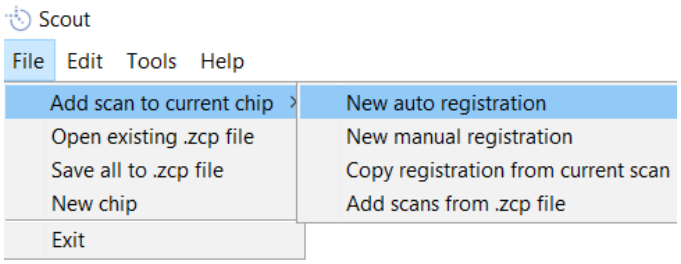
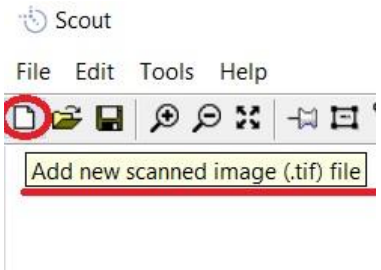
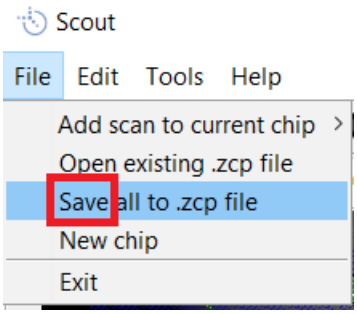
Scout2.1.10 软件数据分析指南

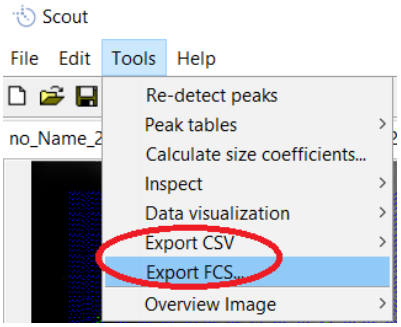
1) Scout软件兼容64bit，16GB RAM的Windows7以上的电脑。
2) 软件下载地址：http://www.proteinsimple.com/scout/downloads/
3) 安装完成后，双击图标，打开Scout软件。
4) 如需打开保存的 .tiff 文件有以下两种方法：File-Add scan to current chip-New auto registration或者点击图标Add new scanned image.



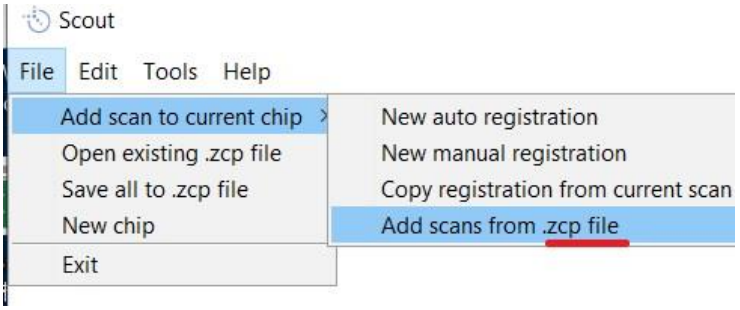


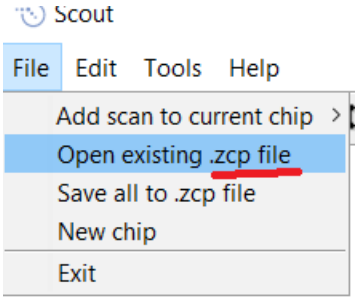
5) 如果您对.tiff的文件进行了修改，可以将它保存为.zcp文件(File-Save all to .zcp file)，方便下次直接调取，否则需重新分析结果，且该软件没有返回键。另外您也可以将其导出成.csv和.fcs文件(Tools-Export CSV/FCS)，用其他软件打开，进行后续分析。





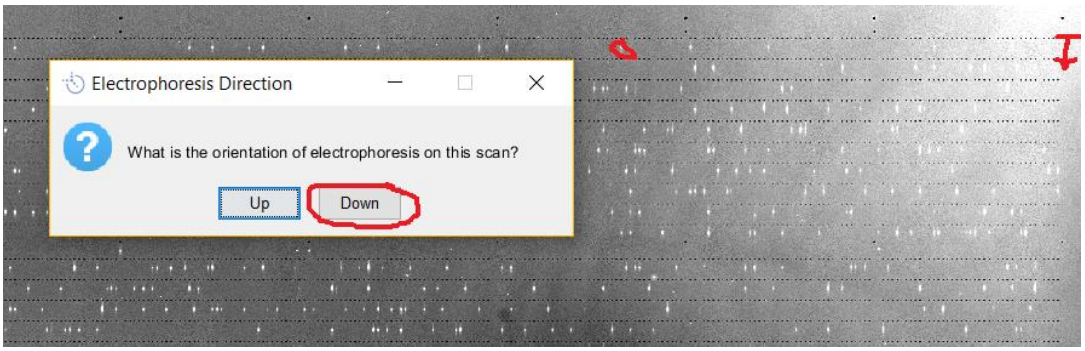
6) 如需打开.zcp文件有以下两种方法：File-Add scan to current chip-Add scans from .zcp file或者File-Open existing .zcp file.



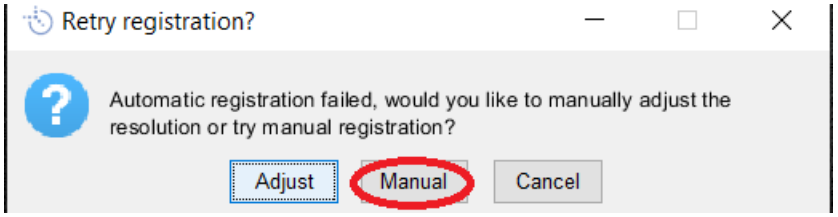


7) 判定蛋白迁移方向。可通过查看最上面一排样品的迁移方向判断，如果信号在最上面一排孔的上面，选择 Up；如果在最上面一排孔的下

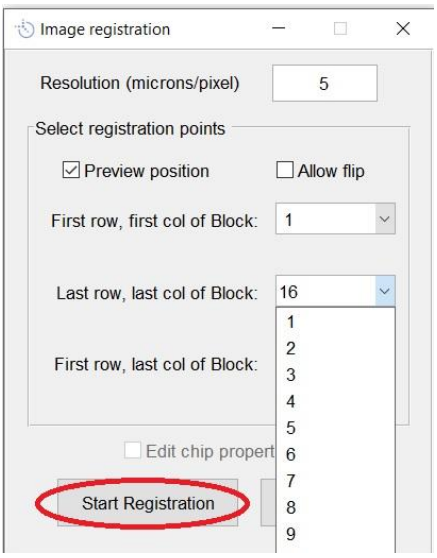
面，选择Down。

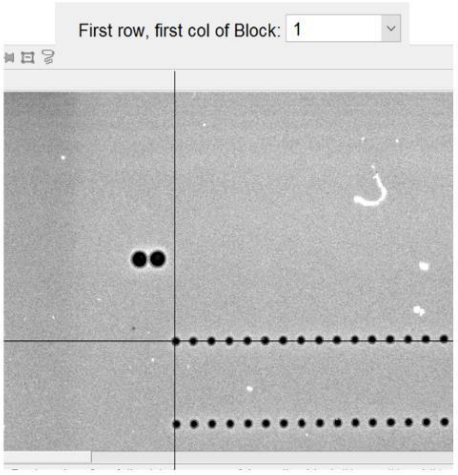


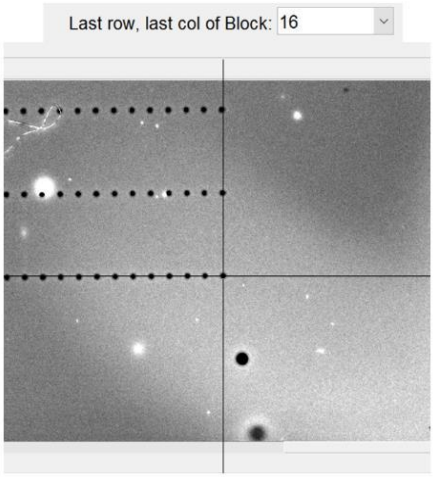
8) 如果自动校正失败，会弹出如下对话框，此时您需要选择Manual手动校准。



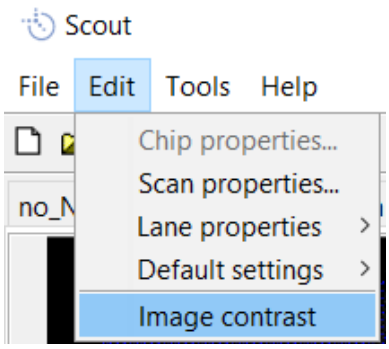
9) 手动校准时您可以选择电泳方向，以及选择采用哪两个block的第一排和最后一排作为基准，然后点击Start Registration，block之间距离越远，校准效果越好。





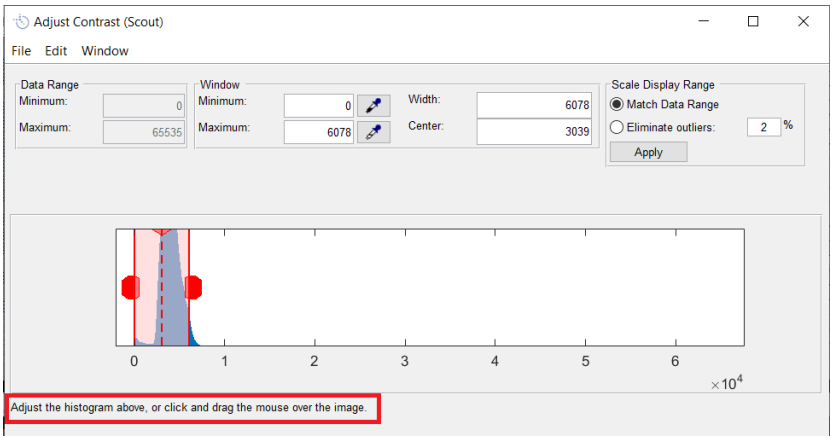


10) 如果图片太暗不便于定位，您可以调整图片对比度

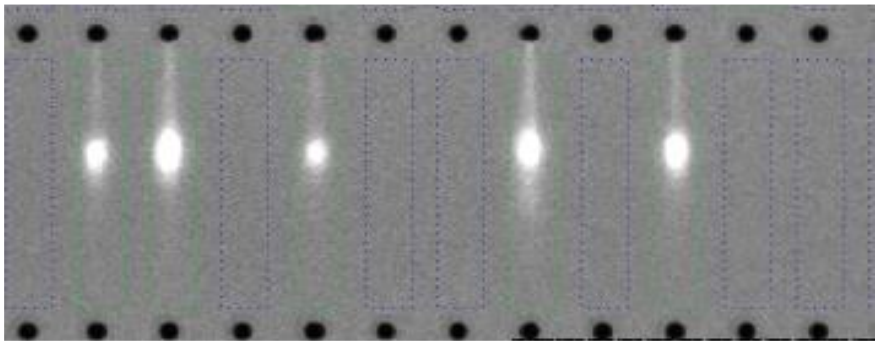


Edit-Image contrast.

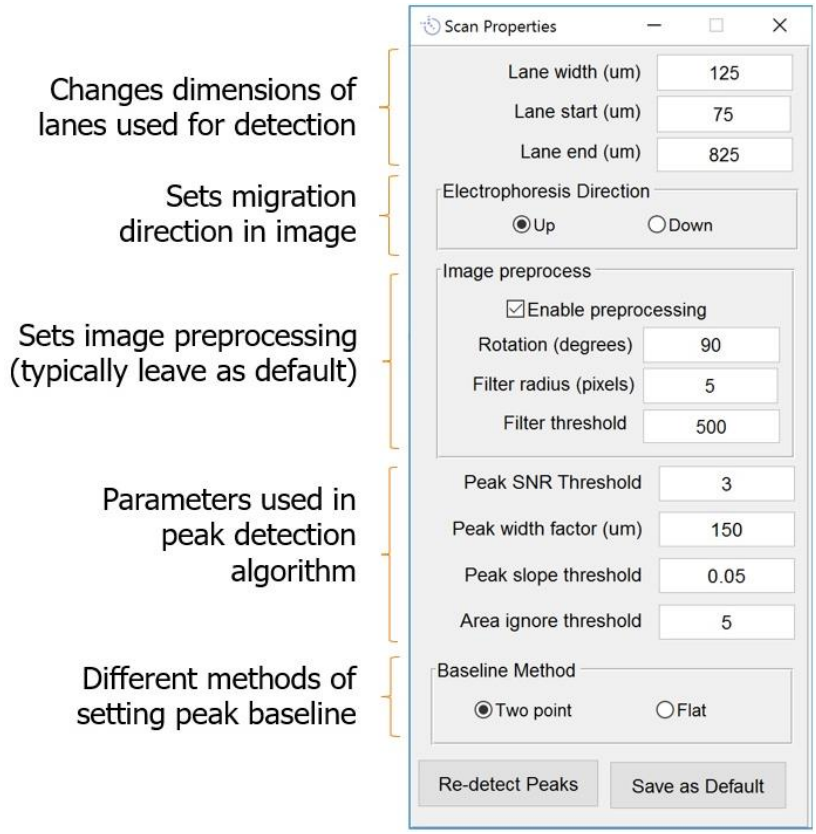
11) 在弹出的对话框中，调整上面的直方图或单击并拖动图像上的鼠标，进行图片对比度调整。



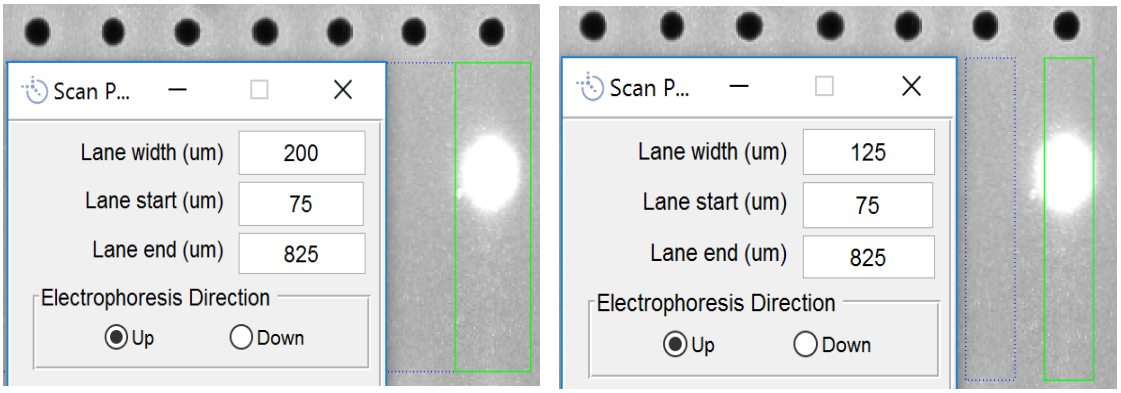
12) Scout软件将自动将有信号的泳道加绿框，无信号的泳道加蓝框。



13) 如需改变某张图片目的峰识别的参数设置，可在Edit-Scan properties修改，如下图。包括泳道起点，终点，宽度；电泳方向；峰宽，信噪比；基线计算方法等。

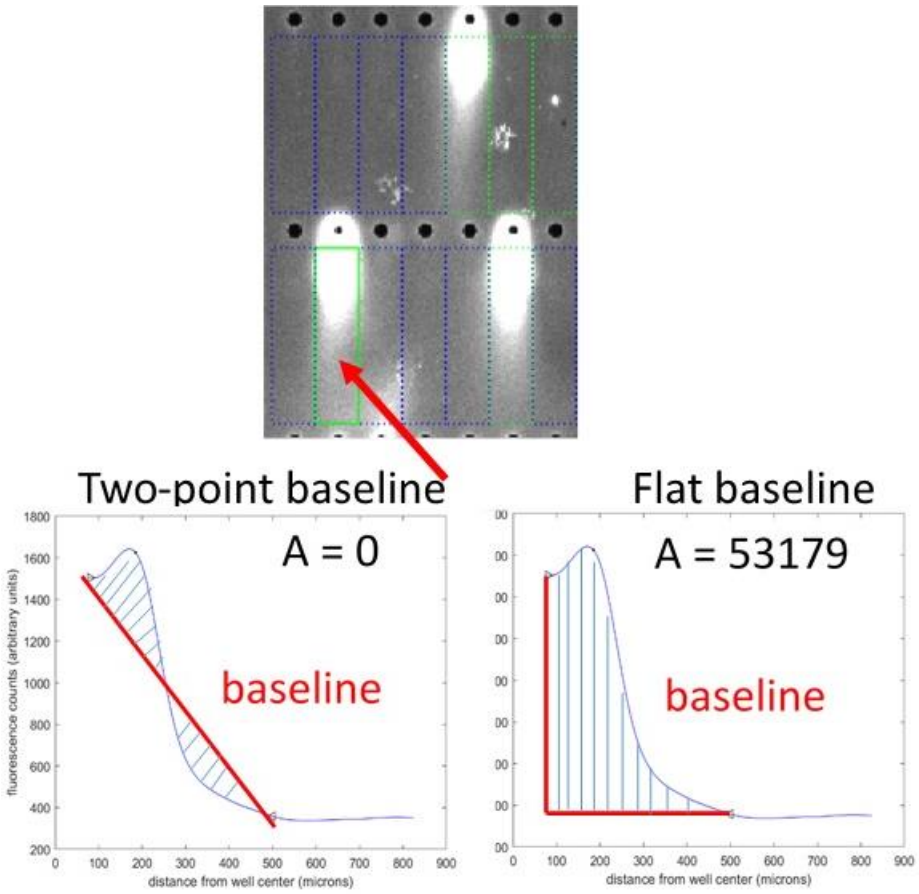


14) 如果信号太强或者跑的太慢太快，超出了绿色边框，可通过lane width/start/end调整泳道的宽度，起点和终点，如下图。

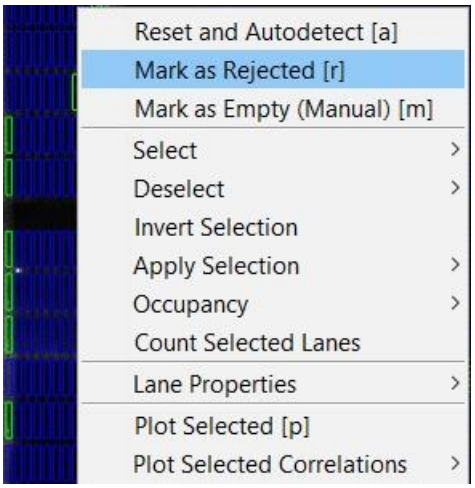


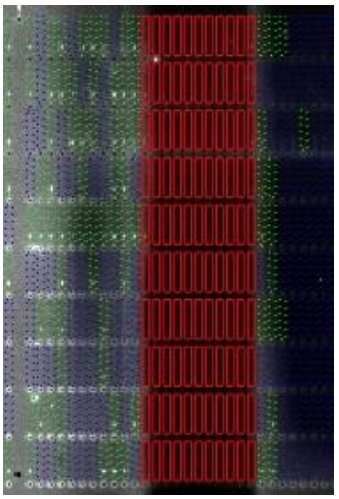
15) 通过调整Peak width factor可更好的识别宽的或者狭长的目的信号。

16) 如果目的信号跑入下一个泳道，上一个微孔正好位于斑点内，为了准确定量，您需要将Baseline Method由默认的Two-point baseline改为Flat baseline。如下图所示，红线即为baseline(基线)，阴影部分为峰面积(表达量)。同一个泳道，采用不同的方法扣背景，最终Area大不相同。

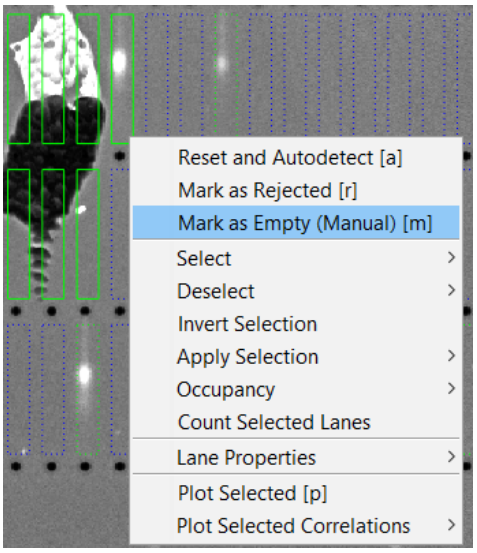


17) 如果采用滤纸轻压的方式将芯片分成不同区域，用于同时分析不同细胞样品或者利用三抗体孵育槽，孵育不同的抗体，那么有些区域属于无效区域，可通过 选中该区域，此时被选中的泳道会自动高亮，点击鼠标右键Mark as Rejected，将其剔除，此时该区域的泳道变为红色。

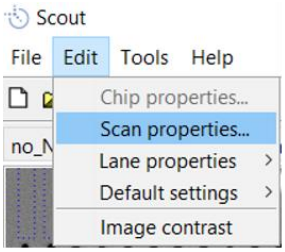


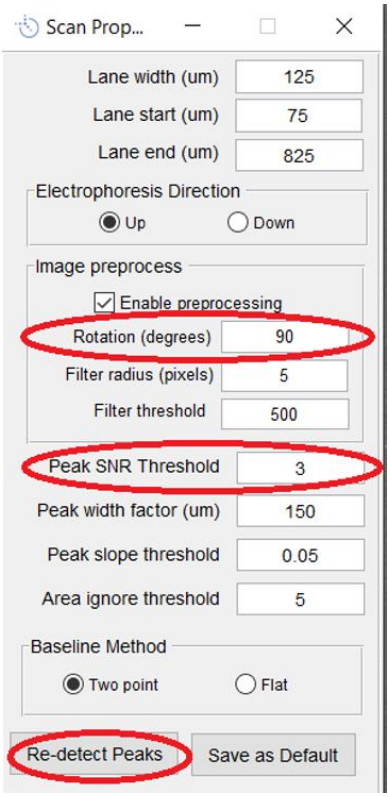


18) 您可以通过  放大或者  缩小，对每个泳道进行人工核对。如果发现某些泳道异常，可以手动剔除或者添加。利用鼠标点击选中单个泳道或者利用  选中多个泳道，此时被选中的泳道会自动绿色高亮，点击鼠标右键Mark as Empty，将其剔除，或者Reset and Autodetect，将其添加。

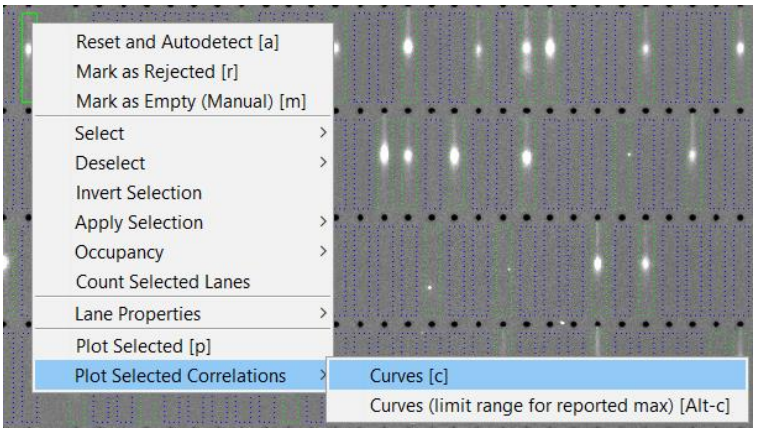


19) 如果异常的泳道太多，手动修改太麻烦，您可以通过修改SNR/信噪比进行批量修改：Edit-Scan properties，在弹出的对话框中修改SNR值，然后点击Re-detect Peaks.

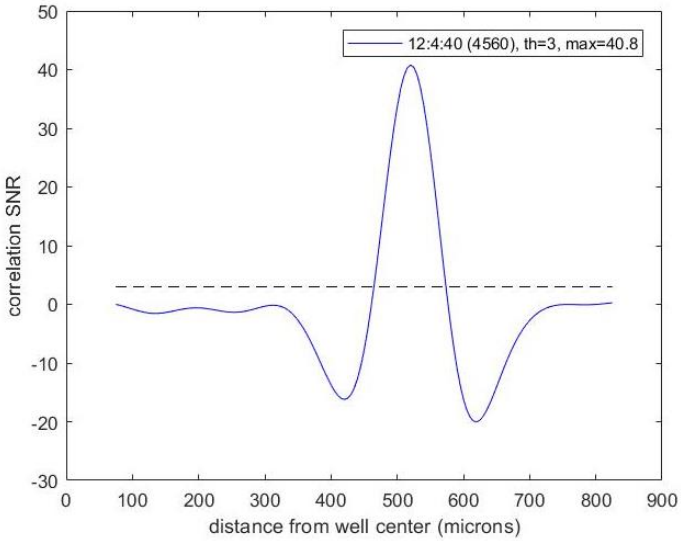




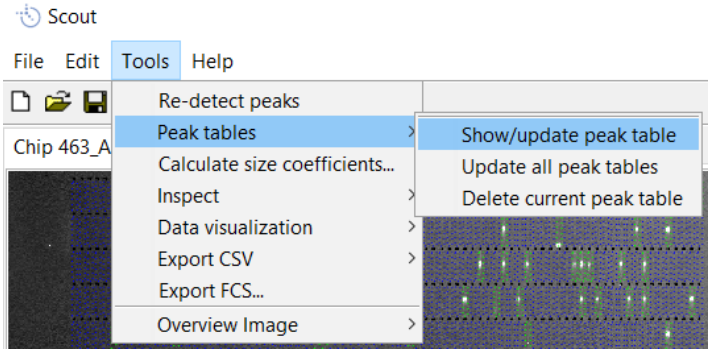
20) 如果不知道SNR值设置为多少比较合适，您可以选择某个有代表性的泳道，点击鼠标右键Plot Selected Correlations-Curves，如右图。



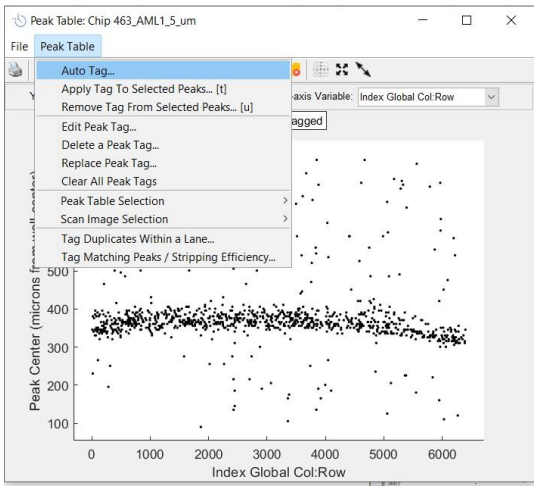
21) 弹出该泳道相对的SNR值，见右图，如果您需要把该泳道剔除，则SNR值需要设置高于其Max值，即41，这时其他比该泳道信号弱的泳道也一并被剔除了。

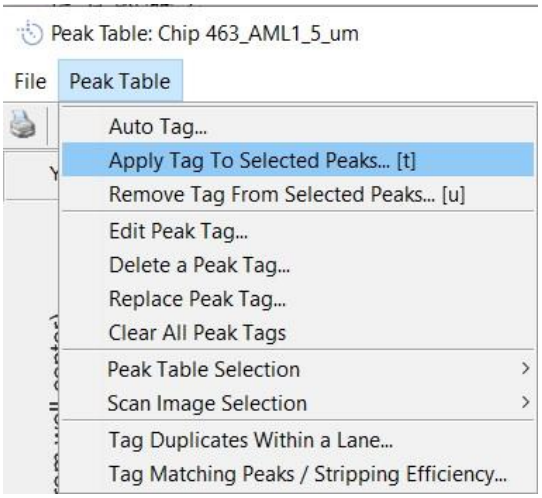


22) 泳道核对之后，点击 Tools-Peak tables-Show/Update peak table。

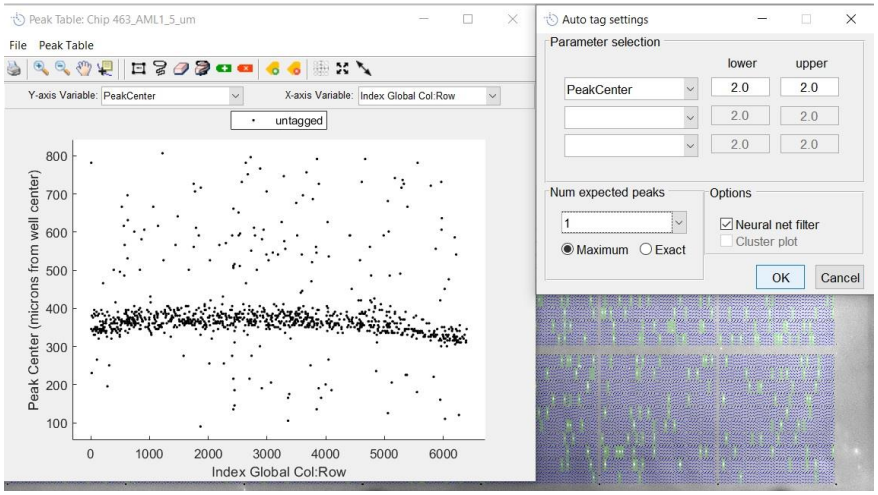


23) 出现信号散点图后，点击 Peak Table-Auto Tag或者点击  把一群Point框进去，然后 Peak Table-Apply Tag To Selected Peaks进行靶信号的命名。



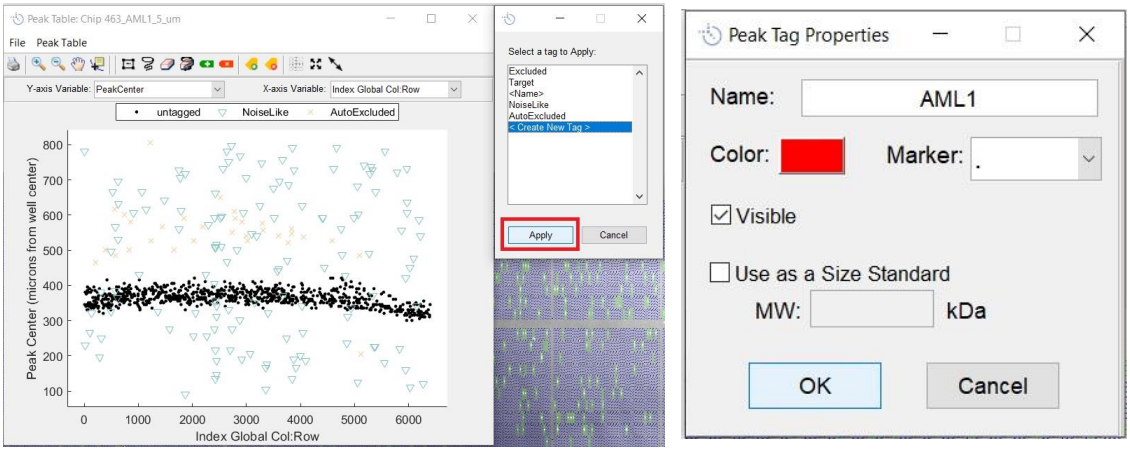


24) 散点图聚类表示同一个靶点信号。右图 Num expected peaks 选择1，表示泳道中有 1 个靶点。左图聚类散点图的上下两侧表示分子量太大或太小的非靶点信号。或者您也可以通过参数设置进行筛选，一般选用Peak Center和Peak Fill Factor两个参数。

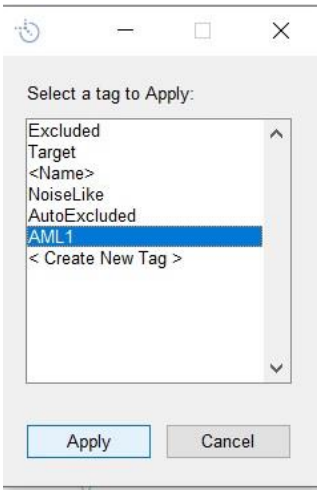


25) 点击<Create New Tag>，然后点击Apply或者直接双击<Create New Tag>给靶点命名。

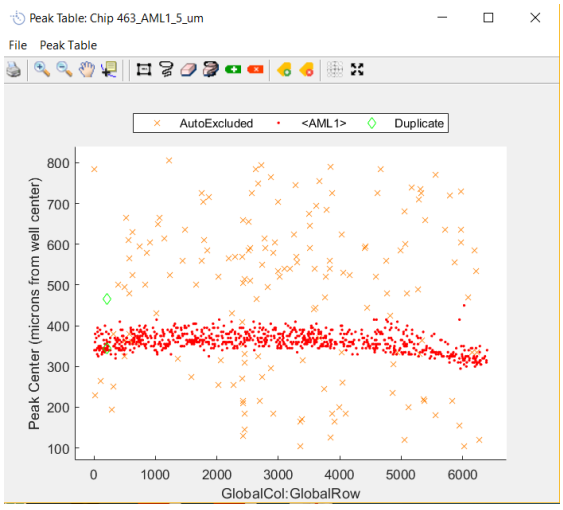
26) 例如Name设置为AML1，点击OK。

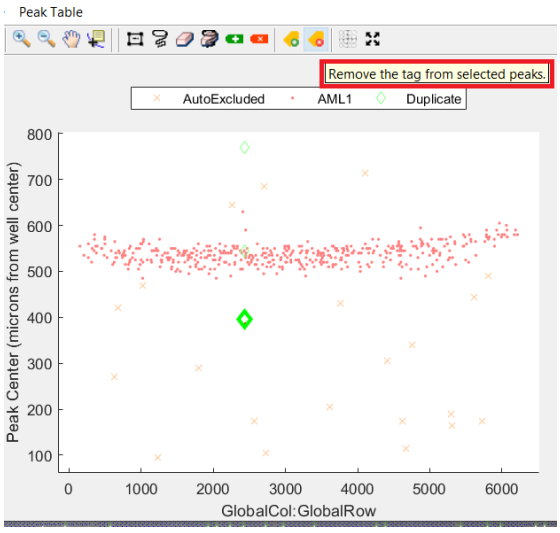


27) 在弹出的对话框中选择之前命名的靶点，并点击Apply。

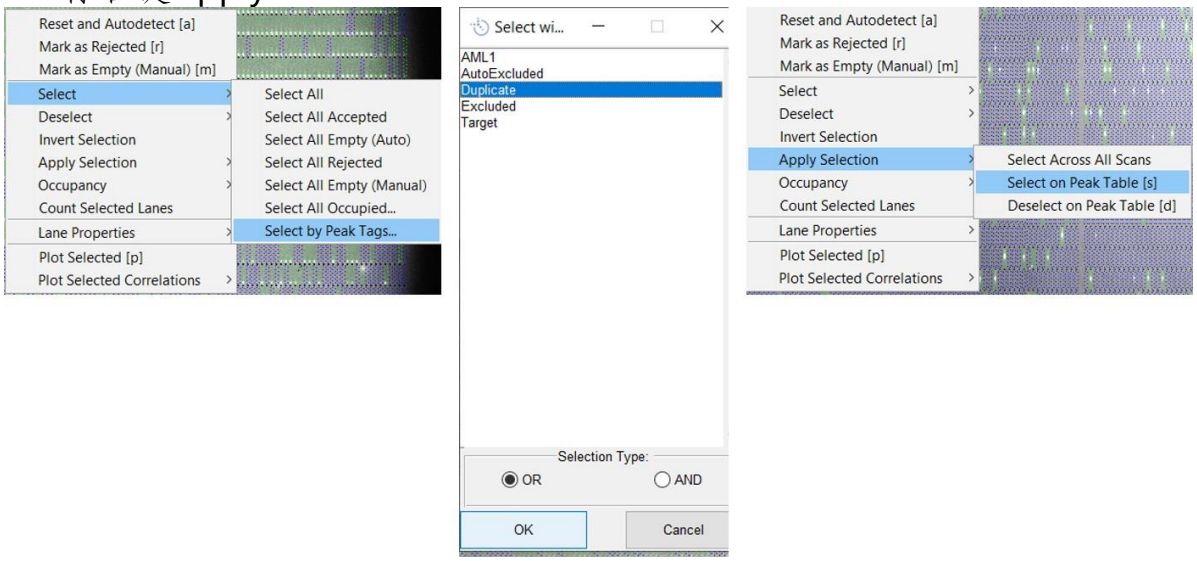


28) 此时散点图如图所示，每一个点相当于传统WB中的一条Band，同一个Lane中可能包含多个Band，即多个Point，当同一个泳道中多个点被命名为一个Tag时，即为 Duplicate。Peak Table-Tag Duplicate Within a Lane将duplicate lane显示出来。此时您需要将同一个泳道中的非特异性Point删除，我们可以看到靶蛋白的Peak center基本在300-400之间，显然绿色方框指示的这个Point是杂带，您可以利用 或 选中该点，此时它会变成绿色高亮，然后点击 进行删除。

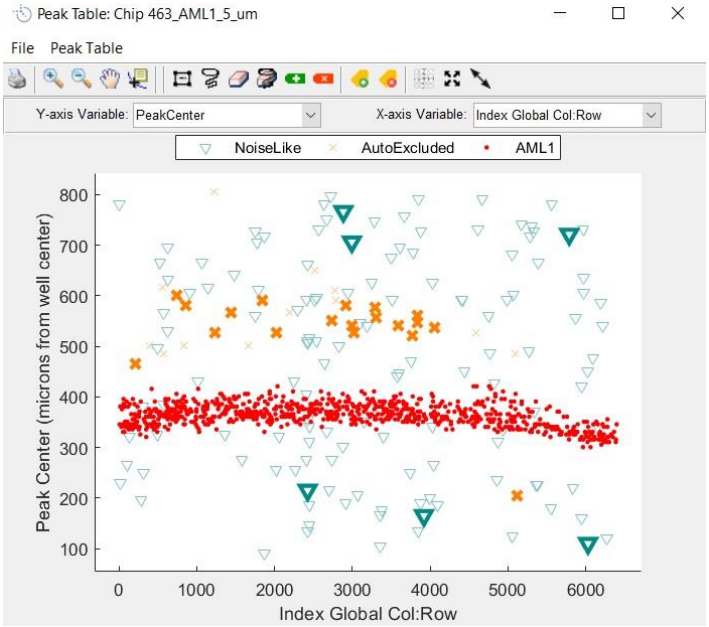




29) 如果Duplicate比较多，且与Target Point重叠或者离得较近，不易操作，此时您可以在芯片上点击鼠标右键Select-Select by Peak Tags，在弹出的对话框中选择Duplicate-OK，然后在芯片上点击鼠标右键Apply Selection-Select on Peak Table

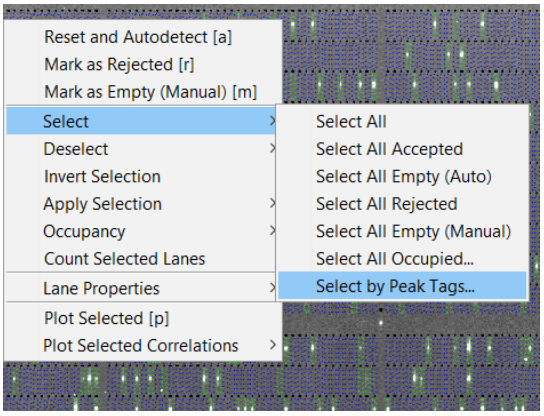


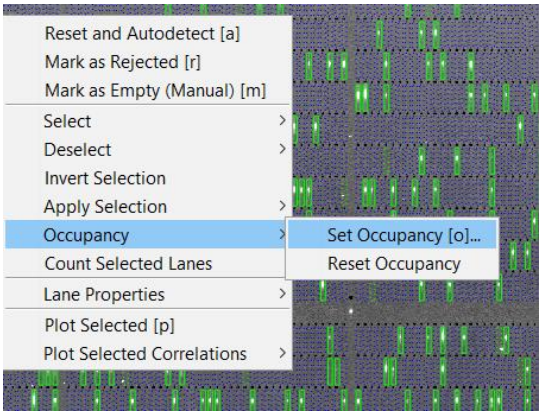
30) 此时所有Duplicate Point都被高亮，如下图所示，此时您点击 或者Peak Table-Remove Tag From Selected Peaks进行删除。



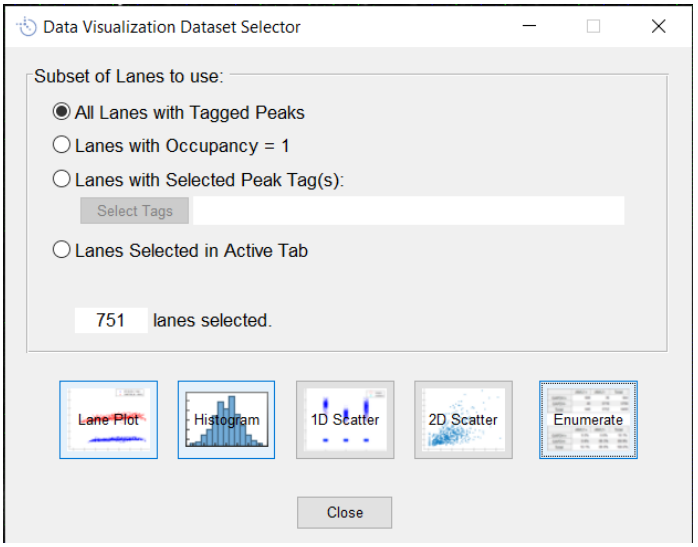
31) 在扫描芯片图上右键，Select-Select by Peak Tags，选择之前命名的靶点名称。

32) 在扫描芯片图上右键，Occupancy-Set Occupancy[o]并将值设为 1。

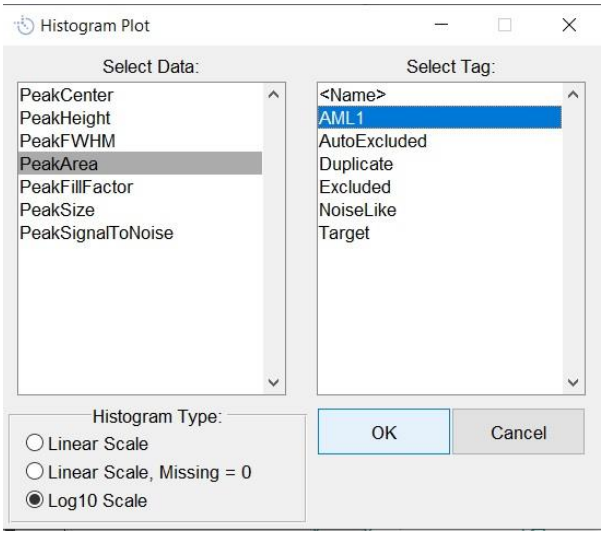




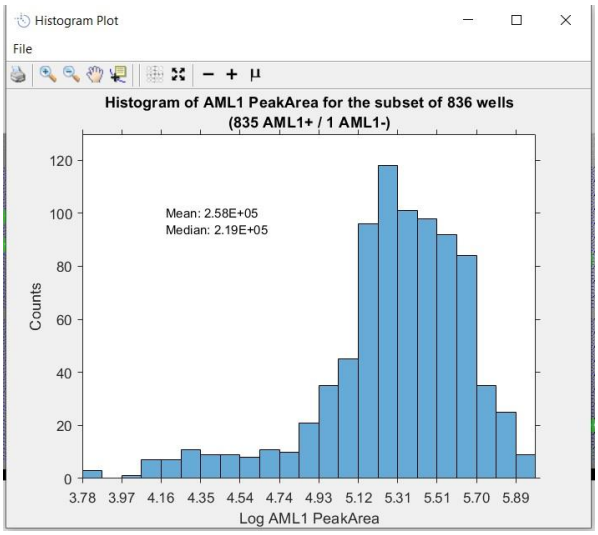
33) 点击 Tools-Data Visualization，通过五种不同的方式展示结果。如直方图，散点图，统计表格等。

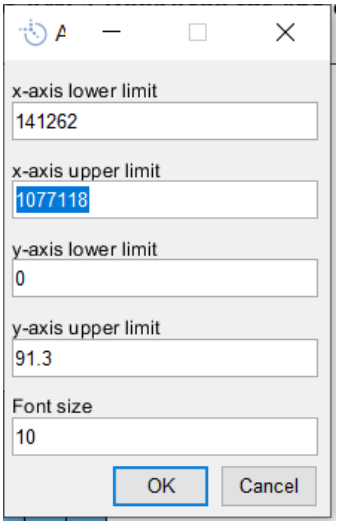


34) 例如用直方图展示表达分布，在弹出的对话框中选择 Peak Area 代表考察的参数为表达丰度，右侧选择命名的靶点。

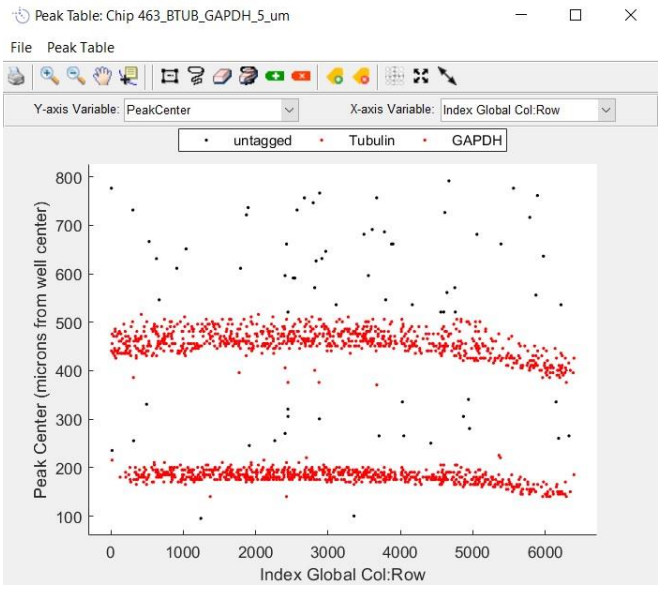


35) 示例数据： AML1平均表达量为2.58X10^5。您也可以点击 直接平移或者点击 在弹出的对话框中对X-Y轴进行编辑。

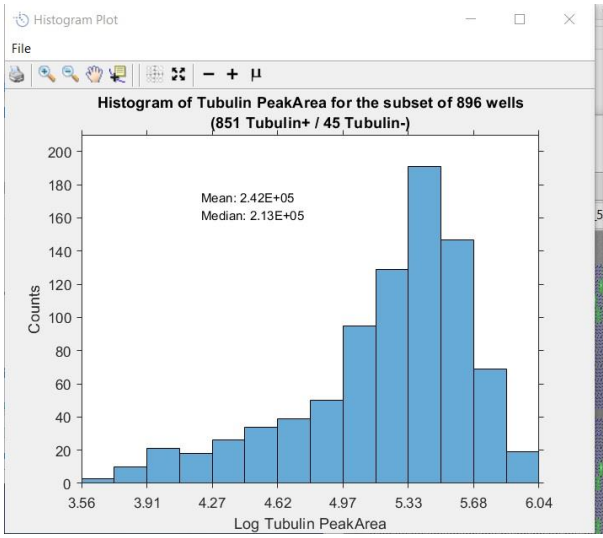


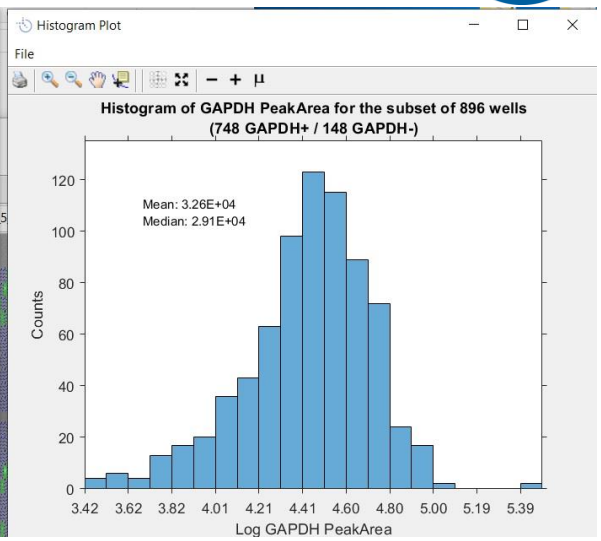


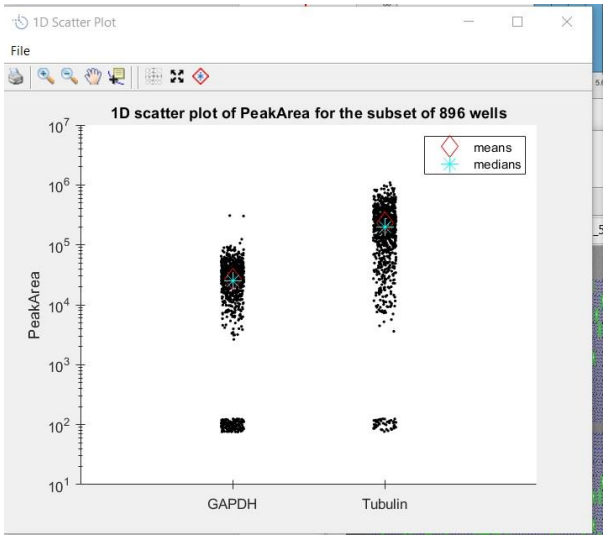
36) 如果同一张芯片采用相同荧光通道检测了两个不同的靶蛋白，此时点击 把一群Point框进去，点击 Peak Table-Apply Tag To Selected Peaks进行靶信号的命名，重复此操作直至所有靶蛋白均已成功命名，然后点击Peak Table-Tag Duplicate Within a Lane，查看一下是否有Duplicate Lane，如果有，按照(27-29)处理即可。

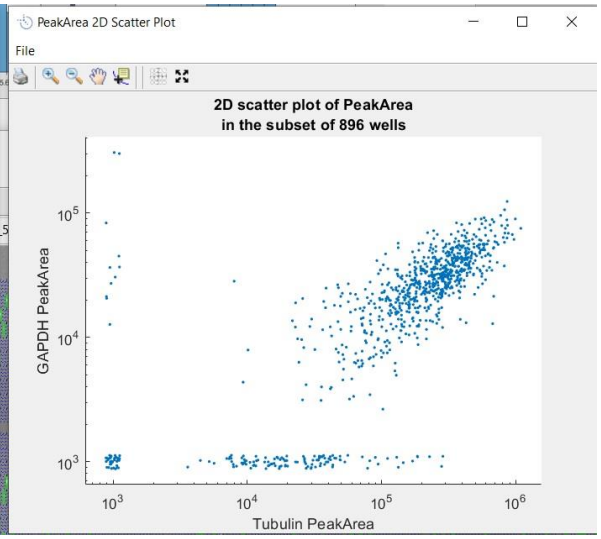


37) 此时您可以直方图，一维散点图，二维散点图，统计表等多种形式展示Peak Area的结果。点击 Tools-Data Visualization-Histogram/1D Scatter Plot/2D Scatter Plot/Enumeration，通过直方图展示表达分布。









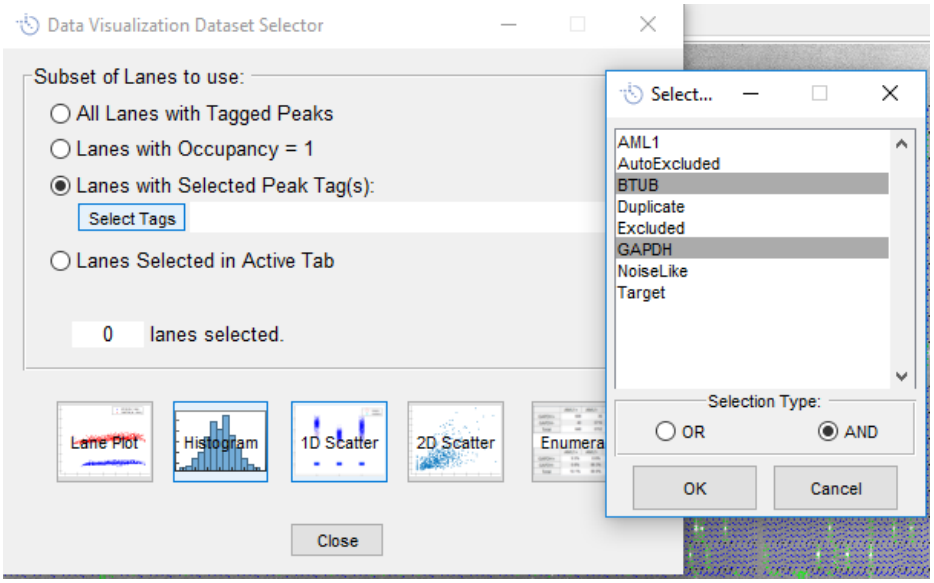
GAPDH vs. Tubulin (by PeakArea)

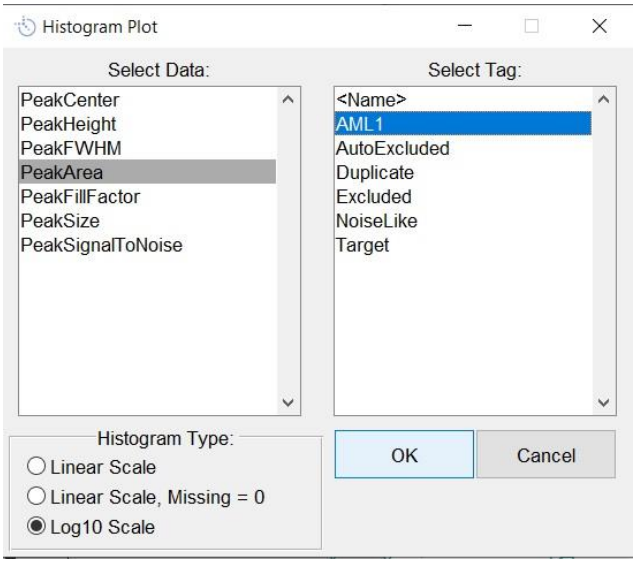
File

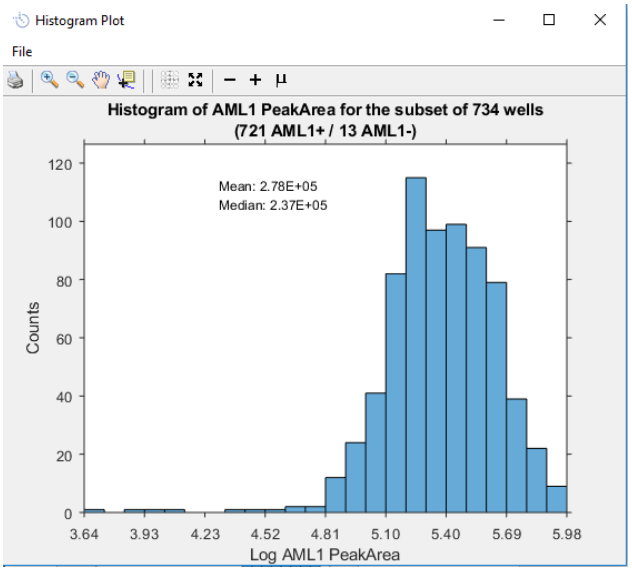
	Tubulin+	Tubulin-	Total
GAPDH+	737	11	748
GAPDH-	114	34	148
Total	851	45	896

	Tubulin+	Tubulin-	Total
GAPDH+	82.3%	1.2%	83.5%
GAPDH-	12.7%	3.8%	16.5%
Total	95.0%	5.0%	100.0%

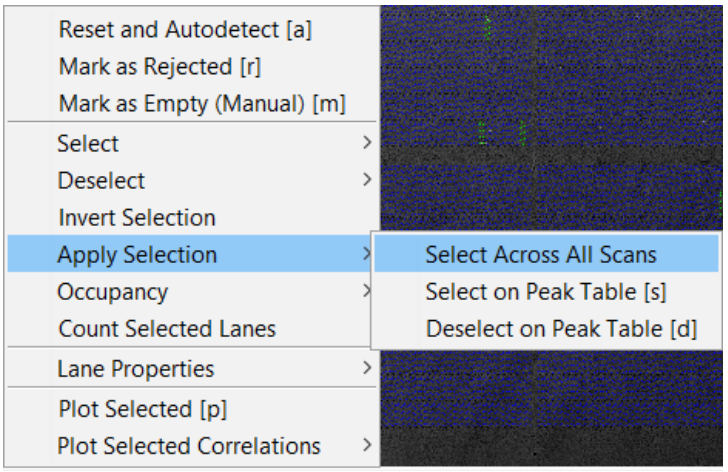
38) 如果同时检测了三个蛋白: GAPDH，β-Tubulin，AML1，只想在表达了两个内参蛋白的基础上分析AML1的变化，此时选择Lanes with Selected Peak Tag，弹出的对话框中选择BTUB和GAPDH，Selection type选择OR或者AND，在双击选择以哪种方式展示结果，如Histogram，然后参照(33-34)即可。



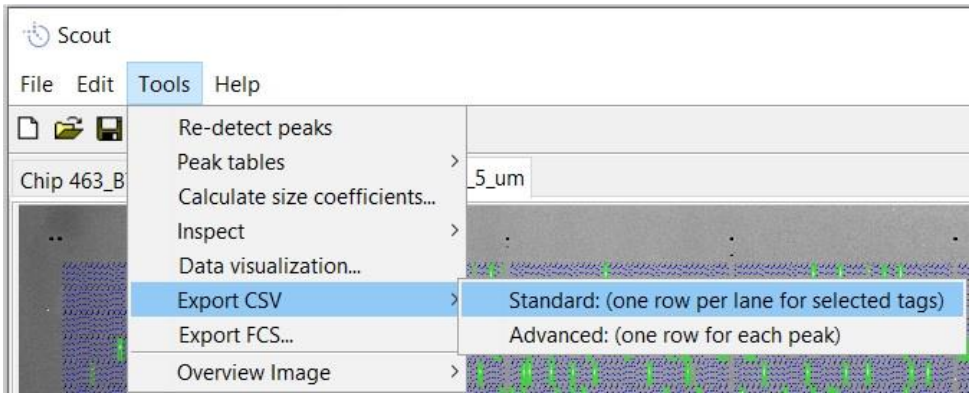




39) 如果您想查看哪些泳道在表达了GAPDH的基础上也有AML1的表达，先选中表达内参的泳道，然后鼠标右键，Apply Selection-Select Across All Scans，这样就可以实现Merge了。

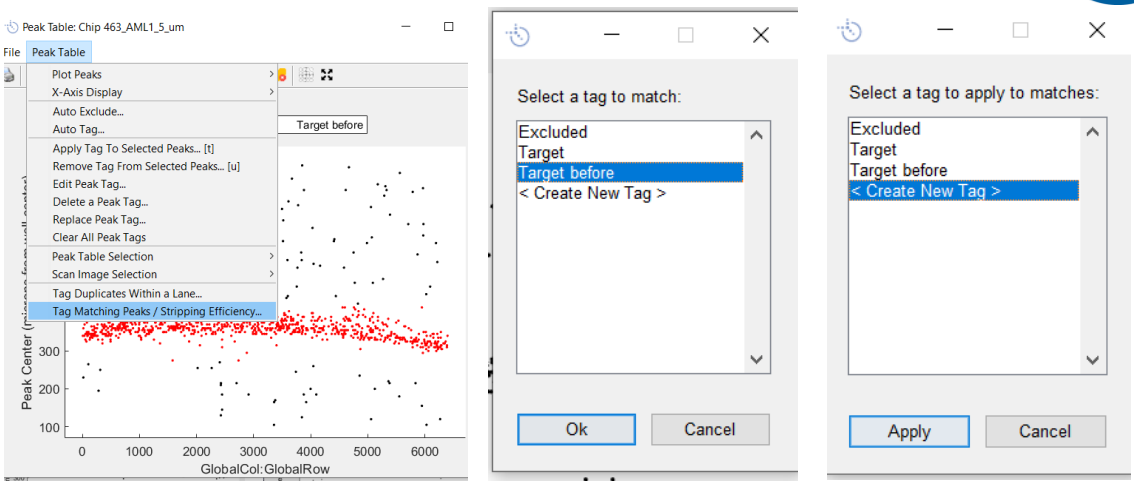


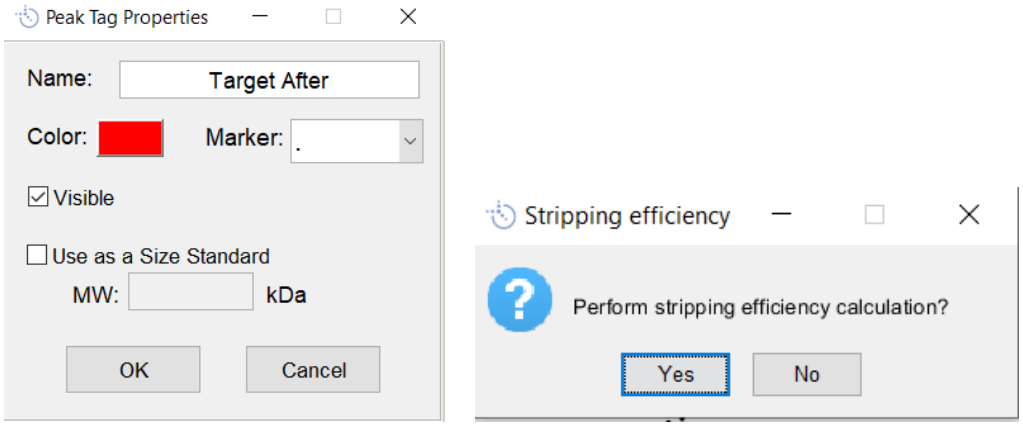
40) 可点击 Export CSV-Tagged peaks, one row per lane 导出原始数据，进一步通过第三方统计软件进行数据处理，作图展示等等。

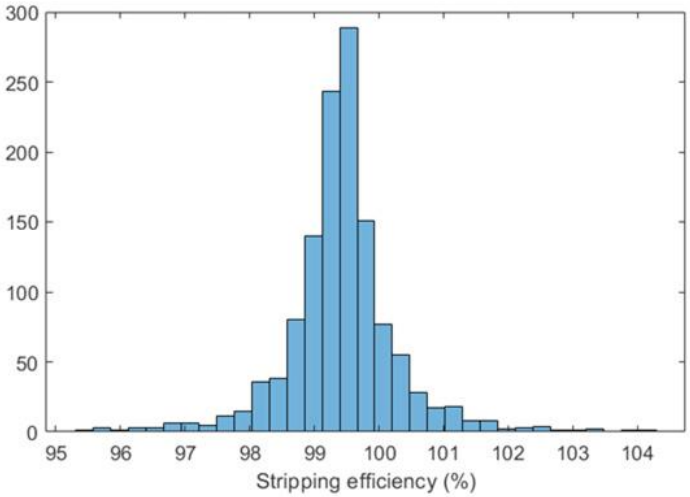


41) 如果同一张芯片采用不同荧光通道检测了两个不同的靶蛋白，您可以将分析一个荧光通道，然后点击File-Add scan to current chip-Copy registration from current scan将该荧光通道的Registration and Alignment 应用于另一个通道。

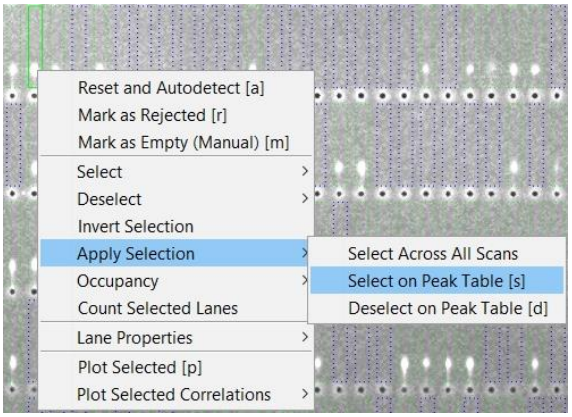
42) 如果利用Scout软件分析芯片剥离再杂交的效率，您需要在Stripping之前先分析结果，并把Target蛋白命名为"Target Before"，然后再加载这张芯片剥离之后的结果。之后点击Peak Table -Tag Matching Peaks/Stripping Efficiency，在弹出的对话框中选择"Target Before"，点击"OK"，在新弹出的对话框中选择"Create New Tag"，点击"Apply"，把Target蛋白命名为"Target After"，选择"Target After"，点击"Apply"，弹出的对话框中选择Yes，Scout软件会自动进行剥离效率的统计，如下图所示：

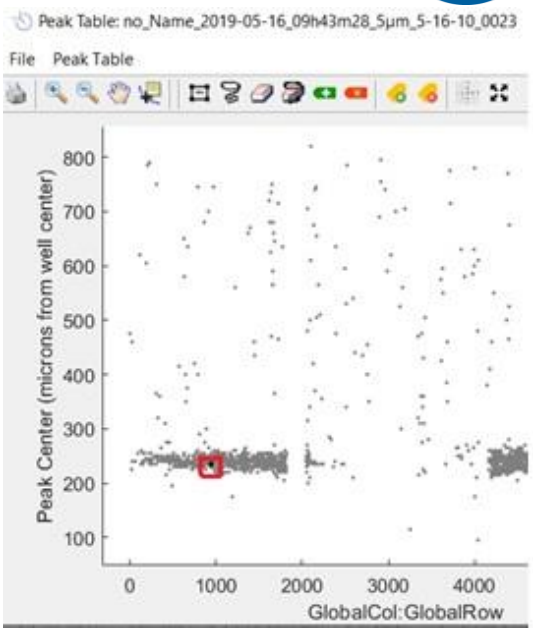




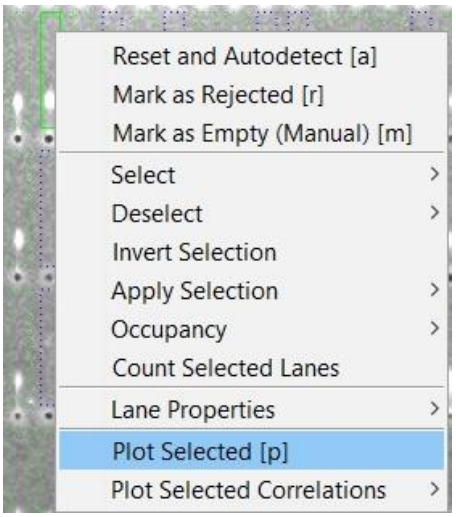


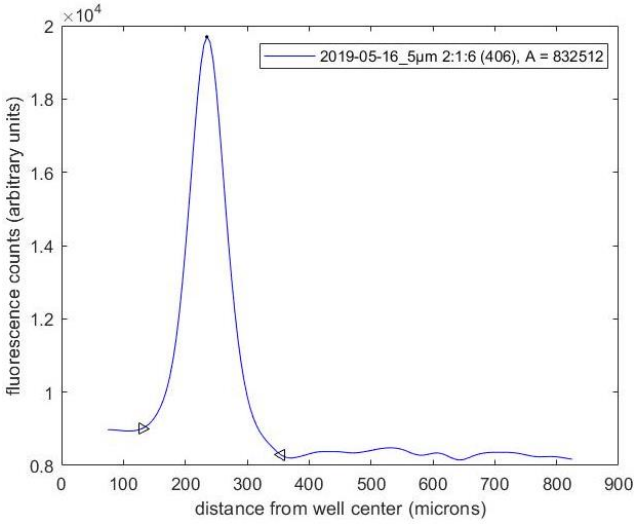
43) 如果想知道某个泳道在peak table中具体是哪个点，可以通过鼠标选中该泳道，然后点击右键Apply Selection-Select on Peak Table,此时弹出一个新的窗口，如下，红色框内的那个黑色高亮的点即为目的泳道。





44) 如果想要展示某个泳道的峰型图，可选中该泳道，鼠标右键-Plot Selected，即出现右边对应的峰型图。其中横坐标为迁移率，峰面积A=832512.





45) 更详细软件使用说明可参阅《Scout Software User Guide》。