

iBright™ 分析软件桌面版帮助指南

出版编号 MAN0017843 修订版 C.0

- 软件安装、更新和系统要求 1
- 软件安装指南 1
- 图库 4
- 调整图像 7
- 使用自动分析模式分析图像 10
- 使用手动模式分析图像 18
- 定量 19
- 导出 pdf 报告 20
- 文档和支持** 21
- 客户和技术支持 21
- 产品质量保障 21

iBright™ 分析软件桌面版是一款用于分析电泳凝胶和蛋白质印迹图像的工具。该软件能够进行光密度测定、分子量测定、相对和绝对定量、纯度计算以及图像调整（如对比度、旋转、裁剪）。

该桌面版软件与 Thermo Fisher Cloud 云端 iBright™ 分析软件功能类似（可在 thermofisher.com/cloud 上进行查找）。

软件安装指南

软件安装、更新和系统要求（PC）

针对 Windows™ 操作系统（PC）或 Mac 操作系统（Mac），提供相应的软件安装说明。

PC 系统要求	
系统配置	Windows™ 7、8、8.1 或 10，配备 32 位或 64 位操作系统
最低 RAM	8 GB
网络连接	仅在安装和更新软件下载时需要连网

下载安装程序
<ol style="list-style-type: none"> 1. 访问 thermofisher.com/iBrightanalysis 查找安装程序。 2. 填写网页表格。 3. 下载 PC 端安装程序（iBrightAnalysisSoftware.exe 文件）。 <p>注意：PC 端软件分为 32bit 和 64bit 两个版本，请依据您电脑的配置进行选择。</p>

安装过程
<ol style="list-style-type: none"> 1. 打开 PC 端 iBrightAnalysisSoftware.exe 安装程序文件。 2. 接受条款和条件（最终用户许可协议）。 3. 单击安装（Install）。 4. 使用在桌面上创建的快捷方式启动应用程序。

软件更新	
如果已连网	如果软件有版本更新，打开软件时，将出现一个窗口，提示有可用的新软件版本。按照提示安装新版本。
如果未连网	您将需要偶尔检查软件更新是否可用。转到 帮助（Help） 菜单 ► 检查更新（Check for Updates） ，然后按照提示安装新版本。或者使用电脑登陆 thermofisher/iBrightanalysis 查看软件更新信息。

软件安装、更新和系统要求（Mac）

Mac 系统要求	
系统配置	OS X 10.10: Yosemite, OS X 10.11: El Capitan, macOS 10.12: Sierra, macOS 10.13: High Sierra, macOS 10.14: Mojave
最低 RAM	8 GB
互联网连接	仅在软件安装时需要

下载安装程序
<ol style="list-style-type: none"> 1. 在 thermofisher.com/iBrightanalysis 上找到安装程序。 2. 填写网络表格。 3. 单击 Mac 安装程序链接，下载该文件。 4. 打开下载 Download 文件夹。 5. 双击 iBrightAnalysisSoftware.zip 文件解压缩。

安装过程

注意：用户必须以管理员身份登录才能安装软件。

1. 打开 iBrightAnalysisSoftware.pkg 文件。
2. 如果系统上未安装 xcode 命令行工具，则会出现一个窗口。
接受 Apple™Xcode 许可，安装该工具。
3. 接受 iBright 分析软件的条款和条件（最终用户许可协议）。
4. 单击**安装（Install）**。
5. 提示信息将要求您输入密码，以便安装该应用程序。
6. 在 Applications 文件夹中启动应用程序。

软件更新

如果已连接到互联网

如果软件有版本更新，打开软件时，将出现一个窗口，提示有可用的新软件版本。按照提示安装新版本。

如果未连接到互联网

您将需要偶尔检查软件更新是否可用。转到**帮助（Help）**菜单 ► **检查更新（Check for Updates）**，然后按照提示安装新版本。或者使用电脑登陆 thermofisher/iBrightanalysis 查看软件更新信息。

MAC 系统软件卸载

注意：用户必须以管理员身份登录才能卸载软件。

1. 打开 Finder。
2. 从左侧面板中选择 Applications。
3. 右键单击 **iBright 分析软件**，然后选择**移至回收站（Move to Trash）**。

删除图库

1. 打开 Finder。
2. 按 Command-Shift-H，打开 Home 文件夹。
3. 删除 **iBright 分析软件**文件夹。

图库功能总览


图库包括用于管理图像文件的工具。您可以导入或导出图像、选择图像进行编辑和分析、创建报告或删除图像。

导入图像









从“**图库 (Gallery)**”选项卡导入单个文件：

1. 单击“**操作 (Actions) ▶ 导入图像 (Import image)**”。
2. 浏览并选择图像文件（只能导入由 iBright™ 成像系统 (.G2i) 采集的图像）。
图库中将出现一个弹出窗口，显示导入图像的状态。

管理图库


默认图像文件以  **网格视图 (Grid view)** 显示，并按时间顺序排序，最新文件位于顶部。

从“**图库 (Gallery)**”选项卡中：

- 单击  “**网格视图 (Grid view)**”，浏览图库中的缩略图。
 - 选择  “**小图标 (Small)**”、 “**中等图标 (Medium)**”、或者  “**大图标 (Large)**”可改变图库中缩略图的展示尺寸。
 - 单击 ，可按**日期、名称、模式或大小**对图像进行排序。
 - 单击 ，颠倒图像文件的顺序。如果按时间排序，则可以从最旧到最新或从最新到最旧。如果按名称进行排序，则可以颠倒字母顺序 (A 到 Z 或 Z 到 A)。
 - 单击  “查看表格中的图像文件。使用  (向上或向下箭头) 颠倒**日期、名称、模式、最近使用时间或图像尺寸大小**。

注意：在后续使用中，图库会保留对视图设置的更改。

- 选择“**操作 (Actions) ▶ 图像预览关 / 开 (Image preview off / on)**”以切换预览显示。

预览显示提供图像的放大视图和预览下方的图像信息，如名称、日期、模式和注释。单击 ，展开并浏览附加信息（若有）。



启用图像预览时，将鼠标悬停在文件记录或缩略图上，会在图像预览窗口中显示相应的图像。

在预览窗口中，将鼠标悬停在文件名上并单击，可重命名该文件。

- 选择一个或多个图像，然后**选择操作 (Actions) ▶ 删除 (Delete)**，并确认删除，可从图库中永久删除图像。

选择图像 进行调整和分析

将图像添加到窗口底部的托盘中，即可在后续窗口中对其进行调整和分析。

在图库选项卡的  网格视图或  列表视图中：

- 单击图像缩略图或记录，将选定图像添加到窗口底部的浏览区中。
- 将鼠标悬停在底部浏览区的图像上，然后单击出现的 **X** 将其移除。
或者，可以随时单击底部浏览区中的缩略图将其移除。
- 如果底部浏览区中有超过 6 个图像，可使用向左和向右箭头滚动查看。
- 单击屏幕底部的“**下一步 (Next)**”，或单击“**调整 (Adjust)**”选项卡，转至第 7 页的“**图像调整**”部分。
或者，单击分析 (Analyze)，直接跳至“使用自动分析模式分析图像”（第 10 页）。
- 双击图像以将其添加到图像浏览区，然后在 **调整 (Adjust)** 页面中打开。

导出用于发表的图像

导出用于发表的图像是指用于印刷或数字出版物中。导出期间将保留用户执行的所有图像增强或调整。不建议在下游分析中使用出版物质量的图像。如果需要使用第三方软件分析图像，参见第 6 页的“导出用于分析的图像”。

1. 导出单个图像或批量图像。

- 在图像上单击鼠标右键，然后选择导出单个图像 (Single export)。
- 选择“**操作 (Actions)** ▶ **批量导出 (Batch export)**”，导出浏览区中的所有图像。

2. 选择**出版 (Publication)**，设置参数，获得可供出版品质的图像 (24 位色)。

3. 使用菜单选择 JPG、PNG 或 TIFF 作为图像导出格式。

4. 使用菜单选择 150、300、600 或自定义，指定图像的 DPI 分辨率 (每英寸点数)。

注意：自定义分辨率可以设置范围为 72-1200 DPI。

5. (可选) 输入图像的高度或宽度值。根据图像的宽高比自动计算相应值 (如图像大小 (Image size) 字段下方所示)。

6. (可选) 如果需要图层，选择**显示图层 (Show layers)** 复选框。

注意：图层仅在分析图像时可分层使用，在合成图像上不进行分层显示及分析。

7. (可选) 选择在多通道导出中包括合成图像 (Include composite image in multi-channel export) 复选框, 将合成图像与各通道图像一起导出。

注意: 此选项仅适用于多通道图像。

8. (可选) 在图像下方文本框中编辑文件名, 进行重命名。

9. 单击“导出 (Export)”

图像将以 ZIP 压缩文件形式自动下载到本地下载 (Downloads) 文件夹。底部功能区会显示大概的导出文件大小 (或批量导出的文件夹大小)。此功能也可用于导出灰度模式和反转图像。

注意: 在后续使用中保留对导出时做出的更改。

导出用于分析的图像

1. 导出单个图像或一批图像。

- 在图像上单击鼠标右键, 然后选择导出单个图像 (Single export)。
- 选择操作 (Actions) ► 批量导出 (Batch export), 导出浏览区中的所有图像。

2. 选择**分析格式 (Analysis)** 导出图像并保存, 以保留原文件供分析使用。

注意: 在分析模式下, 多通道图像中的所有通道都将作为单独的通道导出。

3. 如果您计划共享文件, 请使用菜单选择 G2i 作为共享文件类型。

注意: .G2i 文件只能使用 iBright™ 分析软件打开并进行分析。

4. 使用菜单选择 TIFF 作为图像文件格式, 以便使用第三方软件分析图像。

注意: 图像将导出为 16 位灰度、未调整的 TIFF 文件。

5. (可选) 在图像下方文本框中编辑文件名, 以重命名图像文件。

6. 单击“导出 (Export)”。

图像文件将以 ZIP 压缩文件形式下载到选定位置。底部功能区会显示大概的导出文件大小 (或批量导出的文件夹大小)。此功能也可用于导出灰度模式和反转图像。

调整图像

“调整 (Adjust) ” 选项卡包含图像编辑工具。默认情况下：






- 选定图像浏览区中的一张图像进行查看和编辑。
- 所有图像均为自动对比显示。荧光图像使用背景信号校正进行自动增强，但是这种校正不适用于灰度图像。
- 即使在荧光模式下，也不会对灰度图像应用背景校正。
- 由于数据分析是在原始图像上进行，这些校正不会影响分析结果。

在 “调整 (Adjust) ” 选项卡上：

- 在屏幕底部的图像浏览区中选择图像，以便在视窗中进行查看。
- 第 7 页的 “使用缩放控件”，调整显示比率。
- 第 8 页的 “拉直、裁剪、旋转、翻转或反转图像”。
- 第 8 页的 “查看和编辑通道”。
- 第 9 页的 “查看框架、泳道、条带和区域”。
- 第 9 页的 “调整图像显示增强”。
- 第 9 页的 “指定通道颜色”。


使用缩放控件

在 “调整 (Adjust) ” 或 “分析 (Analyze) ” 选项卡中，使用缩放控件调整显示倍数。

-  - 平移图像。
-  - 放大。
-  - 缩小。
-  - 缩放至适合屏幕大小。
-  - 使用鼠标选择要放大的图像部分。



拉直、裁剪、旋转、翻转或反转图像

在调整 (Adjust) 选项卡中, 使用**图像选项 (Image Options)** 拉直、旋转或反转图像。调整后, 将自动重新分析图像。

-  - 单击“**裁剪 (Crop)**”, 通过拖动裁剪标线调整要裁剪的图像区域, 然后单击**应用 (Apply)**, 确认裁剪, 删除裁剪框外部不需要的区域。






裁剪版本将保留在裁剪之前对图像执行的手动调整, 但不保留分析结果。

裁剪功能将创建一个新图像并自动添加到图库和屏幕底部的图像浏览区中。裁剪图像的文件名与原始文件相同, 但添加了**后缀裁剪 (cropped)**。原始图像保留在图像浏览区中。

-  - 单击**拉直 (Straighten)**, 图像上将显示十字型准线。使用网格底部的滑块或滑块下方的文本框将图像旋转到自定义角度, 完成后再次单击 。




警告! 拉直会改变像素强度值并更改数据分析。


-  - 单击“**旋转 (Rotate)**”, 然后单击图像下方的“**向左旋转 (Rotate Left)**”或“**向右旋转 (Rotate Right)**”, 可将图像旋转 90°。
-  - 单击“**翻转 (Flip)**”, 然后单击图像下方的  “**垂直翻转 (Flip Vertical)**”或  “**水平翻转 (Flip Horizontal)**”。
-  - 单击“**反转 (Invert)**”, 以反转图像显示。如果应用伪彩色, 则也将反转。对于多通道图像, 图像中的所有通道都将被反转。


查看和编辑通道

该功能仅适用于多通道图像。

- 单击 , 打开或关闭各个通道的显示。

如果已选择一个通道进行编辑 (见下文), 则无法关闭该通道的显示。

- 单击 , 选择要编辑的通道。默认选择第一个通道进行编辑。
- 单击“**灰度 (Grayscale)**”进行转换并以灰度显示荧光通道。

注意: 通过单击 Chemi 图像的灰度模式的 , 可进行膜通道叠加。此功能不适用于其他模式。在荧光模式下, 一次有一个通道以灰度显示, 进行编辑。在灰度模式中选择色度, 将返回显示合成图像, 与在灰度选择之前相同。

查看框架、泳道、条带和区域

这些功能可用于已分析的图像。

在调整 (Adjust) 选项卡中:

- 单击“**框架 (Frames)**”, 查看图像泳道周围的边界。在视窗中, 从上到下、从左到右对框架进行编号。

- 单击“泳道 (Lanes)”，在图像中每个条带的中间垂直向下添加一条线。在分析框架中，从左到右对泳道进行编号。
- 单击“条带 (Bands)”，可查看条带边界。在每个泳道中，从上到下对条带进行编号。
- 单击“区域 (Regions)”，查看图像的选定区域。根据创建顺序对区域进行编号。


调整图像显示增强

在图像显示增强面板的**调整 (Adjust)** 选项卡中：

- 单击“自动对比度 (Auto-contrast)”复选框，使用软件确定最佳信噪比。
- 单击“显示饱和度 (Show saturation)”复选框，显示过饱和像素。荧光图像使用白色显示过饱和像素，其他图像模式使用红色显示过饱和像素。
- 单击“自动增强 (Auto-enhance)”复选框，查看扣除了背景的图像显示。

使用直方图调整显示

直方图是灰度强度的图形表示方法，灰度强度是图像像素与特定灰度强度的比例。纵轴表示像素数，横轴表示像素强度。

使用直方图时，所做的任何调整将只影响所选通道，在**查看和编辑通道**窗格中以指示。Y轴表示所代表图像的频率或像素数，X轴表示这些像素的信号强度。调整仅影响显示，而不会反映在数据分析中。

在图像显示增强面板的**调整 (Adjust)** 选项卡中：

1. 使用 gamma 滑块调整图像中间色调。
2. 使用直方图下方的滑块或文本框，设定显示的黑白信号强度。
3. (可选) 单击**自动对比度 (Auto-contrast)**，恢复默认值。

指定通道颜色

在**伪彩色面板**的**调整 (Adjust)** 选项卡中：

1. 单击与单个通道关联的色样。
2. 从下方的调色板中选择一种新颜色。

图像将会更新为相应的新颜色。

使用自动分析模式分析图像

从**调整 (Adjust)** 转到**分析 (Analyze)** 选项卡时，将自动执行**自动分析 (Auto-analysis)**。自动分析模式将分析指定框架内的所有信号。软件将自动识别和测量泳道和条带。

- 第 18 页的“使用**手动模式 (Manual Mode)** 分析图像”
- 第 10 页的“编辑框架”
- 第 11 页的“调整图像的泳道和条带”
- 第 13 页的“分子量分析”
- 第 12 页的“查看和导出分析数据”
- 第 16 页的“使用对照进行数据归一化”

用于信号检测的背景指定

此功能允许用户在蛋白质模式下更改信号识别的指定背景。在白色屏幕的情况下，该算法检测白色背景上的黑色信号，而在没有白色屏幕的情况下，该算法检测黑色背景上的白色信号。如果手动更改蛋白质图像的背景，则相应地重新分析图像。

编辑框架

当您第一次将图像添加到浏览区时，将自动执行分析。自动分析模式将分析指定框架内的所有信号。软件将自动识别和测量泳道和条带。



注意：当删除浏览区中的所有框架时，**自动分析 (Auto-analyze)** 选项仅显示在**操作 (Actions)** 菜单中。

- 选择“**分析模式 (Analysis Mode)**”▶“**自动 (Automatic)**”▶“**框架 (Frames)**”。
- 如果之前未完成，请单击将其选中。
- 单击 - **自动分析 (Auto-analyze)** 面板中**框架 (Frames)** 下的**删除 (Delete)**。
删除框架以及相应的泳道和条带。您现在可以使用一个新框架进行替换。
- 单击**工具 (tools)** 面板中**框架 (Frames)** 下的 **+ 添加 (+ Add)**。
- 使用鼠标在图像上绘制一个框架以覆盖待分析区域。
- 调整框架大小，请单击 **+ 添加 (+ Add)** 以取消选择。选择待调整大小的框架，并使用四角“手柄”中的任意一个来调整大小。
- 单击**应用 (Apply)** 进行分析，或单击**清除 (Clear)** 进行删除。

- (可选) 单击框架将其选中, 然后按 Ctrl + C 和 Ctrl + V, 复制和粘贴框架, 以供再次使用。

粘贴的框架将显示在被复制框架的下方, 略有偏移。如果您正在重复粘贴并且新粘贴的区域到达图像边界, 则新框架将粘贴到上一次粘贴的框架上。

- 要移动框架, 请选择框架并使用鼠标拖动框架或使用键盘箭头键进行移动。
- 选择**应用 (Apply)** 分析框架, 或选择**取消 (Cancel)** 删除所有编辑。

- (可选) 单击**扭曲**  (**Skew** ) 并拖动框架上的任意一个手柄以调整位置。如有需要, 可以向上或向下移动扭曲手柄创建曲线。

- 选择**应用 (Apply)** 分析框架, 或选择**取消 (Cancel)** 删除所有编辑。

该软件将自动识别框架中的泳道和条带并对其进行编号。

图像的泳道和条带调整工具

您可以在自动分析模式下调整图像的泳道和条带。

在“**分析 (Analyze)**”选项卡的“**自动分析 (Automatic)**”窗口中, 单击“**泳道和条带 (Lanes & Bands)**”。

- 选择一个泳道, 然后单击“**删除 (Delete)**”  以删除所选泳道。
- 选择“**泳道 (Lanes)**”下的 , 然后单击分析框内的预期位置以添加新泳道。
- 选择一个泳道并单击“**扭曲 (Skew)**” , 拉动泳道上的句柄以使之对齐, 然后再次单击“**扭曲 (Skew)**” 。
- 选择一个泳道, 并使用键盘方向键移动泳道。
- 在**条带 (Bands)** 下, 单击**添加 + (Add +)**, 然后单击目标位置以添加条带。
- 选择一个条带, 然后单击**删除 (Delete)** - 删除条带。

若要同时删除多个条带, 可使用鼠标单击拖拽, 从而在目标条带周围绘制一个选择框。或者, 依次选择各个条带进行删除。

- 选择一个或多个条带, 并使用四角手柄调整大小。
- 使用键盘箭头键移动条带。
- 选择“**应用 (Apply)**”以分析经过调整的条带和泳道或“**取消 (Cancel)**”所有编辑。使用“**撤销 (Undo)**”删除上一步编辑。

条带添加、删除或调整大小对每个染料通道都是特定的。选择一个通道进行编辑。

查看泳道剖面图

泳道剖面图 (Lane Profile) 是选定泳道的强度图示。x 轴为强度, y 轴为像素位置。该图表还显示了以灰色模式检测到的非特异性背景。默认情况下, 使用由软件产生的最佳滚球半径来执行滚球背景扣除, 生成泳道剖面图。这有助于更清晰地查看条带边界, 根据剖面图更轻松地调整条带。将鼠标悬停在剖面图上, 将显示泳道强度值、条带强度值、背景强度值和相对前沿值。

在**自动分析 (Auto-analyze)**窗口的**分析 (Analyze)**选项卡中:

- 单击泳道轮廓面板中的查看**泳道剖面图 (View lane profile)**。
- 选择框架和泳道, 查看剖面图。默认选择第 1 框架 / 第 1 泳道。
- 调整条带 (即添加、删除、移动、调整大小)。更改将在泳道剖面图中实时显示。
- 单击**应用 (Apply)**保存更改。
- 若要更改默认背景扣除, 请输入滚球半径并单击该字段外部。
将从框架中扣除背景并在剖面图中展现。若要使用此背景校正进行分析, 请单击**应用 (Apply)**。数据表将更新, 以显示经背景校正后的数据。
- (可选) 切换关闭**显示背景 (Show background)**, 以查看未经背景减法的剖面图。
- (可选) 更换通道, 以查看其他通道的泳道剖面图。

查看和导出分析数据

数据表显示图像分析数据, 包括像素强度 (pixel intensity) 和密度 (density)、背景扣除数据 (background substrated data)、保留因子 (Rf)、分子量 (MW)、相对和绝对数量 (relative and absolute quantities)、归一化 (normalization) 和条带纯度 (band purity)。仅显示可获取数据。使用数据表图标 显示或隐藏数据列。在后续使用中保留做出的设置更改。

在“**分析 (Analyze)**”选项卡的“**自动分析 (Automatic)**”窗口中:

1. 单击“**数据 (Data)**”。

将打开包含可用数据的表格, 图像将显示在左侧面板中。使用 打开和选择列。该表显示以下数据:


- 名称 (Name) - 数据点或数据组的名称。
- 体积 Vol. (强度 Int.) - 区域或条带中每个像素灰度强度的总和。体积的单位是强度。所有像素强度均显示为 16 位图像中的强度。
- 面积 (Area) - 每个区域或条带内的像素数。
- 密度 (Density) - 每个像素的平均强度或体积除以面积, 单位为强度 / 面积。
- 分子量 (Mol. Wt.) - 每个条带对应于所用分子量标准 (marker 或者 ladder) 的分子量。

- 相对数量 (Rel. Quant.) - 区域或条带体积除以相对参考区域或参考条带体积得到的比值。
- 绝对数量 (Abs. Quant.) - 利用定量曲线获得的数量值。星号 (*) 更改为从数量 (Quantity) 子选项卡的单位 (Units) 下拉菜单中选定的质量单位。
- 归一化因子 (Norm. Factor) - 对照条带经背景校正后的体积除以参考条带经背景校正后的体积。
- 归一化信号 (Norm. Signal) - 经背景校正条带体积除以归一化因子。
- 局部背景校正体积 (Local Bg. Corr. Vol.) - 体积减去局部背景强度。软件将针对每个条带或区域自动计算该值，并且无法禁用。
- 局部背景校正密度 (Local Bg. Corr. Den.) - 局部背景校正后体积除以面积。
- 全局背景校正体积 (Global Bg. Corr. Vol.) - 体积减去全局背景区域强度。
- 全局背景校正密度 (Global Bg. Corr. Den.) - 全局经背景校正体积除以面积。
- 滚球背景校正体积 (Rolling-ball Bg. Corr. Vol.) - 条带或经滚球背景校正图像的像素强度之和。
- 滚球背景校正密度 (Rolling-ball Bg. Corr. Den.) - 滚球背景校正体积除以面积。


有关背景校正的更多信息，参见第 17 页的“使用背景校正”。

2. 选择“操作 (Actions)” ▶ “导出数据 (Export Data)” 将表格数据导出为 .xls 文件。


筛选数据表

1. 单击 ，打开一个新数据表
2. 将数据添加到新数据表。
 - 单击各条带，以便将数据添加到表中。
 - 单击泳道，以便添加选定泳道中所有条带的数据。
 - 按住 Shift 键，同时单击选择多个条带或泳道。
3. (可选) 选择操作 (Actions) ▶ 导出数据 (Export Data)，将表格数据导出为 .xls 文件。

注意：如果数据已筛选，则只有经筛选的数据才会显示在报告中。

4. (可选)  单击，返回到原始数据表。

分子量分析

在指定分子量标准泳道之前，请务必选择正确的通道，由  指示。

注意：每个框架只能应用一种分子量标准 (如 iBright™ Prestained Protein

Ladder, BenchMark™ His-Tagged Ladder 等)。

在**自动分析 (Auto-analyze)**窗口的**分析 (Analyze)**选项卡中:

1. 单击“**分析 (Analysis)**”。

从下拉菜单中选择分子量标准 (Markers)。

3. 单击图像中的分子量标准泳道以将其选中。

选定的 Marker 泳道和条带变为黄色 (如果图像为浅色背景, 则为蓝色)。

4. 从第二个下拉菜单中选择自定义分子量标准 (Custom Markers) 或从已有的分子量标准中进行选择。

有关如何创建自定义分子量标准, 参见第 14 页的“在您的分析中添加自定义分子量标准”。

软件将根据所选 Marker 按降序将自动标定对应条带。如果软件识别出的条带数量多于标准条带数量, 则将排除最小的条带。如果条带数量少于标准条带数量, 则放弃使用最小的标准条带。条带按降序排列。

5. (可选) 从分子量标准列表中选择和取消选择多余的条带。

取消选择的条带不再显示黄色。如果软件检测到的条带数量多于可用的标准条带数量, 请单击图像中的多余条带以取消选择。

6. (可选) 调整分子量标准或单击任何被错误指定为分子量标准旁边的 X。

7. 单击应用 (Apply)。

您现在可以以图表形式查看数据 (第 15 页的“以图表形式查看数据”)。

在您的分析中添加自定义分子量标准

在**自动分析 (Auto-analyze)**窗口的**分析 (Analyze)**选项卡中

1. 单击“**分析 (Analysis)**”。

2. 从下拉菜单中选择**分子量标准 (Markers)**。

3. 单击**添加 / 编辑自定义分子量标准 (Add/Edit Custom Markers)**, 然后单击**添加自定义分子量标准 (Add Custom Marker)**以添加新 marker。

4. 输入**自定义 marker**名称。仅限使用字母数字字符, 不可使用空格。

5. 从 marker 类型 (Marker type) 下拉菜单中选择**蛋白质 (Protein)**、DNA 或 RNA。

6. 根据 marker 类型, 选择相应的单位。

7. 选择标 marker 条带的数量。

8. 单击**下一步 (Next)**。
9. 输入每个条带分子量，然后单击**保存 (Save)**。

自定义分子量标准将添加到自定义分子量标准列表中，可以被选定并应用于图像中。有关详细信息，参见第 15 页的“编辑或删除自定义分子量标准”。

编辑或删除自定义分子量标准

在**自动分析 (Auto-analyze)** 窗口的**分析 (Analyze)** 选项卡中：

1. 单击“**分析 (Analysis)**”。
2. 从下拉菜单中选择**分子量标准 (Markers)**。
3. 从第二个下拉菜单中选择**添加 / 编辑分子量标准 (Add/Edit Custom Markers)**。
4. 单击以在**自定义分子量标准 (Custom Markers)** 列表中选择一组自定义分子量标准。
(可选) 您可以单击**删除分子量标准 (Delete Marker)** 以便在此删除 marker，然后确认删除。
5. 编辑分子量标准参数，如**名称 (Name)**、**类型 (Marker type)**、**单位 (Units for this marker)** 或**条带数 (Number of marker standards)**。
6. 单击**下一步 (Next)**。
7. 根据需要调整指定的分子量标准分子量。
8. 单击**保存 (Save)**。

以图表形式查看数据

为图像指定分子量标准条带后（第 13 页的“分子量分析”），便可以以图表形式查看数据。

在**自动分析 (Auto-analyze)** 窗口的**分析 (Analyze)** 选项卡中：

1. 在下拉菜单中选择**分析 (Analysis)**。
2. 单击“**图表 (Graph)**”。
即可打开图表。选择图像上的一个泳道，查看图表上的相应数据。点对点 (Point to point) 是用于通过计算标准曲线来确定分子量的默认回归方法。
3. 在图像上选择一个泳道或条带，查看图表上相应数据。
4. (可选) 选择“**回归 (Regression) ▶ 线性 (Linear)**”或“**线性半对数 (Linear Semi Log)**”以更改使用的回归方法。查看“**R 平方值 (R-squared)**”

Value) ”以确定所选回归方法的“拟合优度 (goodness of fit) ”。

有关更多信息，参见第 16 页的“回归方法”。

5. 在图像中选择另一个框架，查看该框架的图表。使用图表上方的下拉菜单更改通道。

6. (可选) 单击“数据 (Data)”，查看数据表。

单击“完成 (Done)”返回“分析 (Analyze)”界面。

回归方法

点到点 - 该回归方法确定两个分子量标准条带之间的线性斜率。因此，此方法没有单个方程且没有 R² 项。Marker 的分子量值的对数用于生成每对 marker 条带之间的斜率。

线性 - 该回归方法利用线性方程 $y = ax + b$ 来确定分子量，其中 y 代表分子量，a 代表线的斜率，x 代表相对前沿 (Rf)，b 代表截距。该线性方程利用 marker 的分子量值进行计算。该方法最大程度地减少观测值与模型提供的拟合值之间的平方差的总和。

线性半对数 - 线性方程为 $\ln(y) = ax + b$ ，其中 y 代表分子量，a 代表线的斜率，x 代表相对前沿 (Rf)，b 代表截距。该线性方程利用 marker 的分子量值的对数进行计算。

注意：在某些情况下，计算所得分子量与通过对比两个最接近的 marker 条带得到的视觉估算分子量不同。在这种情况下，改为使用点对点回归方法可使计算所得分子量与目视分子量较一致。

使用对照进行数据归一化

通过比较选定归一化条带与参考条带的强度和体积，生成归一化系数。每个泳道只有一个归一化系数。每个泳道中的条带体积除以它们的归一化系数，得到归一化信号。每个条带的归一化系数和归一化信号将显示在数据表中。

此功能在“自动分析 (Automatic)”模式下可用。用以控制不均匀的样品和降低实验变异性。

该功能可用于自动分析模式。它能够控制不均匀上样和实验变异性。

在自动分析 (Auto-analyze) 窗口的分析 (Analyze) 选项卡中：

1. 单击“分析 (Analysis)”。
2. 在下拉菜单中选择“归一化 (Normalize)”。
3. 选择归一化对照通道 (如上样对照)。

4. 选择一个条带作为归一化对照, 然后选择**应用(Apply)**。归一化对照是上样对照, 通常是一种管家蛋白或不受实验条件影响的已知蛋白。

在选定条带上方将出现一条水平线。落在该线上的所有条带都将被自动指定为归一化对照。如果自动条带选择不准确, 请手动选择或取消选择条带。

5. 选择一个条带作为参考, 然后选择**应用 (Apply)**。

生成归一化因子并且针对该因子对条带进行归一化。

6. 对于 Chemi blots, 允许跨多个框架进行归一化。确认参考条带后, 使用上面定义的上样对照选择需要归一化的框架。选择**应用 (Apply)**, 以确认归一化。

7. (可选) 选择工具中的**清除 (Clear)** 按钮, 可以清除所执行的归一化。

使用背景校正

该软件执行自动局部背景扣除。原始数据和局部背景校正数据将自动显示在分析表中。还可以使用手动模式执行全局背景扣除, 使用自动模式执行滚球背景校正。

- 局部背景减法 (Local background subtraction) - 软件自动执行局部背景扣除。围绕每个条带或区域的边界的 2 个像素的平均强度, 用于计算受该背景影响的条带或区域内强度。。从条带或区域内的每个像素强度中减去该值, 得到局部背景校正体积 (Local Background Corrected Volume) 和密度 (Density) 值并显示在分析表中。
- 全局背景减法 (Global background subtraction) - 全局背景扣除指定一个区域作为背景, 改背景将从条带中扣除。有两种方法可激活全局背景减法: (1) 选择一个背景区域并与条带区域相关联或 (2) 选择条带区域并与背景区域相关联。全局背景扣除允许指定多个背景区域与图像上的条带区域子集相关联。例如, 当分析背景不均匀图像时, 可能需要指定多个背景区域作为从某些目标条带区域中减去的背景。

注意: 为获得准确的全局背景校正, 指定的背景区域应与目标区域大小 (像素) 相等。

1. 单击**分析 (Analyze)**。
2. 在下拉菜单中单击**背景校正 (Background Correction)**。
3. 选择**全局 (Global)** 单选按钮。
4. 选择要指定为背景的区域。
5. 右键单击并选择适当的选项 (指定为背景)。
6. 选择要与背景区域关联的区域。您可以选择多个区域, 方法是单击套索工具, 然后按 Shift, 然后选择区域。
7. 选择背景区域。

8. 右键单击并从下拉选项中选择关联区域，以创建一组选定区域。

选定的背景区域将用于校正该组中所有关联区域的背景，数据将在数据表中可用。

9. (可选) 按照第 6-8 步创建更多组。

注意：每个组只能有一个背景区域。

- 滚球扣除 (Rolling-ball background) - 滚球背景减法将指定一个特定半径的球，使其可以滚过选定泳道剖面并减去背景。滚球半径越小，背景扣除越多。经背景校正的图像可用于进一步分析。

在自动分析 (Auto-analysis) 窗口的分析 (Analyze) 选项卡中：

1. 单击泳道剖面图 (Lane Profile) 折叠选项中的查看泳道剖面 (View lane profile)。

2. 选择要应用滚球的框架。默认选择框架 1。

3. 在泳道剖面图下方的文本框中输入滚球半径，或使用滑块增加半径。

注意：默认情况下，文本框将显示软件生成的最佳滚球半径。应用于该半径的背景校正将在剖面中以灰色显示。

您可以随时将半径重置为默认数值。重置后，编辑的半径大小将在单击应用 (Apply) 后被应用于分析。

4. 单击应用 (Apply)。输入的球半径将用于选定框架中所有泳道的背景校正。

注意：在滚球背景扣除之后执行的任何分析都将使用滚球背景校正体积进行计算，之前执行的分析将使用滚球背景校正体积替代局部背景校正体积进行重新计算。



使用手动模式分析图像

若只需分析图像的一部分，使用**手动模式 (Manual Mode)**可以手动挑选出您感兴趣的信号进行分析。

注意：**手动模式 (Manual Mode)**和**自动分析模式 (Automatic Mode)**可以在同一图像上同时使用。

1. 选择“分析模式 (Analysis mode)” ► “手动 (Manual)”。

2. 在“手动 (Manual)”窗格中，选择“区域 (Regions)”。

3. 选择  或 ，添加一个方形或圆形区域。

4. 使用鼠标在信号周围绘制边框，以创建一个区域。
可以一次绘制多个区域。
软件将这些区域标记为 V1、V2 等。
5. (可选) 单击一个区域将其选中，然后按 Ctrl + C 和 Ctrl + V，复制并粘贴该区域以供再次使用。
粘贴的区域将显示在复制区域下方，略有偏移。如果您正在重复粘贴并且新粘贴的区域超出视图范围，请缩小图像以进行查看。
6. (可选) 若要删除区域，请单击区域以将其选中，然后按键盘上的 Delete 或 Backspace (Mac 电脑需要同时按住 fn)。
7. 使用鼠标将区域移动到所需位置。
8. 单击**应用 (Apply)**，以确认对该区域的操作。

通过单击查看框架、泳道和条带 (View Frames, Lanes, & Bands) 窗格中的区域 (Regions)，可打开或关闭区域。

定量

“**定量 (Quantitate)**”功能包括用于执行条带相对和绝对定量的工具。在图像上选定了条带或区域时，将启用这些功能。

相对定量

将一个条带或对应区域指定为相对参考，将参考区域的局部背景校正体积与图像上的所有其他条带和区域进行比较。执行该任务会将所有条带 / 区域归一化为一个目标条带 / 区域。这是将实验样品与对照进行比较的实用工具，其中倍数变化由数据归一化处理。

相对定量是区域或条带体积除以相对参考区域或条带体积的比值。在选择一个条带或一个区域作为参考后，可以在自动分析和手动模式下执行此分析。有关更多信息，参见第 18 页的“使用手动模式分析图像”。

相对定量在自动分析模式下为框架和通道级别，在手动模式下为通道级别。

在**自动分析 (Auto-analyze)**窗口的**分析 (Analyze)**选项卡中：

1. 单击**分析 (Analyze)**。
2. 在下拉菜单中**选择定量 (Quantitate)**。
3. 使用单选按钮选择**相对 (Relative)**，然后选择要定量的通道。
4. 单击以选择一个区域或条带作为相对参考。

选择一个相对参考后，数据表将显示相对数量。所选 R 的值为 1。

绝对定量

将多个条带或体积区域指定为具有已知量的绝对参考，从而可以对图像上所有其他条带和区域进行体积（像素强度之和）数量插值 / 外推。当同一图像上至少有样品的两个已知量时，这是用于确定样品量的实用工具。

绝对数量是利用定量曲线获得的数量值。可以在自动分析或手动模式下执行分析。有关更多信息，参见第 18 页的“使用手动模式分析图像”。

在**自动分析 (Auto-analyze)** 窗口或**手动模式 (Manual mode)** 下的**分析 (Analyze)** 选项卡中：

1. 单击**分析 (Analyze)**。
2. 在下拉菜单中选择**定量 (Quantitate)**。
3. 使用单选按钮选择**绝对 (Absolute)**，然后选择要定量的通道。
4. 单击以选择一个条带或区域作为绝对参考。

标准 (Standard) 文本框将显示在**定量 (quantitate)** 窗格中。

5. 为标准选择一个度量单位。

- mg
- µg
- ng
- pg
- fg
- nmol
- pmol
- fmol
- mg/mL
- µg/mL

6. 在提供的文本框中输入标准数量。
7. (可选) 选择一个或多个其他绝对标准作为参考，并按上述方式为指定它们的值。
8. 单击“**应用 (Apply)**”。

您的数据表将根据所指定的标准品反映计算所得的数量。

导出 pdf 报告

1. 选择“操作 (Actions)” ▶ “生成报告 (Generate Report)”。
 2. 选择或取消选定将要包含在您报告中的以下功能。
 -  图像
 -  数据表
 -  数据图
 3. (可选) 取消选择显示图层 (Show layers) , 以从图像显示中删除显示泳道、条带、框架和区域。
 4. (可选) 取消选择**图像详细信息 (Image details)** , 以从报告中删除图像的详细信息。
 5. 单击“**导出 (Export)**”。
- 显示预览报告。
6. 单击“**打印 (Print)**”。

pdf 报告可以按需命名, 并保存到任何位置。为准确打开文件, 务必保留 .pdf 扩展名。在后续使用中保留做出的设置更改。

文档和支持

客户和技术支持

访问 <http://thermofisher.com/support> 获取最新服务和支持, 包括:

- 全球联系电话
- 产品支持, 包括:
 - 产品常见问答
 - 软件、补丁和更新
 - 许多应用和仪器的培训
- 订购和网络支持
- 产品文档, 包括:
 - 用户指南、手册和协议
 - 分析证书
 - 安全数据表 (SDS; 也称为 MSDS)

注意: 有关其他制造商的试剂和化学品的 SDS, 请与制造商联系。

产品质量保障

Life Technologies 公司和 / 或其子公司 保证其产品符合 www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html 网站列出的《Life Technologies 一般销售条款和条件》。如有任何疑问, 请通过 <http://www.thermofisher.com/support> 联系 Life Technologies。



制造商: Thermo Fisher Scientific | 3747 N. Meridian Road | Rockford, Illinois 61101 美国

本指南中的信息如有更改, 恕不另行通知。

免责声明: 在法律允许的范围内, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. 和 / 或其附属公司对与本文档相关或因由本文档引起的特殊、偶然、间接、惩罚性、多重或后果性损害, 包括您使用本文档所造成的损害, 不承担任何责任。

购买者须知: 权利许可免责声明: 单独购买本软件产品, 不代表拥有由 Life Technologies Corporation 以专利权利的形式拥有或以明示或禁止反言的方式所控制的关于任何过程、仪器或其它设备、系统、组成成分、试剂或试剂盒的权利。

商标: 除非另有说明, 所有商标均为 Thermo Fisher Scientific 及其子公司所有。公司实体: Life Technologies Corporation | Carlsbad, CA 92008 美国 | 美国免费电话 1 800 955 6288

© 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. 版权所有。

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion

thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C