

Spin(SR)10 快速操作指南

EVIDENT



仪景通光学科技（上海）有限公司 应用支持课

<https://www.evidentscientific.com.cn/zh/>

2023.12 Ver. 1.0

目录

----- 图像采集 -----

启动/关闭系统	4
通过目镜找到标本	5
XY图像采集	6
XYZ 图像采集	8
XYT图像采集（单点+ZDC）	9
XYT图像采集（多点+ZDC）	11
XYZT 图像采集	14
自动图像拼接	15
自动聚焦	16
实验管理员模式	17

----- 图像处理 -----

2D浏览与处理	19
3D浏览与处理	20
后期景深拓展	21
图像输出	22

----- cellSens常用分析功能 -----

共定位分析	26
比例分析	28
消卷积处理	30
记波器	36
对象计数（手动）	39
宏管理器	40

图像采集

EVIDENT

启动/关闭系统



注意: Photometrics BSI/95B相机, 需要先开启相机, 然后再开启PC.

1 打开PC主机和显示器



7 打开显微镜控制器 (CBH)和电动载物台控制器(选配)



3 打开转盘控制单元



8 打开PICU电源开关, 将钥匙旋转至on



5 打开LED光源, 先打开后面的开关, 再按下前方的ON/OFF开关



9 打开每个激光的电源, 将钥匙转至“ON”



打开开关

转到钥匙

6 打开实时控制器 U-RTCE (或者NI控制器)

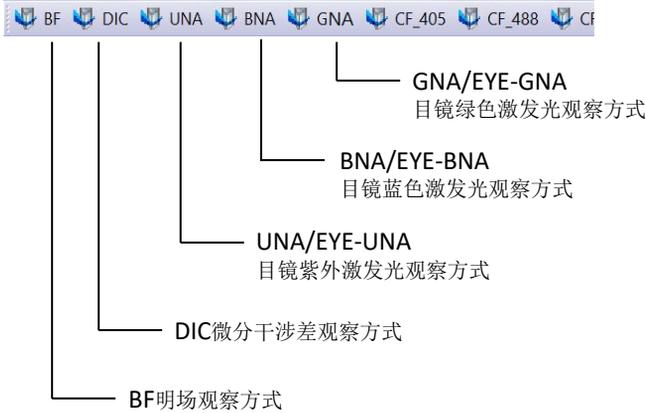


11 启动cellSens(cS)软件



关闭系统时按照(11) → (1)逆序操作

通过目镜找到标本



方式一、

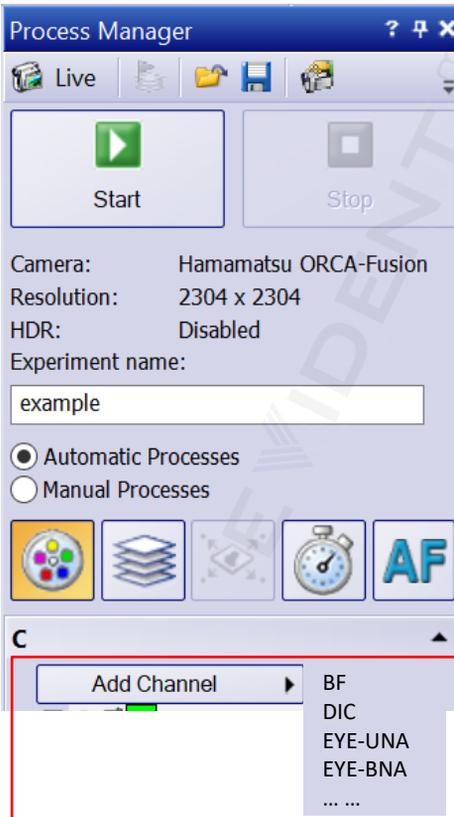
【1】在软件上方[Observation methods]栏中，选择目镜观察方法；

【2】通过目镜观察样品，调解Z轴至视野中的样品图像清晰；

【3】调节光源的亮度至合适的水平。

方式二、

在Process Manager窗口中，点击Add Channel，在弹出的列表中选择目镜观察方式，项目涵义和观察方法，与方式一中的方法相同。



方式三、

直接点击触摸屏控制上的目镜观察方式：

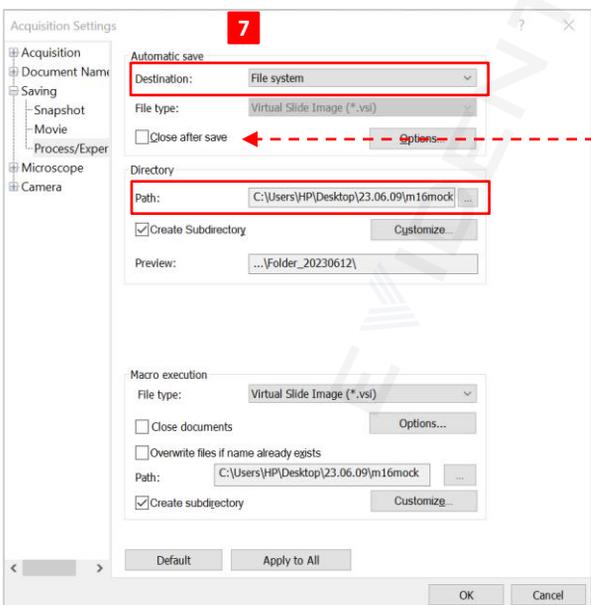
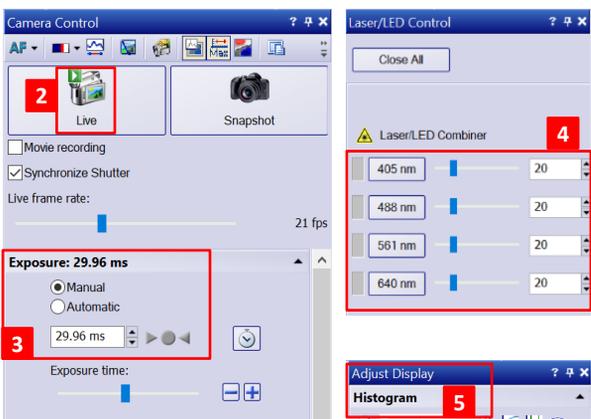
EYE-BNA：目镜蓝色激发光观察方式

EYE-UNA：目镜紫外激发光观察方式

EYE-GNA：目镜绿色激发光观察方式



XY 图像采集 (一)



调节预览图像

【1】在软件上方[Observation methods]栏中，选择图像拍摄模式或荧光通道。

【2】点击[Camera Control]窗口中的 Live图标预览图像；

【3】调节[Exposure]中的曝光参数，先执行[Automatic]自动曝光，再切换为[Manual]手动调节模式，手动输入曝光时间；

调节激光强度

【4】在菜单栏View > Tool Windows > Laser/LED Combiner中打开激光控制窗口，根据需求设置激光强度。

调节图像显示对比度

【5】在菜单栏View > Tool Windows > Adjust Display中打开图像对比度调节窗口，可根据情况，按照固定区间[Fixed Scaling]和自动对比度[Auto Contrast]两种方式进行调节。

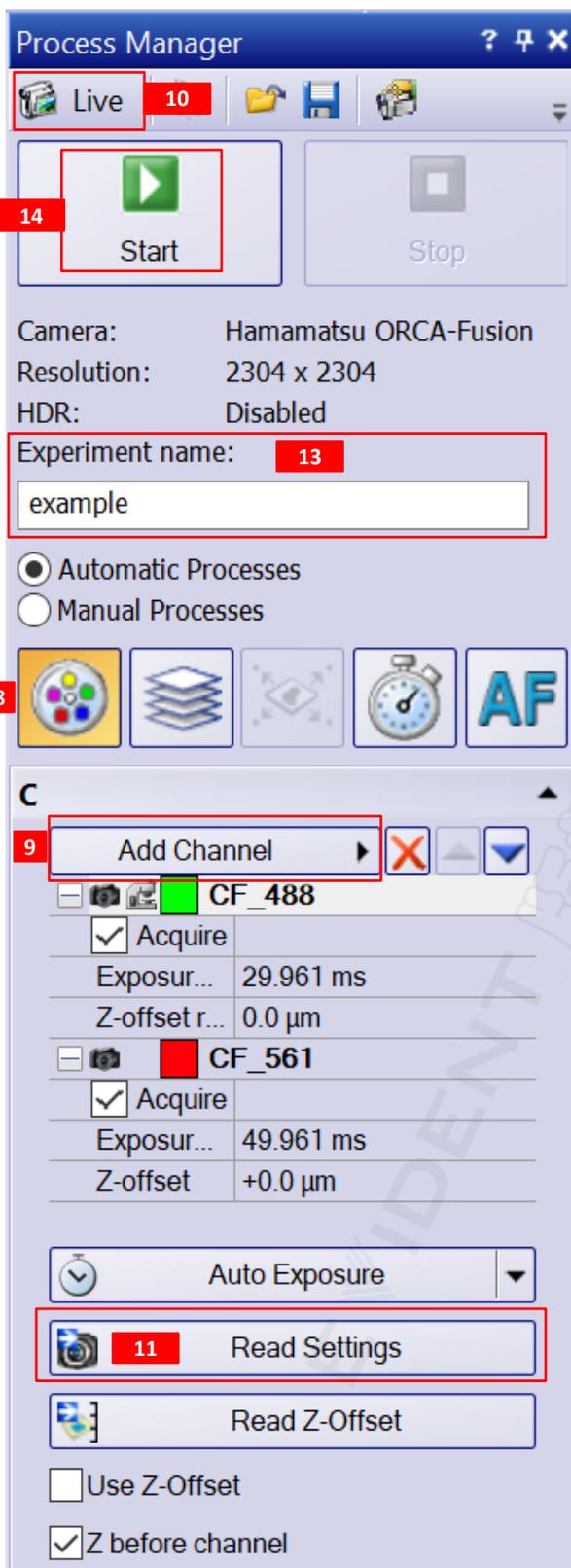
设置自动保存路径

【6】点击[Process Manager]栏中的 Acquisition Settings图标，打开设置窗口；

【7】选择Saving > Process/Experiment。在[Destination]中选择保存位置，[File system]表示保存在本地磁盘。在[Path]中选择保存的文件夹路径。

※Close after save: 勾选，软件中不显示图像，节约电脑内存；不勾选，每张图像在软件中打开，适用于单帧或少量图像采集。

XY 图像采集 (二)



选定采集通道

【8】在Process Manager窗口中，选中  Multi Channel 多通道采集模式；

【9】点击Add Channel，在弹出的列表中选择图像采集的通道；

【10】预览  Live，调整曝光参数（方法同单通道XY图像采集）；

【11】在[Process Manager]窗口中点击[Read Settings]，读取设置好的采集参数；

【12】重复以上步骤，以同样的方式添加其他通道；检测各通道的参数，输入样品名称；

【13】在[Experiment name]栏中输入实验名称。

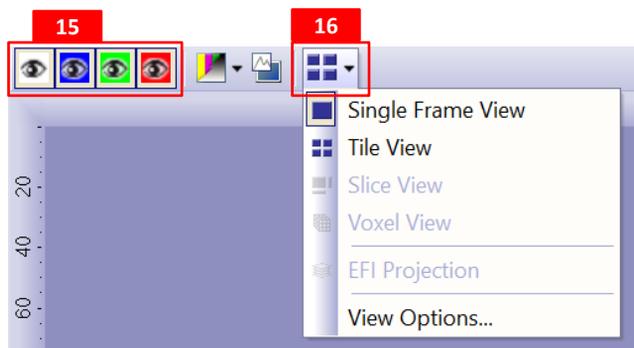
图像采集

【14】点击[Process Manager]栏中  Start按键，开始多通道图像采集，采集后的图像自动保存在预设的文件夹中。

图像显示方式

【15】打开采集后的图像，点击显示区左上方的  通道图标，可以显示或隐藏该通道；

【16】点击  Tile View图标，可将图像从单帧切换为平铺，同时展示多个通道。



XYZ 图像采集

开始下列步骤之前，请正确设置单幅图像采集参数（参见6-7页）。

设置Z序列

【1】在[Process Manager]窗口中，选中  Z-Stack图标，打开Z序列设置窗口；

【2】在[Define]栏中，选择“Top and bottom”（也可根据需求，选择Range方式）；

【3】预览  Live，调整曝光参数（方法同单通道XY图像采集）；

【4】转动调焦旋钮，改变Z轴位置，调节焦点至样品顶部，点击[Start]中Set按键，注册Z序列图像采集的起始位置；

【5】改变Z轴位置，找到样品的底部焦点，点击[End]中的Set按键，注册Z序列图像采集的终止位置；

【6】在[Step Size]栏输入数值(μm)，确定Z轴步进大小，层数[Z-Slices]将自动调整。

※点击[Recommended Step Size]下面的[Apply]，软件采用推荐的步进采集，Z-Slices自动调整。

※Step Size指相邻2层Z图像的距离，Z-Slices指层数，定义为总厚度除以Step Size。

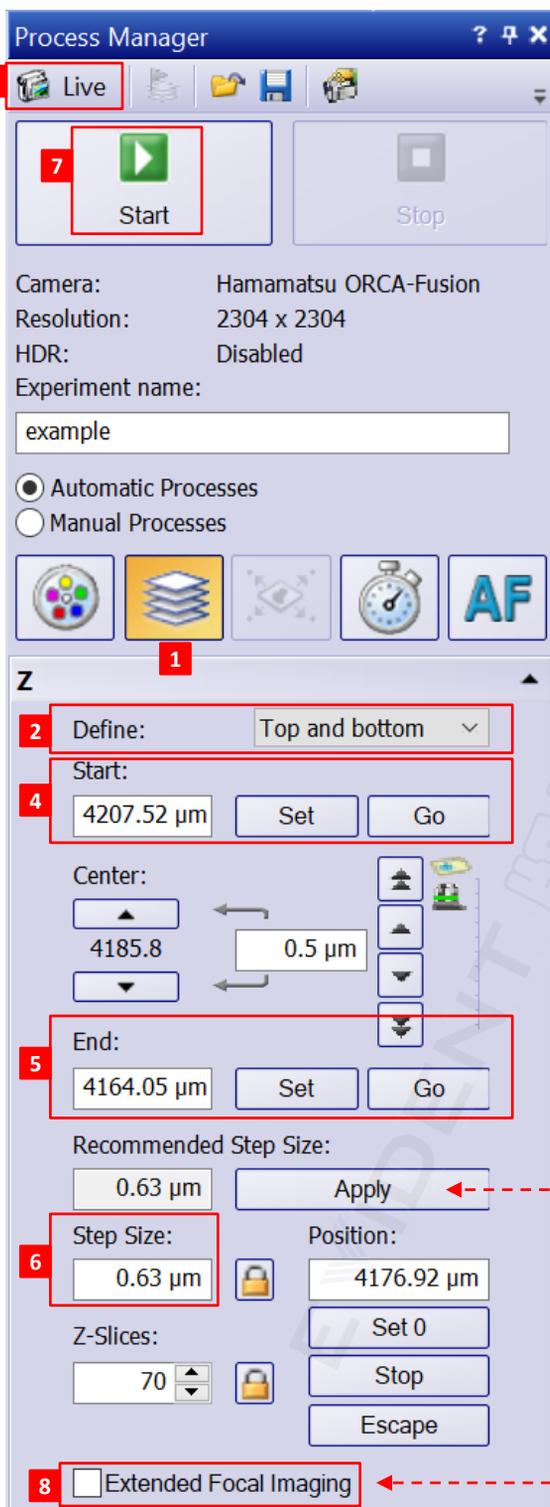
图像采集

【7】在[Experiment name]栏中输入实验名称，检查自动保存路径。点击[Process Manager]栏中  Start按键，开始XYZ图像采集，采集后的图像自动保存在预设的文件夹中。

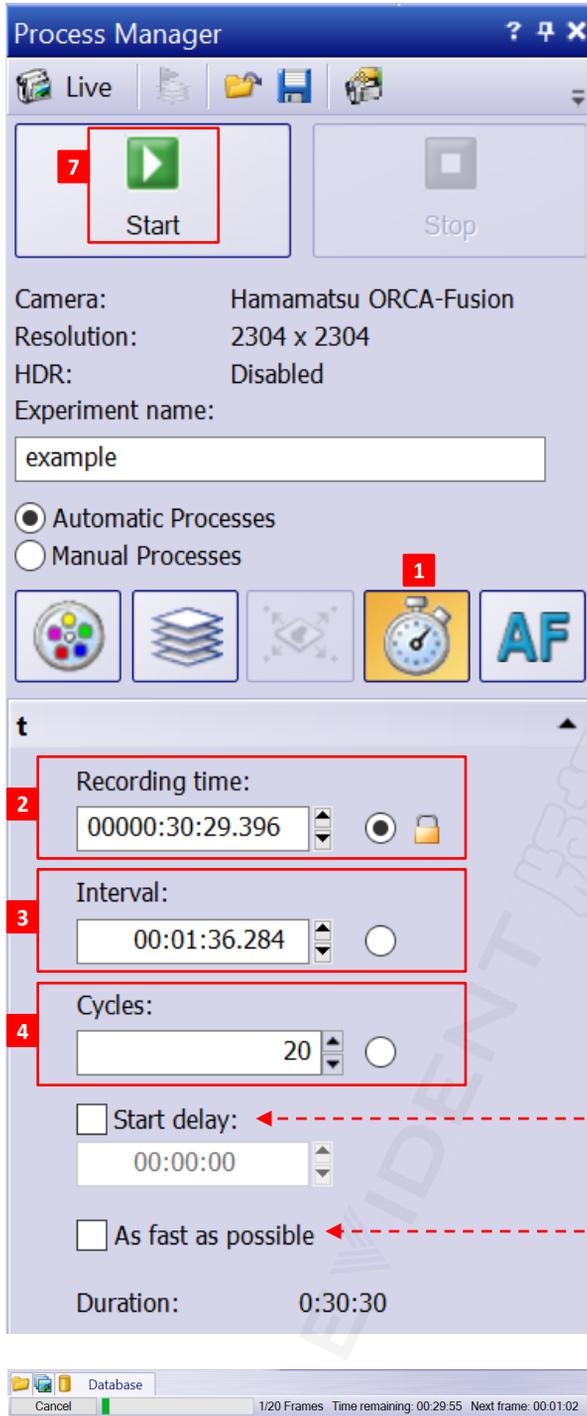
采集扩展景深图像

【8】勾选[Extended Focal Imaging]扩展景深选项，然后采集Z序列图像，这样最终得到的是一张自动EFI图像，而不是常规Z序列的多张图像。

※采集Z序列图像，而非EFI图像时，确保[Extended Focal Imaging]未勾选。



XYT 图像采集（单点+ZDC）



开始下列步骤之前，请正确设置单幅图像采集参数（参见6-7页）。

设置时间序列

【1】在[Process Manager]窗口中，选中  Time Lapse时间序列图标，可按照以下3种方式进行设置：

【2】[Recording time]固定记录时间模式：锁定总时长，拍摄帧数和间隔时间相互变化，手动更改其中一项，另一项自动变化；

※ 拍摄总时间=间隔时间 X（帧数-1）。

【3】[Interval]固定间隔时间模式：锁定时间间隔，总时长和帧数相互变化，手动更改其中一项，另一项自动变化；

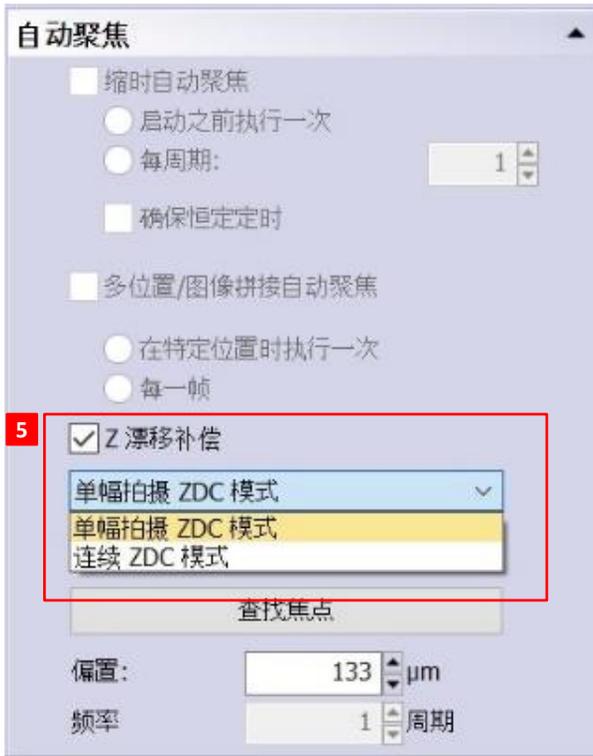
【4】[Cycles]固定帧数模式：锁定帧数，总时长和间隔时间相互变化，手动更改其中一项，另一项自动变化。

※ Start delay: 启动延迟，系统等待设定的时间后才开始拍摄。

※ As fast as possible: 尽可能快采集模式，无间隔采集，勾选后间隔时间变成灰色，无法修改，固定为完成一轮采集所需要的最快时间。

※ 图像采集时间进度位于软件的左下角，点击 Cancel 可以终止拍摄。

XYT 图像采集（单点+ZDC）



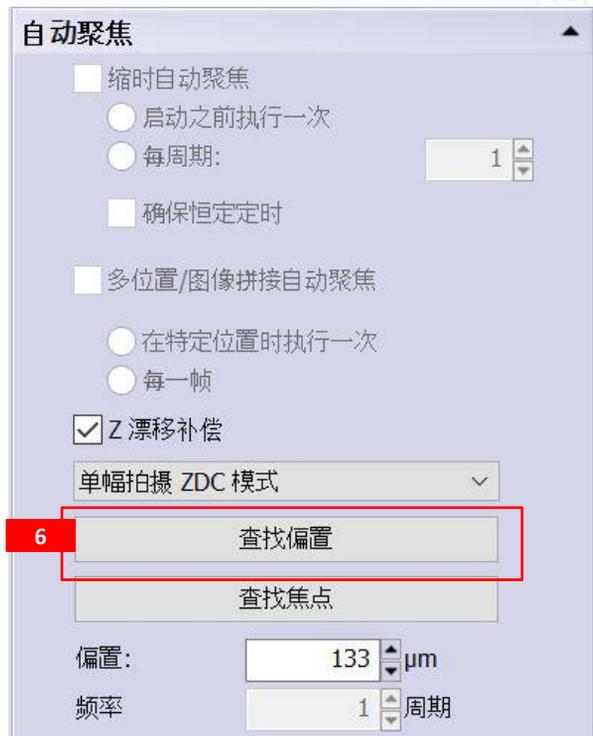
【5】选中[Process Manager]窗口中的[Autofocus]图标；勾选“Z漂移补偿”项，在下来栏中选择模式；

单幅拍摄ZDC模式：拍摄图像是启动ZDC
连续ZDC模式：始终运行ZDC

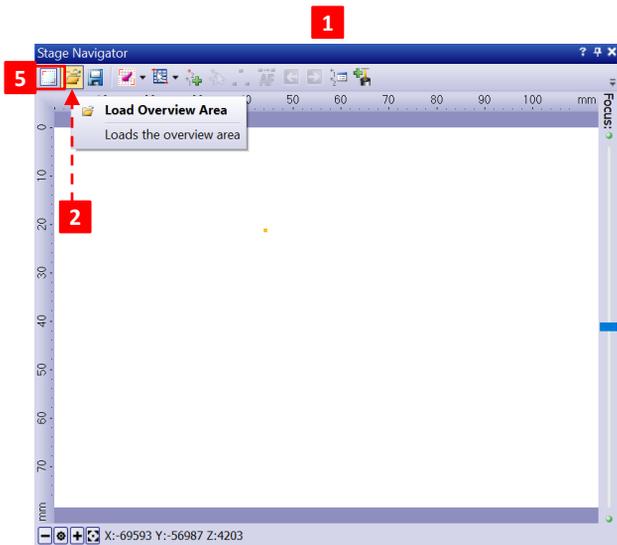
【6】调整焦面位置，点击[Autofocus]栏中的“查找偏置”，注册ZDC；

图像采集

【7】在[Experiment name]栏中输入实验名称，检查自动保存路径。点击[Process Manager]栏中  Start按钮，开始XYZ图像采集，采集后的图像自动保存在预设的文件夹中。



XYT 图像采集（多点+ZDC）



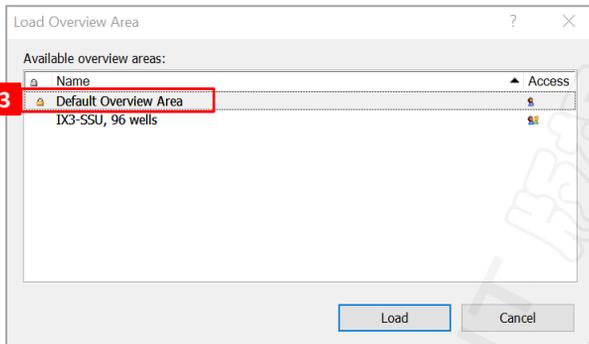
开始下列步骤之前，请正确设置单幅图像采集参数（参见6-7页）。

获取预览导航图

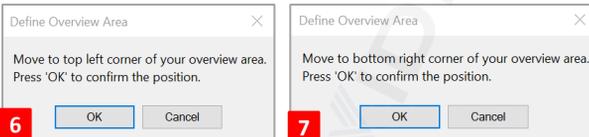
- 【1】打开[Stage Navigator]样品台导航器窗口，打开路径view > Tool Windows > Stage Navigation；
- 【2】点击  [Load Overview Area]图标；
- 【3】在弹出的窗口中选择[Default Overview Area]，载入默认预览区域（全部载物台范围）；
- 【4】预览，调整图像采集的参数；在预览区内，鼠标点击任意位置，载物台自动移至该视野。

建立自定义区域

- 【5】点击[Stage Navigator]样品台导航器窗口中的  [Define Overview Area]；
- 【6】按照屏幕提示，手动移动载物台至采集区域的左上角后，点击OK键；
- 【7】再移动至采集区的右下角，点击OK；

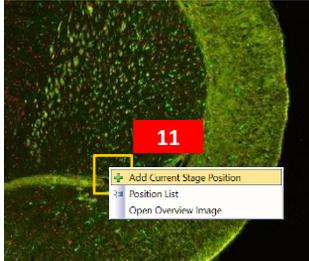
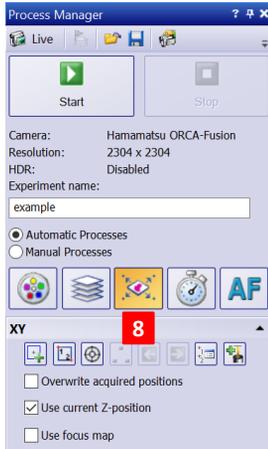


※采集预览图时，软件会推荐采用当前设备最低倍率物镜，建议点击“**Yes**”。



※点击[Stage Navigator]窗口中  [Acquire Overview]，可快速将一整张玻片定义为预览区。

XYT 图像采集（多点+ZDC）



设置多点

【8】在[Process Manager]窗口中，选中  [XY-Position/MIA]；切换到高倍物镜，预览并调节图像采集参数；

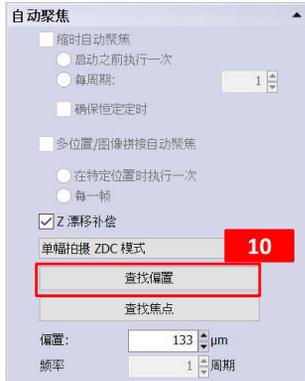
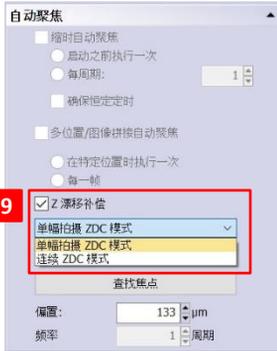
【9】选中[Process Manager]窗口中的  [Autofocus]图标；勾选“Z漂移补偿”项，在下来栏中选择模式；

单幅拍摄ZDC模式：拍摄图像是启动ZDC
连续ZDC模式：始终运行ZDC

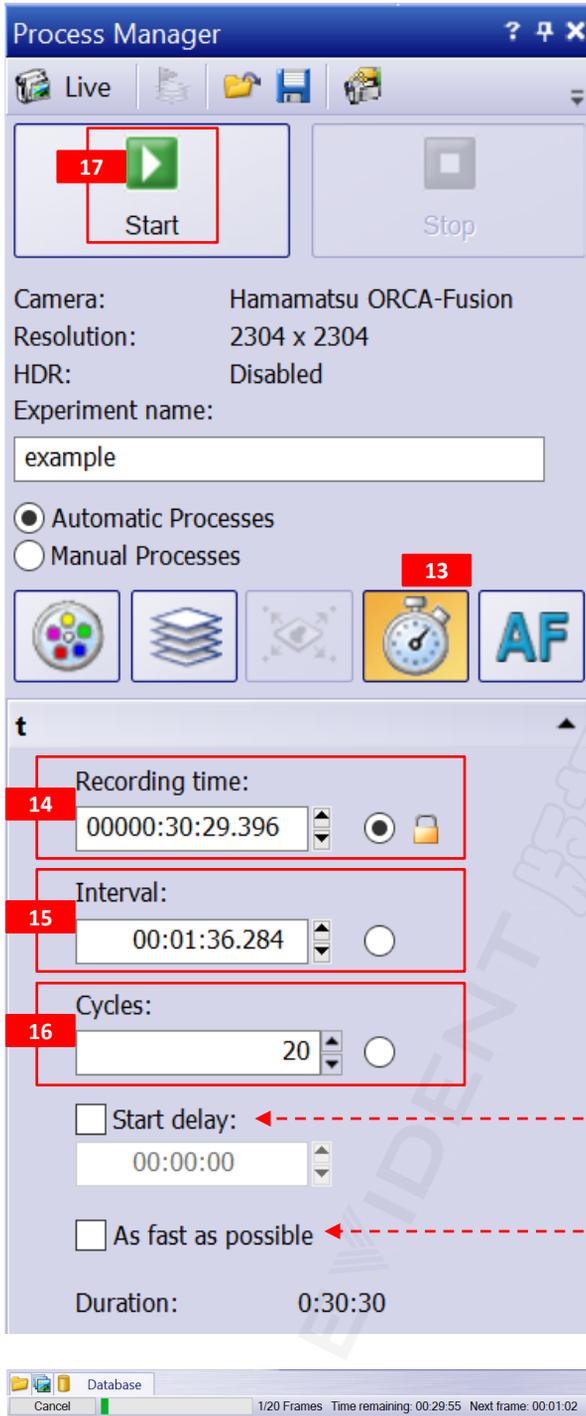
【10】预览图中黄色区域为当前视野，调整焦面位置，点击[Autofocus]栏中的“查找偏置”，注册ZDC；

【11】在预览图中，鼠标右键并选择[Add Current Stage Position]，可添加当前位置；

【12】鼠标点击其他位置，重复操作步骤【10-11】，可依次添加其他位置；



XYT 图像采集（多点+ZDC）



设置时间序列

【13】在[Process Manager]窗口中，选中  Time Lapse时间序列图标，可按照以下3种方式进行设置：

【14】[Recording time]固定记录时间模式：锁定总时长，拍摄帧数和间隔时间相互变化，手动更改其中一项，另一项自动变化；

※ 拍摄总时间=间隔时间 X (帧数-1)。

【15】[Interval]固定间隔时间模式：锁定时间间隔，总时长和帧数相互变化，手动更改其中一项，另一项自动变化；

【16】[Cycles]固定帧数模式：锁定帧数，总时长和间隔时间相互变化，手动更改其中一项，另一项自动变化。

图像采集

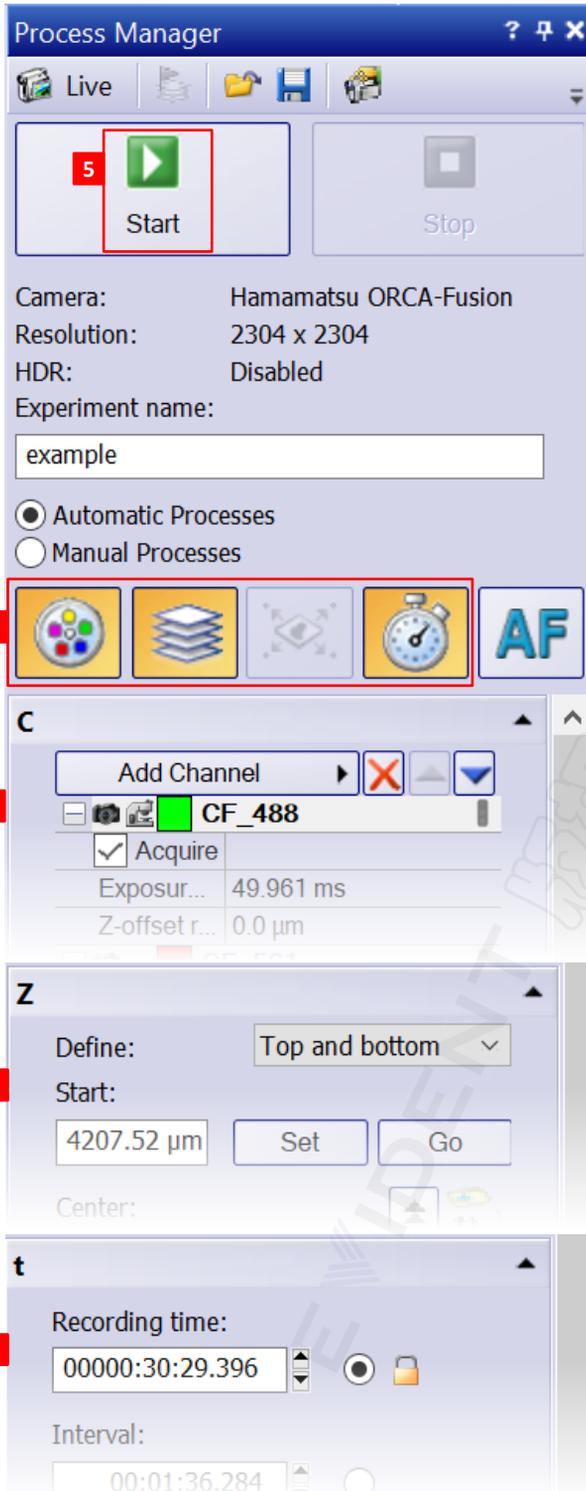
【17】在[Experiment name]栏中输入实验名称，检查自动保存路径。点击[Process Manager]栏中  Start按键，开始XYZ图像采集，采集后的图像自动保存在预设的文件夹中。

※ Start delay: 启动延迟，系统等待设定的时间后才开始拍摄。

※ As fast as possible: 尽可能快采集模式，无间隔采集，勾选后间隔时间变成灰色，无法修改，固定为完成一轮采集所需要的最快时间。

※ 图像采集时间进度位于软件的左下角，点击 Cancel 可以终止拍摄。

XYZT 图像采集



开始下列步骤之前，请正确设置单幅图像采集参数(参见6-7页)。

【1】 在[Process Manager]窗口中，全部选中 [Multi Channel]、[Z-Stack]和[Time Lapse] 图标    ；

设置单/多通道采集参数

【2】 添加一个或多个采集的通道，预览并调节 焦点位置，分别设置每个通道的图像采集参数 (参加第6页) ；

设置Z序列

【3】 改变Z轴位置，注册图像采集的起始/终止 位置[Start/End]；根据需要，设置适合的Z轴 步进[Step Size] (参见第6页) ；

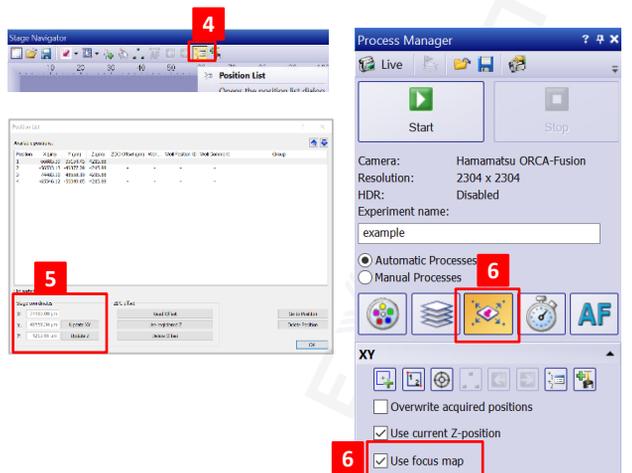
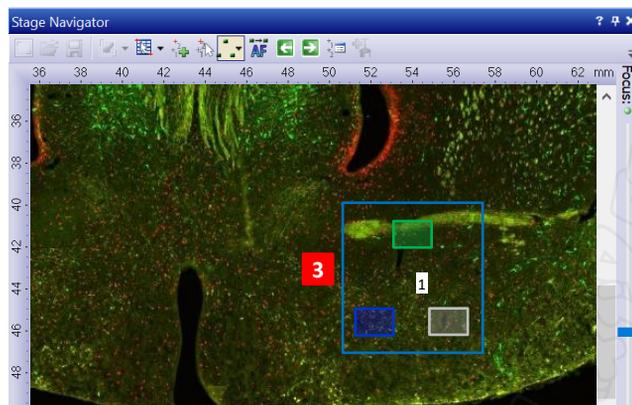
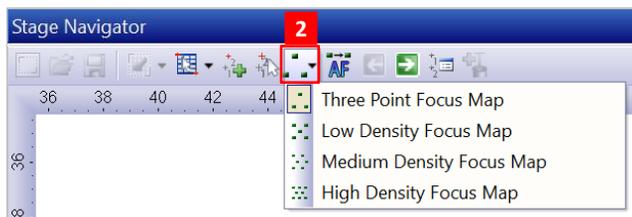
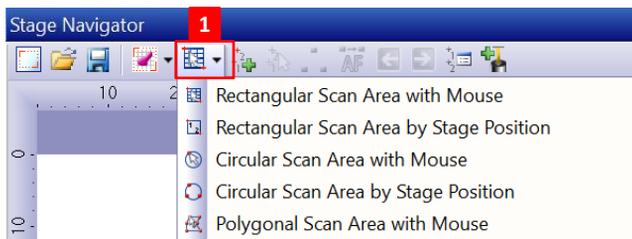
设置时间序列

【4】 设置用于时间序列图像采集的总时间 [Recording time]、时间间隔[Interval]和次 数[Cycle] (参见第7页)。

开始采集

【5】 在[Experiment name]栏中输入实验名称， 检查自动保存路径。点击[Process Manager]栏 中  Start按键，开始XYZ图像采集，采集后 的图像自动保存在预设的文件夹中。

自动图像拼接



开始下列步骤之前，请正确设置单幅图像采集参数（参见6-7页）。

建立拼图区域

【1】点击[Stage Navigator]窗口中的 [Rectangular Scan Area with Mouse] 图标；

- ① [Rectangular Scan Area with Mouse] 鼠标画矩形：按住鼠标左键不松开，在预览图中拖动，出现拼接矩形，
- ② [Rectangular Scan Area by Stage Position] 移动样品台位置画矩形：弹出[]对话框，手动移动载物台，确定矩形对角线的一端，点击Next；
- ③ [Circular Scan Area with Mouse] 鼠标画圆形：与鼠标画矩形类似，拼接区域按照圆形分布，适合圆形样品；
- ④ [Circular Scan Area by Stage Position] 移动样品台位置画圆形：与移动样品台位置画矩形类似，拼接区域按照圆形分布，适合圆形样品；
- ⑤ [Polygonal Scan Area with Mouse] 鼠标画多边形：鼠标在预览图中点击确定多边形区域。

※ 对于不平整的样品，拼接图像时，可使用三点聚焦功能。

三点聚焦

【2】点击[Stage Navigator]窗口中的 [Three Point Focus Map] 图标；可根据情况选择[Low]、[Medium]或[High]密度聚焦模式；

【3】蓝色边框区域表示当前视野，调焦至清晰，点击至下一个视野，依次完成所有视野的焦面调整；可鼠标拖动焦点位置，放置到拼图区的任意位置；绿色边框区域表示已经调焦完成。

位置列表

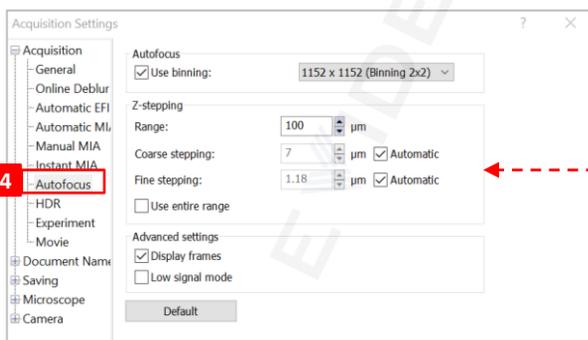
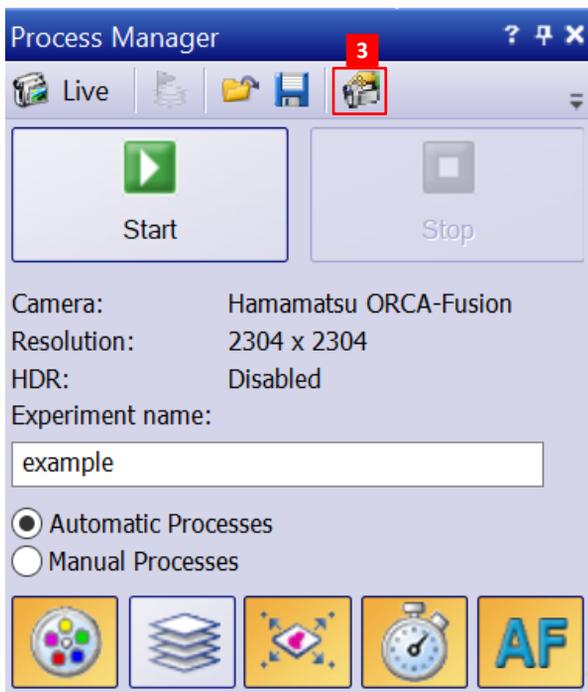
【4】在[Stage Navigator]窗口中打开 [Position List] 位置列表，可查看所有的位置记录信息；

【5】点击[Update XY]实现位置的平移，[Update Z]改变焦面位置。

【6】选中[Process Manager]窗口中的 [XY-Position/MIA]，并勾选[Use focus map]。

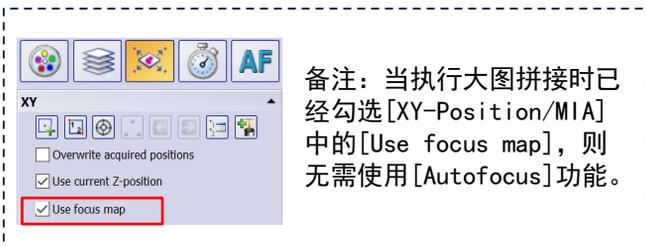
【7】点击 Start 开始按键，进入多点图像采集流程，软件按照位置列表中的顺序依次采集和拼接。

自动聚焦



多点聚焦、大图拼接或时间序列图像采集都可使用自动聚焦功能；开始下列步骤之前，请正确设置图像采集参数(参见6-7页)。

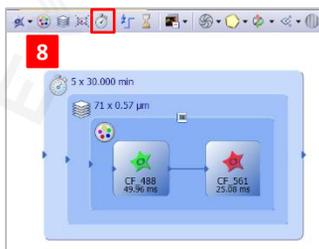
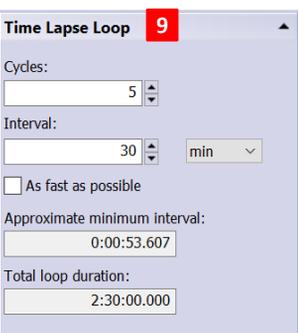
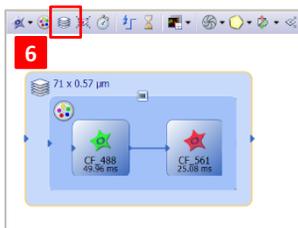
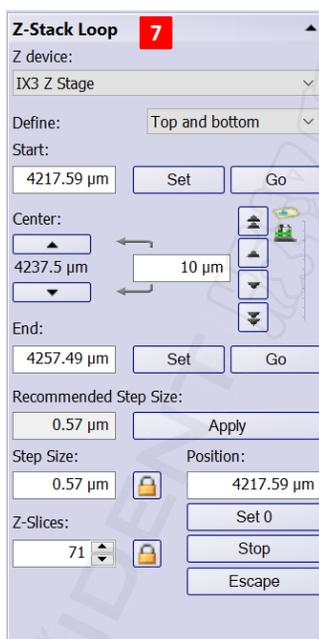
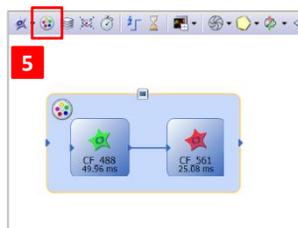
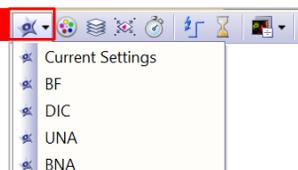
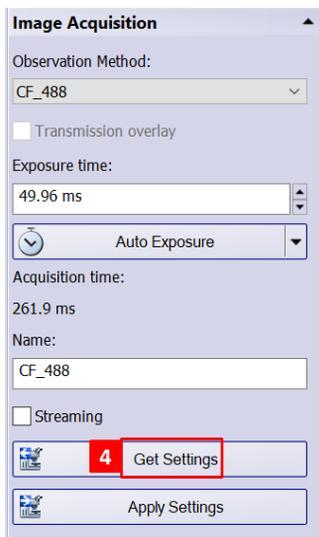
- 【1】选中[Process Manager]窗口中的 **AF** [Autofocus] 图标；
- 【2】勾选[Multiposition/MIA autofocus] 多点/拼图自动聚焦；
- 【3】点击  打开[Acquisition Settings]；
- 【4】在弹出的窗口中打开Acquisition > Autofocus，根据样品厚度等具体情况设置自动聚焦的参数；
- 【5】预览并找到焦面的大概位置；
- 【6】在[Experiment name]栏中输入实验名称，检查自动保存路径。点击[Process Manager]栏中  Start按键，软件自动计算焦面位置并开始图像采集。



备注：当执行大图拼接时已经勾选[XY-Position/MIA]中的[Use focus map]，则无需使用[Autofocus]功能。

[Use binning]像素合并：软件计算焦面的时间缩短，但准确性降低；
[Z-stepping]软件搜索焦面的范围和步进，建议勾选[Automatic]；
[Use entire range]：软件搜索整个设置的Z范围，建议不勾选，缩短聚焦时间；

实验管理员模式



采集多通道图像

【1】在 [Experiment Manager] 实验管理员选项卡中点击  [New] 新建；

【2】在新建窗口的左上点击  [Image Acquisition] 选择观察模式；

【3】鼠标移动到空白处单击，放置图标；多通道采集时可依次放置多个图标；

【4】依次预览和调整每一个通道的图像采集参数，调整完成后，选中实验管理员窗口中相应通道的图标，鼠标点击 [Image Acquisition] 中的 [Get Settings] 获取设置后的成像参数，软件将自动读取采集参数；同样的方式依次完成所用通道的参数设置；

【5】点击  [Multichannel Group] 图标，将需要采集的多通道图标框在内部；

采集Z-stack图像

【6】点击  [Z-stack loop] 图标，框选需要采集Z序列的通道；

※对于采集单通道Z序列图像，只框选单个通道图标外围；对于采集多通道Z序列图像，如图所示，先使用多通道选项将所有通道图标框选，再使用Z-stack loop项目在最外围框选。

【7】在 [Z-Stack loop] 窗口中进行参数设置。

采集时间序列图像

【8】点击  [Time lapse loop] 图标，框选需要采集的时间序列的通道；

【9】在 [Time lapse loop] 窗口中进行参数设置。

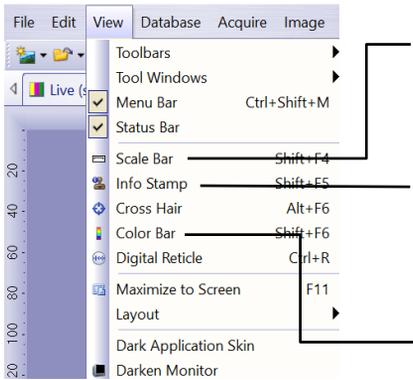
图像采集

【10】输入实验名称，检查自动保存路径；点击 [Experiment Manager] 实验管理员窗口  [Start] 图标开始图像采集。

图像处理

EVIDENT

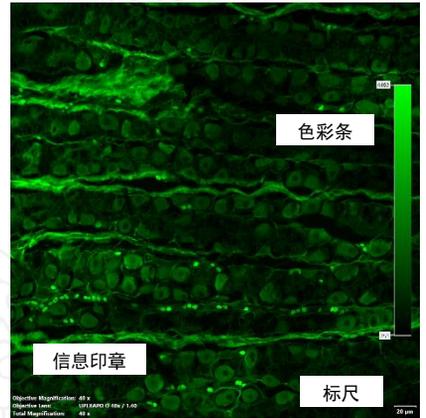
2D浏览与处理



[Scale Bar] 添加标尺, 可在菜单栏Tools > Options > Scale Bar中调整标尺的属性

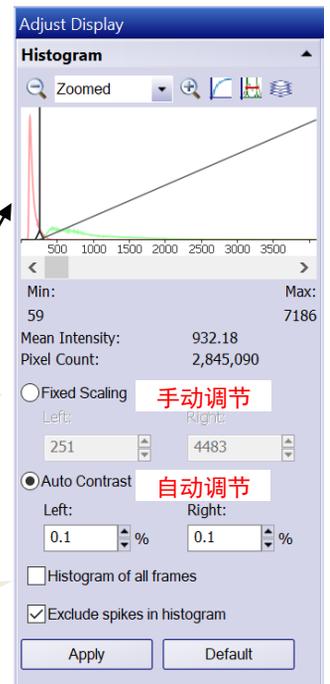
[Info Stamp] 添加信息印章, 可在菜单栏Tools > Options > Info Stamp中调整信息印章的属性

[Color Bar] 添加色彩条, 可在菜单栏Tools > Options > Color Bar中调整色彩条属性



可以通过拖动区间或者直接输入数值, 定义图像显示灰度值的最大值和最小值。

降低最大值 → 提高图像信号亮度
提高最小值 → 扣除弱信号(背景)



在菜单栏View > Tool Windows > Adjust Display中打开图像对比度调节窗口, 可根据情况, 按照固定区间[Fixed Scaling]和自动对比度[Auto Contrast]两种方式进行调节。

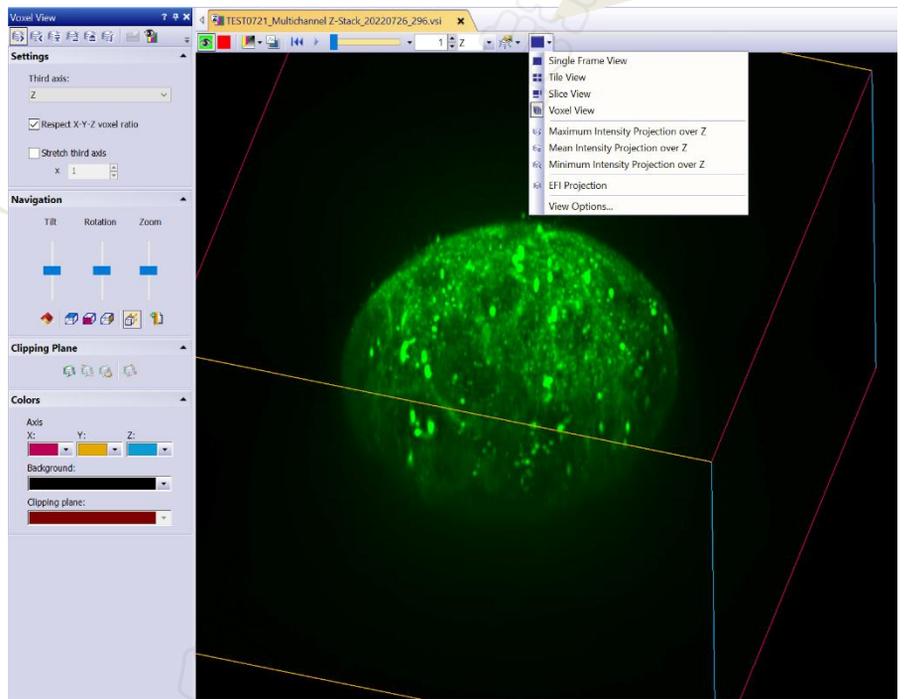
3D浏览与处理

[Voxel View]以3D的形式展示Z序列图像

[Tilt]: 垂直旋转图像
 [Rotation]: 水平旋转图像
 [Zoom]: 放大/缩小图像

-  默认角度视图
-  Z轴角度视图
-  X轴角度视图
-  Y轴角度视图

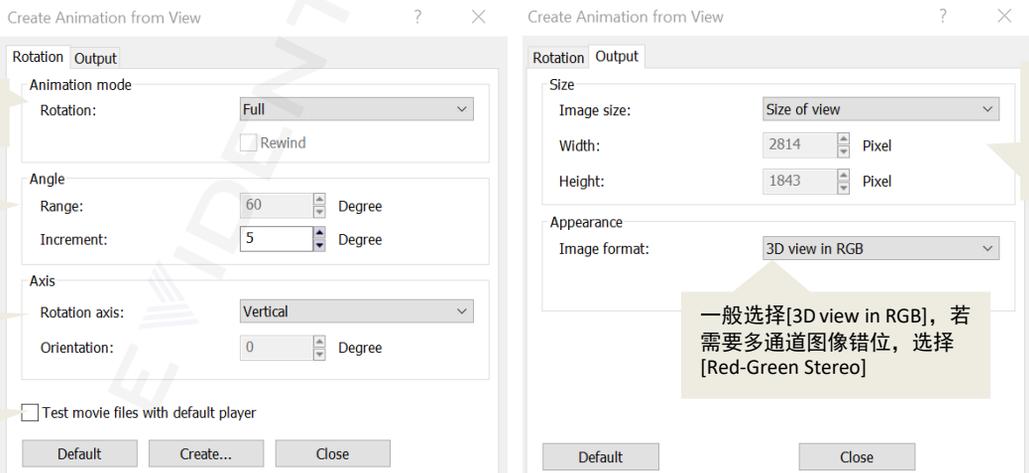
改变XYZ边框/背景的颜色



3D视图浏览

3D视频输出

在图像窗口右击鼠标，打开[Create Animation from View]窗口，如下



Full: 360度旋转
 Centric: 自定义旋转

自定义旋转范围
 和最小角度

旋转方式

完成后立即播
 放建议不勾选

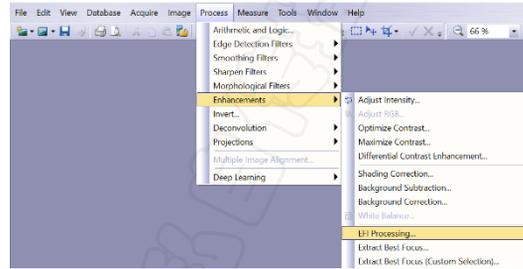
设置完成后点击
 [Create]，生成视频

图像大小:
 一般默认
 为当前视
 野大小

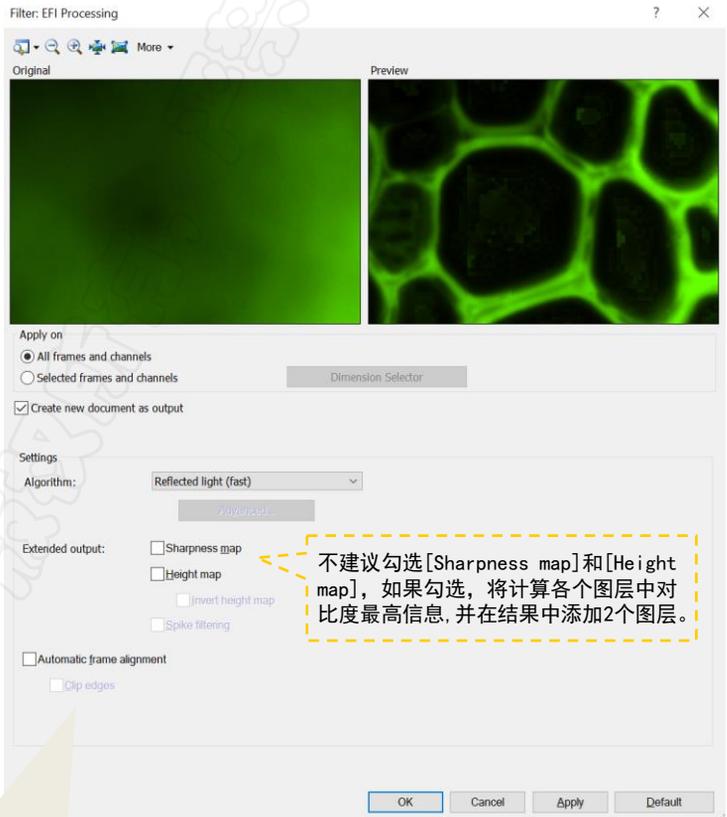
一般选择[3D view in RGB], 若
 需要多通道图像错位, 选择
 [Red-Green Stereo]

后期景深拓展

透射光和荧光图像都可用于后期EFI，在菜单栏中打开Process > Enhancements > EFI Processing



在原图中单击鼠标可改变预览图的位置；滚动鼠标滚轮可调整预览图像的大小。



生成新文件，建议勾选

[Algorithm]算法有以下四种选项：

Reflected light (fast)
Reflected light (fine)
适用于透射光成像，如明场/DIC/相差；

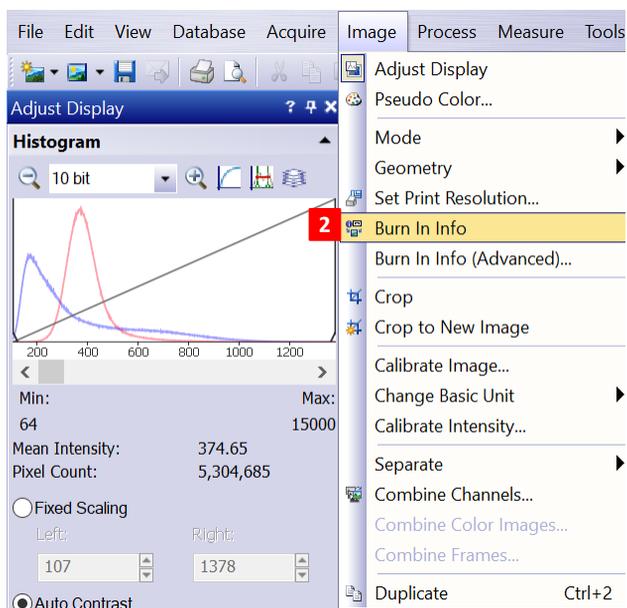
Transmitted light (exponential)
Transmitted light (quadratic)
适用于透射光成像，如荧光，推荐采用 [exponential] 指数算法，效果优于 [quadratic] 二次曲线

不建议勾选 [Sharpness map] 和 [Height map]，如果勾选，将计算各个图层中对比度最高信息，并在结果中添加2个图层。

[Automatic frame alignment] 自动帧对齐：体式显微镜图像采集时使用，宽场、共聚焦和转盘显微镜不需要勾选。

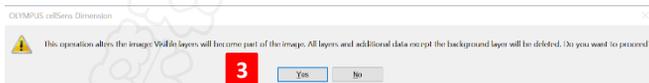
点击OK，生产一张新的EFI图像

图像输出 (一)



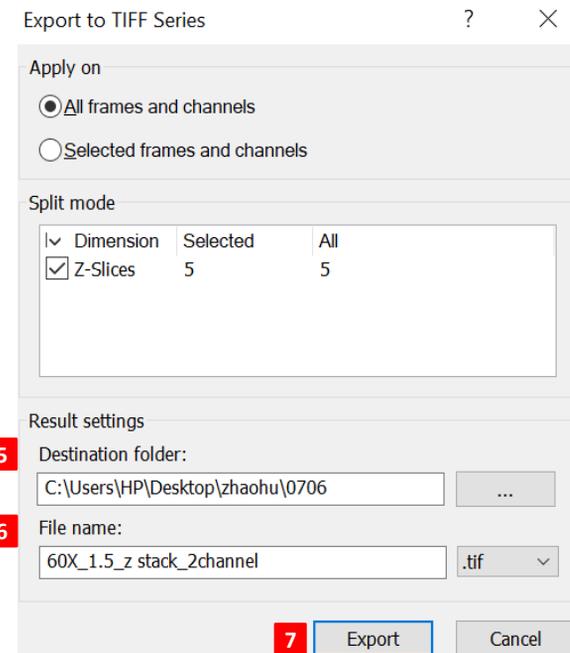
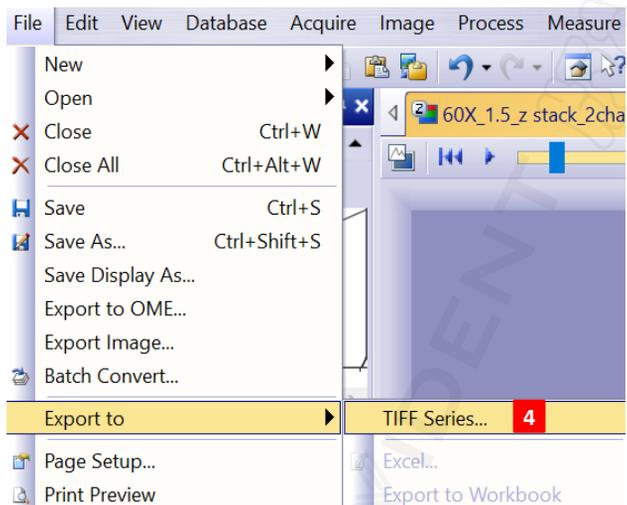
印入信息

- [1]** 首先根据需求，在原始图像格式.vsi上添加所需的标尺、信息印章或色彩条等；
- [2]** 点击菜单栏中Image > Burn In Info；
- [3]** 核实弹出的提示信息，点击[Yes]；



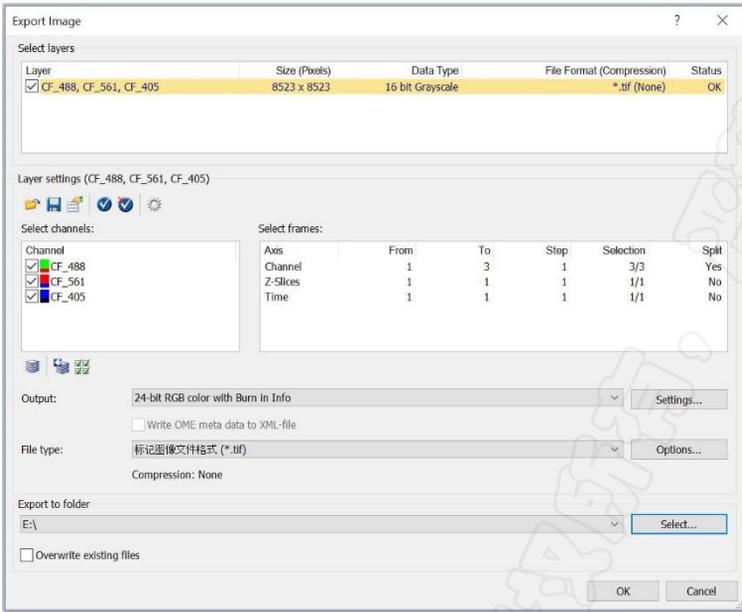
将图像保存为tif格式

- [4]** 打开菜单栏中File > Export to > TIFF Series对话框；
- [5]** 在[Destination folder]中选择需要输出文件的位置；
- [6]** 在[File name]中输入文件名称；
- [7]** 点击[Export]输出文件。



图像输出（二）

打开菜单栏中File > Export Image对话框, 如下图所示



选择是否需要Channel、Z-Slices、Time进行拆分

选择图像保存的类型, 通常选择24-bit RGB color with Burn in Info图像类型

选择图像保存的格式

选择图像保存的路径

注意: 当文件类型选择“.tif”时, 导出的图像有可能是16bit, windows自带的看图软件打开是全黑的, 需要用专业的软件如ImageJ或photoshop才可以正常查看。

cellSens 常用分析功能

EVIDENT

说明

本手册使用cellSens安装光盘中“Product family cellSens\ Example images”目录下的图像作为示例，如无法获取请与Evident相关人员联系索取图像文件。

注意：在您对任何图像做任何处理分析之前，强烈建议您备份原始图像！



图像备份方法：选中需备份图像，点击菜单栏“图像 > 复制”（或按快捷“Ctrl+2”）。

共定位分析（一）

注意：待测图像需包含至少2个荧光通道。

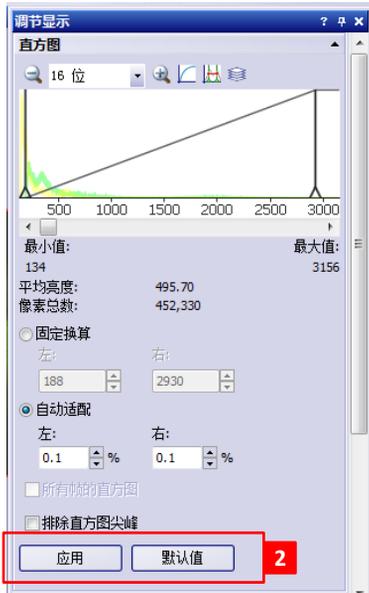


【1】打开以下图像：

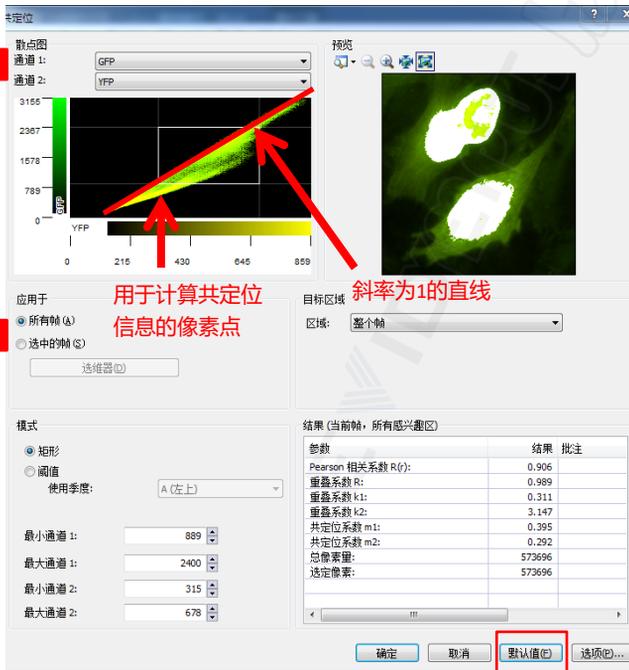
Example images\Unmixing\HeLa_original.tif;

【2】打开“视图 > 工具窗口 > 调节显示”，点击“默认值”键，点击“应用”；

【3】打开“视图 > 工具栏 > 生命科学应用”，点击“共定位”图标；



【4】打开共定位测量窗口，点击窗口左上方“通道”下拉菜单，分别选取待分析的两个通道。左侧散点图显示原图中每个像素的荧光强度分布情况，散点图越集中在斜率为1对角线上说明两个通道共定位可能性越高；

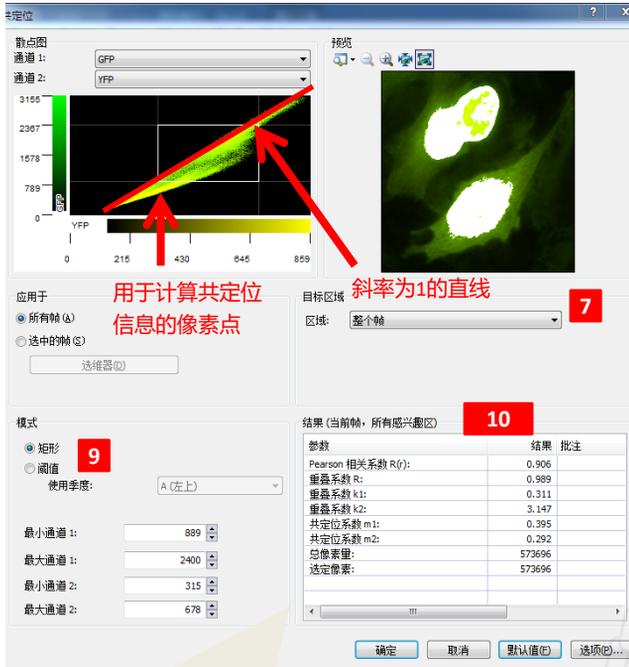


【5】为了简化流程，建议点击右下角默认值，会对相应选项设定默认值进行计算共定位状态。白色矩形框是阈值框，其代表包含两个待分析通道荧光强度中间值像素点的位置，可根据荧光信号强度选取，其大小和位置可以在图中任意框选设置；

【6】待测图像如为序列图像(t、Z)，可只测量选定的帧。单击“选中的帧”-选维器，选取需测量的帧；



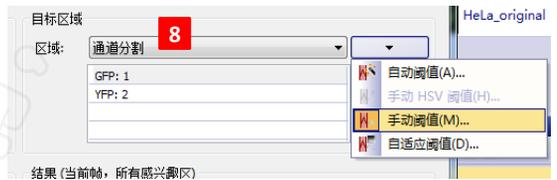
共定位分析（二）



【7】如不需测量整个区域，可在“目标区域”内选择“感兴趣区”。点击右侧的ROI图形（方形、圆形、任意形），在图像上设置ROI（感兴趣区），单击鼠标右键，选择“确认输入”。



【8】“目标区域”-“通道分割”是先对需要计算共定位的两个通道设置阈值，再形成散点图，进行共定位分析，阈值设置可以有自动、手动、自适应等方式，如下图：

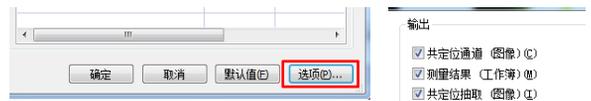


【9】“模式”选项里，点击默认值后会选择为矩形，如切换为“阈值”模式，则散点图显示为A、B、C、D四个区域，“使用季度”选项一般选择为“B右上”，表示对处于B区域荧光强度的像素点进行共定位分析，具体阈值可以通过拖动图上分界线或输入具体数据进行设置；



【10】分析结果自动显示在窗口右下方；

【11】点击“选项”后，可对最终输出结果做设定，全选后，最终点击确定完成共定位分析，将生成三个文件，一是含有“共定位”通道和原有通道的新图像，二是分析结果的工作簿，三是单独抽取出的“共定位”通道。



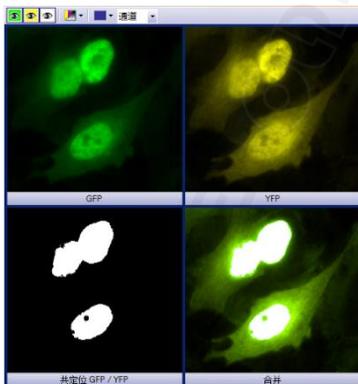
Pearson相关系数：常用相关性判定系数，用于描述荧光强度变化趋势是否一致。 $-1 < R(r) < 1$ 。 $R(r)$ 越接近1，表示两个荧光通道之间荧光强度变化趋势一致，共定位的可能性越大；反之， $R(r)$ 越接近-1，两荧光通道之间荧光强度变化相反，越不可能存在共定位信息；若 $R(r)=0$ ，表明两个荧光通道的位置信息为随机分布。

重叠系数R：常用共定位判定系数， $0 < R < 1$ ，越接近1共定位可能性越高。R可排除多种因素造成的两个通道间荧光强度不同的影响，如染料浓度、光毒性、量子效率等。

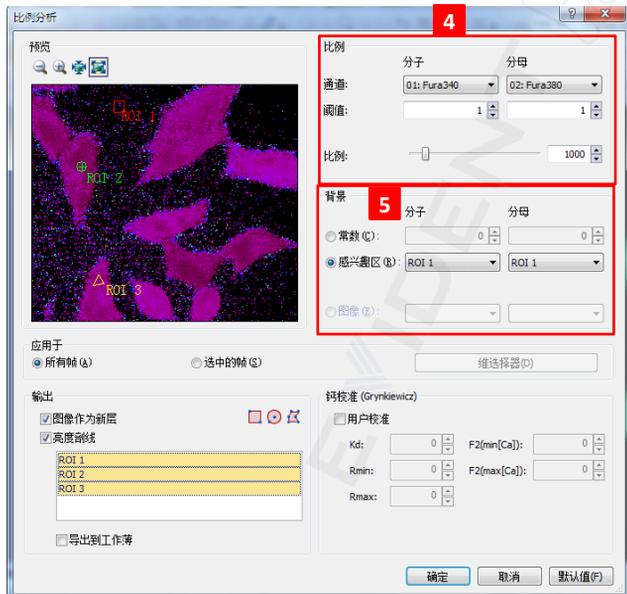
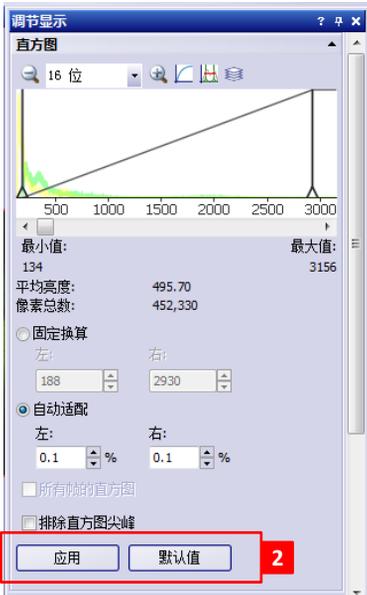
重叠系数k1和k2：重叠系数R的子参数， $R^2 = k1 \times k2$ 。k1与通道2荧光强度有关，k2与通道1荧光强度有关，均为线性关系。可用于判断两通道间的荧光强度的区别。

共定位系数m1和m2：图像的分析区域内带有共定位信息的像素的荧光强度占总荧光强度的比例。m1代表带有通道2信息的通道1的像素的荧光强度值，占通道1总荧光强度值的比例；m2代表带有通道1信息的通道2的像素的荧光强度值，占通道2总荧光强度值的比例。此组参数可用于判断哪个通道在共定位中更占优势。

11



比例分析（一）



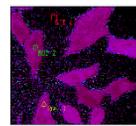
注意：待分析图像通常为时间序列图像，包括至少2个荧光通道。

- 【1】打开Example images\Fura.tif，(Fura2法测量钙离子浓度示例图)；
- 【2】打开“视图 > 工具窗口 > 调节显示”，点击“默认值”键，点击“应用”；
- 【3】打开“视图 > 工具栏 > 生命科学应用”。首先需要在待测图像的背景区域和待测区域创建感兴趣区 (ROI)，然后点击“比例分析”图标；

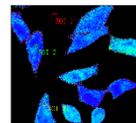


- 【4】打开“比例分析”窗口，设定参数；
 - 通道：选择待分析的通道，确定分子和分母。
 - 阈值：用于降低窗口左上方预览图像背景噪声，两个通道可单独调节。
 - 比例：数值放大系数，越大数据越准确，建议设置为1000或以上。

参数示例：



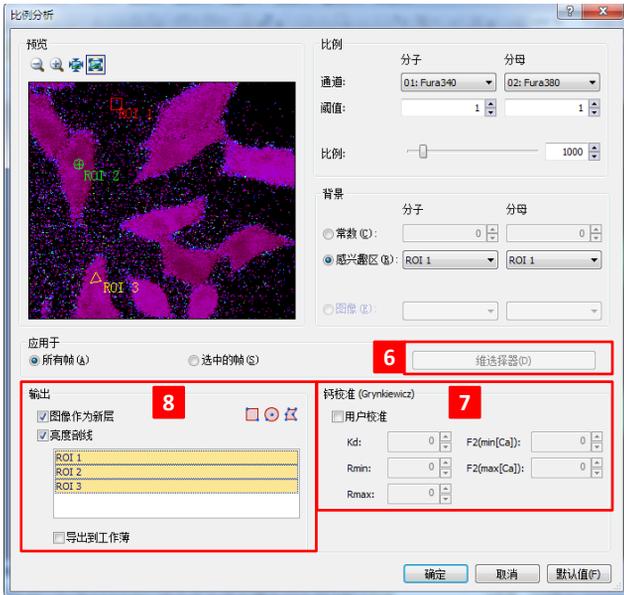
“阈值”为1时



“阈值”为5时

- 【5】需要进行比例分析的图像，扣除背景之后才可进行除法计算。三种去除背景的方法：
 - 常数：输入固定数值。适用于一组实验图像的分析，以保证参数一致性。
 - 感兴趣区：选取预先在图像背景位置设置的ROI，适用于单个实验图像。
 - 图像：选取在无标本位置拍摄的图像作为背景图像，背景图像的成像参数必须与待分析图像一致。

比例分析（二）

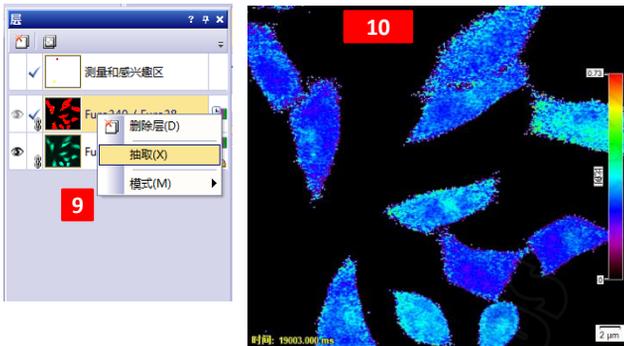


【6】 如不需分析全部图像，可单击“维选择器”取所需测量的帧；



【7】 如使用Fura-2进行钙离子浓度测量，可根据Grynkiewicz公式[参考文献Grynkiewicz et. al. (1985), J. Biol. Chem. Vol. 260, No. 6, pp 3440-50]，计算出钙离子绝对浓度值。勾选“用户校准”对话框，使用钙离子标准浓度样品作为参照样品，获取相应校准参数（注意：参照样品和待测样品的图像采集参数要保持一致）；

- Kd: Fura-2 Ca²⁺合成物的离散常量。
- Rmin: 不含Ca²⁺离子的参照样品中测量的比例值。
- Rmax: 含饱和Ca²⁺离子浓度的参照样品中测量的比例值。
- F2(min[Ca]): 不含Ca²⁺离子的参照样品中380通道的强度值。
- F2(max[Ca]): 含饱和Ca²⁺离子浓度参照样品中380通道的强度值。



【8】 选择要测量的ROI，勾选“图像作为新层”、“亮度剖面线”和“导出到工作簿”，可分别获得比例图像、剖面图和数据结果。点击“比例分析”窗口右下方的“确定”按钮，获得分析结果；

【9】 比例图像将默认为原图的图层。如需单独保存，可打开“视图 > 工具窗口 > 层”，调出“层”窗口。然后再图层上单击右键，选择“抽取”；

【10】 比例图像以色谱图形式表示，不同颜色代表比例值的高低。打开“视图”，点击“标尺”、“信息印记”、“彩色条”，分别可在图像上添加标尺信息、时间信息、数值信息。打开菜单栏“文件 > 另存为”可保存为视频文件(AVI格式)；

【11】 在亮度剖面线窗口下，点击“导出至 Excel”按键，可导出数据。



消卷积处理

在采集明场图像和荧光图像时，由于焦面上方和下方区域的存在漫射光和衍射光，造成的焦面信息的过度曝光、畸变和模糊，这种现象称为卷积。卷积可以通过适合的数学算法进行减弱或消除，此种处理方法称为消卷积。消卷积处理的图像结果在很大程度上取决于用于采集图像的特定参数，如物镜的数值孔径和折射系数，荧光染料的发射峰值等。

cellSens标配三种消卷积滤镜：二维消卷积、最近邻和Wiener滤镜。对于确定图像消卷积和降噪时所必需的点扩散函数和噪声函数的方式，各个消卷积滤镜在本质上有区别，因此对图像的处理方式和类型也有所区别。同条件下，用于计算点扩散函数的图像数据越多，结果就越精确，计算所花费的时间越长。

消卷积滤镜	处理速度	荧光图像		三维图像	透射光图像	
		二维	三维	处理效果	明场	相衬
二维消卷积	快	支持	支持	差	支持	不支持
最近邻	较快	支持	支持	中	支持	支持
Wiener滤镜	慢	不支持	支持	好	支持	支持

此外，进行消卷积的先决条件是采集图像时达到足够高的分辨率要求，这意味着待处理图像的像素必须足够小，在处理三维图像时Z轴步进距离不宜过高。

根据Nyquist-Shannon取样法则，“Nyquist高度”定义：

$$Z_{Nyquist} = \frac{\lambda/2}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}$$

λ ：发射波长
 n ：物镜介质折射率
 NA ：物镜数值孔径

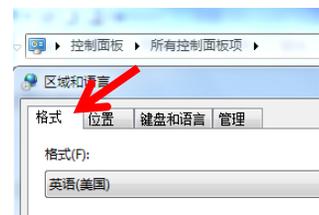
根据此原则，使用“最近邻”和“Wiener滤镜”方法处理三维图像时，用于采集三维图像的Z轴步进距离“ Z_{max} ”不得大于以下公式计算得出的数值：

$$Z_{max} = 5 \times Z_{Nyquist}$$

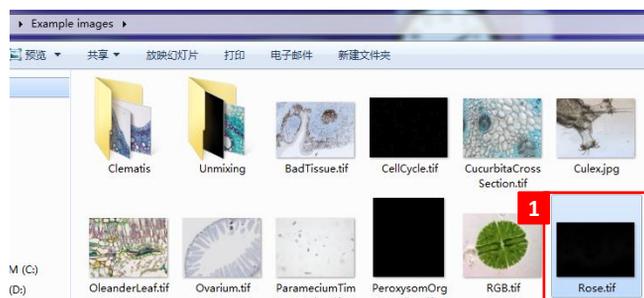
否则，消卷积滤镜操作界面会出现报错信息，无法完成消卷积处理。  Z轴校准缺失或对消卷积无效。

例如：当使用双光子物镜XLPLN25XWMP2 (NA 1.05) 在920 nm的激发光下采集Z层图像时，根据公式计算得出“ $Z_{Nyquist}$ ”约为0.9 μm ，则“ Z_{max} ”约为4.5 μm 。这意味着如需对使用该物镜在920nm激发光下采集的Z层图像进行消卷积处理，采集图像时所设置的Z层步进不应大于4.5 μm 。

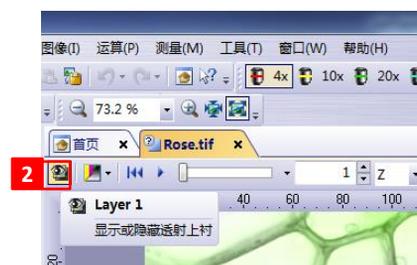
注意：如用于安装cellSens的PC的操作系统为中文版Windows，请在PC的“控制面板 > 区域和语言 > 格式”中，将“格式”设置为“英语(美国)”，确定后重启系统。否则运行消卷积处理时可能会报错。



验证通道参数



- 【1】打开Example images\Rose.tif;
- 【2】点击左上角图标 “隐藏透射上衬”;
- 【3】打开“视图 > 工具栏 > 生命科学应用”，点击“验证通道参数”图标;
- 【4】打开“验证消卷积通道参数”窗口。如待处理图像为使用原始图像格式 (VSI、OIB、OIF、OIR等) 或包含图像信息的TIF格式，软件将自动读取所需参数。如某些参数错误或缺失，请手动修改或添加;

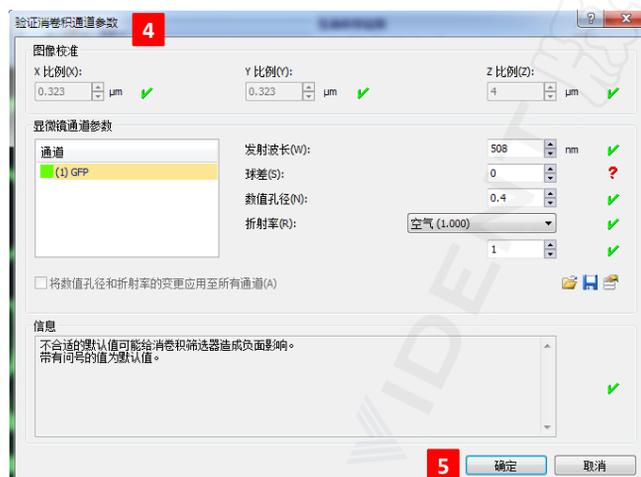


如果无法确定参数，请输入默认参数：发射波长:540nm，球差:0，数值孔径:0.75，折射率:空气 (1.000)。只能使用“最近邻”滤镜或“Wiener 滤镜”处理图像。

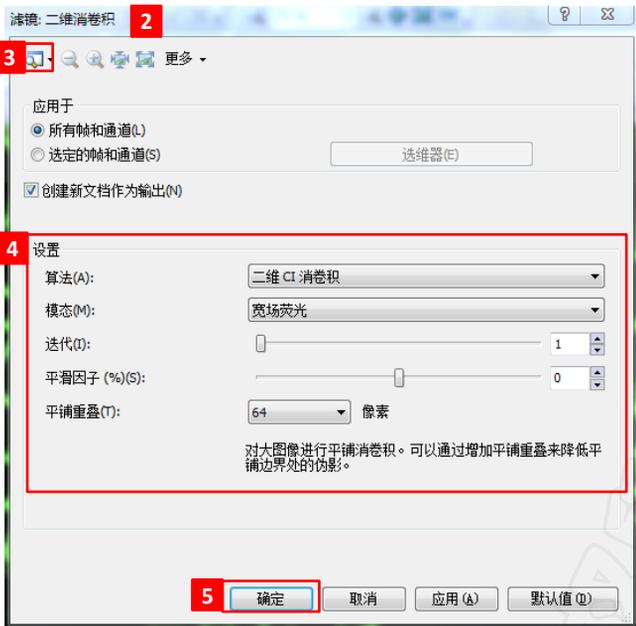
注意：除特殊应用外，“球差”一项通常为0。



- 【5】参数确认之后，点击“确定”;
- 【6】图像参数验证完毕之后，可进行下一步消卷积处理。



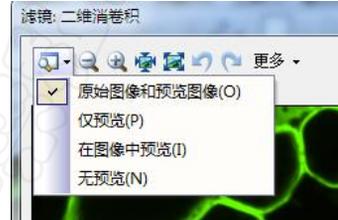
二维消卷积



【1】打开“视图 > 工具栏 > 生命科学应用”，点击“二维消卷积”图标；

【2】打开“二维消卷积”滤镜窗口；

【3】点击左上角图标，可选择是否显示预览图像；

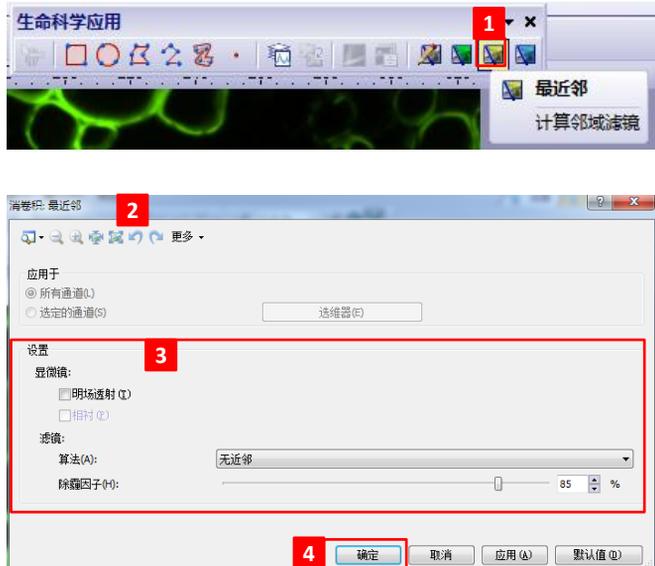


【4】在下方设置窗口，设置二维消卷积处理参数；

- **算法：**默认“二维CI消卷积”算法，如使用“二维去光晕”算法，需配合“平滑因子”参数使用。如注重荧光亮度信息，请采用“二维CI消卷积”算法；如注重荧光表达位置信息，请选用“二维去光晕”算法。
- **模态：**如为荧光图像，选择“宽场荧光”；如为明场图像，选择“明场透射光”。
- **迭代：**算法应用次数，数字越大应用次数越多。默认为1。
- **平滑因子：**调整滑动游标可使处理后的图像变得平滑或锐化。数值为正，趋向平滑；数值为负，趋向锐化。如使用“二维CI消卷积”算法，此项应为0。
- **平铺重叠：**如所处理的图像过大（像素大于1000x1000），需对图像进行分割处理后，再自动拼接成大图。此参数为分割图之间的重叠区域，用于消除边界伪影。数值越大，图像处理效果越好，所需时间越长。

【5】根据预览图像设置参数。如对结果满意，可点击窗口下方的“确定”按钮，得到二维消卷积处理图像。

最近邻



【1】打开“视图 > 工具栏 > 生命科学应用”，点击“最近邻”图标；

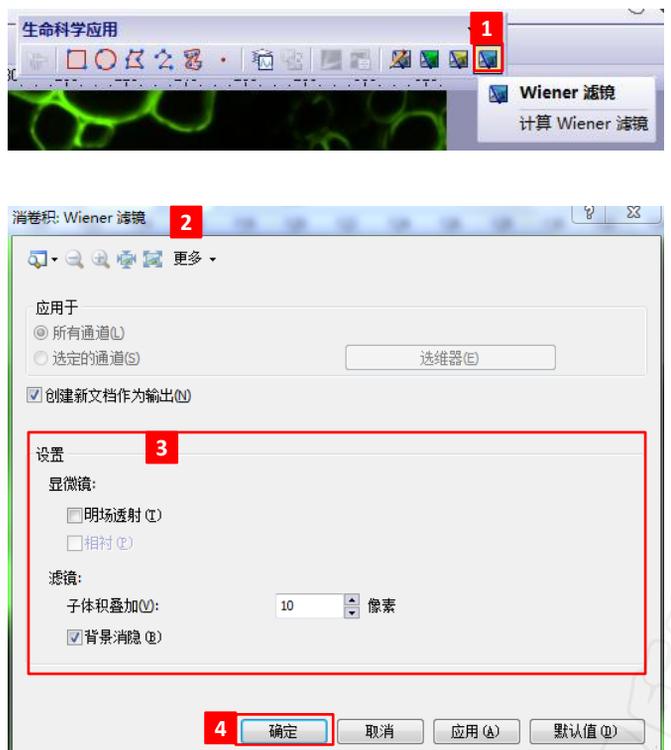
【2】打开“最近邻”滤镜窗口。此滤镜无法预览图像处理结果；

【3】在设置窗口，设置“最近邻”滤镜处理参数；

- **显微镜**：默认荧光图像。如为明场或相衬图像，请在对话框中勾选。
- **算法**：包括“无近邻”和“最近邻”两种。如待处理图像为单帧图像，两种算法无区别；如待处理图像为序列图像(t、Z)时，“无近邻”算法要快于“最近邻”算法。因“最近邻”滤镜无法显示预览图像，为节省时间，处理序列图像时可先使用“无近邻”算法；调整“除霾因子”参数，获得理想结果后再使用“最近邻”算法进一步优化。如待处理图像的Z层较薄(如TIRF图像)，可直接使用“最近邻”算法。
- **除霾因子**：通过调节“除霾因子”参数，排除图像中噪声函数的干扰。如图像通道参数经过验证，默认值85%通常可获得较好的处理效果。如图像通道参数未知，则需要调整“除霾因子”直到取得最佳效果。

【4】点击窗口下方的“确定”按钮可察看图像处理结果，得到最近邻消卷积处理图像。

Wiener滤镜



注意：只能处理带有Z层信息的图像。

【1】打开“视图 > 工具栏 > 生命科学应用”，点击“Wiener滤镜”图标；

【2】打开“Wiener滤镜”滤镜窗口。此滤镜无法预览图像处理结果；

【3】在设置窗口，设置“Wiener滤镜”滤镜处理参数；

- **显微镜**：默认荧光图像。如为明场或相衬图像，请在对话框中选择。
- **子体积叠加**：如待处理的图像过大，可用内存无法同时处理整幅图像，软件将原始图像分割成多个子图像处理，处理完毕后自动拼接。此参数用于设置子图像之间的重叠区域大小，数值越大(最高512像素)，图像组合效果越好，处理时间越慢。
- **背景消隐**：如待处理图像背景噪音过高，将会影响处理结果。因此需勾选此项。

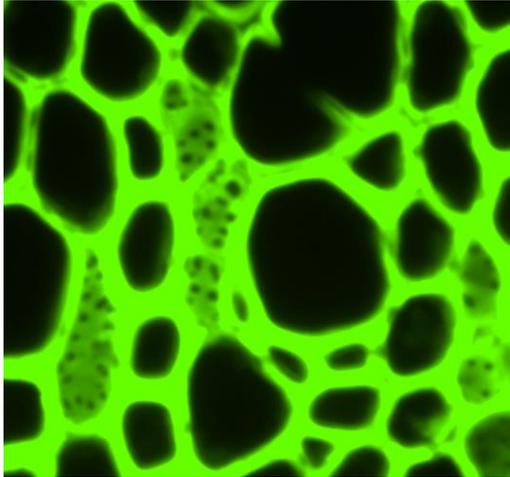
【4】点击“确定”可察看图像处理结果，得到Wiener消卷积处理图像。

通常消卷积处理需要一定时间，处理进度在软件窗口左下角显示。点击取消按钮可随时中止处理。

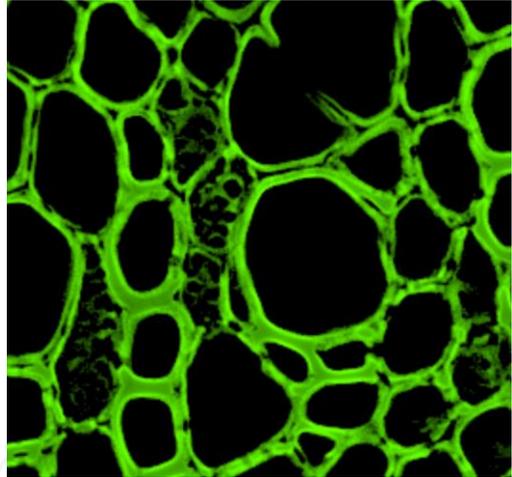


消卷积处理结果对比

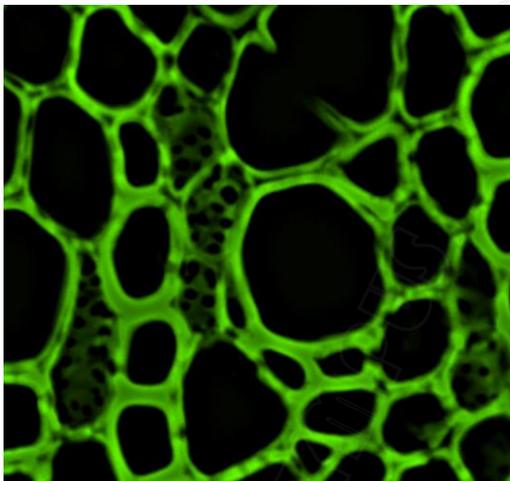
三种滤镜均采用默认参数，下图展示图像为示例图像的局部。



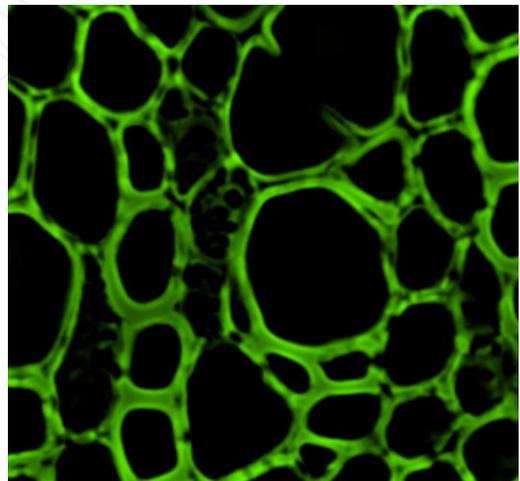
原始图像



二维消卷积



最近邻

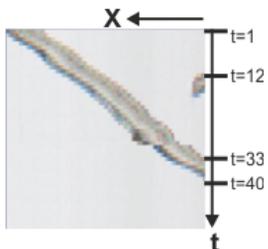


Wiener滤镜

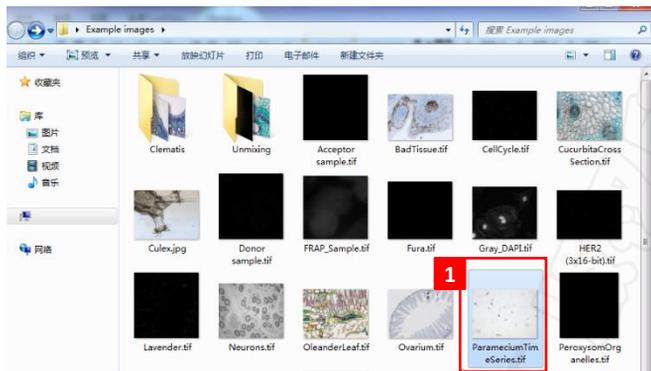
记波器 (一) (Kymograph)

记波器用于创建时间序列图像中待测对象的运动轨迹，生成记波图，将时间序列图像进行二维化展示，且以此测量待测对象的运动速度等数据。在待测图像中可定义一个或多个轨迹，用于指定待测对象的运动路线，轨迹的宽度可以自定义。通过计算轨迹线条的亮度值(彩色图像)或灰度值(荧光图像)，得到待测对象的记波图。

如下图，记波图显示的内容为待测对象上所定义轨迹位置的亮度值，水平轴(X)代表待测对象沿轨迹的运动距离，垂直轴(Y)代表时间(t)。



在时间点 $t=1$ ，待测对象位于轨迹起点。
在时间点 $t=12$ ，其他对象进入了图像。
在时间点 $t=33$ ，待测对象移出图像。
在时间点 $t=40$ 之后，所定义轨迹上没有待测对象可见。



注意：待测图像必需为时间序列图像。如待测图像不是使用原始图像格式(VSI、OIB、OIF、OIR等)或包含图像信息的TIF格式，测量前需添加或校准图像参数(时间信息、标尺信息等)。

【1】打开

Example images\ParameciumTimeSeries.tif;

【2】打开“视图 > 工具窗口 > 记波器”，点击打开记波器窗口；

【3】点击窗口左上方“创建轨迹”图标；

3.1 首先进行“轨迹定义”。本示例图为明场图像，因此“视图”应选择“最小亮度投影”；

- **名称：**输入新轨迹的名称，将在定义轨迹的图像序列的图像窗口中显示。该轨迹计算的记波图将命名为 <图像序列的名称><轨迹的名称>。（**注意：**必需输入名称才能定义新轨迹，确定按钮才可用）。
- **颜色：**为轨迹选择一个颜色，用于在图像序列上显示轨迹。该轨迹对应的记波图在文档组中的标题具有相同颜色。
- **视图：**根据待测对象在图像上的移动位置的投影，定义其运动轨迹。
- **最大亮度投影：**投影图像包含所有单幅图像的最亮像素，在暗背景上移动的亮对象使用该投影方法（如荧光图像）。
- **最小亮度投影：**投影图像包含所有单幅图像的最暗像素，在亮背景上移动的暗对象使用该投影方法（如明场图像）。
- **平均亮度投影：**对于投影图像，将对所有单幅图像的亮度进行平均，在对象并不随时间发生较大变化且各幅图像具有大量图像噪声时使用该投影方法。
- **活动视图：**在定义轨迹时，在图像窗口中不显示待测对象移动位置投影。



记波器(二) (Kymograph)

筛选抽取范围 3.2

维度轴(D): 时间

使用所有帧(U) 使用选定帧(M)

第一帧(F): 1

最后一帧(L): 50

步距(I): 1

滤镜参数 3.3

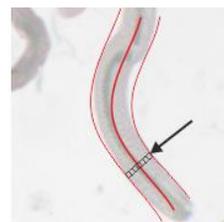
平均值(A): 7 像素

拉长因子(E): 2 行

3.2 如待测对象仅在部分图像中可见，则不需要测量全部图像，可在“筛选抽取范围”中选取含有待测对象的图像帧。

3.3 如图像中的待测对象较大或宽度具有分析意义，可在“滤镜参数”中定义轨迹的相关参数；

平均值：用于定义轨迹具有的宽度。如下图箭头标记处，显示了用于定义对象宽度的7个像素，并将这些像素亮度的平均值用于计算记波图。红色粗线为定义的轨迹，细线指示轨迹的实际宽度。此项操作用于确定待测对象运动轨迹的中心位置。

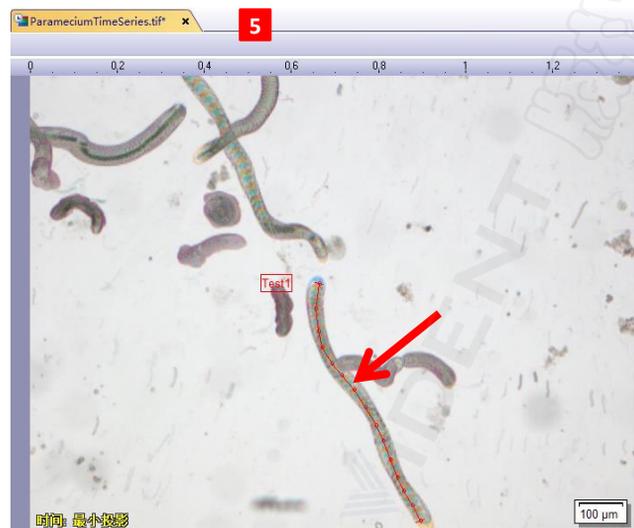


拉长因子：输入要在记波图中复制行的次数。例如，输入值2可将记波图的Y轴拉长至2倍，每个帧的值也相应地在记波图中显示两次。



【4】定义轨迹参数之后，点击窗口的“定义轨迹折线”图标，进入待测对象运动轨迹定义状态，此时鼠标只能在图像窗口中活动；

注意：拍摄时间序列图像时，设置适合的间隔时间是准确获取待测对象运动速度的关键。确保待测对象在相邻两帧之间的位置存在重叠区域，才能准确的测量出待测对象的运动速度。



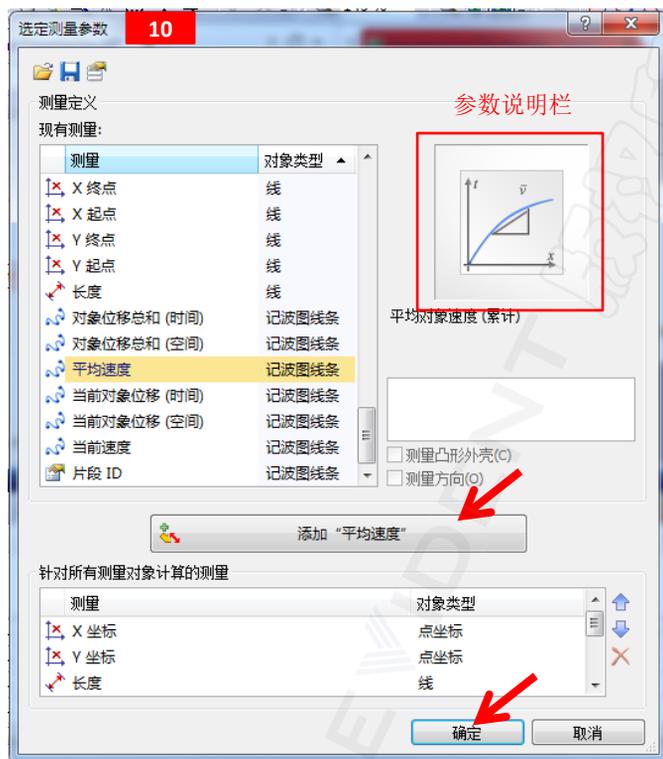
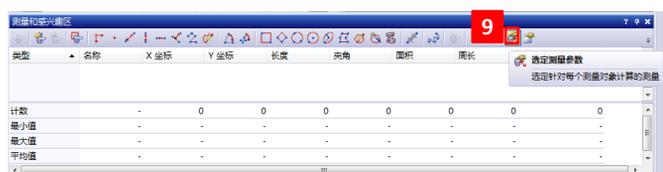
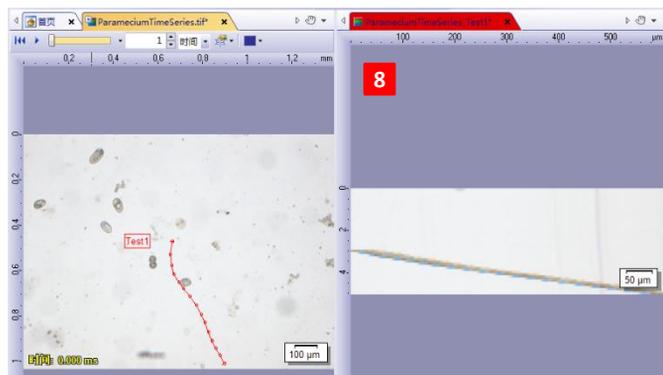
【5】根据图像窗口中待测对象的投影，通过鼠标左键单击，描绘出需测量的运动轨迹，单击鼠标右键单击退出运动轨迹定义状态。如果对定义的轨迹需要进行调整修改，可以左键单击需要修改的位点，然后按住左键将位点拖至预期位置；

【6】定义轨迹之后，如需修改调整，可点击“编辑轨迹”按钮；

【7】如轨迹定义无误，点击“计算记波图”按钮，生成该轨迹的记波图；



记波器 (三) (Kymograph)



【8】记波图将自动排列在原始图像的右侧，可以单独保存。如需获取待测对象的运动速度等数据，需要对记波图进行测量；

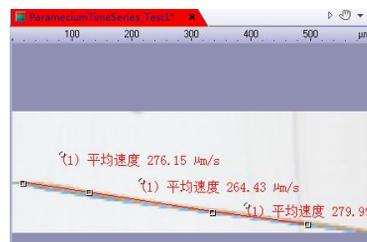
【9】打开“测量 > 测量和感兴趣窗口”，点击“选定测量参数”图标；

【10】选取需要测量的参数，如“平均速度”，参数的具体定义说明可参考右侧的“参数说明栏”。选取参数后，点击“添加“平均速度””按钮添加测量参数，然后点击“确定”；

【11】添加参数后，点击“记波图折线”按钮，在右侧记波器图像结果中，沿着轨迹画出折线图，单击鼠标右键结束，测量记波图；



【12】在记波图的轨迹上，选取需测量的区域段，每段之间的待测对象平均速度数据将直接在记波图上显示；



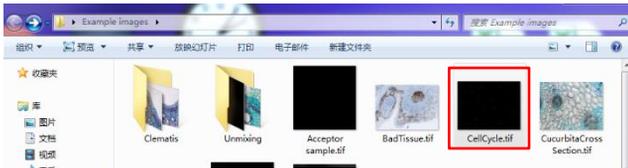
【13】测量结果也显示在“测量和感兴趣区”窗口，点击“将活动文档导出至Excel”按钮，可将数据导出为Excel文件。



对象计数（手动）

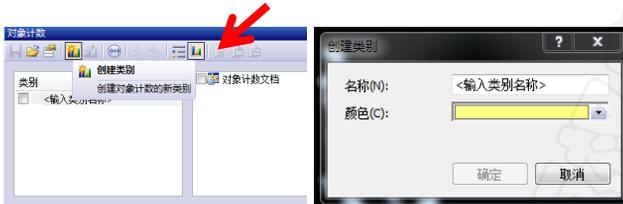
使用对象计数工具窗口可手动计算待测图像上的待测对象的数量。为此，只需单击图像上的待测对象即可。不同类型的待测对象可分别定义类别，并且可以直接在计数过程中为待测对象进行类别分配。

【1】 打开Example images\ CellCycle.tif;

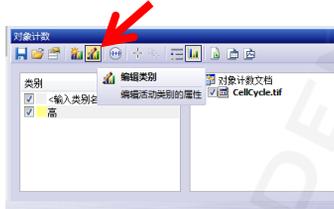


【2】 打开“视图 > 工具窗口 > 对象计数”，点击打开对象计数窗口；

【3】 点击“创建类别”，在跳出的窗口中输入类别名称，选取对应颜色。可创建多个类别；



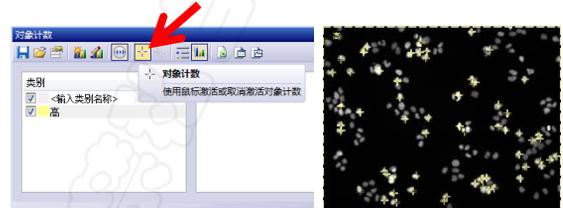
【4】 如需更改调整已创建的类别，可点击“编辑类别”进行修改；



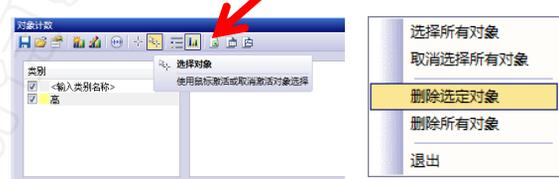
【5】 点击“数字标线”按钮，可为图像添加辅助线；



【6】 点击“对象计数”按钮，在图像上点击符合标准的待测对象，进行计数。计数完成或者需要调整计数点时，再次点击“对象计数”按钮，或按键盘的“Esc”键退出计数模式；



【7】 如需调整计数点，可点击“选择对象”按钮，选取需删除的计数点。单击鼠标右键，选择“删除选定对象”，或者单击键盘“Delete”按钮，即可删除；



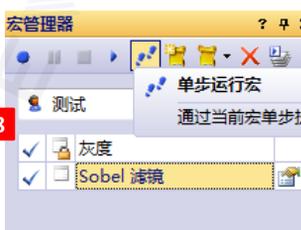
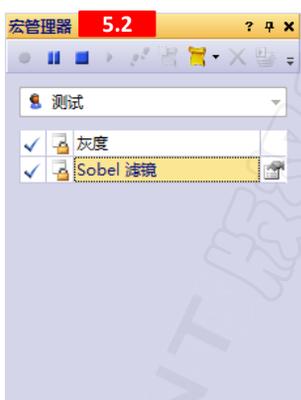
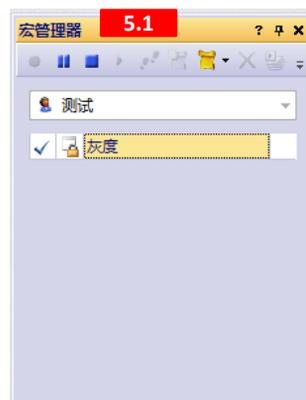
【8】 计数结果在“对象计数窗口”的右侧显示，可以列表和柱状图的形式。点击“将分类结果导出至Excel表格”按钮，可导出计数结果；



选取结果显示形式
(列表或柱状图)

结果窗口

宏管理器 (一) (Macro Manager)



宏 (Macro) 功能是指将重复使用的工作流程自动化的功能, 比如对批量图像使用相同的方法进行处理、格式转换、自动分析等等。进行宏编辑无需掌握任何编程知识, 只需在“宏管理器”中执行整个工作程序, 所执行的操作和使用的命令将被自动录制。当录制完成后, 一个可以随时再次运行的宏也相应的创建完成。

【1】 打开

Example images\Clematis\Clematis01.tif;

【2】 打开“视图 > 工具窗口 > 宏管理器”, 点击打开宏管理器窗口;

【3】 点击窗口左上方“创建宏”图标;

【4】 输入新建宏的名字和描述, 方便之后的调用;

【5】 点击“确定”按钮后, 宏管理器将自动开始录制对图像处理的步骤。这里示例为改变图像的模式, 并进行滤镜处理;

5.1 首先将图像改为灰度模式: 打开“图像 > 模式”, 点击“灰度”, 即可将此操作步骤添加到“宏管理器”;

5.2 然后进行Sobel 滤镜处理: 打开“运算 > 边缘探测滤镜”, 点击“Sobel 滤镜”, 在随后跳出的滤镜窗口下点击“确定”。即可将此滤镜操作步骤添加到“宏管理器”;

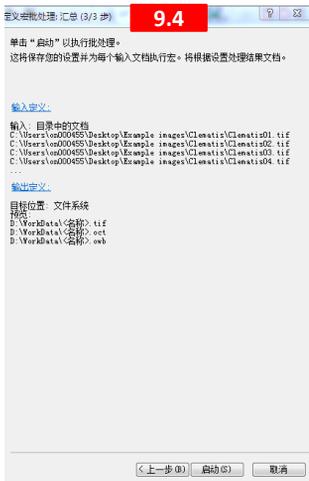
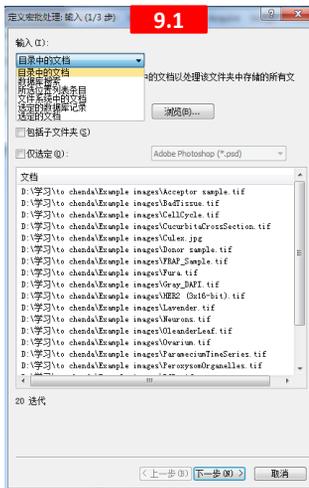
【6】 录制宏的过程可以随时中断, 或者继续;

【7】 如录制结束, 点击“停止宏运行或记录”按钮完成。录制内容会自动存储在宏管理器中, 下次使用时直接调用即可;

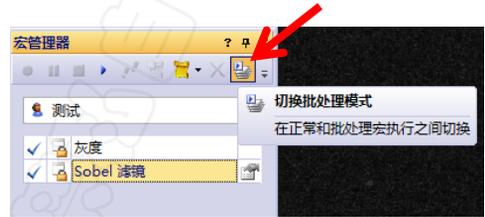


【8】 点击“运行宏”按钮, 可自动运行宏包含的全部操作步骤; 点击“单步运行宏”按钮, 每点击一次, 按顺序运行一次宏包含的操作步骤。

宏管理器 (二) (Macro Manager)



【9】如需对一组图像进行批量处理，点击“切换批处理模式”按钮；此时“单步运行宏”已不可用，点击“运行宏”按钮，进行批量宏处理；



9.1 在“定义宏批处理”窗口下，首先选取要进行批处理的图像文件，软件提供多种选取方式，可选择子文件夹和文件夹中特定格式的文件，选择完成后，点击“下一步”；

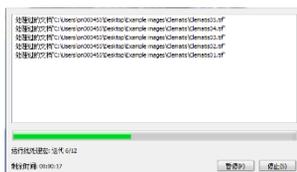
9.2 在“目标位置”中，如选择“未保存”，宏批处理后的图像将全部在 cellSens 中打开，需手动保存；选择“文件系统”，宏批处理后的图像将自动保存在定义的位置，建议使用。也可以处理后的图像保存在数据库中；



9.3 选择“文件系统”后，需要定义宏批处理后的所生成的图像、图表、工作簿的保存路径和文件类型，如无图表或工作簿可不勾选。然后点击“下一步”；

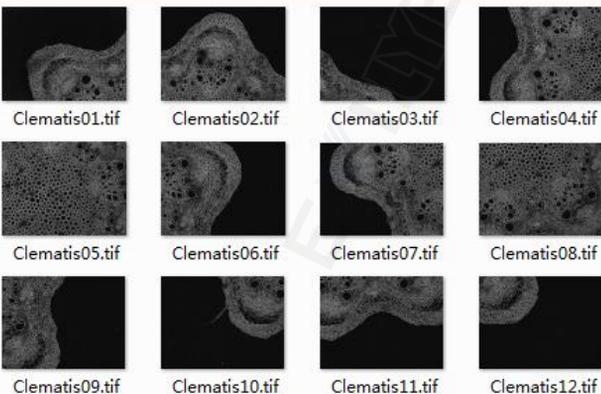
9.4 最后确认输入文件内容和输出文件的保存位置，如无误，点击“启动”。运行宏批处理；

【10】启动后，待处理图像将进行宏批处理，进度条和剩余时间在窗口下端显示；



【11】结束后点击“关闭”按钮。如第9.2步“目标位置”选择了“文件系统”，所有批处理的图像将保存在定义的保存路径中。

11



Notes

EVIDENT 版权所有，
严禁私自传播