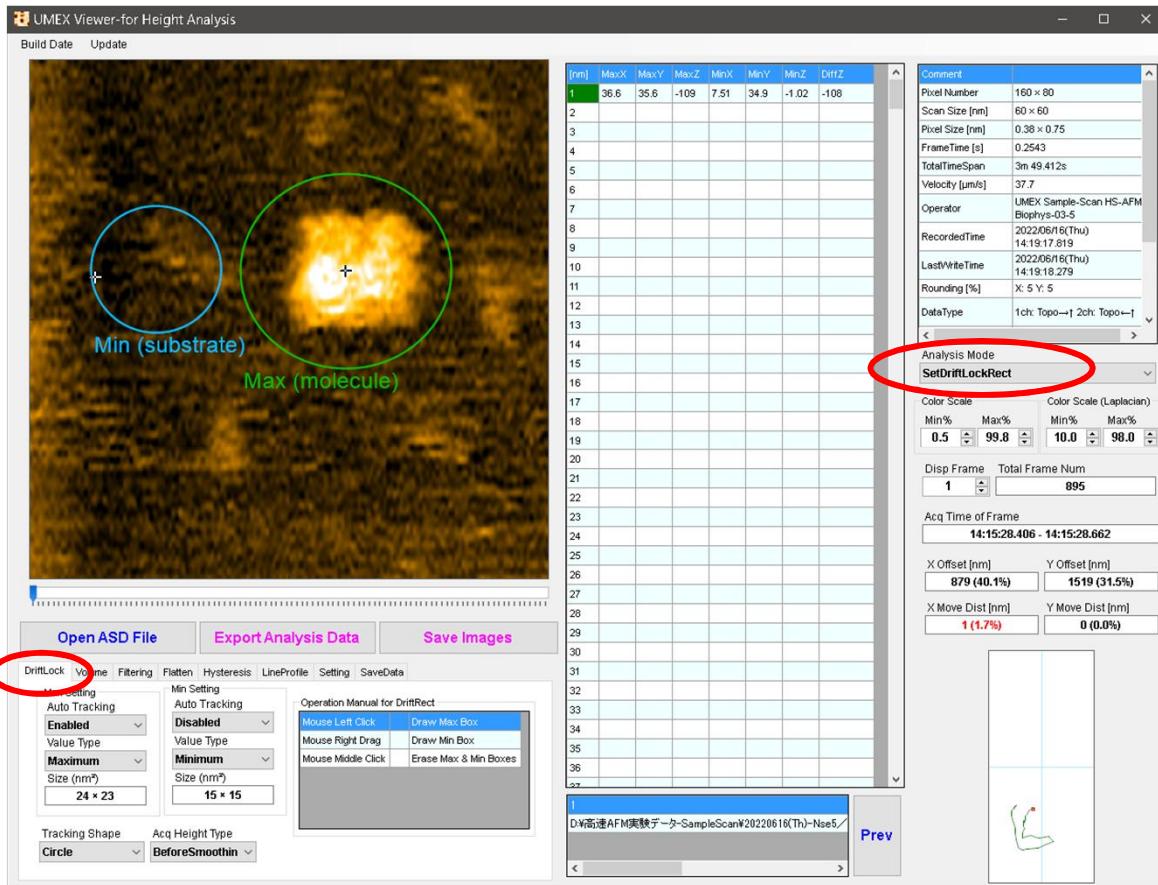


Quick Guide for UMEX Viewer for Height Analysis

< Analysis Mode _ Set Drift Lock Rect >

分子の位置と最大高さの時間変化を計測したい場合に用いるモード。分子が動く場合にも自動で追隨することができる。



Max Box、Min Boxを指定し、Frameごとに分子と基板それぞれの位置（XYZ座標）、その2点の高さの差を測定する。（Image左上を原点0とする。）

Max Box Setting : Max Box内で一番高いところを検出する（分子を設定）。

Min Box Setting : Min Box内で一番低いところを検出する（基板表面を設定）。

AutoTracking: フレームを移動した時に、最大最小値がBoxの中心に来るよう自動で追尾するかどうかの設定。

Value Type: Maximum or Minimumにすると、Box内での最大or最小値を取得（AFMイメージ上で十字線として表示）。Averageにすると、Box内での高さの平均値を取得。基板の高さを取得する際に平均値を用いた方が良い。

Operation Manual for DriftRect :

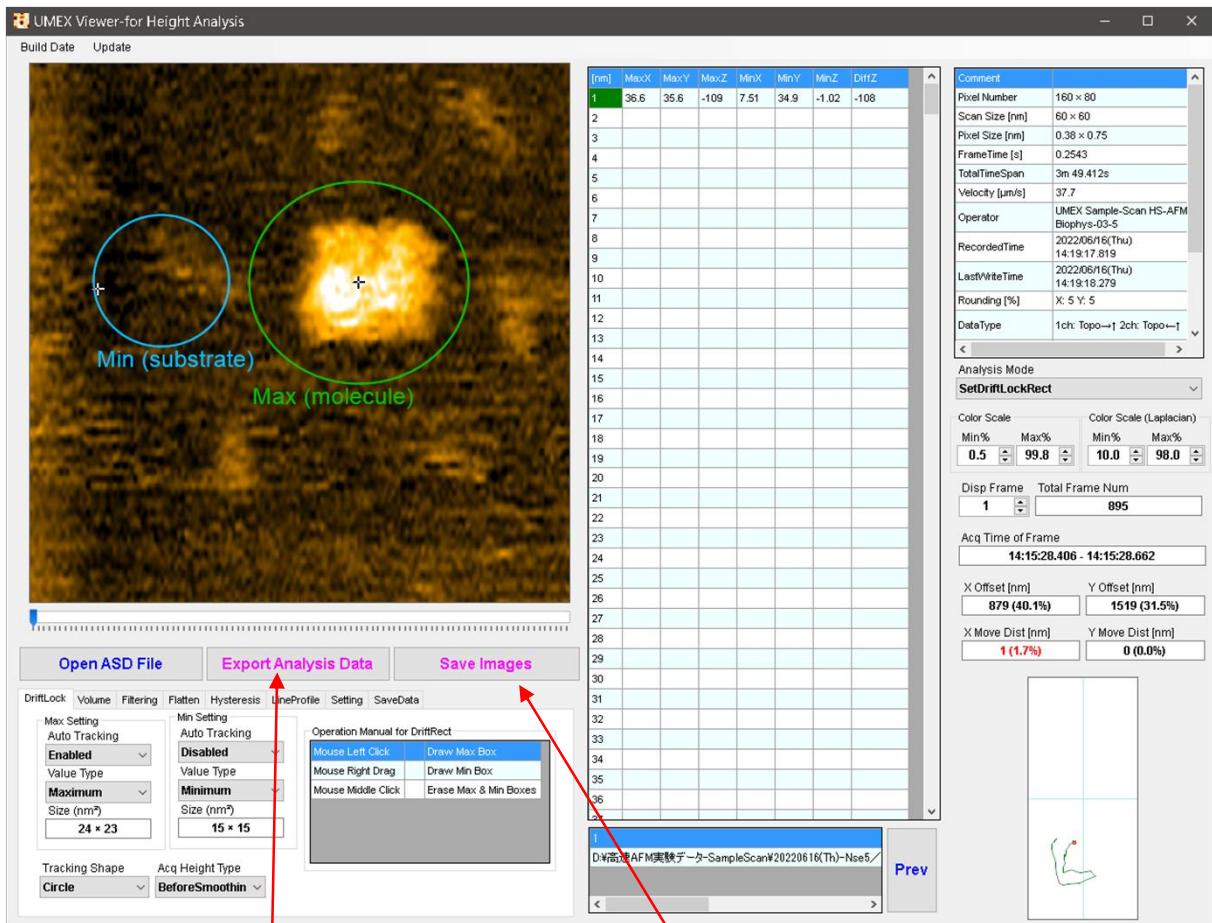
左drag…Max Box（緑、分子用）

右drag…Min Box（青、基板用）を描く。

中click…Boxを消す。

Tracking Shape : 枠の形を指定する。

Acq Height Type : Smoothingをする前後どちらの高さをとるか？beforeをとるとノイズの影響を受けてしまう。afterをとるとノイズは低減するが絶対値が少し小さく見積もられてしまう。Smoothingをきつくかけるならbefore、緩くかけるならafterが良い。

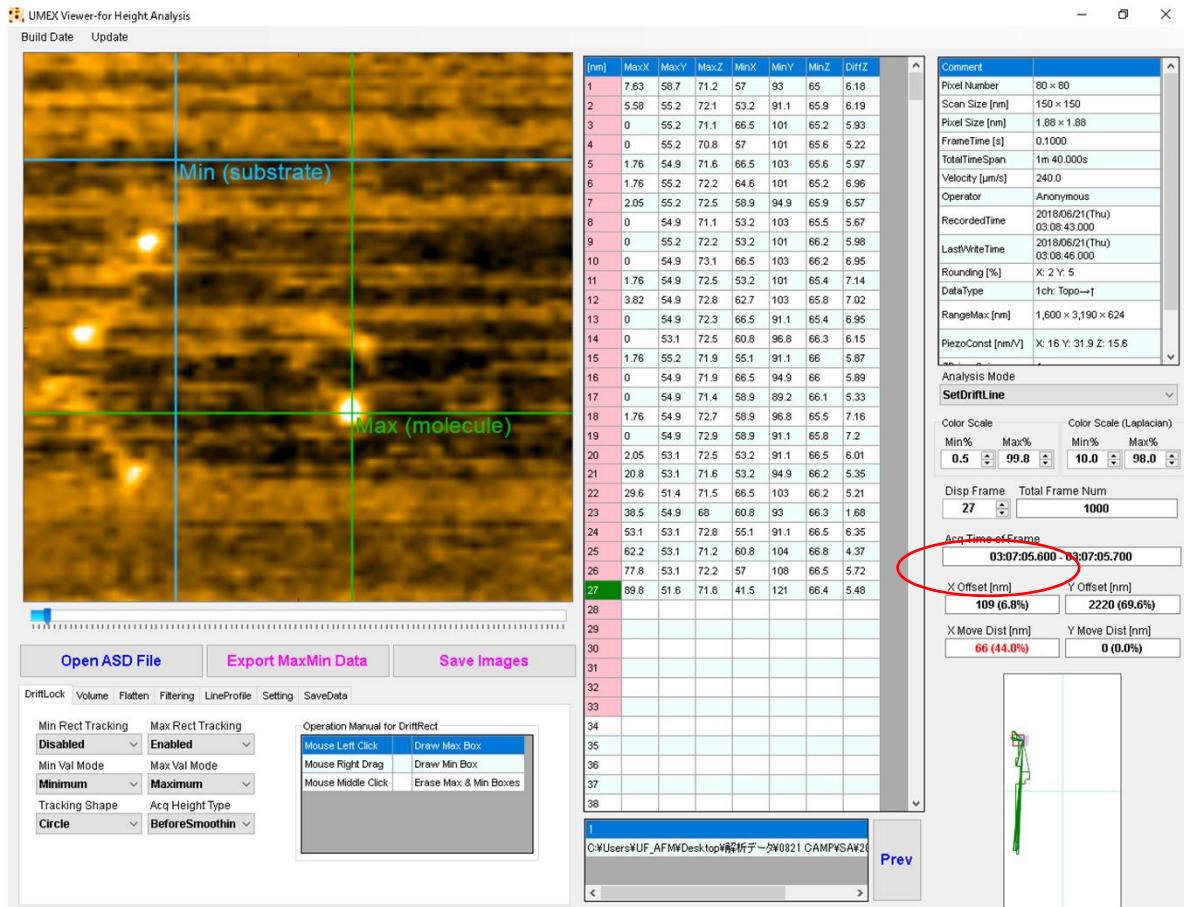


Export Analysis Data
csv.Fileとして書き出す。

Save Images
全てのImageを保存する。
→1枚保存はSaveDataタブで設定する。

< Analysis Mode_Set Drift Line >

分子の位置と最大高さの時間変化を手動で計測したい場合に用いるモード。Drift Lock Rect でうまくトラッキングできない場合に用いる。



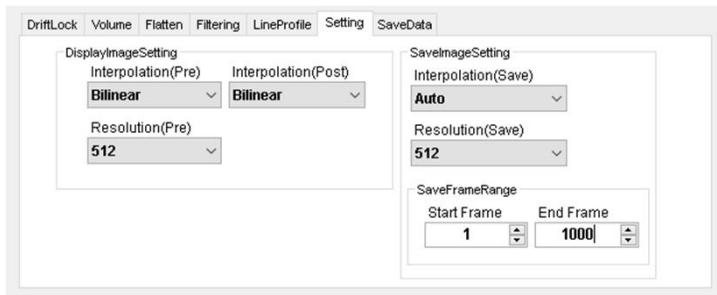
Max Line、Min Lineを指定し、Frameごとに十字線の交点の位置（XY座標）と、それぞれの高さ（Z）および、それらの2点の高さの差分量を測定する。

< Analysis Mode _Line Profile >

Line Profile

Analysis Mode をLineProfileにすると、Image上で指定したLineの高さと距離を見ることができる。
※ここでは、記録および保存はできない。

Setting



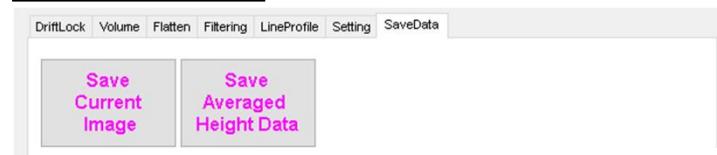
Display Image Setting

Interpolation…Image表示の補間方法を指定する。
Resolution…Imageの解像度を指定する。

Save Image Setting

Imageを保存するときの表示方法やFrame範囲を指定する。

Save Data



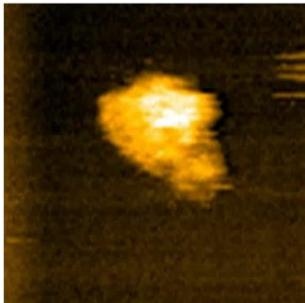
Save Current Image…現在表示されているImageをpng.Fileで保存する。

Save Averaged Height data…Frame全体の高さの平均値をcsv.Fileで保存する。

Flatten ラインノイズや高速スキャンした際に発生するリングングがひどい時や、フレーム毎にイメージの傾きが変化するために、SlopeCorrectionでは傾き補正ができない場合に使用する。

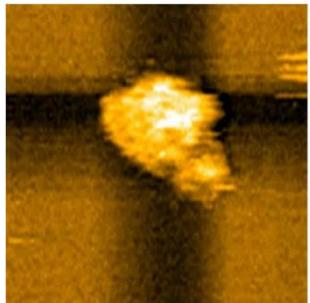


1. Original Data



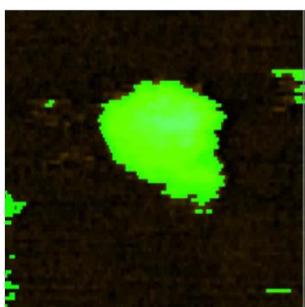
輝度値がスキャンライン毎に変化している。

2. Normal flatten



Flattenの設定を、「Post Threshold」で行う。ただし、Flattenはライン毎にオフセットを差し引くため、AFMイメージに分子があった場合、その両脇に黒いラインが発生してしまう。

3. Detecting molecular regions



そのため、分子領域を検出して、Flatten処理から除外する必要がある。このため、まず、「Pre Threshold」のパラメータでFlattenをかけた後、Thresh Image1やImage2で設定した閾値を用いて、分子領域を検出する。

典型的には、Threshold↑ : 40~60% and Size : 0~3%でうまくいくが、それでも駄目な場合、数値を調節する。

ThreshDispボタン: 「ON」状態にすることで、除外領域をイメージ上で緑色に描画し確認することができる。これは単なる確認用の表示であり、最終的なイメージには影響を及ぼさない。

Mode: Byte%にすると、最大輝度値を100%とした時の、0~100の値で閾値を設定する。通常は、Byte%を用いる。nmにすると、高さをnmの絶対値で指定することができる。フレームによって、大きな構造物が表れる場合などで、Byte%でうまくいかない場合に、nmを用いる。

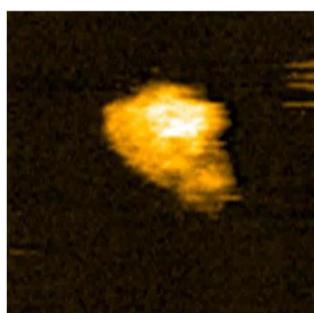
Threshold ↑: 分子など高い領域を除外するための閾値を設定する。

Threshold ↓: 穴やクラックなど低い領域を除外するための閾値を設定する。

Size(%): 検出されたThreshold領域を広げられる。パラシュート効果などが出る場合に用いる。

Smoothing: 検出されたThreshold領域をぼかしたい場合に用いる。基板上にノイズが多く。どうしても基板が除外領域に入ってしまう場合に用いる。

4. Only-substrate flatten



うまく分子領域のみをFlatten処理から除外できれば、このように基板表面を完全にフラットにすることができる。

< Analysis Mode _Volume Measure >

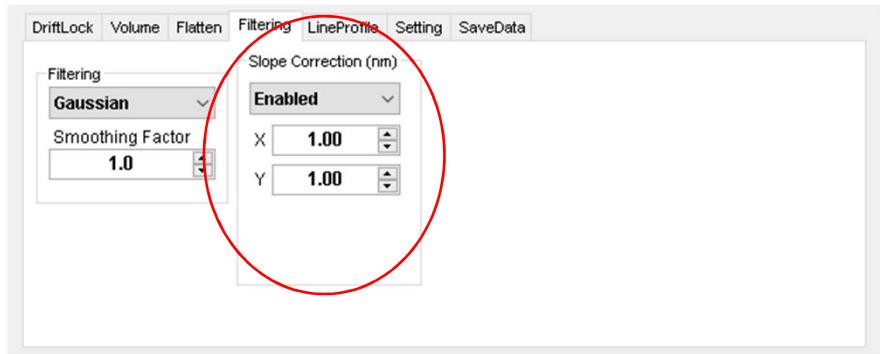
分子や表面形状の体積の時間変化を計測したい場合に用いるモード。

- ▶ 基板表面がフラットで且つ傾きのない状態でないと正確な分子の体積を求めることができないため、まず、「傾き補正orラインノイズ除去」を行ってから、体積の算出を行う。

Step 1

傾き補正orラインノイズ除去

方法1: Slope Correction

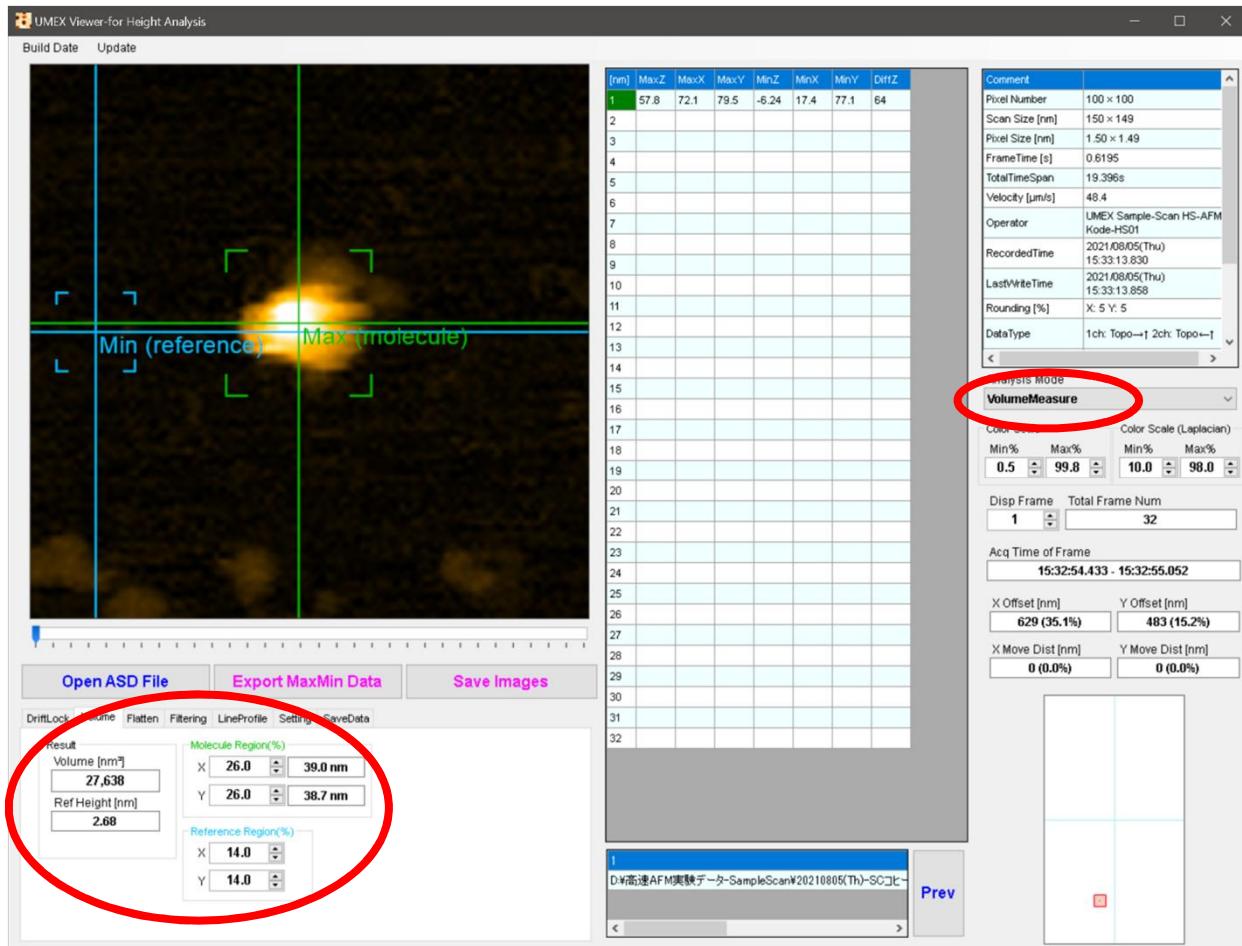


基板表面の傾きを手動で調節する。

方法2: Flatten

前ページで解説

Step 2



体積の算出方法

- Reference領域の合計高さを面積で割り算することで、Reference領域の平均値を算出する。

$$\bar{z}_{\text{reference}} = \frac{\iint z_{\text{reference}}(x, y) dx dy}{\iint dx dy}$$

- Molecule領域において、Reference領域の平均高さを基準とした高さを積分することで、Molecule領域の体積を求める。

$$V_{\text{molecule}} = \iint z_{\text{molecule}}(x, y) - \bar{z}_{\text{reference}} dx dy$$

断面回転半径（Radius of Gyration, RoG）の算出方法

- オブジェクトのコンパクトネスを定量化するための数学的概念。
- 次式に示すように、オブジェクトの中心位置から各ピクセルの距離の二乗平均平方根（RMS）に相当する。
- 真円の時、オブジェクトの半径の $1/\sqrt{2}$ 倍の値をとる。

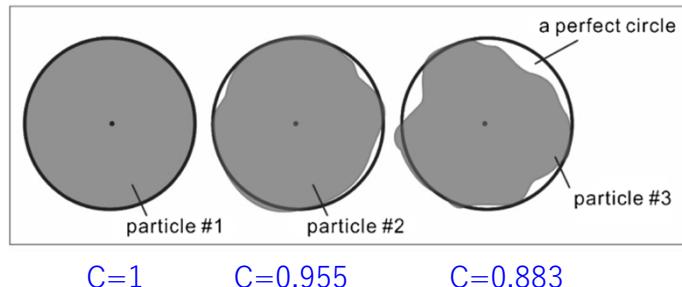
$$R_G = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{CM})^2} \quad \mathbf{r}_{CM} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i$$

円形度（Circularity）の算出方法

- オブジェクトが輪郭の凹凸の大きさを定量化するための数学的概念。
- 次式で表されるパラメータであり、真円の時に1をとり、それ以外では1未満の値をとる。
- ただし、実際のAFM像では画素が量子化しているため、Perimeterの算出に誤差が発生してしまう。そのため、真円であってもC=0.9程度の値になってしまう。

1. Circularity [-] C
2. Area [nm^2] A
3. Perimeter [nm] P

$$C = \frac{4\pi A}{P^2}$$



面積、断面回転半径、円形度は、共有する一面をもった数学的概念であるが、
以下のようにして使い分ける

	特徴	適した実験系	応用例
面積 area	形状によらずサイズのみ によって決まる値	一定の形状をもつか、形状 に意味をもたない場合に、 サイズ変化を定量化したい 場合。	脂質膜ドメイン ドロッププレット
断面回転半径 Radius of gyration	形状とサイズを反映した 値（面積と円形度、両方 の影響を受ける）	コンパクトネスを定量化し たい場合。	DNAのスーパーコイル DNA結合タンパク質によ るDNAのコンパクション
円形度 Circularity	サイズによらず、形状の みによって決まる値（同 じ形状なら、異なるサイ ズでも同じ値をとる）	トータルのサイズが変化せ ず、形状のみが変化する場 合に、形状の凹凸を定量化 したい場合。	RNAの二次構造

1. Area Shape

- Rectangle, Circle, MousePaintの中から、検出エリアの形状を選択する。

2. Position Setting

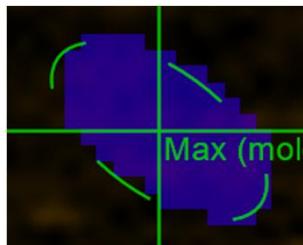
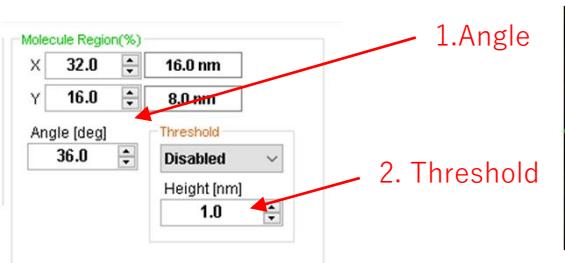
- イメージ上で、緑のラインで体積の測りたい分子の位置、青のラインで基準となる基板表面の位置を設定する。**(重要) ラインノイズのために、Y方向の場所によって基板の高さがわずかに異なることが多いため、上図に示すようにReference領域とMolecule領域のY方向の位置を揃えた方が良い。**

2-1. Reference Setting

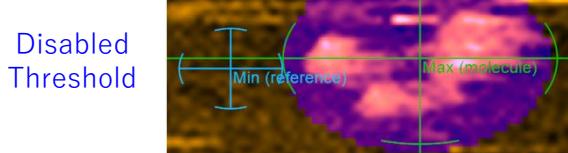
- Volumeのタブ上で、Reference Rangeを使って、Ref Heightを算出するためのエリアを設定する。設定したエリア内の全高さの平均値がRef Heightに表示される。青のラインの位置を変えてみて、Ref Heightの値が大きく変化しないことを確認する。もし、大きく変化する場合には、傾き補正が不完全である可能性がある。

2-2. Molecule Setting(Rectangle, Circle の場合)

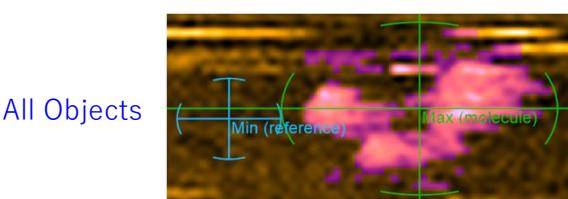
- Molecule Rangeを設定することで青枠が分子のサイズにフィットするようになる。Ref Heightの高さを基準(0 nm)とした分子の高さを積分することで得られた体積がVolumeに表示される。
- Molecule Rangeを分子と同じサイズに設定してから、徐々に、XやYのサイズを大きくした時、Volumeの値が大きく変化しないことを確認する。もし、どんどん大きくなったり、あるいは小さくなっていく場合には、傾き補正が不完全である可能性がある。



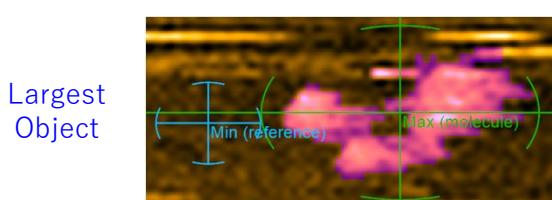
RectangleやCircleの角度を調節することができる。



選択した領域全てにおける全ピクセルを解析するため、選択領域を分子領域にぴったり合わせる必要がある。



選択した領域において、Minの高さを基準として、Threshold Heightを超えた全ピクセルを解析する。複数分子を解析する場合には良いが、ノイズも検出してしまうため、単一分子を解析する場合には、Largest Objectを使用した方が良い。



選択した領域のThreshold Heightを超えたピクセルのうち、もっとも大きなオブジェクトのみを検出し、解析する。単一分子を解析する場合に最適。

2-3. Molecule Setting(MousePaintの場合)

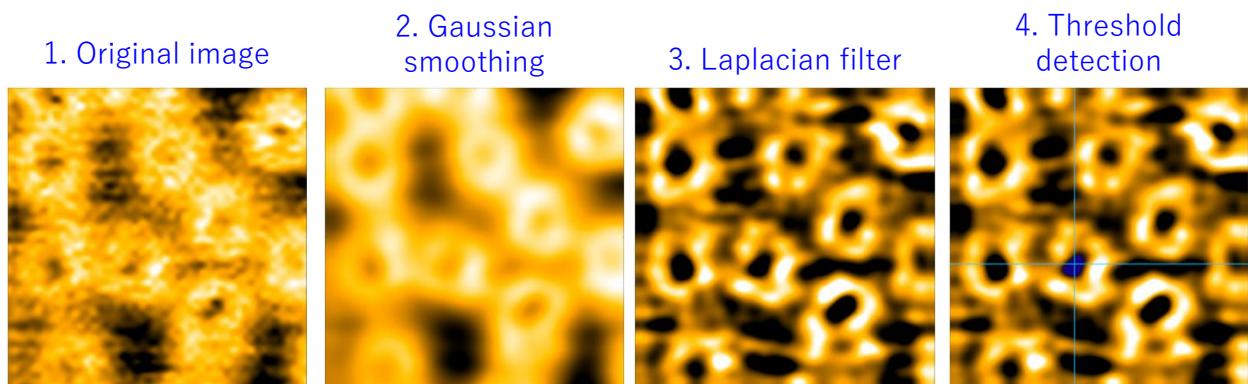
- AFMイメージ上で、マウス操作することでMolecule領域を設定できる。
- 左クリック：Molecule領域の追加
- 右クリック：Molecule領域の削除
- ホイール：描画範囲の変更
- ミドルクリック：設定した内容のリセット

< Analysis Mode _ Blob >

表面上にできたホールの形状を測定するためのモード。

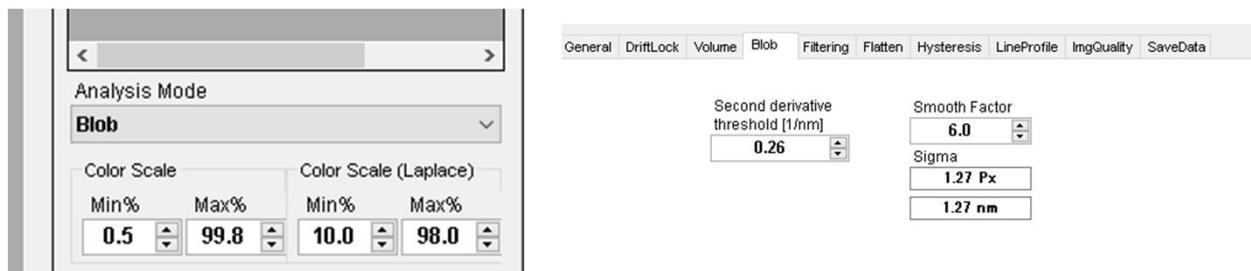
➤ ソフトウェア内部で以下の手順で処理を行うことで、ホールの形状を測定している。

1. ガウシアンスムージングを用いて高周波ノイズを除去する
2. ラプラシアンフィルターを用いて、高さ分布の二階微分を取得する。二階微分は分子やホールなどのように局面において大きな値をとるため、閾値を設定することで分子やホールを認識できる。
3. イメージをクリックするとクリックした箇所に十字線が表示される。
4. クリックした箇所のピクセルを中心として、設定した二階微分の閾値よりも小さな領域が青色に表示される。



Step 1

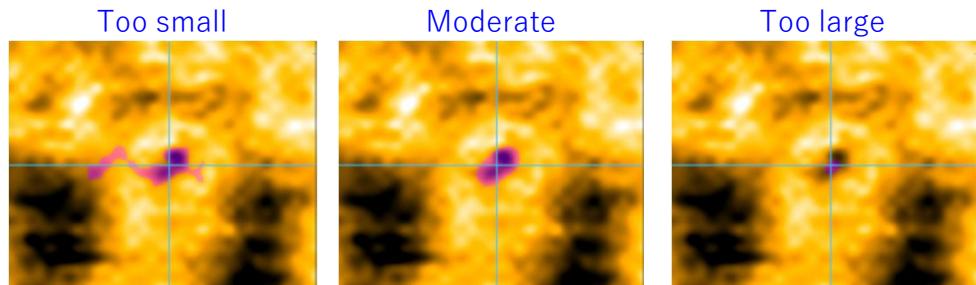
1. Analysis ModeをBlobに変更する。
2. Blobのタブを開く。



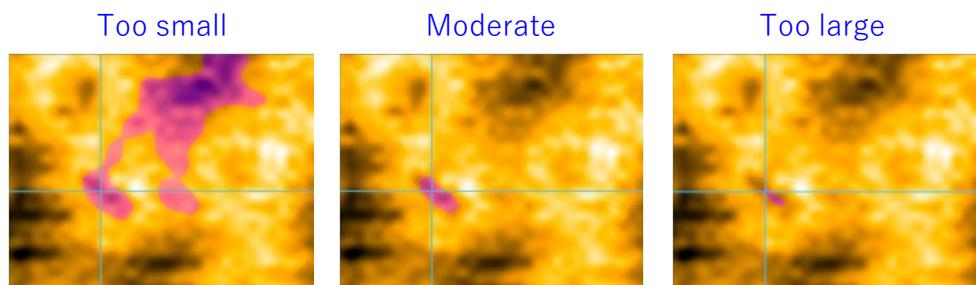
次ページに続く

Step 2

1. Smooth Factor of Gaussian Filter



2. Second derivative threshold [1/nm] of Laplacian filter



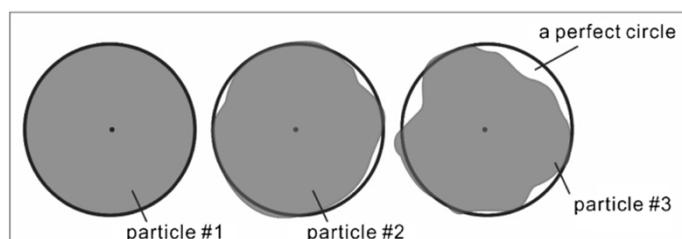
Step 3

➤ [Export Analysis Data]ボタンを押すことで以下のパラメータをCSVファイルに保存することができる。

1. Circularity [-] c
2. Area [nm²] A
3. Perimeter [nm] P

Circularityとは次式で表されるパラメータであり、真円の時に1をとり、それ以外では1未満の値をとる。

$$c = \frac{4\pi A}{P^2}$$



$C=1$

$C=0.955$

$C=0.883$