

GenePix4100A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

- ・ GenePix4100Aの電源スイッチ(スキャナー背面)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.ホルダのツメを引き上げ、ステージのカバーを開きます。
 - 2.アレイスライドをステージに置いた後にトリガーを引き、アレイスライドを固定します。
 - 3.ステージのカバーを閉じます(カチッと音がします)。
 - 4.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**にな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

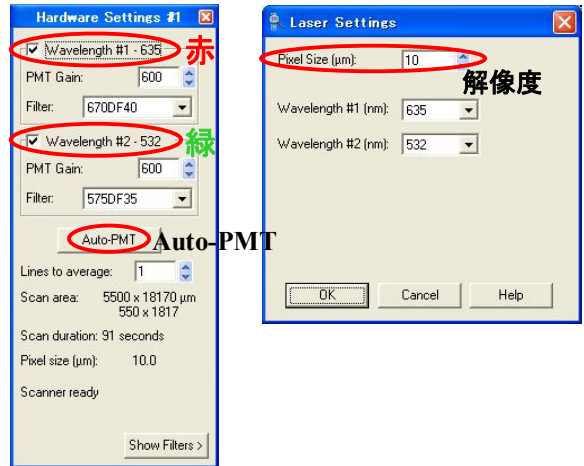
スキャン停止ボタン

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100μmまでであれば10μmで十分です。それ以下の場合は5μm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。



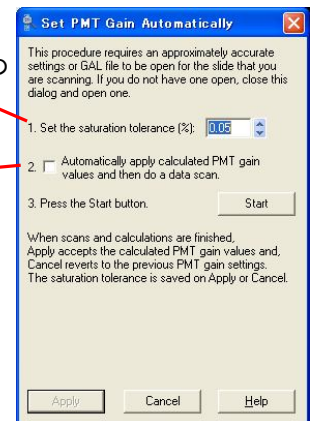
4. プレスキャンを行います

- ・ 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 (40μm) 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。

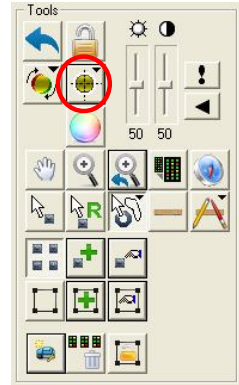
GALで保存をし遺伝子情報を入力後、GPSで保存をすることで全ての情報を含んだファイルを作成できます。

BlockとFeatureの概念

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。

正規化の条件設定

Configureで設定した条件で正規化を行います。

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。

正規化を解除します。

Table

Data Types... Resize

Select All Group Rows

Display... Show Selection

Normalization

Configure... Flag Features...

Apply Remove

Normalization Factors:

635 ...

1.000 ...