

GenePix4300A/4400Aを使用したスキャンニング

1. マイクロアレイスキャナを起動します

- ・ GenePix4300Aの電源スイッチ(背面)とPCの電源を入れます。
- ・ GenePix Proのソフトウェアを立ち上げます(ドングルが差さっていることを確認してください)。
- *以上の作業後、**ウォームアップのため15分程度**そのままの状態にしておいてください。

2. アレイスライドをスライドホルダにセットします

- ・ スキャナ本体のドア蓋を持ち上げます。



1. スキャナ本体のドア蓋を持ち上げるとステージが自動で開きます。
2. アレイスライドをステージに置いてアレイスライドを固定します。
3. スキャナ本体のドア蓋を閉じます。

- ・ アレイ面の埃等をエアダスターなどで取り除き、**アレイ面を下向きにし、バーコード側(アレイの下部)が手前**にくるようにしてステージに置きます。
- ・ ステージカバーを閉める際は**一点に力がかかり過ぎないように**注意して下さい。(ステージのズレの原因になります)。

Image

- Preview (635/532) プレビュー画像の表示
- Wavelength 635 635nm画像の表示
- Wavelength 532 532nm画像の表示
- Ratio: 1.635/532 レシオ画像の表示

自動調整ボタン

リセットボタン(値を50に戻す)

輝度・コントラスト調整つまみ

ドラッグによる画像移動モード

ズームモード

拡大率を一つ前に戻す

スライドの全面表示

スキャン領域選択モード

スキャン領域表示

プレスキャン開始ボタン


本スキャン開始ボタン

スキャン停止ボタン


画像、設定条件ファイル等の管理ボタン

スキャン条件(Hardware Setting)の設定画面の表示


3. スキャン条件を設定します

- ・  をクリックし、レーザーの設定 (PMT、フィルタ) を行います。(赤:Standard Red, 緑:Standard Green)

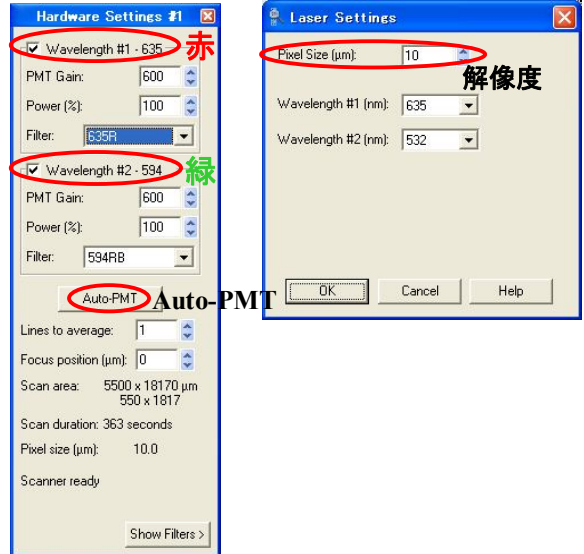
PMT Gainは蛍光強度やヒストグラムのCount Ratioを参考に設定してください。

- ・  をクリックし、解像度を設定します。



スポットの径が100 μ mまでであれば10 μ mで十分です。それ以下の場合は5 μ m(4400Aは2.5 μ mまで可)に設定してください。

- ・ GPSファイルがある場合は  のOpen Settingsからファイルを開いてください。





*3励起以上のレーザーを使用する場合にはDisplayタブのColor Modeの設定においてFour-color modeに変更する必要があります。



4. プレスキャンを行います

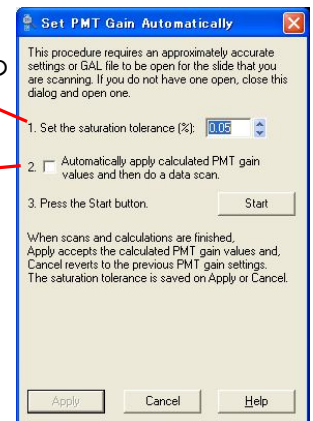
- ・ スキャン条件を設定後、 をクリックしプレスキャンを行います。
- ・ プレスキャンを行うと低解像度 (40 μ m) でアレイ全面を短時間でスキャンします。画像が荒いので解析には向きませんが、アレイ位置の推測や蛍光強度の設定などに役立ちます。
- ・ PMT値はリアルタイムで反映されますので、読みながらPMT値を調整することが可能です(本スキャンも同様)。
- ・  や調整つまみで輝度・コントラストを画像の見やすい値に調整してください。

5. 本スキャンを行います

- ・ プレスキャン画像を参考にして、 でスキャン範囲を設定します。アレイ全面をスキャンする場合は設定する必要はありません。
- ・  でスキャン範囲を追加することが可能です。各スキャン範囲でスキャン条件を設定します。
- ・ スキャン条件を確認後、 をクリックしスキャンを行います。
- ・ スキャン条件 (PMT値、スキャン範囲、Block情報) は  のSave SettingsからGPSファイルとして保存することができます。

サチュレーションの割合の設定


PMT値決定後に本スキャンを行うかの設定



<Auto-PMT機能について>

- ・ Auto-PMT機能を使うことで最適なPMT値を自動で設定することができます。
- ・ 範囲内におけるサチュレーション(蛍光強度 65535)の割合を設定することにより最適なPMT値を算出します。デフォルトではサチュレーションの割合が0.05%に設定されています。
- ・ Auto-PMT機能を使用するには解析用のBlock(GPS、GALファイル)をアレイ上に設定する必要があります。

6. 画像の保存をします

- ・  のSave Images - Selected Scan Areaをクリックし、画像の保存を行います。
- ・ Multi-Image TIFF FilesもしくはSingle-Image TIFF Files形式で保存を行います。

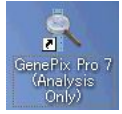
Multi-Image TIFF Files :Previewと635nmと532nmの画像を1つのファイルで保存します。

Single-Image TIFF Files :Previewと635nmと532nmとレシオの画像を別々のファイルで保存します。

GenePix Pro 7を使用したアナライズ

1. GenePix Pro 7を起動します

- GenePix Pro 7を起動します(ドングルが差まっていることを確認してください)。
Analysis Onlyのアイコンから起動させれば、スキャナを使用せずに解析のみに用いることができます。



2. 画像を開きます

- Open Imagesより、解析を行いたいアレイの画像を開きます。

スキャンから引き続いての解析を行う場合は、以下の作業からになります。
スキャン後にGenePix Pro 7(Analysis Only)を開きなおして解析を行えば、レーザーの消費を抑えることができます。

3. Blockの作成を行います

- すでにGPS、GALファイルなどでBlock情報がある場合は からファイルを開きます。
GPSファイルはOpen Settingsから、GALファイルはLoad Array Listから開くことができます。
- 新たにBlockを作成する場合は をクリックしBlockの作成を行っていきます。
- をクリックし、Image画面上でワンクリックすると選択しているBlockをコピーしていくことができます。
同じ並び方のアレイが複数ある場合はBlockを1つ作成し、それをコピーしていけば簡単に作成できます。
- Block情報は のSave Settings AsよりGPS及びGALファイル形式で保存できます。
形式の選択はファイルの種類の項目で選択します。

*GPS形式とGAL形式の違い

GPS : Block情報以外にも、PMT値、スキャン範囲も保存されます。

GAL : Block情報のみの保存。

Excel、ワードパットで開いて編集可能で、Featureごとに遺伝子のIDとNameを入力できます。

GALで保存をし遺伝子情報を入力後、GPSで保存をすることで全ての情報を含んだファイルを作成できます。



The diagram illustrates the concept of Blocks and Features. It shows four blocks (Block1, Block2, Block3, Block4) arranged in a 2x2 grid. Block1 and Block2 are highlighted with red and green boxes respectively, and arrows point to the 'New Blocks' dialog box. The dialog box has two sections: 'Blocks: Blockの設定' and 'Features: Featureの設定'. The 'Blocks' section includes fields for Number of columns (1), Number of rows (1), Column spacing (2070.63), and Row spacing (2170.81). The 'Features' section includes fields for Number of columns (10), Column spacing (180.07), Number of rows (10), Row spacing (180.09), Feature diameter (100), and Rotation (0.08). The 'Feature Layout' section shows four options: Rectangular (selected), Orange packing #1, Orange packing #2, and Orange packing #3. A legend at the bottom right indicates that 'column' represents the number of rows and 'low' represents the number of columns.

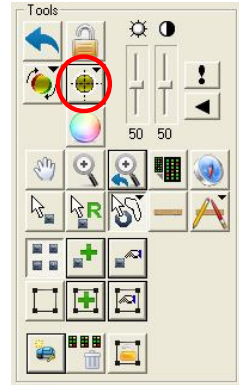
BlockとFeatureの概念

Array

column : 行の数
low : 列の数

4.アライメントを行います




- ・  をクリックし、アライメントを行います。
- ・ アライメントを行うと、**アレイのスポットにBlockやFeatureが適合**します。
Featureの伸縮率は  のAlignmentタブで設定可能です。
Resize Features during Alignmentのチェックを外せばFeatureの径は固定になります。



Find Array, Find All Blocks, Align Features Options... F8	全てのアライメントを行います。
Find Array Alt+Shift+F7	Array単位でのアライメントを行います。
Find Selected Array Alt+F7	
Find All Blocks Shift+F7	Block単位でのアライメントを行います。
Find Selected Blocks F7	
Find All Blocks, Align Features Shift+F6	Block単位でのアライメントを行い、Featureのアライメントも行います。
Find Selected Blocks, Align Features F6	
Align Features in All Blocks Shift+F5	Featureのアライメントのみを行います。
Align Features in Selected Blocks F5	
Align Selected Features Alt+F5	

*Selected : アライメントの対象が選択されたBlock等になるか、対象が全てになるかの違いです。

5.解析を行います

- ・  をクリックすると、各Featureの蛍光強度、バックグラウンド値等を数値化します。
- ・ 数値化されたデータはResultタブに表示されます (Analyze後自動的にResultタブに移動します)。
- ・ 解析結果は  の **Save Results - Selected Results Sheet**より**GPRファイル形式**で保存します。
また共通アイコンの  をクリックすれば、**選択部分をExcelへ貼り付ける**ことが可能です。
Export Resultsをクリックすればテキストファイル形式での保存も可能です。

Result画面に表示される項目の設定を行います。

全選択をします。

FlagのついたFeatureについて表示の有無の設定を行います。

ノーマライゼーションの条件設定

Configureで設定した条件でノーマライズを行います。

各項目の幅を調節します。

選択されているFeatureを上へ移動します。複数選択されている場合は選択されたFeatureが全て上に移動します。

Featureモードで選択したFeatureを青くハイライトします。

クエリー機能を使い、条件に当てはまるFeatureにFlagを付けたり、ハイライトをつけたりすることができます。

ノーマライズを解除します。

Table

Data Types... Resize

Select All Group Rows

Display... Show Selection

Normalization

Configure... Flag Features...

Apply Remove

Normalization Factors:

635 ...

1.000 ...