HistoQuest 分析软件快速操作指南

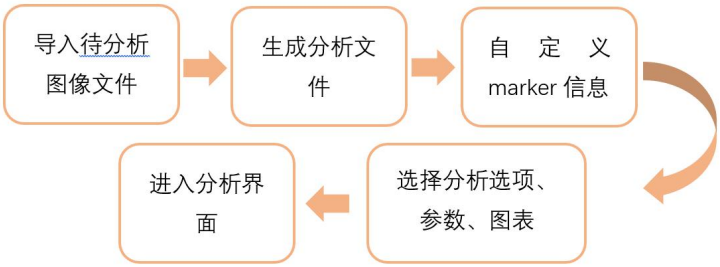
1 开启 HistoQuest

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。

图 1

2 分析前参数选定

HistoQuest 分析前参数选定主要步骤：



2.1 导入待分析图像文件

HistoQuest 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，及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）：

- **TissueFAXS for manual analysis setup**：
  导入单个文件，并进行手动分析设置。
- **Multiple projects for manual analysis setup**：
  导入多个个文件，并进行手动分析设置。

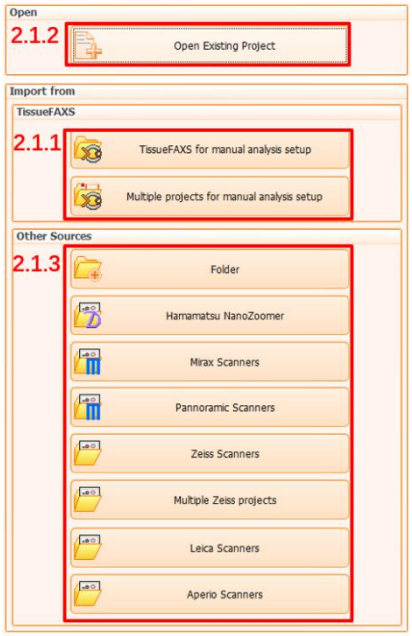


图 2

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 for manual analysis setup 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。

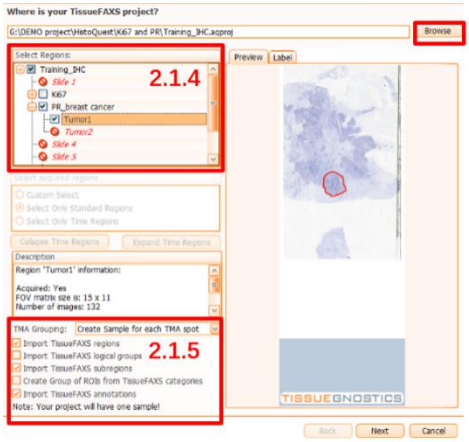


图 3

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，扫描时定义为同 group 样本点被视为一组。
- **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 。

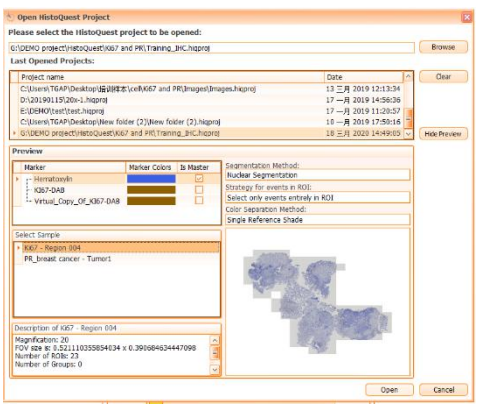


图 4

2.2 生成分析文件

HistoQuest 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

点击 Add Marker ，弹出窗口，输入标记的 marker 名称，输入之后设定 marker 类型（图 6-2.3.1），标记细胞核的 marker type 设为 master 如（Hematoxylin），其他均为 Original。

点击下拉箭头进行更改。

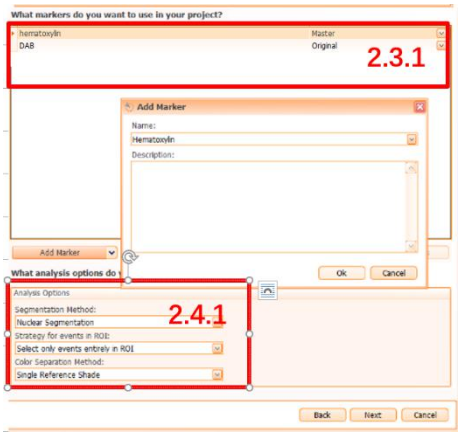


图 6

2.4 选择分析选项

三类分析选项可供选择（图 6-2.4.1）

Segmentation Methods:

Nuclear Segmentation:

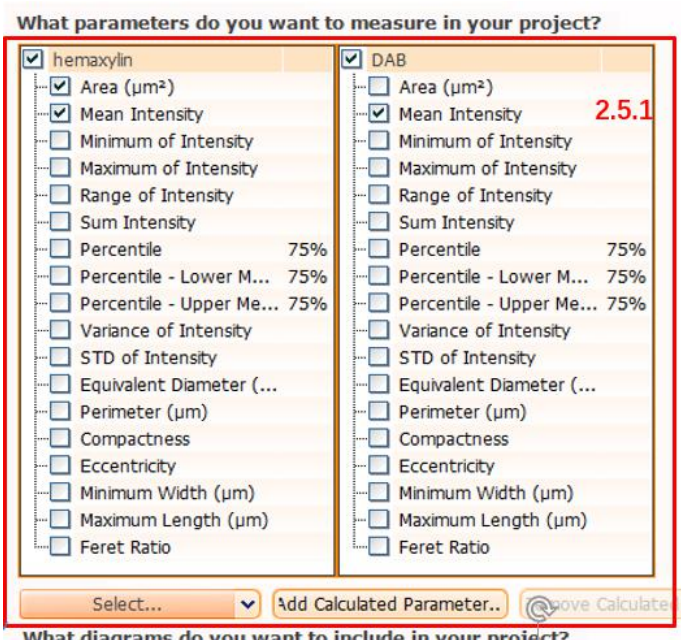
默认选择，进行单细胞识别为基础的分析

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

Color Separation Methods（默认即可，不需更改）

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）。



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

图 7

2.6 选择输出表格

这可增加、删除散点图 scattergram 和直方图 histogram(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)。

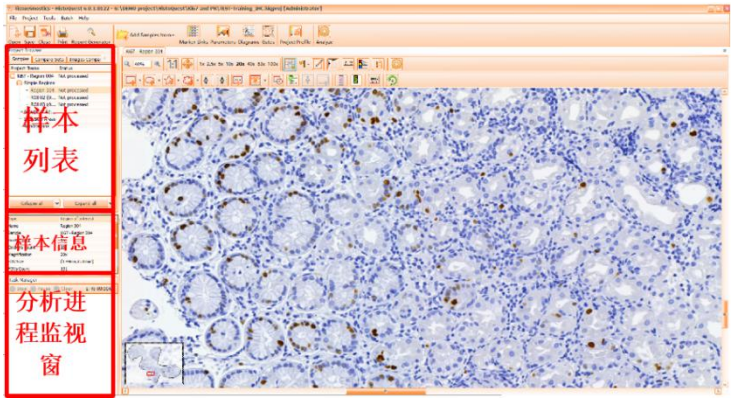


图 8

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）进行参数预调试，调试完毕应用到整个样本。

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。

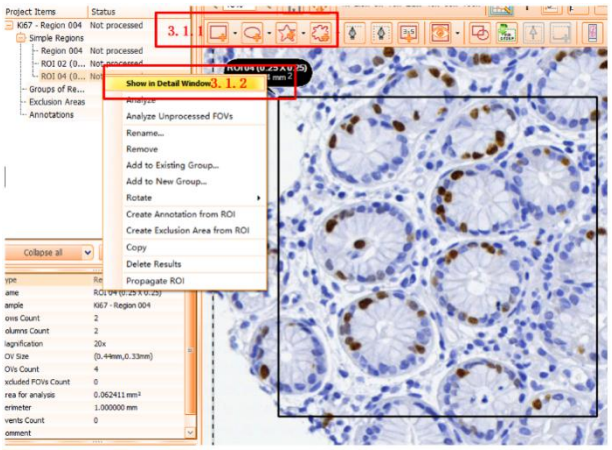


图 9

3.2 信号拆分

点击 Autodetect（图 10-3.2.1），移动鼠标至图像上，会自动出现一个可随鼠标移动的框，任意移动至两种颜色均比较明显的区域后，点下鼠标左键，软件自动进行颜色拆分，并弹出拆分结果窗口（图 11）。

可点击 view 进行查看拆分结果，根据拆分情况可勾选、 交换颜色，然后点击 OK 按钮。

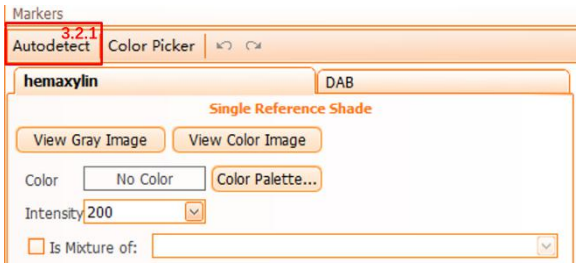


图 10

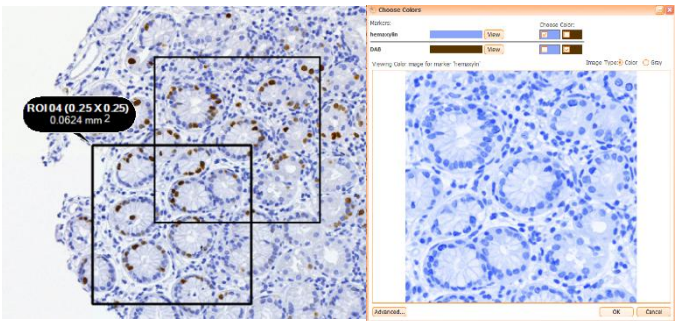


图 11

3.3 默认参数细胞识别

首先点击分析按钮 （图 12），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。

图 12

3.4 调整参数

根据细胞预识别结果进行参数调整。按钮分别为设定的两个 Markers。分别点击 Hematoxilin

（Master Marker，细胞核识别）或 DAB（Original Marker，细胞质识别）按钮，二者的子菜单不同（图 13-3.4.1，图 14-3.4.2），可调整参数改变细胞识别结果，参数示意如下：

图 13

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 14），用于设置参数删除目的细胞。

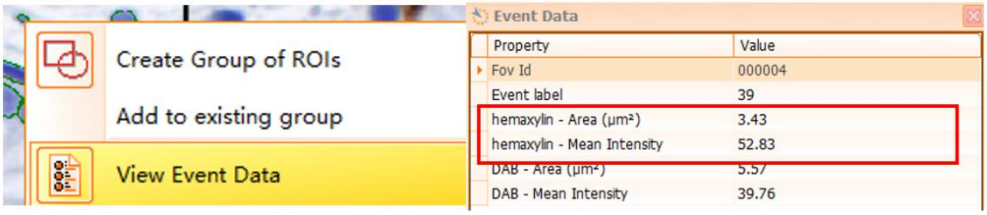


图 14

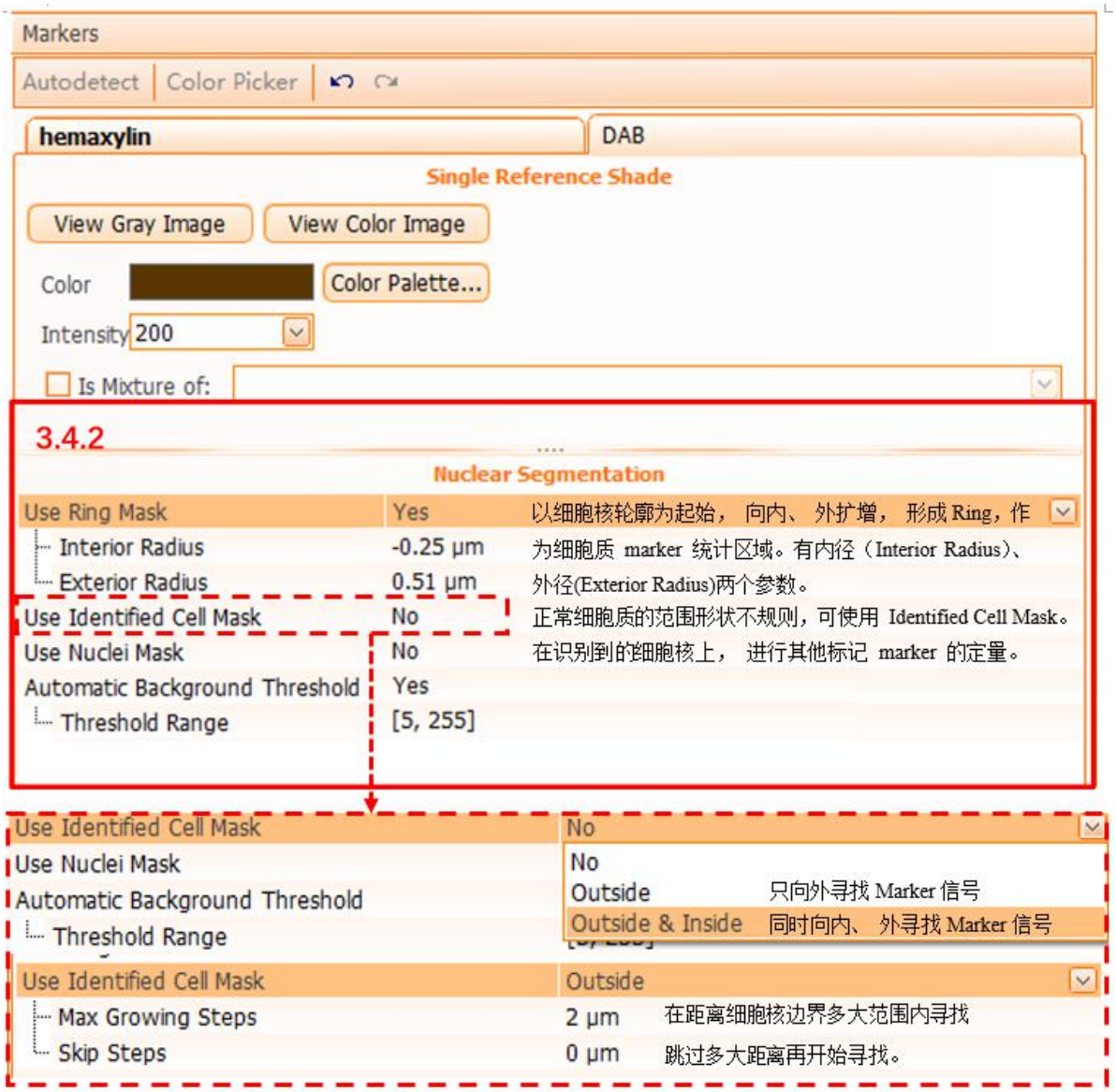


图 15

3.5 整体分析

通过上述步骤， HistoQuest 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。

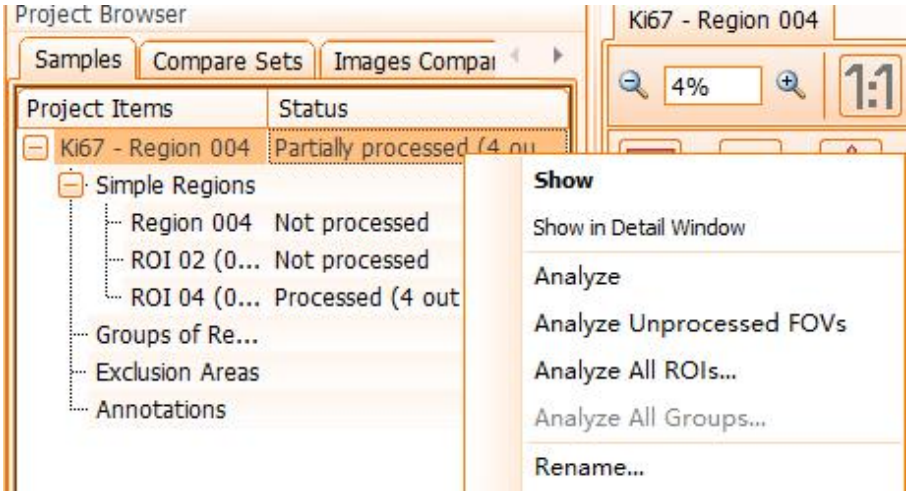


图 16

3.6 结果输出

通过上述步骤， HistoQuest 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 Histogram 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）：

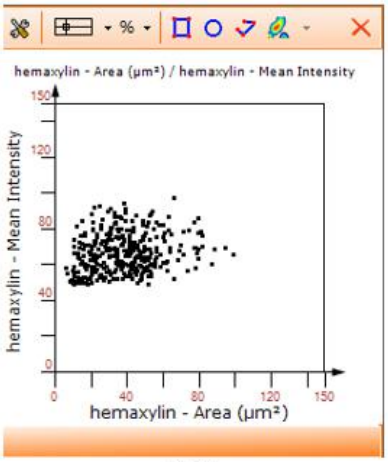


图 17

图 18

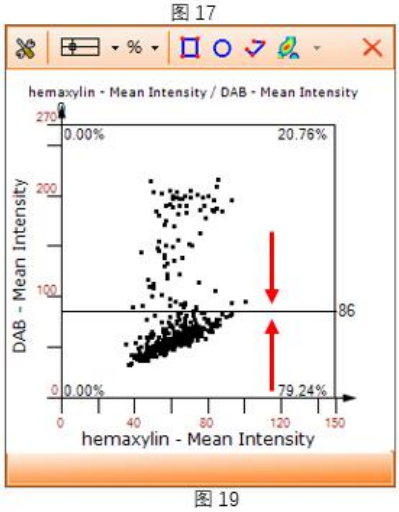


图 19

- 直方图 Histogram（图 20）

  横坐标为选定参数， 纵坐标为细胞数目，调整同散点图。

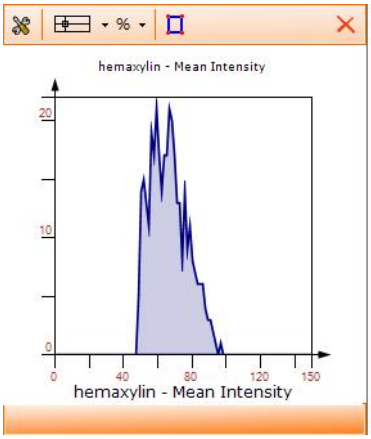


图 20

- 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。

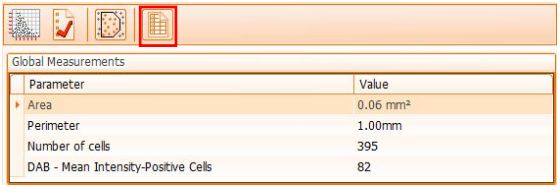


图 21

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

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。

可在图中拖动调整 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。

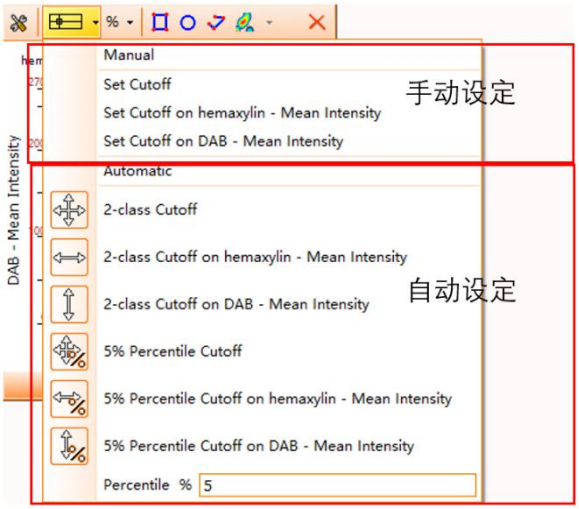
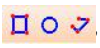


图 23

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）。

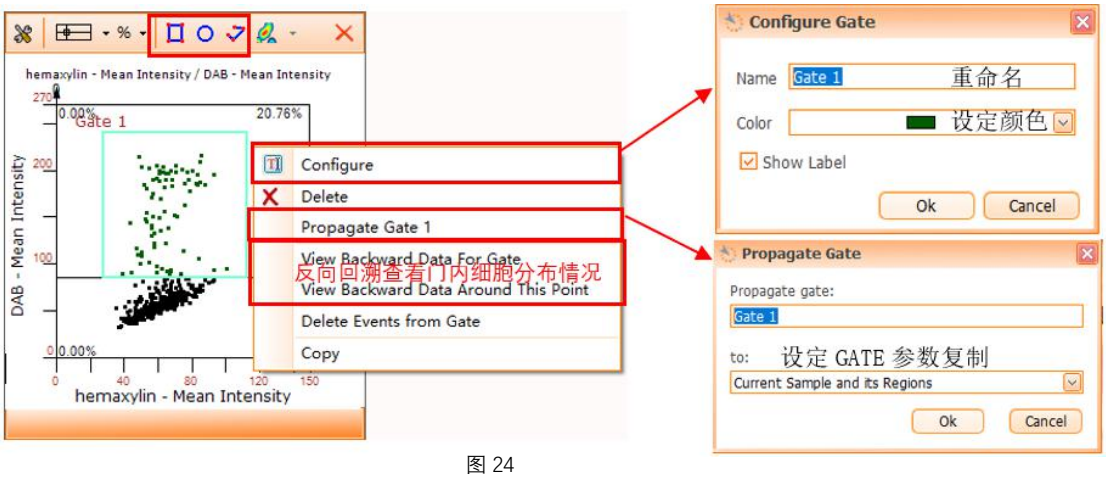


图 24

快速对圈定细胞进行再分析步骤，点击 ，弹出菜单（图 25）。

图 25

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）。

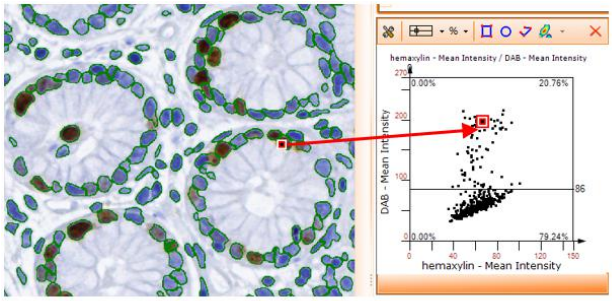


图 26

- 反向回溯

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

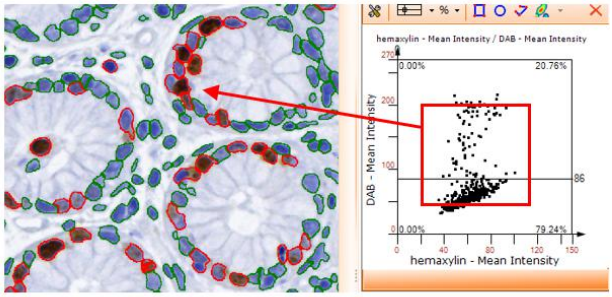


图 27

3.6.6 分析报告输出

HistoQuest 分析报告的输出方式具有两种类型：系统自动生成数据分析报告，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）。

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 出分析数据（图 29），设定完成后点击 Export。

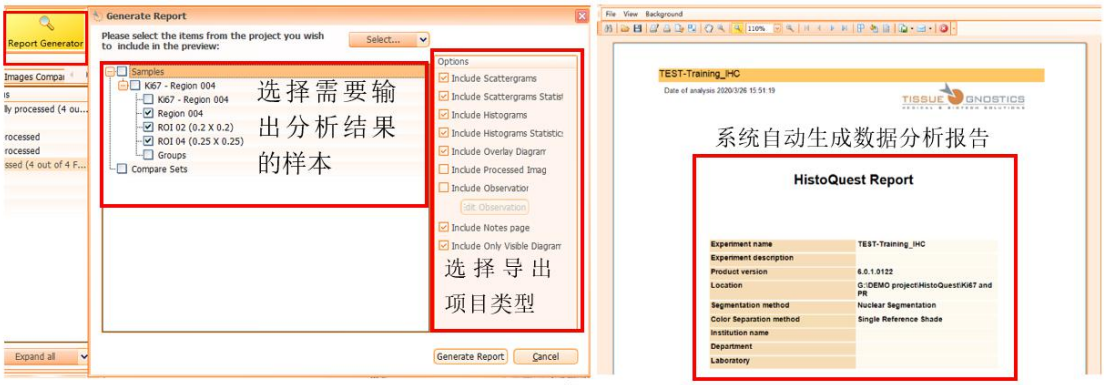


图 28

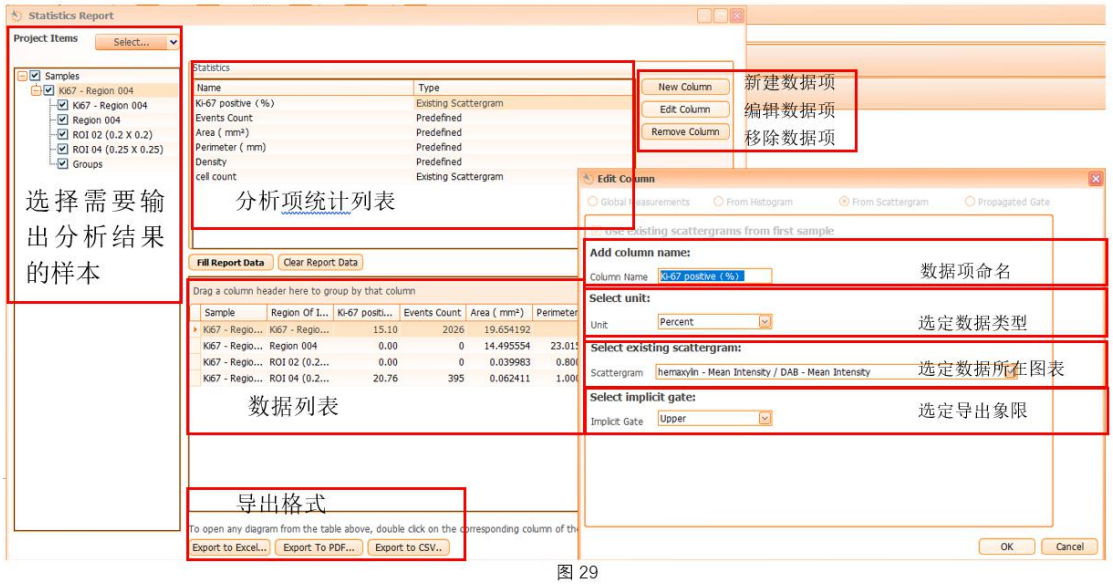


图 29