

Diplomamunka

Lázár István

Debrecen

2009

Debreceni Egyetem
Informatikai Kar

Szoftverfejlesztés Java környezetben

Témavezető:

Espák Miklós

egyetemi tanársegéd

Készítette:

Lázár István

programtervező matematikus

Debrecen

2009

Tartalomjegyzék

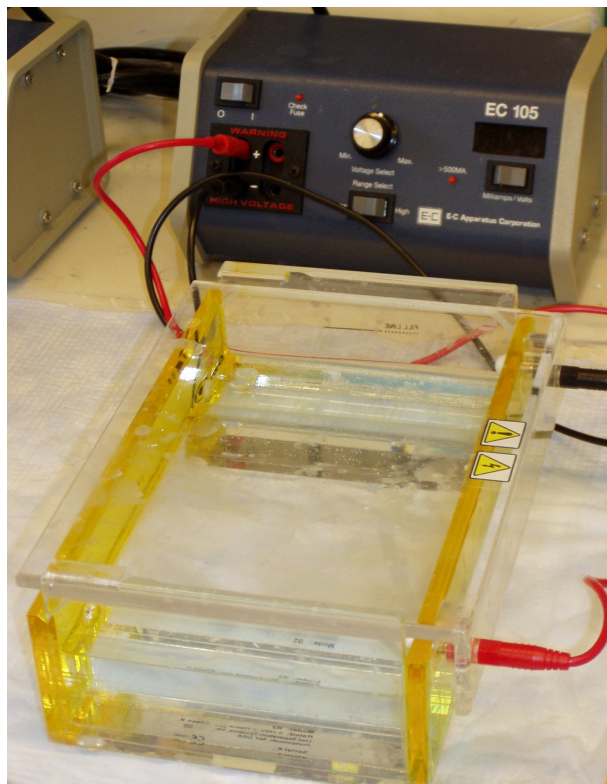
1. A Gél-elektroforézis.....	1
2. Hasonló kereskedelmi szoftverek.....	4
2.1 Kapelan - Labimage 1D.....	4
2.2 Nonlinear dynamics - Totallab TL120.....	5
3. A program működése és használata.....	6
3.1 A program telepítése és futtatása.....	6
3.2 Licencek, a licenc állományok kezelése.....	7
3.2.1 Demo licenc.....	7
3.2.2 Teljes liszensz.....	7
3.2.3 A licenc manager(license manager).....	7
3.3 A program nyelve.....	8
3.4 Projektek.....	9
3.4.1 Új elemzés létrehozása.....	9
3.4.2 Elemzés mentése.....	9
3.4.3 Elemzés megnyitása.....	10
3.5 A program grafikus felülete.....	11
3.5.1 A fő ablak (Main window).....	11
3.5.2 A kép ablak (Image window).....	12
3.5.3 A lane profil ablak (Lane profile window).....	13
3.5.4 Az elemzés információs ablak (Analysis information window).....	15
3.5.5 Az molekulasúly és mennyiségi kalibrációs ablakok.....	16
3.6 A program módjai.....	17
3.6.1 A Lane mód.....	17
3.6.1.1 Lane-ek automatikus detektálása.....	17
3.6.1.2 Lane kiválasztása.....	18
3.6.1.3 Lane-ek törlése.....	18
3.6.1.4 Új lane hozzáadása.....	19
3.6.1.5 Lane-ek módosítása.....	19
3.6.2 Band mód (Bands mode).....	20
3.6.2.1 Bandek detektálása.....	20

3.6.2.2 Új Band hozzáadása.....	20
3.6.2.3 Band törlése.....	20
3.6.2.4 Band-ek módosítása.....	21
3.6.3 Háttér eltávolítási mód (Background subtraction mode).....	21
3.6.3.1 Rolling ball algoritmus (automatikus).....	22
3.6.3.2 Valley to valley algoritmus (automatikus).....	22
3.6.4 Rf kalibrációs mód.....	23
3.6.4.1 Alap (0.0 és 1.0) kalibráló görbék hozzáadása.....	24
3.6.4.2 Új Rf kalibráló görbe hozzáadása.....	24
3.6.4.3 Rf görbék módosítása.....	25
3.6.5 Mennyiségi kalibráció (Quantity calibration).....	25
3.6.6 A molekulásúly kalibráció (MW calibration).....	27
3.6.6.1 A kiválasztott lane mentése standardként.....	28
3.6.6.2 Standard illesztése a kiválasztott lane-re.....	28
3.7 Exportálási lehetőségek.....	29
4. A program megvalósítása, felhasznált módszerek, algoritmusok.....	30
4.1 Tervezési megfontolások.....	30
4.2 A grafikus felület alapvető felépítése.....	30
4.3 Megjelenítési felületek (look & feel).....	31
4.4 Dialógus alapú kommunikáció a felhasználóval.....	32
4.5 Java 2D.....	33
4.6 Adatállományok írása és olvasása.....	33
4.7 Ellenőrző összeg használata.....	34
4.8 Licenc állományok védelme.....	34
4.9 A lane detektálás.....	35
4.10 A band-ek detektálása.....	36
4.11 A programkód védelme.....	36
5. Összefoglalás és további tervek.....	38
6. Irodalomjegyzék.....	39
7. Függelék.....	40

1. A Gél-elektroforézis

A gél-elektroforézis egy eljárás, mellyel DNS, RNS és fehérje molekulák választhatóak el. Az elválasztás történhet analízis, vagy egyéb módszerek előkészítése céljából, mint például tömeg-spektrometria vagy DNS szekventálás.

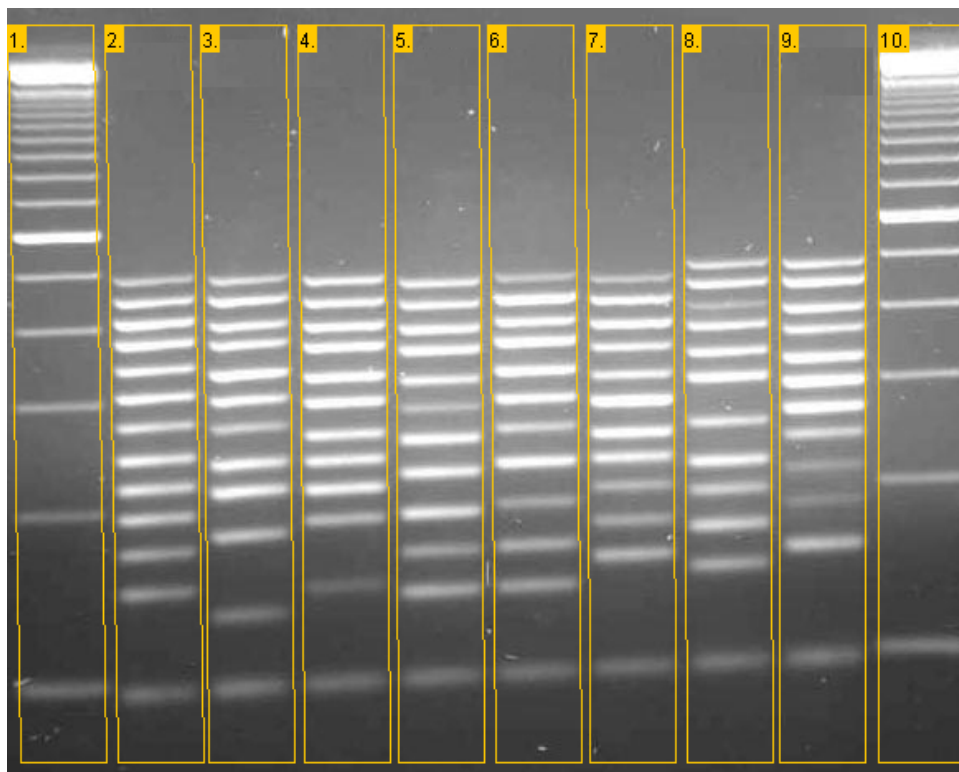
A módszert széleskörűen használják biológiai, molekulár-biológiai, genetikai, mikrobiológiai, biokémiai kutatások során, illetve alapvető a szerepe a törvényszéki eljárások, például azonosítások során.



Futtató kád és a hozzákapcsolt
egyenáramú áramforrás

Az eljárás során a vizsgálandó anyagot egy gél mátrixba helyezik, és ebbe a mátrixba elektromos áramot vezetnek. A gél egy szilárd, de ugyanakkor porózus anyag, melyben az elektromosság hatására a vizsgált molekulák az ellentétes töltés felé vándorolnak. A gél mátrixot a vizsgálat előtt kell elkészíteni (mintába önteni). A még folyékony gél tetején

azonos méretű zsebeket hoznak létre egy fésűnek nevezett sablon segítségével. Ezekbe a zsebekbe kerülnek a vizsgált minták. Egy gélben több minta is vizsgálható egyszerre. Minden minta egy függőleges vonalon (lane) fut. A vizsgálandó molekuláktól függően a gél anyaga általában poliakrilamid vagy agaróz. Hogy a szétválasztott molekulákat láthatóvá tegyék különböző festékanyagok alkalmazhatóak, például ethidium-bromid. Amennyiben a vizsgált molekulák fluoreszkálnak UV fényben, fénykép készíthető a gélről.



Lane-ek és band-ek egy futtatás eredményeképp.

Két szélén létra látható.

A molekulák tömegüktől függően különböző sebességgel mozognak a gélben, általánosságban elmondható, hogy a molekula sebessége fordítottan arányos a tömegének (MW, molekulasúly) logaritmusával. A molekulasúly mértékegysége a bp (base pair - bázispár). A futtatás során az azonos méretű molekulák a lane-ekben ugyanakkora utat tesznek meg, így sávokat (band) alkotnak. Az olyan mintát, melynek ismert az összetétele standardnak vagy markernek nevezik. A standardok futtatás során egy létrát képeznek (egy gélen több standard is futtatható, növelve az elemzés pontosságát). A létra band-jeit összehasonlítva az ismeretlen

lane-ek band-jeivel megállapítható az ismeretlen minták összetétele. Azt, hogy egy band milyen hosszú utat tett meg, az Rf értékkel fejezzük ki. Az Rf egy 0.0 és 1.0 közé eső valós szám. Egy band Rf értéke tehát fordítottan arányos a band-et alkotó molekulák tömegének logaritmusával. Így a létra Rf - MW érték párosaira függvény illeszthető (jellemzően legkisebb négyzetes értelemben vett illesztés). Ennek a függvénynek az ismeretében meghatározható az ismeretlen lane-ekhez tartozó band-ek MW értéke. Ezt az eljárást molekulásúly kalibrálásnak, illetve molekulásúly kiértékelésnek nevezzük.

Az egyes band-ek a lane-ekben különböző területűek lehetnek. A band területe arányos a band-et alkotó molekulák mennyiségével. Így az ismert mennyiségű bandek terület - mennyiség párosaira függvény illeszthető, mellyel meghatározható az ismeretlen band-ek mennyisége. Ez az eljárás a mennyiségi kalibrálás(Quantity calibration), illetve mennyiségi kiértékelés.

A diplomamunka témája egy gél-elektroforézis képeket kiértékelő szoftver fejlesztése volt.

A kifejlesztett szoftver (GelAnalyzer) a gélekről készült képeket felhasználva segíti az elemzést. Megvalósítja a lane-k és band-ek automatikus detektálását. Implementál 3 különböző módszert a háttér eltávolítására az egyes lane profilokon, lehetővé teszi a futtatás során fellépő torzulások korrekcióját Rf kalibrálással. Megvalósítja a mennyiségi és molekulásúly kalibrálást és kiértékelést. A szoftver Java 1.6 nyelven íródott, a grafikus felületet megjelenítéséhez a Swing keretrendszert használja. A program teljesen platformfüggetlen, amennyiben az adott rendszeren létezik Java futtató környezet.

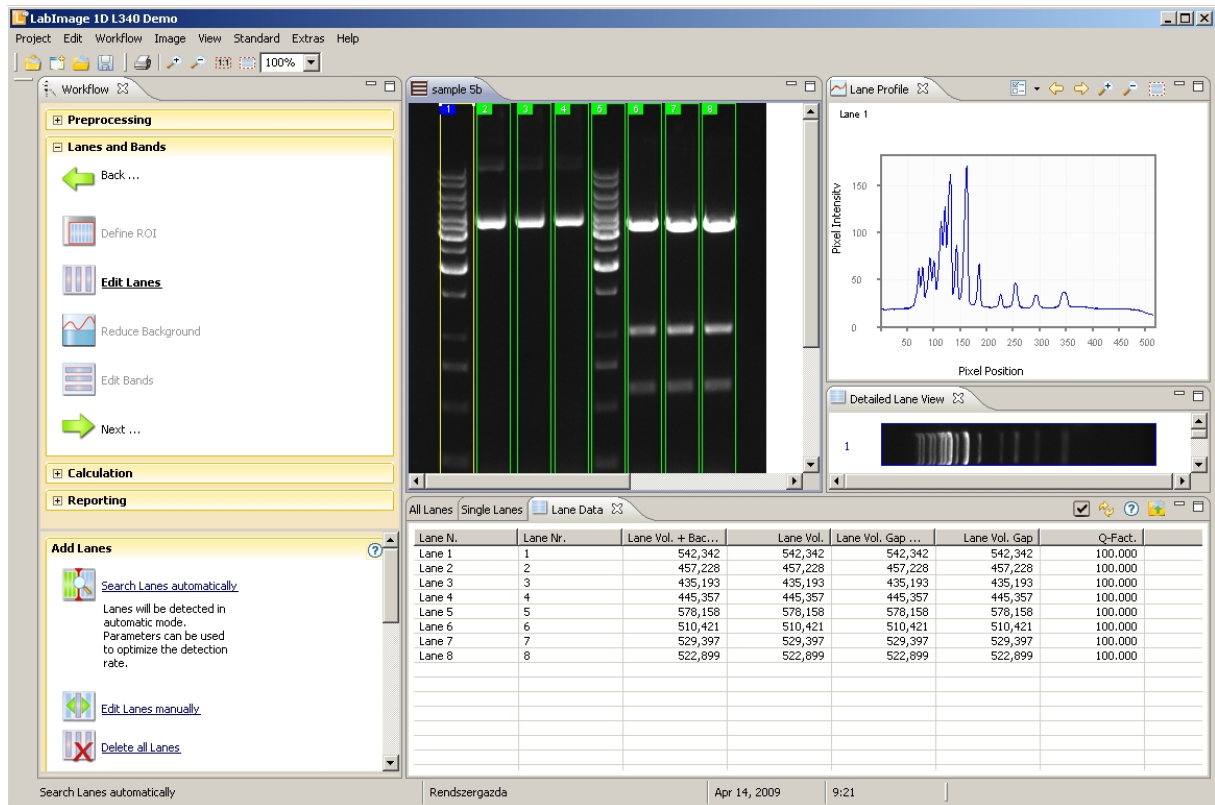
A program kereskedelmi verziója elérhető a www.GelAnalyzer.com címről.

2. Hasonló kereskedelmi szoftverek

A piacon több hasonló célú szoftver is elérhető. Itt az általam tesztelt szoftverek közül a Labimage 1D és Totallab programok tulajdonságait ismertetem röviden.

2.1 Kapelan - Labimage 1D

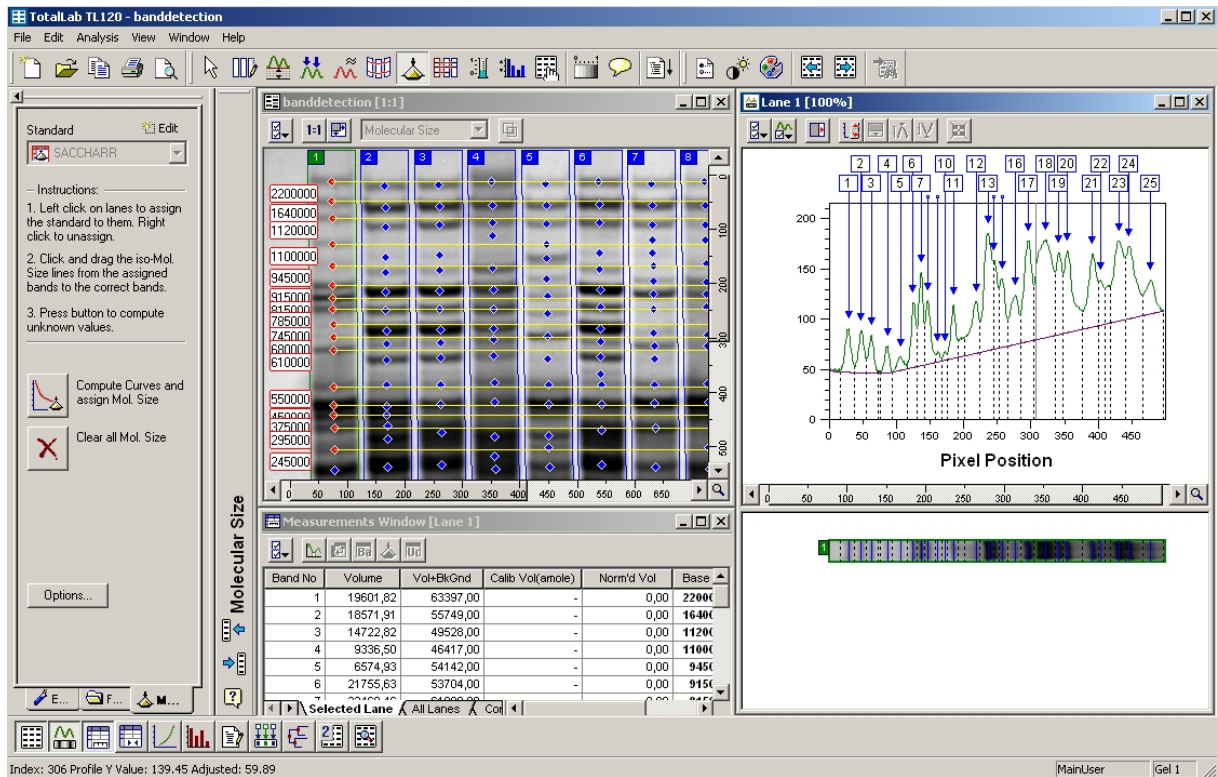
A szoftver Demo verziója letölthető a www.labimage.net címről.



A lényegesebb jellemzői: automatikus lane és band detektálás, háttér eltávolítási lehetőségek, Rf kalibrálás, molekulásúly és mennyiségi kalibrálás illetve kiértékelés. A szoftver képes előre definiált sablon alapján jelentéseket generálni. Tapasztalataim szerint a program kissé nehezen kezelhető és lassú. Bár java alapú, de nem platformfüggetlen. A grafikus felület megjelenítéséhez az SWT keretrendszert használja. A felület paneljei egymáshoz kapcsolódnak, egyes panelek méretét csak a szomszédjai területének rovására lehet változtatni. Átlagos méretű monitorokon az elrendezés kényelmetlen, nem lehet egyszerre megfelelő minőségben vizsgálni a képet és a profilt.

2.2 Nonlinear dynamics - Totallab TL120

A szoftver Demo verziója letölthető a www.nonlinear.com címről



A vizsgált hasonló célú szoftverek közül a legprofesszionálisabb.

A lényegesebb jellemzői: automatikus lane és band detektálás, háttér eltávolítási lehetőségek, rf kalibrálás, molekulaszűrés kalibrálás, mennyiségi kiértékelés, normalizálás, matching (különböző lane-ek bandjeinek egymással való megfeleltetése).

A program felülete jól kezelhető és gyorsan tanulható, belső ablakos megvalósítású. A szoftver nem platformfüggetlen, de több operációs rendszerre is elérhető.

Minőségének és képességeinek megfelelően a kipróbált szoftverek közül ez a legdrágább.

3. A program működése és használata

A szoftver megvalósítja a gél-elektroforézis képek pontos kiértékeléséhez szükséges funkciókat, egyéb képességei pedig nagyban meggyorsítják az elemzés menetét. A program platform függetlensége lehetővé teszi, hogy változtatások nélkül használható legyen Windows, Linux, Mac OS, Solaris rendszereken és bármilyen más operációs rendszer alatt, ahol létezik az 1.6-os Java futtató környezet implementációja.

A program legfontosabb funkciói felsorolás szinten (a későbbiekben részletesen is leírva az egyes funkciók használata és működése)

- Automatikus lane detektálás
- Automatikus band detektálás
- Háttér eltávolító algoritmusok (Background subtraction): Rolling ball, Valley to valley, manuális alapvonal megadás
- Rf kalibráció
- Mennyiségi kalibrálás és kiértékelése
- Molekulasúly (MW) kalibrálás és kiértékelés
- MW standardok kezelése
- Projektszemlélet

3.1 A program telepítése és futtatása

A program Java 1.6 nyelven íródott, ezért futtatható minden olyan platformon, amelyen telepítve van minimálisan az 1.6-os verziójú JRE (Java futtató környezet). Amennyiben a gépen, melyen a szoftver használni szeretné, még nincs Java telepítve, letöltheti a www.java.com oldalról, ahol megtalálhatóak a telepítéshez szükséges információk is.

A szoftver installálásához midössze ki kell tömöríteni az archív állományt egy tetszőleges könyvtárba. A program nem módosít semmilyen rendszer adatbázist, és nem helyez el átmeneti állományokat a merevlemezen. Amennyiben el akarja távolítani a programot, midössze törölnie kell a könyvtárat.

Windows operációs rendszer használata esetén a program elindításához elég a GelAnalyzer.exe program fájlt futtatni. Ez a program elindítja a Java környezetet, és

amennyiben nem található, vagy nem megfelelő verziószámú a JRE, hibaüzenetben tájékoztat a problémáról.

Más operációs rendszerek esetén(amennyiben a JRE megfelelően telepítve van) a GelAnalyzer.jar file-t kell elindítani. Ezt megtehető parancssorból a "java -jar GelAnalyzer.jar" vagy a "javaw -jar GelAnalyzer.jar" utasításokkal.

3.2 Licencek, a licenc állományok kezelése

A program csak megfelelő licenc állománnyal működik. A licenc állományok kiterjesztése ".gal" és a /license könyvtárban találhatóak. A licenc állományok minden esetben titkosítottak, továbbá ellenőrző összeggel vannak ellátva. Kétféle licenc létezik:

3.2.1 Demo licenc

A demo licenc lehetőséget ad rá, hogy kipróbálja a program összes funkcióját, de csak a licenc állományban tárolt képek felhasználásával. A demo licenc tartalmazza a használható állományok neveit, és minden állományhoz egy ellenőrző összeget. Az ellenőrző összeg használata biztosítja, hogy ne lehessen azonos nevű, de különböző képekkel használni a programot.

Amennyiben új projekt létrehozásakor, vagy projekt megnyitásakor a felhasználandó kép paraméterei nem egyeznek a licenc állományban megadottakkal a program hibaüzenetet ad.

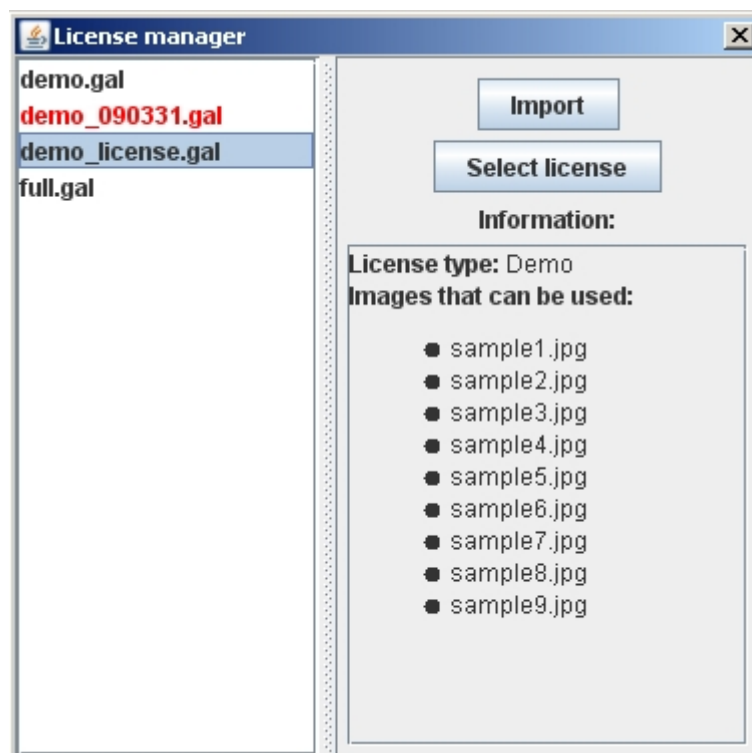
3.2.2 Teljes liszensz

Ilyen típusú licenc esetén tetszőleges képek elemezhetőek a programmal. A teljes licenc állomány tartalmazza a licenc azonosító kódját, a tulajdonos nevét, illetve tetszőleges megjegyzések is elhelyezhetőek az állományban, például a felhasználás módjára vonatkozó megszorítások (például csak oktatási célokra használható)

3.2.3 A licenc manager(license manager)

A licenc manager a help menüben található menüpont segítségével indítható el. Az ablak bal oldali részén láthatóak azok a licenc állományok, amiket a program induláskor a /license könyvtárból betöltött. Licenc állomány importálásához kattintsunk a Import gombra, és a

megjelenő dialógus ablakban válasszuk ki az importálni kívánt licencet. A kiválasztott licencet egyúttal a program a /license könyvtárba másolja. A bal panelen a licenc állományok neveire kattintva megjelennek a kiválasztott licenc tulajdonságai. Demo licenc esetén megjelennek a használható kép állományok nevei. A bal panelen a használatra kiválasztott licenc neve piros színnel jelenik meg. A program működését a kiválasztott licenc határozza meg. Licenc használatra kiválasztásához jelöljük ki az állomány nevét a bal panel listájából, és kattintsunk a "Select license" gombra. A program elmenti, hogy melyik a kiválasztott licenc, így a következő indításkor nem kell megismételni a fenti lépéseket.



A liszensz manager

3.3 A program nyelve

A program a nyelvi elemeket (üzenetek, menük, nyomógombok feliratai...) a /language könyvtárban található "selected.lan" szöveges állományból olvassa be. Az állományban minden sor szerkezete a következő: [azonosító: név], ahol az azonosító azonosítja a nyelvi elemet a program számára, a név pedig a megadott nyelvi elem. A sorok sorrendje tetszőleges. Saját felelősségre a nyelvi állományok módosíthatóak, ezzel a program több nyelvre is

lefordítható.

A "selected.lan" állomány módosítása előtt tanácsos arról biztonsági másolatot készíteni. Ha a program nem találja a "selected.lan" állományt, a beépített angol elemeket használja.

3.4 Projektek

A program projekt szemléletű. A projekteket elemzésnek (Analysis) nevezi. Minden elemzés pontosan egy képen történik. Az elemzések elmenthetőek speciális állományokba és később visszaolvashatóak. Az elemzés tárolja az összes információt (lane-eket, kalibrációs görbéket...).

3.4.1 Új elemzés létrehozása

Új elemzés létrehozásához válasszuk a "Create new analysis" elemet a File menüből, vagy kattintsunk az "új elemzés" ikonra a felső ikonsorban (lásd függelék). Egy állomány kiválasztó dialógus ablak jelenik meg, ahol kiválaszthatjuk a kiértékelendő képet. A támogatott formátumok: JPEG, PNG, GIF. Az állomány kiválasztó ablakban egy miniatűr jelenik meg a képről. A kép kiválasztása után egy ablak jelenik meg, ahol meg kell adni, hogy milyen típusú a kép. Két lehetőség van: sötét alapon világos foltok (light on dark) vagy világos alapon sötét foltok (dark on light). Ez az információ a band-ek detektálása illetve a profil megjelenítése szempontjából lényeges. Mivel világos alapon sötét foltok esetén az intenzitás értékek fordítottak, a program ilyenkor invertálja a profilokat, hogy helyes eredményeket adjon.

3.4.2 Elemzés mentése

Az elemzés mentéséhez válasszuk a File menüből a "Save analysis" elemet, vagy kattintsunk az "Elemzés mentése" ikonra a felső ikonsorban (lásd függelék). A megjelenő ablakban adható meg az állomány neve és helye. Az elemzés állomány nem tartalmazza a képet. Ahhoz hogy egy már elmentett elemzést betöltsünk annak ugyanabban a könyvtárban kell lennie, mint a kép állománynak amihez tartozik. Az elemzés állomány tartalmazza a kép állomány nevét és a képhez tartozó ellenőrző összeget. Ajánlott tehát a projektet a kép file-t tartalmazó könyvtárba menteni. Azonban, ha a kép forrása nem írható később is odamásolható a kép a

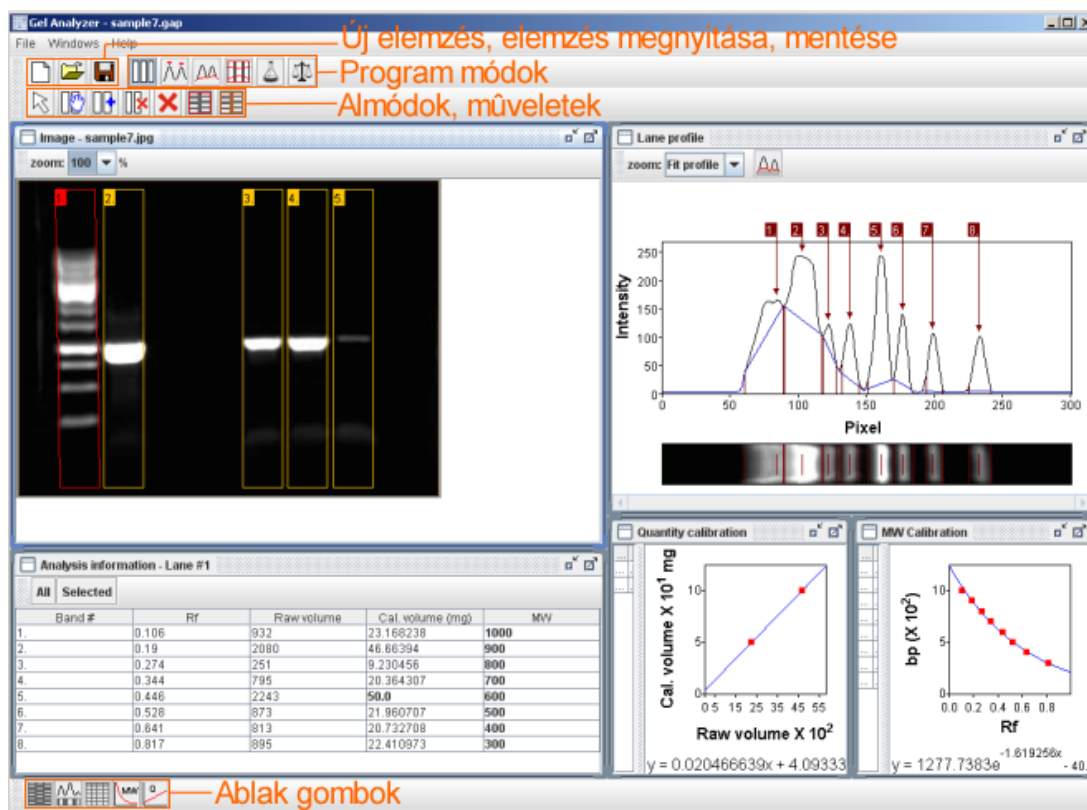
projekt állomány könyvtárába. A projekt állományban lévő ellenőrző összeg biztosítja, hogy ne lehessen az elemzés adatait egy azonos nevű, de különböző képhez kapcsolni, ezzel meghamisítva a kiértékelés eredményeit.

3.4.3 Elemzés megnyitása

Egy már elmentett elemzés megnyitásához válasszuk a File menüből a "Load analysis" elemet, vagy kattintsunk a felső ikonsorban lévő "Elemzés megnyitása" gombra (lásd függelék). A megjelenő dialógus ablakban választható ki a projekt állomány. Csak ".gap" kiterjesztésű állományok nyithatóak meg. Amennyiben a program nem találja az elemzéshez kapcsolt képet, vagy nem egyezik a kép ellenőrző összege és az elemzés állományban tárolt érték, erről a program egy hibüzenetben tájékoztat.

3.5 A program grafikus felülete

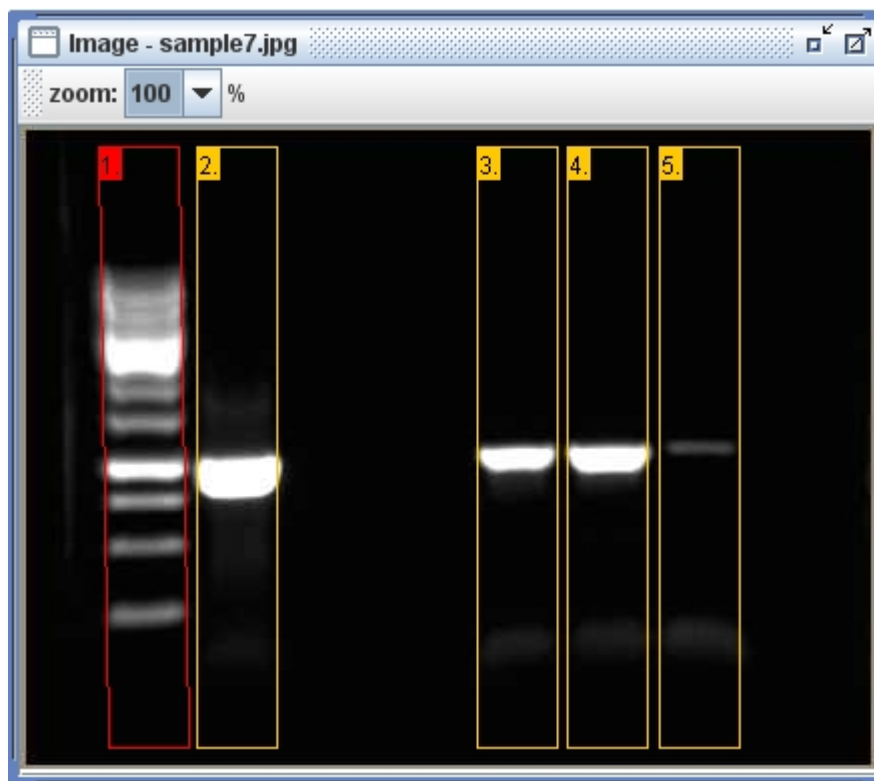
3.5.1 A fő ablak (Main window)



A fő ablak tetején két sorban láthatóak az ikonok. A felső sorban lévő program mód gombok szolgálnak az elemzés lépései közötti váltásokra. A program módoknak ez az elrendezése egyúttal a kiértékelés lépéseinek is az ajánlott sorrendje. Az alsó sor ikonjai mindig az aktuális program módnak megfelelő műveleteket mutatják.

Az ablak alján látható gombok segítségével előtérbe helyezhetőek a megfelelő ablakok. A fő ablak belső része egy desktop-ként funkcionál, az itt lévő öt ablak tetszőlegesen átméretezhető, minimalizálható és maximalizálható. A Windows menü "Arrange windows" utasítása segítségével a program automatikusan elrendezi az ablakokat a fő ablak méretarányainak megfelelően.

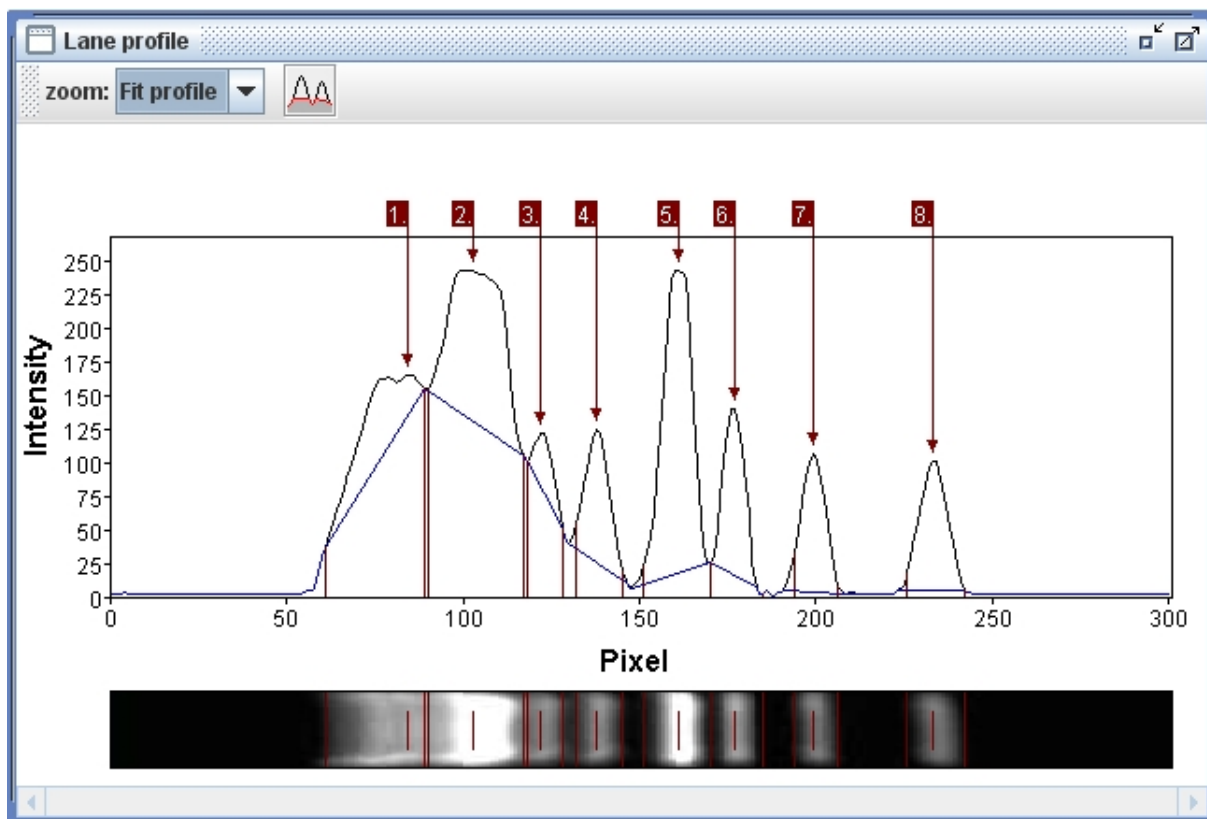
3.5.2 A kép ablak (Image window)



A kép ablak(Image window) lane módban

A kép ablakban jelenik meg a feldolgozás alatt álló kép. A program módoktól függetlenül mindig megjeleníti a lane-eket. A lane-eket sárga az éppen kiválasztott lane-t piros színnel rajzolja ki. A program módjaitól függően megjeleníti a bandeket és Rf kalibrációs görbéket. MW és mennyiségi kiértékelési módokban a kalibráló band-eket jelölő körök narancssárga színűek. Az ablakon történő műveletekről részletes leírása a megfelelő módok tárgyalásánál olvasható. Az ablak eszköztárában található a zoom. Ezzel az eszközzel nagyítható, vagy kicsinyíthető az ablak tartalma a megadott arányokban. Amennyiben a megjelenített kép nagyobb mint az ablak, aktívvá válnak a görgetősávok.

3.5.3 A lane profil ablak (Lane profile window)



A lane profil ablak profil illesztéses zoom módban. A háttérrel kék színű töröttvonal jelöli

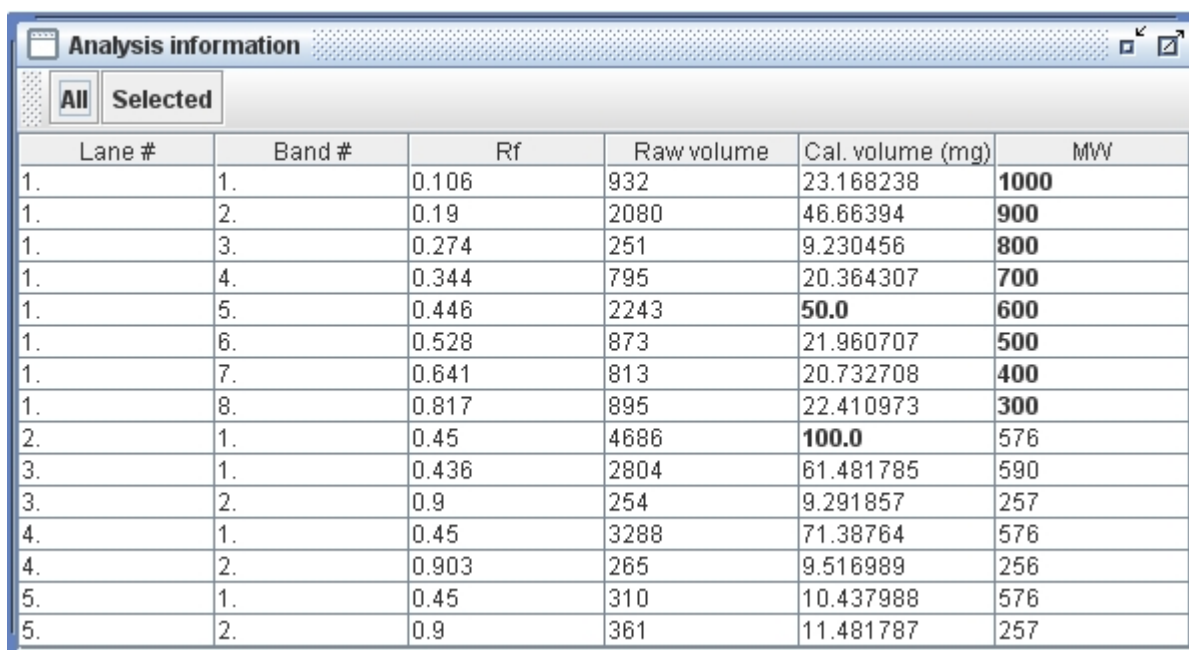
A lane profil ablak mindig a kiválasztott lane profilját mutatja. A kiválasztott lane-en megjeleníti a bandek határait, csúcspontjait. Amennyiben van kijelölt háttér, azt kék színnel rajzolja ki. A profil ablak ikonsorában található "háttér nélkül" ikonra kattintva ki és be lehet kapcsolni a háttér megjelenítését. Amennyiben van kijelölt háttér ezt az opciót bekapcsolva a program levonja a háttér értékeit a profil értékeiből és úgy jeleníti meg a profilt. Természetesen ennek a lehetőségnek a bekapcsolása nem változtat semmit az adatokon, mindössze a megjelenítést módosíthatjuk vele. Bekapcsolt "háttér nélkül" opció esetén nem használható a manuális alapvonal háttér eltávolítási eszköz.

A megjelenített profilon lehetőség van nagyításra, ez az ablak ikonsorában található zoom eszköz segítségével tehető meg. A zoomnak két módja van:

- Profil illesztéses mód (Fit profile): ebben az esetben a profil teljes szélességét az ablak szélességéhez igazítja. Ebben a módban a kiválasztott lane teljes profilja látható, a megjelenítés felbontása az ablak átméretezésével változtatható.
- Fix zoom értékek (100%, 200%, 300%): A profilt a megfelelő mértékben nagyítja. Amennyiben az így keletkező kép nagyobb mint a megjelenítési terület, az ablak alján található görgetősáv aktívvá válik, és ezzel lehet a profilt görgetni. A profil görgetése során csak a megjelenítési terület belsejét és a vízszintes skálát rajzolja újra a program. A függőleges tengely skálája görgetés közben is látható marad. Profil illesztés esetén a görgetősáv inaktív.

A profil magasságát mindkét esetben a megjelenítő terület magassága határozza meg. A függőleges skála az egyes pixelek intenzitás értékeit jelenti. A maximális érték 255, de a skála mindig a megjelenített profilhoz igazodik. Az alsó skála a lane kezdőpontjától számítva a távolságokat jelenti pixelben.

3.5.4 Az elemzés információs ablak (Analysis information window)



Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume (mg)	MW
1.	1.	0.106	932	23.168238	1000
1.	2.	0.19	2080	46.66394	900
1.	3.	0.274	251	9.230456	800
1.	4.	0.344	795	20.364307	700
1.	5.	0.446	2243	50.0	600
1.	6.	0.528	873	21.960707	500
1.	7.	0.641	813	20.732708	400
1.	8.	0.817	895	22.410973	300
2.	1.	0.45	4686	100.0	576
3.	1.	0.436	2804	61.481785	590
3.	2.	0.9	254	9.291857	257
4.	1.	0.45	3288	71.38764	576
4.	2.	0.903	265	9.516989	256
5.	1.	0.45	310	10.437988	576
5.	2.	0.9	361	11.481787	257

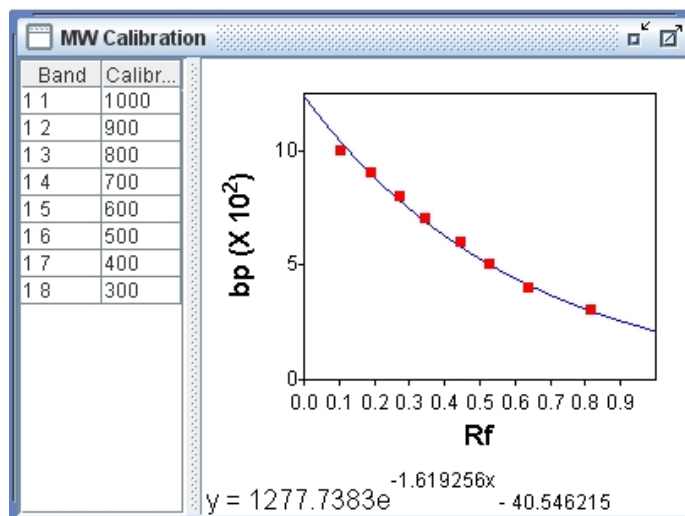
Az elemzés információs ablak.

Az elemzésben szereplő összes lane-t megjeleníti

Ez az ablak jeleníti meg az elemzés adatait lane-ekre bontva. Választhatunk, hogy a kiválasztott, vagy az összes lane adatát jelenítse -e meg. Táblázatos formában láthatjuk lane-enként az egyes band-ek tulajdonságait: területét (Raw volume), Rf értékét és mennyiségi illetve MW értékeit. Amennyiben valamelyik kalibrációban az adott band kalibráló band-ként szerepel, az adott értékek félkövér betűtípussal láthatóak. A program működése során az elemzésben történt bármilyen változtatás hatása azonnal észlelhető. Például, ha módosítjuk a kiválasztott lane háttéreltávolítását, az maga után vonja a mennyiségi kiértékelés adatainak a változását. Bármilyen módosulás az elemzésben azonnal megjelenik az elemzés információs ablakban.

Lehetőség van az ablak tartalmát a vágólapra másolni. Ehhez előbb jelöljük ki a másolni kívánt sorokat, vagy a Ctrl+A billentyűkombinációval jelöljük ki az egész táblát. A vágólapra másoláshoz használjuk a Ctrl+C billentyűkombinációt. Ezután a szoftverben, ahová az adatokat szeretnénk beilleszteni használjuk a program saját beillesztés funkcióját.

3.5.5 Az molekulásúly és mennyiségi kalibrációs ablakok



Az MW kalibrációs ablak. A bal oldali panelen láthatóak a kalibráláshoz használt band-ek adatai

A mennyiségi és molekulásúly kalibrációs ablak azonos felépítésű. Az ablakok osztott elrendezésűek, egy mozgatható függőleges sáv választja el egymástól az ablak két komponensét. A bal komponens egy táblázatban a kalibrációban résztvevő band-ek azonosítóját (lane száma, band száma) illetve a band-ekhez rendelt kalibrációs értékeket jeleníti meg. A jobb oldali komponens a kalibrációs band-ek (rf, bp) értékpárjaira illesztett függvény képét jeleníti meg. A függvény mennyiségi kalibráció esetén $y = a \cdot x + b$, molekulásúly kalibráció esetén pedig $y = a \cdot e^{b \cdot x} + c$ alakú. A grafikonokat zoomolni nem lehet, de a megjelenítés méretaránya követi az ablak méretarányait, így az ablak átméretezésével a függvények képe nagyobb felbontásban tekinthető meg. Az ablakok tartalma azonnal frissül, amennyiben az elemzésben történt változtatások kihatással vannak a kalibráló görbék paramétereire.

3.6 A program módjai

Az elemzés során a program mindig a 6 mód egyikében van. Ezek a Lane-, Band-, Háttér eltávolítási (Background subtraction), Rf kalibrációs, mennyiségi és molekulásúly(MW) kalibrációs módok.

A módoknak ez a sorrendje, és ahogy ikonjaik a főablak felső ikonsorában láthatóak egyúttal az elemzésnek is egy ajánlott sorrendje. Bármelyik módot kiválasztva a főablak alsó menüsorában az adott módhoz tartozó funkciók ikonjai jelennek meg. A program módok változtatásával egyes ablakok tartalma is változik. Például a kép ablak minden módban megjeleníti a lane-eket, de a lane-ek band-jei nem jelennek meg Rf kalibrációs módban, és az Rf kalibráló görbék is csak Rf kalibrációs módban láthatóak.

A program módjainak és a hozzájuk kapcsolódó műveleteknek a tészletes leírása a következőekben olvasható.

3.6.1 A Lane mód

Ebben a módban van lehetőség a lane-ekre vonatkozó műveletek elvégzésére, azok detektálására, módosítására, törlésére. Lane módban az összes művelet a kép ablakon történik.

3.6.1.1 Lane-ek automatikus detektálása

Az automatikus detektálás során a program egy beépített algoritmus alapján megkísérli meghatározni a képen a futási lane-eket. Az algoritmus bizonyos keretek között paraméterezhető. A gél-eketroforézis képek nagyon sokfélék lehetnek, és nem garantált, hogy az algoritmus az összes esetben pontos eredményt ad. Kis kontrasztú, zajos, elmosódott képek esetén a detektálás gyakran nem megfelelő, vagy hamis eredményeket ad. A használt algoritmus pontossága a kép méretének növekedésével csökken, és a detektálási folyamat időtartama növekszik. Általánosságban elmondható, hogy ajánlatos az elemzendő képeket - amennyiben indokolt - előbb egy képmanipuláló programmal átméretezni, a kép kontrasztját javítani. A program természetesen lehetőséget ad a lane-ek teljeskörű manuális manipulálására, így bármilyen minőségű kép elemezhető.

Az automatikus detektálás előtt lehetőség van a területet kiválasztani, ahol a műveletet végre szeretnénk hajtani (Region of Interest - ROI). Hogy ezt megtegyük, kattintunk a "detektálási

terület kiválasztása" gombra a főablak ikonjai között. Ezután a kép ablakban a bal egérgombot lenyomva tartva jelölhetjük ki a detektálási területet. A kijelölt terület oldalai módosíthatóak, a téglalap oldalait az egérrel megfogva azok mozgathatóak. Ha a kijelölt területet törölni szeretnénk, ez a jobb egérgombbal a képre kattintva tehető meg. Amennyiben nem adtunk meg detektálási területet, a lane detektálás a kép egész területén fog történni. A detektálási terület kiválasztásával történő lane detektálás több lépésben is alkalmazható. A detektálás újbóli használata nem törli az előzőleg már létező lane-eket.

Az automatikus lane detektáláshoz a főablak ikonjai közül kattintunk a "Lane-ek detektálása" gombra. A megjelenő dialógus ablakban van lehetőség az algoritmus paraméterezésére:

- Alsó és felső küszöbérték (Low-, high threshold): Ezekkel a paraméterekkel szabályozható az algoritmus érzékenysége. Minél kisebbek ezek az értékek annál érzékenyebb az eljárás a zajra. Amennyiben a feldolgozandó kép zajos, ajánlatos ezeket az értékeket megnövelni. Az alsó értéknek mindig kisebbnek kell lennie a felsőnél.

- Minimális fragment méret (Minimal fragment size). Az eljárás során az algoritmus igyekszik kiszűrni a zajt. A minimális fragment méret egy alsó küszöböt határoz meg a zajnak. Az ennél az értéknél kisebb darabokat az algoritmus figyelmen kívül hagyja. Amennyiben zajos képen dolgozik ajánlatos az értéket megnövelni az alap beállításhoz képest.

Az "Ok " gombra kattintva megtörténik a lane-ek detektálása. Az eredmény a Kép ablakon látható.

3.6.1.2 Lane kiválasztása

A lane kiválasztása almód használatához kattintunk a főablak ikonsorában a "Lane kiválasztása" gombra. Ebben a módban van lehetősége a kép ablakban a lane-ek belsejébe kattintva azokat kiválasztani. A kiválasztott lane profilja megjelenik a Lane profil ablakban, az adatai pedig az Elemzési információk ablakban. Ez az almód az alapértelmezett a Lane módban. Lane-t kiválasztani lehetőség van az Rf kalibrációs módot kivéve az összes többi módban.

3.6.1.3 Lane-ek törlése

A kiválasztott lane törléséhez kattintunk a "Kiválasztott lane törlése" gomb. Az "Összes lane törlése" gombra kattintva az összes lane törölhető.

A lane(-ek) törlésével a kapcsolódó adatok is elvesznek. Amennyiben a törölt lane(-ek)-en voltak kalibráló band-ek, az új adatoknak megfelelően a program újraszámítja a kalibráló görbéket. Ha elegendő számú kalibráló band szerepel a kalibrációban (mennyiségi vagy MW), akkor megtörténik az új kalibráció alapján a kiértékelés, és az új adatok megjelennek az elemzési inoformációs ablakban.

3.6.1.4 Új lane hozzáadása

Ez a művelet a "Lane hozzáadása" gombra kattintva használható. Ezután az új lane a Kép ablakon 3 kattintással megadható. Az első kijelöli a lane tetejét, a második az alját, a harmadik pedig a lane szélességét rögzíti. A folyamat közben az egeret mozgatva látható az új lane alakja. A művelet megszakítható a jobb egérgombbal történő kattintással. Az új lane hozzáadásakor annak az indexe nem a sorrendben a következő lesz, hanem ilyenkor a program újra indexeli az elemzés összes lane-jét az elhelyezkedésük alapján balról jobbra. Ugyanez igaz a lane-ek törlésekor is.

3.6.1.5 Lane-ek módosítása

A lane detektáló algoritmus egyenes lane-eket hoz létre. Amennyiben a lane detektálás nem adott kielégítő eredményt, vagy a futtatás során a lane-ek nem egyenesek, szükséges lehet a lane-ek módosítása. Ebben a módban tetszőlegesen módosíthatja a lane-ek alakját és szélességét.

Ennek az almodnak a használatához kattintsunk a "Lane-ek módosítása" gombra. Ennek hatására megjelenik a lane-ek középvonala és a kontrollpontok. Minden lane egy spline interpoláló görbe, de detektálás és megadás során csak két pontja kap értéket, így a képe egyenes lesz. Ahhoz, hogy valódi görbe lane-eket hozzunk létre legalább három kontrollpont szükséges. Kontrollpont hozzáadásához kattintsunk a lane középvonalára. Ennek hatására az adott ponton a lane görbéjéhez hozzá lesz adva egy új kontrollpont, az egérgomb lenyomva tartásával az új pont mozgatható.

Meglévő kontrollpontokat módosítani az egérrel lehet. A kiválasztott kontrollpontot az egér segítségével mozgatható. A kontrollpontokat nem lehet túlmozgatni a megelőző és következő kontrollpontok vízszintes tengelyén. A lane görbéje a pont mozgatásával módosul, így a lane-ek futását pontosan követő görbék hozhatók létre.

Az első és utolsó kontrollpont kivételével a többi a jobb egérgombbal törölhető.

A lane-ek szélessége úgy módosítható, hogy a lane-ek szélét az egérrel mozgatjuk.

Fontos, hogy a lane-ek bármilyen nemű változtatása maga után vonja a lane adatainak elvesztését.

3.6.2 Band mód (Bands mode)

Ebben a módban van lehetőség a lane-ek band-jeinek kezelésére. Band módban a műveletek a Lane profil ablakon történnek. A band-eket megjeleníti a kép ablak is, de ott nincs lehetőség műveletekre. A Lane profil ablakban függőleges nyilak és számok jelölik az egyes band-ek csúcspontját és függőleges szakaszok a band-ek határvonalait. A kép ablakon a band-ek határait vízszintes szakaszok, a band-ek csúcspontjait pedig fehér körök jelölik.

3.6.2.1 Bandek detektálása

A program képes a band-ek határait és csúcspontjait automatikusan meghatározni a kiválasztott, vagy egyszerre az összes lane-en. A band detektálási algoritmus nem paraméterezhető, de a lane detektálási módszerhez képest kevésbé érzékeny a zajra, és meglehetősen pontosan működik. Az eszköz használatához kattintsunk a "Band-ek detektálása a kiválasztott lane-en" vagy a "Band-ek detektálása az összes lane-en" gombok valamelyikére. A band detektálás után az új adatok azonnal megjelennek az elemzési információs ablakban.

3.6.2.2 Új Band hozzáadása

Új band hozzáadásához kattintsunk a "Band hozzáadása" gombra. A Lane profil ablakban a profil területén az egérrel adhatjuk meg az új band kezdetét és végét. Az egeret mozgatva függőleges szakasz jelzi az aktuális pozíciót. A band hozzáadás művelete megszakítható a profil megjelenítési területen jobb egérgombbal kattintással.

Nem lehetséges úgy elhelyezni új band-et, hogy annak a területe akár csak részben is megegyezzen egy már létező band-del.

3.6.2.3 Band törlése

A kiválasztott lane-en band-ek törlése a lane profil ablakban a törlendő band belsejébe, jobb egérgombbal történő kattintással tehető meg. A főablak ikonjai között található "Összes band

törlése a kiválasztott lane-en" művelettel törölhető az összes band a kiválasztott lane-en. Egy band törlése esetén nem, de a kiválasztott lane-en az összes band törlése előtt kér megerősítést a program. Amennyiben olyan band-ek törlésére került sor, amelyek mennyiségi vagy MW kalibráló band-ek, a kalibrációk újra kiszámításra kerülnek, és elegendő kalibráló band esetén megtörténik a kiértékelés az elemzés összes band-jén.

3.6.2.4 Band-ek módosítása

A kiválasztott lane band-jeinek kezdetét és végét, illetve csúcspontját a lane profil ablakban az egér használatával módosíthatjuk. A band-ek kezdő és végpontját a megjelenítési terület aljától a profilig húzott szakaszok jelölik. A band-ek csúcspontját számokkal ellátott nyilak jelölik, amelyek a megjelenítési terület tetéjétől a profilig húzódnak. Ezeket a szakaszokat az egérrel mozgathatjuk. A band kezdetét és végét nem lehet átmozgatni a band csúcsát jelző ponton. A band-ek rf értéke egyenlő a csúcspontjuk pozíciója osztva a lane profiljának hosszával. A band-ek detektálásakor az algoritmus zajszűrést is végez. A detektálás során a band csúcspontja az így kapott szűrt profilnak a band által határolt intervallumon a lokális maximumhoz tartozó pozíció. Amennyiben mennyiségi vagy molekulásúly kalibráló band-ek adatai változtak meg, a program újra elvégzi a kalibráló görbék illesztését és az elemzésben szereplő band-ek kiértékelését.

3.6.3 Háttér eltávolítási mód (Background subtraction mode)

A kép háttérének intenzitása illetve annak változása az egyes lane-ek profilján is megjelenik. A háttér az elemzés szempontjából nem hordoz lényegi információt, viszont jelenléte a band-ek alakját - ezáltal csúcspontjuk pozícióját - eltorzíthatja, ami a molekulásúly kalibrációt és kiértékelést teszi pontatlanná. A háttér intenzitás értékei hozzáadódnak az egyes band-ek területéhez, ami pontatlan mennyiségi kiértékeléshez vezet. Erre a problémára jelentenek megoldást a háttér eltávolítási (background subtraction) módszerek. Használatukkal kijelölhetjük a háttér profilját, amit a program a számítások során levon a lane profiljának értékeiből.

A program több módszert is kínál az egyes lane-ek profiljairól a háttér információjának eltávolítására. A Lane profil ablak "Háttér nélkül" megjelenítési módjának be- illetve kikapcsolásával választhatunk, hogy a program a megjelenítés során a háttér profiljának

értékeit levonja a lane profiljáról, vagy pedig a háttér profilját külön jeleníti meg.. Utóbbi esetben a háttér kék vonalként jelenik meg a profil alatt. A rendelkezésre álló módszerek háttér eltávolításhoz a következők:

3.6.3.1 Rolling ball algoritmus (automatikus)

Ennek az algoritmusnak a működése úgy szemléltethető, mintha a profil alján egy adott sugarú kört görgetnénk végig. Azok a pontok, ahol a kör érinti a profilt lesznek a háttér pontjai. Minél kisebb a kör sugara, annál inkább "eltűnik" a bandekben, vagyis annál jobban eltávolítja a hátteret, de túl kis sugár esetén már a valódi band-ek területét csökkentjük.

Ennek a módszernek a használatához kattintsunk a főablak ikonjai közül a "Rolling ball" gombra. A megjelenő dialógus ablakban kiválasztható, hogy a művelet csak a kiválasztott, vagy az összes lane-t érintse, illetve megadható a kör sugarát.

3.6.3.2 Valley to valley algoritmus (automatikus)

Ez a módszer csak abban az esetben működik, ha a kiválasztott lane-en már vannak band-ek megadva. Az algoritmus lényegében a band-ek kezdő és végpontjainál lévő profil értékeket köti össze, így alakítva ki a háttér profilját.

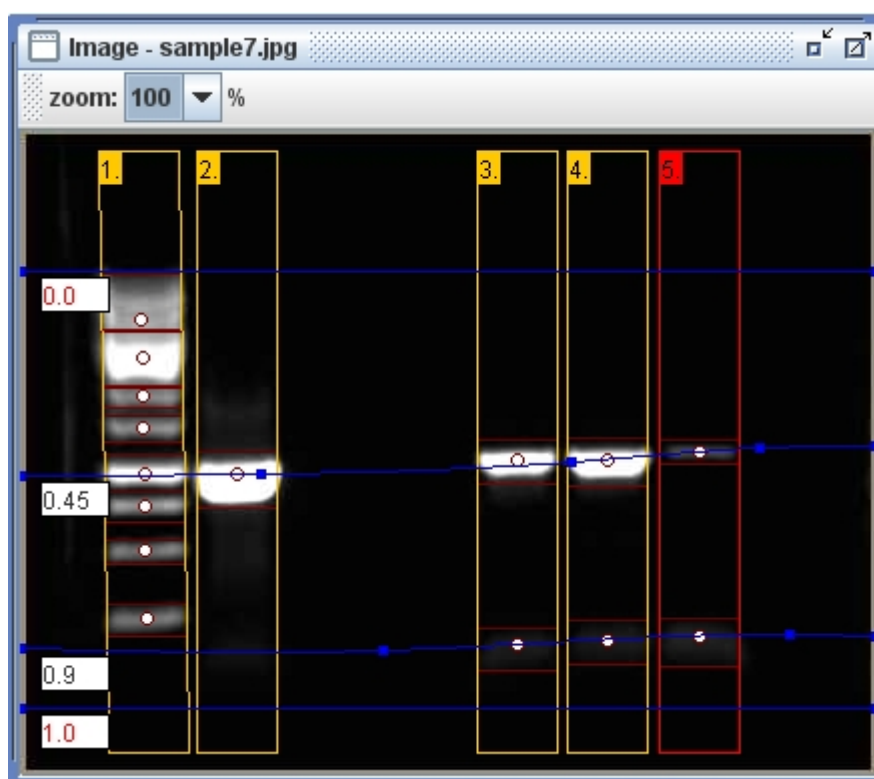
Ennek a módszernek a használatához kattintsunk a főablak ikonjai közül a "Valley to Valley" gombra. A megjelenő dialógus ablakban kiválasztható, hogy a művelet csak a kiválasztott, vagy az összes lane-t érintse.

3.6.3.3 Manuális alapvonal megadása (Manual Baseline)

Ez az eszköz csak abban az esetben használható, ha a Lane profil ablak "Háttér nélkül" funkciója ki van kapcsolva. Ennek a módnak a használatához kattinstunk a főablak ikonsorában a "Baseline" gombra. Ha már a kiválasztott lane-en volt Rolling ball vagy Valley to Valley típusú háttéreltávolítás, akkor ezek a hátterek törlésre kerülnek. Az alapvonal módban korábban megadott háttér nem törlődik, hanem módosítható lesz. Ha nincs korábbi alapvonal megadva, vagy a korábbi törlésre került, akkor alapvonal módban a Lane profil ablakban a profil területre kattintva egy két kontrollpontból álló vízszintes alapvonal lesz megadva. Ennek a vonalnak a két kontrollpontja a profil elején és végén található. A kontrollpontokat az egérrel lehet módosítani, első és utolsó pont esetén csak függőleges

irányba. Új kontrollpontot úgy adható meg, hogy a terület egy tetszőleges pontjára kattintunk. Ekkor egy új pont lesz beillesztve az alapvonalba. Meglévő kontrollpontokat a jobb egérgombbal lehet törölni, kivéve az első és utolsó pontot. A háttéreltávolítás megszüntetéséhez a főablak ikonsorában található "Háttéreltávolítás megszüntetése" gomb használható. Alapvonal esetén a kontrollpontokat mindig egyenes szakaszok kötik össze, itt nincs lehetőség interpoláló görbék használatára. Amennyiben az alapvonal bizonyos részei a profil fölött haladnak, ott a program az alapvonalat a profilra illeszti.

3.6.4 Rf kalibrációs mód



Rf kalibráló görbék és azok kontrollpontjai illetve értékei a kép ablakon Rf módban.

Az Rf kalibráció segítségével javíthatóak bizonyos futtatási hibák és lane torzulások. Különösen hasznos a módszer abban az esetben, ha a lane-ek kezdő- és végpontjai eltérőek. Az Rf kalibráció során kalibráló görbék adhatóak meg, melyeknek pontjai fix Rf értékeket

képviselnek a képen. Amennyiben nem adunk meg kalibráló rf görbét, az egyes lane-eken belül a band-ek Rf értéke a band lane-en belüli pozíciója alapján kerül meghatározásra. Mivel a lane-ek hossza és kezdő- illetve végpozíciói eltérőek lehetnek, rf kalibráció nélkül a bandek rf értékei csak lokálisan érvényesek. Ez lehetetlenné teszi a pontos molekulásúly kalibrációt és kiértékelést, mivel ez a művelet az egyes band-ek Rf értékein alapul. Kalibráló görbék használata esetén az egyes band-ek Rf értéke a band-el szomszédos kalibráló görbéknek a band vízszintes pozíciójánál érvényes függvényértékéből, és a band pozíciójából interpoláció segítségével lesz meghatározva.

A kalibráló görbék kontrollpontokból épülnek fel, és hasonlóan a lane-ek szerkezetéhez ezek is interpoláló spline görbék. Az Rf kalibrációs görbék műveletei a Kép ablakon történnek. A 0.0 és 1.0 Rf értékű görbék kivételével az összes többi görbe Rf értéke tetszőlegesen adható meg. A görbék elméletileg keresztezhetik egymást, ami hamis eredményekhez vezet. A program nem ellenőrzi a görbék minden pontjának helyességét, így a pontos kalibráló görbék megadásának feladata a felhasználóra hárul.

3.6.4.1 Alap (0.0 és 1.0) kalibráló görbék hozzáadása

Az alapértelmezett görbék a 0.0 és 1.0 rf értéket képviselő görbét jelentik. Ezzel a két görbével a lane-ek futásának kezdeti ívét, és a végét jelölhetjük ki. A legtöbb esetben ennek a két görbének a megadásával és módosításával elérhető az egyes band-ek rf értékeinek helyessége.

A két görbe a főablak ikonjai között a "Alapértelmezett Rf görbék hozzáadása" gombra kattintva hozható létre. A program két görbét ad a kalibrációhoz (0.0 és 1.0), amelyek pozícióját a lane-ek kezdő illetve végpozícióinak számtani közepéből határozza meg. Természetesen ezek a görbék is módosíthatóak, de az értékük nem változtatható és csak az egész Rf kalibráció törlésével törölhetőek.

3.6.4.2 Új Rf kalibráló görbe hozzáadása

Ehhez a művelethez válasszuk az almód ikonok közül az "Új Rf görbe hozzáadása" gombot. Ezután a képtablakon kattintva adható meg az új görbe pozíciója. Ha nem voltak korábban 0.0 és 1.0 értékű görbék megadva, akkor ezek is megjelennek.

Az ablak bal oldalán, a görbék pozíciójánál található szöveg mezőkben adhatóak meg az

egyes görbék Rf értékei. A 0.0 és 1.0 görbék értékei nem módosíthatóak, a többi görbének tetszőleges 0.0 és 1.0 közötti valós szám adható meg.

3.6.4.3 Rf görbék módosítása

A 0.0 és 1.0 görbék kivételével a görbéket jobb egérgombbal a görbe tetszőleges pontjára (nem kontrollpontra) történő kattintással lehet törölni. A 0.0 és 1.0 görbéket a kalibráció törlésével lehet eltávolítani. Az egész Rf kalibráció törléséhez használjuk az almód ikonok közül az "Rf kalibráció törlése" gombot.

Mivel az Rf görbék ugyanolyan interpoláló spline görbék, mint a lane-ek, a kontrollpontjaik módosítása is azokkal megegyező módon történik. (A lane-eket alkotó görbék függvényének értelmezési tartománya a képernyő függőleges tengelye, az rf görbék értelmezési tartománya a képernyő vízszintes tengelye)

Rf görbék kontrollpontjait az egérrel lehet mozgatni. Kontrollpont törléséhez használjuk a jobb oldali egérgombot. Új kontrollpont a görbe egy tetszőleges pontjára történő kattintással adható a görbéhez.

Amennyiben egy lane egy band-je a 0.0 és 1.0 vonalak által határolt területen kívülre esik, annak az rf értéke negatív, illetve 1.0-nál nagyobb értéket kap. Az rf értékek elméletileg nem értelmezettek ezeken az értékeken túl, tehát az ilyen esetek kerülendőek, bár a program kezeli az ilyen értékű band-ek molekulaszűrés kiértékelését is. Azonban ez nem tekinthető helyes elemzésnek és használata nem javallott.

3.6.5 Mennyiségi kalibráció (Quantity calibration)

A mennyiségi kalibráció úgy történik, hogy ismert mennyiségű band-ekhez mennyiségi értékeket rendelünk. A band-ek területéből és a hozzájuk rendelt értékekből képzett pontokra a program egy lineáris $y(x) = a \cdot x + b$ alakú függvényt illeszt (legkisebb négyzetes értelemben vett approximáció). Az elemzésben szereplő összes többi band mennyiségi értékét ebből a függvényből határozza meg, az ismeretlen band-ek területi értékét (raw volume) felhasználva. Mivel a mennyiségi kalibráció a band-ek területi értékeire támaszkodik, fontos ezeknek az adatoknak az egymáshoz viszonyított pontossága. A kalibráció pontossága függ a felhasznált kalibráló band-ek számától. Mivel lineáris illesztés történik, legalább két band mennyiségi értékét meg kell adni, azonban minél több band mennyiségi adatát ismerjük, annál pontosabb

lesz a kiértékelés.

Mennyiségi kalibrációs módban a kép ablakon megjelennek az egyes lane-ek bandjei.

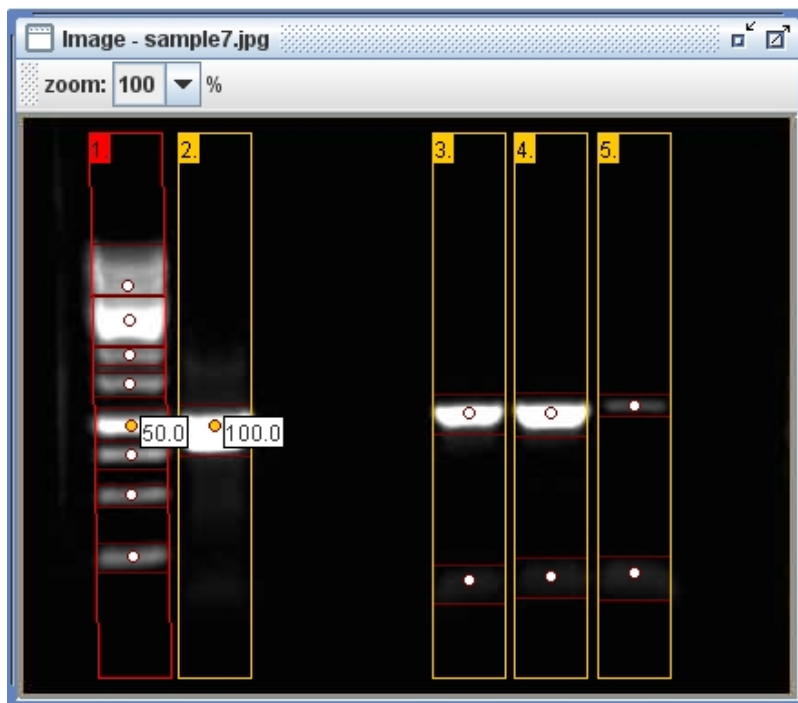
Az egyes band-ek csúcsát jelölő fehér körökre kattintva, a megjelenő szövegmezőben megadható a band-hez rendelt mennyiségi érték. Az érték beírása után az enter leütésével - amennyiben legalább 2 kalibráló band van megadva - megtörténik a kalibráló görbe illesztése, és az elemzésben található összes band kiértékelése. Annak a band-nek, amelyikhez értéket rendeltünk a jelölő köre narancssárga színűvé válik. Egy kalibráló band jelére kattintva a hozzátartozó szövegmező eltüntethető, illetve újra láthatóvá tehető.

Egy band-et a jelölő körére jobb egérgombbal történő kattintással lehet törölni. Band törlése - amennyiben még legalább 2 kalibráló band van megadva - maga után vonja a kalibráló görbe újraszámítását és az elemzés bandjeinek kiértékelését.

A főablak almód ikonsorában a legördülő menüben választható ki a mennyiségi kalibráció mértékegysége. A kalibráció és kiértékelés szempontjából a mértékegység lényegtelen, de megjelenik az elemzési információk ablak táblázatának fejlécében és a mennyiségi kalibrációs ablak grafikonjának függőleges tengelyének címkéjén.

Az illesztett függvényt, annak a képét megtekinthetjük a Mennyiségi kalibrációs ablakban.

Ugyanitt fel vannak sorolva a kalibrációs band-ek is (lane szám, band szám) alakban.



A kép ablak mennyiségi kalibrációs módban.

3.6.6 A molekulasúly kalibráció (MW calibration)

A molekulasúly kalibráció a kalibráló band-ek megadását, törlését, módosítását tekintve a mennyiségi kalibrációval teljesen megegyező módon történik.

MW kalibráció esetén legalább 3 kalibráló band szükséges a görbe illesztéséhez, és a kiértékeléshez. A program egy $y(x) = a \cdot e^{b \cdot x} + c$ alakú függvény illeszt a megadott adatokra.

MW kalibráció esetén a kalibráló bandekhez tartozó értékek mértékegysége mindig a bázispár (base pair, Bp).

Mivel a gyakorlatban mindig ismert a futtatás során használt standardok összetétele (a standardban található fragmentek mérete bázispárokból) ezért célszerű ezt az adatot egy egységként kezelni. A program lehetőséget ad rá, hogy ismert standardokat eltároljunk és ezeket egyetlen művelettel ráillesszük egy kiválasztott lane band-jeire. Lehetőség van továbbá egy lane band-jeit mint standardot elmenteni.

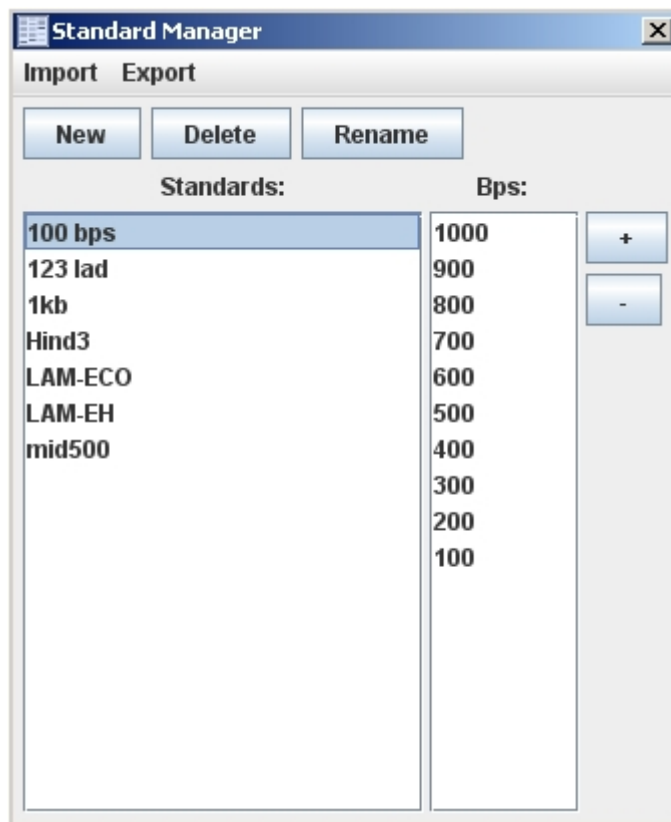
A program a standardokat a "standards.mws" állományban tárolja. Standardokat létrehozni, módosítani, törölni a standard manager segítségével lehet. A standard manager elérhető az "Analysis" menüből. Lehetőség van a standardokat szöveges állományba exportálni. A program képes standardokat más mws állományokból, illetve szöveges állományokból importálni. Szöveges állományból történő importálás esetén a standardban szereplő bázispároknak csökkenő sorrendben soronként kell szerepelnie. A nem számot tartalmazó sorokat a program nem veszi figyelembe.

A standard manager bal listájában láthatóak a rendszerben lévő standardok nevei. Ezekre kattintva a jobb oldali listában megjelennek a standardban található bázispárok. A "New" gombra kattintva hozható létre új standard. A megjelenő dialógusablakban kell megadni az új standard nevét. A "Delete" gombra kattintva a kiválasztott standard törölhető. A "Rename" gombra kattintva a kiválasztott standard átnevezhető.

A kiválasztott standardhoz bázispárokat a "+" gombra való kattintással adhatunk. A megjelenő dialógusablakban kell megadni a számértéket. A kiválasztott bázispár a "-" gombra történő kattintással törölhető.

A standard manager "Import" menüjében található két opció "Import from text file" illetve "Import from mws file" használatával szöveges, illetve a program ".mws" formátumú állományaiából lehet meglévő standardokat a rendszerbe beolvasni, és a meglévő standardokhoz hozzáadni.

Az "Export" menü "Export to text file" utasításával a kiválasztott standard szöveges állományba menthető, ahol az állomány első sora tartalmazza a standard nevét, a további sorok pedig csökkenő sorrendben a tartalmazzák bázispárok értékeit.



A standard manager

3.6.6.1 A kiválasztott lane mentése standardként

MW kalibrációs módban a lane-k belsejébe kattintva választhatunk ki lane-t.

Amennyiben a kiválasztott lane-en vannak MW kalibrációs band-ek, lehetőség van ezeknek a molekulasúly értékeit standardként elmenteni. Ehhez a művelethez kattintsunk az almodgombok közül a "Kiválasztott lane mentése standardként" gombra, majd a megjelenő dialogóablakban adjuk meg a standard nevét.

3.6.6.2 Standard illesztése a kiválasztott lane-re

Standard illesztéséhez kattinstunk a "Standard betöltése a kiválasztott lane-re" gombra az almod ikonsorban. A megjelenő dialogóablak hasonló a standard managerhez, de csak a bal

és jobb oldali listát tartalmazza. A bal oldali listában kiválasztható a betöltendő standard, a jobb oldali listában megtekinthetők a kiválasztott standard bázispárjai.

A standard betöltése maga után vonja a kalibráló görbe újraszámítását és az elemzés bandjeinek kiértékelését. Lehetséges különböző lane-ekben lévő band-eknek MW értéket adni, illetve különböző lane-ekre standardot betölteni. Ez a funkció akkor hasznos, ha egy futtatás során több lane-ben is standard futott. Így az esetleges torzulások okozta pontatlanságok csökkenthetők.

3.7 Exportálási lehetőségek

A programban lehetőség van a kép, lane profil ablakok illetve az mw és mennyiségi kalibrációs ablakok grafikus tartományát kép file-ba exportálni. Ez minden esetben az ablak teljes információtartalmára vonatkozik, nem csak a látható részre. A funkció különösen hasznos lehet a lane profil ablak esetén, melynek zoomolt tartalma egyébként nem férne el a képernyőn, és így más módon nem lenne menthető. A program PNG és JPEG formátumokba képes az exportálást elvégezni. A JPEG formátum veszteséges tömörítést alkalmaz, lehetőség van a tömörítés arányának a beállítására. A PNG forátum veszteségmentes tömörítést alkalmaz, így a mentett képek mérete jelentősen nagyobb lehet a JPEG formátumúakhoz képest.

4. A program megvalósítása, felhasznált módszerek, algoritmusok

4.1 Tervezési megfontolások

A fejlesztés során az MVC (Model View Controller) design pattern megvalósítására törekedtem. A programban logikailag és funkcionálisan is elkülönül a GUI (View) az elemzés összetevőit és funkcióit megvalósító osztályoktól (Model). A kettő között a kapcsolatot a controller osztályok biztosítják, ahol jellemzően az elemzés azonos lépéseihez (azonos program módokhoz) tartozó funkciók alkotnak egy osztályt. A GUI osztályai közvetlenül nem hajtanak végre olyan műveleteket, amelyek az elemzés adatait módosítanák. A GUI és az elemzéshez kötődő műveletek/adatok közötti kapcsolatot a controller osztályok metódusainak hívása teszi lehetővé. Az MVC használatával a program áttekinthetőbb és könnyebben módosítható lesz. A program bizonyos elemei egyszerűbben módosíthatóak, annak a kockázata nélkül, hogy a program egész architektúrájának áttervezése válna szükségessé.

4.2 A grafikus felület alapvető felépítése

A program grafikus felülete a Java SE Swing keretrendszerével készült. Léteznek más GUI keretrendszerek (pl. SWT), de ezek nem részei a nyelvnek. A használatukhoz jellemzően külső programkönyvtárak szükségesek, amelyek megnehezítik a kész program hordozhatóságát.

Az átláthatóság és kezelhetőség miatt a legcélszerűbb felépítésnek a több ablakból álló felület bizonyult. A Swing *JDesktopPane* és *JInternalFrame* komponensek felhasználásával létrehozható egy belső több ablakot tartalmazó elrendezés. Így a belső ablakok a *JDesktopPane* területén a célnak megfelelően átméretezhetőek, mozgathatóak. A Swing nem tesz korlátozást arra, hogy hány *JFrame*-et (ablakot) hozunk létre és jelenítünk meg, de minden *JFrame* külön jelenik meg az adott rendszer "tálcáján", ami zavaró, és nehezen kezelhetővé teszi a programot. A *JDesktopPane* és *JInternalFrame* komponensekkel egyetlen *JFrame*-en belül hozható létre a program teljes felülete, úgy hogy megőrzi a funkcionalitást, de nem válik a felhasználó számára kényelmetlenné.

A kép ablak, lane profil ablak, illetve a kalibrációs ablakok belső grafikus felületei a *JComponent* osztály leszármazottai. Az őszosztálytól örökölt *paintComponent(Graphics gr)* metódus törzsébe beillesztett kód által egyedi grafikus komponensek készíthetők. Az osztályok implemetálják a *MouseListener*, *MouseMotionListener* és *ComponentListener* interfészeket. Ezáltal lehetségessé válik az egérműveletek kezelése, illetve reagálás a komponensek átméretezésére.

4.3 Megjelenítési felületek (look & feel)

A Swing támogatja különböző megjelenítési felületek (look & feel) használatát, ami azonos a más felhasználói programoknál (pl WINAMP, Firefox, Opera...) a skinnek (bőrök) fogalmával. Segítségével választhatunk, hogy a program az egységes Swing külsőt, vagy mindig az aktuális operációs rendszer megjelenési formáját mutassa. A beépített look & feel-ek helyett számtalan egyéb design hozzáférhető az interneten. A Swing beépített *UIManager* és *SwingUtilities* osztályainak segítségével könnyen, akár a program futása közben változtatható a megjelenés módja. A program jelen verziója az alapértelmezett Swing felületet használja, de a következő verziókban lehetőség lesz a futás közbeni változtatásra is. Ugyanakkor a kívánt felület beállítható a program parancssorból való indításakor a -D kapcsoló használatával.

Például a program Windows alatt az alábbi utasítással indítva a Windows felülettel fog megjelenni:

```
javaw -jar -Dswing.defaultlaf=com.sun.java.swing.plaf.windows.WindowsLookAndFeel GelAnalyzer.jar
```

Az alapértelmezett look&feel beállítható a `swing.properties` file-ban is, ami a JRE \lib könyvtárában található, vagy ha nem létezik, ott kell létrehozni. Windows alatt a `swing.properties` file-ba a következő sort hozzáadva beállítható alapértelmezettnek a windows skin:

```
swing.defaultlaf=com.sun.java.swing.plaf.windows.WindowsLookAndFeel
```

Legutóbbi tapasztalataim szerint a felhasználók egy része ódzkodik a megszokottól eltérő felülettől, így a program későbbi verziójában feltétlenül szerepelni fog a választás lehetősége.

4.4 Dialógus alapú kommunikáció a felhasználóval

A *JInternalFrame* osztály alosztályain kívül a felhasználóval való kommunikáció szempontjából a *JDialog* osztály leszármazottai kapnak fontos szerepet. A *JDialog* típusú ablakok modálissá tehetőek, azaz amíg a felhasználó egy dialógóablakban végez műveletek, a program felületének többi eleméhez nem férhet hozzá. Ilyen ablak például a licenc manager, vagy a lane detektálás paramétereit váró ablak is.

A *JOptionPane* osztály statikus metódusaival - mint például a *showConfirmDialog* vagy a *showMessageDialog* - könnyen közölhetünk információkat a felhasználóval, figyelmeztethetjük valamilyen hibára vagy kérhetünk tőle megerősítést valamilyen művelet elvégzése előtt.

A *JDialog* típusú ablakok alapértelmezés szerint nem rendelkeznek a tulajdonsággal, hogy reagálnának billentyű leütésekre. Általában a grafikus felhasználói felületek dialógóablakai esetén elvárás, hogy az *esc* billentyű lenyomását mégsem, az *enter* billentyű lenyomását pedig *ok* műveletként értelmezze a rendszer. A *KeyListener* interfészt implementáló osztályok, amennyiben ezeket hozzáadtuk egy komponens *KeyListener*jei közé, alkalmasak lesznek a komponensen történt billentyű műveletek kezelésére. Azonban ez a megoldás a dialógóablakok előbbi viselkedésének megvalósítására nem alkalmas, mert a billentyű esemény azon a komponensen váltódik ki, ami fókuszban van. Így ha a fókusz például egy szövegbeviteli mező kapja, ott nem lesz hatása az *esc* billentyű leütésének. Persze megtehető, hogy minden olyan komponenshez, ami az ablakban fókuszot kaphat, hozzáadjuk a billentyű figyelést, azonban ez a megoldás amellet, hogy nem elegáns, bonyolulttá és nehézkesen módosíthatóvá teszi a kódot.

Erre a problémára a megoldást a Key Binding (billentyű kötés) módszer jelenti. A *JDialog RootPane*-jének *InputMap*-jéhez hozzáadunk egy kötetést az *escape* billentyűre, és hozzárendelünk az *ActionMap*-ben egy *AbstractAction* objektumot, ami a megfelelő műveletet hajtja végre. A művelet ebben az esetben az ablak eltüntetése. Minden komponens három *InputMap* objektummal rendelkezik, ezeket a *WHEN_FOCUSED*, *WHEN_ANCESTOR_OF_FOCUSED_COMPONENT* és *WHEN_IN_FOCUSED_WINDOW* statikus konstansok azonosítják a *JComponent* osztályban. Mivel itt a cél, hogy az egész ablakra kiterjedjen a kötés, ezért a *WHEN_IN_FOCUSED_WINDOW InputMap*-et használjuk.

Az ehhez szükséges kód elhelyezhető a JDialog konstruktorában:

```
this.getRootPane().getInputMap(JComponent.WHEN_IN_FOCUSED_WINDOW).put(KeyStroke.getKeyStroke("ESCAPE"), "cancel");
this.getRootPane().getActionMap().put("cancel", new AbstractAction() {
    public void actionPerformed(ActionEvent arg0) { dispose(); }
});
```

4.5 Java 2D

A Java 2D keretrendszer a képek beolvasásához és manipulálásához biztosít eszközöket. A fejlesztés során főleg a *BufferedImage*, *Graphics2D* és az *ImageIO* osztályok által biztosított lehetőségekre támaszkodtam. Az *ImageIO* osztály *read(...)* metódusával egyetlen sorban megoldható egy kép beolvasása, a metódus által dobott kivételek elkapásával pedig könnyen kezelhetőek a fellépő hibák, amikről a felhasználót dialógus ablakokban lehet tájékoztatni. A *BufferedImage* osztály metódusain keresztül könnyen hozzáférhetőek a kép egyes pixeljei, ami a program szempontjából alapvető fontosságú. A *Graphics2D* osztály használatával egyszerűen megvalósíthatóak alapvető képmanipulációs eljárások (pl forgatás, skálázás), illetve bonyolult transzformációk sorozata is könnyen elvégezhető.

4.6 Adatállományok írása és olvasása

A program működése során a projektek, standardok, license-ek kezeléséhez a *java.io* csomagban található *DataInputStream* és *DataOutputStream* osztályokat használja. A Java ezen osztályai segítségével könnyen lehet különböző típusú adatokat állományba menteni és onnan olvasni, úgy hogy a fejlesztés során nem kell az adatok reprezentációjával foglalkozni. A *DataInputStream* és *DataOutputStream* osztályok több különböző *read* és *write* metódust tartalmaznak, amelyek egy specifikus típusú adat olvasását és írását teszi lehetővé az adott adatfolyamon. Ez a fajta tárolás az adatok szöveges vagy XML állományokba történő mentéséhez viszonyítva kisebb méretet eredményez, illetve külső szemlélő számára az állományok a program nélkül értelmezhetetlenek. Ez utóbbi tulajdonság fontos, mivel elvárás hogy ne lehessen a programon kívül az elemzés adatait módosítani, ezzel meghamisítva az

eredményeket. A projekt licenc és standard állományok szerkezete az előbbi okok miatt nem nyilvános. Könnyen megoldható annak a lehetősége, hogy a projekt állományokat a licencekhez hasonlóan titkosítva tároljuk, ezzel tovább növelve az adatok megbízhatóságát és biztonságát. A program jelen verziója ezt a lehetőséget - a rá való igény hiánya miatt - nem támogatja, de későbbi verziókban könnyen megoldható az implementációja.

4.7 Ellenőrző összeg használata

A projekt állományok, illetve a demo licencek esetén szükséges az állományokban hivatkozott képek valamilyen módon történő azonosítása. Erre a célra a program a CRC (Cyclic Redundancy Check) ellenőrző összeget használja. Az algoritmus tetszőleges byte sorozatból egy 32 bites számot állít elő. A generáló byte sorozatban történő változtatás maga után vonja az ellenőrző összeg változását is. Az algoritmust implementálja a *java.util.zip.CRC32* osztály, a működéséhez csak egy byte tömbbel kell paraméterezni az osztály egy példányát, és a *getValue()* példányszintű metódus hívásával megkapjuk a függvény értékét. Az adott állományokban csak a CRC értéket kell tárolni, így biztosítható, hogy csak a megadott képekkel lesz működőképes a projekt állomány, illetve csak a demo licencben szereplő kép állományokat lehet megnyitni.

4.8 Licenc állományok védelme

A liszensz állományokat nyilvánvaló okok miatt nem lehet olyan formában tárolni, hogy azokhoz a programon kívülről hozzá lehessen férni. A licenc állományok DES algoritmussal vannak titkosítva, a program pedig a JCA (Java Cryptography Architecture) *CipherInputStream* osztályának példányán keresztül oldja meg a bemenő adatfolyam dekódolását. A *CipherInputStream* osztály példánya paraméterül adható a *DataStream* osztály konstruktorának, így minimális módosítással valósítható meg kódolt állományok olvasása. A *CipherInputStream* osztály használatához szükséges a dekódolást megvalósító *Cipher* osztály példányának megadása:

```
DESKeySpec key_spec = new DESKeySpec(key_data);
SecretKeyFactory skf = SecretKeyFactory.getInstance("DES");
SecretKey sk = skf.generateSecret(key_spec);
```

```
Cipher cipher = Cipher.getInstance("DES");  
cipher.init(Cipher.DECRYPT_MODE, sk);
```

A fenti kód több kivételt is dobhat, például, ha nem ismert a paraméterül adott algoritmus vagy nem érvényes a kulcs.

4.9 A lane detektálás

A lane detektálás algoritmus a Canny éldetektálás algoritmusán alapul [4].

A Canny éldetektálás előkészítéseként a forrásképet intenzitás képpé konvertáljuk, vagyis a színes képből egy egycsatornás szürkeskálás képet állítunk elő.

A folyamat következő lépése, hogy az intenzitásképen zajszűrést végzünk. A szűrést egy Gauss szűrőnek az intenzitásképpel történő konvolúciójával hajtjuk végre. Ezután a már szűrt képen valamilyen éldetektáló operátort alkalmazunk (például Robert, Prewitt, Sobel operátorok). A program erre a célra a Sobel operátort használja. A Sobel opátor által szolgáltatott függőleges és vízszintes irányú deriváltakból meghatározzuk az élek irányát és gradienseit. Az élek iránya és gradiense alapján az éleket elvékonyítjuk. Az így előállt élpontokat az algoritmus végigköveti és a küszöbértékek alapján szűri. A szűrés alapja, hogy csak azokat a pontokat tekintjük tényleges éleknek, amelyeknek az intenzitás gradiens értéke meghalad egy bizonyos felső küszöbértéket, illetve azokat, melyeknek az intenzitás gradiens értéke meghalad egy alsó küszöbértéket és az előbbi kategóriába eső "erős" élponthoz kapcsolódnak.

A követés során a kapcsolódó valódi éleket a program egyúttal külön is gyűjti, amit később a program a fragmentek méret szerinti szűréséhez használ fel. A méret szerint megfelelő fragmentekből a program osztályozások és rendezések során választja ki azokat, amelyek egy azonos lane band-jeihez tartoznak. Az azonos lane-ekhez tartozó fragmentek középpontjára illesztett egyenes adja az egyes lane-ek középvonalát. A lane-ek szélességét az összeállításukhoz használt fragmentek szélességéből átlagolással számítja ki a program.

4.10 A band-ek detektálása

A band-ek detektálásának feladata némiképp egyszerűbb, mint a lane-ek meghatározása. A lane-ek profilja egycsatornás érték, ezért a forrásképet a lane detektálással megegyező módon szűrkeskálás képpé konvertáljuk. Egy lane profiljának a meghatározása úgy történik, hogy meghatározzuk a lane-t alkotó függvény értékeit az első és utolsó kontrollpontjának függőleges koordinátája közötti halmazon. Az így kapott pontok alkotják a lane középvonalát, ami azonban nem egyezik meg a képlakban látható középvonallal, mivel ott a raszteres képernyő diszkrét pontjait egyenesek kötik össze, így rajzolva ki a görbe képét. A lane középvonalának pontjaiban kiszámítjuk az intenzitás értékek összegét a ponttól balra fél szélességtől a ponttól jobbra fél szélességig. A kapott összeget osztjuk a lane szélességével, ami a profil értéke lesz az adott pontban.

A profilok meghatározása során, az átlagolások miatt már bizonyos szintű zajszűrés ment végbe. Ez azonban a legtöbb kép esetében még nem eredményez elegendően "sima" profilt, ahhoz hogy elegendő bizonyossággal meghatározhassuk rajta a band-eket. Ezért a band-ek detektálás előtt a profilt median és átlagoló szűrővel simítjuk. A már szűrt profilon a band-ek könnyen meghatározhatóak egy hegymászó algoritmus segítségével.

4.11 A programkód védelme

A Java nyelvű programokat nem natív, hanem úgynevezett byte kódba fordítja a java fordító. A bytekód (".class" kiterjesztésű állományok) előnye, hogy így a lefordított program hordozható lesz, és futtatható bármilyen rendszeren, ahol a megfelelő Java futtató környezet telepítve van.

A bytekódba történő fordítás hátránya viszont, hogy így a program forráskódja könnyűszerrel visszanyerhető a lefordított java osztályok ".class" állományaiból. Ilyen decompiler például az ingyenesen letölthető DJ Java Decompiler, de természetesen ennél sokkal professzionálisabb szoftverek is léteznek.

A kód védelme során a cél, hogy megnehezítsük illetve lehetetlenné tegyük a forráskód visszanyerését a lefordított programból. Erre a problémára az egyik - de nem feltétlenül leghatékonyabb - módszer az obfuscation.

Az obfuscation (obfuscate: összezavar) során egy speciális program a már lefordított

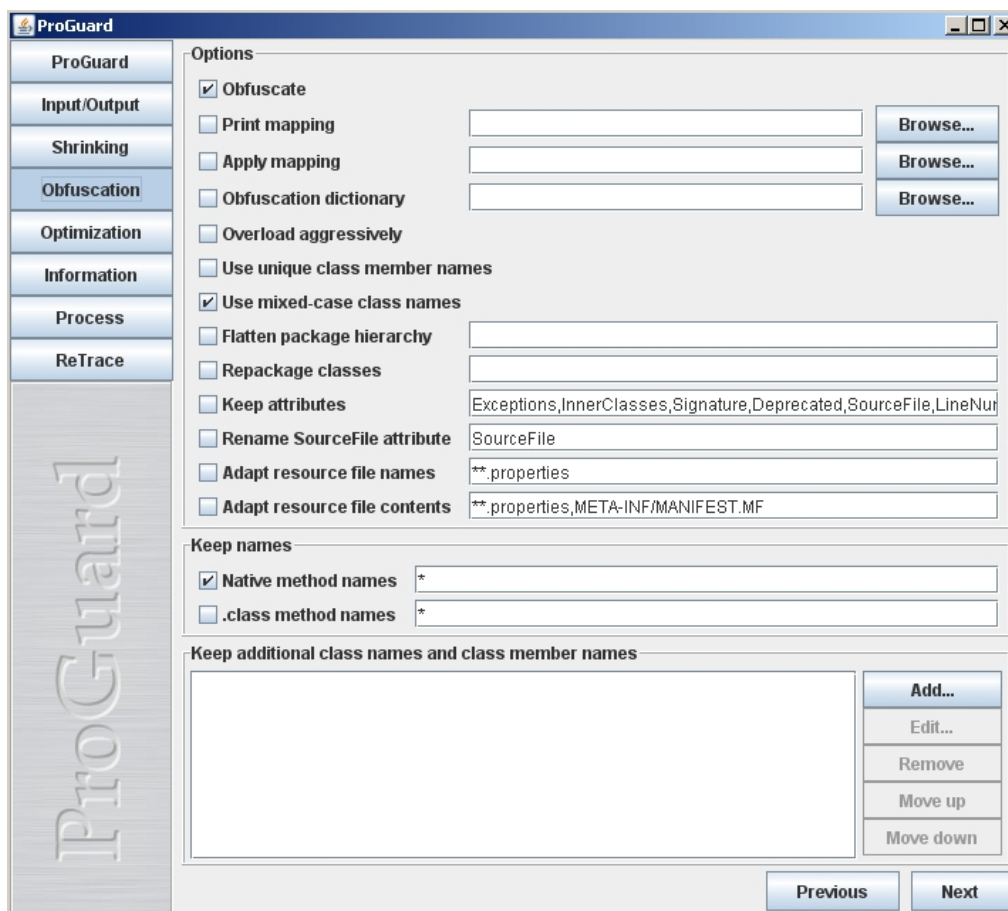
állományokban olyan változtatásokat visz végbe, amelyek a program működését és helyességét nem befolyásolják, de megnehezítik a bytekód visszafejtését, illetve a visszafejtett forráskód a szemlélő számára értelmezhetetlen lesz. Arra, hogy ezt hogy éri el az obfuscator több megoldás is lehetséges. Alapvető, hogy a byte kódban minden olyan elemet, ami a fordítás során még megőrizte az eredeti azonosítóját (hogy ezek mik, az a fordítás módjától függ) átnevezünk véletlenszerű nevekre. Például, mivel a byte kódban lehetséges például a nyelv kötött szavait is azonosítóként használni - amit a fordító egyébként nem engedélyez - olyan byte kód készíthető, amelyet bizonyos decompilerek nem is képesek visszafejteni.

Ha mégis sikerül a forráskódot visszanyerni az, az értelmetlen nevű osztályok, változók, metódusok miatt nagyon nehezen, és csak sok idő és erőforrás ráfordításával hozható olyan formába, hogy a fontos információk, algoritmusok kinyerhetőek legyenek belőle. Sok obfuscator felkínálja a lehetőséget, hogy átstrukturálja a kódot, illetve ugró utasításokkal követhetlenné teszi annak működését.

Az obfuscation-on kívül egyéb módszerek is léteznek, de ezek jóval nehezkesebbek és gyakran a program hordozhatóságát kell feláldozni a kód védelméért. Ilyen megoldás lehet például a futás idejű osztálybetöltés titkosított állományokból, de mivel hozzáértő számára a byte kód így is hozzáférhető, bonyolult megvalósítása miatt ez nem túl gyakran alkalmazott megoldás.

A kifejlesztett szoftver védelméhez a ProGuard nevű freeware programot használtam. A ProGuard nem csak egy obfuscator, hanem optimalizáló funkciókkal is rendelkezik, így ha élünk a lehetőséggel a programot kisebbé és gyorsabbá is tehetjük vele.

Az obfuscation során meg kell adnunk a feldolgozandó állományt (ami lehet futtatható ".jar" állomány is), a felhasznált külső programkönyvtárakat (alapértelmezés szerint a futtató környezet rt.jar állománya) és a kimeneti állományt. Megadhatóak továbbá olyan szöveges állományok, amik azokat az elemeket tartalmazzák, amiket szeretnénk, ha a program használna az átnevezések során (Obfuscation dictionary). Azt, hogy az obfuscation során mit mire nevezett át a program, egy map állományba elmenthetjük. A kész program futása során bekövetkezett esetleges hiba stack trace-jét és a map állományt felhasználva a ProGuard segítséget nyújt a hibakeresés és kijavítás folyamatában is. A ProGuard képes kilaposítani az csomag hierarchiát, így még értelmezhetlenebbé téve a visszafejtett programot.



A ProGuard program felülete

5. Összefoglalás és további tervek

A fejlesztés során sikerült létrehozni egy olyan szoftvert, mely rendelkezik a szükséges eszközökkel, hogy gél-elektroforézis képeket elemezzünk vele. A program platformfüggetlensége lehetővé teszi, hogy változtatások nélkül használható legyen különböző platformokon, ami igen előnyös, figyelembe véve, hogy a tudományos életben elterjedt a Linux és Mac OS operációs rendszerek használata a Windows mellett.

Természetesen még nagyon sokat lehet fejlszteni a programon. További tervek között szerepel a felhasználói felület tökéletesítése, további algoritmusok implementálása a kalibrációs módszerekhez, a meglévő módszerek javítása, finomhangolása.

6. Irodalomjegyzék

1. Java™ Platform, Standard Edition 6 API Specification
(<http://java.sun.com/javase/6/docs/api/>)
2. Creating a GUI with JFC/Swing (<http://java.sun.com/docs/books/tutorial/uiswing/>)
3. Fazekas Attila, Kormos János: Digitális képfeldolgozás matematikai alapjai - egyetemi jegyzet, 2004 MobiDIÁK könyvtár
4. Fazekas Gábor, Hajdu András: Képfeldolgozási módszerek - egyetemi jegyzet, Debrecen 2004

7. Függelék

Program mód és almód ikonjai



Lane mód



Band mód



Háttér eltávolítási mód



Rf kalibrációs mód



Mennyiségi kalibrációs mód



Molekulasúly kalibrációs mód



Lane kiválasztás



Lane hozzáadása



Lane-ek módosítása



Kiválasztott lane törlése



Detektálási terület kiválasztása



Lane-ek detektálása



Band hozzáadása



Összes band törlése a kiválasztott lane-en



Band-ek detektálása az összes lane-en



Band-ek detektálása a kiválasztott lane-en



Rolling ball



Valley to valley



Manuális alapvonal megadása



Háttér eltávolítás megszüntetése



Alapértelmezett Rf görbék hozzáadása



Új Rf görbe hozzáadása