

TissueQuest 分析软件快速操作指南

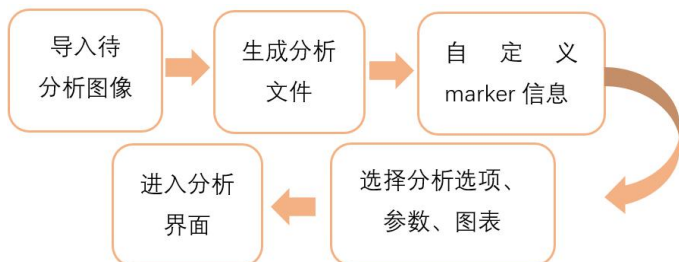
1 开启 TissueQuest

在登陆页面(图 1), 输入密码 (若无, 跳过), 点击

I Agree & Login, 自动进入软件操作页面。

2 分析前参数选定

TissueQuest 分析前参数选定主要步骤:



2.1 导入待分析图像文件

TissueQuest 支持图像格式: 除 **TissueFAXS** 系统拍摄的图像文件外, 还支持其他系统拍摄的原格式扫描文件如 Zeiss (.czi) 等多种格式的图像文件 (.jpg, .tif 等) (图 2-2.1.3)

2.1.1 导入 TissueFAXS 图像文件

两种导入方式 (图 2-2.1.1):

- **Import a TissueFAXS project:**
导入单个 **TissueFAXS** 文件
- **Import Multiple TissueFAXS:**
导入多个 **TissueFAXS** 文件。

具体介绍第一种, 其余类似:

首次分析导入 **TissueFAXS** 图像文件, 选择

TissueFAXS, 弹出界面, 选择文件路径, 点击 **Browse**, 打开 **TissueFAXS** 扫描文件(后缀 .aqproj)。

Regions 列表 (图 3-2.1.4), 不需分析的 **Region** 可不勾选。右侧为玻片 **Preview** 图。

可选择图像 **regions, subregions** 类型 (图 3-2.1.5):

- **Import TissueFAXS regions:**
导入扫描软件中自动识别或手动圈选的 **regions**。
- **Import TissueFAXS logical groups:**
适用 **TMA**, 扫描时系统定义同 **group** 样本点被视为为一组。
- **Import TissueFAXS subregions:**
导入扫描软件或看图软件中定义的 **subregions**。
- **Create Group of ROIs from TissueFAXS categories:**
将属于同一 **category** 的 **subregions** 定义为同一 **group**。

2.1.2 打开已经存在的分析文件

若查看已经分析过的数据可直接点击

Open Existing Project (图 2-2.1.2), 选择目的文件 (图 4), 点击 **Open**。



图 1



图 2

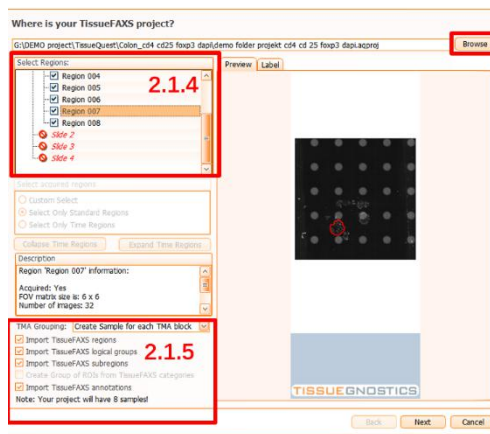


图 3

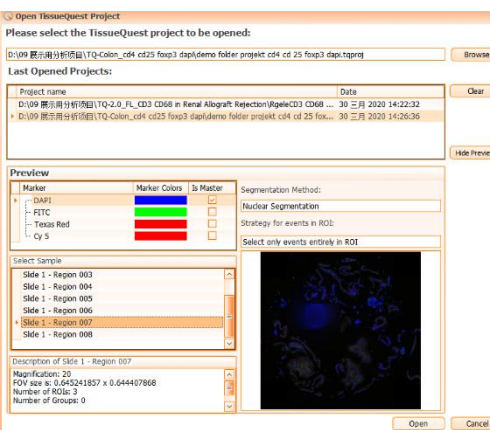


图 4

2.2 生成分析文件

TissueQuest 将会生成一个分析文件，该界面（图 5）设置此分析文件名称及保存位置（一般无需更改，名称默认与扫描文件相同，保存位置默认为扫描文件所在文件夹）。点击 **Next**。

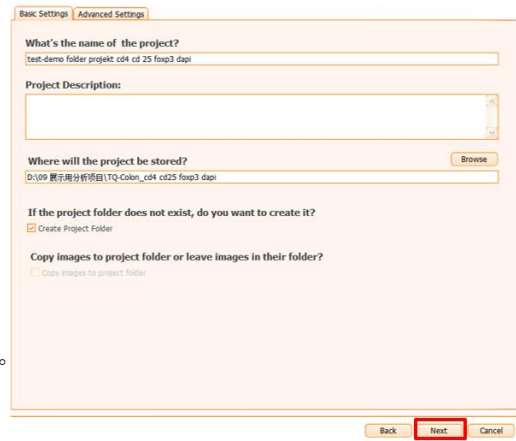


图 5

2.3 自定义 marker 信息

根据样本扫描时定义的 marker 信息，系统自动生成样本各 marker（图 6-2.3.1），标记细胞核的 marker type 设为 **master** 如 (DAPI)，其余为 **Original**，可设置 marker 荧光伪彩。点击下拉箭头进行更改。

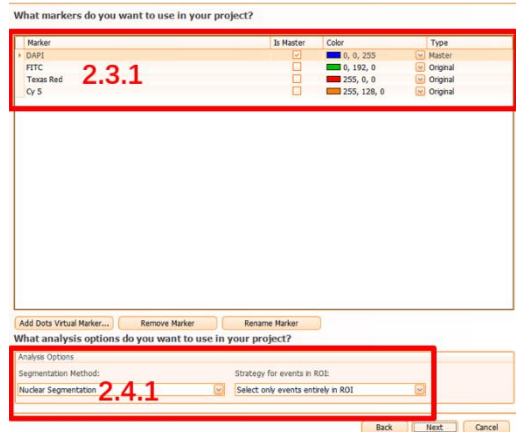


图 6

2.4 选择分析选项

两类分析选项可供选择（图 6-2.4.1）

Segmentation Methods:

Nuclear Segmentation:

默认选择，进行单细胞识别为基础的分析

Total Area Measurements:

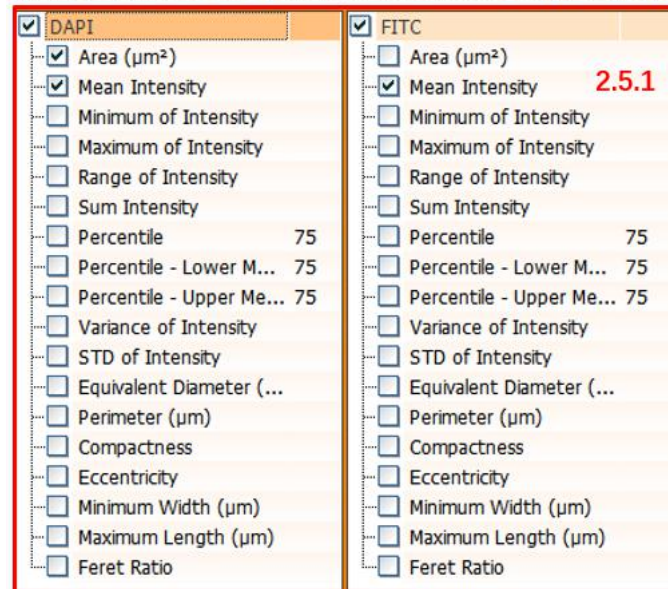
选择可用于测量某种 marker 着色总面积的分析。

Strategy for events in ROI:（默认即可，有需要更改）

2.5 选择分析参数

每个 marker 提供 18 种参数，软件自动进行每个细胞核、质或膜识别后，量化统计其选择参数范围（图 7-2.5.1）。

What parameters do you want to measure in your project?



参数注解:

Area: 面积

Mean Intensity: 平均光密度。

Minimum\ Maximum of Intensity: 最低\高光密度值。

Range of Intensity: 光密度值范围 (max-min)。

Sum Intensity: 所有像素点的光密度值之和。

Percentile (75%): 低于像素灰度值 75%。

Percentile-Lower\Upper (75%): 高于\低于平均灰度值的 75%。

Variance\STD of Intensity: 该 marker 染色强度方差\标准差

Equivalent Diameter: 同该 marker 范围面积相同的圆的直径。

Perimeter: 圈定范围的周长。

Compactness: 该值大小 0-1，标准圆形的值为 1，越接近于圆，值越趋近于 1。

Eccentricity: 该值范围 0-1，越接近于圆，值越趋近于 0。

Minimum Width: 圈定范围图形的短轴。

Maximum Length: 圈定范围图形的长轴。

Feret Ratio: 短长轴比值



What diagrams do you want to include in your project?

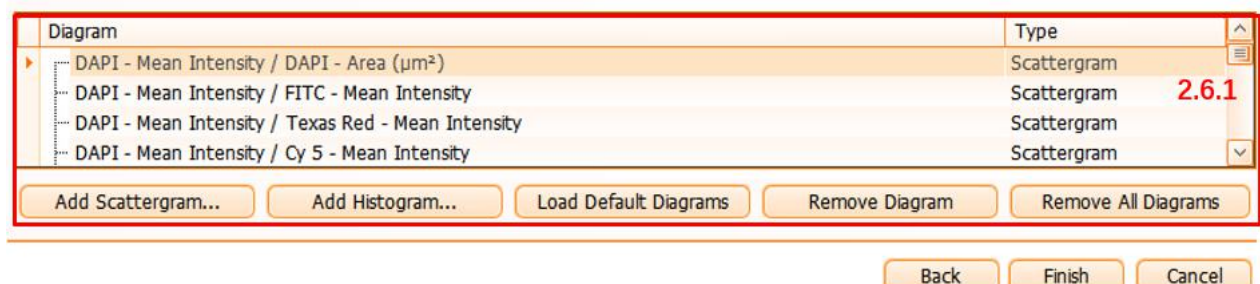


图 7

2.6 选择输出表格

这可增加、删除散点图 scattergram 和直方图 Tissuegram(图 7-2.6.1)。

2.7 进入分析界面

至此完成前期设置, 点击 Finish 进入分析页面。点击 Finish 后, 弹出如下界面(图 8)。

3. 分析参数设定

完成上述图像导入步骤, 选定目标区域 (ROI) 进行分析。为节约时间也可选定 ROI (或多个) 进行分析。为节约时间也可选定 ROI (或多个) 进行参数预调试, 调试完毕应用到整个样本。

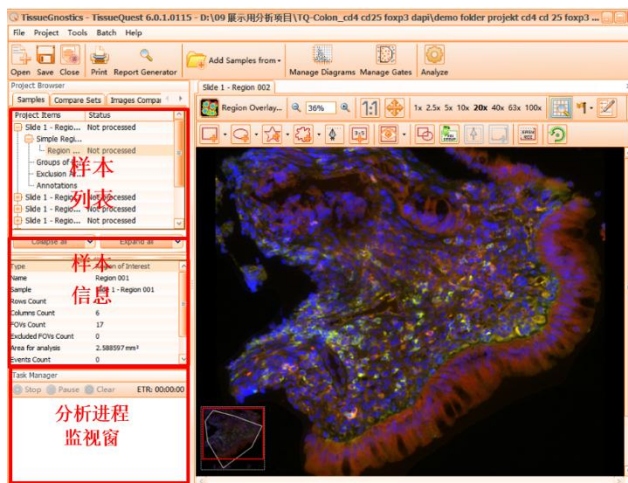
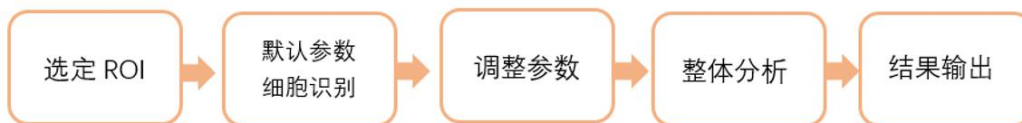


图 8



3.1 选定 ROI

四种 ROI 圈选工具: 矩形、圆/椭圆、折线、任意形状 (图 9-3.1.1), 可在图像上进行圈选。选定 ROI 会自动排列在样本列表内, 我们可以在列表处直接双击或者右键 ROI, 选择

Show in Detail Window (图 9-3.1.2), 软件会弹出参数设定窗口, 进行该 ROI 参数设定。

3.2 默认参数细胞识别

首先点击分析按钮 (图 10), 进行细胞预识别 (可在分析进程监视窗查看分析进度)。用默认参数进行初步运算, 待运算完成, 视结果进行二次调整。

3.3 识别结果浏览

在分析窗口左上角区域有如下菜单, 包括 Original (原始图像), 各荧光单通道 Markers, 例如 DAPI、CY5 等, 可点击进行识别结果的浏览: 查看方式包括: Shades、Labled、Shade Overlay 和 Color Overlay 可选择, 浏览效果如下。

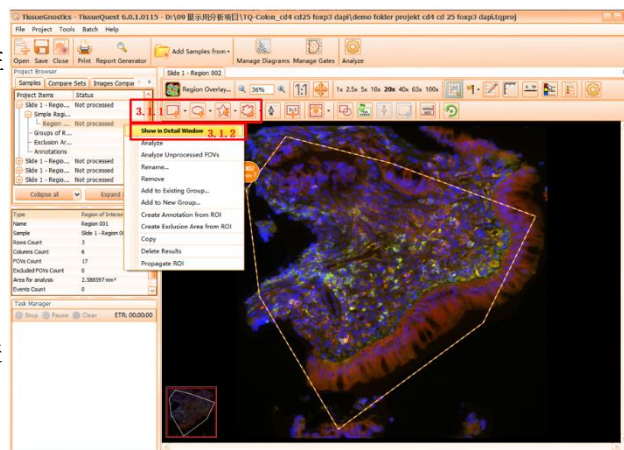


图 9

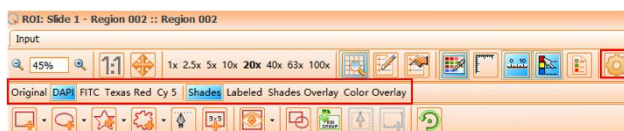


图 10

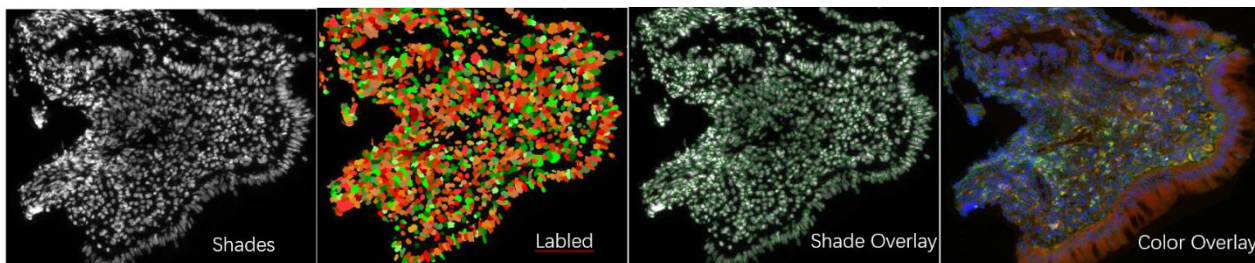


图 11

3.4 调整参数

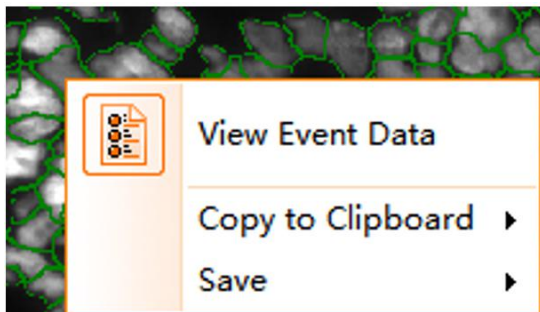
根据细胞预识别结果进行参数调整。按钮分别为设定的 Markers。分别点击 DAPI (Master Marker, 细胞核识别) 或其他 Markers (Original Marker, 细胞质识别) 按钮, 二者的子菜单不同 (图 12-3.4.1, 图 14-3.4.2), 可调整参数改变细胞识别结果, 参数示意如下:

注: 在预识别之后, 观察图像识别结果, 如果想把某些核删掉, 可在该核上点击右键, 选择 View event Data, 弹出窗口, 可查看细胞核的大小和染色强度 (图 13), 用于设置参数删除目的细胞。

Markers			
DAPI	FITC	Texas Red	Cy 5
Nuclear Segmentation			
Nuclei Size	6	用于定义细胞核大小， 根据识别结果调整。	
Remove small-sized objects	2	增大该值， 删除小的细胞核。 3.4.1	
Remove weakly stained obj...	0	增大该值， 删除染色较弱的细胞核	
Automatic Background Thr...	Yes	细胞核识别的阈值设定， Yes: 软件自动在 设定	
Threshold Range	[3, 80]	阈值范围内识别； No: 手动设定固定阈值。	
Virtual Channel	no	默认为 No。 Yes: 两个核染 Marker 信号叠加。	
Post Processing Order	Remove, Merge	识别出的相邻的细胞核， 可设置删除	
Remove Labels	No	(Remove) 和融合 Merge 两种操作的	
Use Merging Rules	No	前后顺序。	

图 12

Post Processing Order	Remove, Merge	
Remove Labels	Yes	可删除识别错误的细胞核。不想使用的选项设置为 Do not use
Smaller Than	6.47 μm^2	面积小于该设定值的细胞核将被删除。
Larger Than	323.6 μm^2	面积大于该设定值的细胞核将被删除。
Weaker Than	20	染色强度小于该设定值的细胞核将被删除。
Stronger Than	do not use	染色强度大于该设定值的细胞核将被删除。
Use Merging Rules	Yes	细胞核被识别为两个， 可使用 merge 功能使其融合到一起。
Max Combined Area	323.6 μm^2	融合之后最大可接受的细胞核的大小。
Max Involved Compactn...	0.9	设定待融合细胞核的 Compactness 值，小于该值进行尝试融合。
Group Max	4	定义最多几个相互接触的核 mask。
Min Resulted Compactness	0.6	设定新核 mask 的 Compactness 值。大于该值融合成功。



Event Data	
Property	Value
Fov Id	000001
Event label	583
DAPI - Area (μm^2)	28.984
DAPI - Mean Intensity	81.68824
FITC - Mean Intensity	0
Texas Red - Mean Intensity	38.21608

图 13

Markers			
DAPI	FITC	Texas Red	Cy 5
Nuclear Segmentation			
Use Ring Mask	No	以细胞核轮廓为起始， 向内、 外扩增， 形成 Ring， 作	
Use Identified Cell Mask	Outside	为细胞质 marker 统计区域。有内径 (Interior Radius)、	
Max Growing Steps	3.5 μm	外径(Exterior Radius)两个参数。	
Skip Steps	0 μm		
Use Nuclei Mask	No	正常细胞质的范围形状不规则， 可使用 Identified Cell Mask。	
Automatic Background Threshold	Yes	在识别到的细胞核上， 进行其他标记 marker 的定量。	
Threshold Range	[5, 255]		

图 14

Use Identified Cell Mask	No	
Use Nuclei Mask	No	
Automatic Background Threshold	Outside	只向外寻找 Marker 信号
Threshold Range	Outside & Inside	同时向内、 外寻找 Marker 信号
Use Identified Cell Mask	Outside	
Max Growing Steps	2 μm	在距离细胞核边界多大范围内寻找
Skip Steps	0 μm	跳过多大距离再开始寻找。

可根据下表内容进行各荧光通道细胞质识别的参数设定及调整（图 15）。

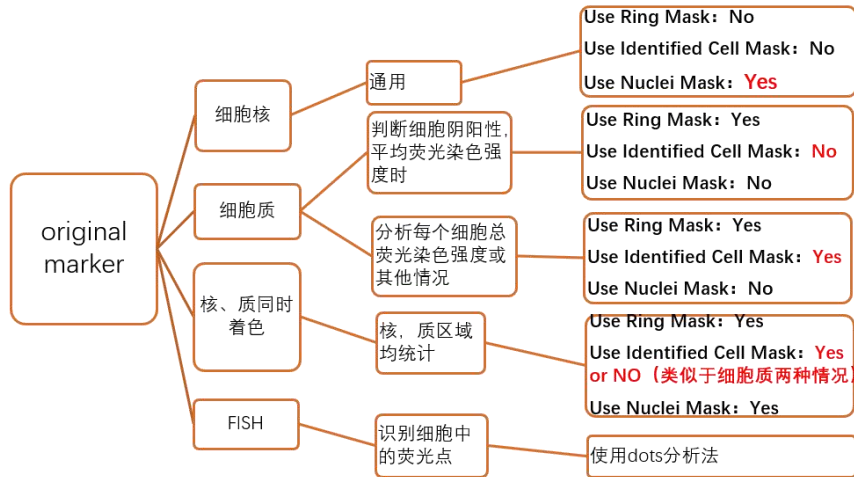


图 15

3.5 整体分析

通过上述步骤，TissueQuest 将选定 ROI 内每个细胞识别并进行定量统计。另外可以在样本列表中点击 进行整个样本的分析统计，或者右键选择 Analyze（图 16）。

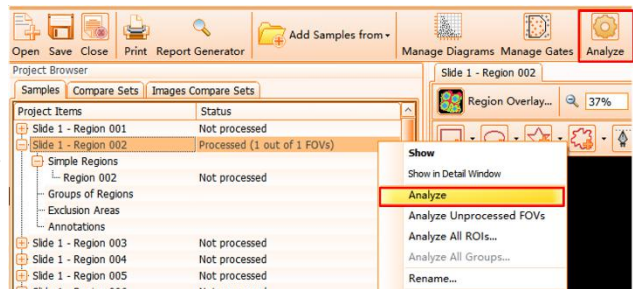


图 16

3.6 结果输出

通过上述步骤，TissueQuest 将每个细胞识别并进行定量统计，结果以多种不同形式输出。

3.6.1 数据图表

主要输出图表形式包含散点图 Scattergram、直方图 Tissuegram 及表格 Table，使用详情如下：

- 散点图 Scattergram（图 17）

每个点代表一个细胞。散点图上点击右键，弹出菜单如下（图 18）。

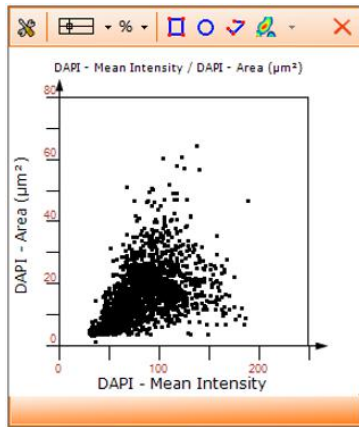


图 17

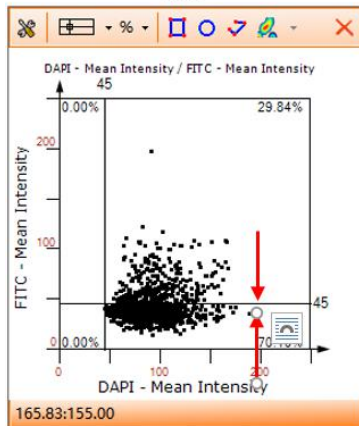


图 19

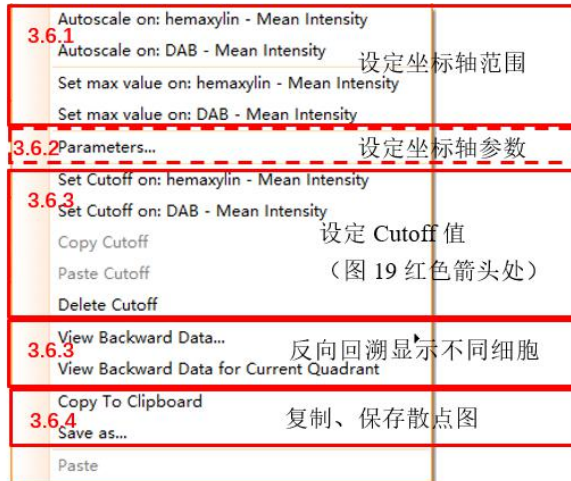


图 18

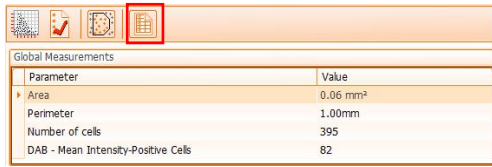


- 直方图 Tissuegram (图 20)

横坐标为选定参数， 纵坐标为细胞数目， 调整同散点图。

- 表格 Table (图 22)

点击右上角 Raw Data 弹出 (图 21)， 每个细胞均有编号， 统计结果以表格形式展示。



Parameter	Value
Area	0.06 mm ²
Perimeter	1.00mm
Number of cells	395
DAB - Mean Intensity-Positive Cells	82

图 21

Event Label	hemax...	DAB - Mean Intensity
6	77.09	83.47
222	77.12	62.77
646	77.13	66.98
296	77.24	67.39
613	77.72	69.02
65	77.94	197.76

图 22

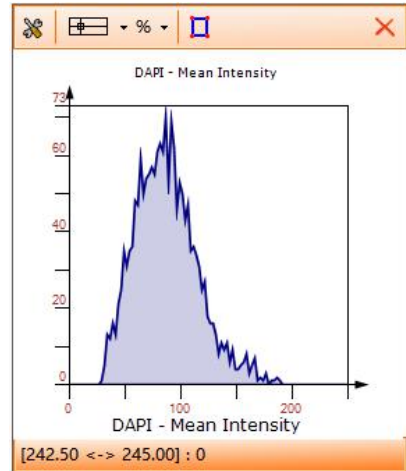



图 20

3.6.2 Cutoff 值

点击  设定 Cutoff 值 (图 23)， 设定完毕， 软件自动显示不同象限细胞比例。 也可在图中直接拖动调整 cutoff 值 (图 19)。

Cutoff 值设定根据：

1. 通过阴性对照样本设定， 分析阴性对照样本后， 根据阴性样本的光密度值设定。
2. 同张玻片上， 查看阴性细胞在散点图位置或者右键 View Event Data 查看平均光密度值。

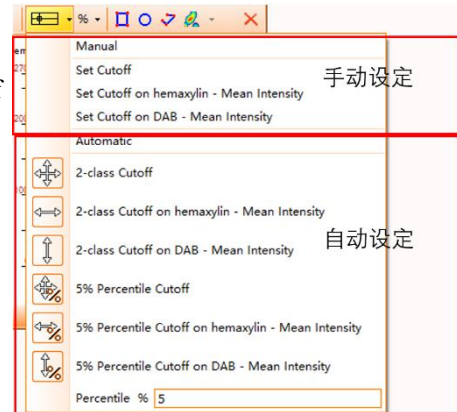




图 23

3.6.3 Gate 设门圈选及再分析

点击图形按钮工具 ， 圈定细胞群。 鼠标移至 gate 框上方 (有颜色变化)， 右键弹出菜单可更改相关设置 (图 24)。

快速对圈定细胞进行再分析步骤， 点击 ， 弹出菜单 (图 25)。

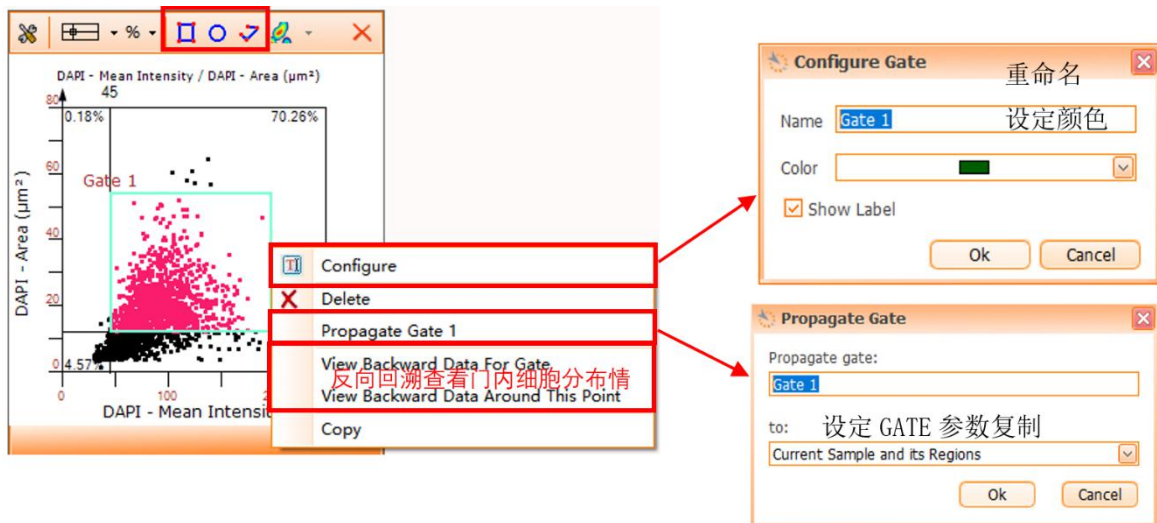



图 24

3.6.4 图表管理

除在 (图 7-2.6.1) 选择生成的图表外， 还可以根据后续需要点击 ， 可添加或删除图表。

3.6.5 正、反向回溯

- 正向追溯

双击图像上任意细胞，细胞在散点图、直方图对应位置闪烁联动（图 26 箭头所指）。

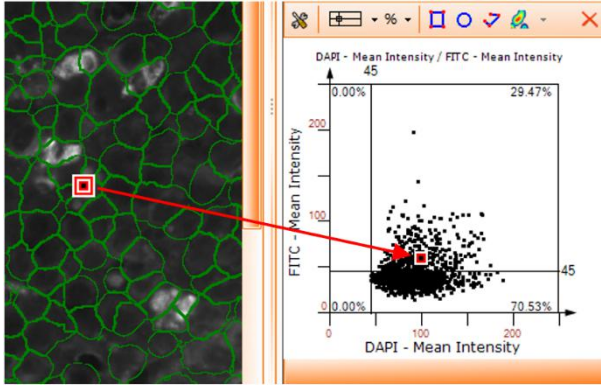


图 26

- 反向回溯

根据设定的 Cutoff 值或 Gate 圈选出的细胞，反向回溯显示不同细胞群（图 18-3.6.3、图 27 红色圈选）

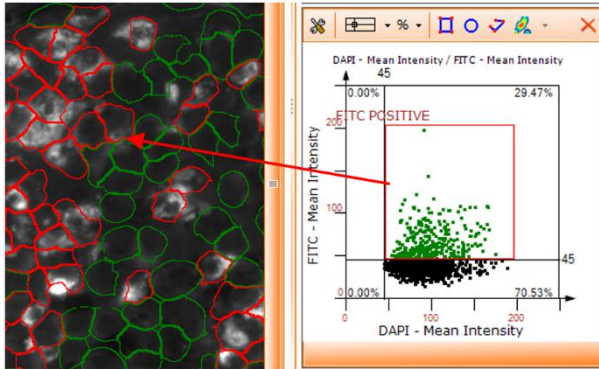



图 27



图 25

3.6.6 分析报告输出

TissueQuest 分析报告的输出方式具有两种类型：系统自动生成数据报告，自定义输出数据表，导出方式如下：

点击待分析样本界面的  Report Generator，选择输出样本及导出项目类型，点击 Create Report，等待数据导出，具有 PDF 等多种文件导出格式（图 28）。

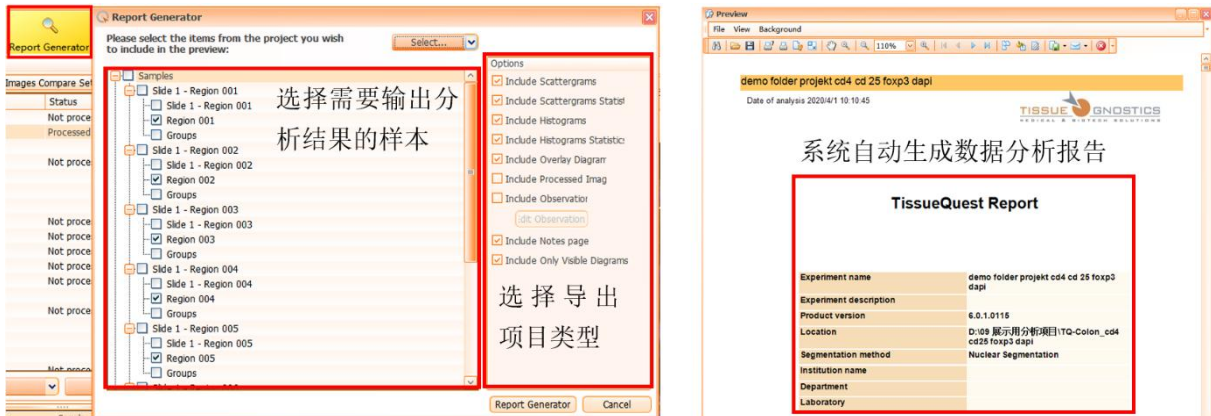


图 28

根据用户需要的分析结果自定义导出数据表，便于统计。点击 **Tools** 选择 **Statistics Report...** 弹出窗口。左侧选定样本，右侧点击 **New Column**，选择需输出的数据，点击 **Fill Report Data** 导出分析数据（图 29），设定完成后点击 **Export**。

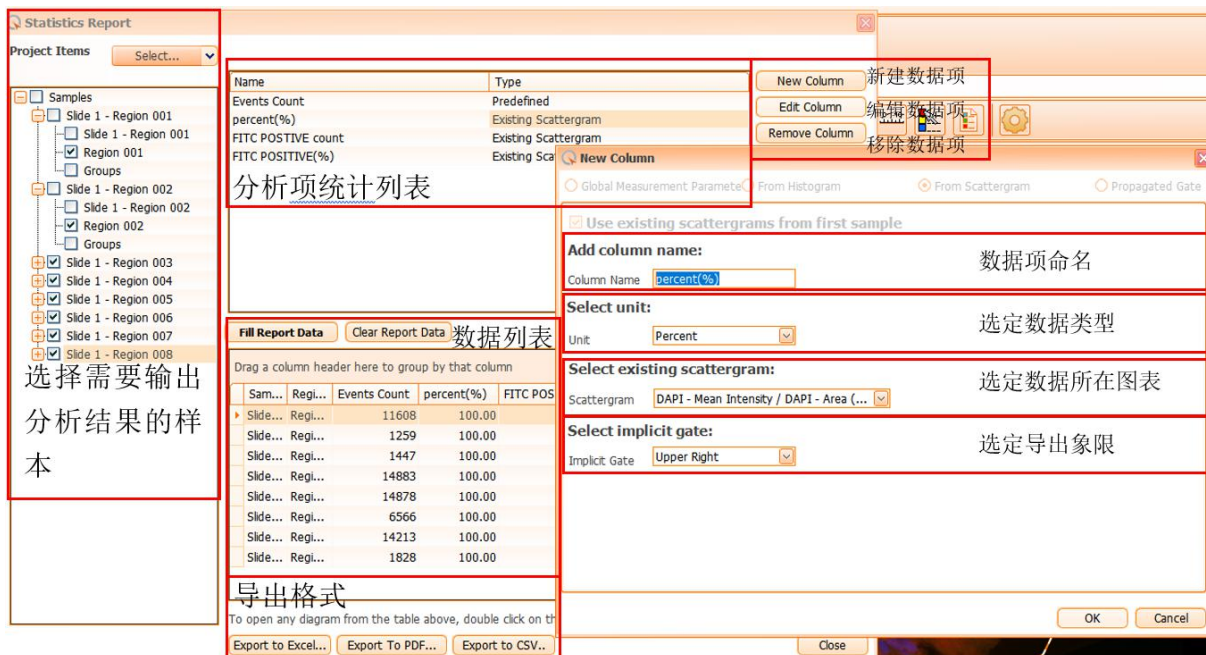


图 29

3.7 Dots 点设置

除以上细胞核、细胞质识别外，TissueQuest 还可以进行对免疫荧光样本的 Dots 点进行识别及数量统计，选择 **Add Dots Virtual Marker** 增加 Dots Marker，并设置其定位于哪个信号通道和重命名，在 Markers 中选定 Dots 大小，具体操作及识别效果图如下（图 30）：

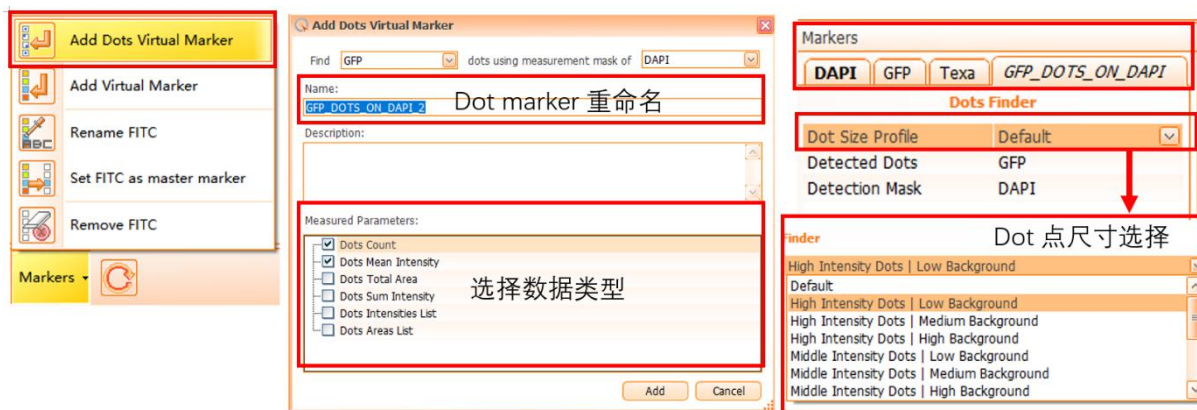


图 30

