

ImageQuant TL 8.1 操作指南

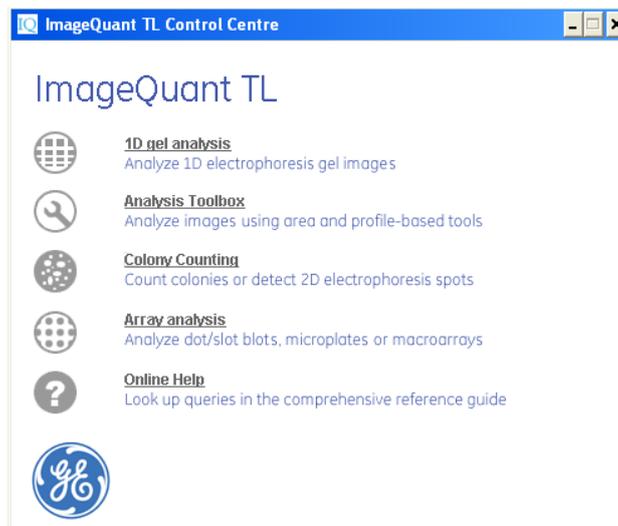
引言

- IQTL 是一款多功能定量分析软件，能够对蛋白条带、克隆计数、96 孔板进行定量分析。对于工业用户，其对蛋白分子量及纯度的分析尤其适用。
- IQTL 软件对分析图片有一定的要求，要求图片由专业的分析成像设备拍摄，图片格式应为 .gel 或 16 bit .tif。
- 若图片为 8 bit RGB 格式，即相机拍摄格式，需要用第三方软件（如 photoshop）将格式转换为 16 bit .tif 灰度图像。

1) 打开软件



双击桌面 ImageQuant TL 图标，弹出 control centre 对话框，IQTL 分析软件提供多种分析模式。



- 1D gel analysis 适用于分析一维凝胶电泳分析，如 SDS-PAGE 或 IEF 凝胶，也适用于对 western blotting 结果进行定量分析
- Analysis toolbox 适用于对图像进行区域分析
- Colony counting 适用于培养皿培养的菌落进行计数
- Array analysis 适用于对斑点进行定量分析，如斑点杂交，蛋白芯片等。

1.1 菜单栏

选中进入分析模式后，菜单栏显示如下：

File Edit View Analysis Object Window Help

File—可以对图片进行打开、保存、另存为、叠加、反色计算、查看信息、打印设置等操作；

Edit—可对数据进行导入导出等操作；

View—可选择显示涂层，调节图像色彩、对比度等；

Analysis—选择图像分析步骤；

Object—调整对象

Window—调整窗口

Help—帮助

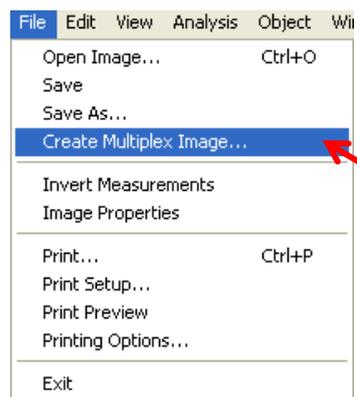
1.1.1 图像叠加

IQTL 软件提供对相同大小图像进行叠加的功能。

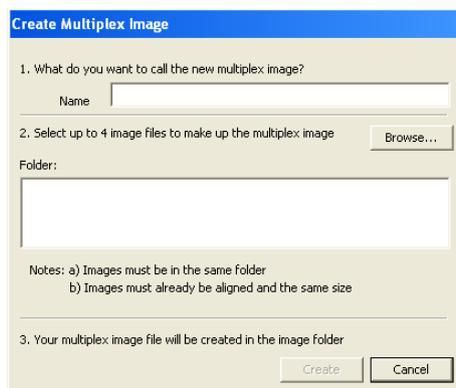
要求需要叠加的图像在同一文件夹中，图像大小完全一致

创建的叠加图片在同一文件夹中

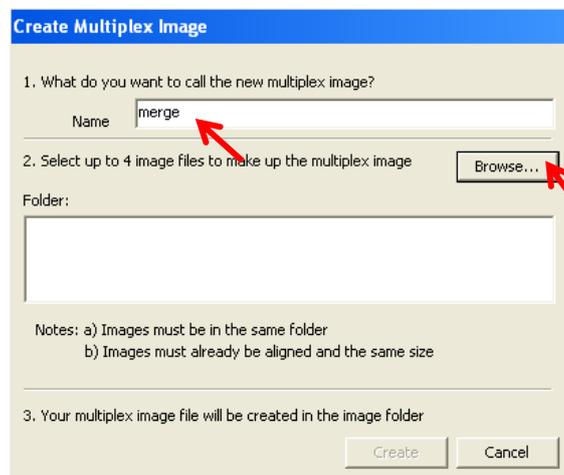
1) 点击 File—Create Multiplex Image



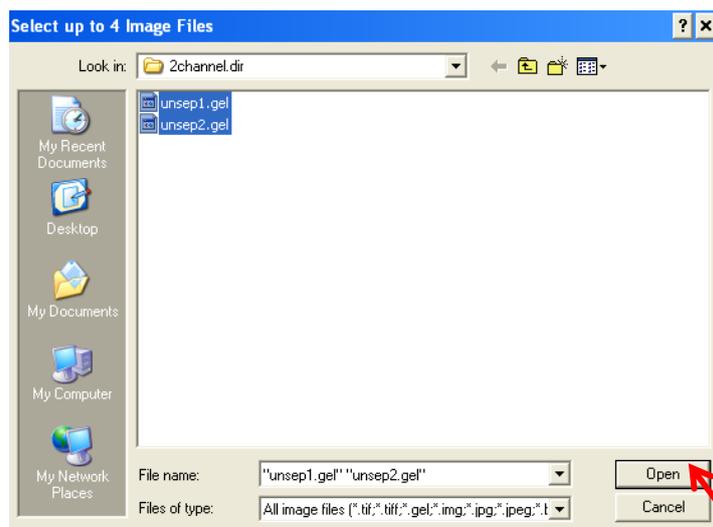
2) 弹出 Create Multiplex Image 对话框



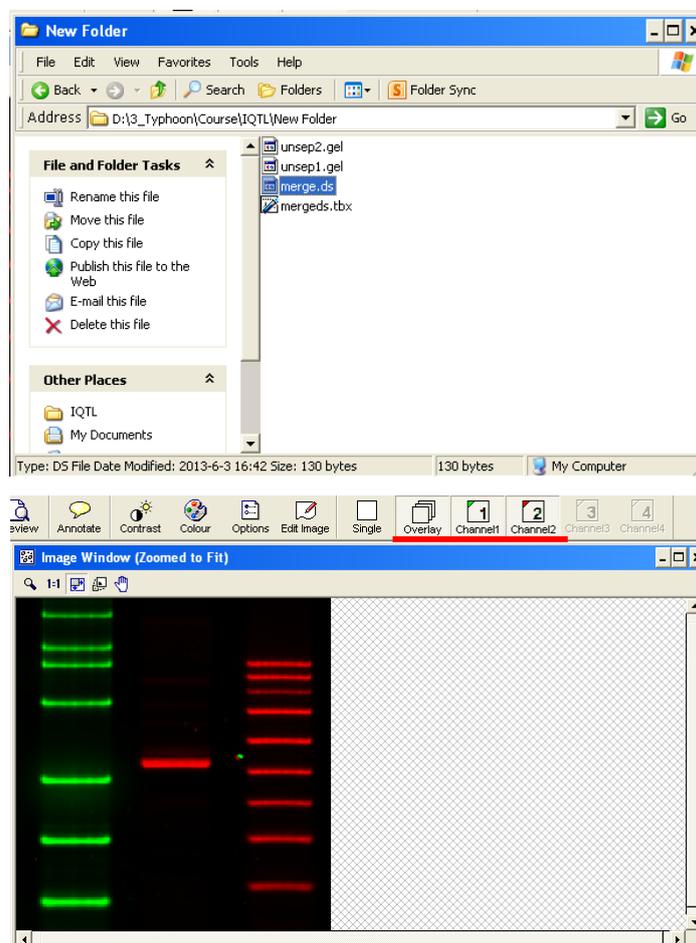
3) 在 Name 中输入叠加后图片名称



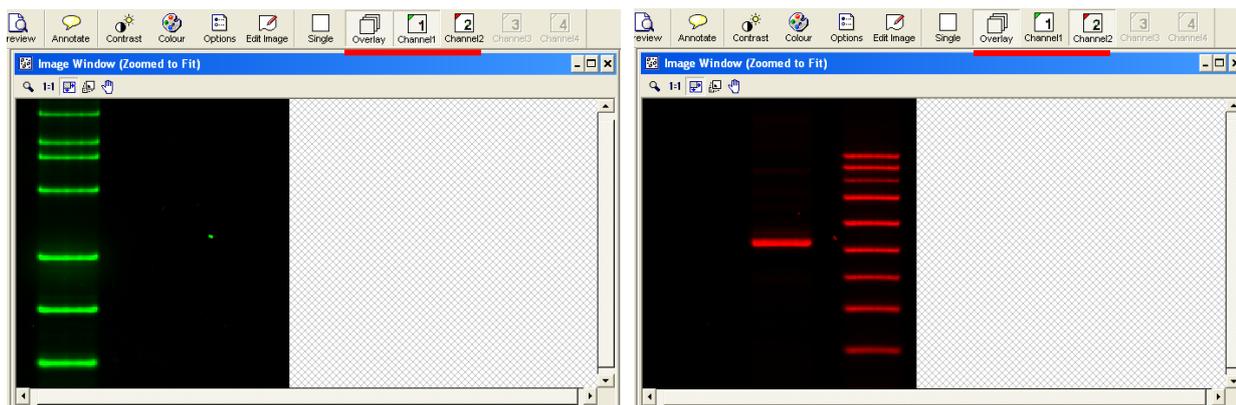
4) 点击 Browse, 选择需要叠加的图片, 点击 open 打开



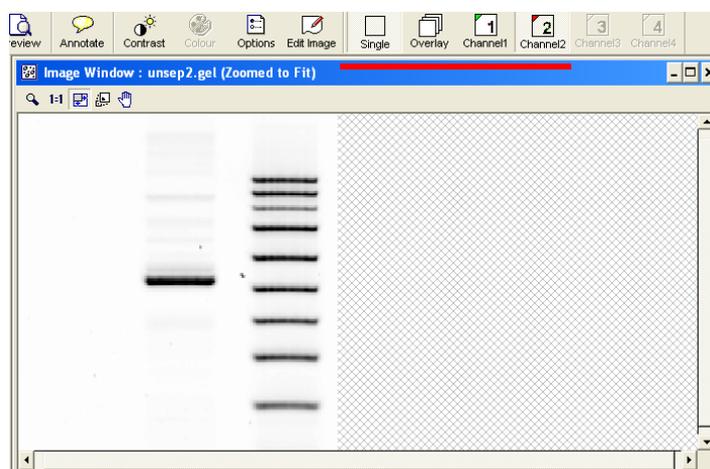
5) 点击 Create, 创建图片, 创建的图片格式为.ds。



6) 可在快捷工具栏中选择观察的通道 Overlay 观察彩色图像，可叠加

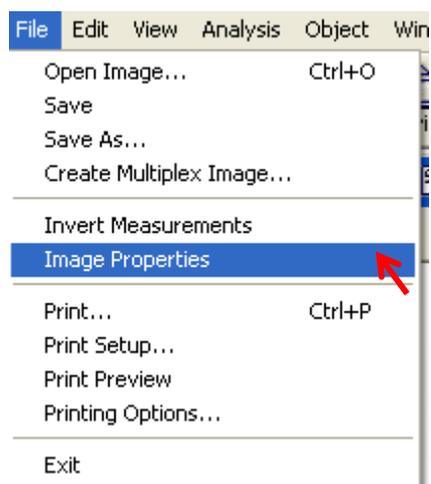


7) 点击 single，观察单通道灰度图，当需要定量计算时，一定要使用 single 模式。

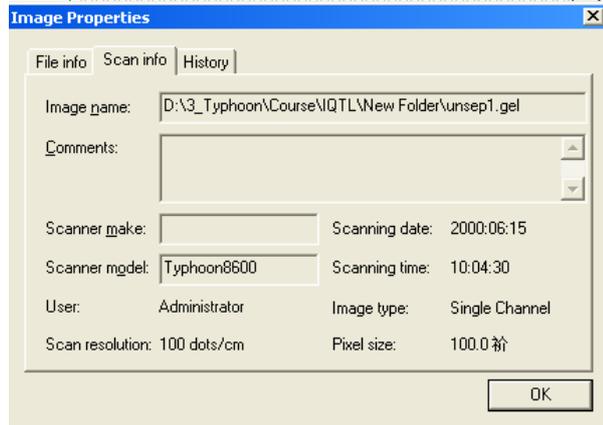
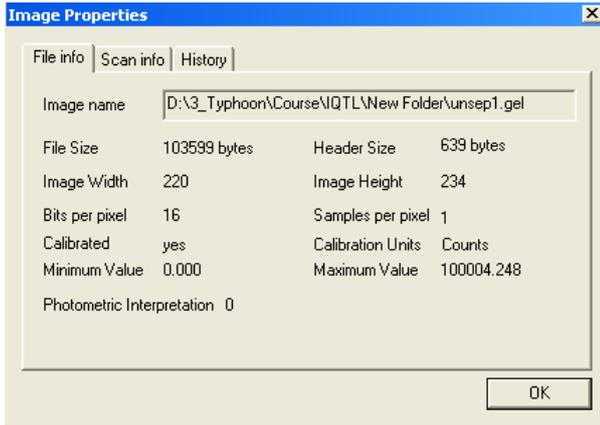


1.1.2 查看图像信息

1) 点击 File—Image Properties



2) 弹出 Image Properties 窗口，选项卡中分别显示了图像的基本信息，扫描信息。



1.2 快捷工具栏

每种分析模式中，快捷工具栏设置相同：



打开图片



将选中窗口拷贝至剪切板



添加标注



调节图片对比度



调节图片色彩



选项



编辑图片



图层选择

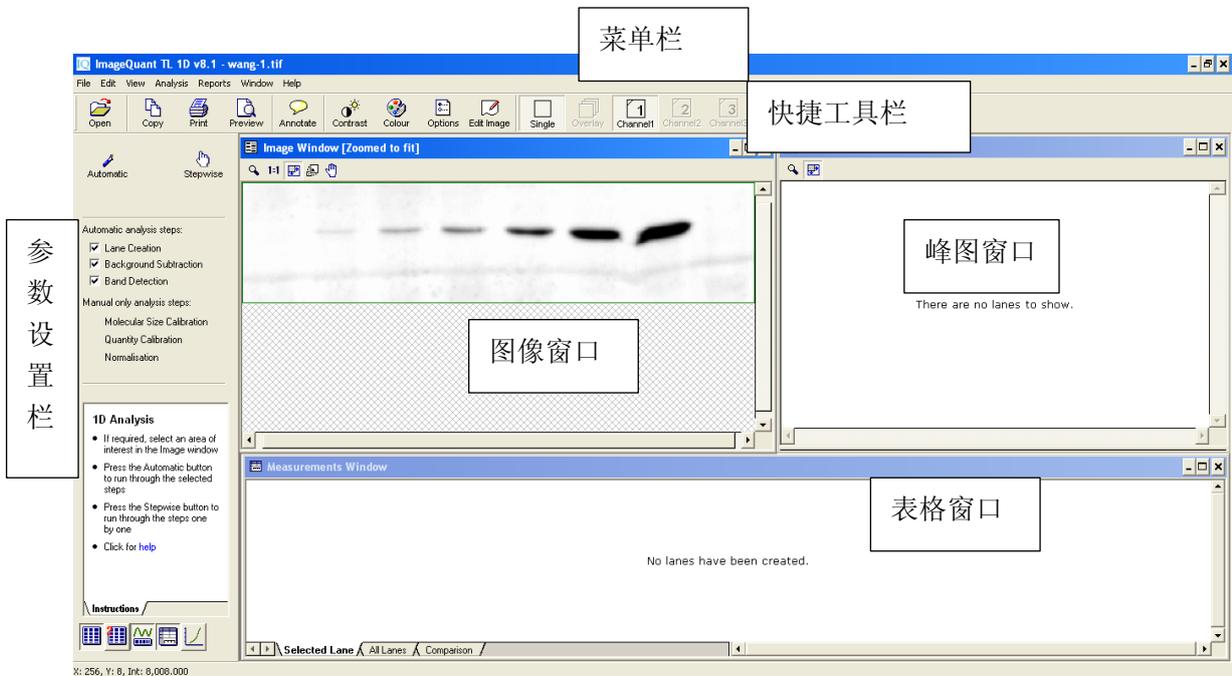
2) 1D gel analysis 一维凝胶分析



1D gel analysis
Analyze 1D electrophoresis gel images

2.1 点击 1D gel analysis

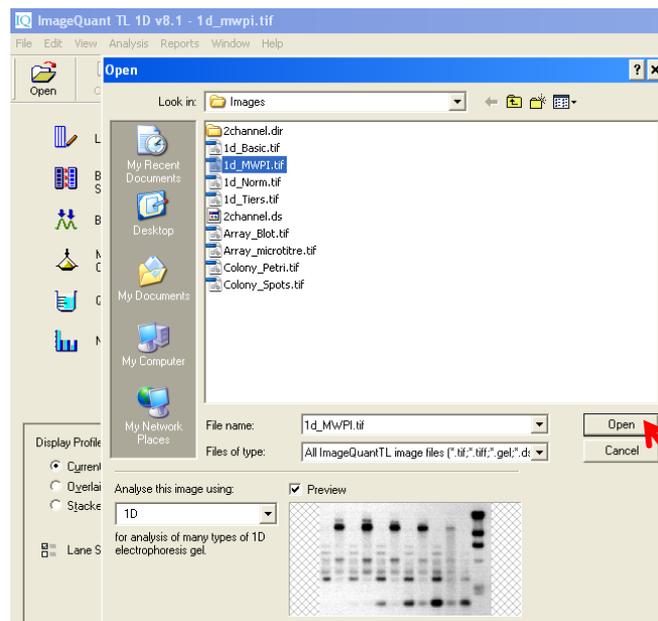
，弹出新窗口



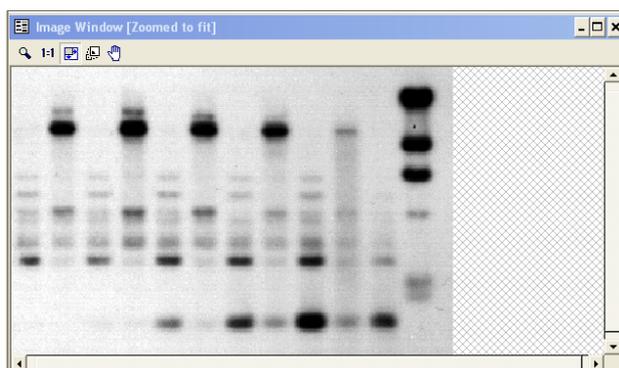
2.2 打开图像

2.2.1 在快捷工具栏中点击 open 按钮，选择需要打开的图像，点击 open。

Note: 图片格式应为.gel 或 16 bit .tif



2.2.2 图像显示窗口打开选中图像。

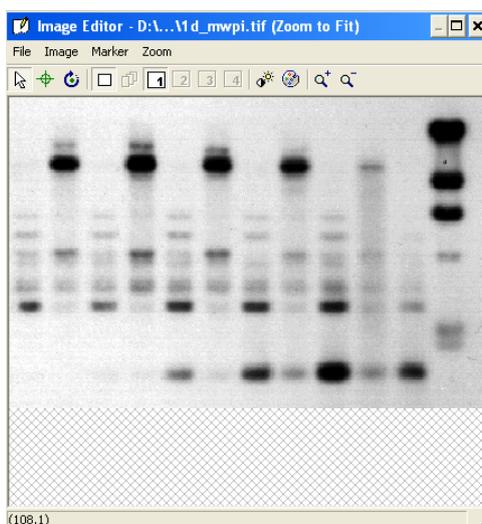


2.3 图片调整

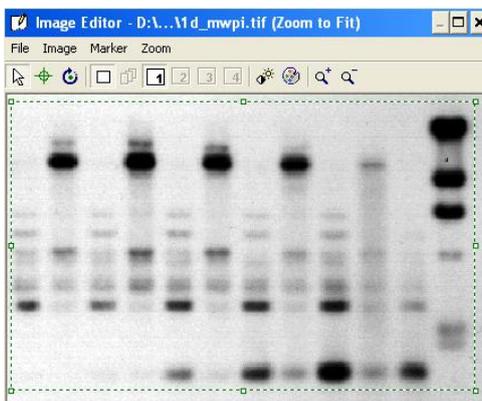
可在正式分析前，对图片进行裁剪、和对比度调节，以方便后续分析。

2.3.1 剪裁

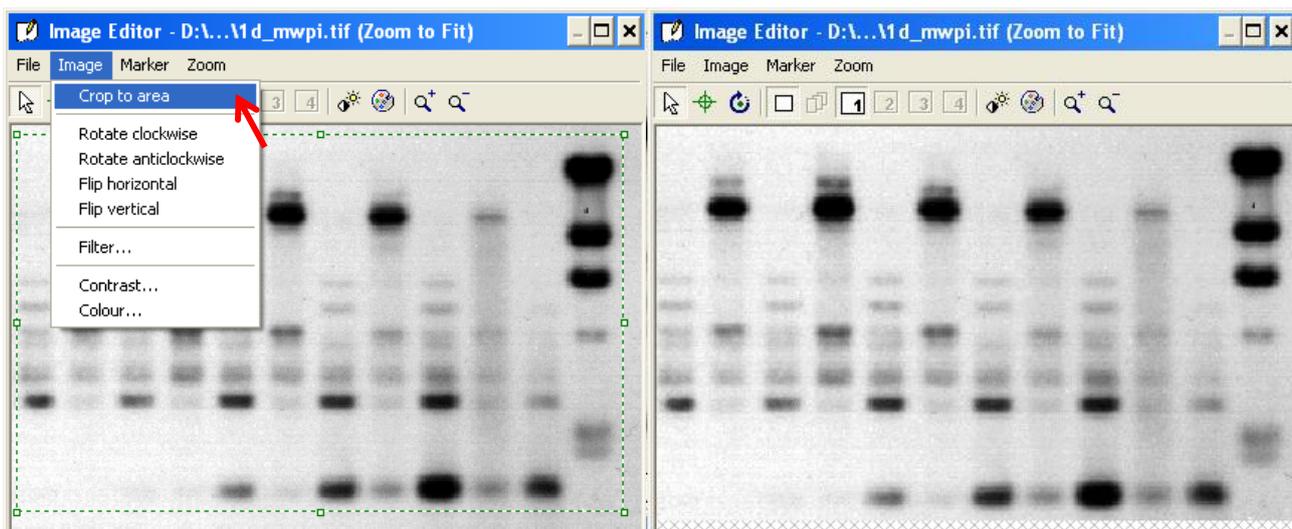
- 1) 在快捷工具栏中点击  Edit Image 按钮，打开 Image Editor 窗口



- 2) 用鼠标在图像窗口中框出需要保留的图像区域

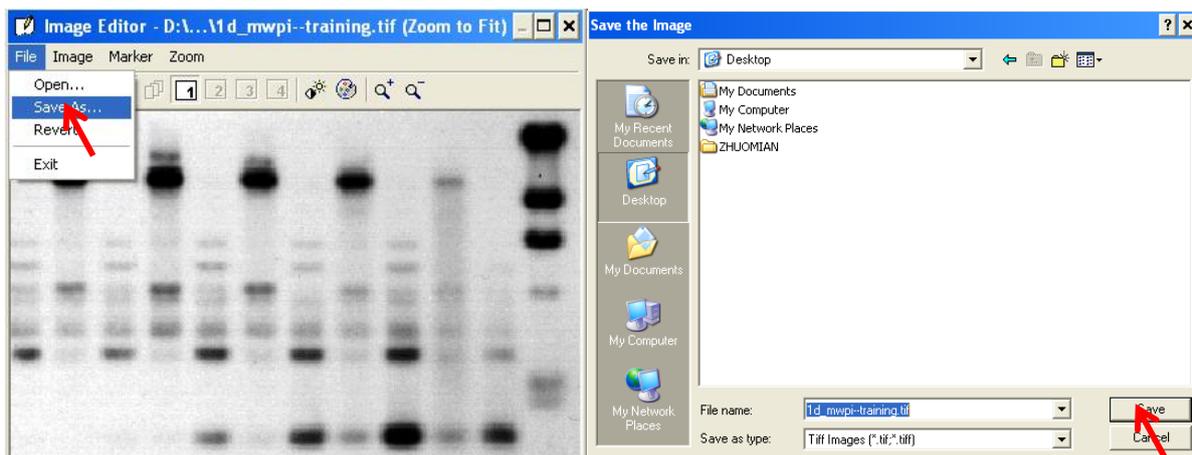


3) 在菜单栏中点击 Image--Crop To Area, 图像将被剪裁



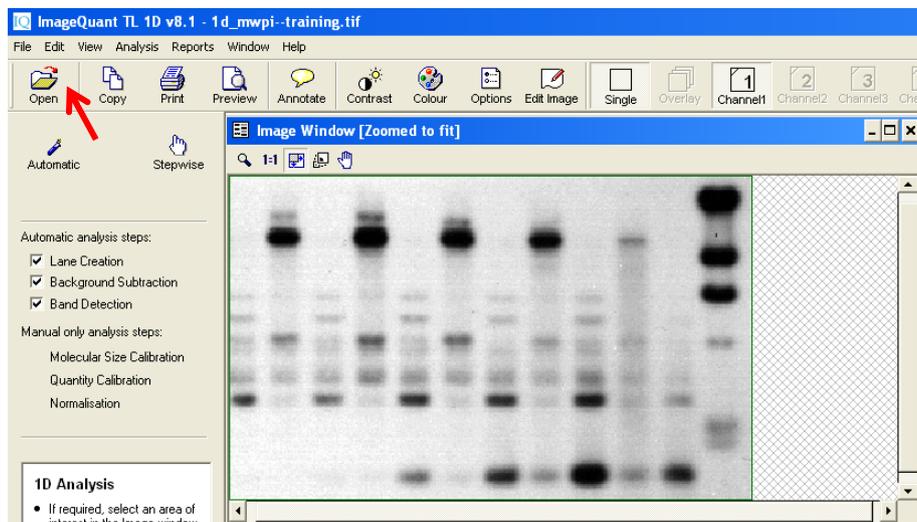
4) 当图片经剪裁调整后, 即可根据修改后的图片进行正式分析。

5) 首先需要保存修改的图片。点击 File--Save As, 选择保存路径, 点击 Save 保存。



6) 关闭 Image Editor 窗口。

7) 在主界面中点击哦 Open, 打开修改后的图片。

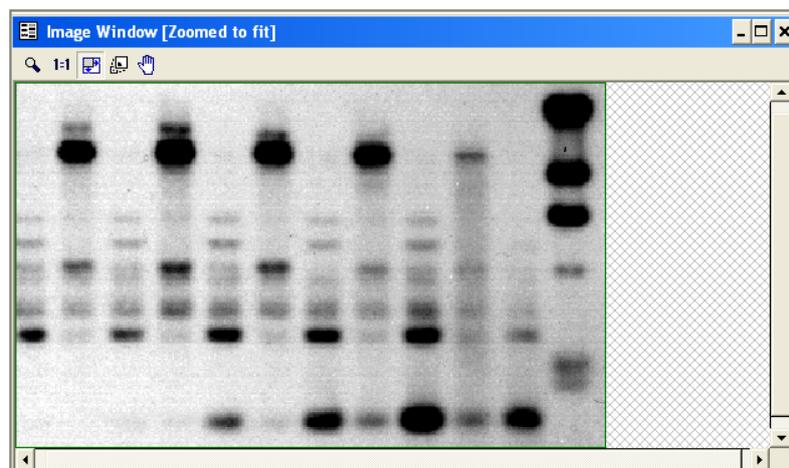
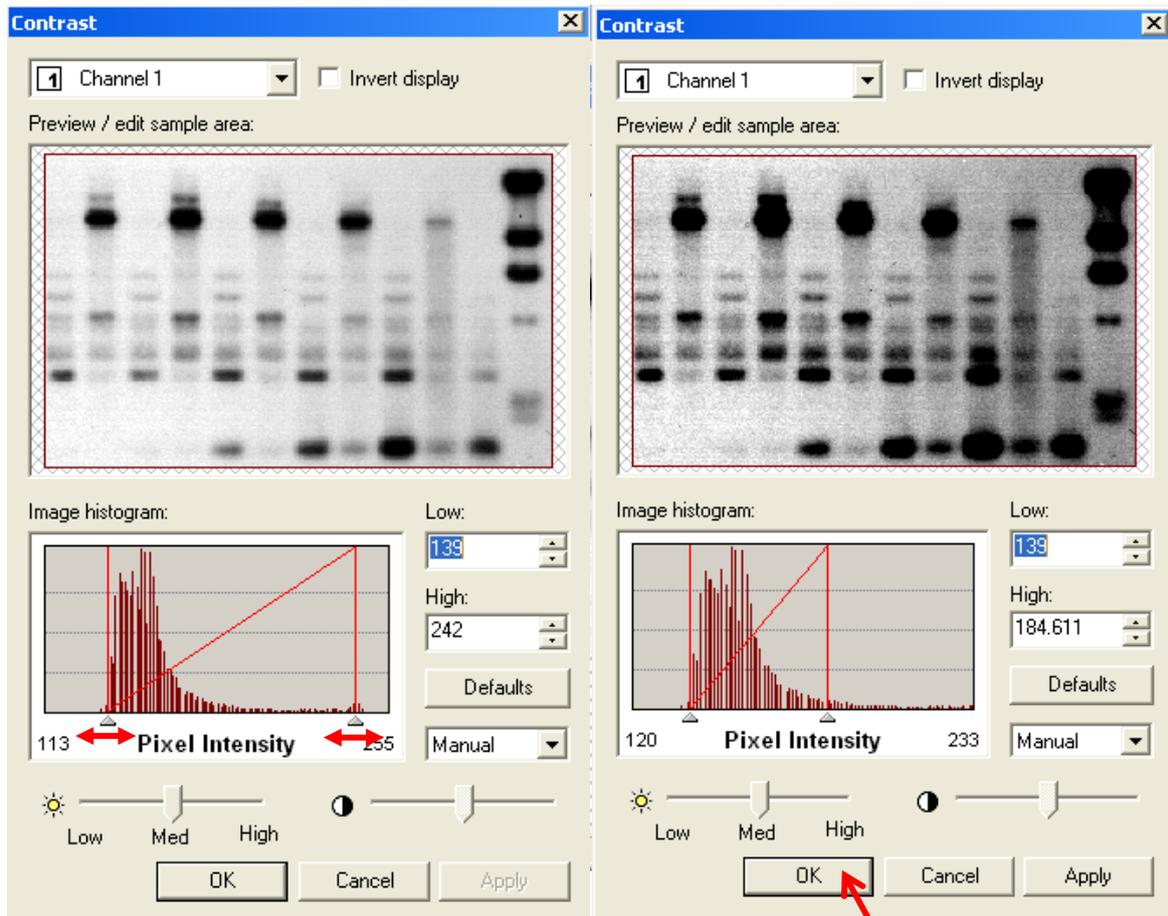


2.3.2 对比度调节

IQTL 在打开图像时会自动调整图像的显示对比度，使图像便于观察。也可以手动调节图像对比度。

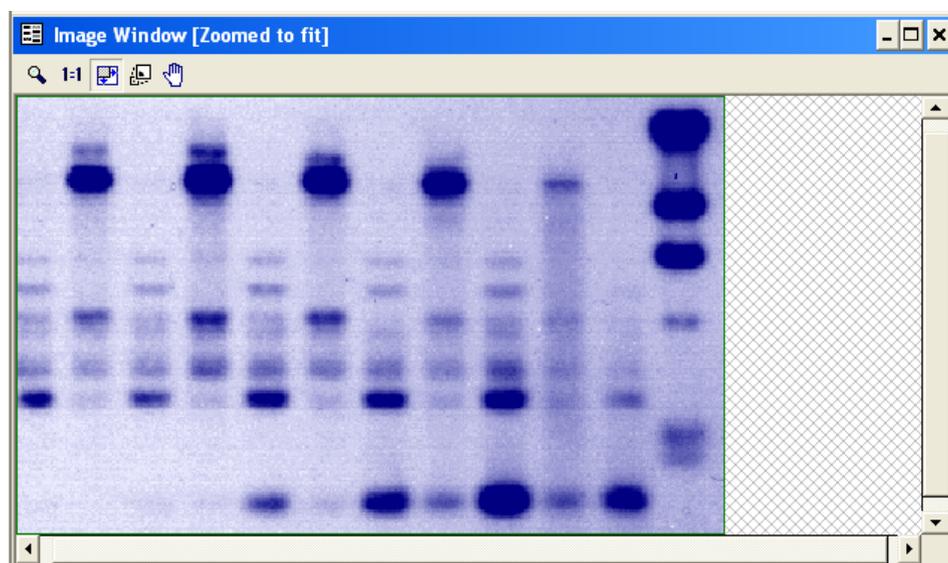
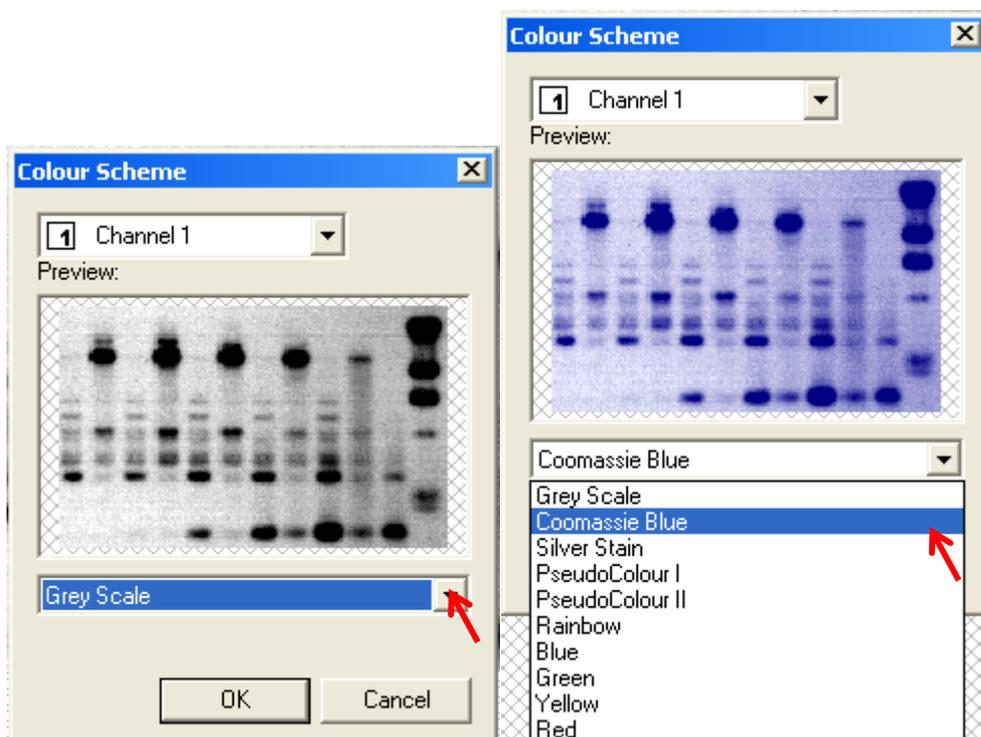
- 1) 点击快捷工具栏中的  按钮，弹出 contrast 对比度调节窗口，可拖动 pixel intensity 中的三角形，调节图片的对比度，在上方窗口中预览调节效果。点击 OK，确认对比度调节。

Note: 此处对对比度的调节仅调节图像的显示对比度，对原始图像数据不会造成改变。



2.3.3 调节图像显示色彩

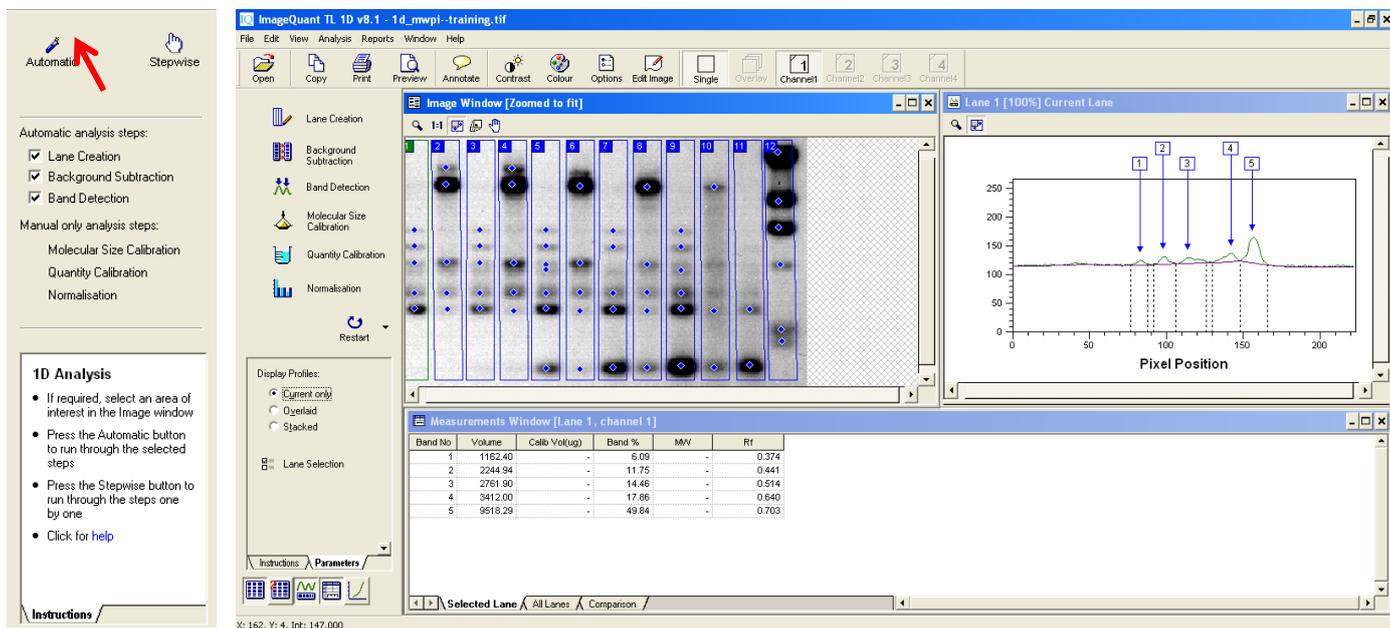
- 1) 点击快捷工具栏中的  按钮，弹出 colour scheme 色彩调节窗口，在下拉菜单中可选择需要改变的颜色，如考染、银染等。点击 Ok 确认。



- 2.4 在 1D gel analysis 中，分析分为 6 步。创建泳道，背景消减，条带检测，分子量校正，含量校正，归一化计算，如参数设置栏所示。其中，前三步，可以通过 Automatic 由软件自动完成，也可勾选其中几步，进行自动分析。

2.4.1 自动分析

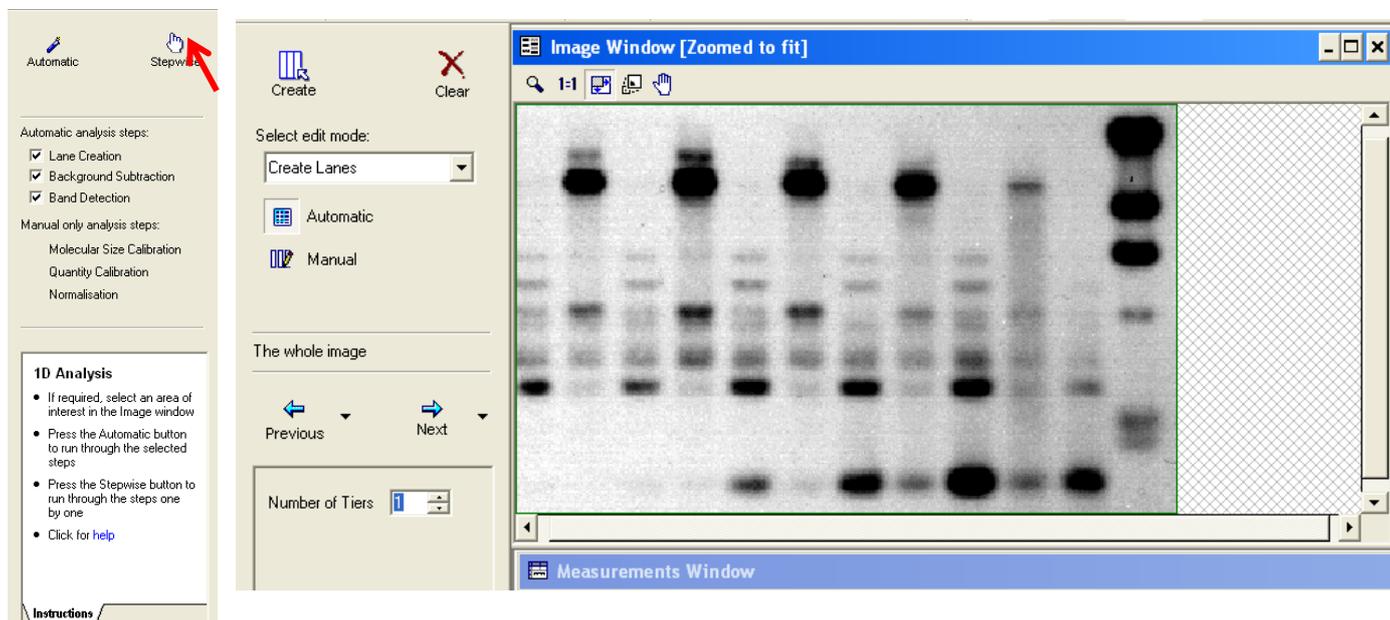
点击  按钮，自动进行创建泳道、背景消减、条带检测分析。



Automatic Analysis Results:

Band No	Volume	Calib Vol(ug)	Band %	MW	Rf
1	1162.40	-	6.09	-	0.374
2	2244.94	-	11.75	-	0.441
3	2781.90	-	14.46	-	0.514
4	3412.00	-	17.86	-	0.640
5	9518.29	-	49.84	-	0.703

2.4.2 也可以点击  按钮，进行手动分析。



Manual Analysis Mode:

Select edit mode:

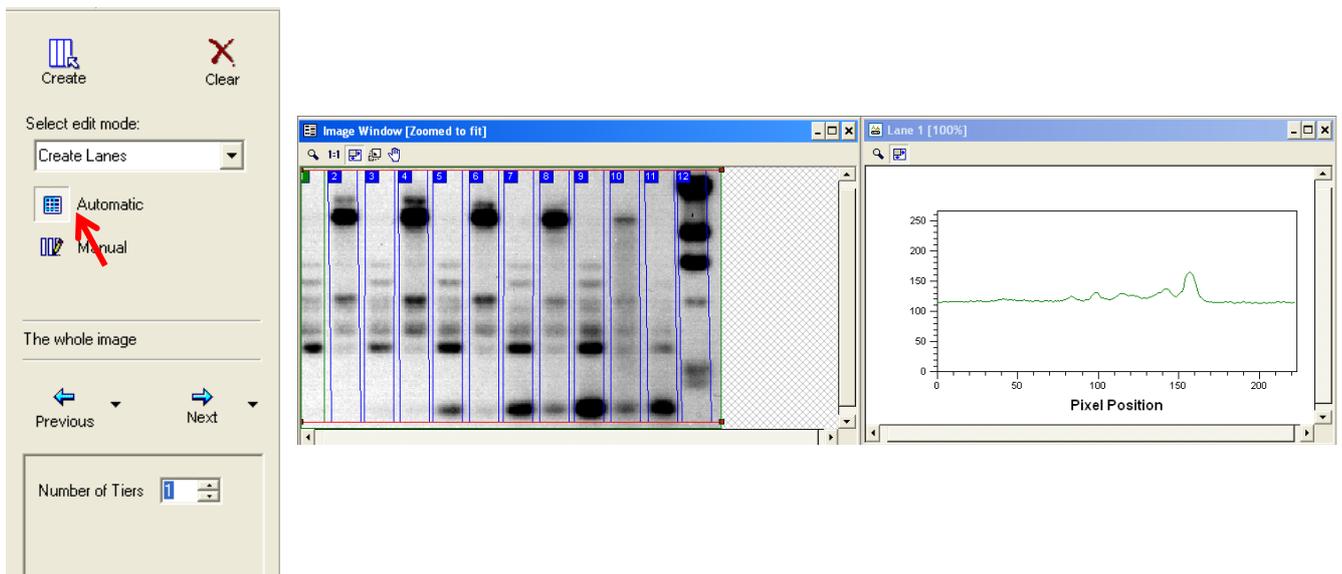
Number of Tiers:

2.5 创建泳道

在创建泳道步骤中，可进行对泳道的创建和修改。

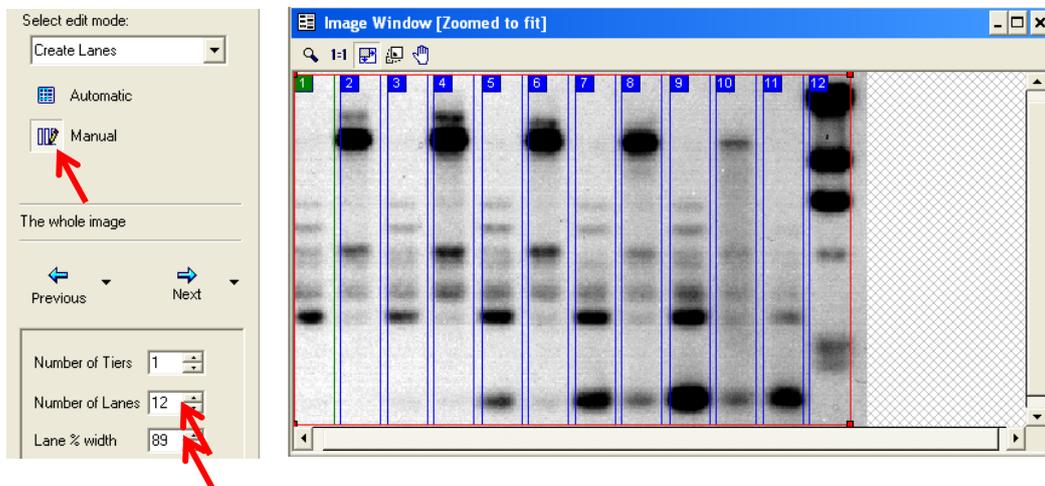
2.5.1 自动创建泳道

选择  Automatic，点击  Create，软件自动创建泳道。



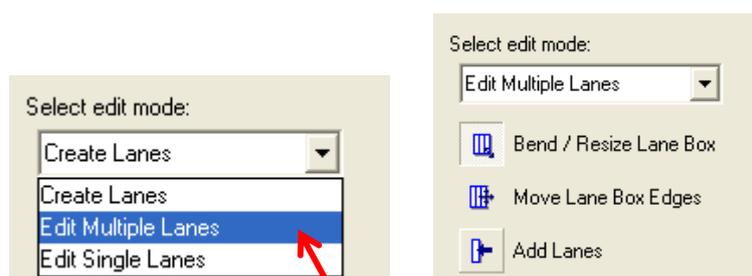
2.5.2 手动创建泳道

选择  Manual，在参数设置中输入泳道数量，及泳道宽度。在图像显示窗口中，划出对应泳道。

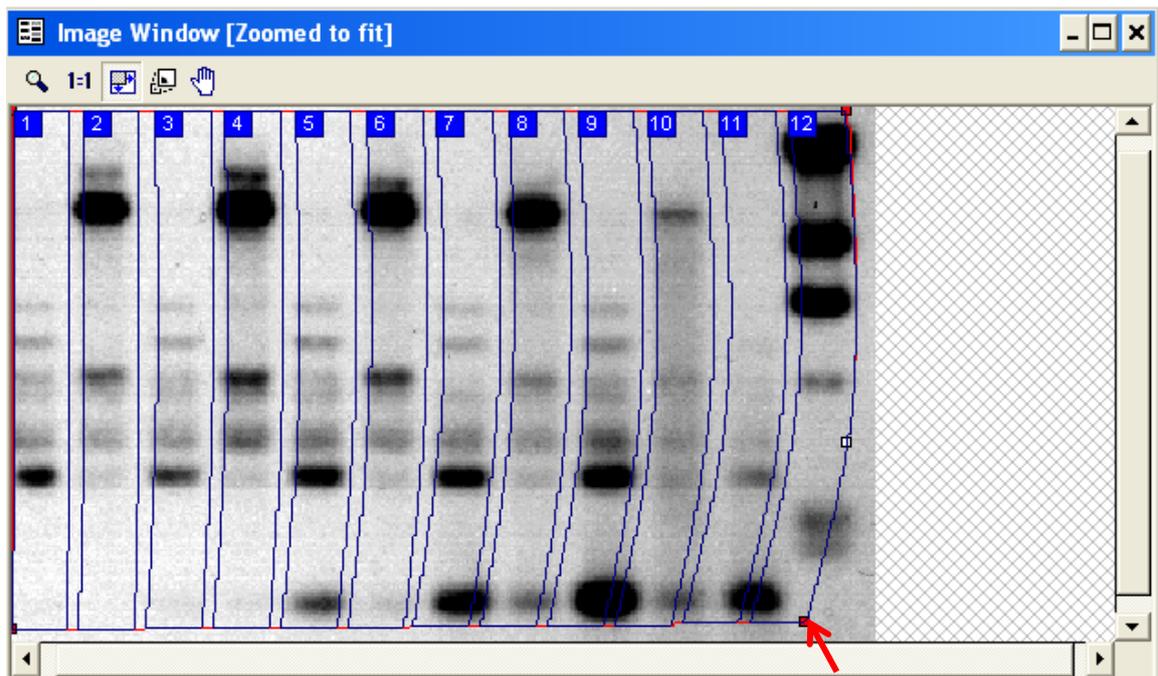


2.5.3 对所有泳道进行修改

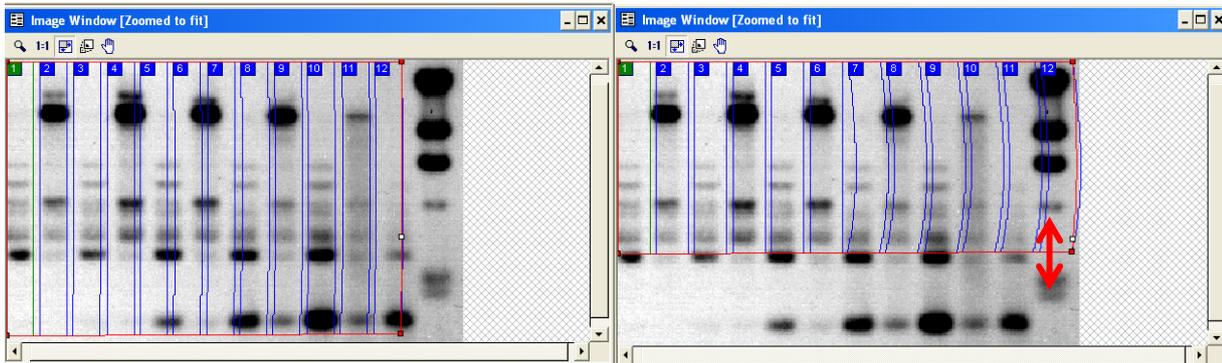
1) 选择 Edit Multiple Lanes



- 2)  Bend / Resize Lane Box 调节可使泳道弯曲。

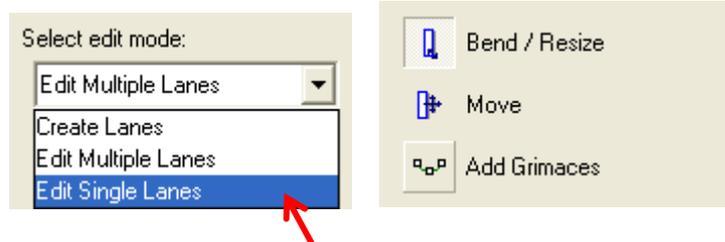


- 3)  Move Lane Box Edges 修改泳道宽窄长短。

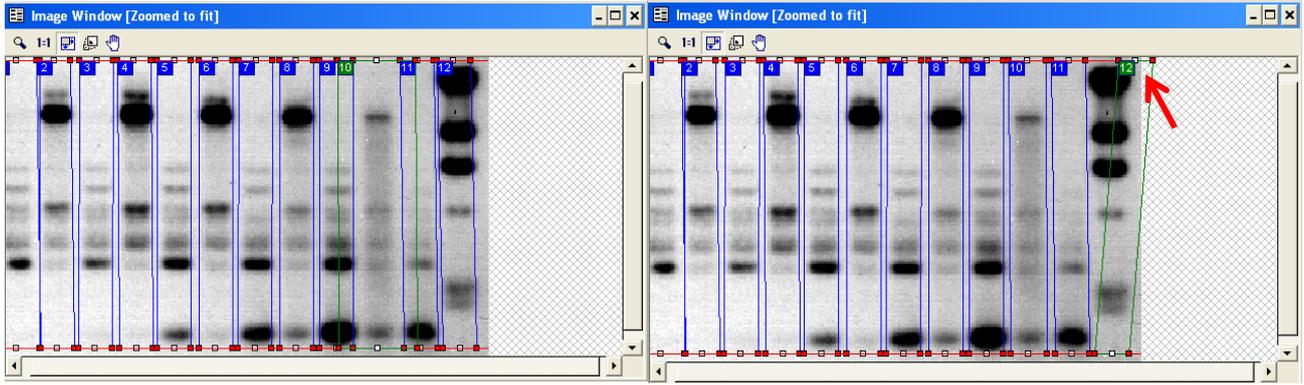


- 4)  Add Lanes 添加泳道

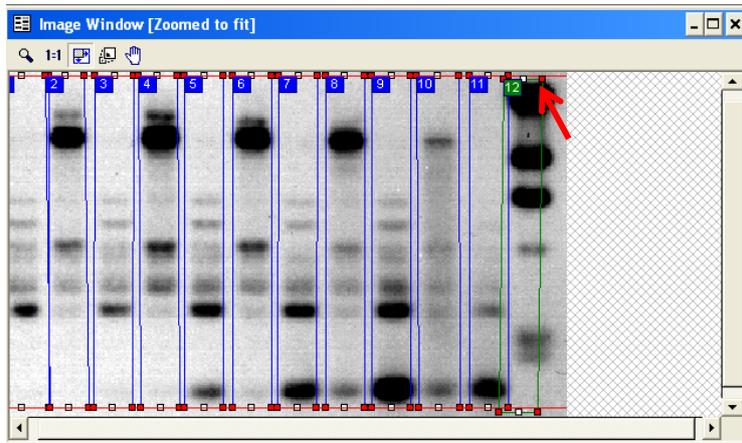
2.5.4 修改单个泳道



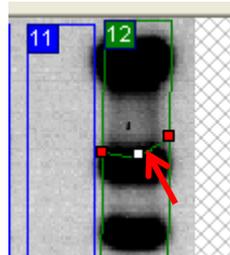
- 1)  Bend / Resize 调整泳道宽度，弯曲度



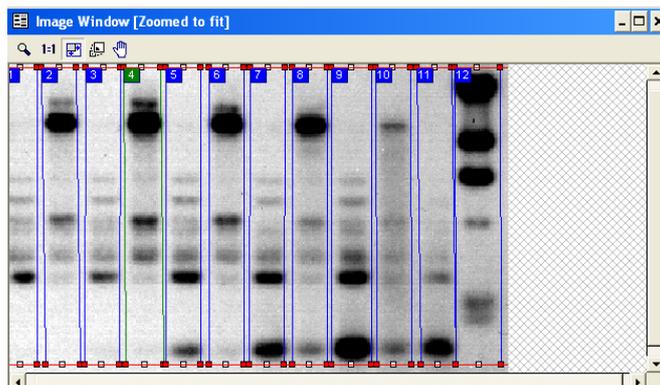
2)  Move 移动泳道



3)  Add Grimaces 标注泳道中发生扭曲的条带

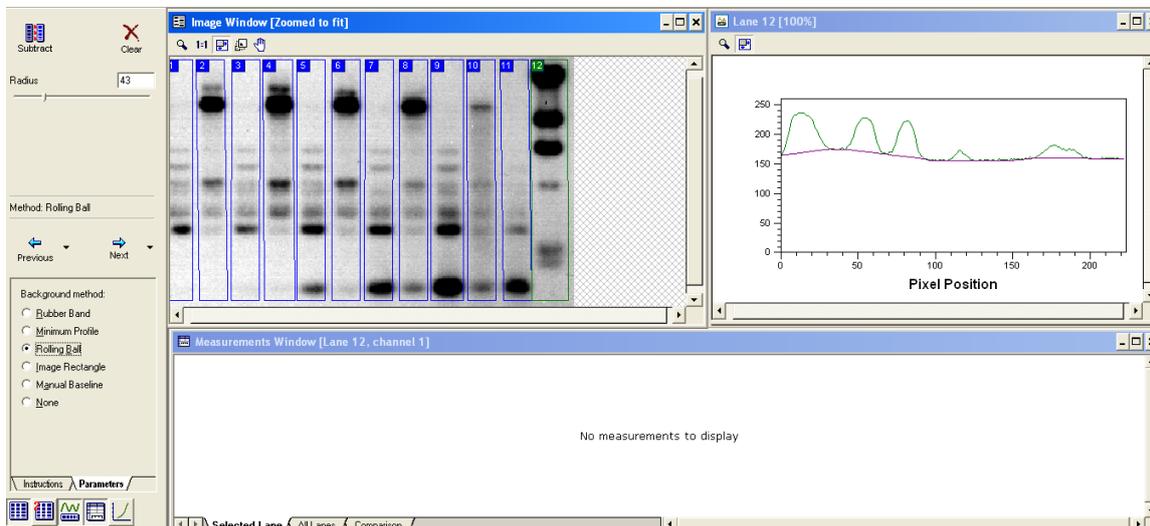


2.5.5 调整好各泳道后，点击  确认



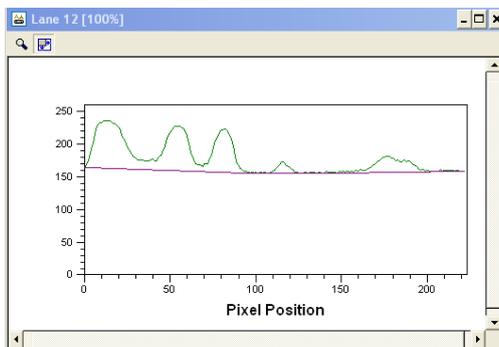
2.5.6 点击  进入下一步消减背景。

2.6 背景消减

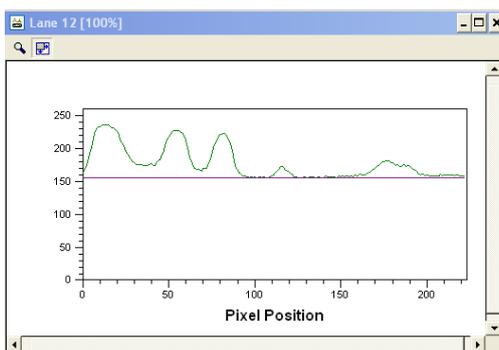


消减背景有多种模式可以选择，推荐使用 Rolling Ball 模式。
右侧的泳道显示窗口中，绿色为对应泳道中像素灰度值的峰图，紫色线为背景基线。

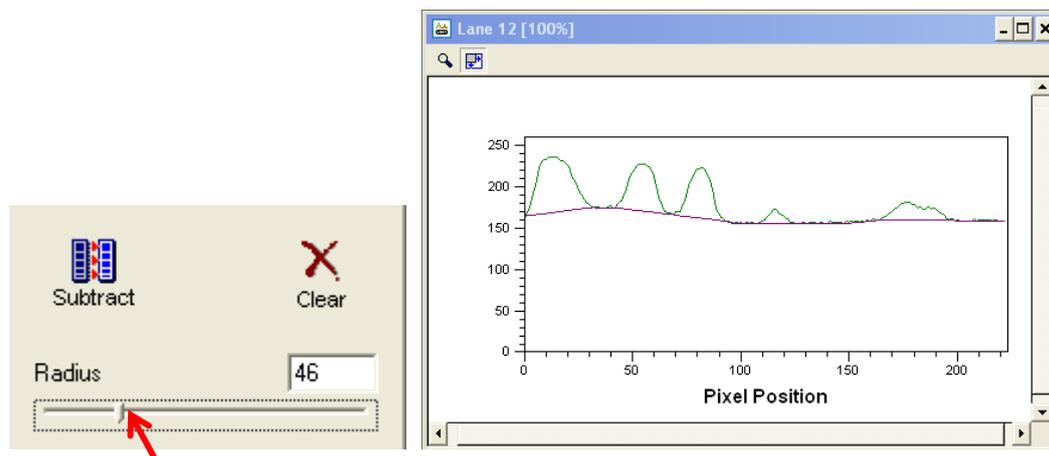
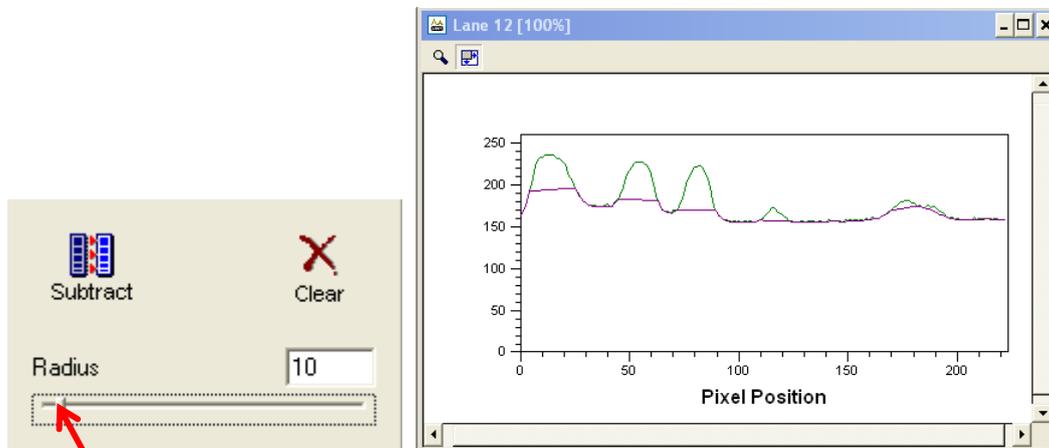
2.6.1 **Rubber Band** 该模式选择了绿色峰图中几个灰度值较低的点，连成背景基线



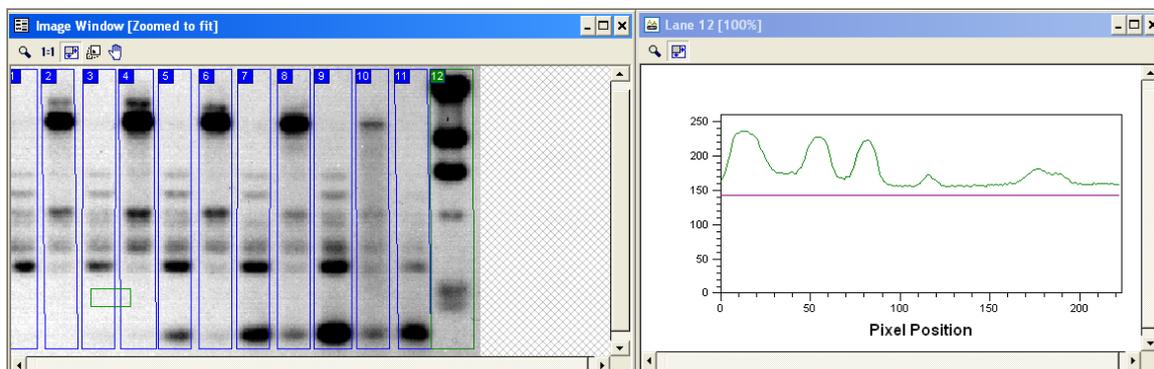
2.6.2 **Minimum Profile** 以灰度值最低点，做一条水平线作为背景基线



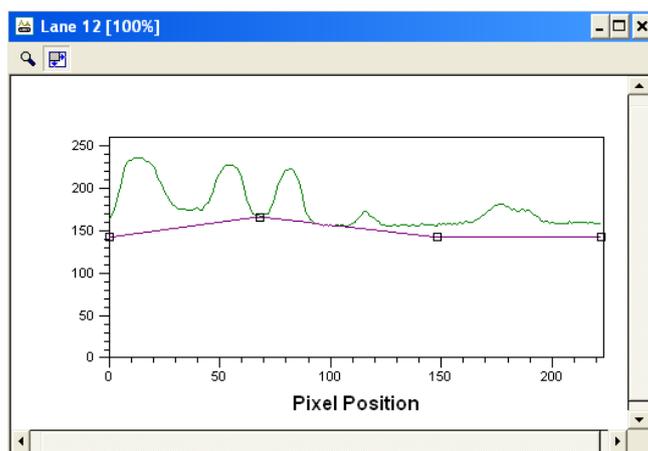
2.6.3 **Rolling Ball** 模拟一个小球，沿着绿色峰图曲线进行滚动，以滚动的痕迹作为背景基线，对图像背景的消减操作；可以通过上面的滑动块调节滚球的半径【Radius】使背景基线（紫色实线）能够尽可能的与背景重合，不同的图像设置的【Radius】的值有所不同。



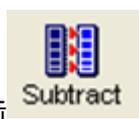
2.6.4 **Image Rectangle** 在图像中选择一矩形区域，以该区域的平均灰度值作为背景基线。



2.6.5 Manual Baseline 手动调节基线位置。

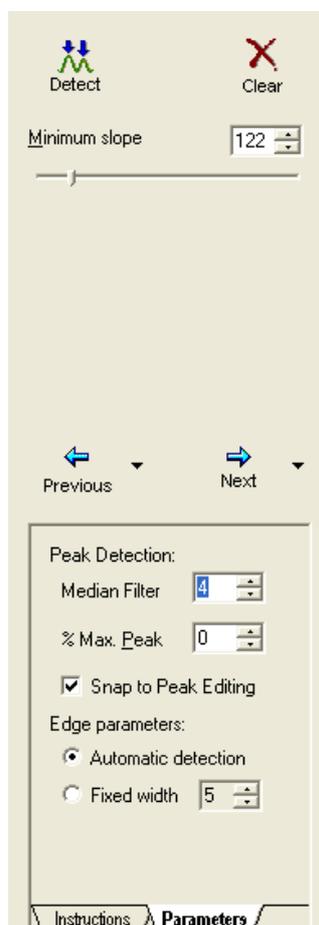


2.6.6 None 清除设置



2.6.7 选择合适的方法后，点击 Subtract 消减背景。点击 Next 进入下一步条带检测。

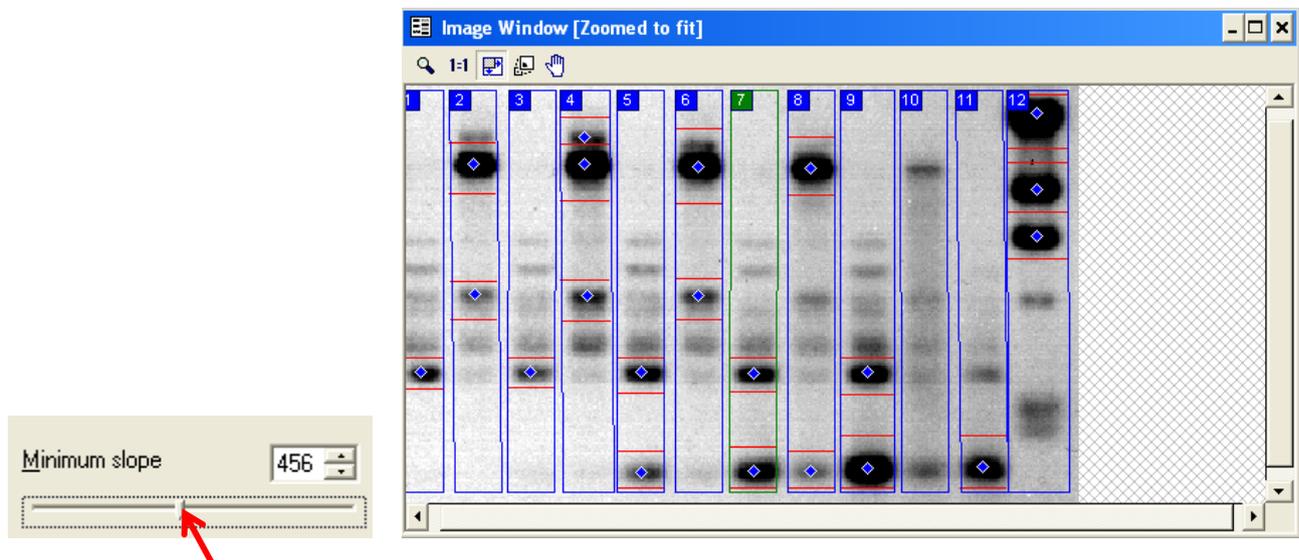
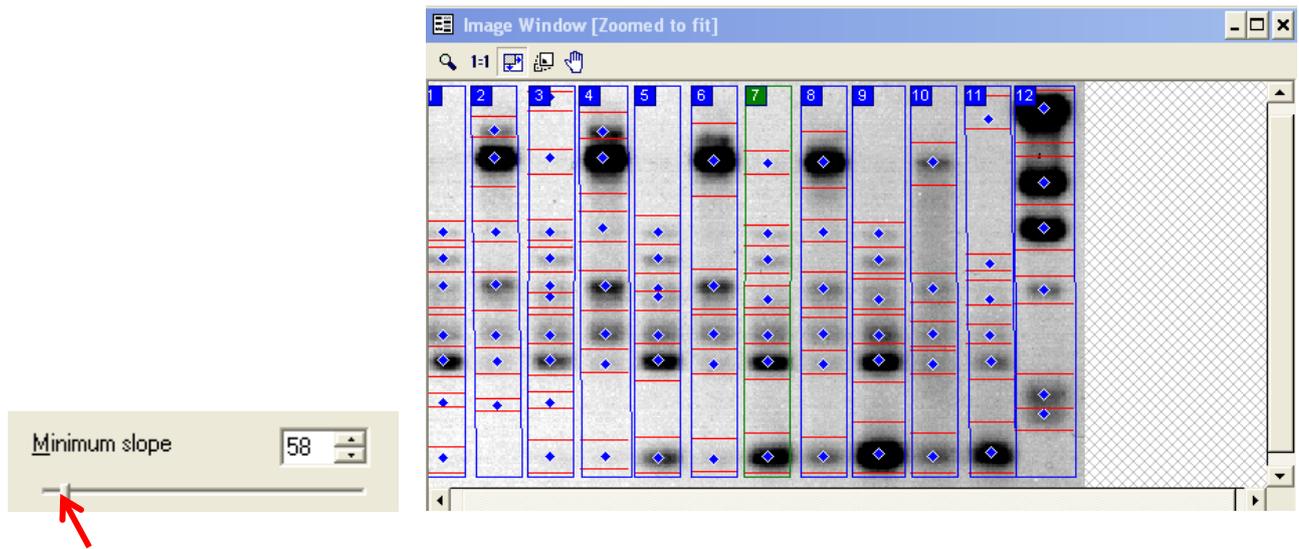
2.7 条带检测



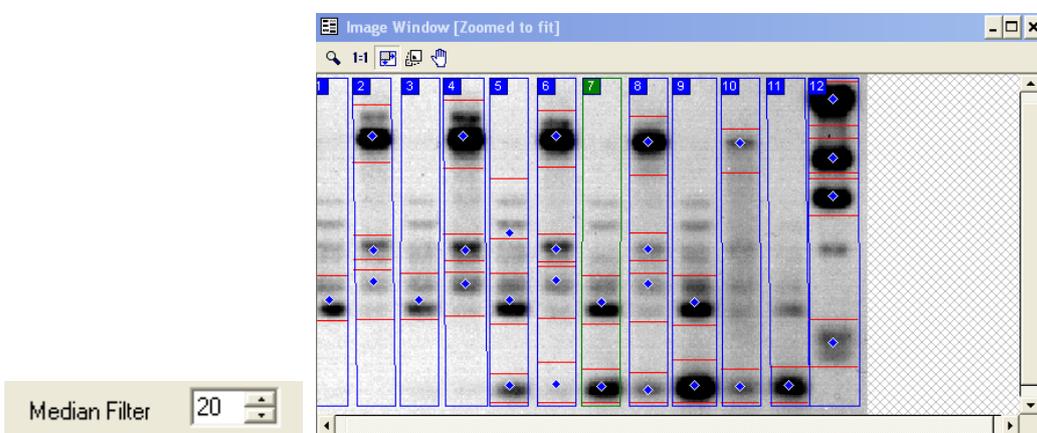
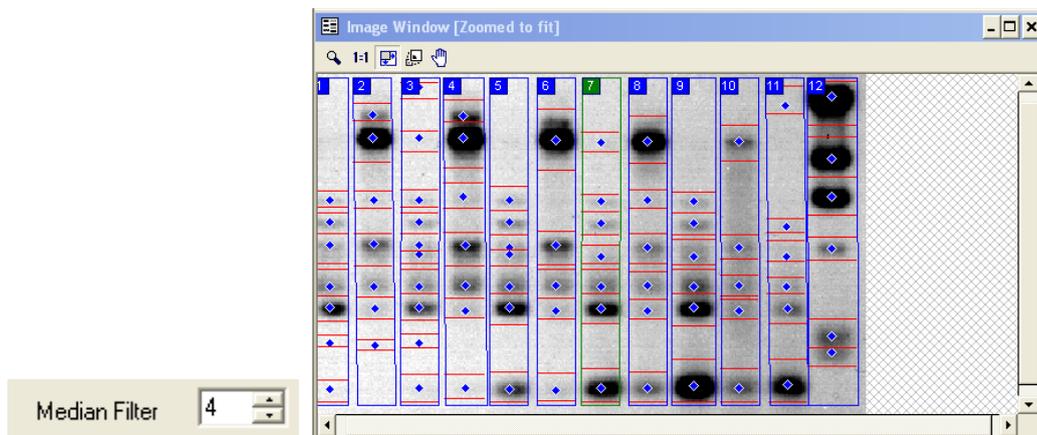
条带检测中，点击  ，进行条带检测，检测到的条带中心用蓝色菱形表示，上下红线表示条带宽度。



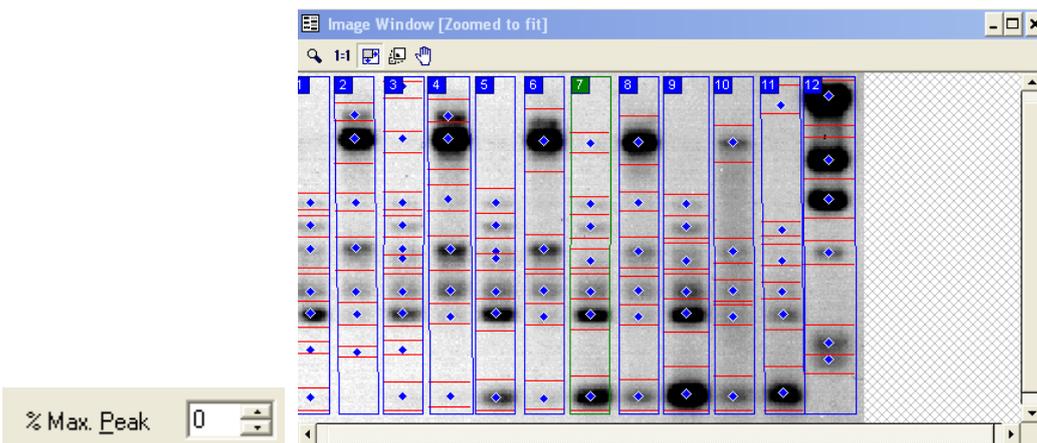
2.7.1 **Minimum slope** 指从条带的波峰到波谷位置做一直线，该直线的斜率为 Slope，该值越大，斜率越大，该条带越锐利，检测到的条带越少。通过调节 Minimum Slope 的值可以调节自动检测的条带。

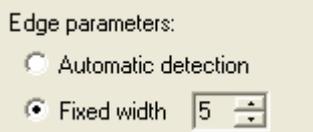
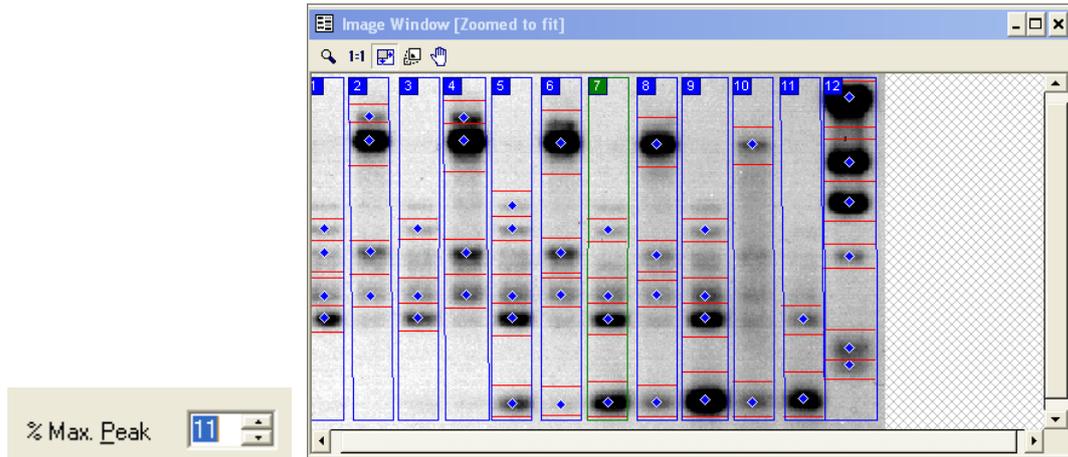


2.7.2 Median Filter 背景噪音的阈值，随着数值的增大，检测到的条带数量逐渐减少。



2.7.3 % Max. Peak 占最大峰的比例，该数值可以调整条带强弱的阈值，随着数值的增大，检测到的弱带数量逐渐减少。在一般情况下，使用软件的默认值；

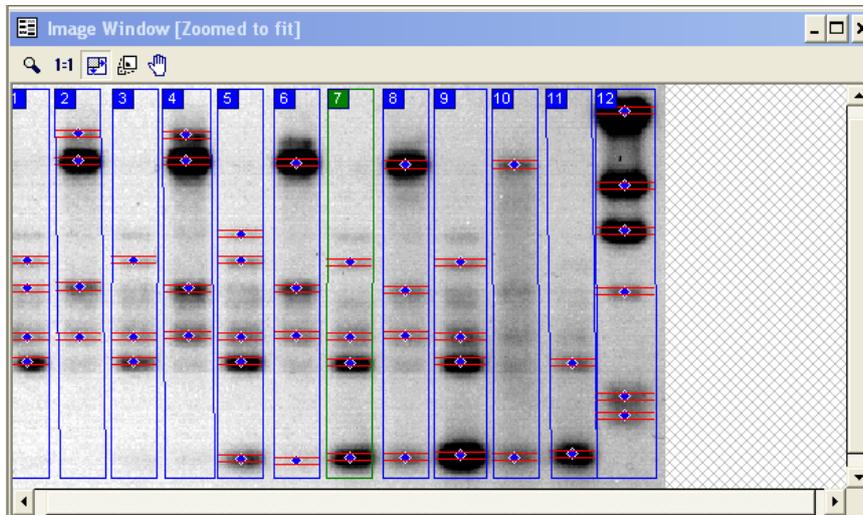




2.7.4 条带宽度设置，一般采用自动模式。

1) Automatic detection 自动调整条带宽度

2) Fixed width 5 固定所有条带的宽度，不推荐使用



2.7.5 也可以手动添加、删除条带，更改条带宽度。

1) 添加

在图像显示窗口中，用鼠标指向需要添加的位置，鼠标将变为 ，点击左键即在该处添加条带。

2) 删除

在图像显示窗口中，用鼠标指向需要删除的条带，鼠标将变为 ，点击右键即删除该条带。

3) 更改条带宽度

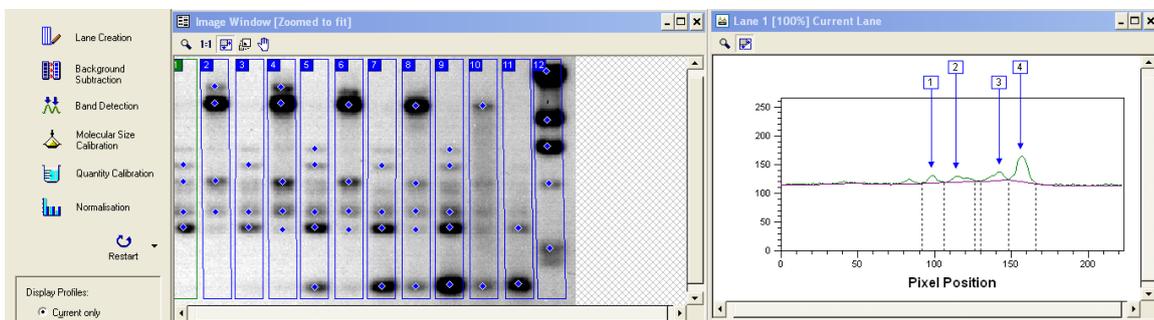
在图像显示窗口中，用鼠标指向需要更改的条带边缘（即红线处），鼠标将变为，拖动该箭头，即可更改条带宽度。

同时，在泳道显示窗口中，用鼠标指向需要更改的条带边缘（即虚线处），鼠标将变为，拖动该箭头，即可更改条带宽度。



2.7.6 点击 **Next** 进入下一步分子量校正。

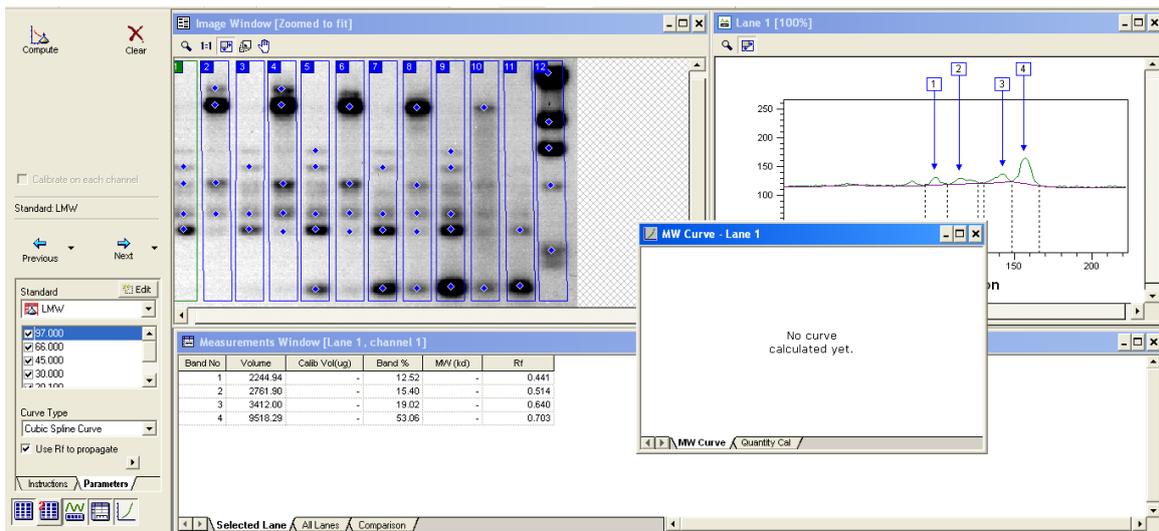
2.8 若采用 automatic 模式，软件自动进行创建泳道、消减背景、条带检测，进入如下界面。



若对结果满意，可直接点击 **Molecular Size Calibration**，进入分子量校正。

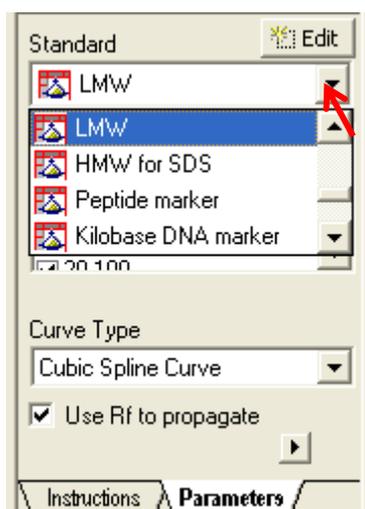
若对结果不满意，可点击相应步骤，进行手动修改。

2.9 分子量校正

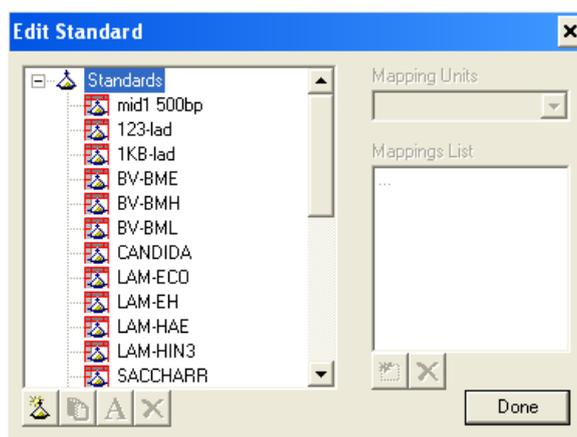


分子量校正，首先需要指定 Marker 大小和对应泳道，选择相应拟合曲线，对 Marker 对应泳道进行分子量拟合，得到校正曲线，再根据该曲线对其余泳道的条带分子量进行计算。

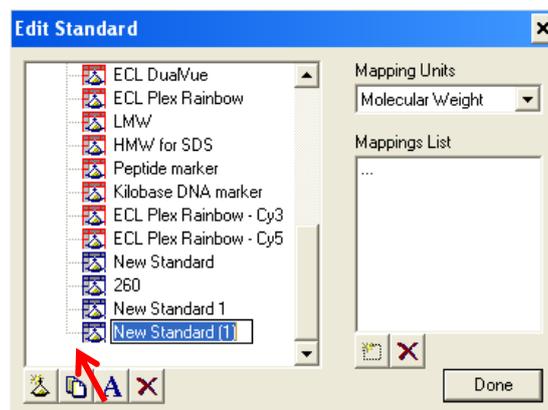
2.9.1 在 Standard 下拉菜单中选择需要的标准。



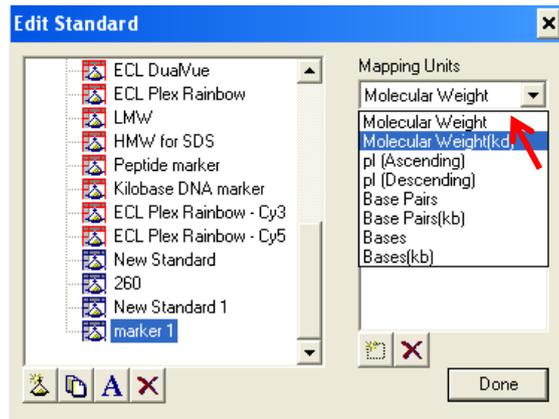
1) 若没有，则点击  Edit，进行添加和修改。在弹出的对话框中，选择需要修改的标准，在右侧窗口进行修改。



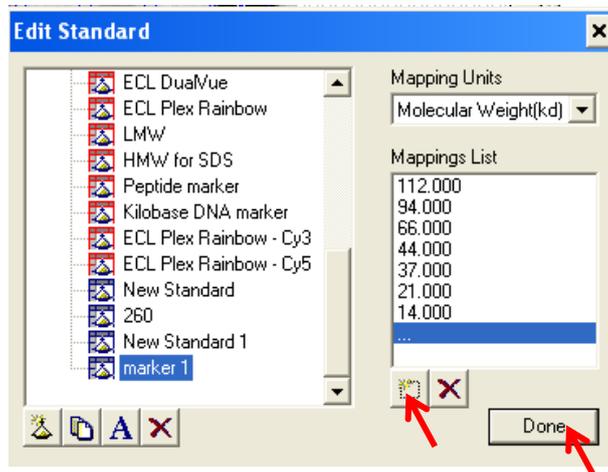
2) 点击 ，新建标准。



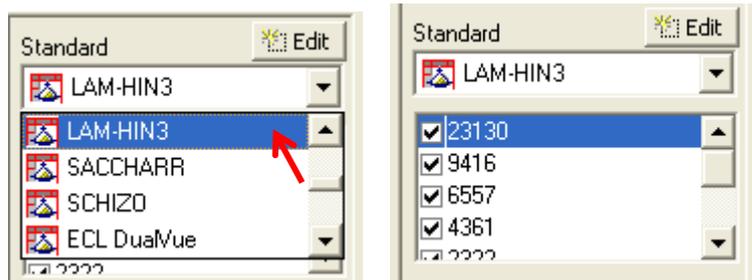
3) 输入新建标准名称，选择标准对应模式，如分子量，等电点，碱基对。



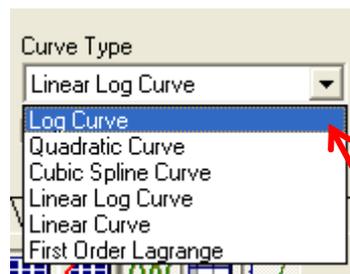
4) 点击 ，添加并输入标准大小。点击 Done 完成新建。



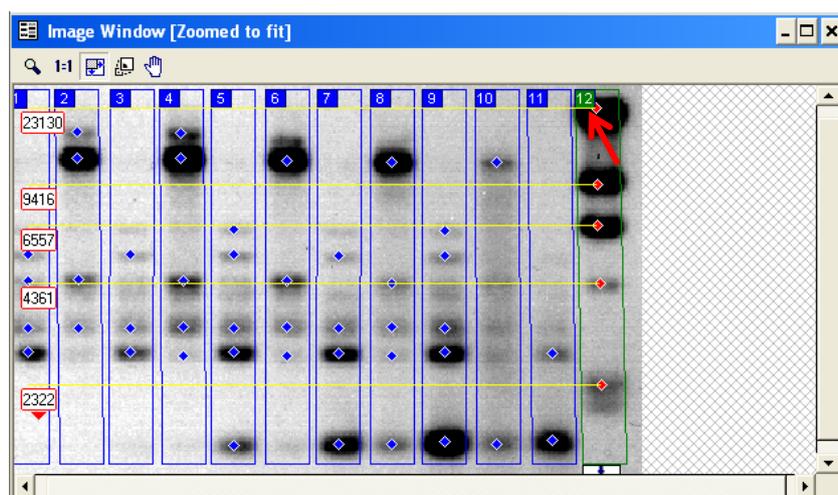
5) 在 Standard 中，选择对应的标准



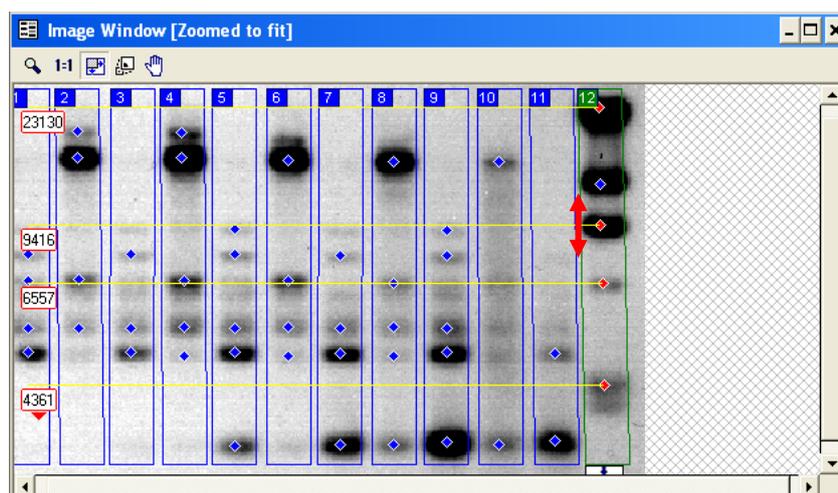
6) 根据标准的曲线模型，在 Curve Type 中选择对应的曲线拟合方式。标准说明书会介绍其拟合曲线。



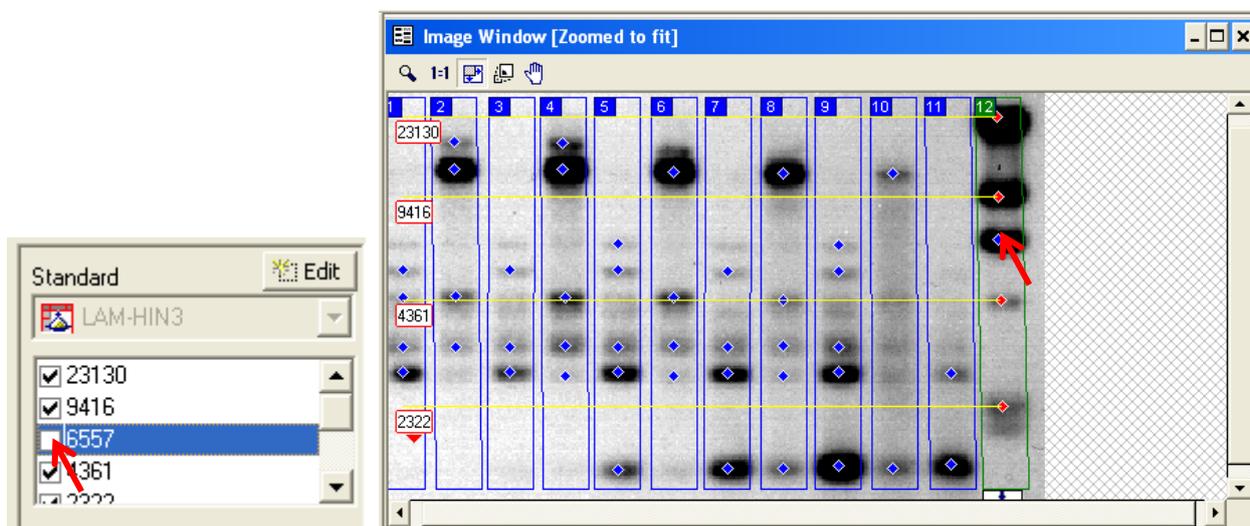
2.9.2 在图像显示窗口中，用鼠标选中 Marker 对应的泳道。



1) 可以通过拖动标准的标示，移动对应大小的标准。



2) 若不需要某个大小的标准，在 Standard 中，将对应的对勾去掉。

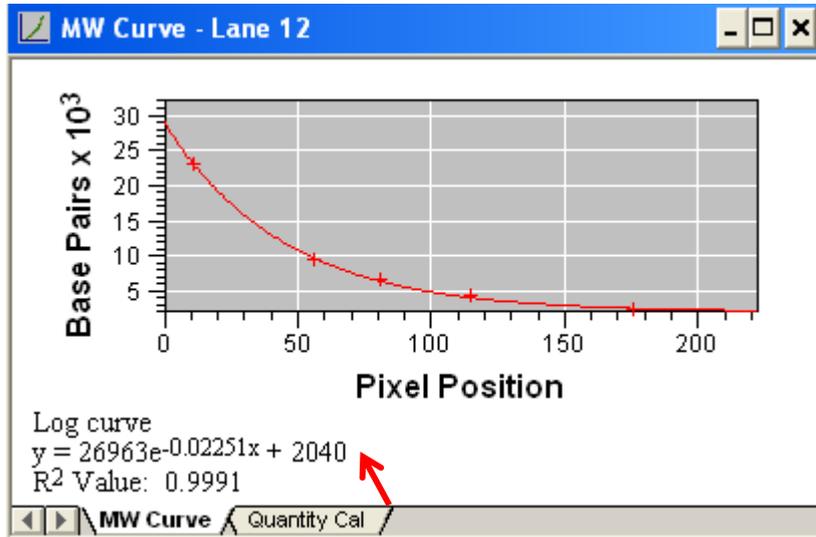


3) 在 Marker 泳道中点击鼠标右键，可以取消选择该泳道作为 Marker。



2.9.3 点击 **Compute**，软件对 Marker 泳道进行标准拟合，并计算其余条带大小。

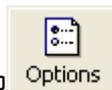
2.9.4 在弹出的 MW curve 窗口中，将出现对应的拟合曲线，观察 R2 大小，大于 0.99，表示拟合良好。



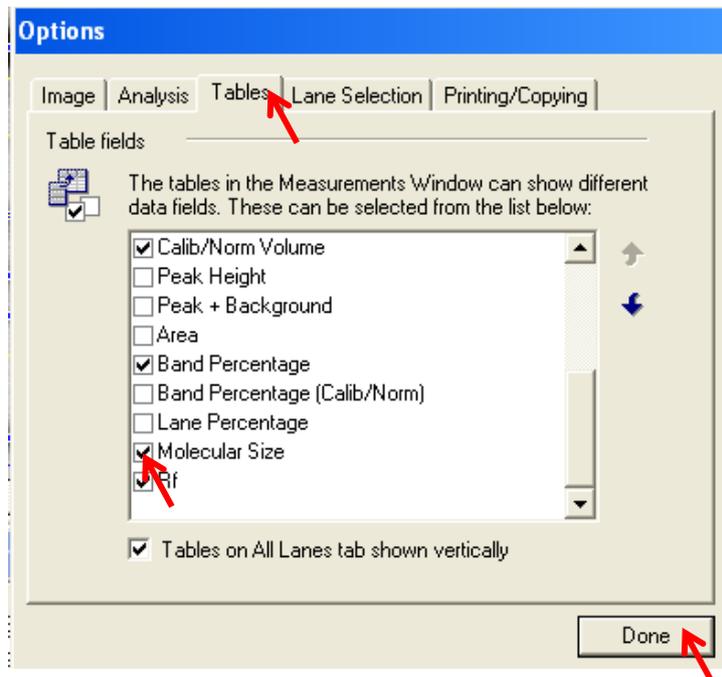
2.9.5 在表格窗口中，Base Pairs/MW/PI 列下显示的即为计算的条带大小。

Band No	Volume	Calib Vol(ug)	Band %	Base Pairs	Rf
1	35604.22	-	35.71	23130.000	0.050
2	24576.38	-	24.65	9416.000	0.252
3	23068.72	-	23.14	6557.000	0.365
4	4228.32	-	4.24	4361.000	0.518
5	12231.00	-	12.27	2322.000	0.793

Selected Lane / All Lanes / Comparison



2.9.6 若表格中无此项，点击快捷工具栏中 **Options**，在 Tables 选项卡中，勾选 Molecular Size。点击 Done。



2.9.7 点击某泳道，可查看该泳道中条带的计算结果。

Band No	Volume	Calib Vol(ug)	Band %	Base Pairs	Rf
1	7368.15	-	11.75	17057.626	0.117
2	36842.35	-	58.75	12754.429	0.185
3	10302.27	-	16.43	4111.591	0.514
4	6958.88	-	11.10	3167.952	0.635
5	1240.50	-	1.98	2792.047	0.716

Selected Lane | All Lanes | Comparison

2.9.8 点击 **All Lanes**，可在表格中查看所有泳道结果。

	Band No	Volume	Calib Vol(ug)	Band %	Base Pairs	Rf
Lane 1	1	2244.94	-	12.52	5009.864	0.441
	2	2761.90	-	15.40	4111.591	0.514
	3	3412.00	-	19.02	3142.837	0.640
	4	9518.29	-	53.06	2844.616	0.703
Lane 2	1	3792.95	-	8.71	17399.487	0.113
	2	29713.55	-	68.25	12754.429	0.185
	3	6669.67	-	15.32	4158.758	0.509
	4	3359.00	-	7.72	3142.837	0.640
Lane 3	1	2010.50	-	14.85	5009.864	0.441

Selected Lane | All Lanes | Comparison

2.9.9 有的条带大小用红色显示，表示该数据是根据拟合曲线，采用外推法计算得到的。

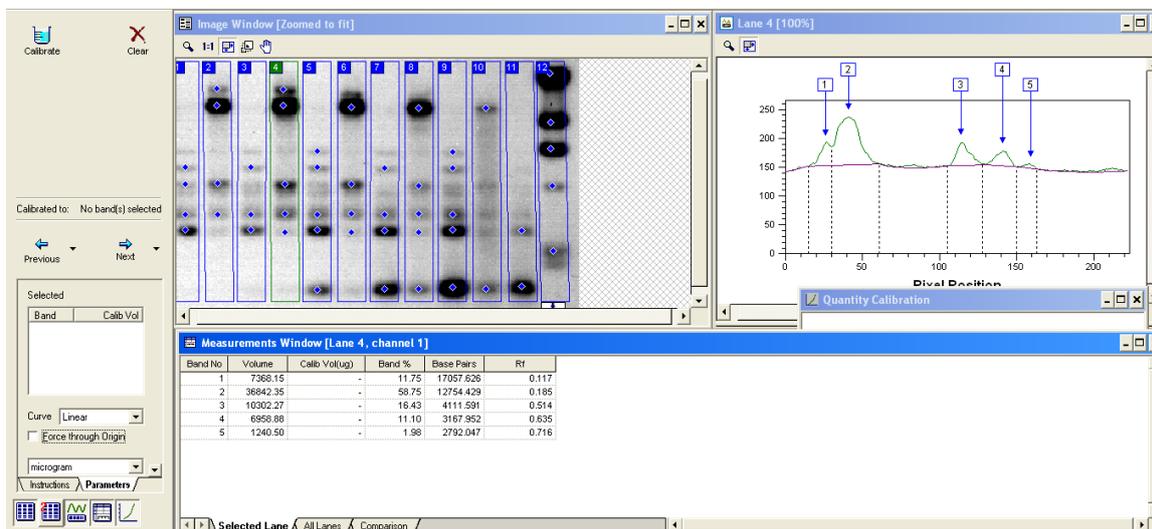
Measurements Window [All Lanes] : channel 1						
	Band No	Volume	Calib Vol(ug)	Band %	Base Pairs	Rf
	2	2903.74	-	7.86	5009.864	0.441
	3	6121.38	-	16.57	3142.837	0.640
	4	15651.85	-	42.37	2844.616	0.703
	5	10061.33	-	27.24	2267.781	0.955



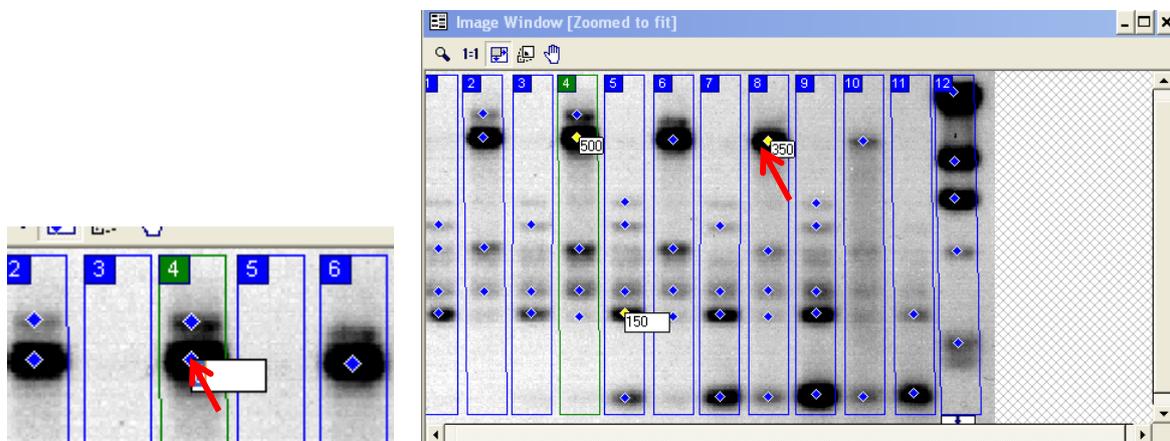
2.9.10 点击  进入下一步含量校正。

2.10 含量校正

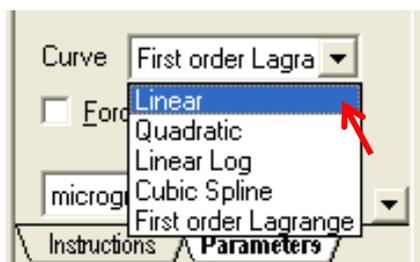
是指已知两个或两个以上条带的含量，并据此做一拟合曲线，根据该曲线计算其余条带的含量。



2.10.1 在图像显示窗口中，用鼠标左键点击已知含量条带，

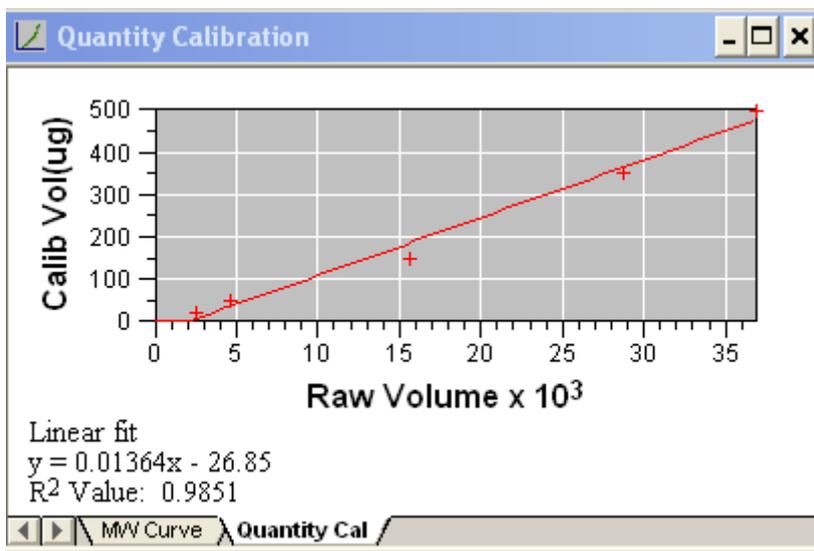


2.10.2 在参数设置栏中选择对应的拟合曲线。



2.10.3 点击 Calibrate。

Quantity Calibration 窗口出现拟合曲线。



2.10.4 表格窗口中 Calib Vol (ug) 列显示对应条带的含量。

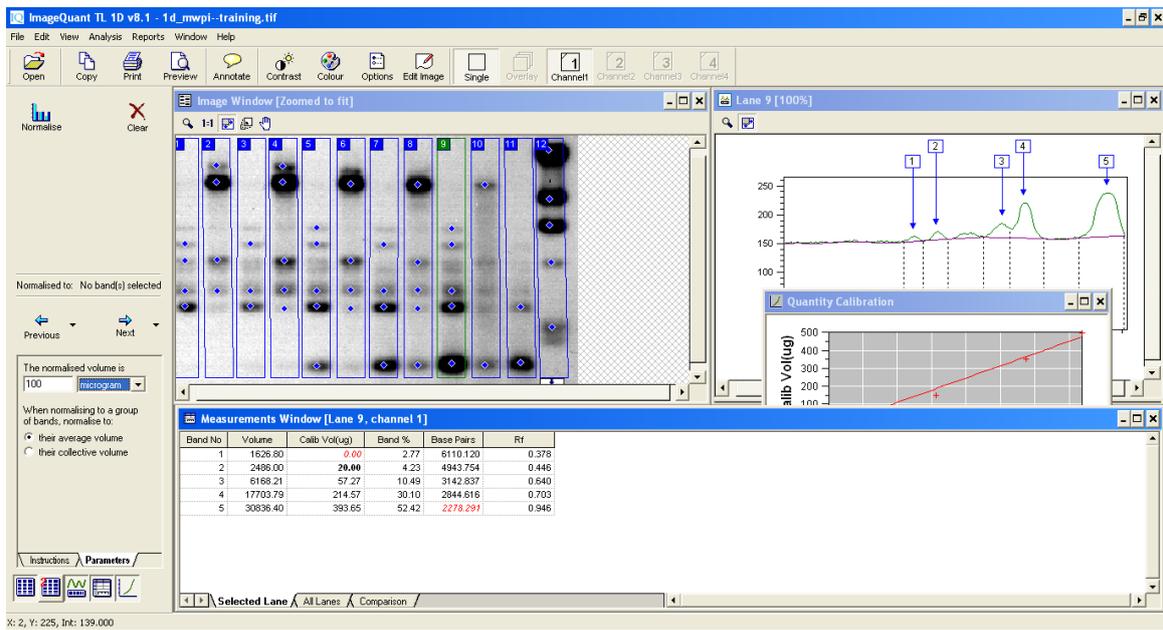
Measurements Window [Lane 9, channel 1]					
Band No	Volume	Calib Vol(ug)	Band %	Base Pairs	Rf
1	1626.80	0.00	2.77	6110.120	0.378
2	2486.00	20.00	4.23	4943.754	0.446
3	6168.21	57.27	10.49	3142.837	0.640
4	17703.79	214.57	30.10	2844.616	0.703
5	30836.40	393.65	52.42	2278.291	0.946

2.10.5 当仅知道其中一个条带的含量，或者需要以某些条带的总量或平均数为标准计算时，则不能采用 Calibrate 含量校正，应采用 Normalise 归一化计算。两种计算方式不能同时进行。

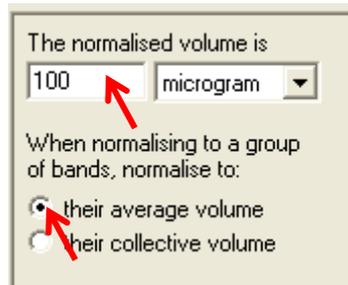


2.10.6 点击 Next 进入下一步归一化计算。

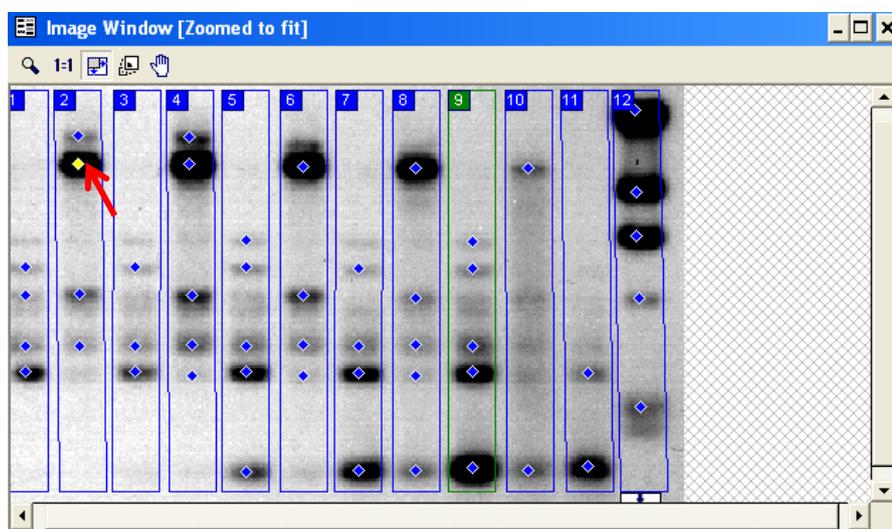
2.11 归一化计算



2.11.1 在 Normalised Volume 中，输入已知条带的含量，或者可以认为某一条带含量为 100%。将选择条带的平均 Volume 作为已知值，或者将选择条带的 Volume 总和作为已知值。



2.11.2 在图像显示窗口中点击对应的条带，选中的条带变为黄色图标。



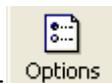


2.11.3 点击 **Normalise** 按钮，表格窗口中 Norm Vol (ug) 显示，以指定条带含量为标准，计算的所有条带含量。

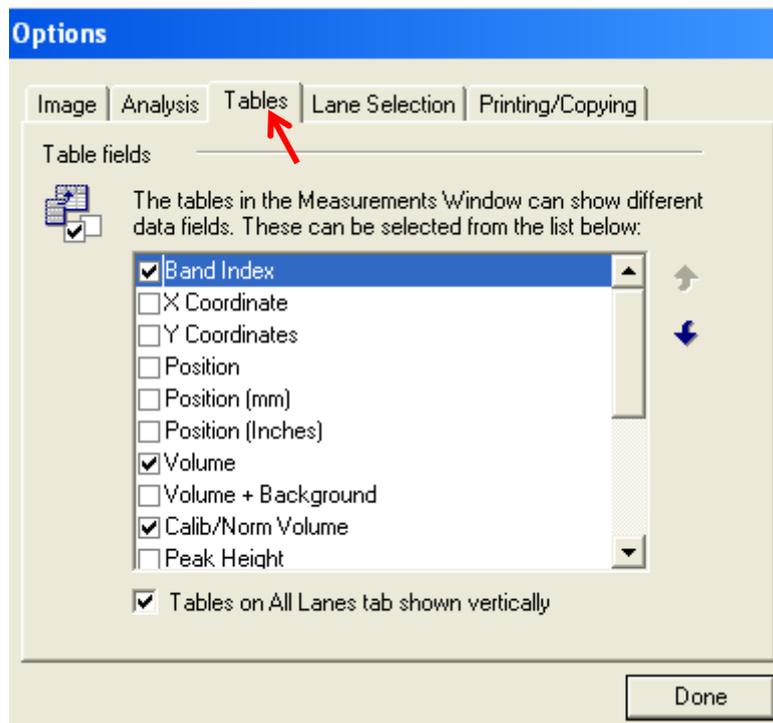
Band No	Volume	Norm Vol(ug)	Band %	Base Pairs	Rf
1	1626.80	5.47	2.77	6110.120	0.378
2	2486.00	8.37	4.23	4943.754	0.446
3	6168.21	20.76	10.49	3142.837	0.640
4	17703.79	59.58	30.10	2844.616	0.703
5	30836.40	103.78	52.42	2278.291	0.946

2.12 表格信息

表格窗口除了显示以上信息外，还可显示更多信息。



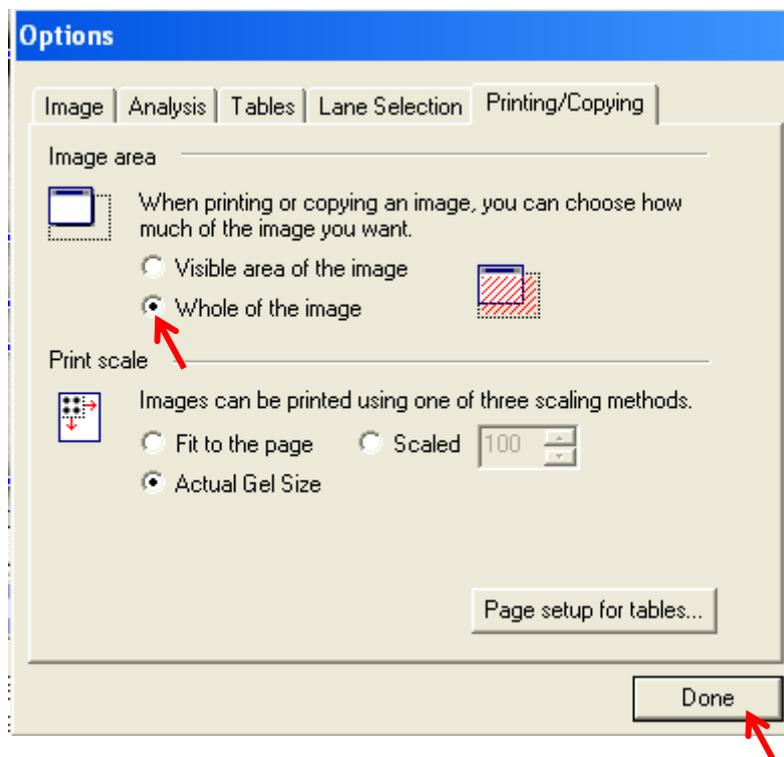
在快捷工具栏中点击 **Options** 按钮，选择 Tables 选项卡。



Band index	条带序号
X coordinate	该条带波峰的 X 坐标
Y coordinates	该条带波峰的 Y 坐标
Position	该条带波峰与泳道起始处的像素距离
Position (mm)	该条带波峰与泳道起始处的毫米距离
Position (Inches)	该条带波峰与泳道起始处的英寸距离
Volume	条带的含量
Volume + background	条带和背景含量总和
Calib/Norm Volume	含量校正或归一化计算后的条带含量
Peak height	该条带的最大值
Peak + background	该条带包括背景在内的最大值
Area	像素数量
Band percentage	同一泳道中该条带含量占有所有条带含量百分比
Band percentage (Calib/Norm)	同一泳道中, 该条带含量校正或归一化计算后, 含量占有所有条带百分比
Lane percentage	该条带体积占该泳道所有体积的百分比
Molecular size	分子量/碱基对/等电点大小
Rf	相对迁移率

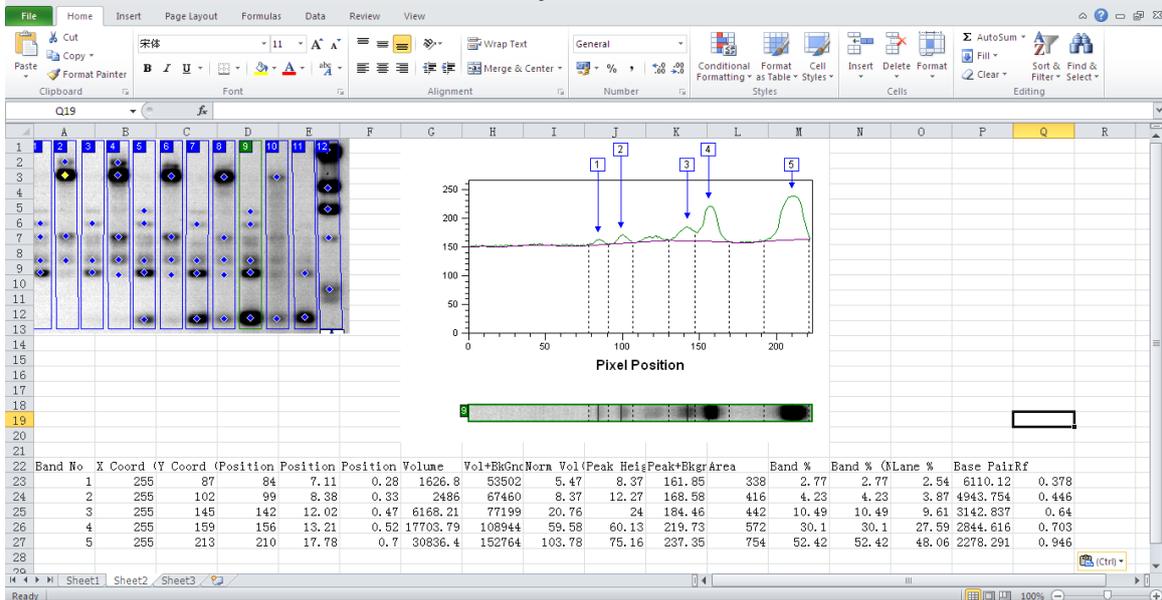
2.13 数据输出

2.13.1 在 Options 中, 选择 Printing/Copying 选项卡, 在 Image Area 中, 选择 Whole Of The Image。点击 Done。

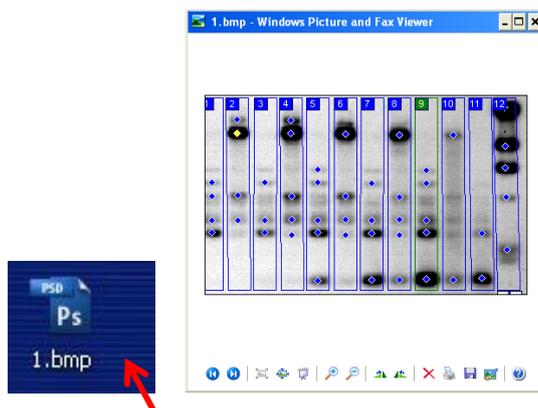
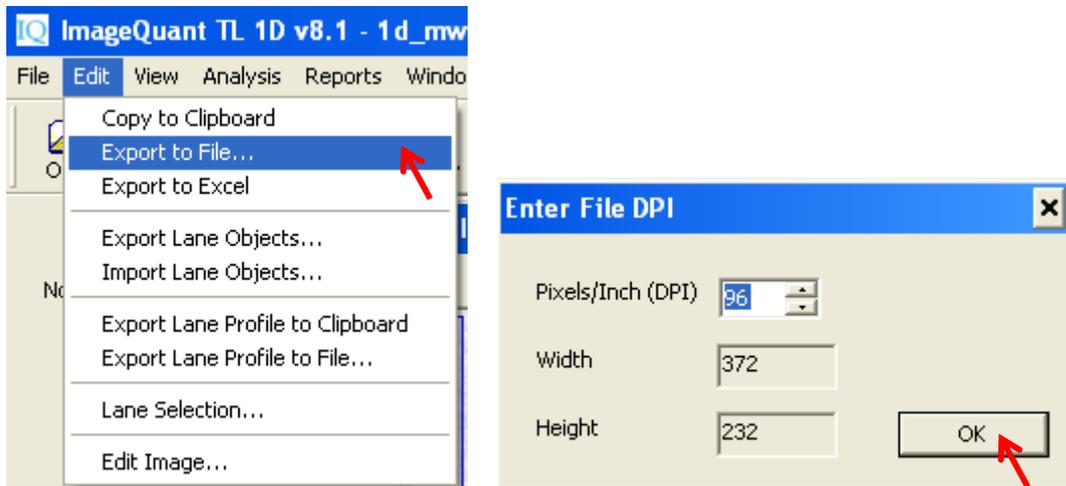




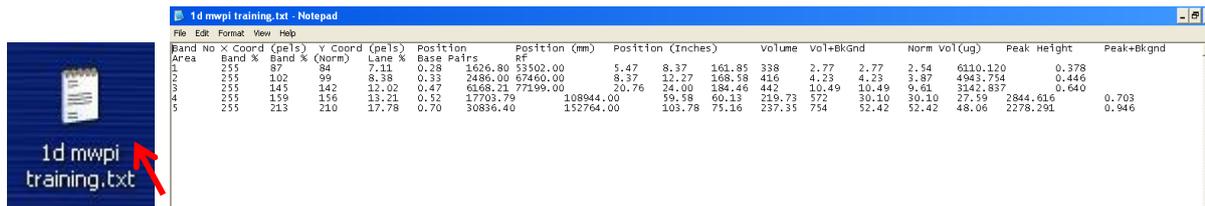
2.13.2 所有窗口的数据都可以通过快捷工具栏中  按钮，复制到剪切板上，再粘贴到其它文档程序中。



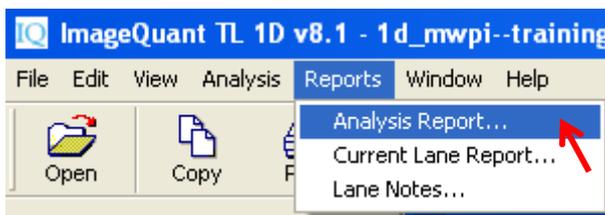
2.13.3 也可以将图像通过 Edit--Export to File 导出.bmp 文件。导出前，可对图像的分辨率（DPI）值进行调整，点击 OK，选择保存路径，保存图像。



2.13.4 表格通过 Export to File 将导出为.txt 文件。



2.13.5 可以在 Report 中选择导出 pdf 分析报告。



QTL Report version 8.1
Time of Report: 10:05 2013-5-23 (China Standard Time)

ImageQuant TL

Analysis Report: 1d_mwpi--training.tif

Lane Table

Lane	Band	Band Volume	Lang Volume
Lane 1	4	17927.13	23348.23
Lane 2	4	43323.17	43818.90
Lane 3	3	15941.28	21891.21
Lane 4	3	32142.74	31477.81
Lane 5	3	38942.38	42818.30
Lane 6	4	34897.36	31028.71
Lane 7	4	29174.13	45816.30
Lane 8	3	44344.12	43822.30
Lane 9	3	38927.26	34168.99
Lane 10	3	42614.56	21011.22
Lane 11	2	23456.29	20447.17
Lane 12	3	36763.63	32184.14

Page 1 of 22

QTL Report version 8.1
Time of Report: 10:05 2013-5-23 (China Standard Time)

ImageQuant TL

Lane Data Report: 1d_mwpi--training.tif, Lane 1

Summary

Name: Lane 1
General Notes: 123

Background

Background Type: Rolling Ball
Rolling Ball Radius: 45

Sand Detection

Automatic Detection: Yes
Minimum Sand Slope: 179
Median Filter: 4
Percentage Maximum Peak: 0
Maximum Peak Measure: Lane
Edge Detection Method: Automatic Edges
Sand Positions Edited: No

Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Position (Inches)	Volume	Volume
1	87	84	7.11	1626.80	53502.00	5.47	8.37
2	102	99	8.38	2486.00	67460.00	8.37	12.27
3	145	142	12.02	6368.11	177499.00	20.76	24.00
4	159	156	13.21	17703.79	108944.00	59.58	60.13

Band No	Band Volume	Peak Height	Peak Width	Area	Band %	Band Volume	Lane %
1	7.08	13.02	108.85	384	12.918	12.918	9.813
2	9.35	33.44	158.20	520	15.219	15.219	11.622
3	11.44	18.44	337.26	488	19.022	19.022	14.314
4	32.03	42.27	103.21	488	52.963	52.963	40.253

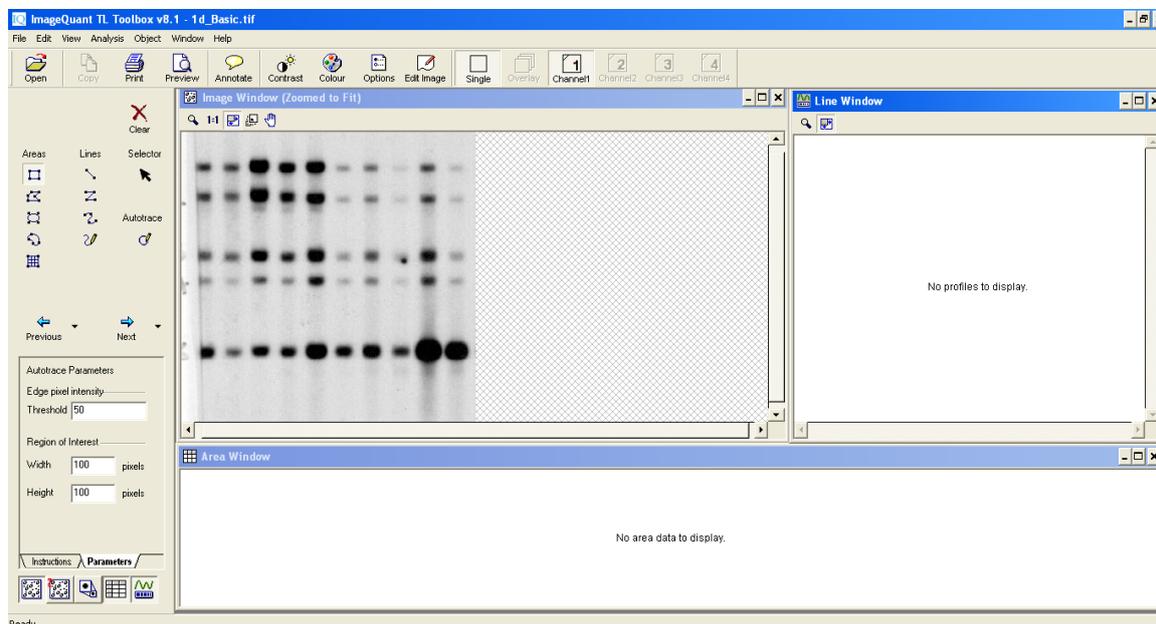
Band No	Band Area	Rf
1	500.894	0.441

Page 2 of 22

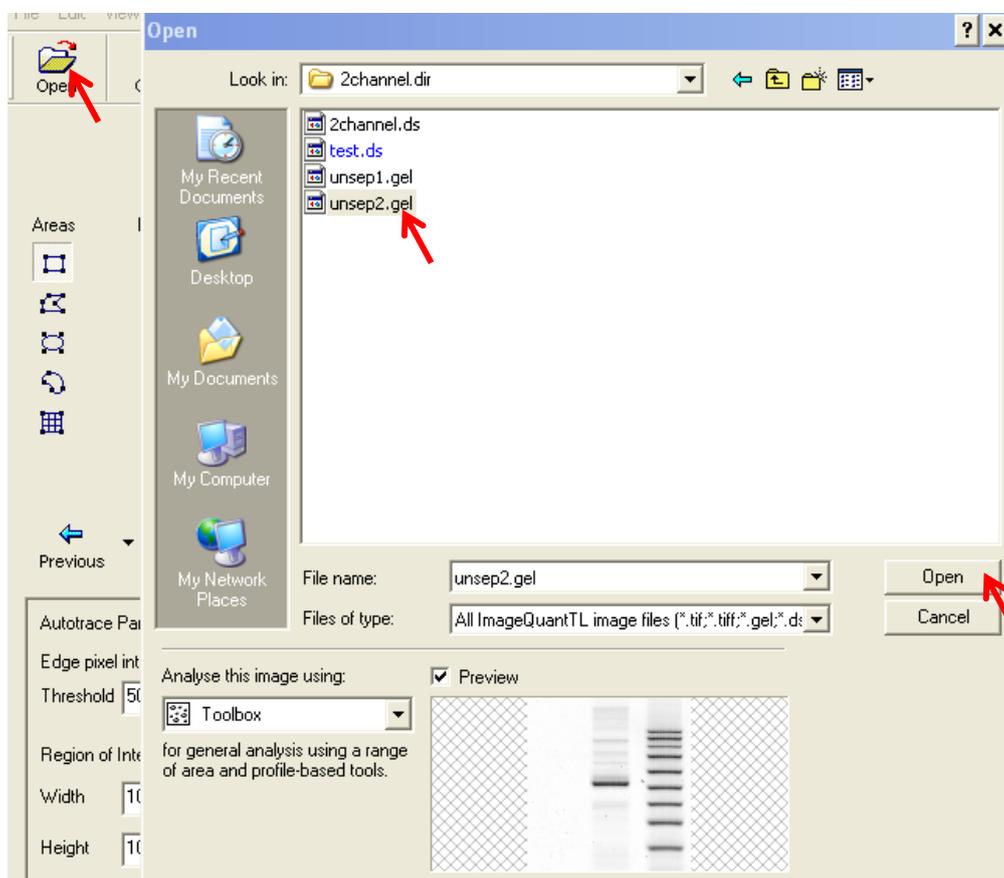
3) 分析工具箱



Analysis Toolbox
Analyze images using area and profile-based tools

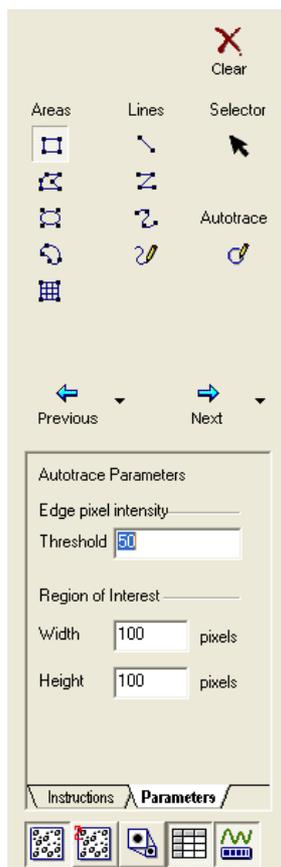


点击快捷工具栏 open，选择需要分析的图片，点击 open，打开。



在【分析工具箱】中分析有两个步骤，【定义形状】和【背景消减】

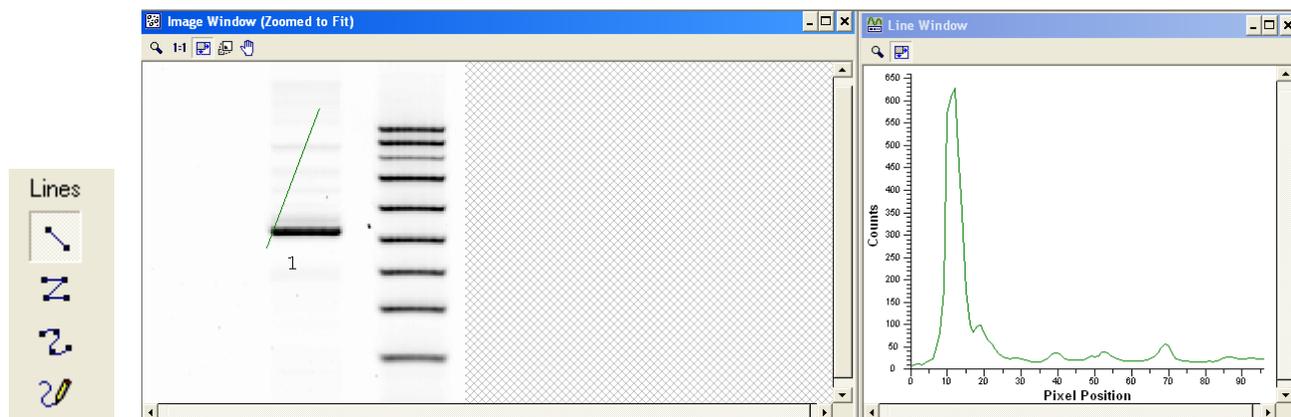
3.1 定义形状



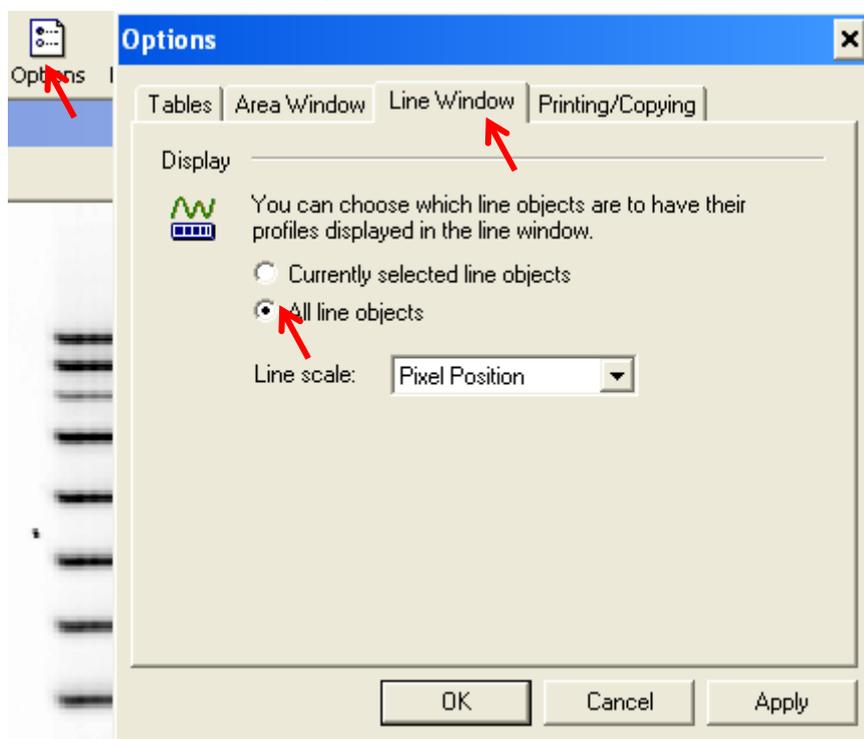
3.1.1 点击 Areas 栏中任意一项，可在图像窗口中用鼠标选取分析区域，在表格窗口中可以看到对该区的信
息。

	Name	Volume	Median Inte...	Average Int...	Mode Intens..	Min Intensity	Max Intensity
1	1	337313.84	60.73	126.81	11.65	7.92	844.60
2	2	274622.80	14.41	97.66	8.75	7.42	1106.82

3.1.2 点击 Lines 栏中任一工具，可在图像窗口中划线，这时在右侧峰型图窗口中将显示该路径的灰度峰图。



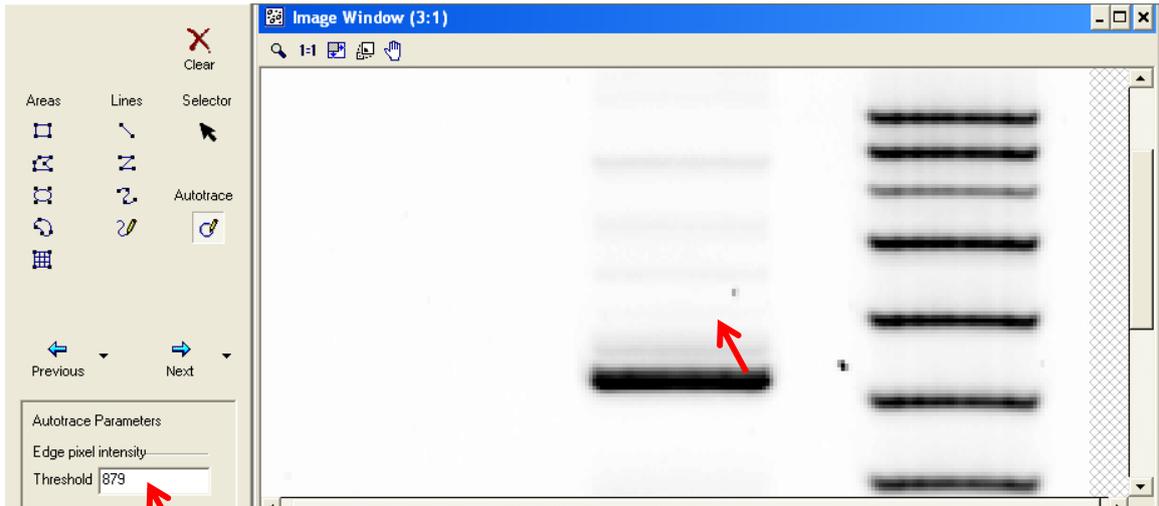
当有多条路径时，可以从快捷工具栏中的 Option 是中选择是否叠加图像观察。



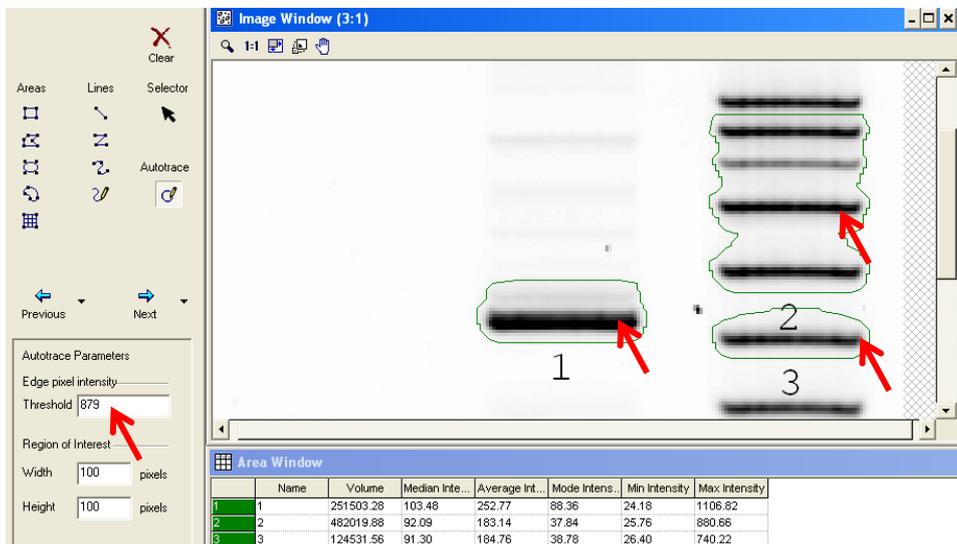
3.1.3 自动选取条带或点



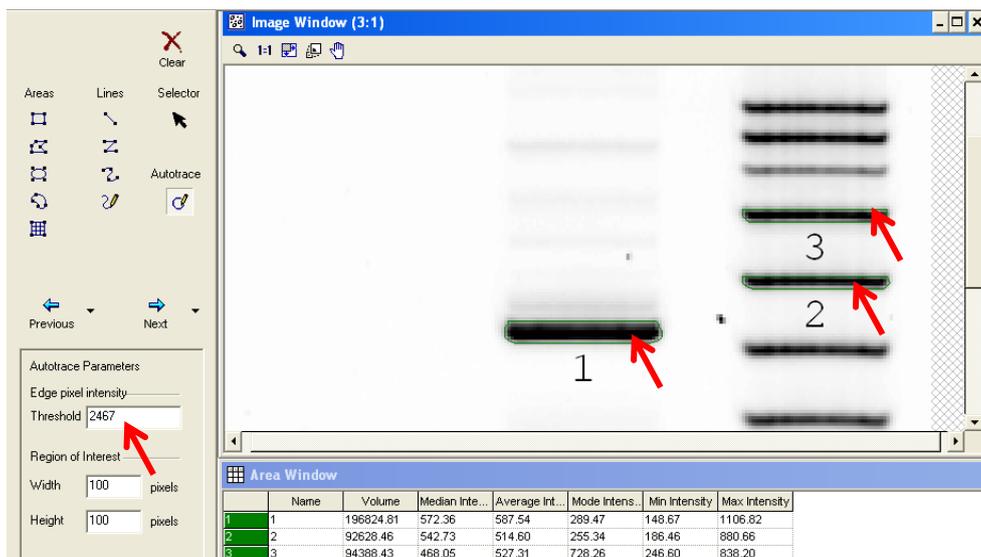
- 1) 点击
- 2) 在图像窗口中，用鼠标右键选择作为背景与信号值区分的点，选择该点后，其 Threshold 值将自动显示在 Threshold 栏中。



3) 在图像窗口中，用鼠标左键点击感兴趣位置，软件将自动以设置的 Threshold 值作为边缘，选取信号范围。



4) 当 Threshold 值较大时



3.2 背景消减 可点击 next 进入，选取一定区域作为背景进行消减，要求背景比较均一。

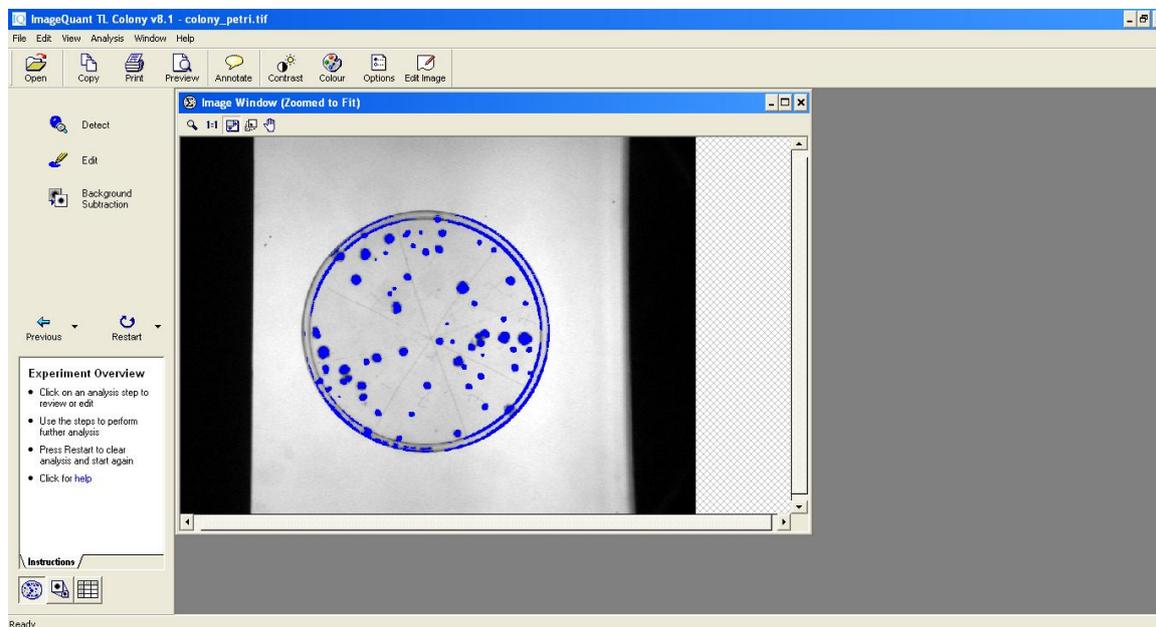
4) 克隆计数

点击 colony counting

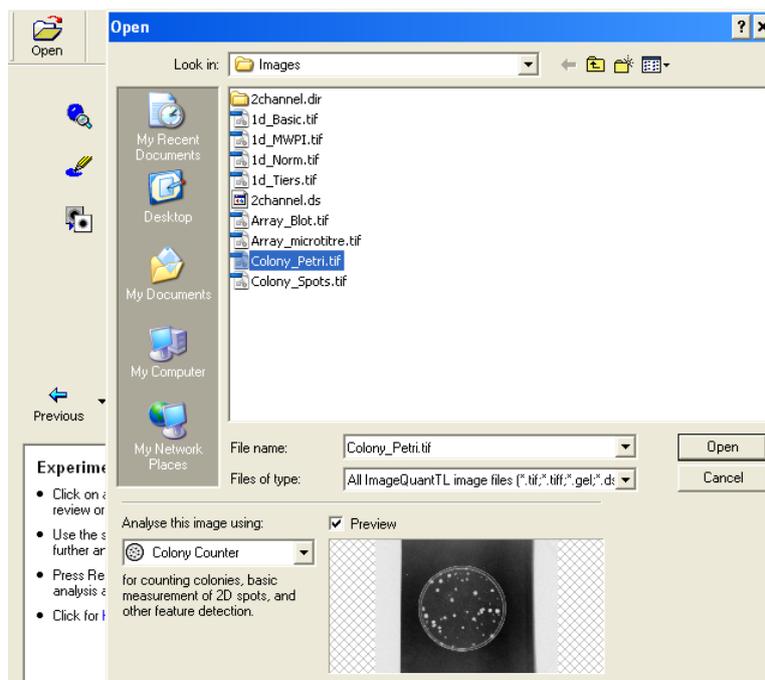


Colony Counting

Count colonies or detect 2D electrophoresis spots

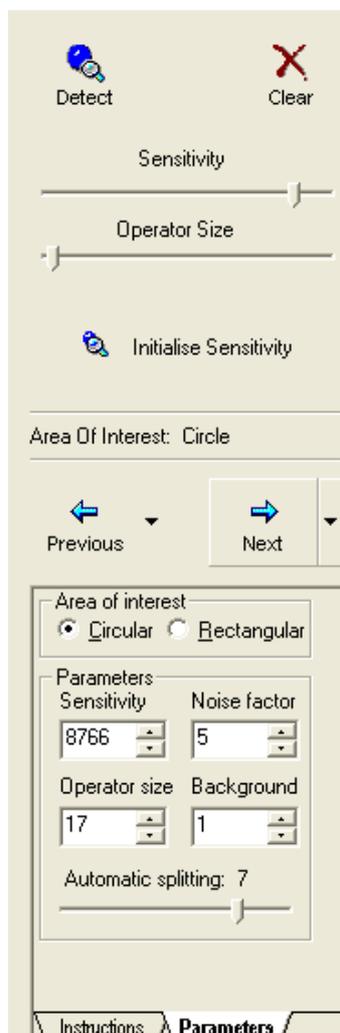


点击快捷工具栏中 open 按钮，选择需要分析的图片，点击 open



菌落计数一般包括检测点【Detect】、点编辑【Edit】和背景消减【Background Subtraction】三个步骤。

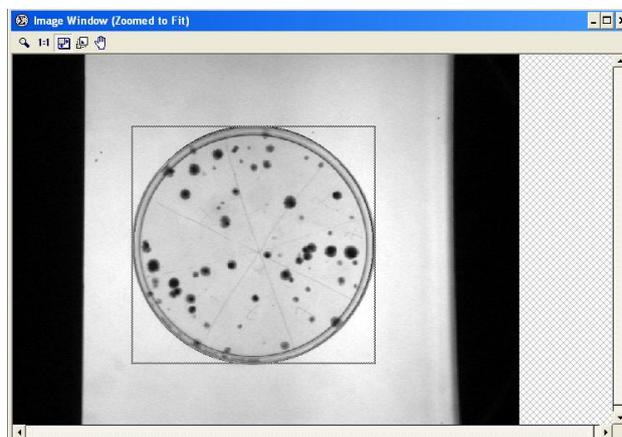
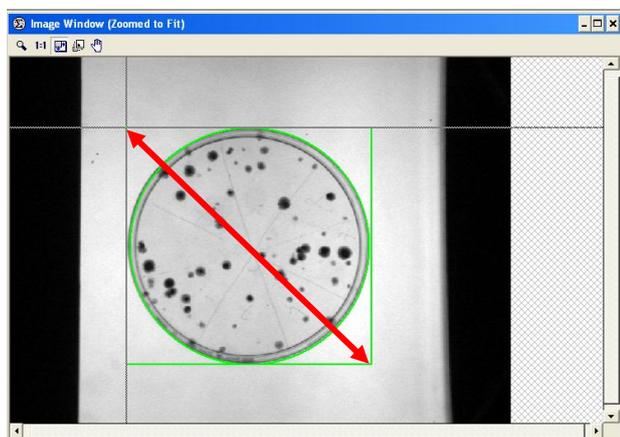
4.1 检测点



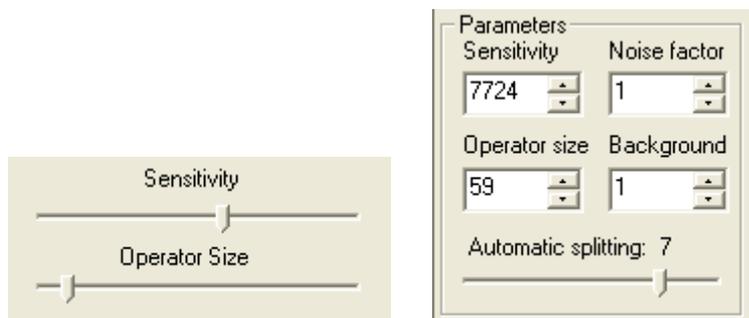
4.1.1 可在参数设置栏中选择检测区域为圆形（菌落计数）或矩形（一般性的点计数操作，如双向电泳凝胶上蛋白点的计数。然而，IQTL 只是简单的数点功能，不能作为双向电泳分析的软件，要进行双向电泳结果的分析，请使用 ImageMaster 2D Platinum 软件。）



4.1.2 在图像窗口中，用鼠标划出需要计数的区域

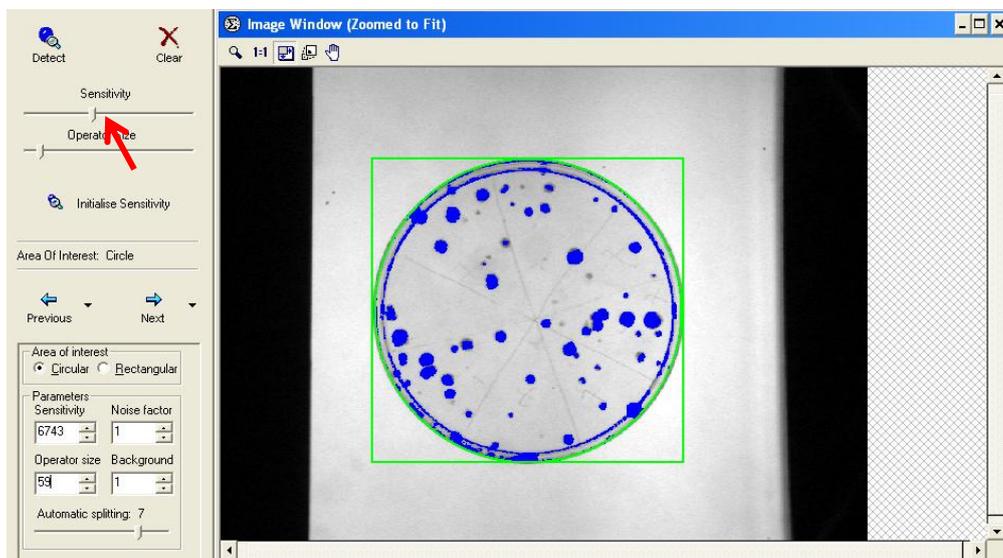
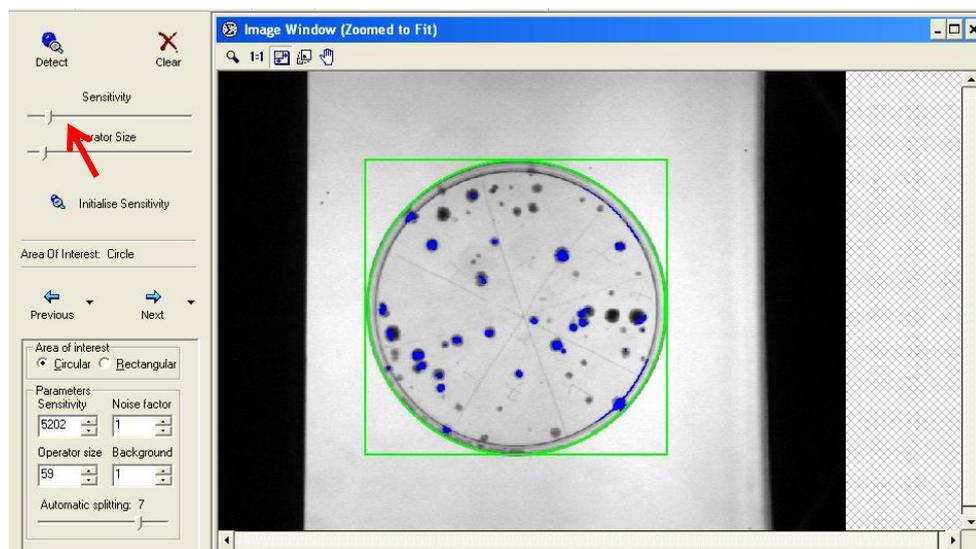


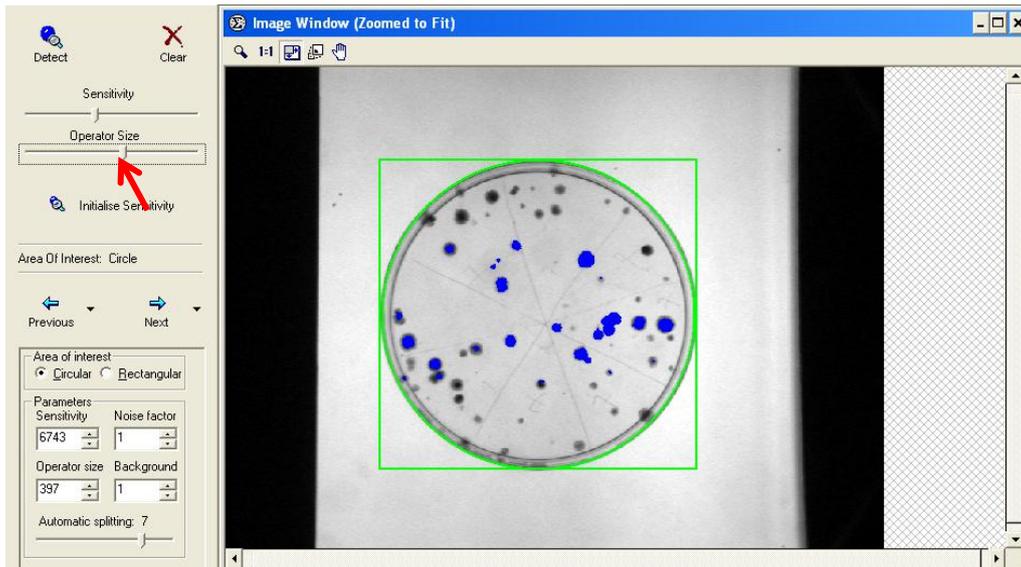
4.1.3 拖动鼠标选中需要分析的区域，软件会自动根据【Sensitivity】和【Operation Size】等设置参数进行菌落的检测，也可以通过调节【Sensitivity】和【Operation Size】下面的滑动块来修改找点的结果。



两处的 sensitivity 和 operator size 为联动。

- 1) 其中 sensitivity 数值越大，能够检测到越弱的点，检测到的点也越多，点击  Initialise Sensitivity 可以自动调整 sensitivity 数值。
- 2) 其中 operator size 数值越大，能够检测到越大的点，检测到的点越少





4.1.4 自动分离位置重叠的点



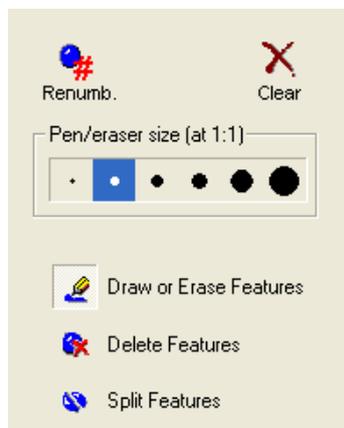
4.1.5 设置好所有参数后，点击 **Detect**，检测点。同时表格窗口中显示检测结果，可以查看菌落的坐标【Coords】、【Volume】、【Vol + BkGnd】、【Area】等信息

Measurements Window (70 colonies)							
This image contains 70 colonies.							
Colony Number	Coords	Volume	Vol + BkGnd	Background	Area	Average Intensity	Circularity
1	(357, 162)	575431.00	575431.00	.00	4032	142.72	.03
2	(407, 120)	1167.00	1167.00	.00	9	129.67	.00
3	(439, 125)	2143.00	2143.00	.00	14	153.07	.12
4	(473, 144)	18471.00	18471.00	.00	128	144.30	.04
5	(342, 147)	14639.00	14639.00	.00	88	166.35	.71
6	(396, 146)	17220.00	17220.00	.00	109	157.98	.85
7	(363, 145)	2148.00	2148.00	.00	15	143.20	.63



4.1.6 完成检测点后，点击 **Next**，进入点编辑，可对检测的点进行添加，分离等操作。

4.2 点编辑

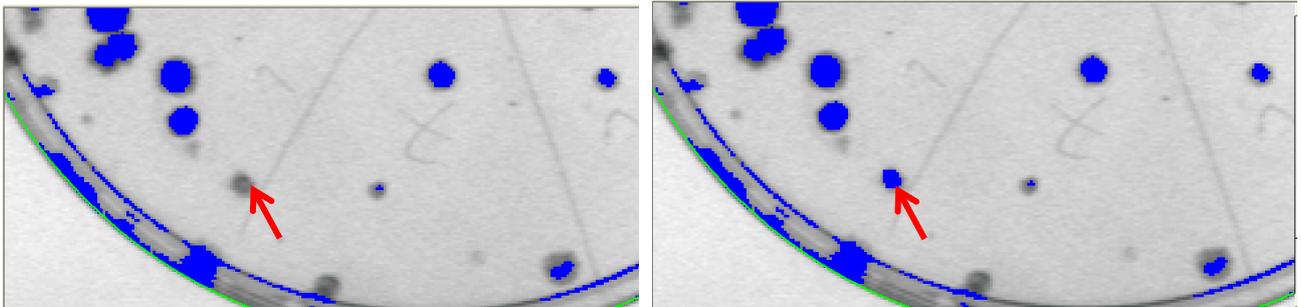


4.2.1 添加

1) 选择画笔大小

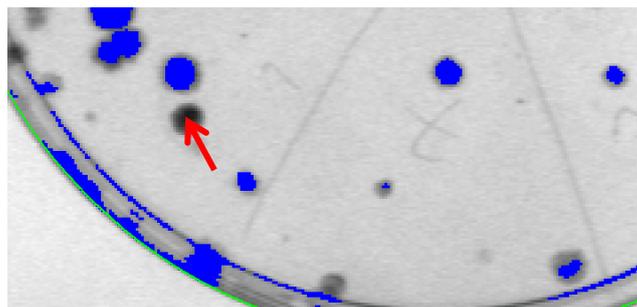


2) 点击  Draw or Erase Features，在图像窗口中画取需要添加的点。可点窗口工具栏中的 ，将图像放大。



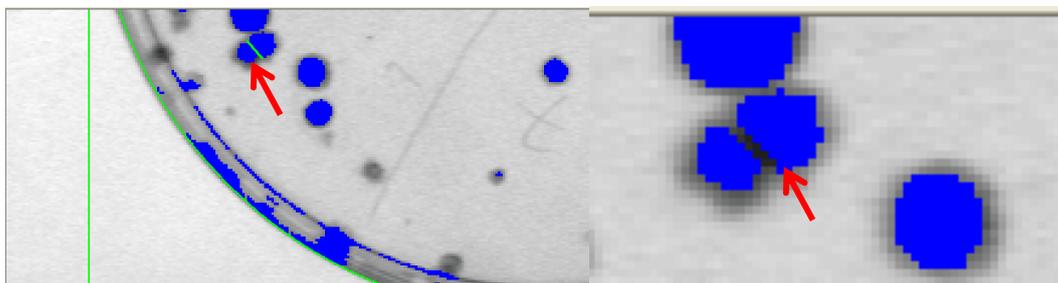
4.2.2 删除点

1) 点击  Delete Features，在图像窗口中选中需要删除的点，点击鼠标左键删除。

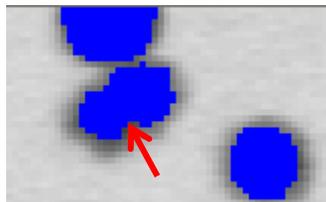


4.2.3 点的分离和恢复

1) 点击  Split Features，在图像窗口中选中需要分离的点，点击鼠标左键画线进行分离。



2) 点击  Draw or Erase Features，可对分离的点进行恢复，在图像窗口中擦去分离线。

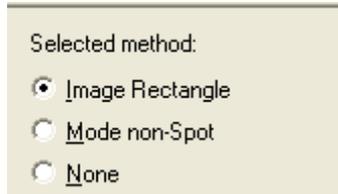




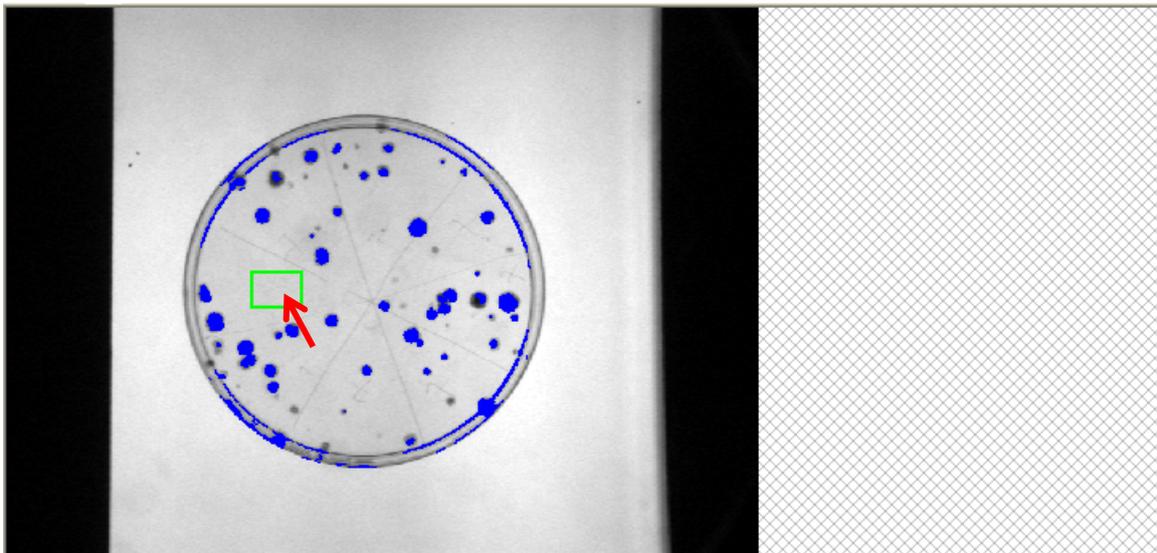
4.2.4 修改完成后，点击 **Next**，进入背景消减。

4.3 背景消减

背景消减有两种模式可供选择。



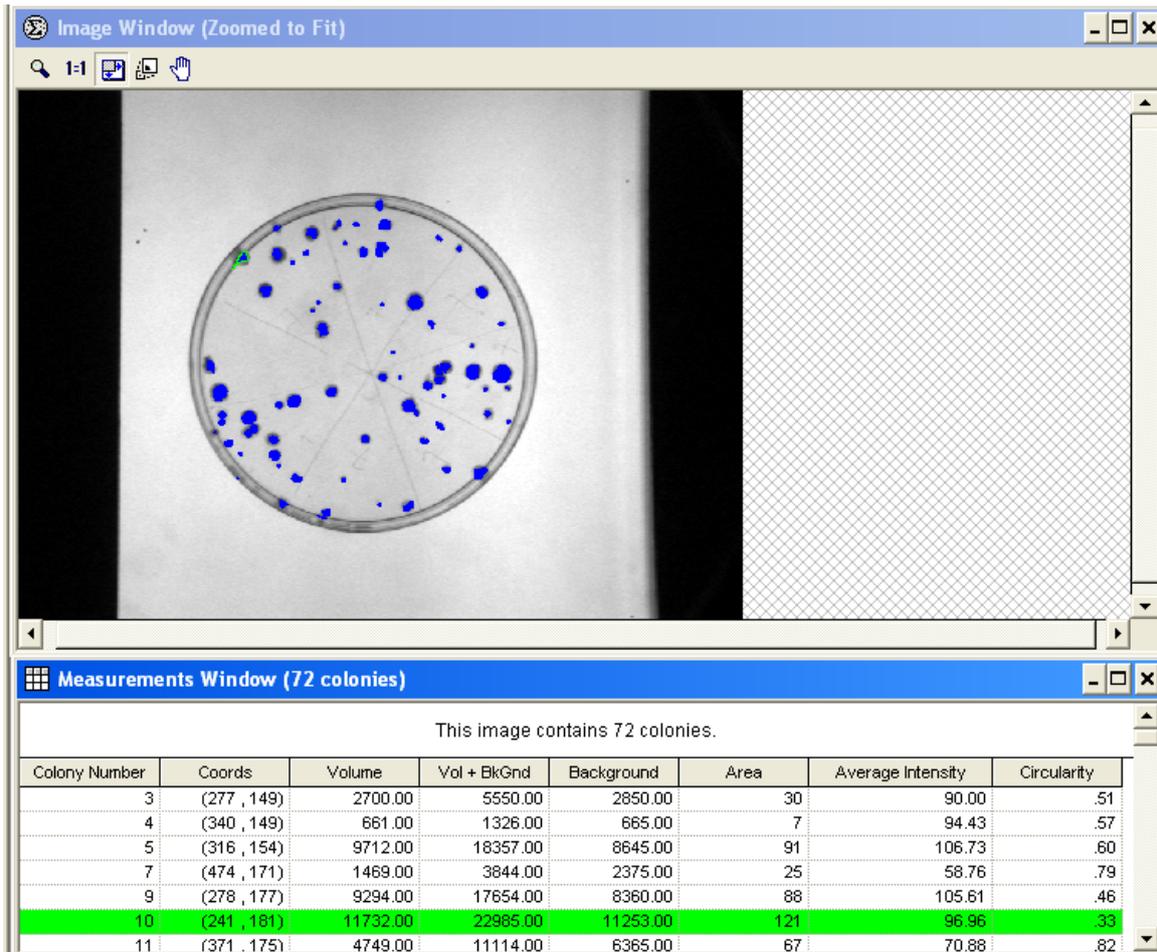
4.3.1 **Image Rectangle** 选中一矩形区域，以该区域的平均灰度值作为背景值被消减。



Colony Number	Coords	Volume	Vol + BkGnd	Background	Area	Average Intensity	Circularity
1	(403, 127)	822.67	1648.00	825.13	9	91.43	.00
2	(309, 135)	6064.59	12849.00	6784.41	74	81.95	.03
3	(475, 145)	3141.21	8092.00	4950.79	54	58.17	.02
4	(396, 146)	3881.62	8374.00	4492.38	49	79.22	.88
5	(342, 147)	4433.25	9109.00	4675.75	51	86.93	.64
6	(458, 150)	13412.60	30557.00	17144.40	187	71.73	.03
7	(316, 155)	12022.02	22382.00	10359.98	113	106.39	.63

4.3.2 **Mode non-Spot** 在 **Margin:** 设置矩形像素框的范围，在该范围内选取最低像素值作为 background。

重新计算的值将在表格中实时更新。



5) Array analysis

适用于对斑点进行定量分析，如斑点杂交，蛋白芯片等。

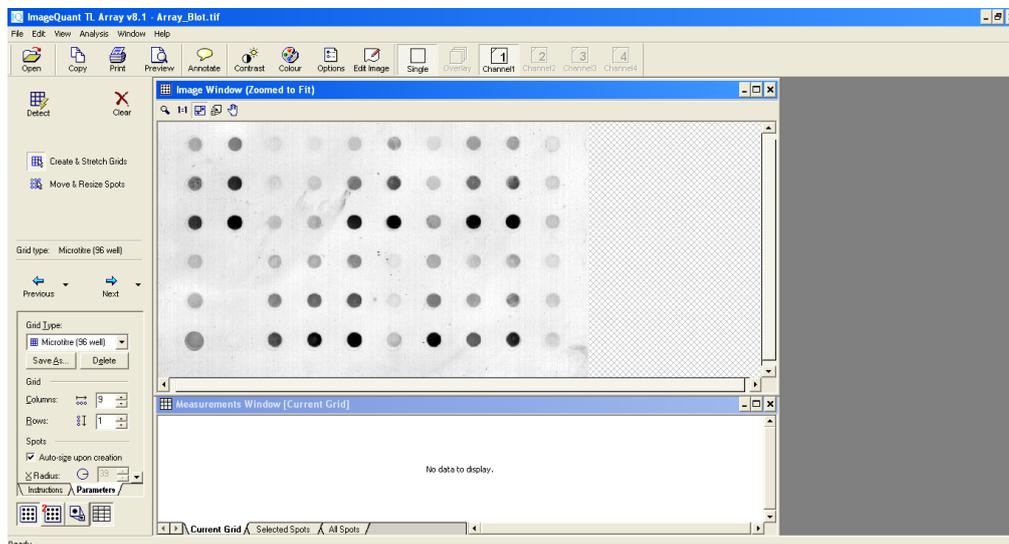


Array analysis

Analyze dot/slot blots, microplates or macroarrays

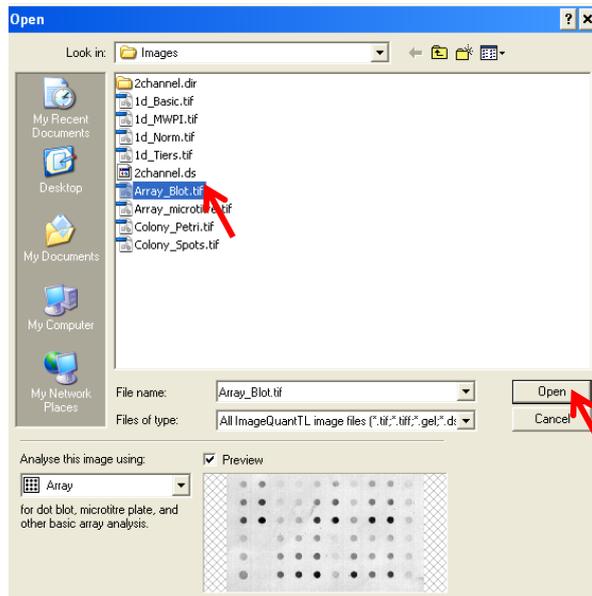
点击

，弹出 Array Analysis 窗口。



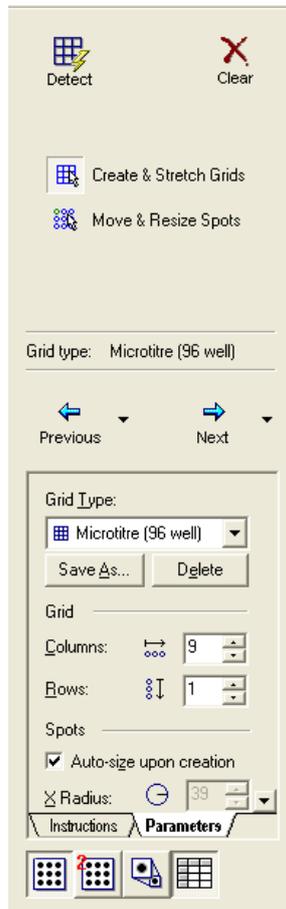


点击  按钮，选择需要分析的图像，点击 Open 打开。



阵列分析一般包括点定义【Spot Definition】、消减背景【BackgroundSubtraction】、含量归一化【Normalisation】和存在性判别【PresenceFlagging】四个步骤。

5.1 点定义

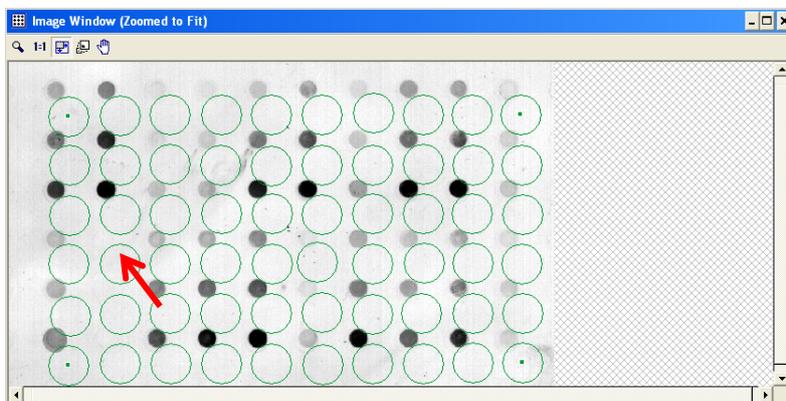


5.1.6 也可手动在图像窗口中圈出点阵。

1) 移动点阵



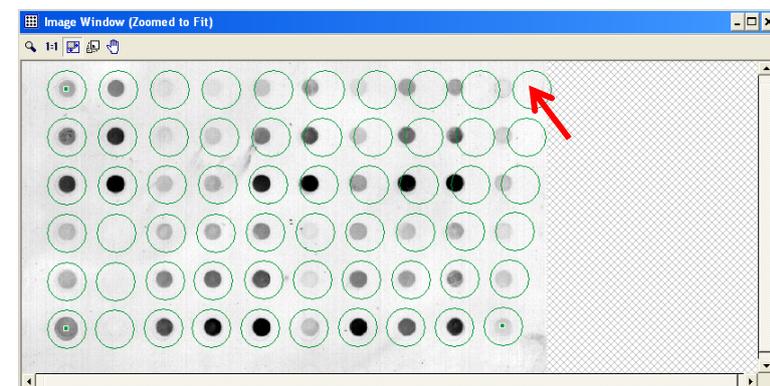
在参数设置栏中选择  ， 在图像窗口中，用鼠标指向任一点，鼠标变为表格模式，则可点击左键移动点阵



2) 弯曲点阵



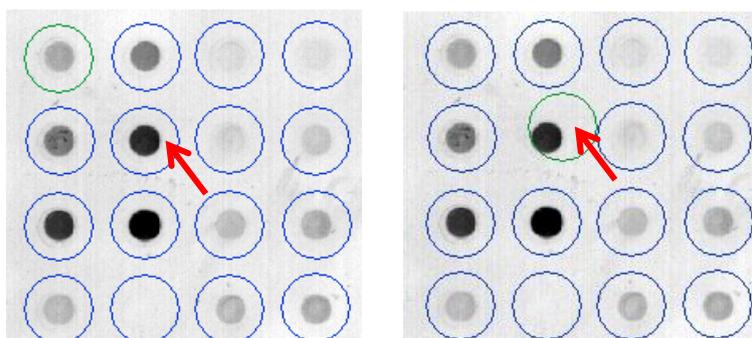
在参数设置栏中选择  ， 在图像窗口中，用鼠标指向点阵 4 个角上的点中心绿色方形，鼠标变为  ，则可点击左键拖动，是点阵弯曲。



3) 移动单个点



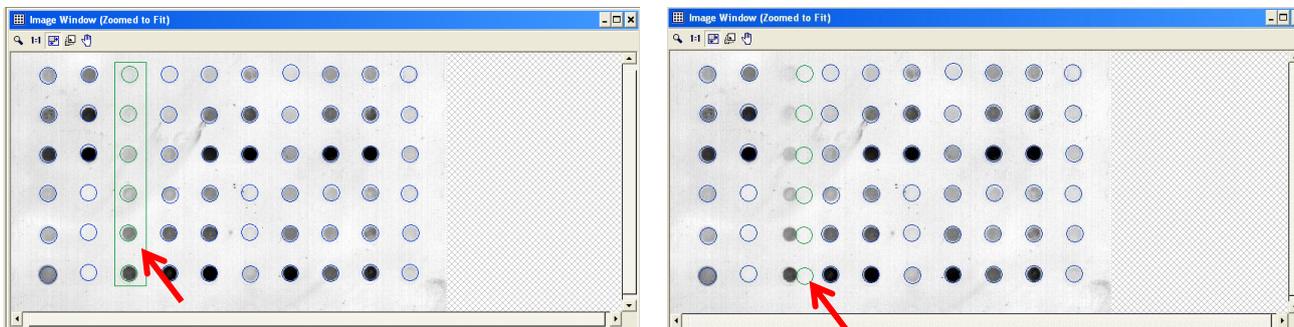
在参数设置栏中选择  ， 在图像窗口中，用鼠标选中需要移动的点，鼠标变为圆圈，点击左键拖动。



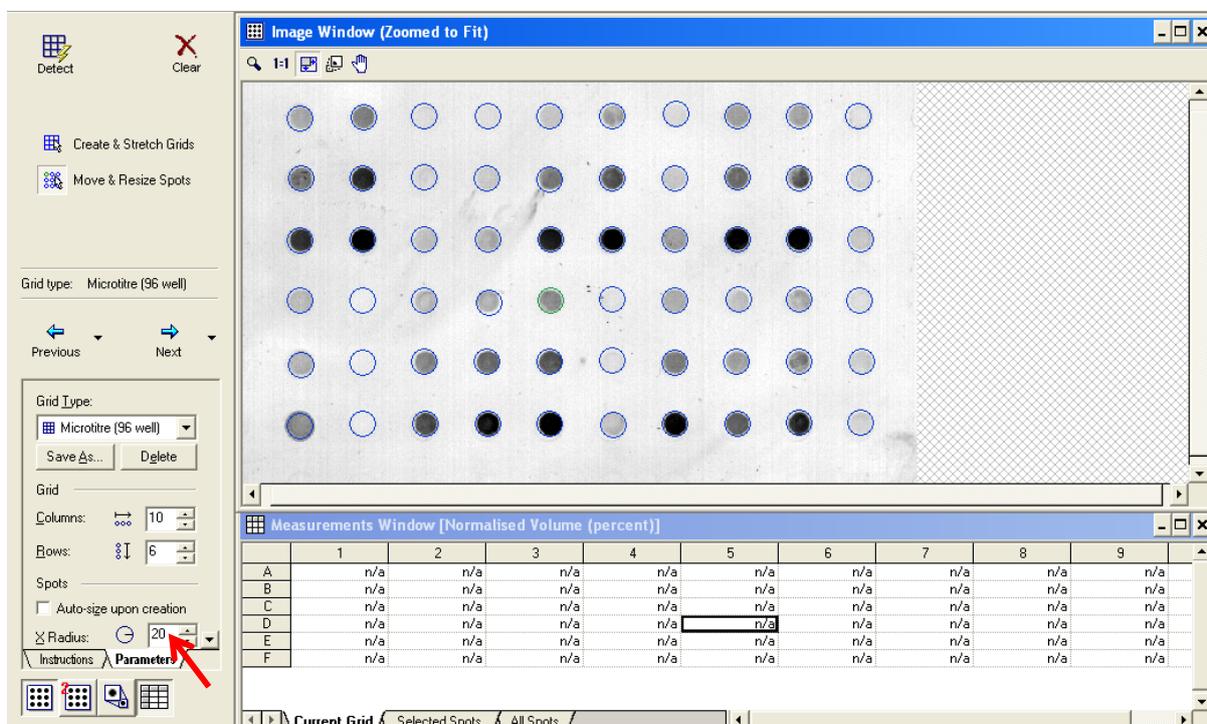
4) 移动多个点



在参数设置栏中选择 **Move & Resize Spots**，可在图像窗口中，用鼠标圈出几行或几列需要移动的点，这些点变为绿色，可点击鼠标左键拖动。

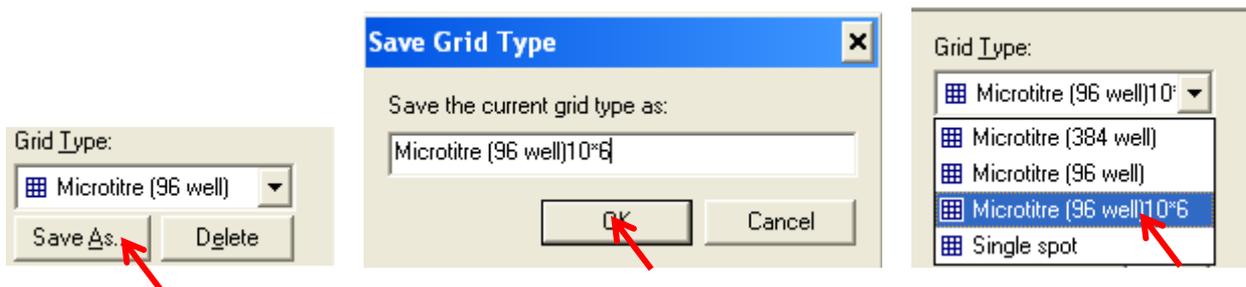


5.1.7 可在 Spots 中修改 X Radius 大小。点的大小会随着参数做相应改变。



5.1.8 保存调整后的点阵模板

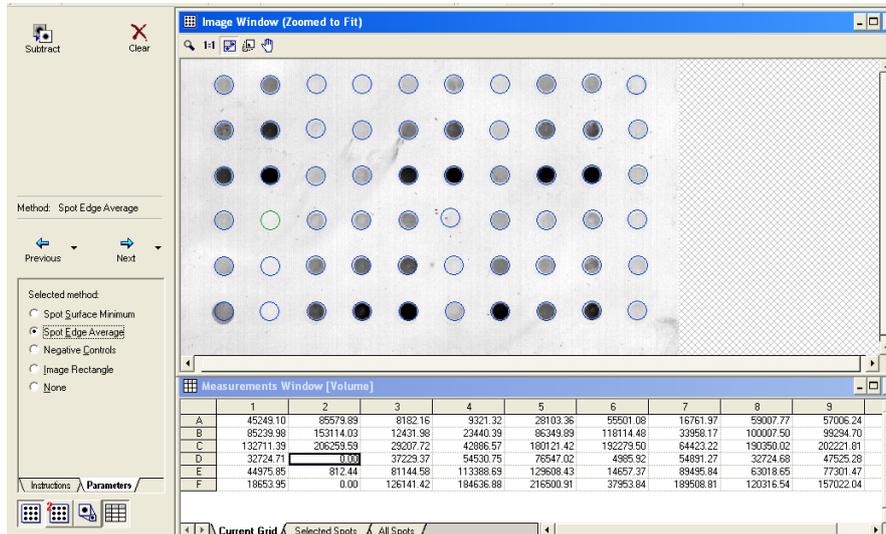
点击 **Save As**，输入新的名字，点击 **Ok** 保存，以后可直接在 **Grid Type** 中选择调用。





5.1.9 检测好点阵后，点击

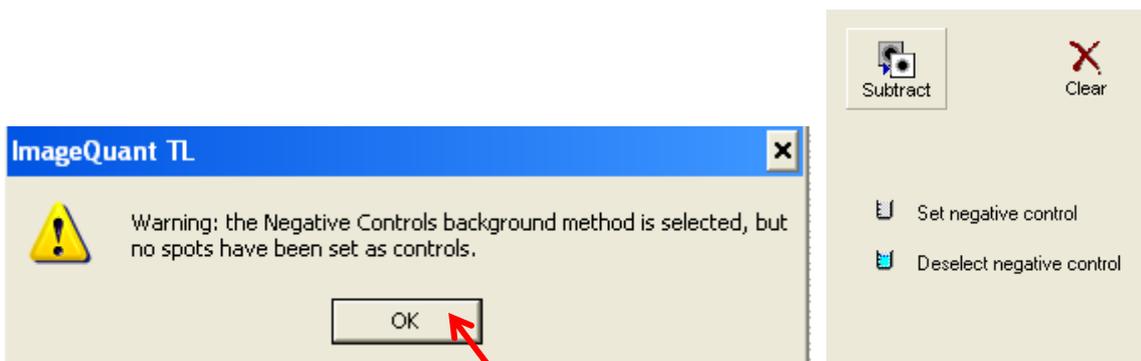
5.2 消减背景



5.2.1 IQTL 提供了 5 种消减背景的算法，在绝大多数情况下，我们在实验中都设立了阴性对照，因此，利用阴性对照【Negative Controls】算法进行背景消减是最为常用的做法；



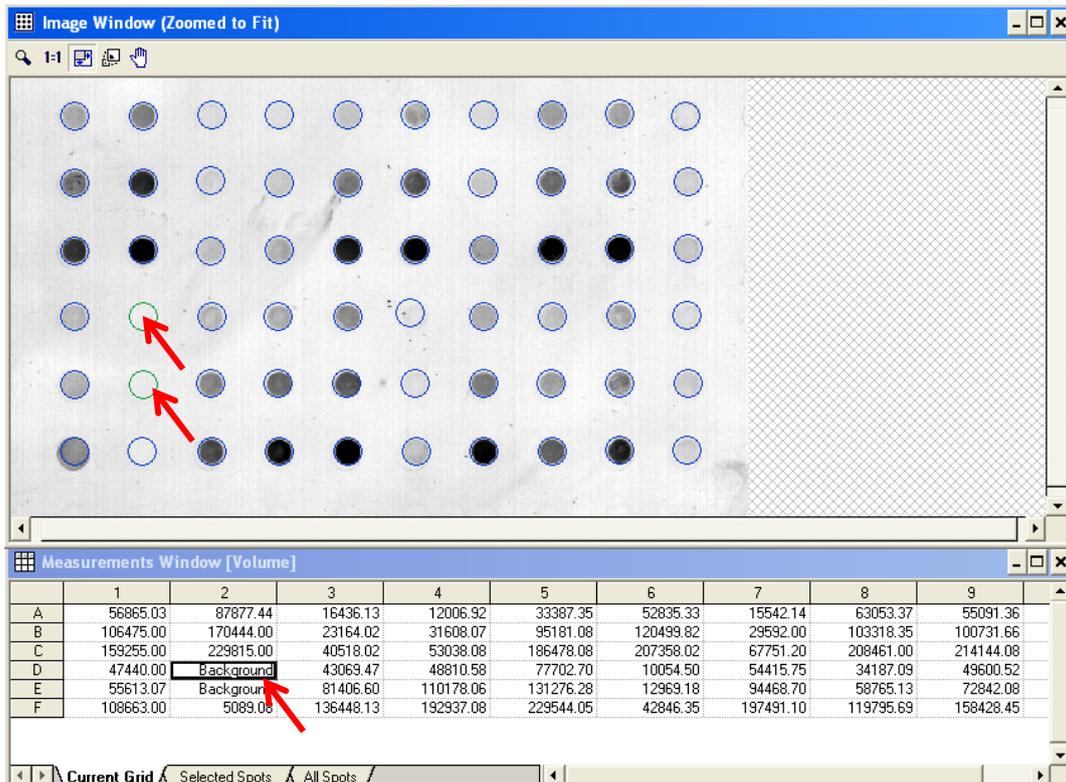
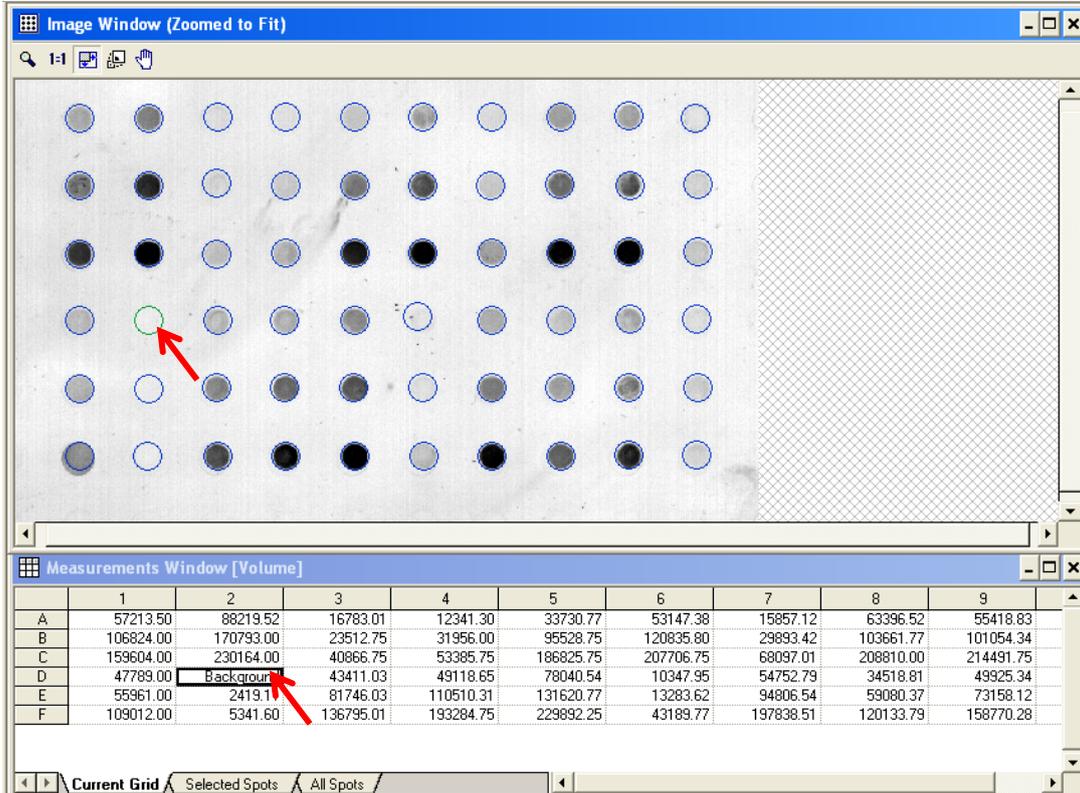
5.2.2  Negative Controls 选中 Negative Controls 后，会弹出提示对话框，提示暂无对照点。同时参数对话框中增加了添加对照和删除对照选项。



1) 在图像窗口中选中对照的单个点，或按住键盘 Ctrl 选中多个对照点，这些点变为绿色，点击



，这些点在表格中显示为 Background，同时其余点的灰度值将发生改变。当多个点被选中作为对照时，其灰度值的平均值将被作为背景扣除。



2) 点击  Deselect negative control，删除被选中的对照。

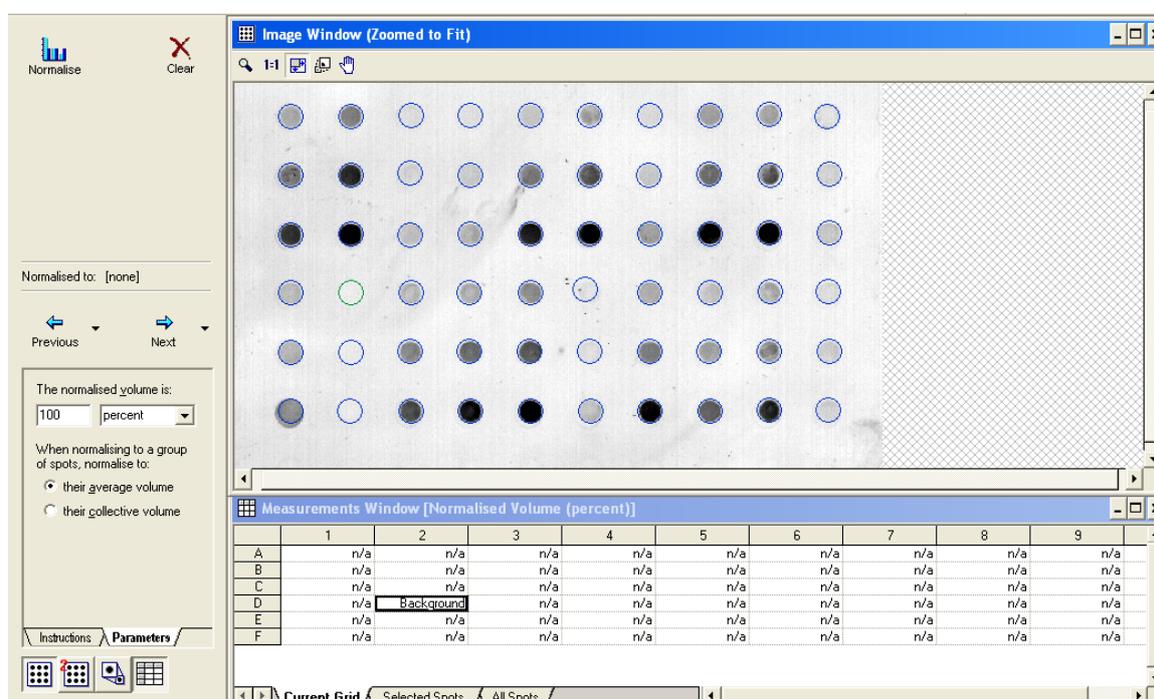
5.2.3  Spot Surface Minimum 算法是使用【点表面】像素的最低灰度值作为背景；

5.2.4  Spot Edge Average 算法是利用【点边界】像素的灰度平均值作为背景；

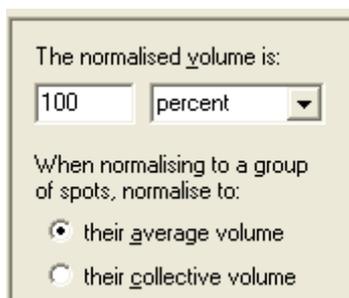
5.2.5  Image Rectangle 和一维凝胶分析中的算法一样，是以鼠标选定区域中的像素灰度平均值作为背景，它同样要求图像的背景分布均一

5.2.6 消减背景完成后，点击  进入含量归一化计算。

5.3 含量归一化

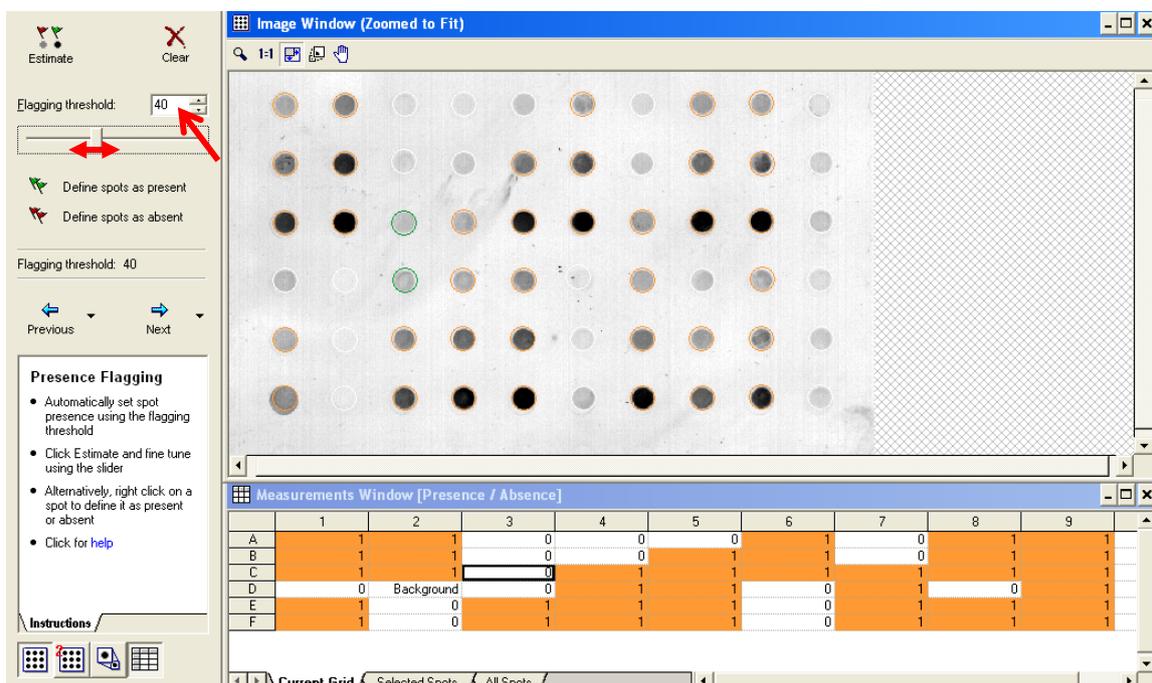


5.3.1 在 Normalised Volume 中，输入已知条带的含量，可选择对应单位，或者可以认为某一条带含量为 100%。将选择条带的平均 Volume 作为已知值（their average volume），或者将选择条带的 Volume 总和作为已知值（their collective volume）。

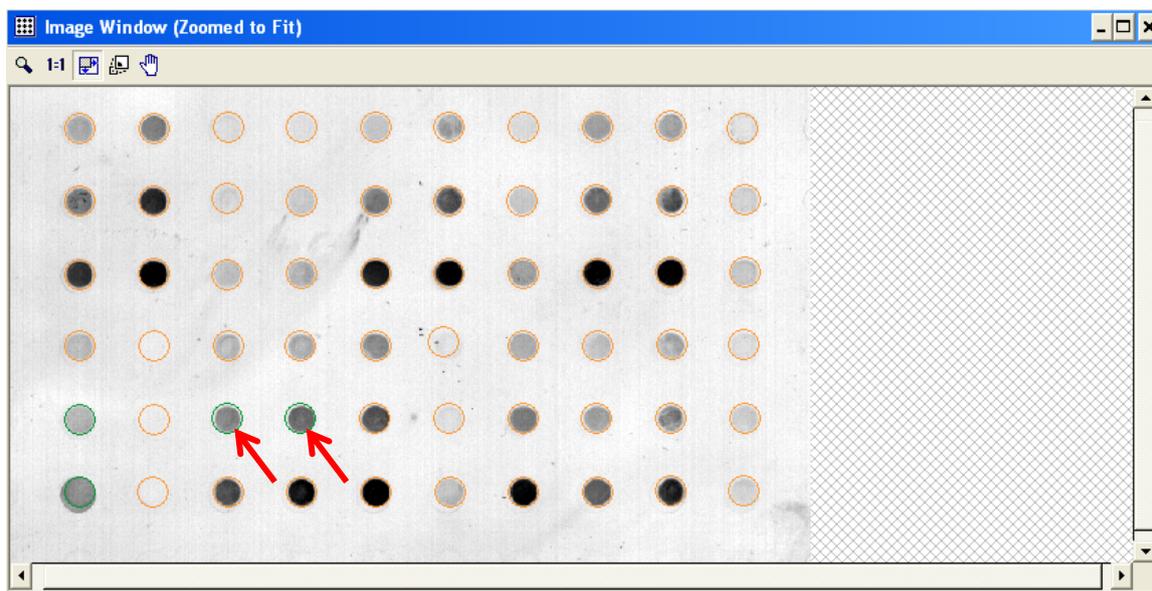


5.3.2 在图像显示窗口中点击对应的点，或者按住键盘 Ctrl 多选几个点，选中的点变为绿色。

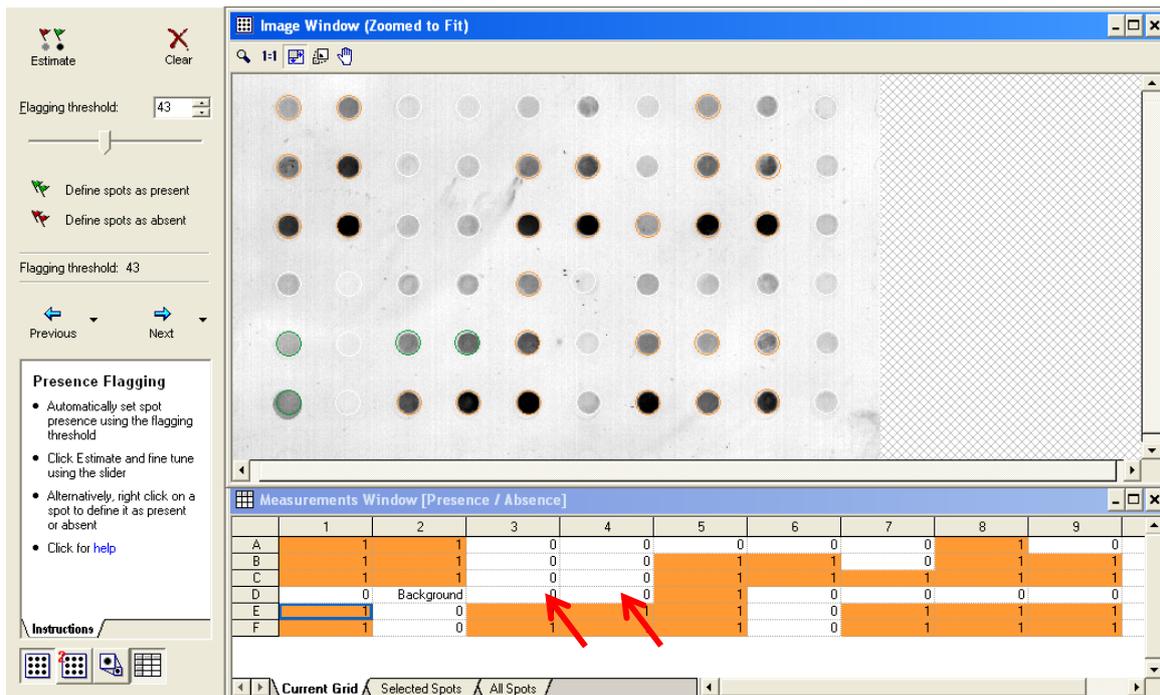
5.4.1 通过滑动【Flagging threshold】下面的滑动块或者在【Flagging threshold】后面的空格中输入数值就可以调节作为【阳性】最低标准的阈值；小于该阈值的点为阴性，用 0 表示，显示白色；大于该阈值的点为阳性，用 1 表示，显示橙色



5.4.2 也可在图像窗口中选定一个点或多个点的平均值作为阳性阈值点，选中该点或按 Ctrl 选中多个点，选中的点变为绿色，



5.4.3 点击 **Define spots as present**，点击 **Estimate**，就可以对实验结果的阳性率进行评估，小于该阈值的点为阴性，用 0 表示，显示白色；大于该阈值的点为阳性，用 1 表示，显示橙色



5.4.4 表格窗口中，可选择 Selected Spots 选项卡，查看所选点的数据

Measurements Window [Selected Spots: 4 spots]

	Label	Vol + Bkgnd	Background	Norm'd Vol (per...)	Present?
E1		91078.00	35117.00	132.80	1
E3		116788.00	35041.97	193.99	1
E4		145444.00	34933.69	262.25	1
F1		144136.00	35124.00	258.70	1

Current Grid | Selected Spots | All Spots

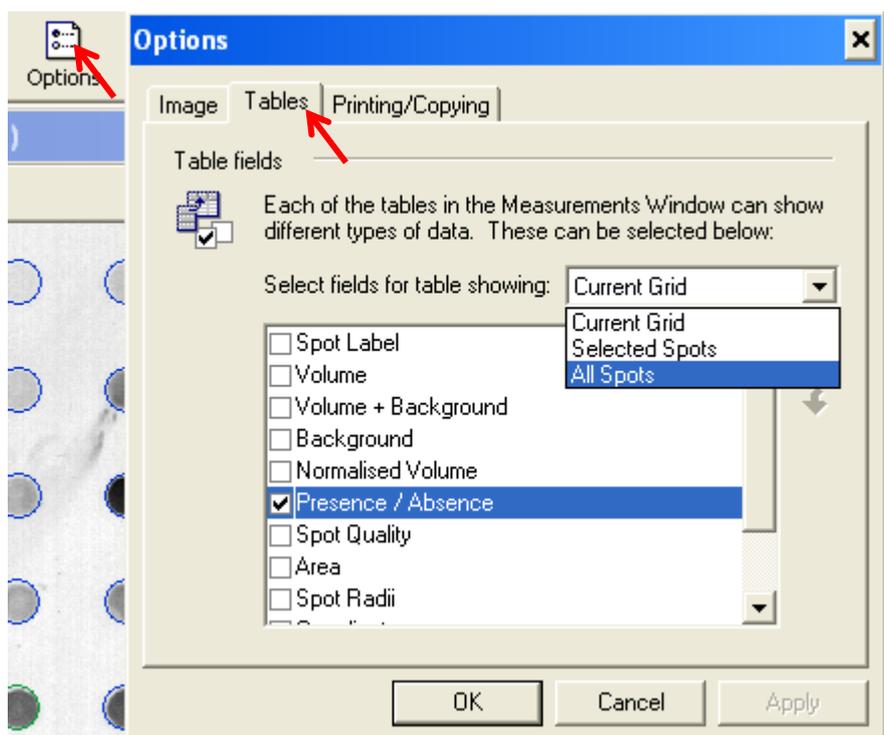
5.4.5 可选择 All Spots 选项卡，查看所有点的数据

Measurements Window [All Spots: 60 spots]

	Volume	Norm'd Vol (percent)	Present?
A1	57213.50	135.77	1
A2	88219.52	209.35	1
A3	16783.01	39.83	0
A4	12341.30	29.29	0
A5	33730.77	80.05	0
A6	53147.38	126.12	0
A7	15857.12	37.63	0
A8	63396.52	150.45	1
A9	55419.92	131.51	0

Current Grid | Selected Spots | All Spots

5.4.6 查看的数据内容，可点击快捷工具栏中 Options，进行修改



5.4.7 【阵列分析】中的所有结果可以通过菜单中【Edit】下的【Export to Clipboard】、【Export to File】以及【Export to Excel】进行导出和保存。

