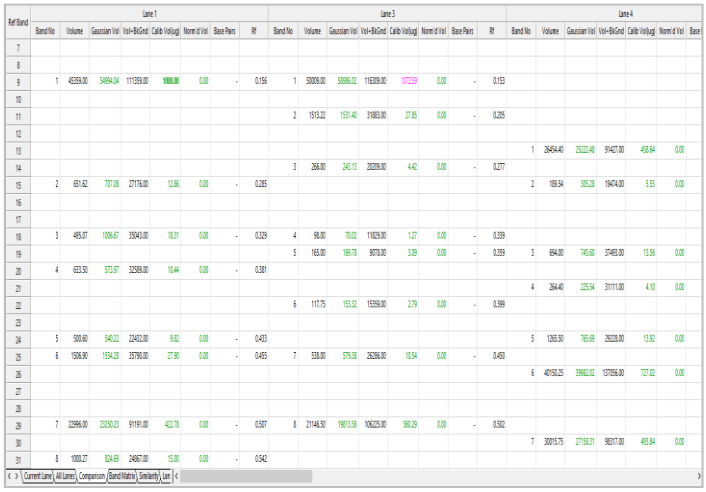


(94) バンドマッチングは１つ１つのバンドをマニュアルでマッチングさせることもできます。

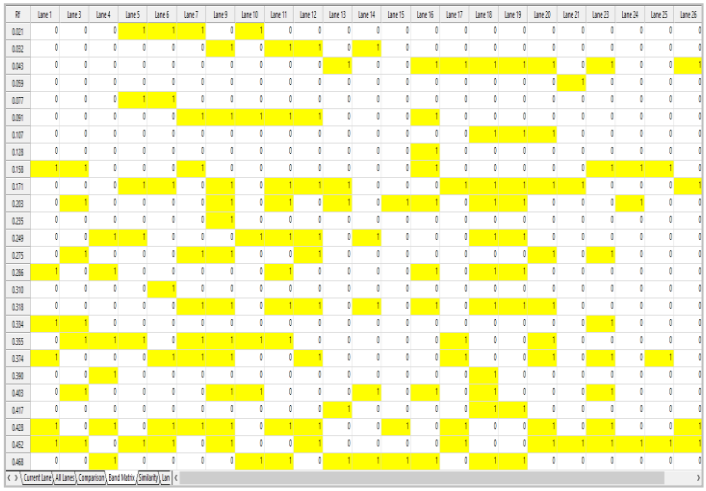
- Edit Matches
  左クリックでマッチングするバンドを追加、右クリックで削除（マッチング解消）することができます。操作の前に Reference レーン画像上で、これからマッチさせるバンドをクリックして選択してからら始めてください。
- Edit Reference Lane
  Reference レーンでバンドが認識されていない場合、左クリックでバンド認識をさせることができます。



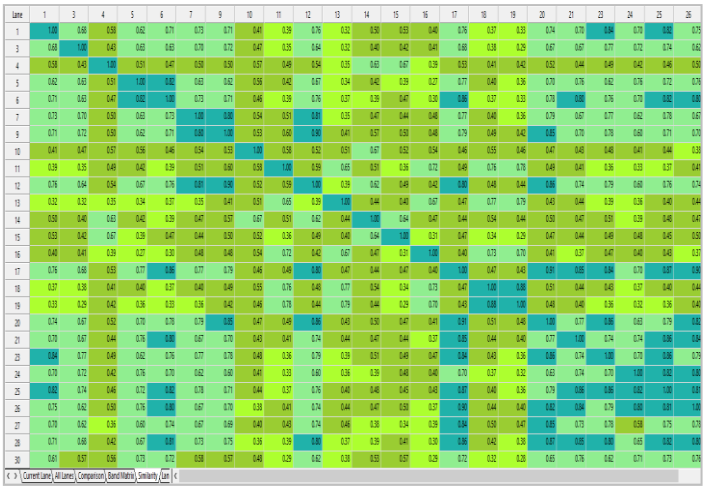
(95) バンドマッチングが行われると、メジャーメントウィンドウの「Comparison タブ」、「Band Matirx タブ」、「Similarity タブ」に数値が入力されます。



(95) Comparison テーブルでは、マッチしたバンドのレーン間におけるバンド量などを比較することができます。マッチしたバンドがない場合レーンは数値が抜けています。

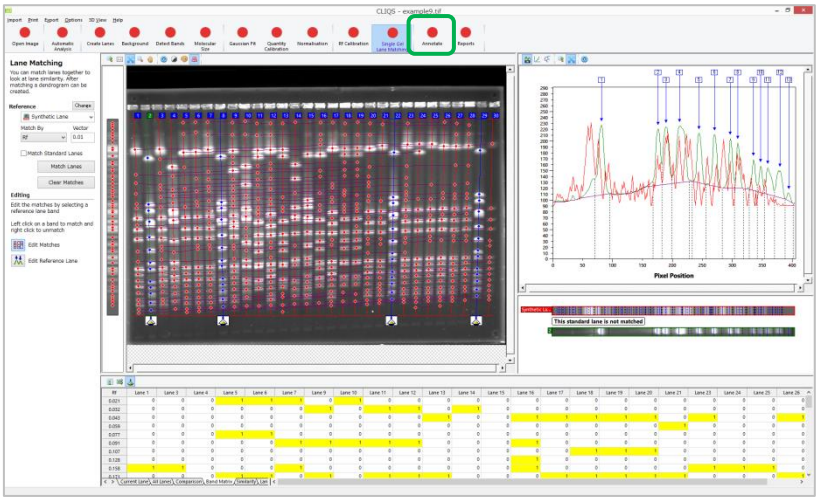


(95) Band Matrix テーブルでは、各レーンでの、それぞれのバンドの「あり」と「なし」が「1」と「0」で表示されます。



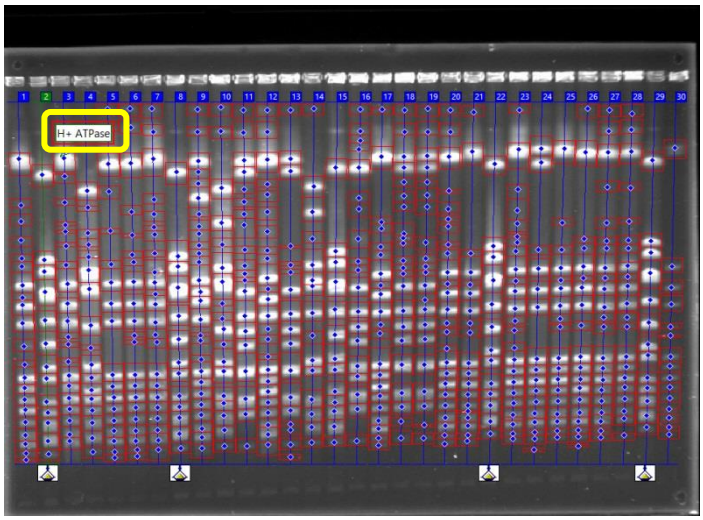
(95) Similarity テーブルではレーン同士のバンドパターンの類似度が数字で表示されます。類似度は0～1で表示され、1が類似度100%です。

Similarity の計算は Dice 法で行われます。



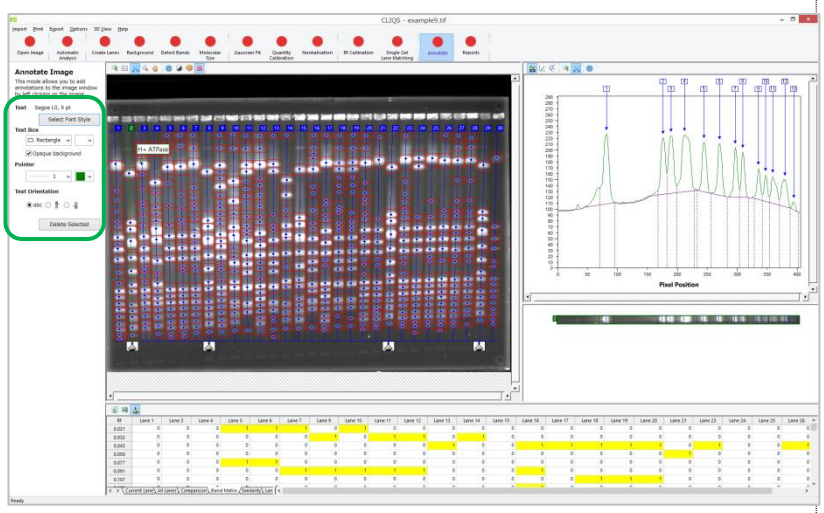
(96) Annotate ボタンを押して次に進んでください。

1−12.　アノテーション



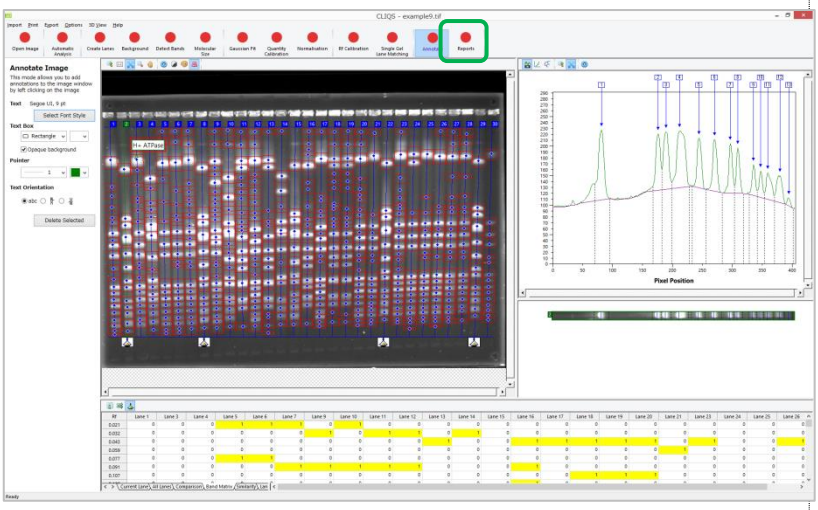
(97)　イメージウィンドウ上で各バンドにバンド名などのメモを付与することができます。

メモを追加したいバンドの上でクリックし、ボックスに文字を入力してください。



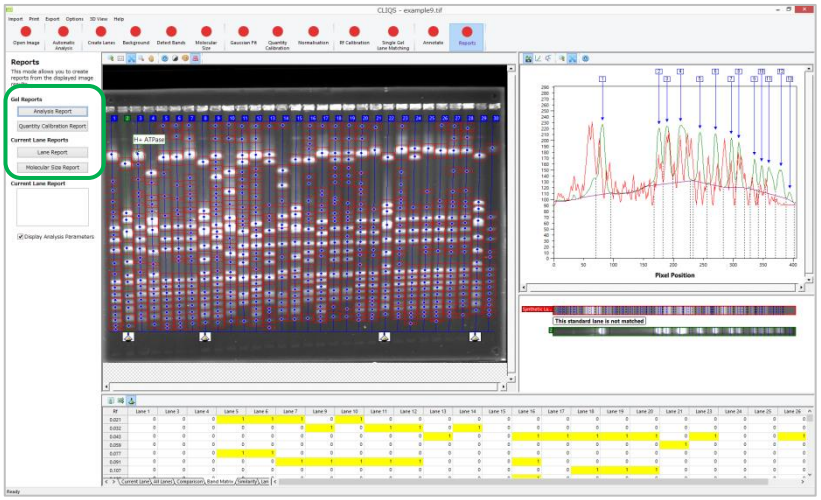
(98) フォントタイプ、フォントサイズ枠の形、枠の背景色、線の太さ、線の色などはツールダイアログで変更することが可能です。

メモを消したい時は、「Delete Selected」ボタンを押してください。



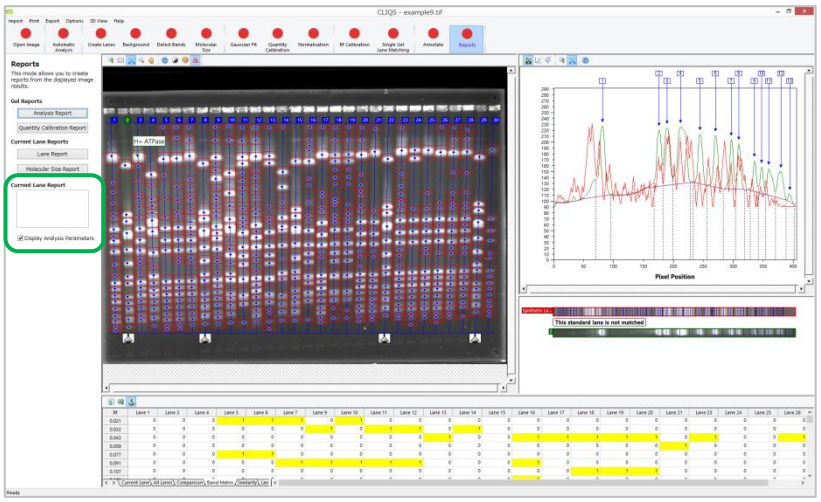
(99) メモの追加が終わったら、ナビゲーターの Reports ボタンを押して次に進んでください。

1－13.　レポート



(100) ツールダイアログで作成するレポートの種類を選ぶことができます。それぞれのボタンを押すと、PDF 形式のレポートが自動で作成されます。

- Analysis Report
  イメージウィンドウのイメージ、レーンプロファイル、メジャーメントウィンドウに表示されている各項目の数値データ
- Quantity Calibration Report
  イメージウィンドウのイメージ、バンド量スタンダードカーブ、スタンダードカーブの数値データ
- Lane Report
  選択したレーンのレーンプロファイル、選択したレーンのメジャーメントウィンドウに表示されている各項目の数値データ
  （レーンの選択はイメージウィンドウ上のバンドをクリックすることで行う）
- Molecular Size Report
  分子量 キャリブレーションカーブ とキャリブレーションカーブの数値データ

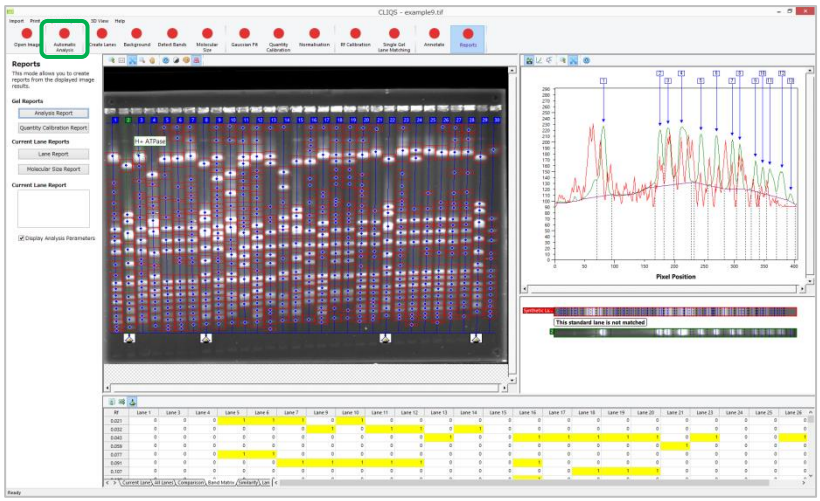


(101) Current Lane Report を使うと、選択中のレーンの情報をレポートに追記することができます。

「Display Analysis Parameters」にチェックを入れると、レポートに解析条件を含めることができます。

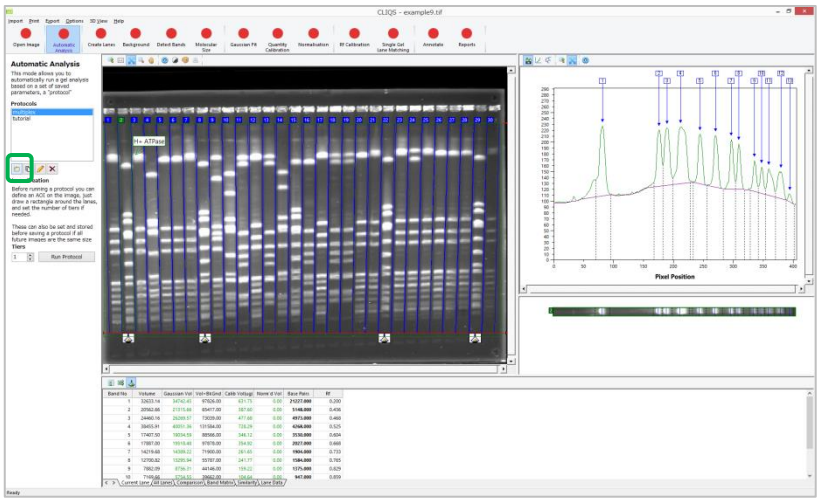
以上で、1D Gel / Western blot analysis によるバンド分子量とバンド濃度の定量は完了です。
一度解析を行うと、その解析で使用した各種のパラメーターをプロトコールとして保存して、後で呼び出して使用することが可能です。保存したプロトコールに従って自動で解析を行いますので、同じような解析を繰り返し行う場合に便利な機能です。

1－14.　自動解析

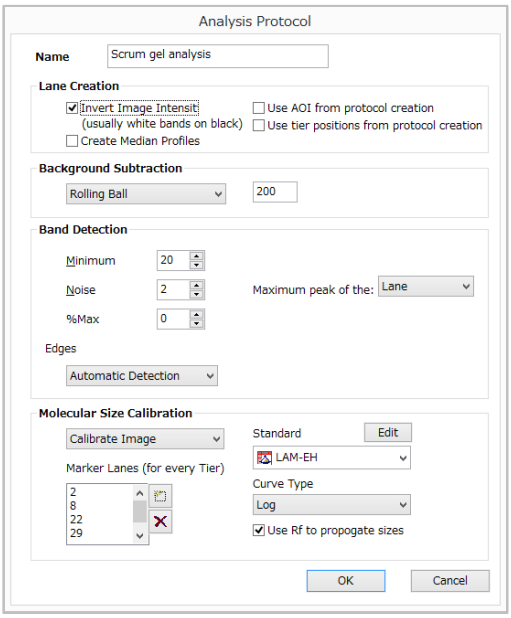


(1) まずはプロトコールの保存を行います。

一度最後まで解析を行い、ナビゲーターの Automatic Analysis ボタンを押して「Automatic Analysis ステップ」に戻ってください。



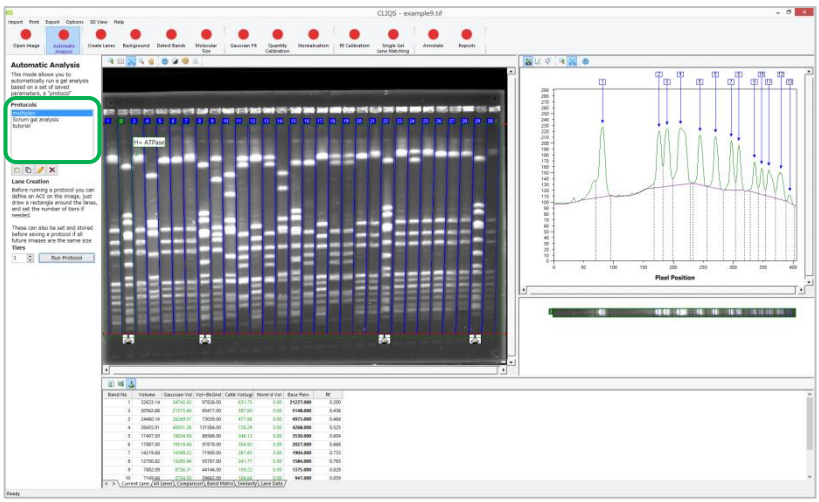
(2) プロトコールを保存するには、ツールダイア ログの ボタンを押してください。



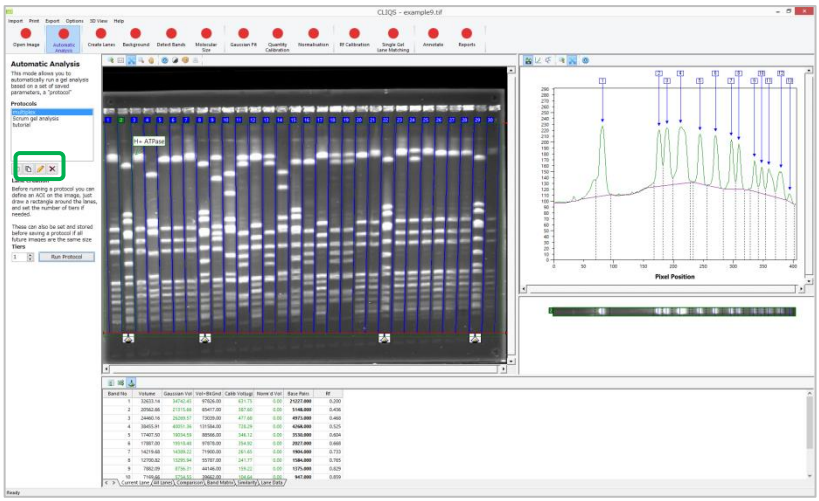
(3) 保存するプロトコールの詳細が表示されます。

Name の欄に任意のプロトコール名を入力することができます。パラメーターとして保存されるのは、レーン作成、バックグラウンド補正、バンド検出、分子量キャリブレーションに関するものです。それ以外は保存されません。

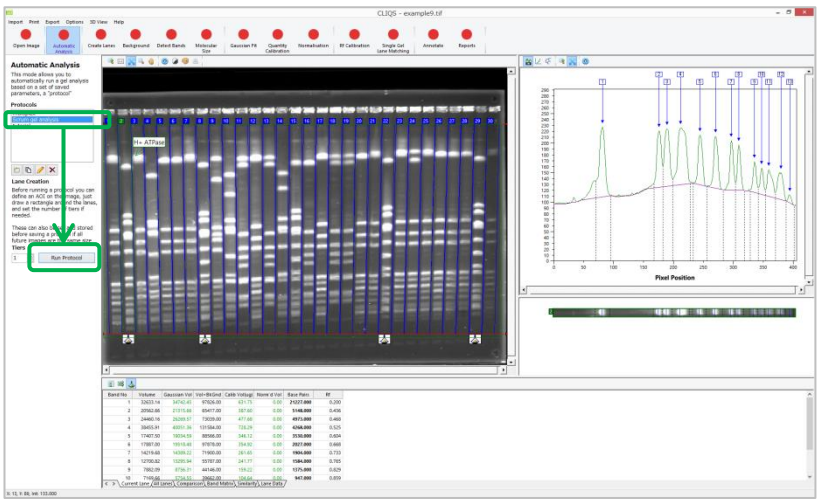
プロトコール名を入力し、各パラメーターを確認してください。問題なければ、「OK」を押して保存してください。



(4) プロトコール一覧に保存したプロトコールが表示されます。



(6) プロトコールの内容を編集、プロトコールを複製、プロトコールを削除する場合には、それぞれのボタンを押してください。



(7) 保存されたプロトコールを使って自動解析を行うには、プロトコール一覧で使用したいプロトコールを選択し、「Run Protocol」を押してください。

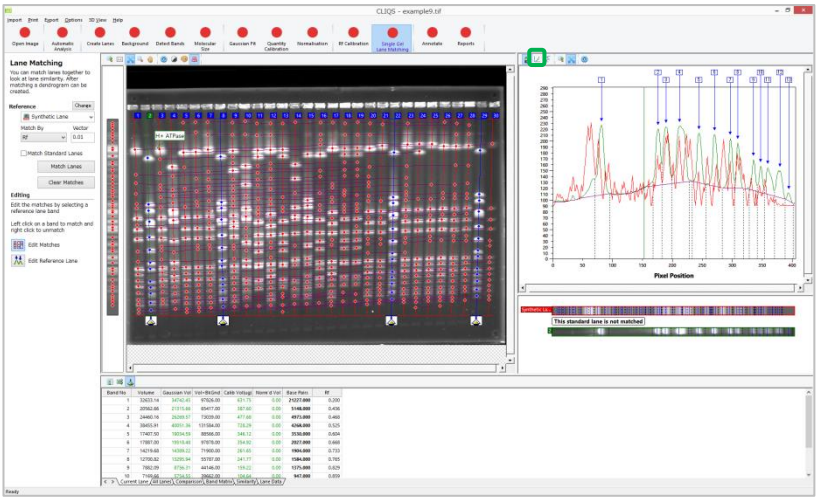
2.　一次元電気泳動ゲルからの系統樹解析

DGGE、PFGE、RFLP などによる 1D ゲル画像からの系統樹解析の方法を解説します。環境中や腸内の微生物叢の解析によく使われるメソッドです。

系統樹解析を行うためには、まず、「1. 一次元電気泳動ゲル／ウェスタンブロットからのバンド分子量やバンド濃度の定量」のうちの下記のステップを実施してください（バンド濃度の測定に関連する操作は必要ございません）。

1－1.　ソフトウェアの起動
1－2.　画像の取り込みと修正
1－3.　レーン検出
1－4.　バックグラウンド補正
1－5.　バンド検出
1－6.　分子量の算出
1－10.　Rf キャリブレーション
1－11.　バンドマッチング

バンドマッチングの最後まで行ったら続いて下記の操作を行ってください。

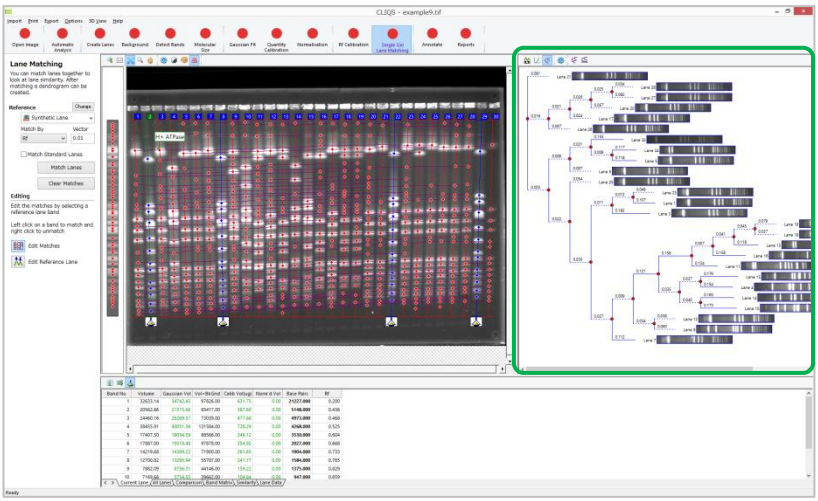


(1) レーンプロファイルウィンドウの ボタンを押してください。
続いて のどちらかを選んでください。

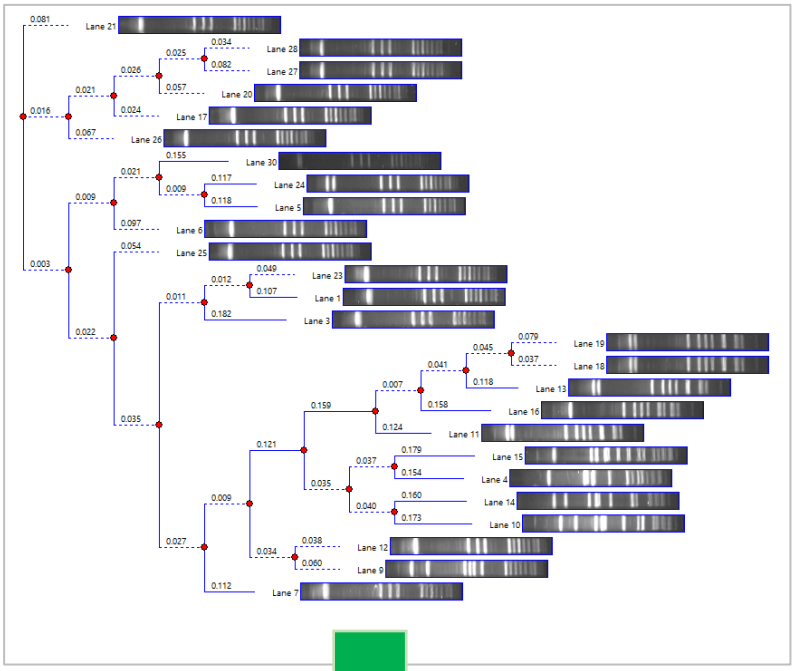
それぞれの系統樹作成アルゴリズムは下記です。

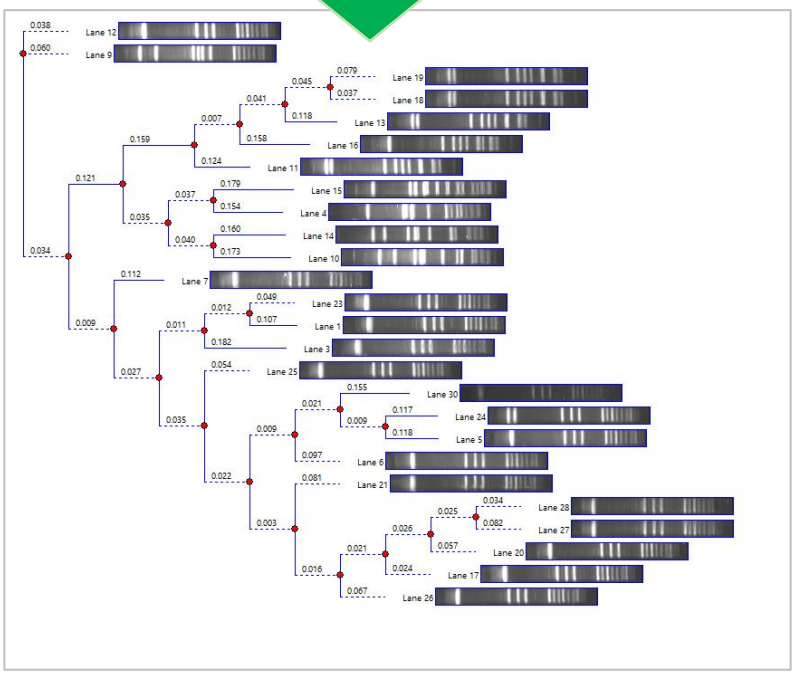
近接接合法（NJ 法）

非加重結合法（UPGMA 法）



(2) 系統樹が作成されました。



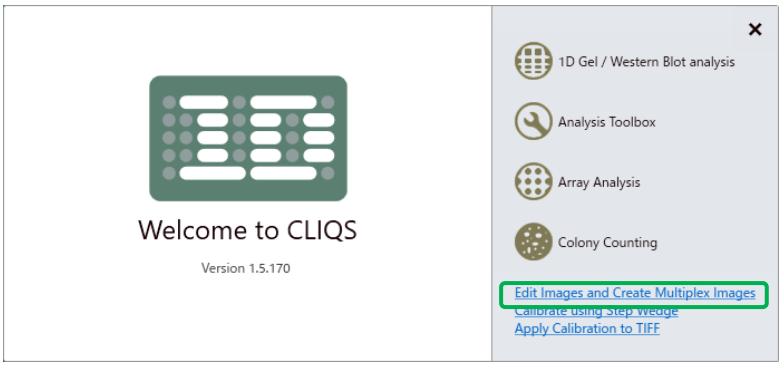


(3) NJ 法では、系統樹の を押すと、系統樹の基準とするレーンを変更することができます。

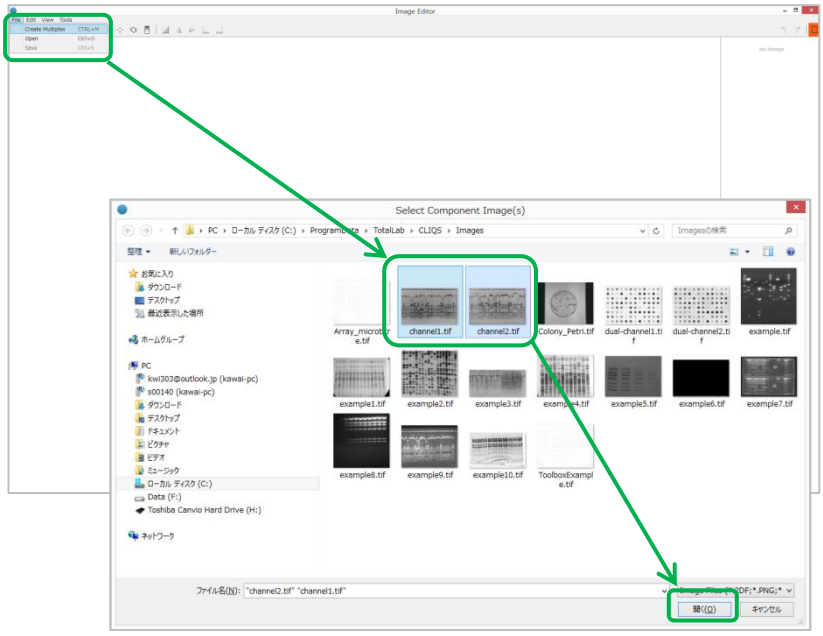
3.　マルチプレックスデータの解析

2 色以上で染色されたマルチプレックスデータの解析方法について説明します。基本的な操作は「1. 一次元電気泳動ゲル／ウェスタンブロットからのバンド分子量やバンド濃度の定量」」と同様です。ここでは、マルチプレックスデータで操作が異なる部分についてのみご説明します。

3－1.　マルチプレックス画像の作成と保存

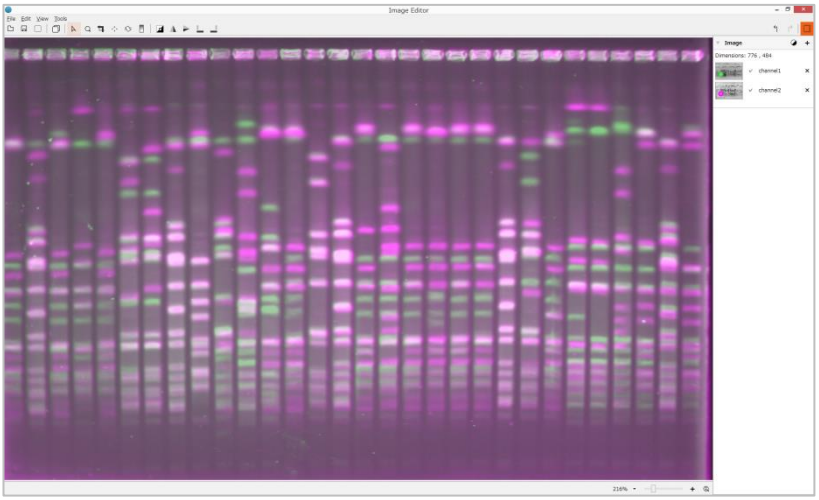


(1) コントロールセンターで 「Edit Images and Create Multiplex Image」を押してください。



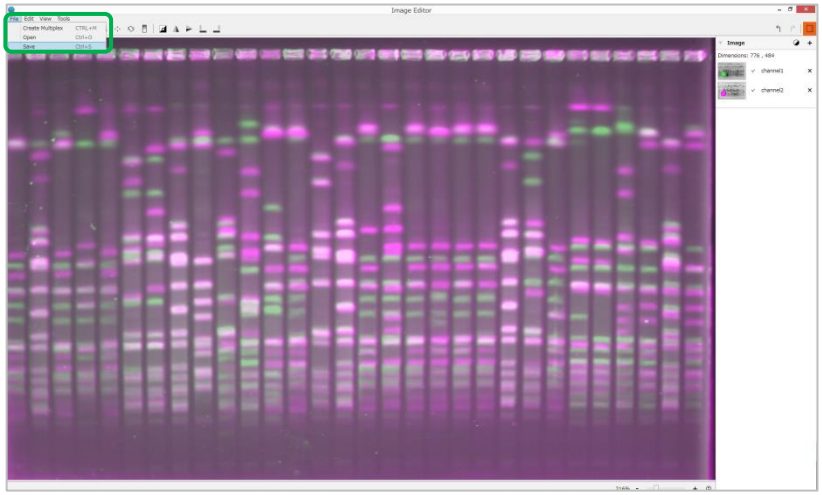
(2) Image Editor が開きます。

[File] – [Create Multiplex]を押して、マルチプレックスを構成する複数の画像を選んで「開く」を押してください。



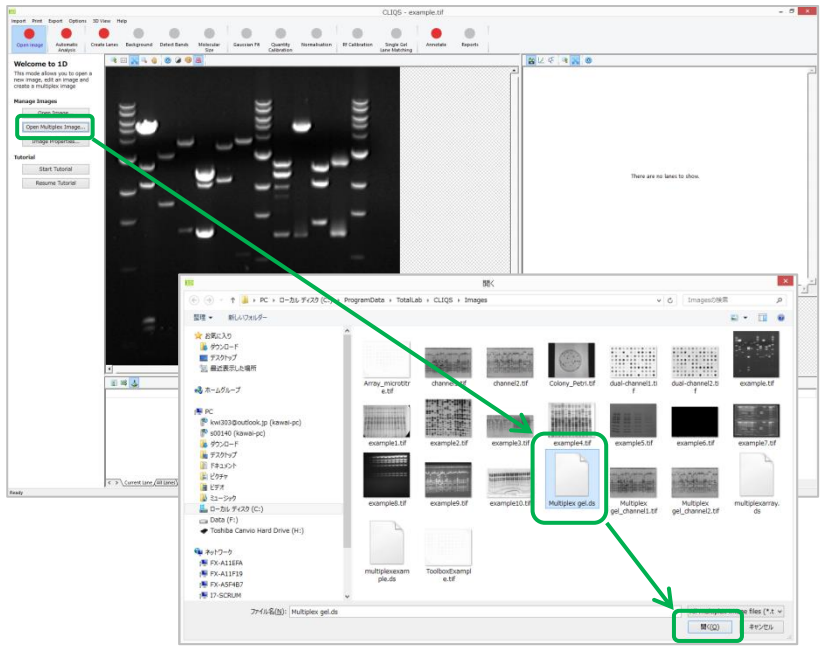
(3) マルチカラーの画像が開きました。

それぞれのカラーチャンネルの色を変えるには右上の●と●の上をクリックして調整してください。

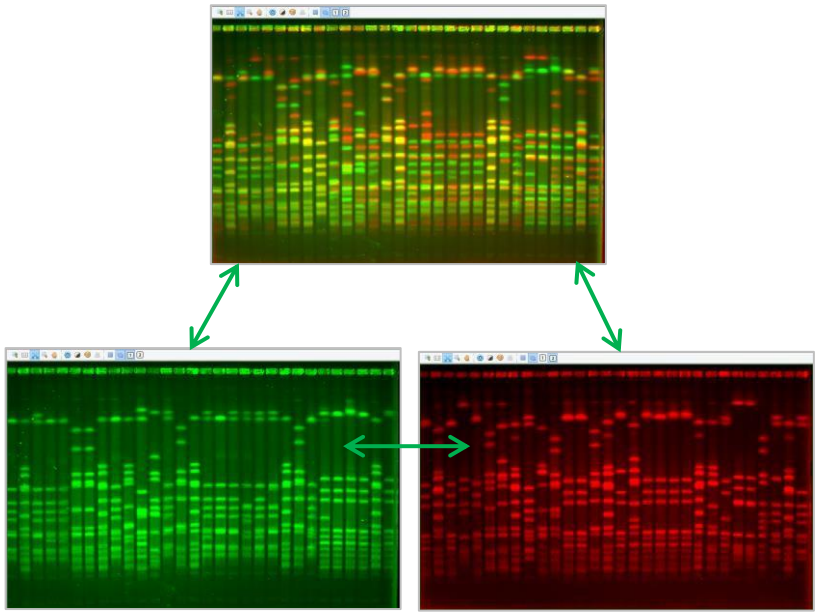


(4) [File] – [Save] で画像を保存してください。

3−2.　マルチプレックス画像の取り込みとカラーチャンネルの切り替え

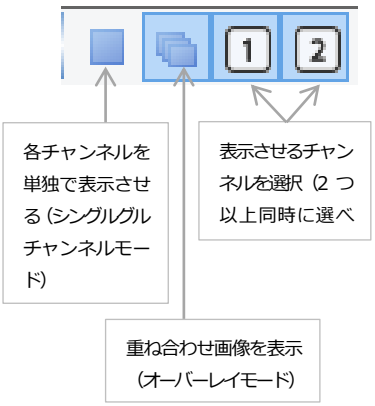


(5) マルチカラー画像を開くには「Open Multiplex Image...」を押してファイルを選び、「開く」を押してください。

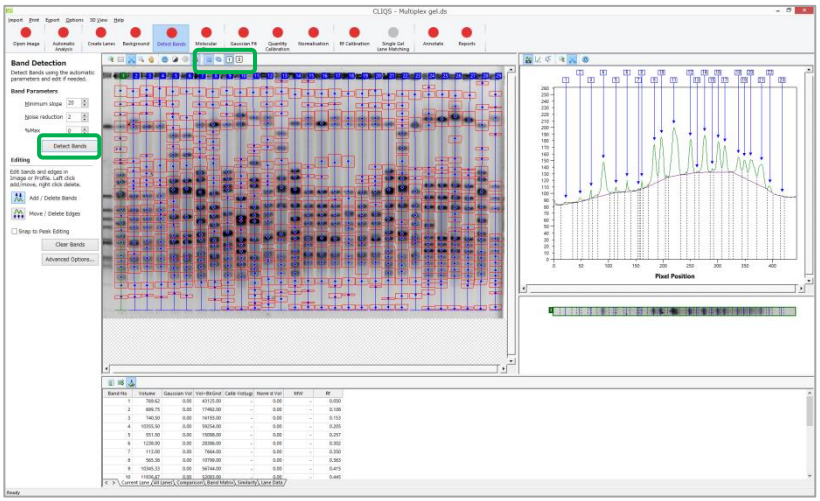


(6) マルチプレックスイメージの解析では、それぞれの解析ステップで、イメージウィンドウにどのチャンネルを表示させるか切り替えることができます。

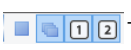
切り替えるためにはイメージウィンドウ上部の を操作します。

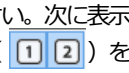


3−3.　バンド検出



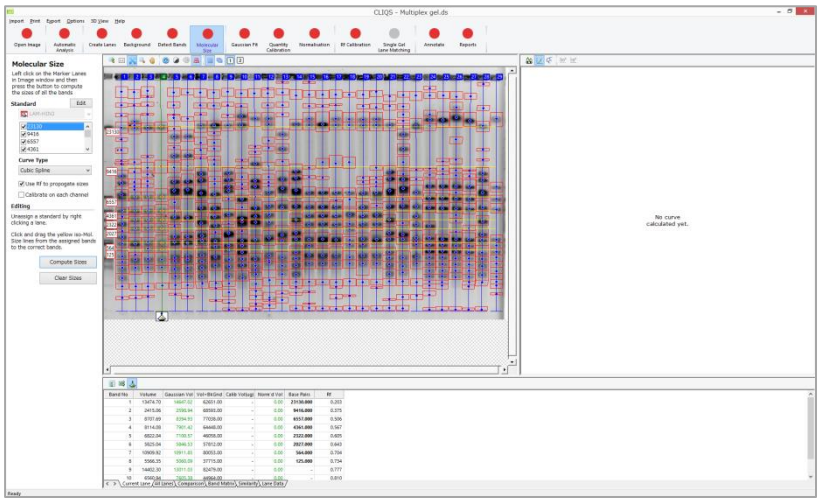
(7) バンド検出は、重ねあわせ画像ではなく、各カラーチャンネルで別々に行ってください。


で

を押してシングルチャンネルルモードにしてください。次に表示させるチャンネル（  ）を選択してください。選択後、「Detect Bands」ボタンを押して、バンド検出を行ってください。この作業を各チャンネルで繰り返してください。

(8) 重ね合わせ画像を表示させると、各チャンネルで検出されたバンドが別々の色◆で表示されます。

3−4.　分子量の算出

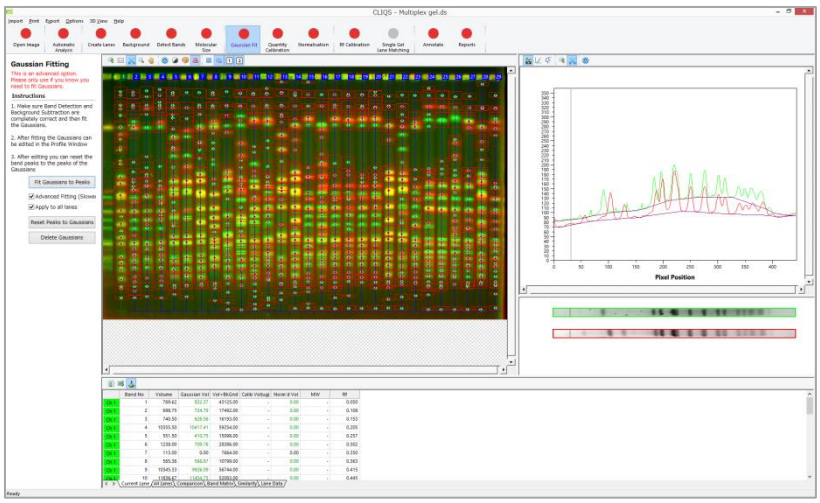


(9) オーバーレイモードでは分子量マーカーレーンの指定を行うことはできません。シングルチャンネルモードでどれかひとつのチャンネルを単独表示させて、分子量マーカーレーンの指定を行ってくださ い。

シングルチャンネルモードでどれかひとつのチャンネルを表示させ、分子量マーカーの種類の選択と分子量マーカーレーンの指定（マーカーレーンの上でクリック、複数可）を行い「Compute Sizes」ボタンを押します。別のチャンネルのバンドの分子量も自動的に計算されます。イメージウィンドウで別のチャンネルの画像を選択して確認して下さい。

それぞれのチャンネルで分子量マーカーレーンの指定を別々に行いたい場合は、「Calibrate on each channel」のチェックボックスにチェックを入れてください。

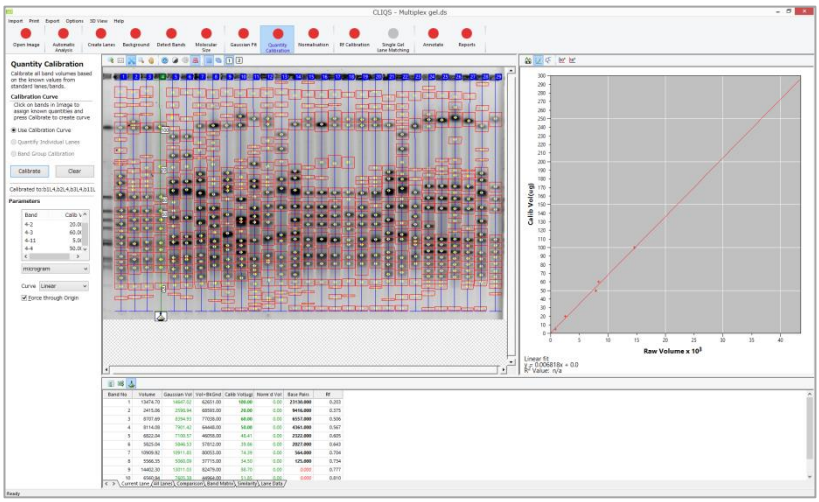
3−5.　ガウシアン・フィッティング



(10) ガウシアン・フィッティングは、オーバーレイモードで行っていただくと、各チャンネルに自動適用されます。

ただし、レーンプロファイルウィンドウでのマニュアル調整を行う場合は、シングルチャンネルモードで行っていただく必要がございます。

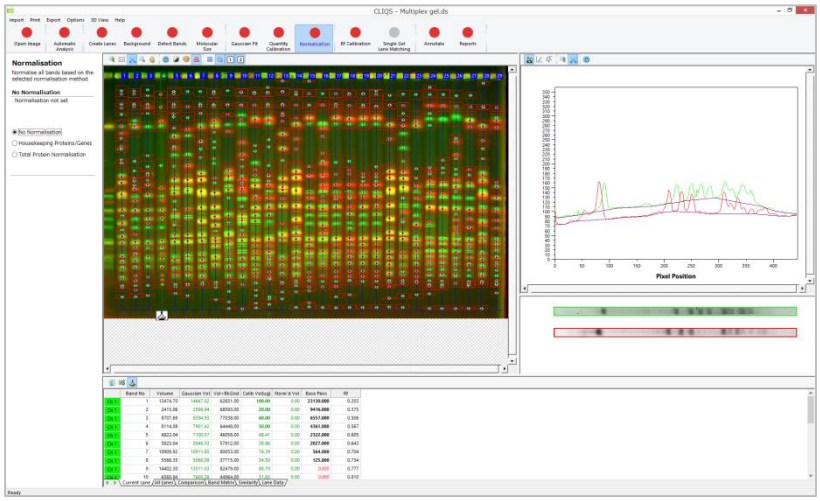
3−6.　バンド量のキャリブレーション



(11) バンド量の定量はシングルチャンネルモードで、各チャンネルごとに別々に行います。キャリブレーションスタンダードも各チャンネルで別々に設定する必要がございます。

イメージウィンドウにどれかひとつのチャンネルを表示させ、分子量キャリブレーションを行ってください。その作業を各チャンネルで繰り返してください。

3−7.　ノーマライゼーション



(12) マルチプレックスイメージではレーン間（サンプル間）での ローディングの違いの補正（ノーマライゼーション）が可能です。主にウェスタンブロッティングにおけるバンド定量の補正に使用します。

2つのノーマライゼーション方法をご選択いただくことができます。

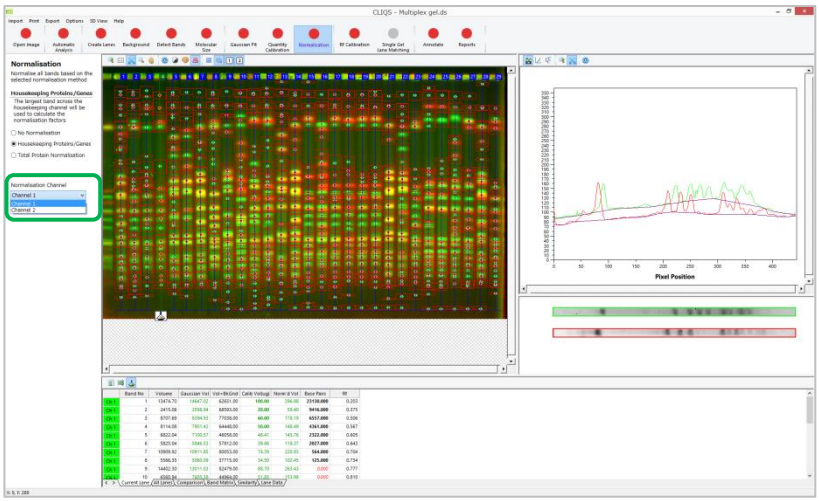
- Housekeeping Proteins/Genes
  GAPDH、β-actin、tubulin などのハウスキーピングタンパク質（遺伝子）がレーン間（サンプル間）で発現変動しないという前提でノーマライゼーションを行います。
- Total Protein Normalisation
  各レーンのバンドの総量はレーン間で変動しないという前提でノーマライゼーションを行います。

ノーマライゼーションを行いたくないときは「No normalization」を選択してください。

以下にそれぞれの方法の操作方法について ご説明します。

(13) Housekeeping Proteins/Genes 法について説明します。

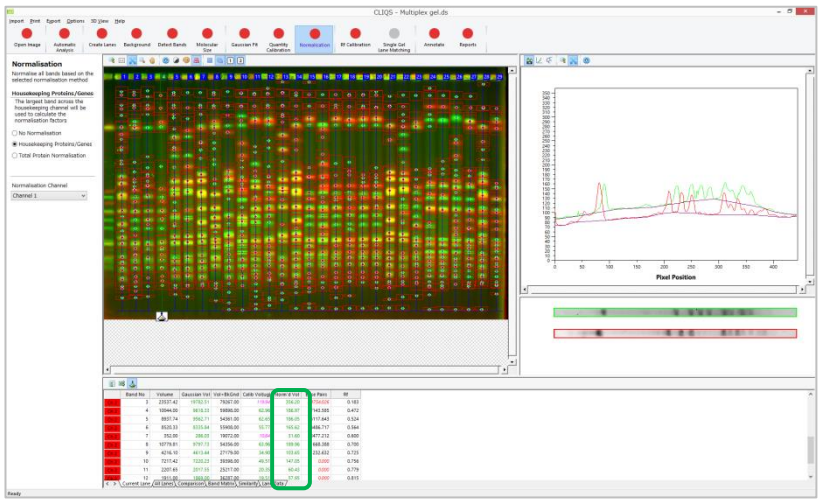
「Housekeeping Proteins/Genes」を選択してください。



(14)ハウスキーピングタンパク質が含まれるチャンネルを選択してください。

選択したチャンネルの中で最も大きなバンドがリファレンスバンドとなります。このリファレンスバンドのボリュームに対して、各レーンで最も大きなバンドのボリュームの比率が計算され、これがノーマライゼーション係数(NF)となります。

$$\text{Normalisation factor (NF)} = \frac{\text{volume of band in lane}}{\text{volume of reference band}}$$



(15) サンプルチャンネル（（14）で選ばなかったチャンネル）の各バンドのボリュームが下記の式で補正されノーマライゼーションボリュームが算出されます。

$$\text{Normalised volume} = \frac{\text{raw volume of each band}}{\text{normalisaton factor (NF)}}$$

ノーマライゼーション後のバンドボリュームは、メジャーメントウィンドウのNorm'd Vol 欄に表示されます。

(16) Total Protein Normalisation 法について説明し ます。

「Total Protein Normalisation」を選択してください。

(17) リファレンスとなるレーンが含まれるチャンネルとリファレンスレーンを選んでください。

ノーマライゼーション係数(NF)が下の数式で計算されます。

$$\text{Normalisation factor (NF)} = \frac{\text{volume of all the material in lane}}{\text{volume of all the material in ref lane}}$$

(18) (17) で選ばなかったすべてのレーンについて、各バンドのノーマライゼーションボリュームが下記の式で算出されます。

$$\text{Normalised volume} = \frac{\text{raw volume of each band}}{\text{normalisaton factor (NF)}}$$

ノーマライゼーション後のバンドボリュームは、メジャーメントウィンドウの Norm'd Vol 欄 に表示されます。

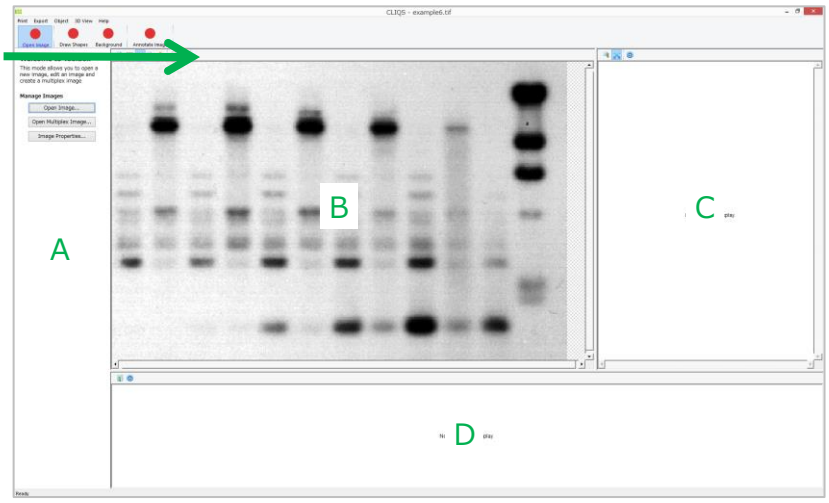
4.　ウェスタンブロットからのバンド濃度の定量（Analysis Toolbox）

特定のバンドの相対定量が目的の場合は、Analysis Toolbox を使用すると便利です。

4－1.　ソフトウェアの起動

(1) デスクトップの アイコンをダブルクリック してください。

(2) コントロールセンターが開きます。4 つの解析モードがあります。「1D Gel / Western Blot analysis」を選んでクリックしてください。



(3) 解析画面が開きます。解析はスクリーン上部のナビゲートにしたがって左から右に向かって順に進めていきます。各画面については下記をご参照ください。

A)　ツールダイアログ
　　解析を実施するためのツール

B) イメージウィンドウ
　　ゲルやブロットの画像

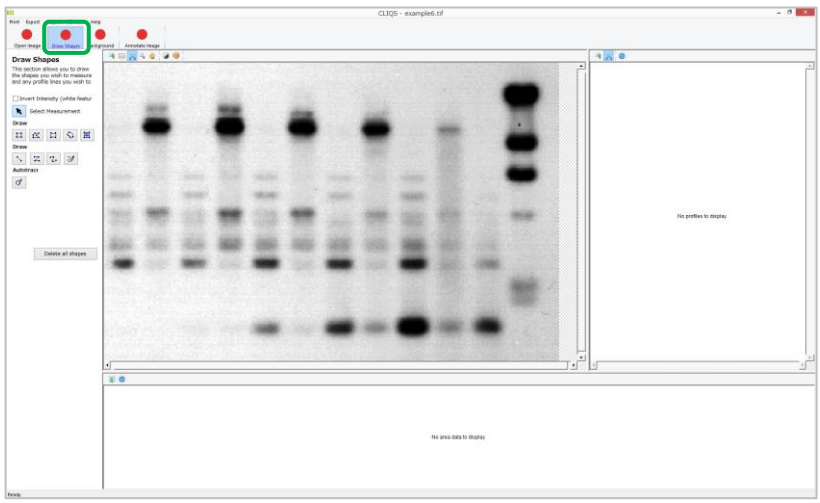
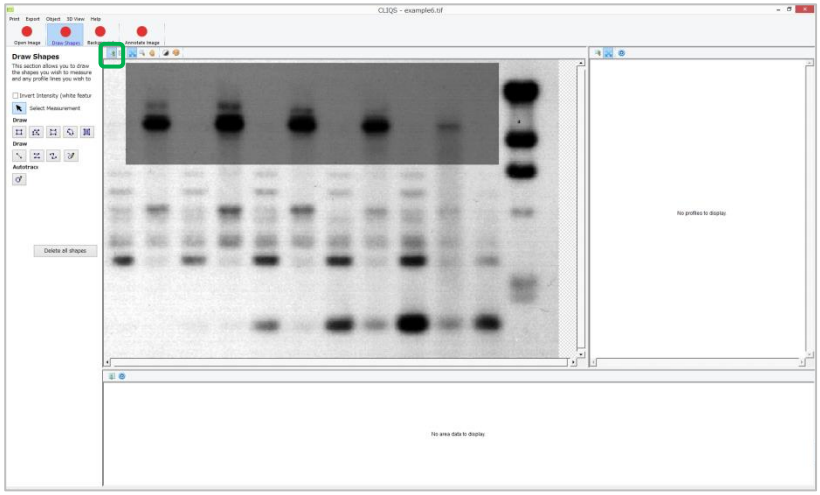
C) レーンプロファイルウィンドウ
　　各レーンの縦断プロファイル

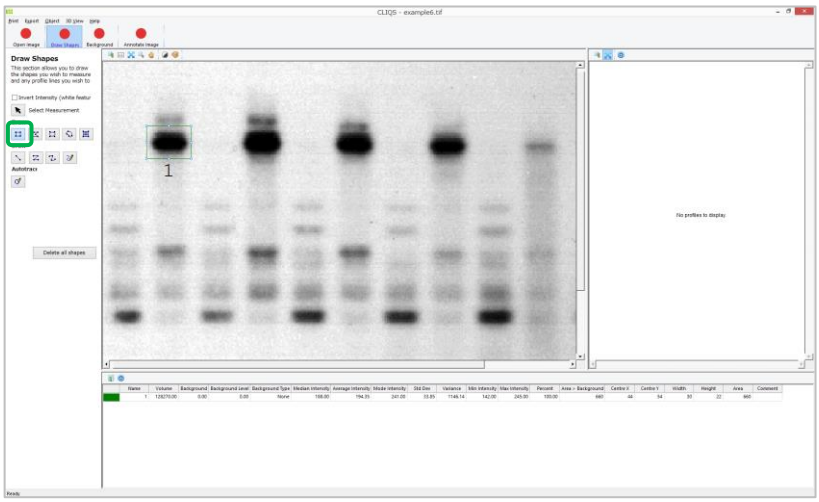
D) メジャーメントウィンドウ
　　数値データ（定量結果）

4－2.　画像の取り込みと修正

操作方法は「1．　一次元電気泳動ゲル／ウェスタンブロットからのバンド分子量やバンド濃度の定量」と同じです。本ガイド「1－2．画像の取り込みと修正」を参照に操作を進めてください。

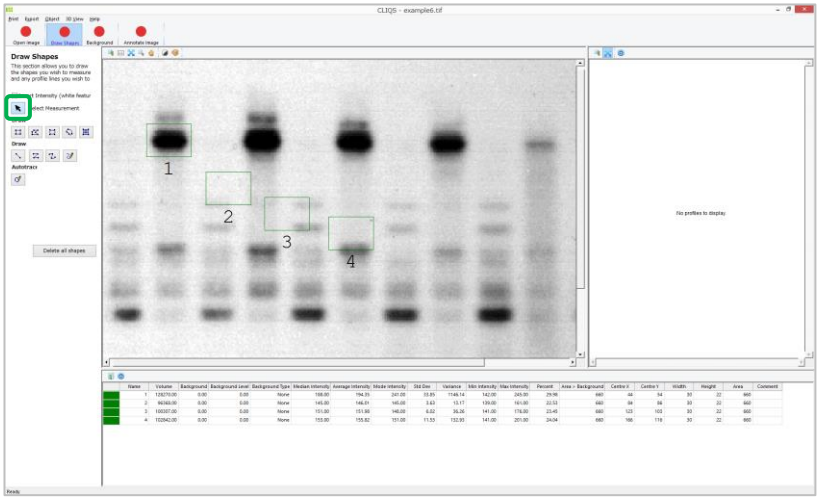
4－3.　ROI の設定

	(4) 検出枠（定量枠）　の設定を行います。 ナビゲーターで「Draw Shapes」が選択されていることを確認してください。
	(5) イメージを拡大するには、イメージウィンドウ の上のツールアイコンから を選んで、イメージ上でクリック&ドラッグしてください。



(6) ツールダイアログで ツール（Rectangle ツール）を選択し、イメージウィンドウ上で定量したいバンドをクリック&ドラッグで囲んでください。

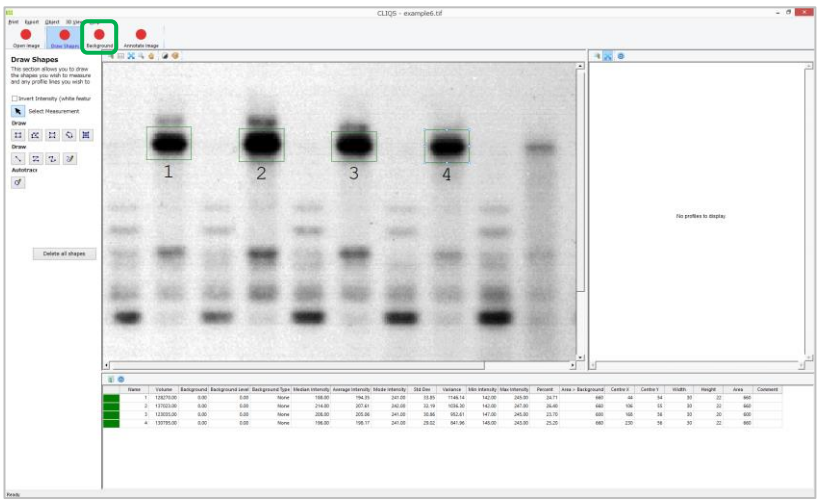
囲んだ枠に含まれる定量値が数値化されて、メジャーメントウィンドウに表示されます。



(7) ツールを選択し、先ほど囲んだ枠の上で一度クリックするとその枠が選択されます。

右クリック→Copy を押し、イメージ上の任意の場所で再び右クリック→Pasteすると同じ大きさの枠がコピーされます。Pasteを繰り返し、必要な数の検出枠をコピーしてください。

- 検出枠の番号には自動的に連番がふられます。任意の名前に変えたいときは、メジャーメントウィンドウのNameに入力して書き換え てください。



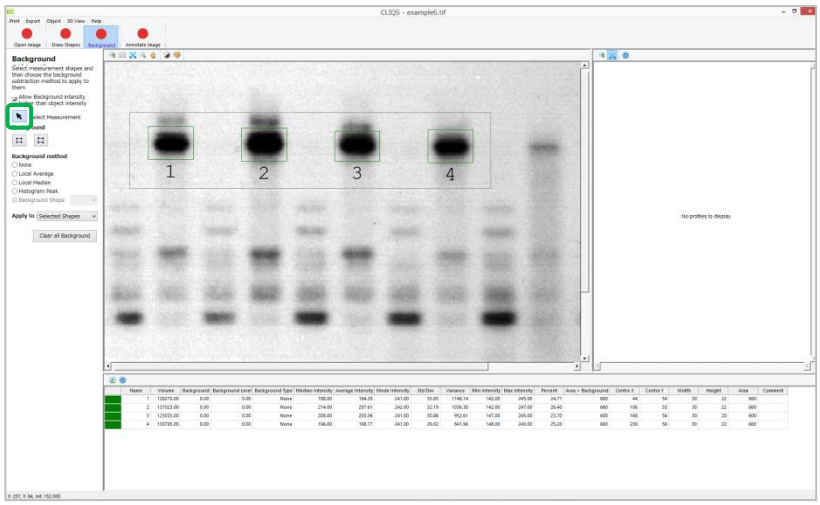
(8) ツールで、コピーしたそれぞれの検出枠を選択し、目的のバンドに移動させてください。

検出枠のサイズは緑枠の角と四辺の□を動かして調整できます。

それぞれの枠を個別に消したいときは、消去したい枠を選択し、右クリック→Delete を押してください。すべての枠を消したいときは、「Delete all shapes」ボタンを押してください。

検出枠の設定が終わったら、ナビゲーター の Background ボタンを押して、次に進んでください。

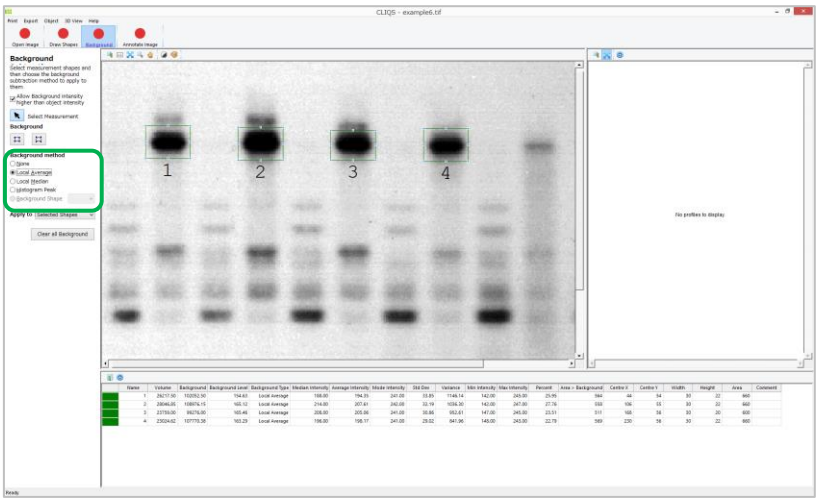
4−4.　バックグラウンド補正



(9) バックグラウウド補正を行います。

ツールを選び、イメージウィンドウでクリック&ドラッグして、バックグラウンド補正を適用する検出枠をすべて選択してください。

➢ 検出枠をクリックすることで1つずつ補正を行うことも可能です。



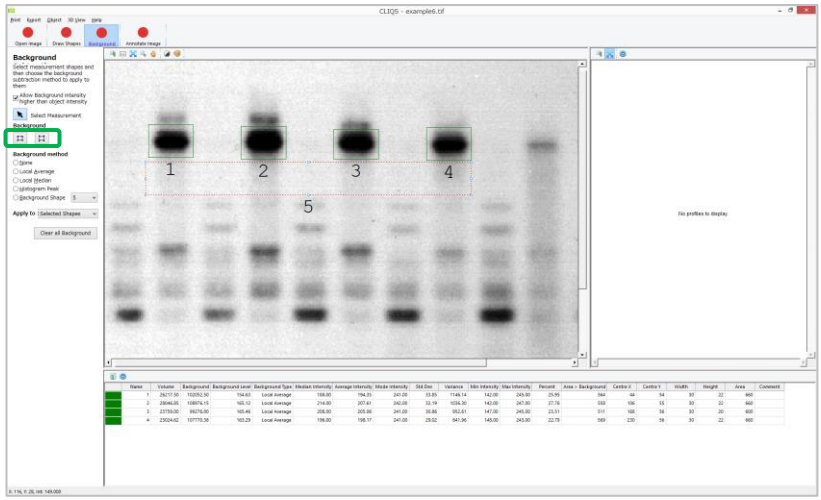
(10) ツールダイアログの Background method から 補正の方法を１つ選んでください。

- None
  補正を行いません。
- Local Average
  検出枠の外周の全ピクセル強度の平均値をバックグラウンドとします。
- Local Median
  検出枠の外周の全ピクセル強度の中央値をバックグラウンドとします。
- Histogram Peak
  検出枠と同じ幅の帯をゲルの上から下まで設定し、その範囲内の全ピクセル強度の中の最頻値をバックグラウンドとします。
- Background Shape
  バックグラウンドとする領域を自分で設定します。領域を設定しないと選択できません。操作 (11) をご参照ください。

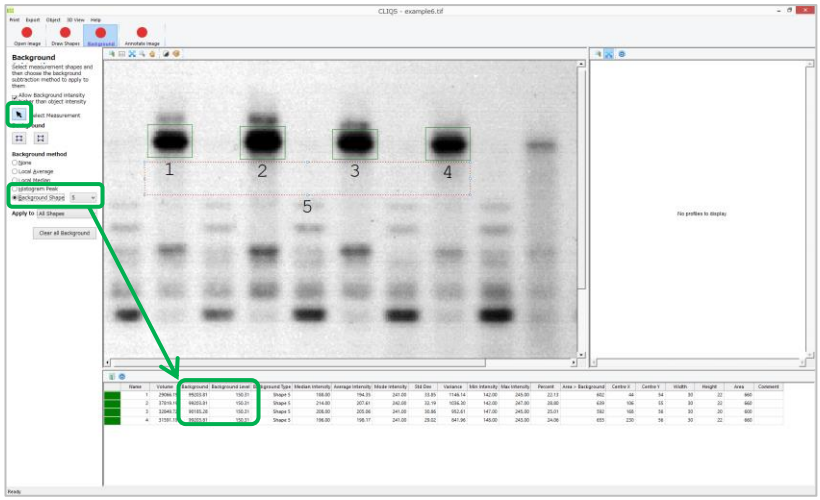
補正方法を選択すると、メジャーメントウィンドウの Background 欄とBackground Level 欄に数値が表示されます。

➢ 操作 (9) で 1つの検出枠だけを選択した場合はその検出枠のバックグラウンド値だけが表示されます。操作 (9) と操 作 (10) を繰り消すことで各検出枠をそれぞれ別々の方法で補正することも可能です。

➢ 「Clear all Background」を押すと最初からやり直すことができます。

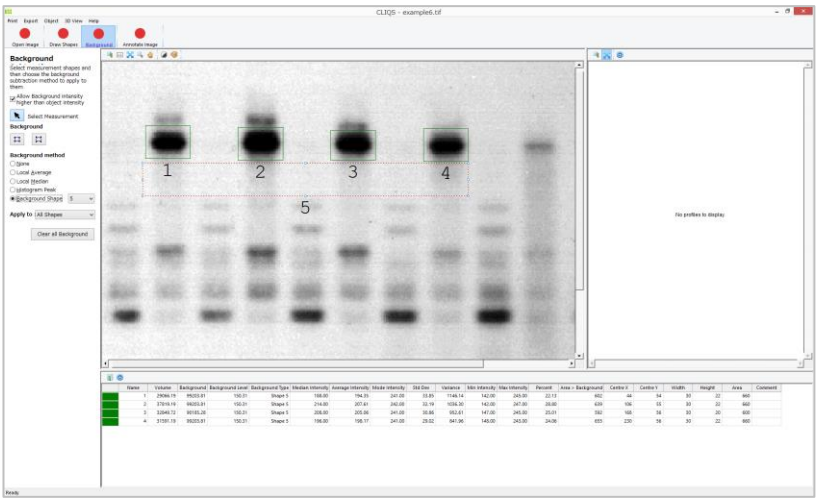


(11)　Background Shape 法でバックグラウンド領域を設定するには、まず ツールあるいは ツールを選び、イメージウィンドウでバックグラウンドに指定する領域をクリック&ドラッグで囲んでください（左の例では5番の検出枠）。



(12)　次に、 ツールで操作（11）で作成した枠をクリックして選択してください。

「Background Shape」を選択すると、バックグラウンド値が算出されます。バックグラウンド領域の全ピクセル強度の平均値がバックグラウンド値となります。



(13) バックグラウンド補正が終わったら、ナビゲーターの Annotate Image ボタンを押して、次に進んでください。

4−5.　アノテーション

(14)　イメージウィンドウ上で各バンドにバンド名などのメモを付与することができます。

メモを追加したいバンドの上でクリックし、ボックスに入力してください。

(15) フォントタイプ、フォントサイズ、枠の形、枠の 背景色、線の太さ、線の色などはツールダイ アログで変更することが可能です。

メモを消したい時は、「Delete Selected」ボタンを押してください。

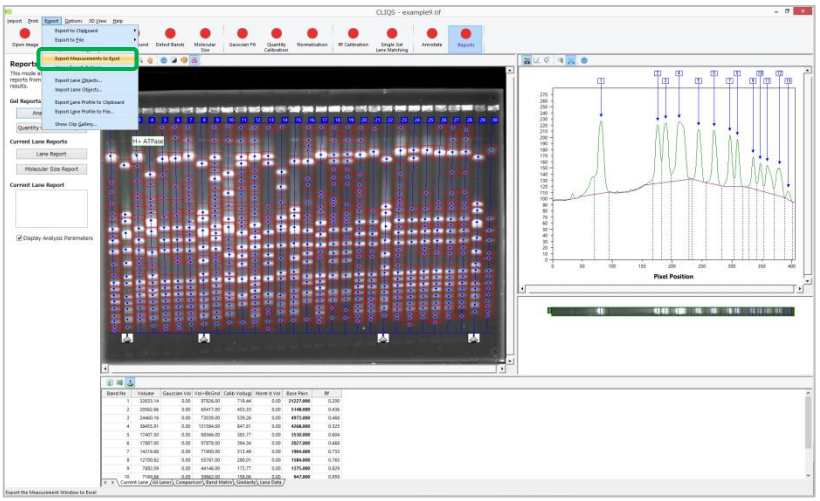
5.　解析ファイルの保存と呼び出し

解析を行い右上の　×　を押してソフトウェアを終了すると、解析結果は自動的に保存されます。
次回ソフトウェアを開くと、最後に解析した画像が開きますので、続けて解析を行う場合は、ナビゲーターバーをそのステップまで進めて解析を続けてください。
以前に解析したファイルを開きたい時は、その画像ファイルを開くと自動的に解析が終わった状態で開くことができます。

6.　解析結果のエクスポート

解析の終わった数値データあるいは画像データを出力する方法を説明します。

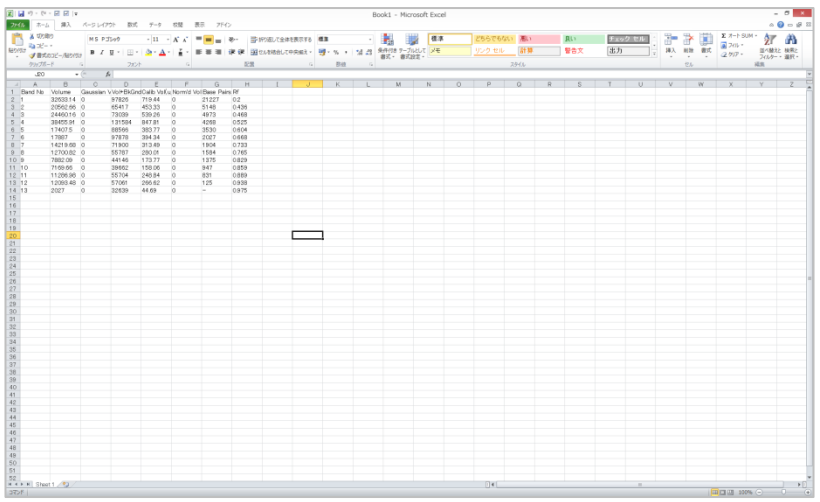
6－1.　数値データのエクスポート



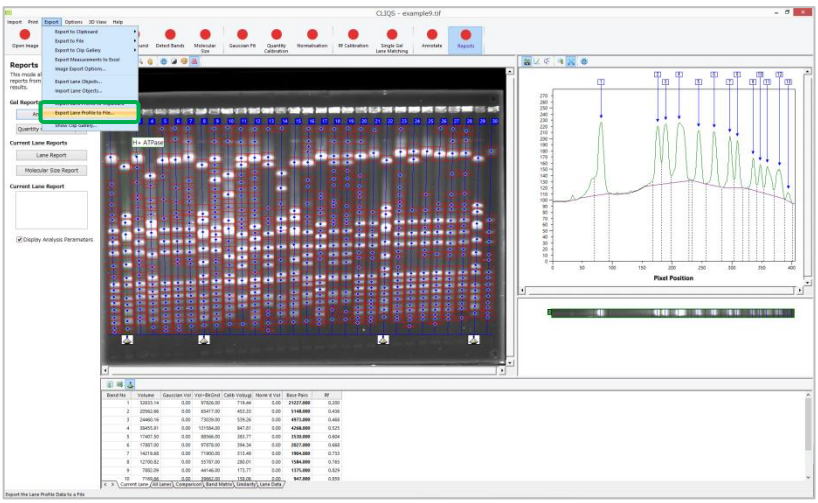
(1)　メジャーメントウィンドウに表示された数値データをエクセルファイルにエクスポートすることができます。

[Export] － [Export Measurements to Excel] を押してください。

- エクスポートされるのはメジャーメントウィンドウで表示中のタブです（例えば Current Lane タブを表示しているときは Current Lane タブの内容がエクスポートされます）。エクスポートする内容を変えたい時はタブを切り替えてください。



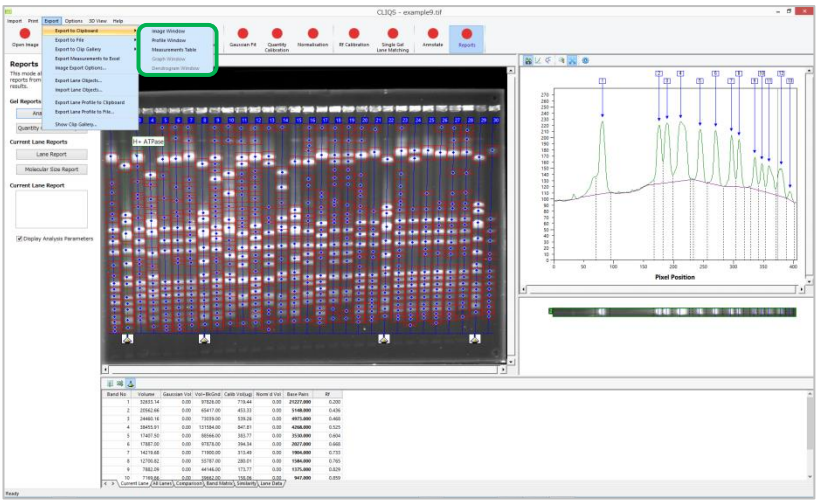
(2)　自動的にエクスポートが行われエクセルが立ち上がります。



(3) レーンプロファイルの元となっている数値データをエクスポートすることも可能です。

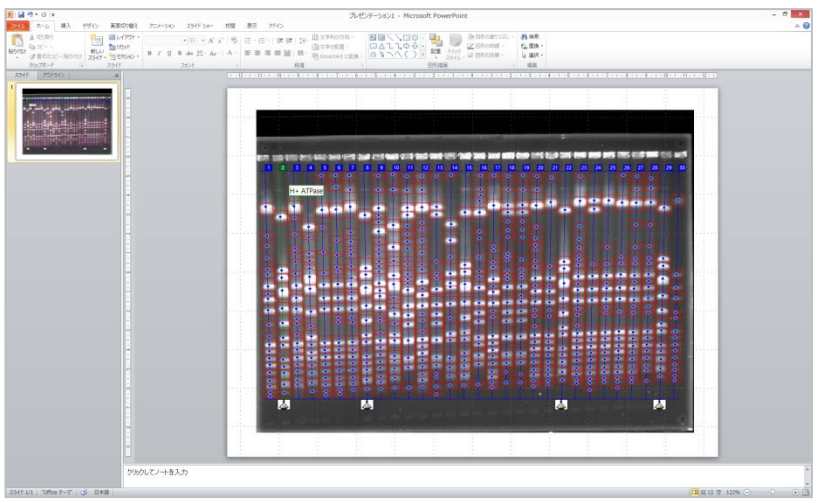
[Export] – [Export Lane Profile to File] を押し、エクセルを開いてデータを貼り付けてください。

6－2.　画像データのエクスポート



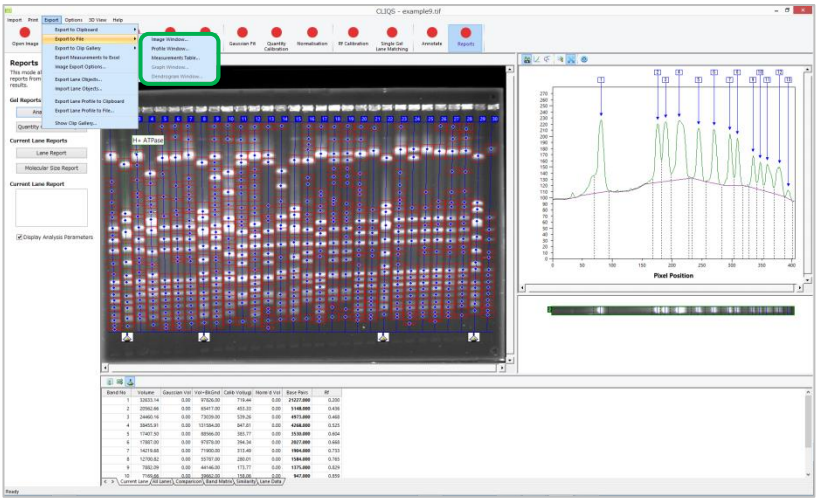
(4) 表示中の各ウィンドウを画像データとしてエ クスポートすることが可能です。

[Export] – [Export to Clipboard] を選び、右サイドメニューからエクスポートしたいウィンドウを選んでください。クリップボードにコピーされます。



(5) コピーしたデータは、アプリケーションで貼り付けることができます（左の例では、パワーポイントにイメージウィンドウを貼り付けています）。

- ソフトウェア上でウィンドウを拡大して いると、拡大されたままでコ ピーされます。全体像をコピーしたい場合は、[Menu] – [Export] – [Image Export Options] で「Whole of the Image」にチェックを入れてください。



(6) 画像をファイルとして保存することもできます。

[Export] – [Export to File] を選び、右サイドメニューからエクスポートしたいウィンドウを選んでください。bmpファイルとして保存していただけます。

輸入元

株式会社スクラム

本社　〒135-0014 東京都江東区石島 2-14
Imas Riverside 4F
Tel. (03)6458-6696 Fax. (03)-6458-6697

西日本営業所　〒532-0003
大阪市淀川区宮原5-1-3 NLC新大阪アースビル403
Tel. (06)6394-1300 Fax. (06)6394-8851

HP：www.scrum-net.co.jp