

ImageXpress & MetaXpress

High Content Imaging System

常用操作指南



MD20250508A

moleculardevices.com

目录

一、开启及关闭系统.....	1
1. 开机流程.....	1
2. 关机流程.....	3
二、图像采集.....	4
1. 图像采集的基础设置.....	4
2. Timelapse 模式拍摄设置.....	12
3. Z series 图像采集设置.....	14
4. 校正环调节方法.....	17
5. Laser Autofocus (LAF) Wizard 法设置多孔板参数.....	19
6. 激光及图像自动对焦的设置.....	32
三、图像处理.....	38
1. 图像的查看.....	38
延时成像图像的查看.....	41
Z series 多层图像的查看.....	47
2. 单通道及多通道单个视野彩色图像的导出.....	58
3. 彩色图像的批量导出.....	71
4. 原始图像的导出及导入.....	76
5. 图像的拼接.....	80
6. 图像的彻底删除.....	83

7. 图像添加标尺	86
四、图像分析	88
1. 图像分析概论	88
2. 分析结果 Measurements 的导出方法	91
3. Cell 及 image measurements 的导出方法	94

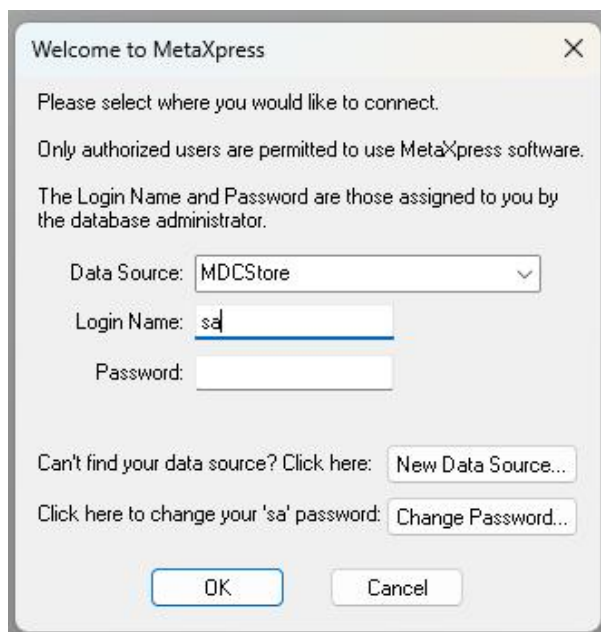
一、开启及关闭系统

1. 开机流程

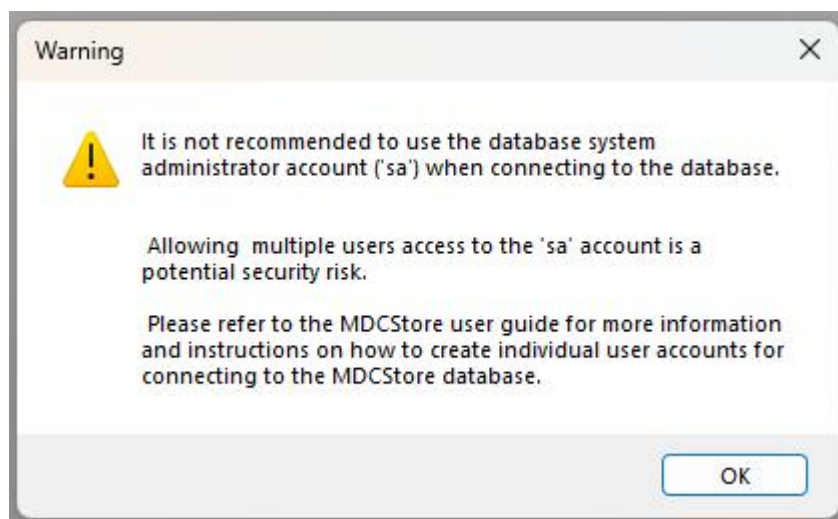
1) 打开 ImageXpress Systems Power and Options Controller (电源) 上的总开关 (INSTRUMENT)，如果需要开环境控制，那么同时也打开温控开关 (SAMPLE HEATER)，否则不需要开。如果荧光光源自动启动，则不需要另外打开，否打开荧光光源，并确保钥匙打到 ON。



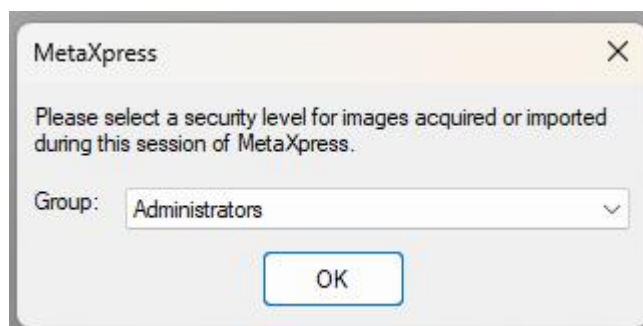
2) 启动计算机，打开软件。Data Source 选择在用的数据库，输入 Login Name 及 Password，点 OK 确认。如果用 sa 账户登录，在弹出的对话框点 OK 继续。



如果用 sa 账户登录，在弹出的对话框点 OK 继续。



在弹出的对话框选择 Group，并点 OK 确认。



开机过程，仪器会完成初始化，舱门会打开并关闭，请确保舱门不放置物品。开机完成后

仪器的指示灯带为橙色。

2. 关机流程

1) 在 Plate Acquisition Setup 界面点 Eject Plate，打开舱门，取出样本。（注：仪器无实体按钮开关舱门）之后点 Load Plate，关闭舱门。

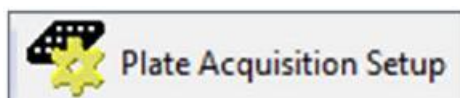


2) 关闭软件并关闭计算机。

3) 在 ImageXpress Systems Power and Options Controller（电源）上关闭温控开关（SAMPLE HEATER）及总开关（INSTRUMENT）。无需单独关荧光光源，也不要拧动钥匙。

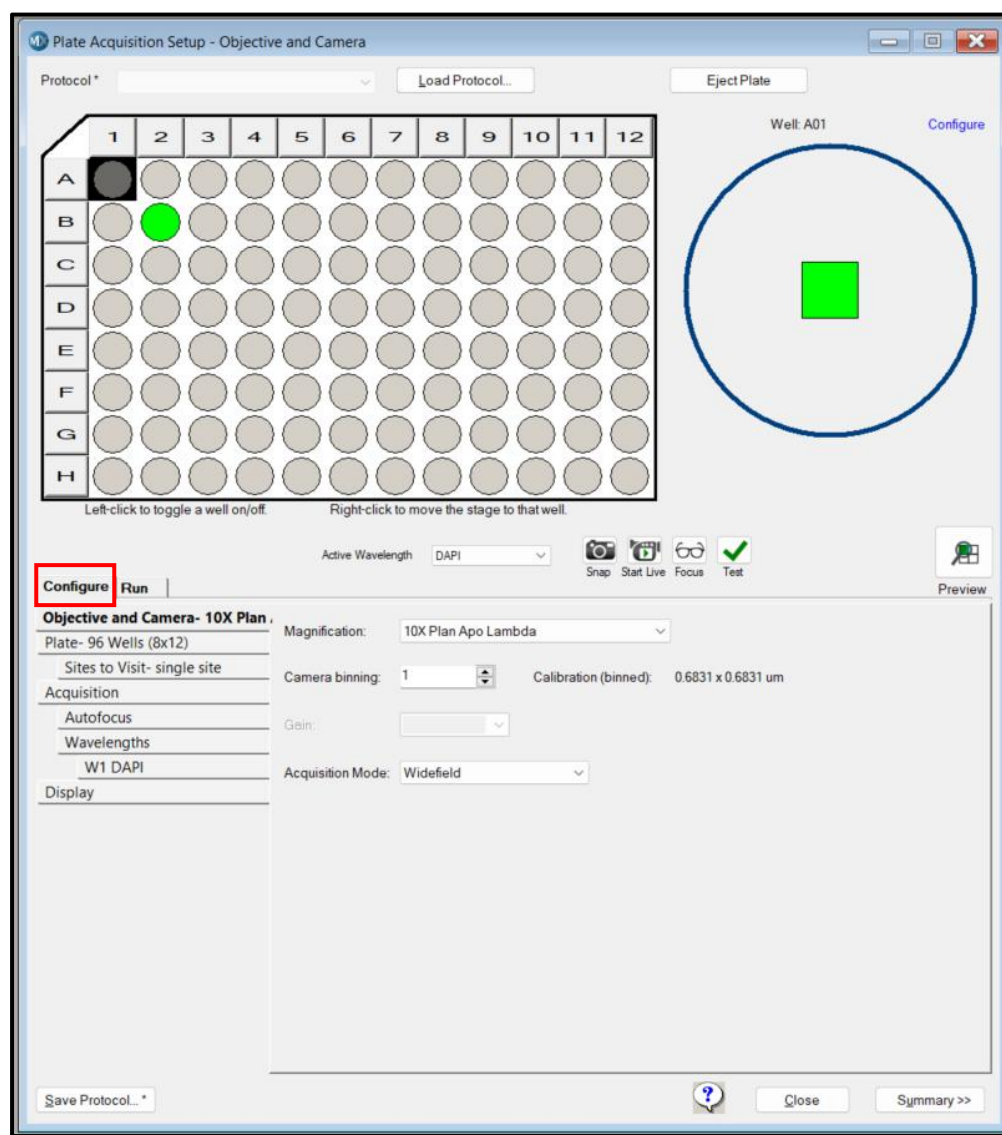
二、图像采集

1. 图像采集的基础设置



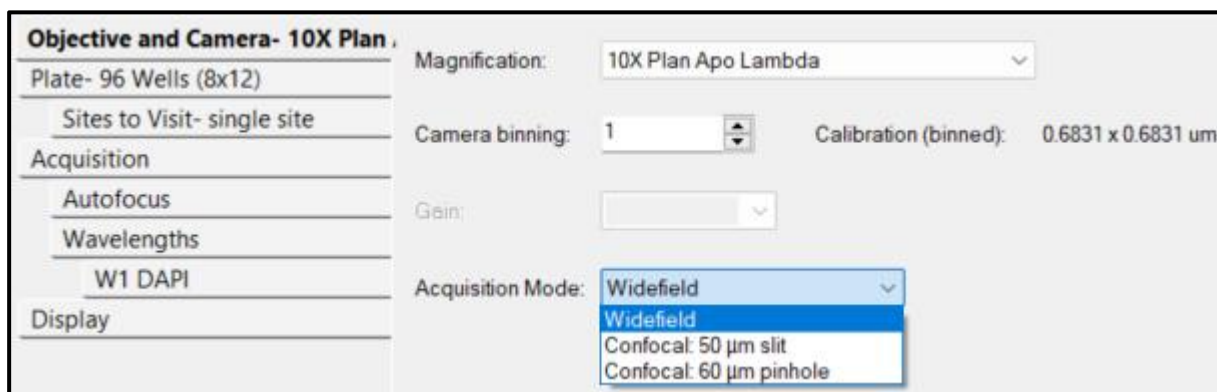
1) 打开 Plate Acquisition Setup，在 [Screening--Plate Acquisition Setup](#)。

2) 在 Plate Acquisition Setup 界面选择 **Configure**。

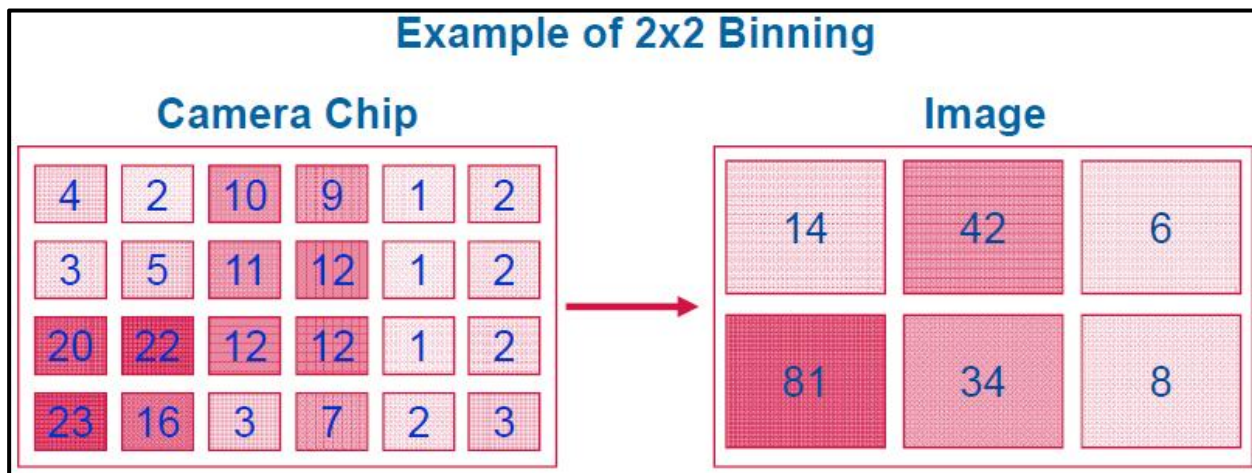


3) 在 **Configure** 下选择 **Objective and Camera**。

4) Magnification 下拉框选择要用的物镜。Camera binning（像素融合）值为 1 时，得到的图像不发生像素融合，图像为 2048×2048 像素（IXM-C）；当值为 2 时，相邻的 2×2 个像素融合为 1 个，此时采集的图像为 1024×1024 像素。Acquisition Mode 下拉框选择宽场或共聚焦模式，共聚焦转盘一般有 60um pinhole，50um slit 及 42um pinhole 3 种，以配置而定。



像素融合示例：



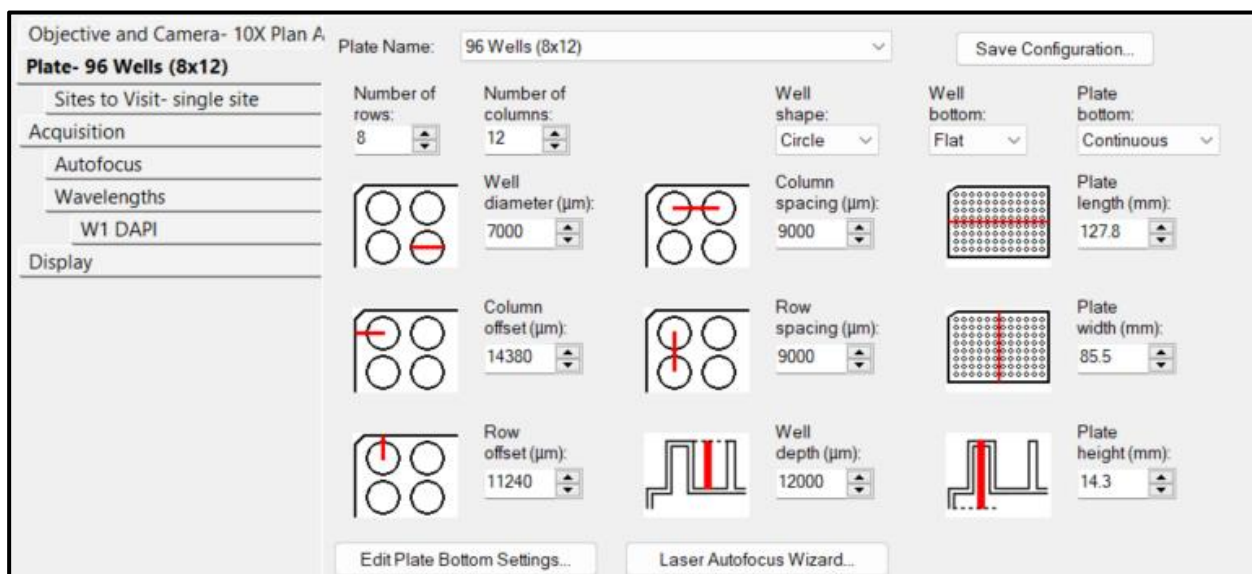
为什么要像素融合？

- A. 融合后每一个像素都变得更亮；
- B. 融合后每张图变为原先的 1/4（以像素融合值 2 为例）大小，占据的电脑存储减少；
- C. 图像从 MetaXpress 向 database 转移的更快，且图像分析的更快；

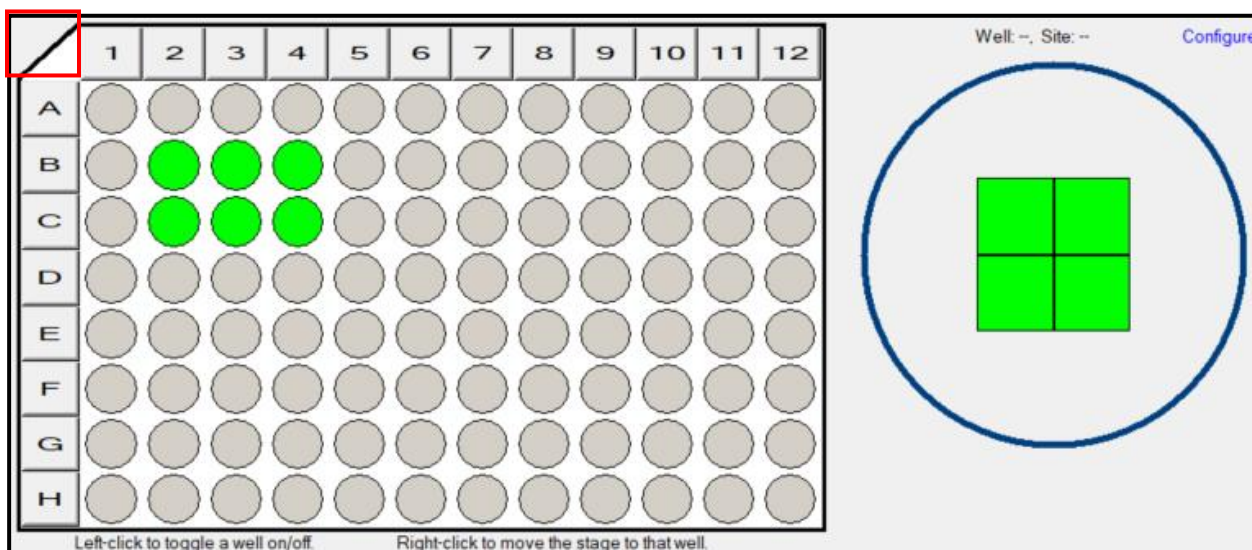
何时要像素融合？

- A. 不需要亚细胞结构，对图像的分析在细胞层面；
- B. 细胞计数及根据荧光 marker 进行细胞分类，统计细胞的整体 intensity 值。

5) 选择 **Plate**。在 Plate name 右侧下拉框选择要用的孔板或玻片类型。

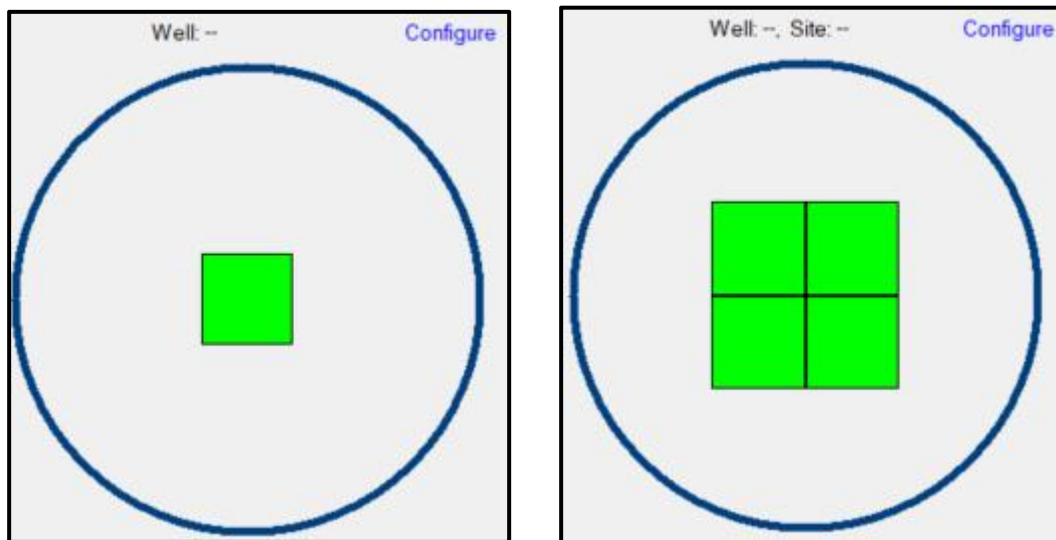


6) 此时在 **Configure** 上方显示所选孔板类型，鼠标左键拖动可选中要拍摄的孔（绿色），左上角可全选或全删除，也可以整行或整列选中或删除。



7) 选择 **Site to Visit**。Site Options 下选择 Single site 表示只拍摄孔中央单个视野。也可选择 Fixed number of sites 设定每孔多个视野。改变 Columns 及 Rows 可设定要拍的视野数。

Tile sites 为视野紧挨，不分离也不重叠；Fit sites to well 表示将视野分布到孔边缘；Overlap sites 10%表示视野重叠 10%。孔内的视野也可以鼠标左键选中及删除。

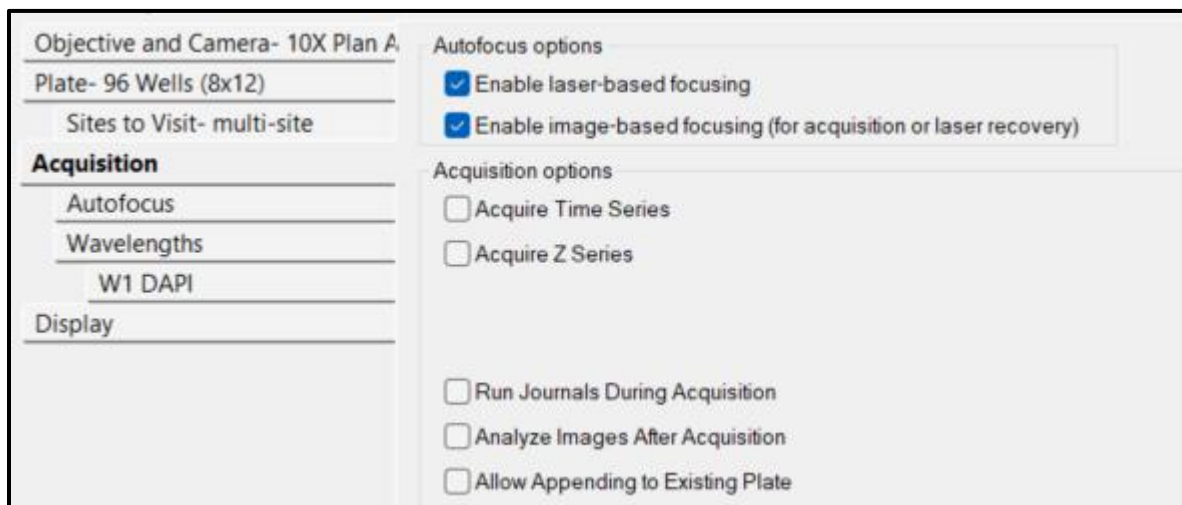


Objective and Camera- 10X Plan A	Site Options	☐ Custom field of view (%):	Well size: 38 mm ²
Plate- 96 Wells (8x12)	☐ Single site	X 100 Y 100	Number of sites: 4
Sites to Visit- multi-site	☒ Fixed number of sites	Site/image size: 1.40 x 1.40 mm	20.34% Well Coverage
Acquisition	☐ Adaptive acquisition		
Autofocus	☐ Multi-well		
Wavelengths	Acquires a fixed number of sites in each well		
W1 DAPI	Columns: 2	Spacing (μm) 0	Tile sites
Display	Rows: 2	0	Fit sites to well
			Overlap sites 10%

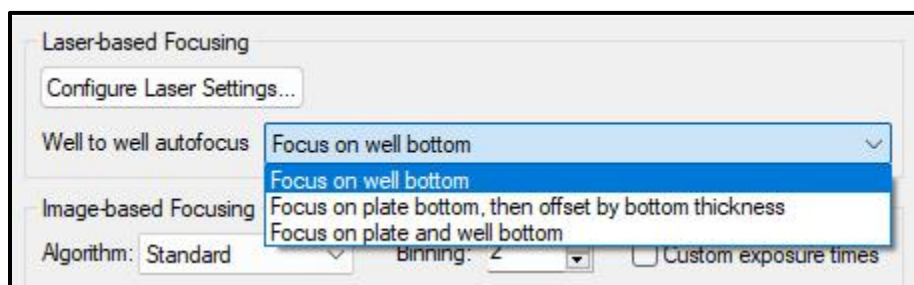
- **Tile sites** places sites edge to edge
- **Fit sites to well** spreads sites to well edge
- **Overlap sites 10%** overlaps edges of sites for stitching

8) 选择 **Acquisition**。右侧 Autofocus options 下 Enable laser-based focusing 表示激光自动聚焦；Enable image-based focusing (for acquisition or laser recovery) 表示基于图像的自动聚焦。两种对焦可以都选中，具体用哪种可根据后面的情况而定，不选中，后面则无法进

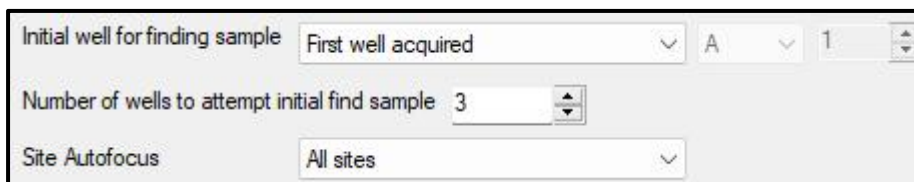
行相应的设置。Time Series 及 Z series 不在本章节讲解，可参考后续章节。



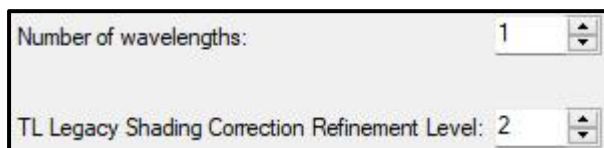
9) 选择 **Autofocus**。在 Well to well autofocus 下拉框选择相应的模式，Focus on well bottom 适用于 10×及更高倍物镜。Focus on plate bottom, then offset by bottom thickness 适用于玻片及薄底板等。Focus on plate and well bottom 适用于板底波动大的孔板。



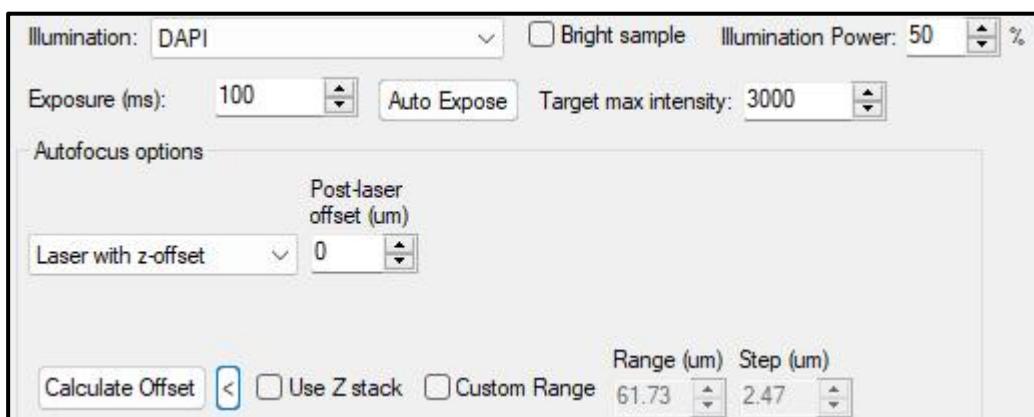
Initial well for finding sample 建议选择 First well acquired，能帮忙监测孔板是否已经放置，不适用于油镜。Number of wells to attempt initial find sample 设置为 3。Site Autofocus 建议选择 All sites，能聚焦的更好。



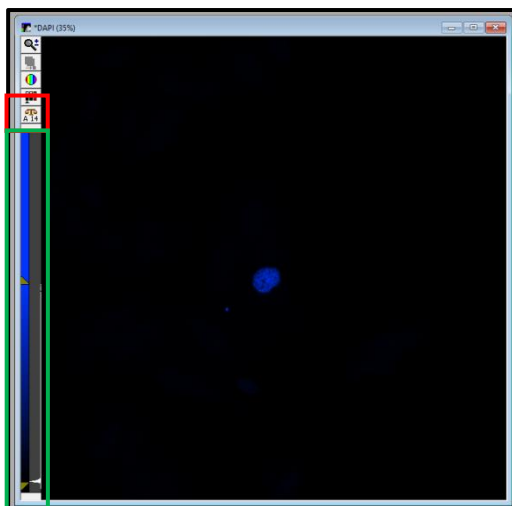
10) 选择 **Wavelengths**。在 Number of wavelengths 填入要拍摄的通道数：荧光和明场都算在内。



11) 选择 **W1**。在 Illumination 下拉框选择要拍摄的通道（TL 为 transmitted light 的缩写，代表透射光，即明场）。Illumination Power 代表光强调整为最大光强的百分比。点击 Calculate Offset，找最佳焦面，即确认 Post-laser offset 值，可以勾选 Use Z stack 来人为确认最佳焦面，如果未找到最佳焦面，还可以勾选 Custom Range，调整 Range 及 Step，来扩大最佳焦面的搜寻范围。



摸索合适的曝光时间。点击 Focus **Focus**，拍摄的图像可用来判断是否过曝。红框内数字最大为 16（16bit），小于 16 则没有过曝。数字为 16 时，查看绿框内白线长度，建议不超过总长的 50%，如果打到 100%，则代表过曝。

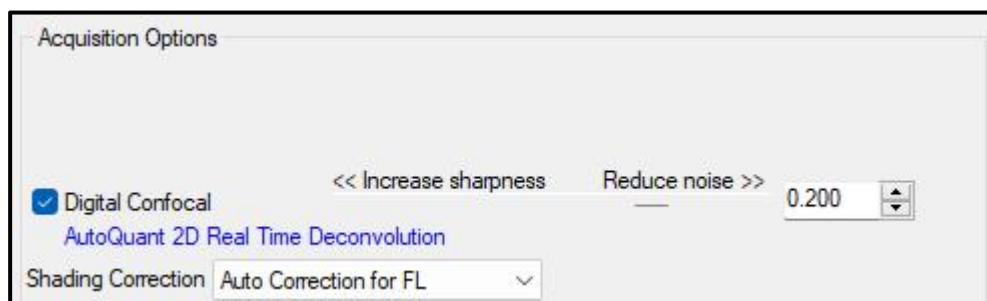


按照上述方法设置其余 wavelengths。

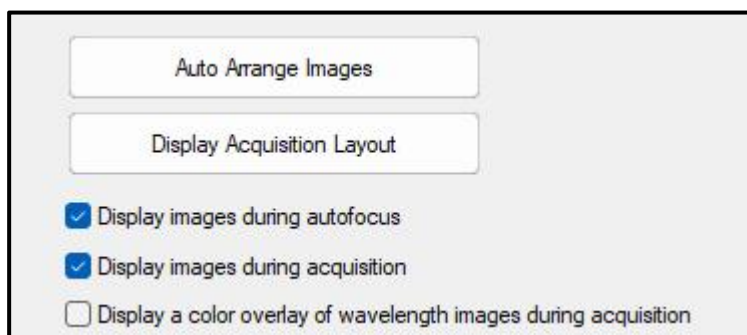
注：可以多试几个孔的样本，确保曝光时间是合适的。



12) 勾选 Digital Confocal。启用数字共聚焦，可打开 Start Live 模式，在 Increase sharpness 和 Reduce noise 之间滑动滑动条确定最佳的 k value。



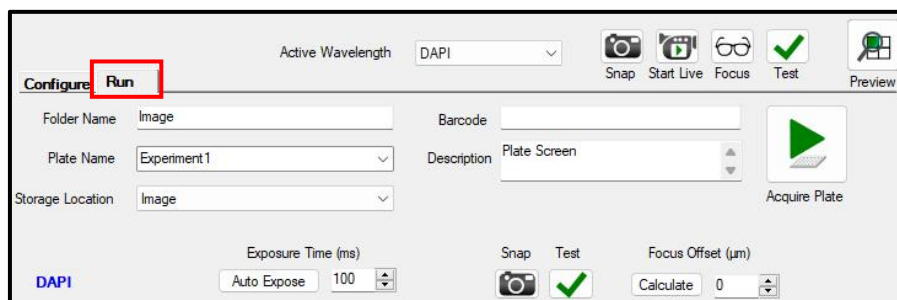
13) 选择 **Display**。默认勾选 Display images during autofocus 和 Display images during acquisition 方便查看对焦结果及拍摄结果。点击 Display Acquisition Layout 可以设置拍摄时图像的布局，不至于互相遮挡，并方便查看拍摄进度。



14) 选择 **Run**。在 Folder Name 输入要存储图像的文件夹，Plate Name 输入此次拍摄孔板的名称，Description 可用于描述实验。之后点击 Acquire Plate



Acquire Plate，开始图像采集。





: 在当前的孔、视野、Active wavelength 及 Z 轴位置直接拍摄。



: 对当前的孔、视野、Active wavelength 及 Z 轴位置实时成像。



: 运行 autofocus 之后对当前的孔、视野、Active wavelength 进行拍摄。



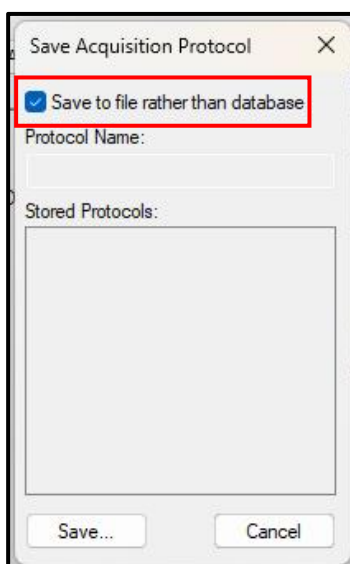
: 拍摄单层时同 Focus。拍摄 Z 轴时，拍摄各层面，然后展示 2D projection（2D 投影）的结果。



: 对所有通道进行 Focus，如果拍 Z 轴则 Test。

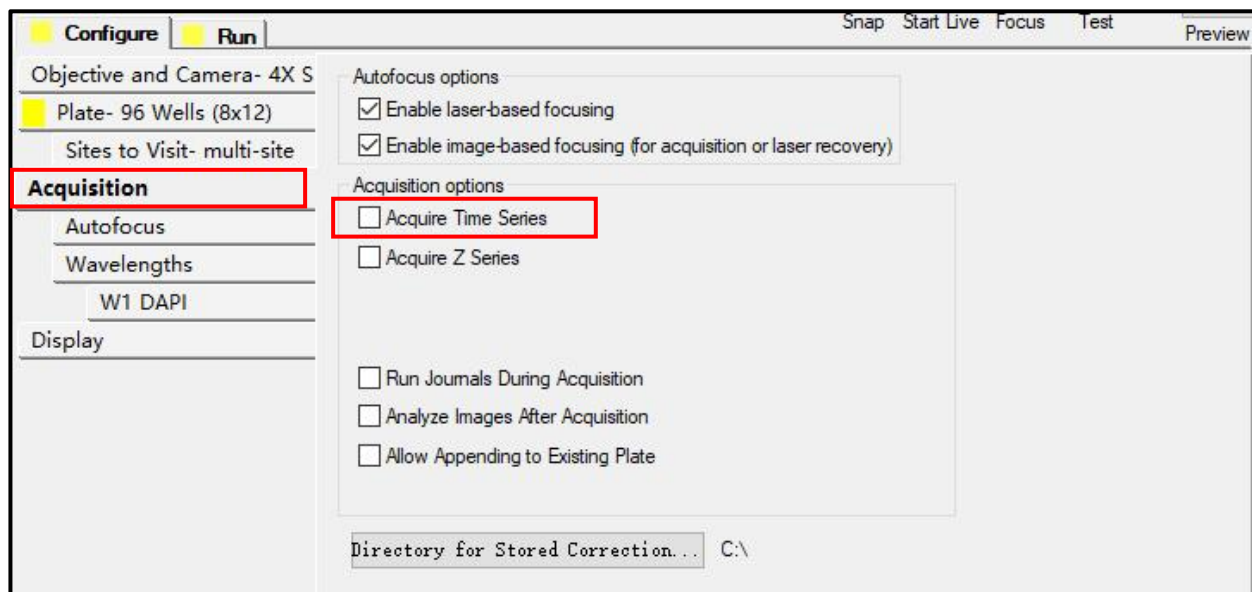


点击 Summary，可展示拍摄条件，可通过 print 将其保存为 pdf 文档。点击 Save Protocol 可将拍摄条件保存下来，建议勾选 Save to file rather than database，点击 Save，选择存储路径，保存为 protocol 文件。

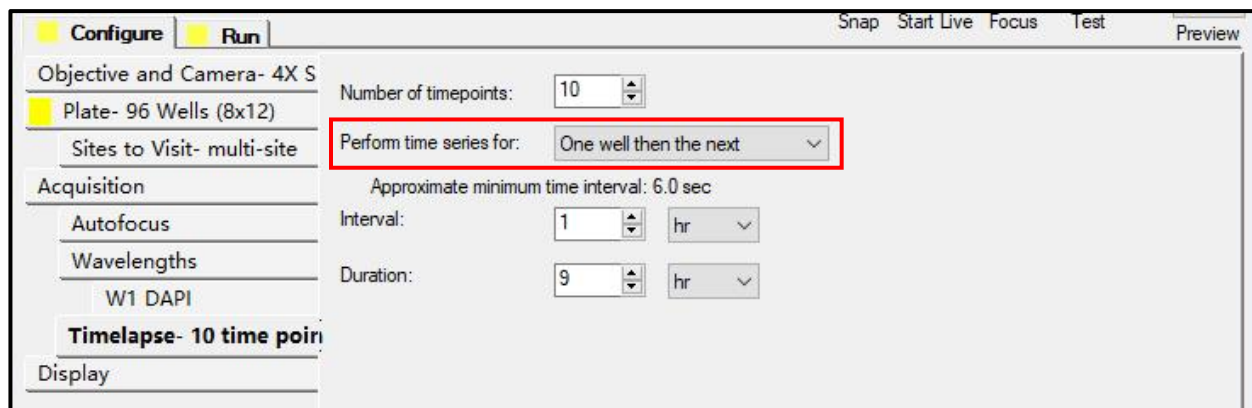


2. Timelapse 模式拍摄设置

1) 如需进行延时拍摄，点击菜单中的 **Acquisition**，并勾选 **Acquire Time Series**。

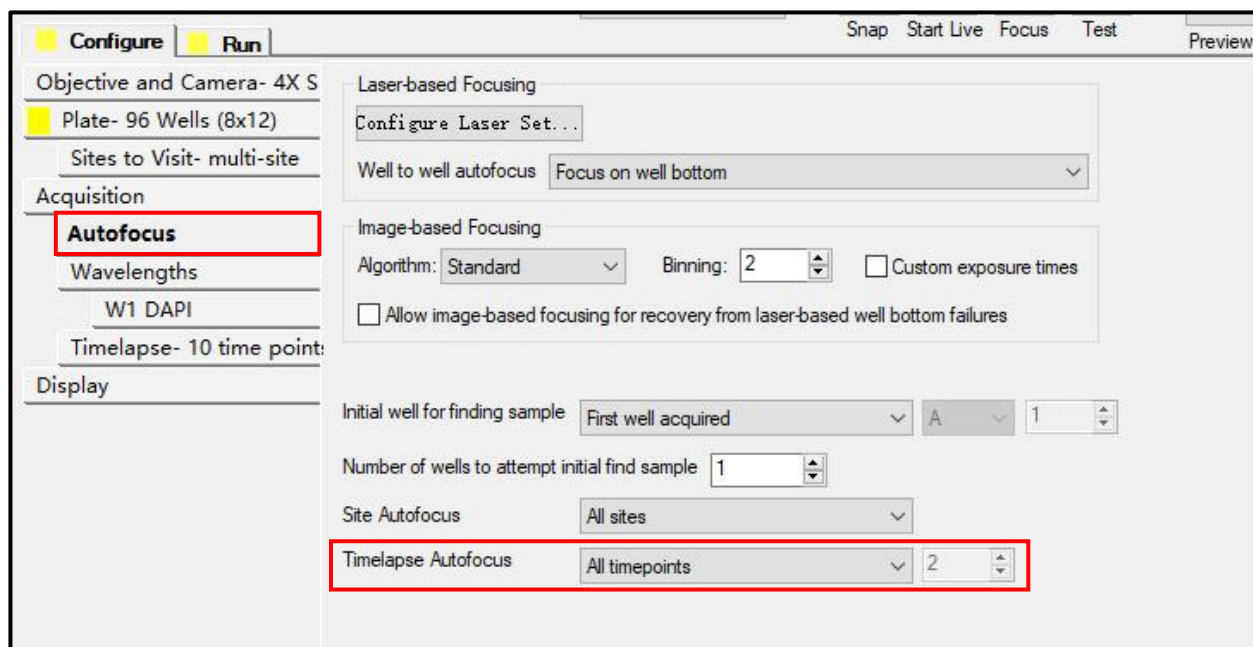


2) 菜单中会新增 **Timelapse**，点击并填写 **Duration**（拍摄总时长）和 **Interval**（拍摄间隔），下拉菜单可选择时间单位；**Number of timepoint** 会自动填写。



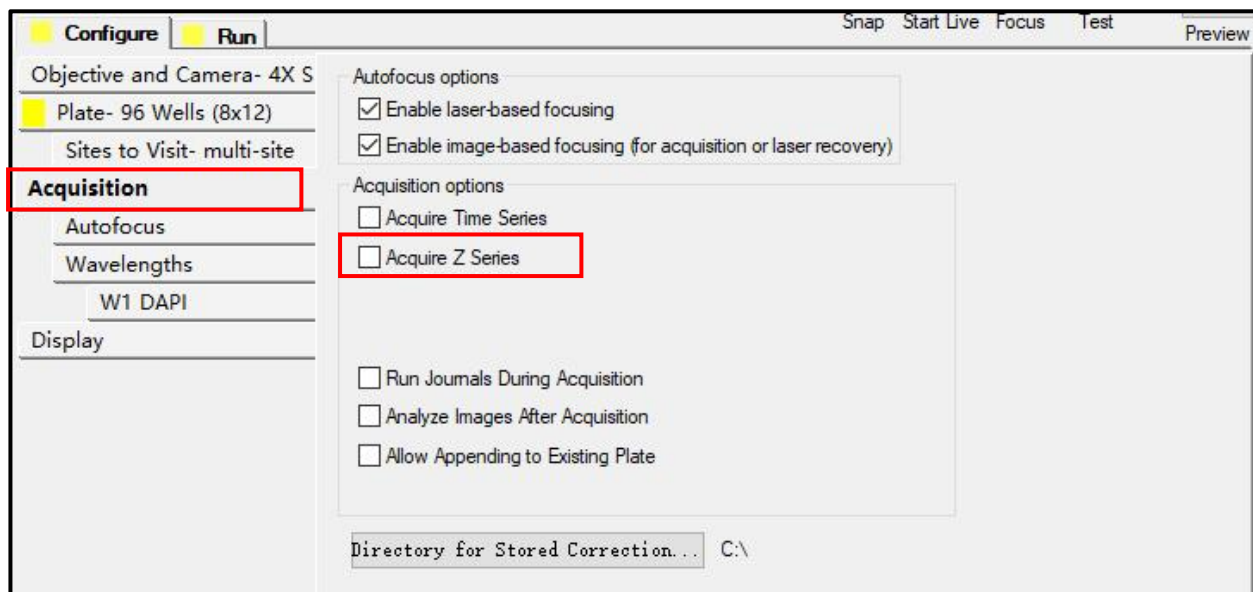
3) Perform time series for 通常选择 All selected wells，每个时间点会拍完所有被选择的孔，如果选择 One well then the next，则意味着每个孔拍完设置周期再开始拍下一个孔。

4) 点击 Autofocus，在 Timelapse Autofocus 下拉菜单中选择 All Timepoints，即每个时间点都会做一次激光自动聚焦以保证对焦成功率。

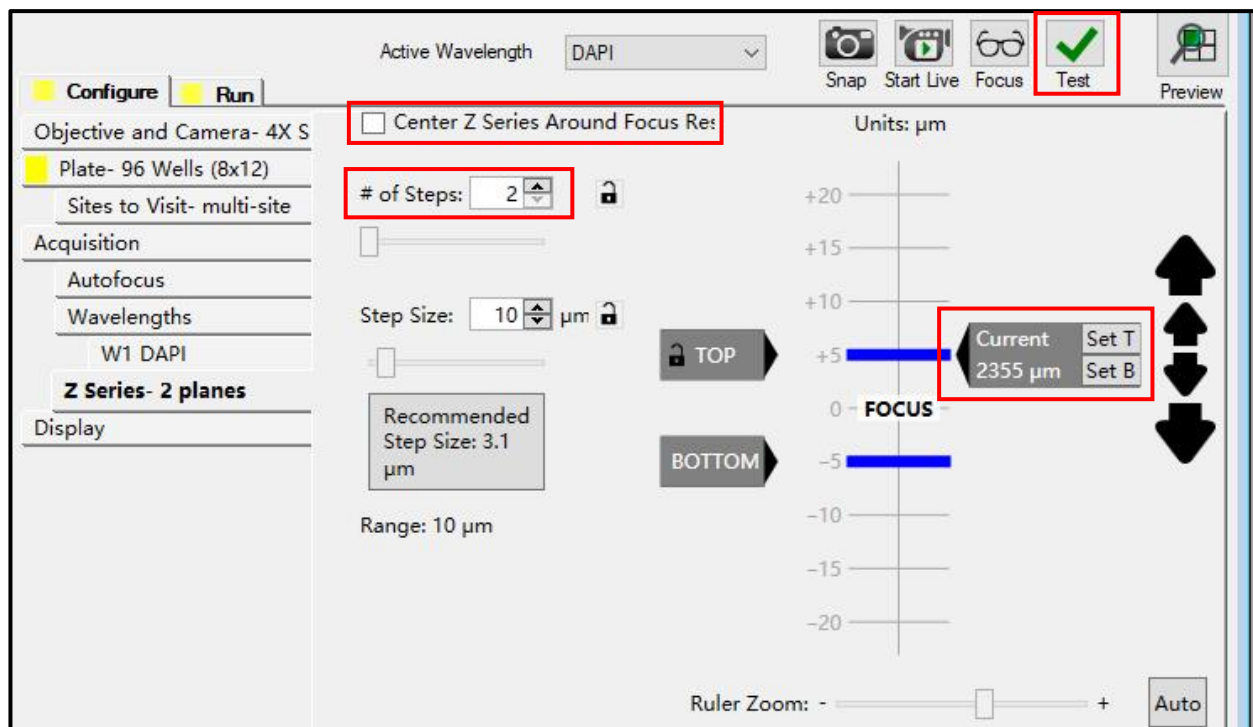


3. Z series 图像采集设置

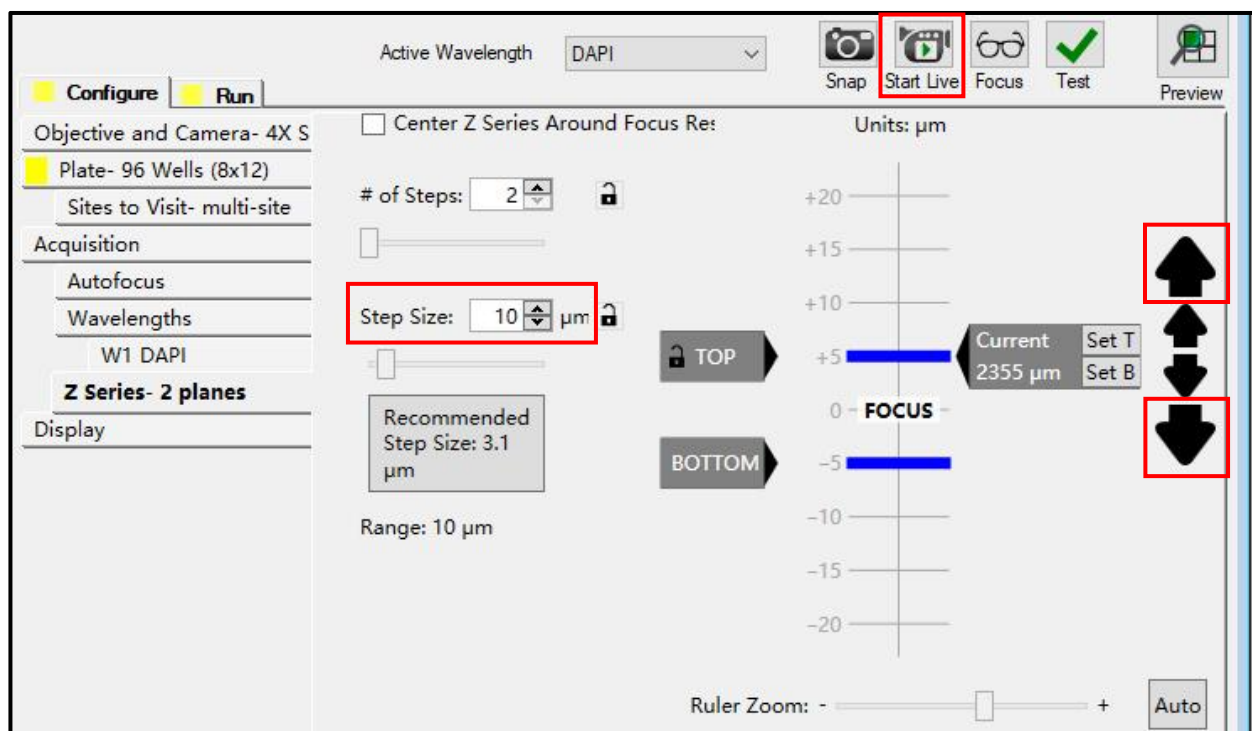
1) 如需进行 Z 轴层扫，点击菜单中的 **Acquisition**，并勾选 **Acquire Z Series**。



2) 菜单中会新增 Z Series，不要勾选 **Center Z Series Around Focus**，step 更改为 2，点击 **Test** 可以看到 **Set T/ Set B**。

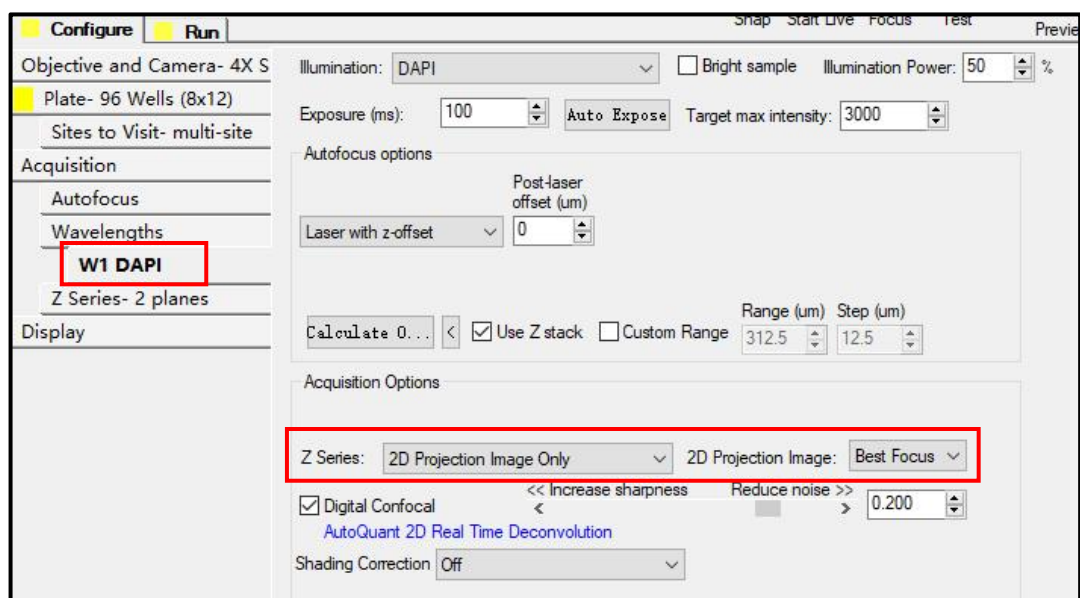


3) 设置 Step Size, 点击 Start Live, 调节上下键直至找到拍摄目标的 Z 轴上下限, 找到后分别点击 Set T 和 Set B, 此时 Steps 会自动填入相应的数值。



4) 点击 Start Live, 此时实时关闭, 选择视野点击 Test 可测试 Z stack 拍摄效果。

5) 点击通道, 选择 Z Series 的保存方式; 2D projection Image Only 即只保存一张投影图片, Z Series and 2D Projection image 即保存原始的每一层拍摄图像和投影图; 投影可选择算法, Best Focus 居多。

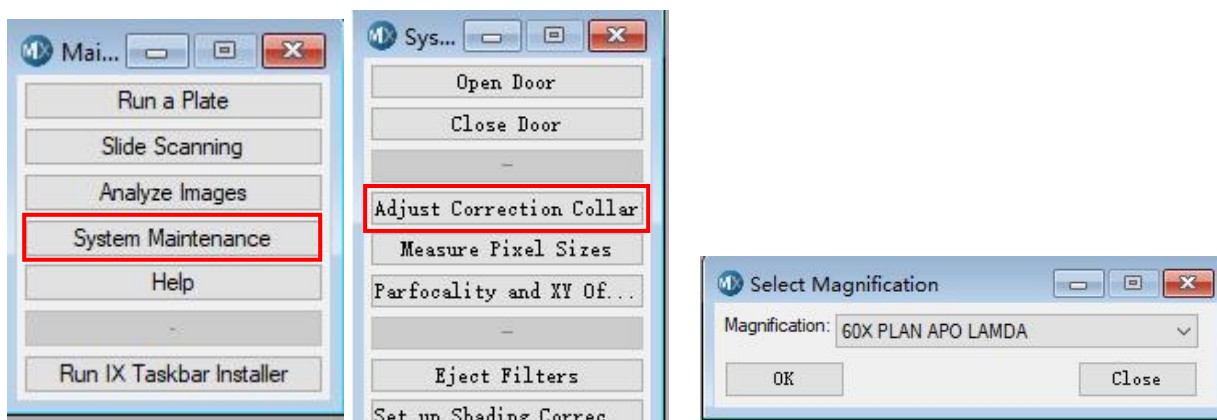


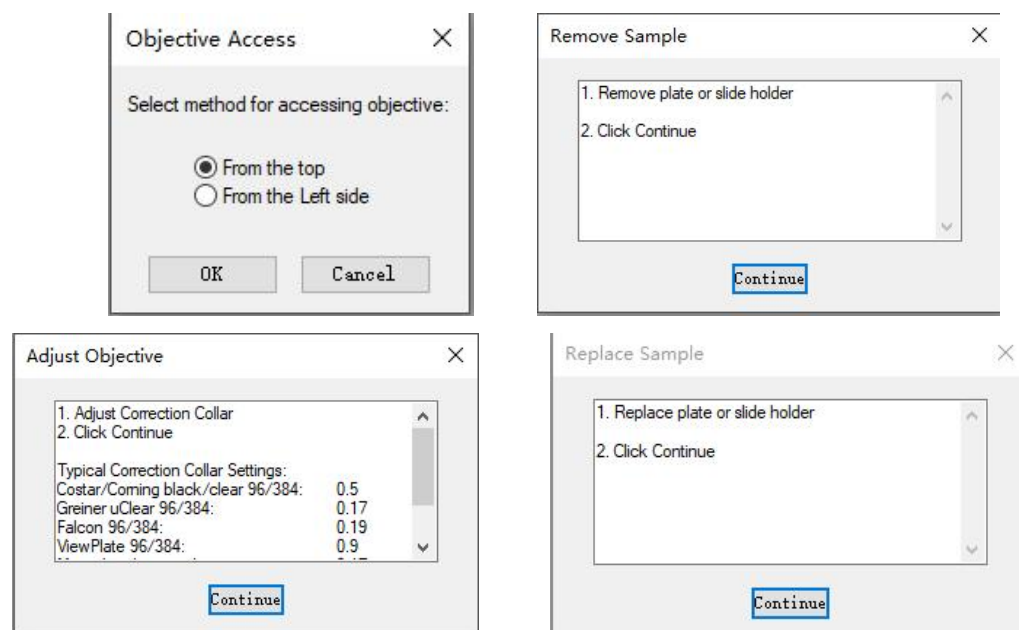
4. 校正环调节方法

20x 及以上的物镜可能涉及到校正环的调节，需要将校正环上的数值调节至微孔板的厚度，如微孔板物理厚度为 170um，则校正环需调节至 0.17，如下图



在 Taskbar 悬浮窗上点击 System Maintenance，随后点击 Adjust Corretion Collar。在弹出界面的下拉菜单里选择要调整的物镜，选择从顶部或侧面取出物镜，按照提示将载物台上的样本取出后再点击 Continue，此时要调节校正环的物镜会升高，逆时针旋转物镜后可将物镜取出，调整校正环至合适的数值，再将物镜装回至原位置（顺时针旋转直至拧紧），点击 Continue，放回样本，点击 Continue，提示框消失后可进行其他操作。





注：校正环应该调整到盖玻片或板底的物理厚度。这个可以咨询生产商。如果不能获得这个数据，可以通过激光自动聚焦测定双峰之间的距离，即光学距离，用光学距离乘以折射率即为物理厚度。对于玻璃来说折射率一般为 1.52，聚苯乙烯一般为 1.59。通常盖玻片的厚度为 170um，而载玻片 1000um 居多。

5. Laser Autofocus (LAF) Wizard 法设置多孔板参数

Laser Autofocus Wizard 的使用场景

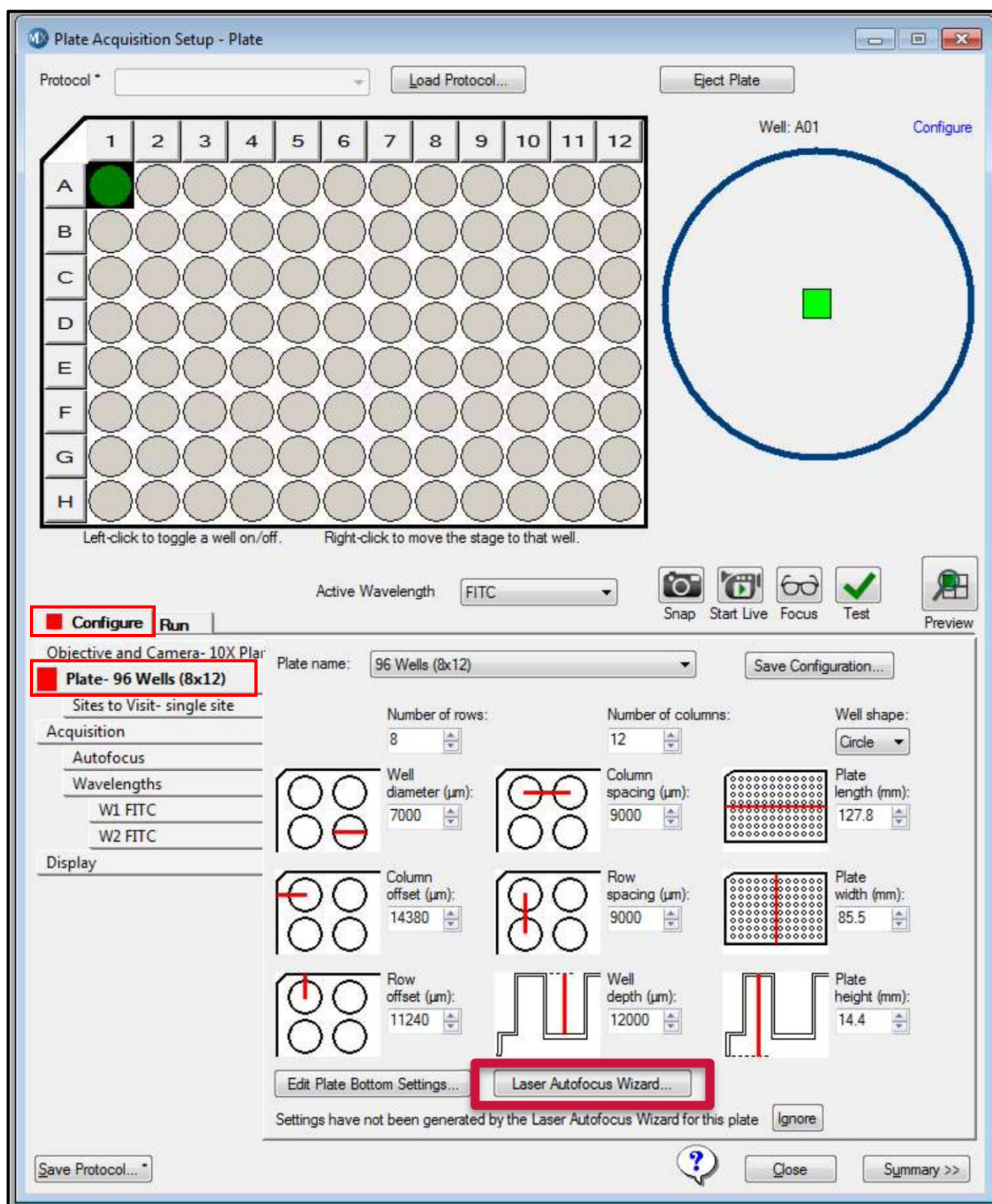
- A. 设置新板型
- B. 原有板型使用新物镜
- C. 某一板型第一次使用环境控制系统
- D. 当使用激光自动聚焦采集图像遇到问题时

准备条件

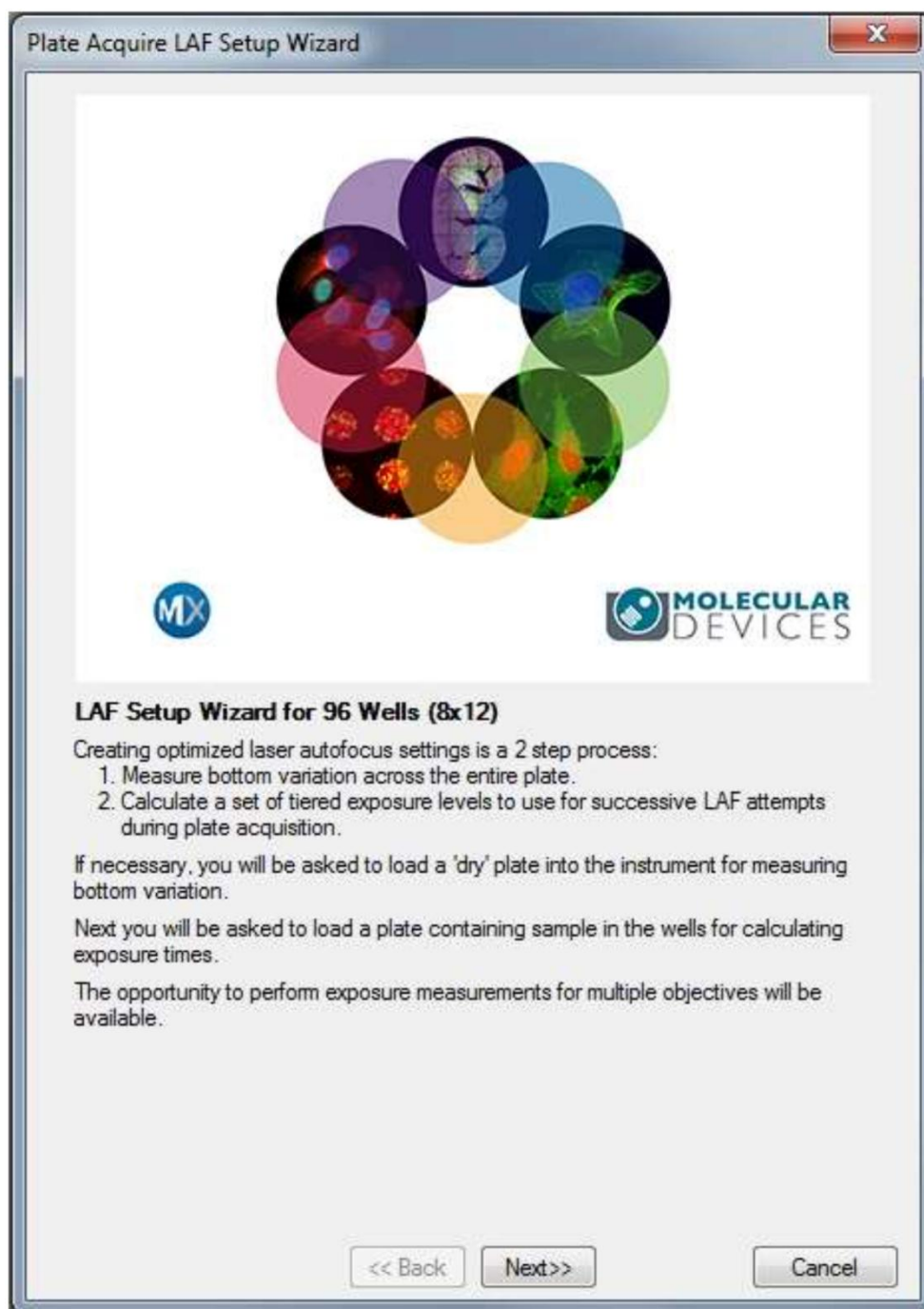
- A. 孔板参数
- B. 干燥的孔板
- C. 加培养基的孔板（培养基达到孔容积的一半）

运行 Laser Autofocus Wizard

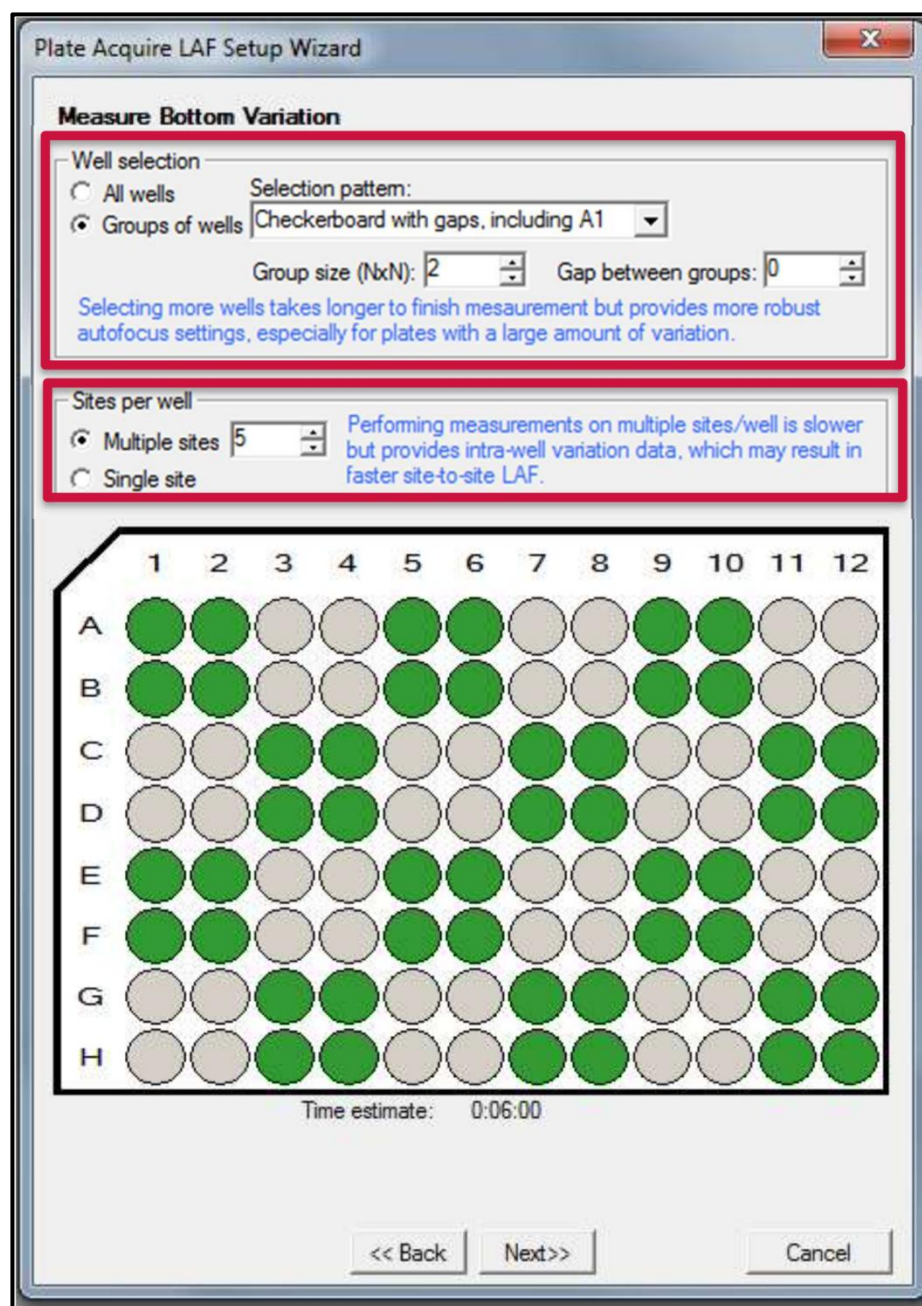
- 1) 打开 Plate Acquisition Setup, 在  或 Screening--Plate Acquisition Setup。
- 2) 在 Plate Acquisition Setup 界面选择 **Configure**, 接着选择 **Plate**, 然后在 Plate name 下拉框选择要设置的孔板。
- 3) 点击 **Laser Autofocus Wizard...**, 此时出现 **Plate Acquire LAF Setup Wizard** 界面。



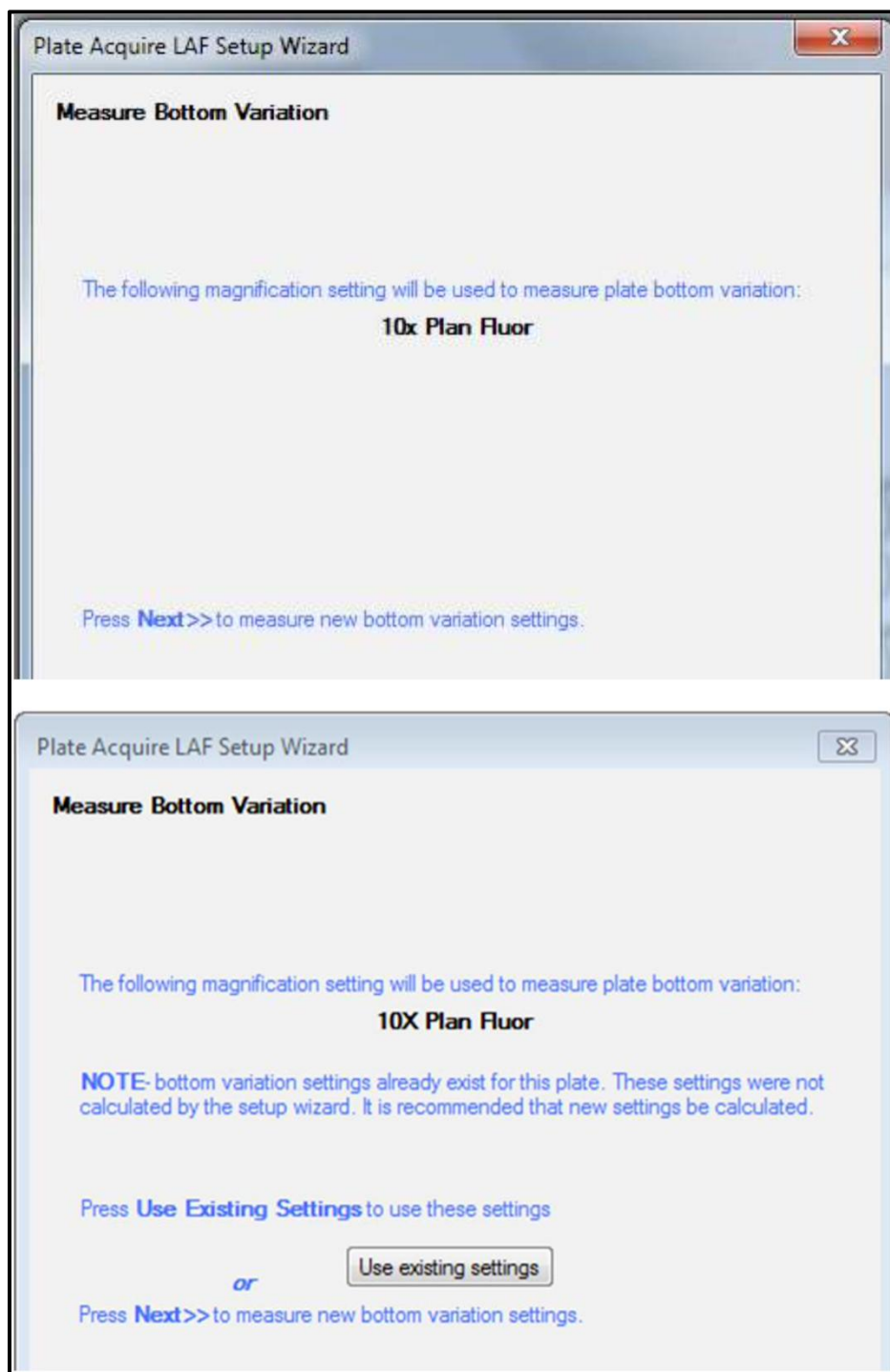
4) LAF Wizard 分为两个阶段，分别是 dry plate 和 wet plate 阶段。Dry plate 阶段用了测量板厚度及其平均值，还有一些 variation 值；wet plate 阶段则主要测定曝光时间，并找到板底和孔底。点击 **Next** 继续。



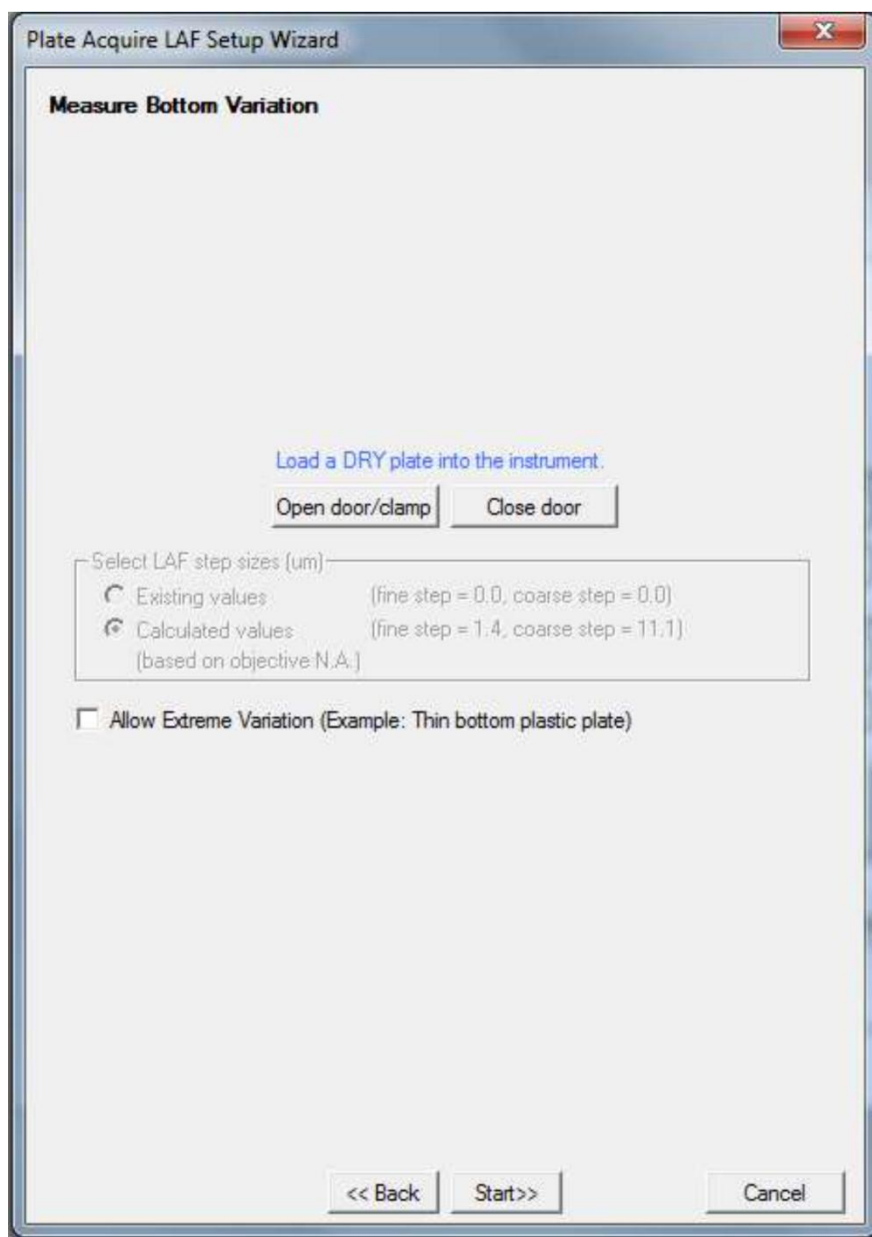
5) 接下来是设置 **dry plate** 的阶段。在 **Well selection** 下如果选择 All Wells 则测定的精准度最高，但是比较耗时。如果要较快的完成 LAF test，可以选择 Groups of wells，并在下拉框选择 **Checkerboard with gaps, including A1**，并设定 Group size 及 Gap between groups，要测定的孔会显示在下面的 plate map。在 Sites per well 建议选择 Multiple sites（这样能测到 intra-well variation），并将值设置为 5。接下来点击 Next。



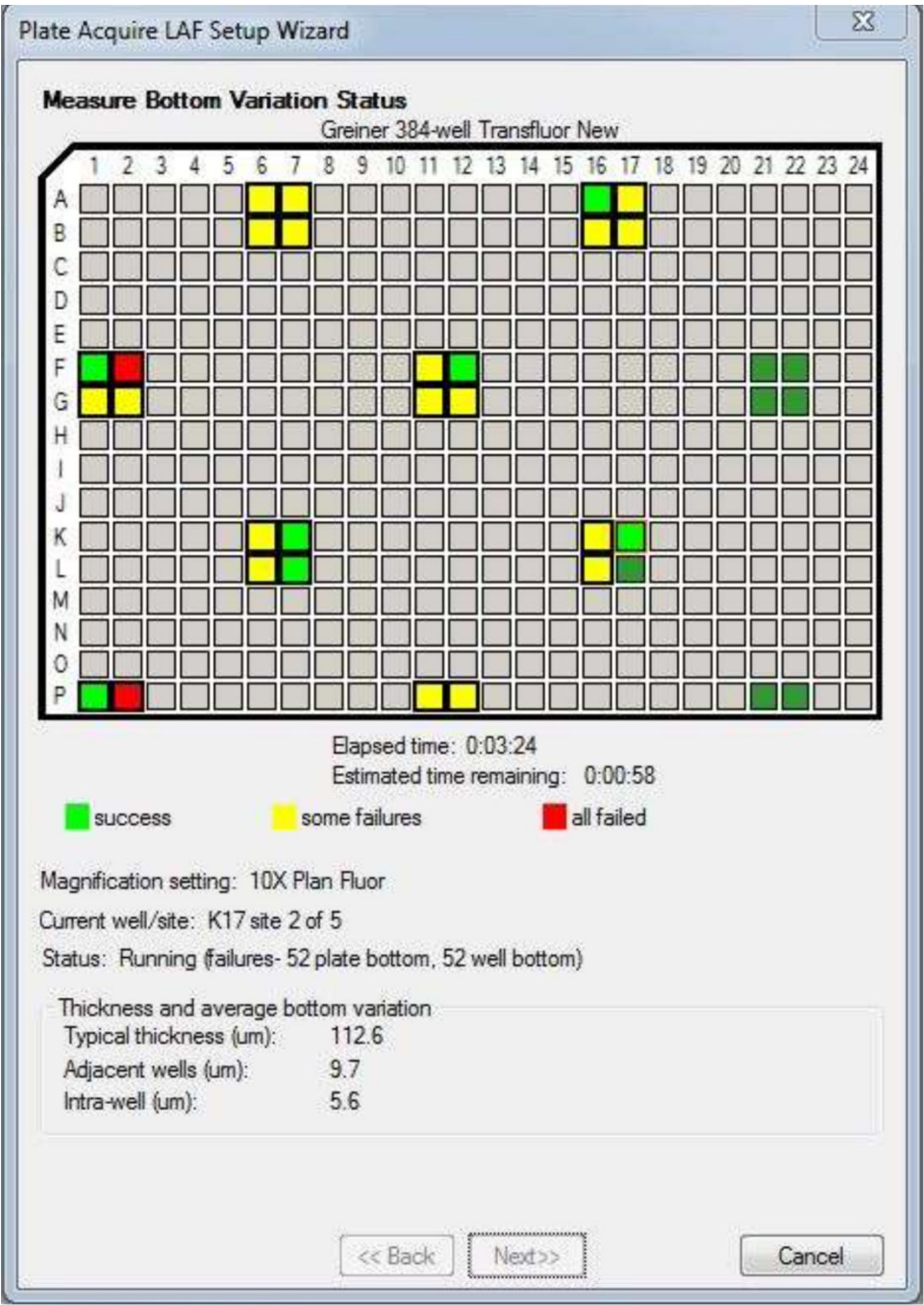
6) 情况一：第一次运行 **Laser Autofocus Wizard** 或者要重新计算 bottom thickness，直接点击 **Next**。情况二：之前运行过 **Laser Autofocus Wizard**，本次只是要设置新的物镜，可以点击 **Use existing settings**，这样将直接跳过 dry plate 阶段，进入 wet plate 阶段。



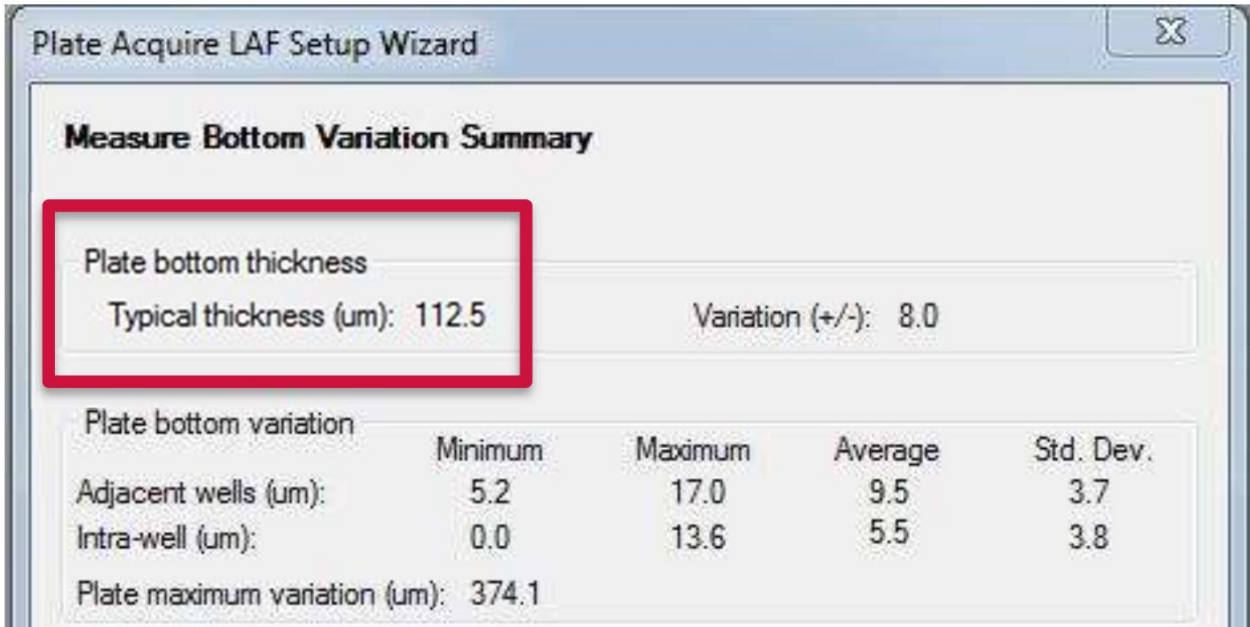
7) 如果是情况一，点击 Open door/clamp，打开舱门，放入 dry plate，点击 Close door，关闭舱门。选择 Calculated Values，不勾选 Allow Extreme Variation，点击 Start 开始。



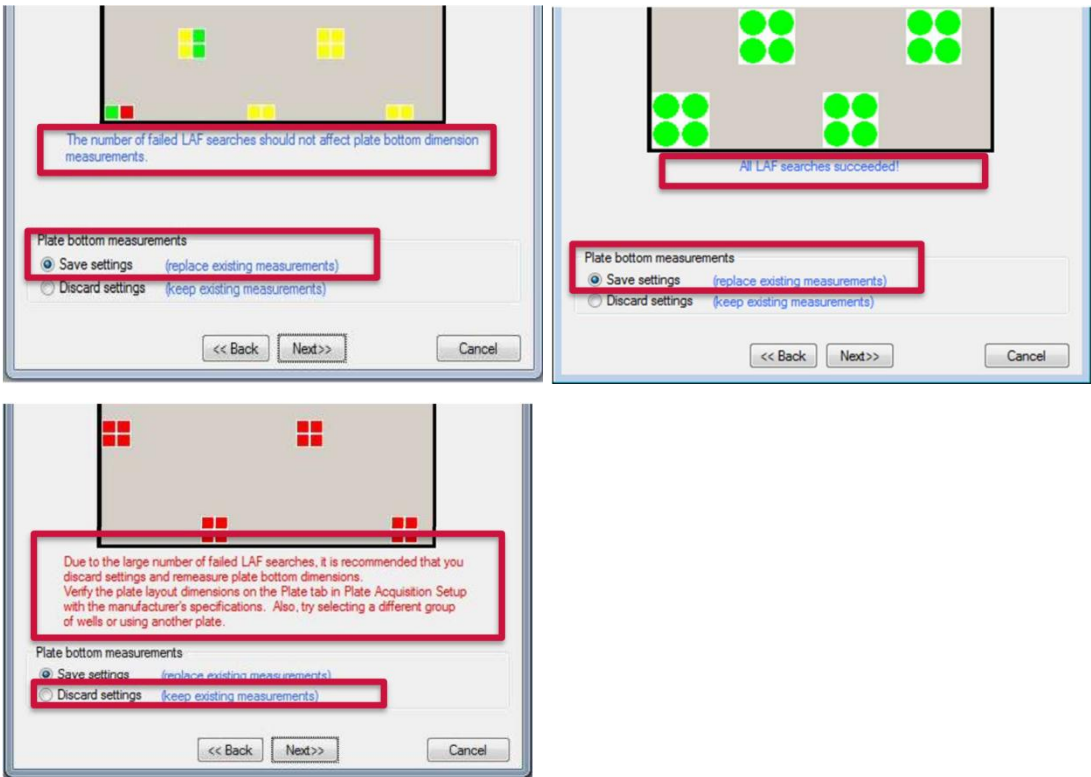
8) 此时显示 **Measure Bottom Variation Status** 界面，此时我们能看到已经运行的时间，大约剩余的时间，哪些孔所有 sites 都 success，部分 sites success 及全部 sites failed。



10) 运行结束后显示 **Measure Bottom Variation Summary**，我们能得知 bottom thickness 及一些 variation 值。

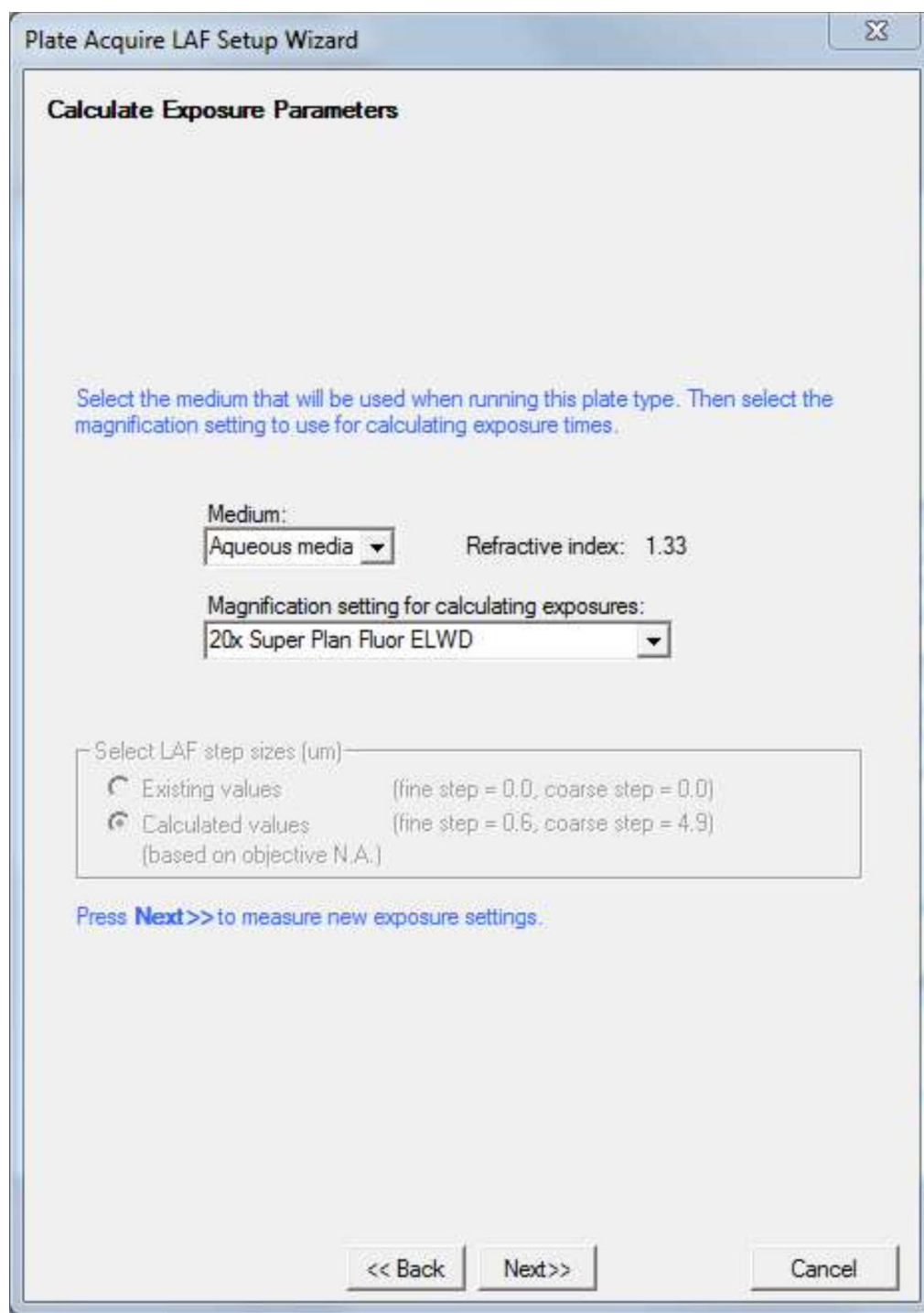


11) 另外，我们还能得知测定的结果是否能保证后续持续的对焦成功。如果结果可以接受，则下一步进入 wet plate 阶段，否则，放弃测定结果，重复测定或用其他方式解决 LAF 问题。

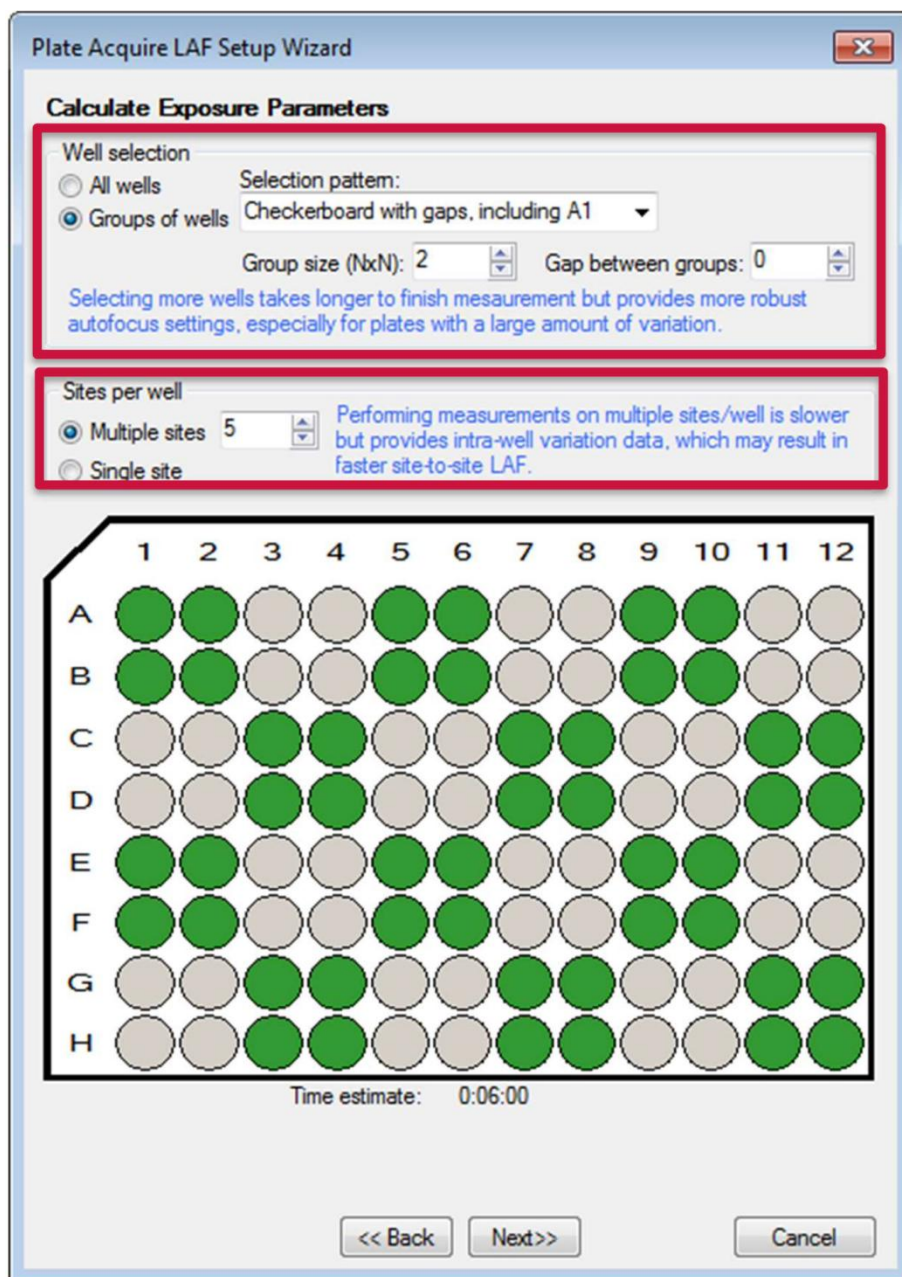


12) 如果 dry plate 阶段成功，则进入 wet plate 阶段。这一阶段将测定曝光时间，找到板

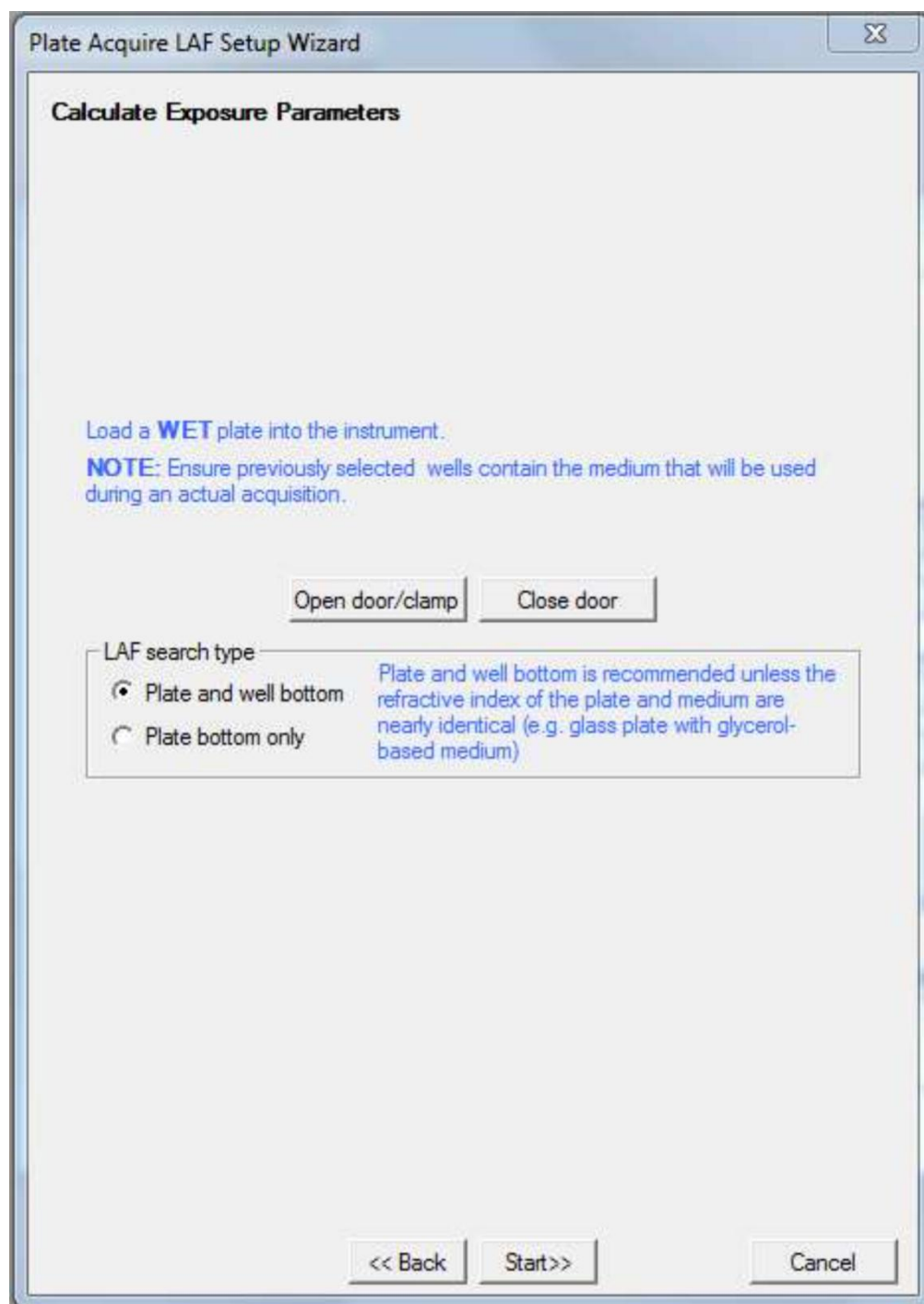
底及孔底，并且针对每一个物镜都要进行一次。在 Medium 下拉框一般选择 Aqueous media（水基培养基），接下来选择物镜，选择 Calculated values，并点击 **Next**。



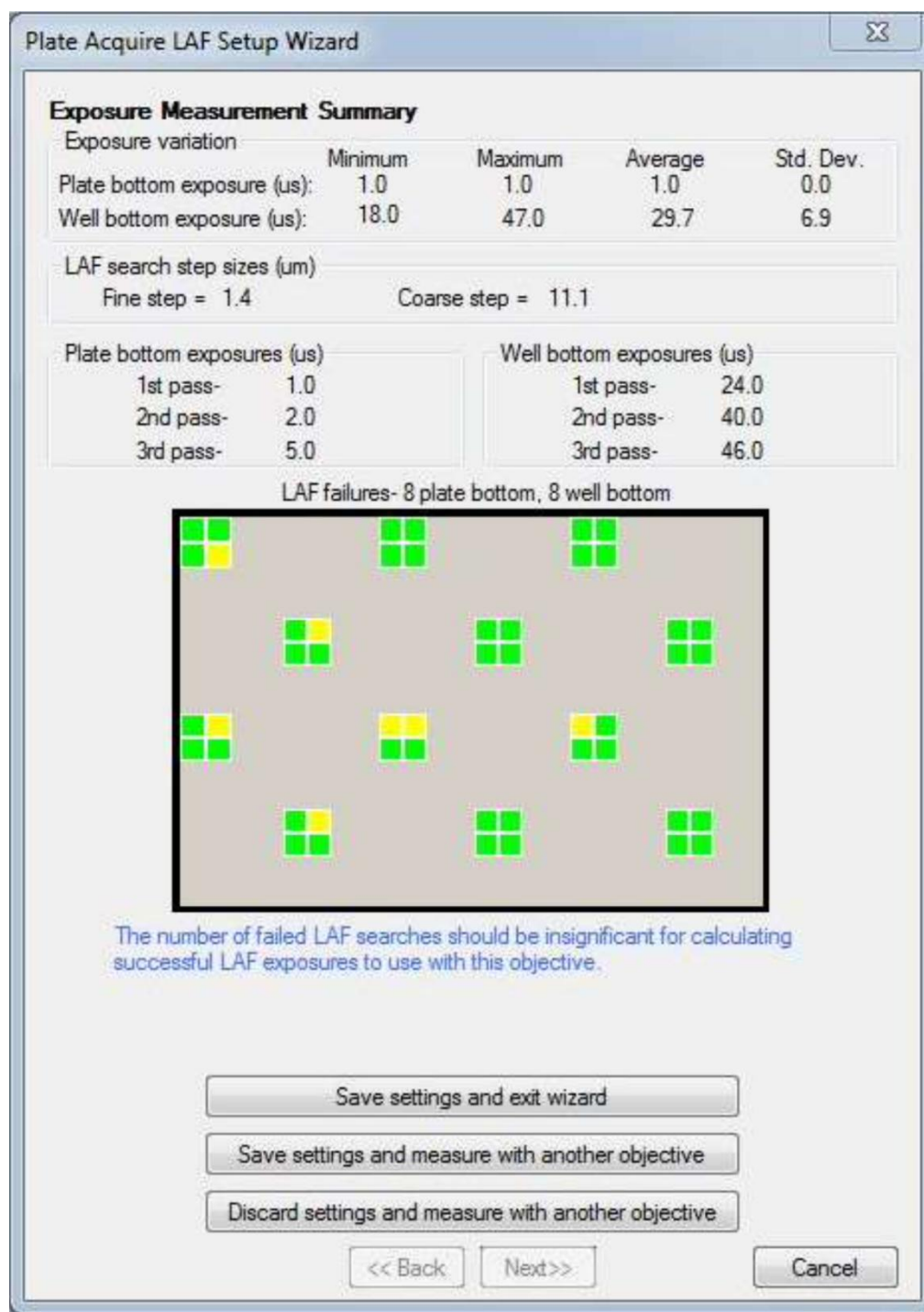
13) 接下来的 **Calculate Exposure Parameters** 界面的设定可参考步骤 5)，点击 **Next** 继续。



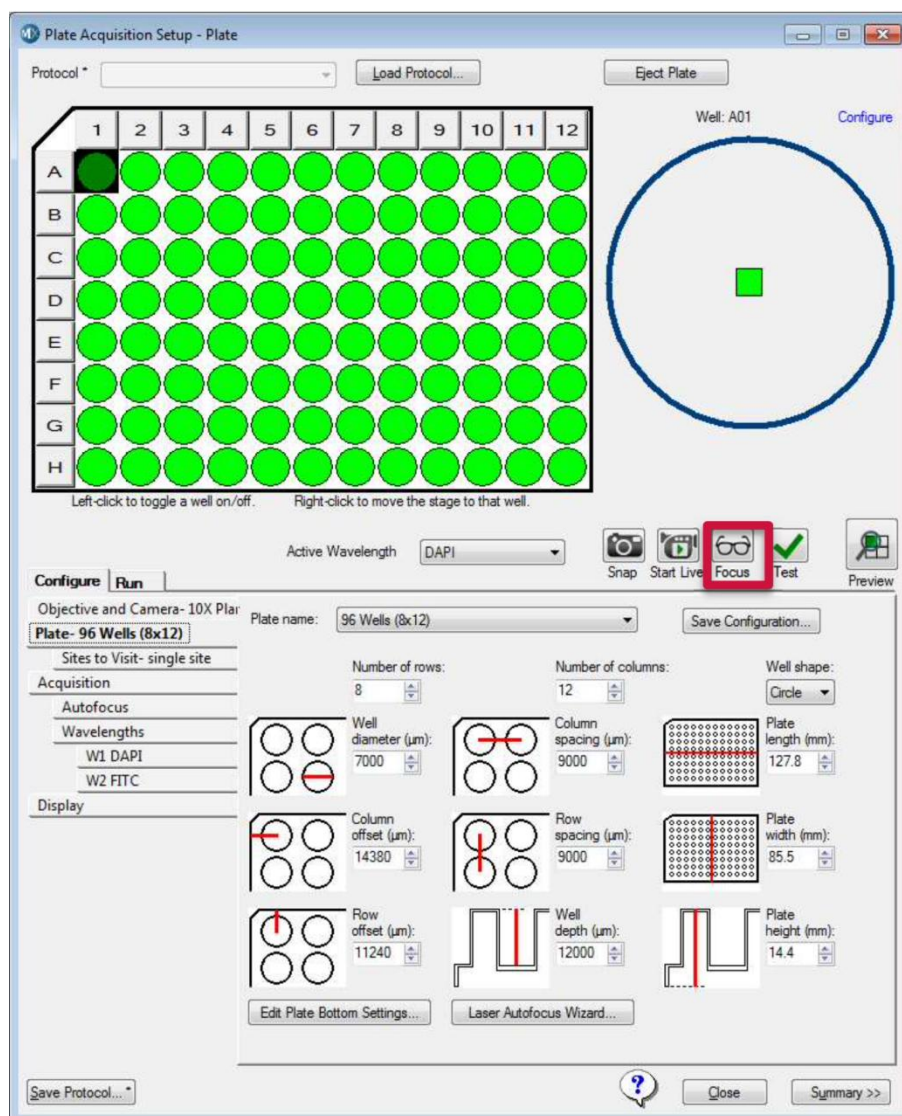
14) 接下来参考步骤 7) 放入带有培养基的孔板，在 LAF Search type 部分，如果是 10 倍及更高倍物镜选择 Plate and well bottom，如果是 1-4 倍物镜则选择 Plate bottom only。点击 Next 继续。



15) 在 **Exposure Measurement Summary** 界面，我们能得知测定结果是否能保证接下来持续对焦成功，如果结果没问题，则选择 **Save settings**，并退出或测定其他物镜。如果失败，则放弃测定结果，重复测定或用其他方式解决 LAF 问题。



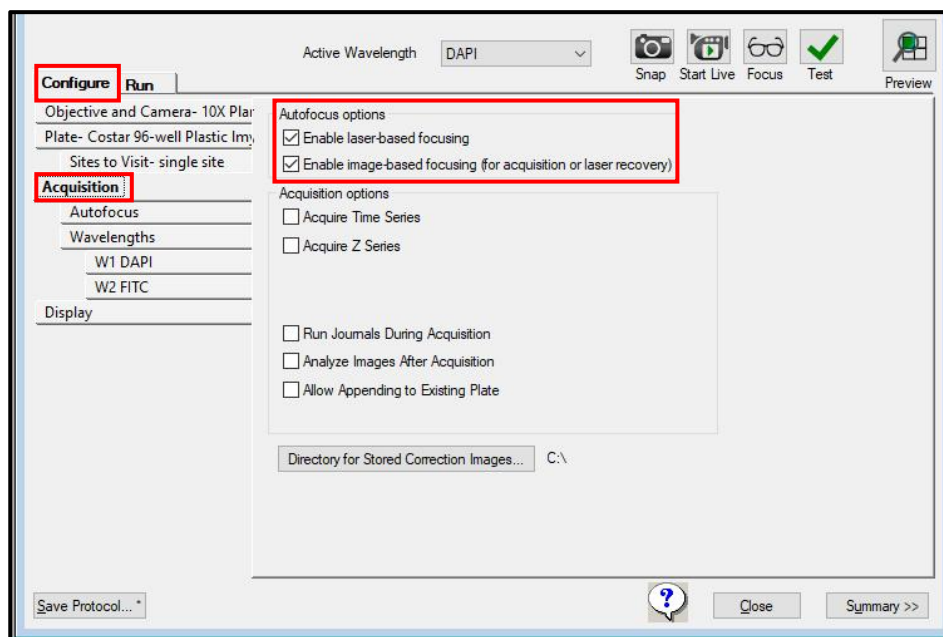
16) 检验 **Laser Autofocus Wizard** 是否运行成功的方法就是，设定好图像采集条件，右击选择一个感兴趣的孔，点击 Focus，能快速采集到一张有样本的图像。



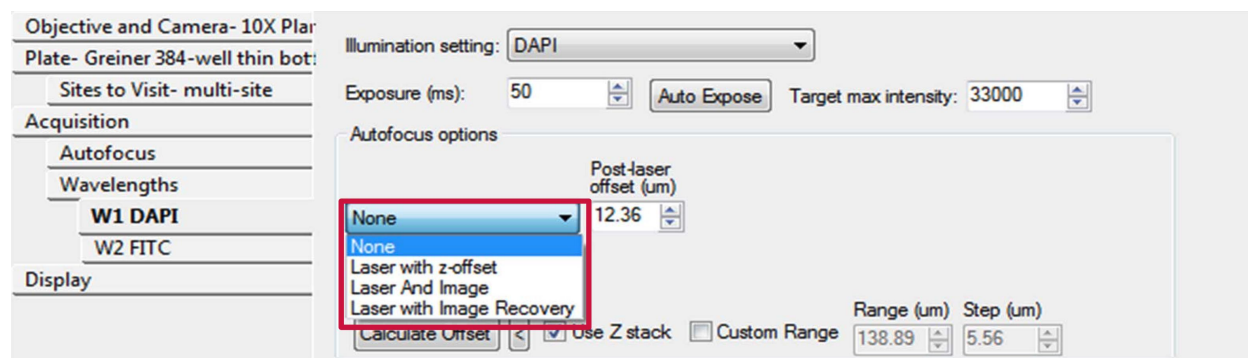
6. 激光及图像自动对焦的设置

激光自动聚焦

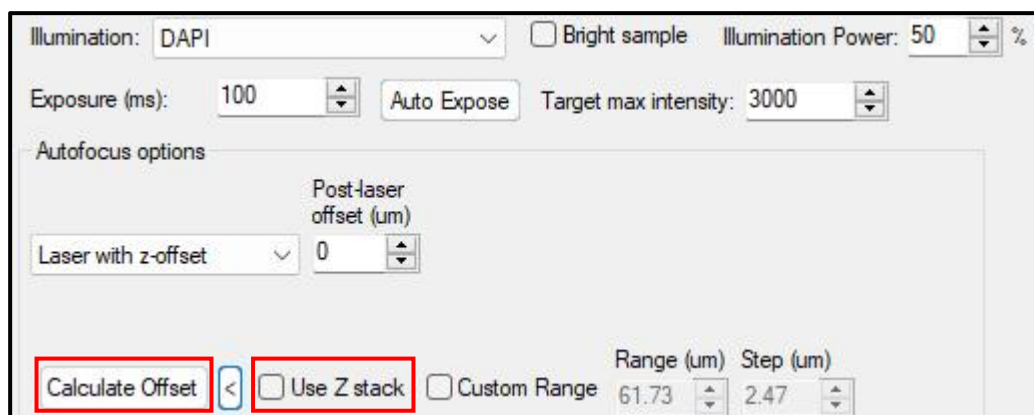
1) 在 **Configure** 下选择 **Acquisition**，建议在 Autofocus options 选项下把 Enable laser-based focusing 及 Enable image-based focusing (for acquisition or laser recovery)都勾选上。



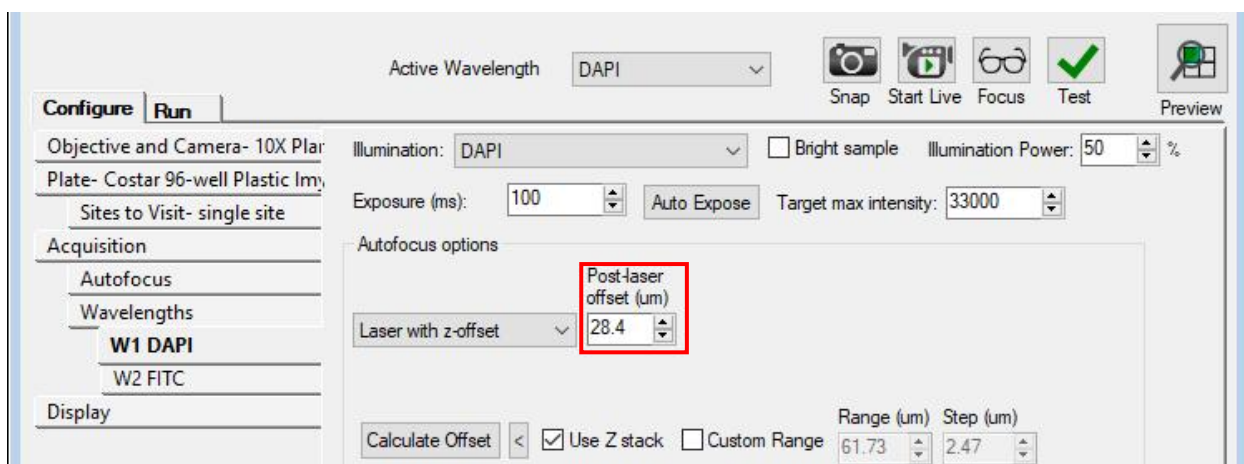
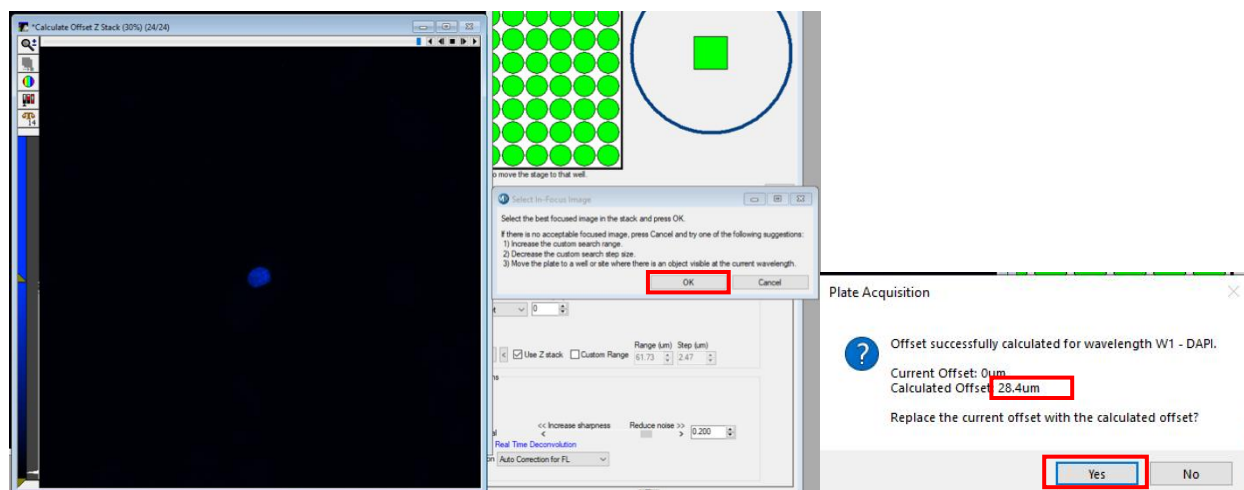
2) 切换到 **W1**，在 Autofocus options 下拉框处选择 **Laser with z-offset**，此时表示图像采集时仅运用激光自动聚焦模式。



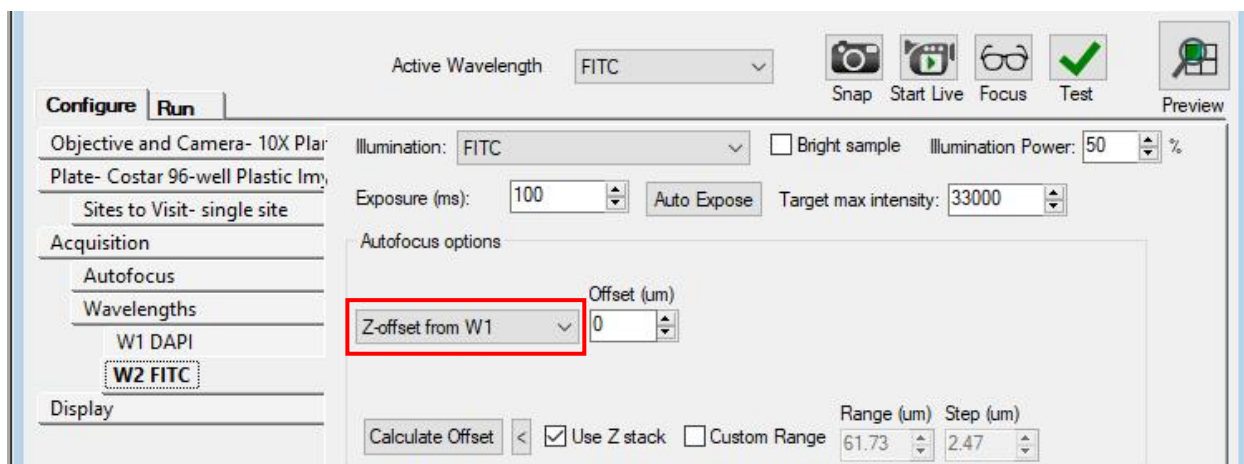
3) 不勾选 **Use Z stack**，此时点击 **Calculate Offset**，仪器可自动确认最佳焦面。



4) 如果要手动选择最佳焦面，可勾选 **Use Z stack** 后点击 **Calculate Offset**，此时仪器拍摄多层图像，手动选择最佳焦面后在 **Select In-Focus Image** 界面点击 **OK**，在弹出的界面点击 **Yes**，此时相应的 offset 值会自动填入 **Post-laser offset (um)**。



5) 其他 Wavelength 在下拉框选择 **Z-offset from W1** 并按照步骤 4) 方法计算出 Offset 即可。

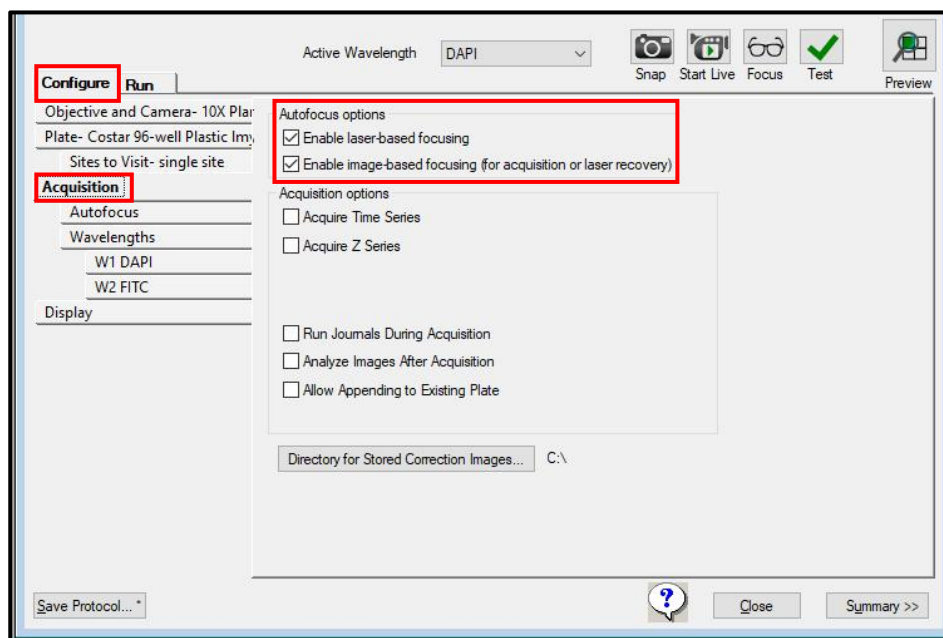


注：采用激光自动聚焦的方法仅在拍摄 W1 时启用激光自动聚焦搜索 well bottom，其余 wavelength 都会根据 W1 的聚焦位置及各自的 Offset 值进行拍摄，不需要再次聚焦。

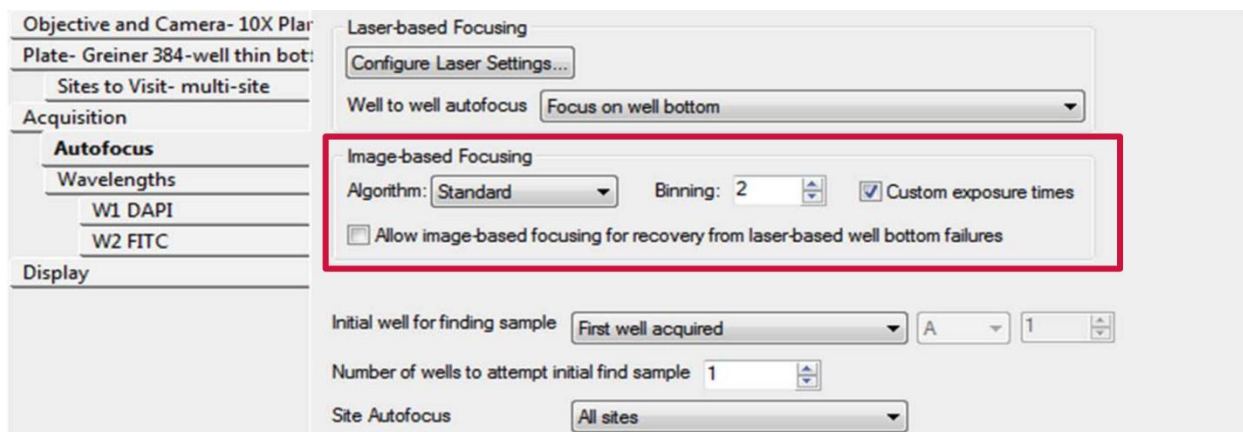
图像自动聚焦

图像自动聚焦主要应用场景是视野之间或孔之间 post-laser offset 值不一致，包括悬浮细胞，长在胶上或胶内的细胞，细胞无接触抑制叠加生长，组织切片及斑马鱼、线虫等小型模式生物的拍摄。

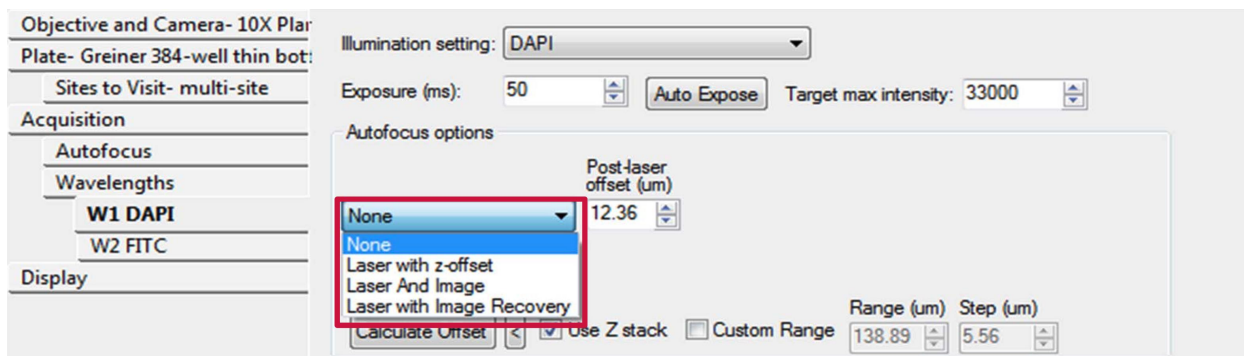
1) 在 **Configure** 下选择 **Acquisition**，建议在 Autofocus options 选项下把 Enable laser-based focusing 及 Enable image-based focusing (for acquisition or recovery)都勾选上。



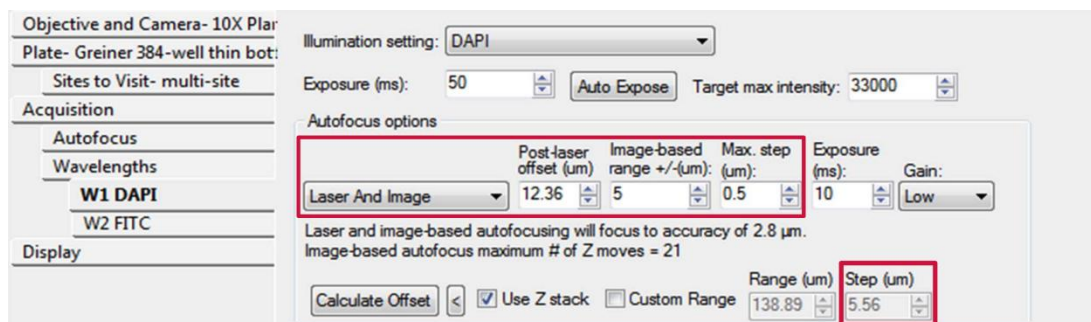
2) 选择 Autofocus, 在 **Image-based Focusing** 下, **Algorithm** 选择 **Standard**, **Binning** 值设置为 ≥ 2 (此处 Binning 值仅在图像自动对焦过程发挥作用)。勾选上 Custom exposure times, 这样可以设定图像自动聚焦时曝光时间。**Allow image-based focusing for recovery from laser-based well bottom failures** 可选择性勾选。



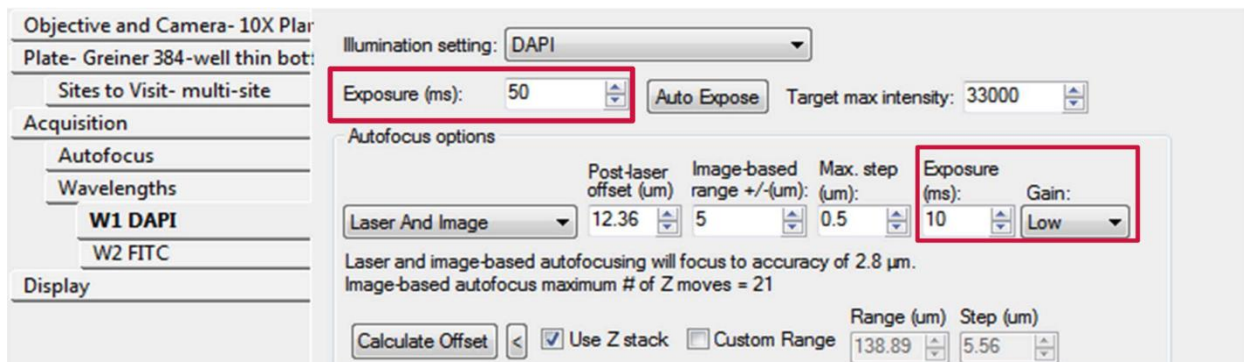
3) 切换到 **W1**, 在 Autofocus options 下拉框处选择 **Laser And Image**, 此时表示图像采集时先运行激光自动聚焦, 然后用图像自动聚焦模式找到最佳焦面。



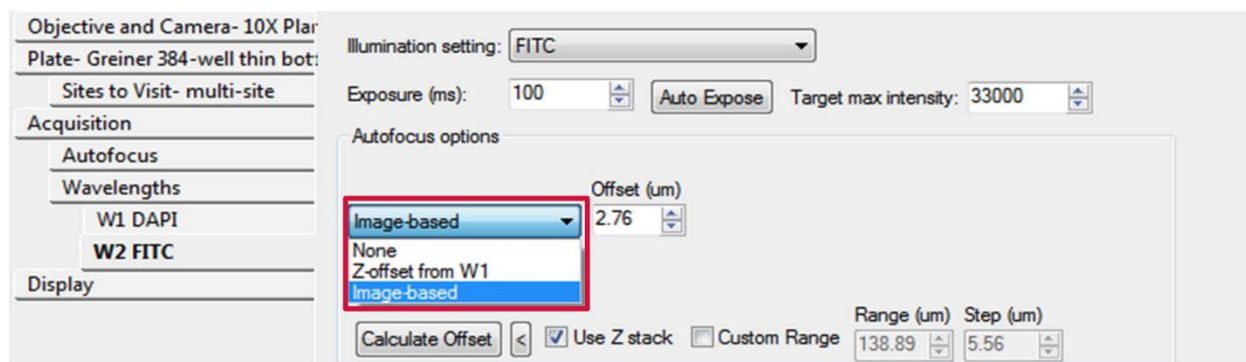
4) 如前面激光自动聚焦部分所述确认好 **Post-laser offset** 值, **Image-based range** 是 **Post-laser offset** 确认的焦面上和下各一段距离, **Max. step** 是各层之间的间距, 物镜放大倍数越大该值越小, 不要超过 25um。



5) 为了加速对焦过程, Exposure 值可以低于图像采集的 Exposure 时间, 如果图像采集的 Exposure 时间 < 50ms, 两者可以一致。将 Gain 设置为 High, 可以加速 autofocus。



6) 其余 wavelength 一般选择 **Z-offset from W1** 即可确认一个统一的 offset 值, 除非视野之间或孔之间 offset 值不一致才选择 **Image-based**, 这时按照以上步骤操作即可。



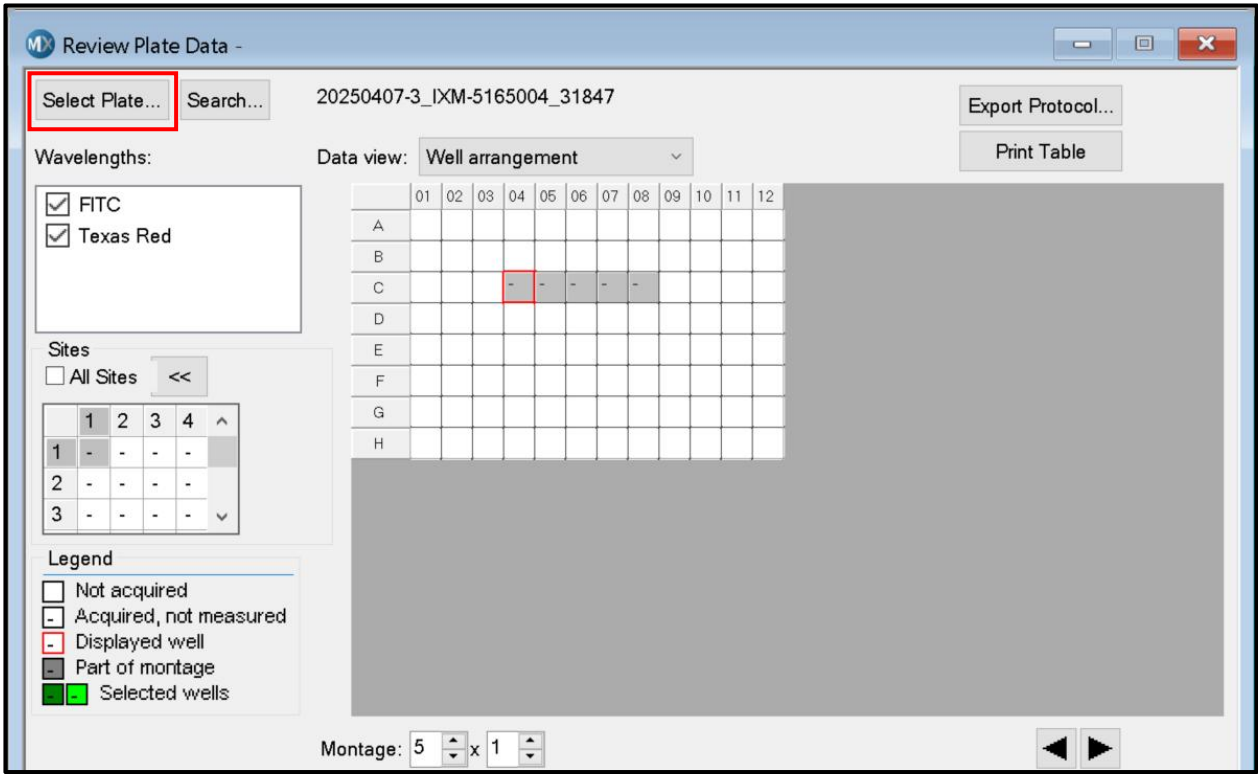
注：图像自动聚焦的**优势**在于应对各种不平的样本，保证各个视野的图像均不失焦。图像自动聚焦的**劣势**在于拍摄时间的延长，另外光漂白及光毒性的几率增加。

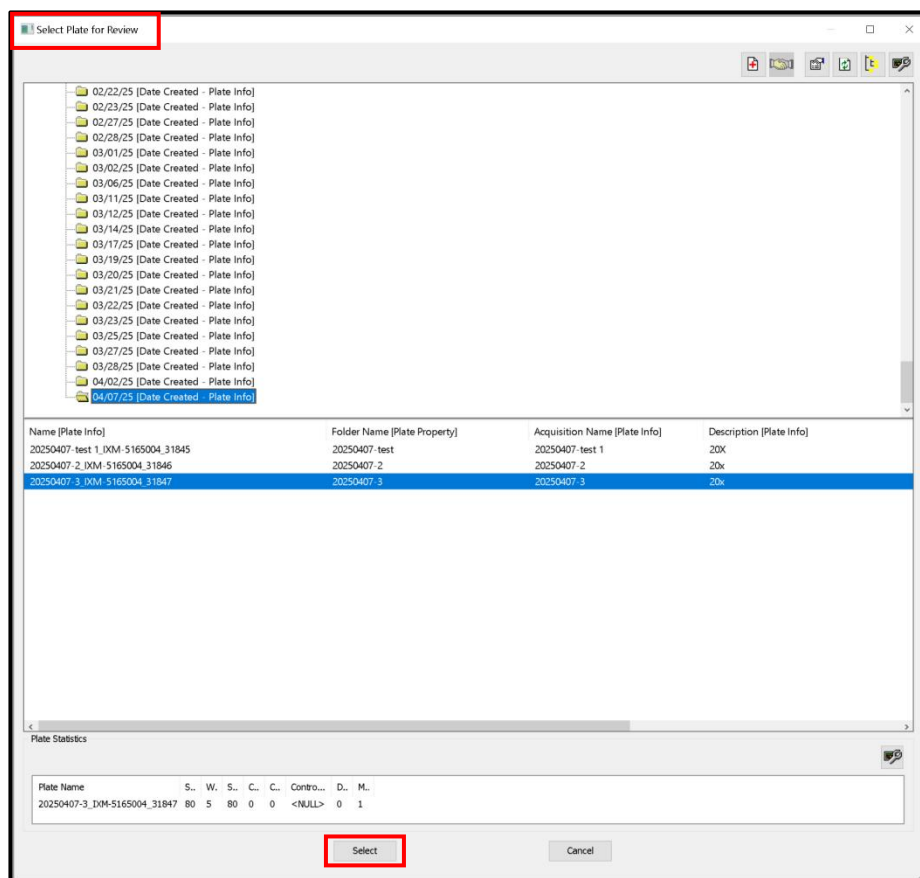
7) 设定好其余拍摄条件后即可进行图像采集。

三、图像处理

1. 图像的查看

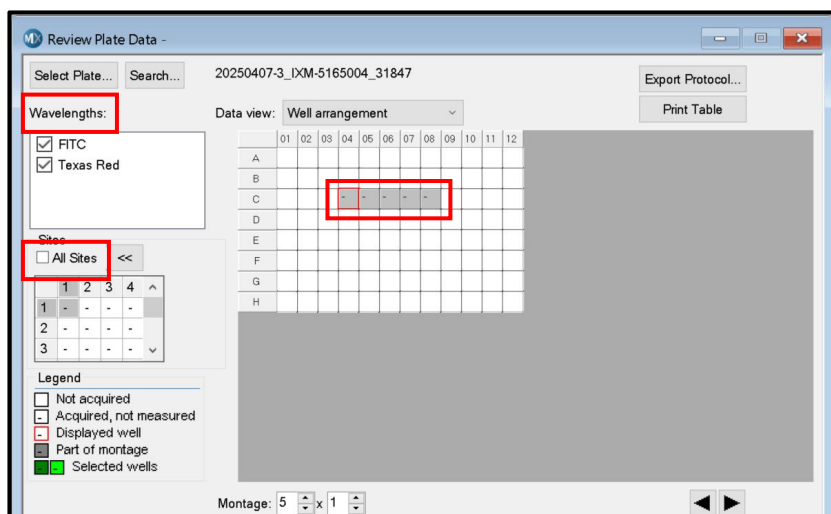
- 1) 打开 **Review Plate Data**，在主工具栏点击  **Review Plate Data** 或 Screening--Review Plate。
- 2) 在弹出的 **Review Plate Data** 界面，点击 **Select Plate** ，此时弹出 **Select Plate for Review** 界面，浏览文件夹，选择要查看的数据双击或点击 **Select** 即可打开。



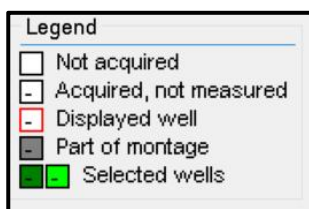


3) 在 **Review Plate Data** 界面左击或点左键连续选中某些孔，即可将这些孔内的图像缩略图拼接出 Montage，即一个图集。此时被选中的孔变为灰色。

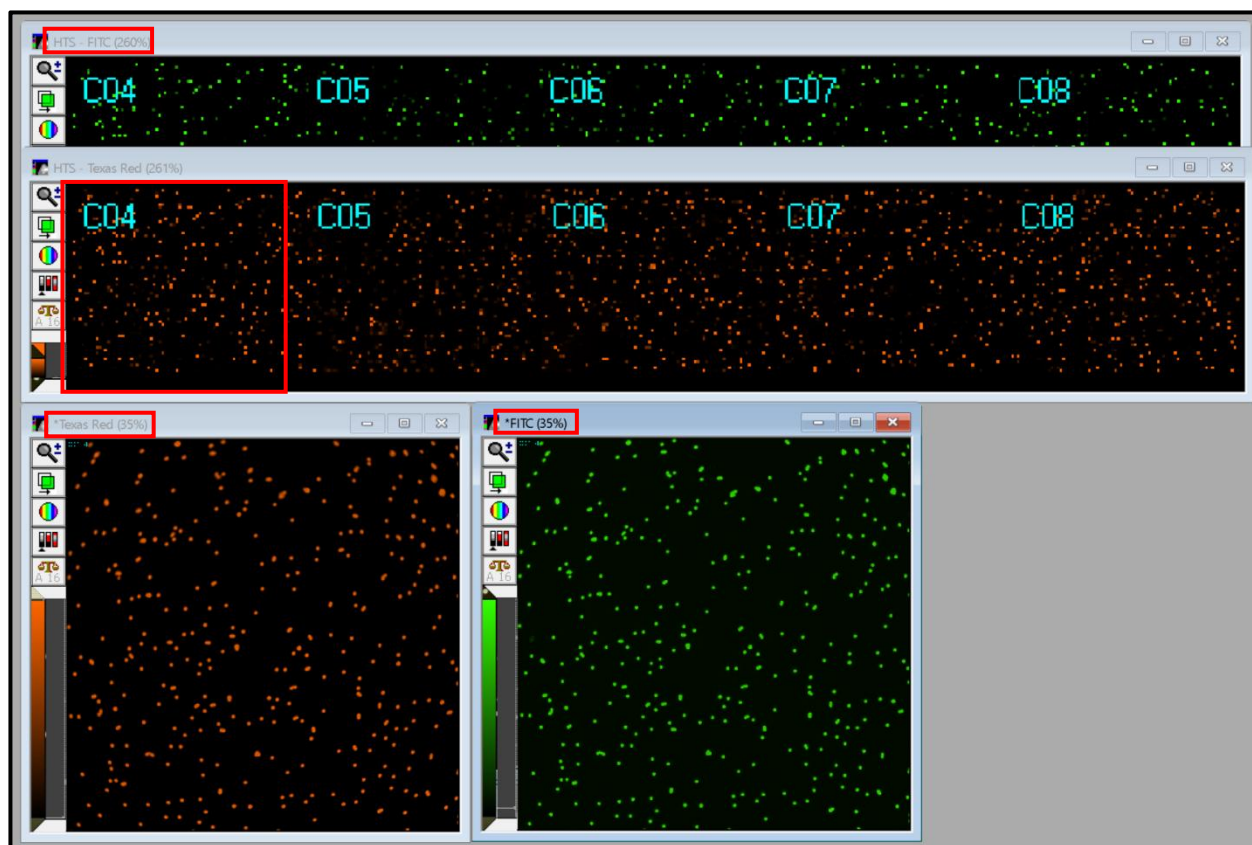
在 **Wavelengths** 框内选择不同的 wavelength 即可将相应通道的 Montage 展示出来，在 **All Sites** 框内可选择要展示的 site（视野），也可勾选 All Sites，此时所有 sites 都会展示在 Montage 中。对于 Site，只能选择某一个或 All Sites。



□ 代表未拍摄图像；□ 代表未进行图像分析；□ 代表以高分辨率显示的图像；■ 代表在缩略图中选择查看的图像；■ 绿色高亮代表选中的孔（右键单击选择）。



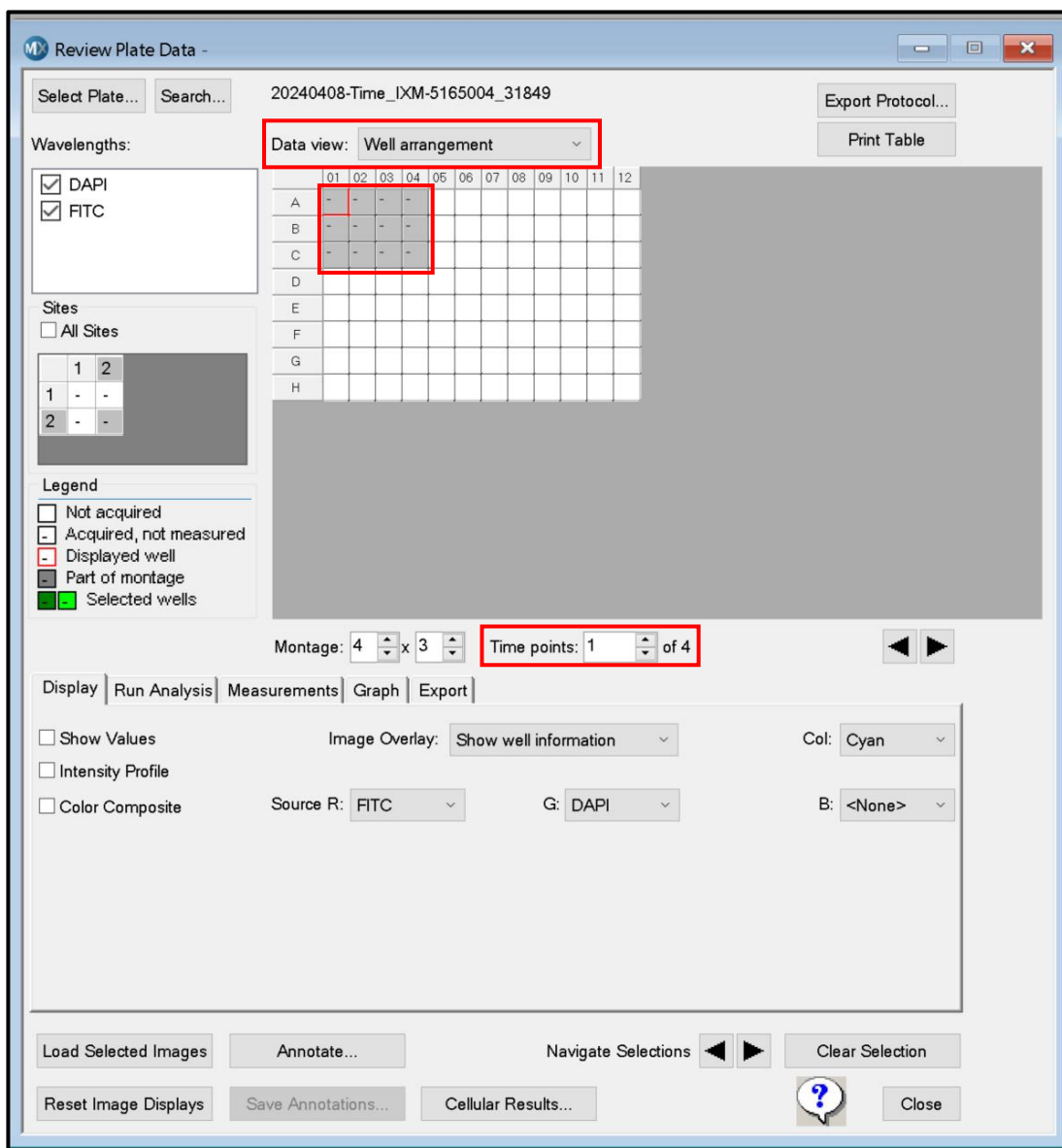
4) 展示的 Montage 会有前缀 HTS，并且当 Montage 被放大后会有明显的马赛克。如果要查看高清图，在 Montage 点击某一个 sites（视野）即可，此时该视野下所有被选中的 wavelength 的高清图都会展示出来，并且命名是 wavelength 的名称，无 HTS 前缀。如果要切换不同 site 的高清图，没必要关闭已展示出来的，直接在 Montage 点击感兴趣的 sites 即可。



延时成像图像的查看

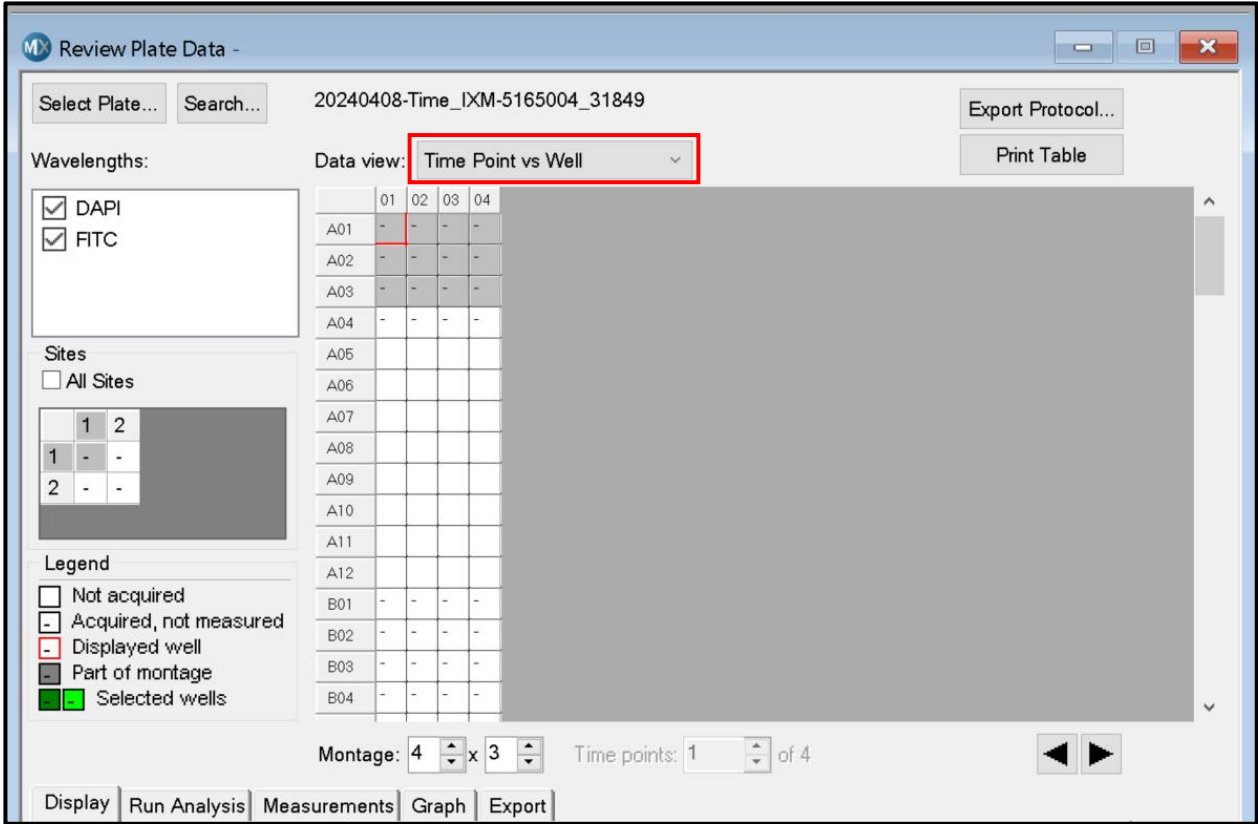
单个时间点缩略图的查看

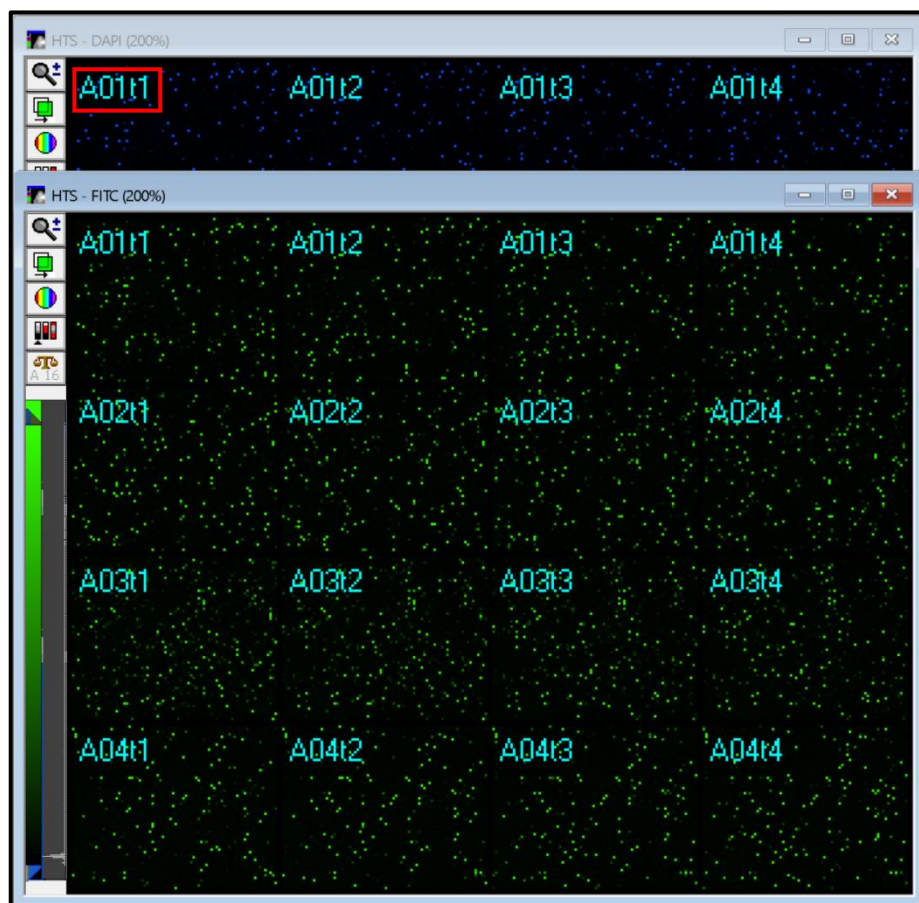
查看单个时间点多个孔的缩略图，请将 **Data View** 更改为 “Well Arrangement”。左键点击并拖动可选择一系列的孔，图像以缩略图的形式显示。在 “Time Points” 处选择所需的时间点。



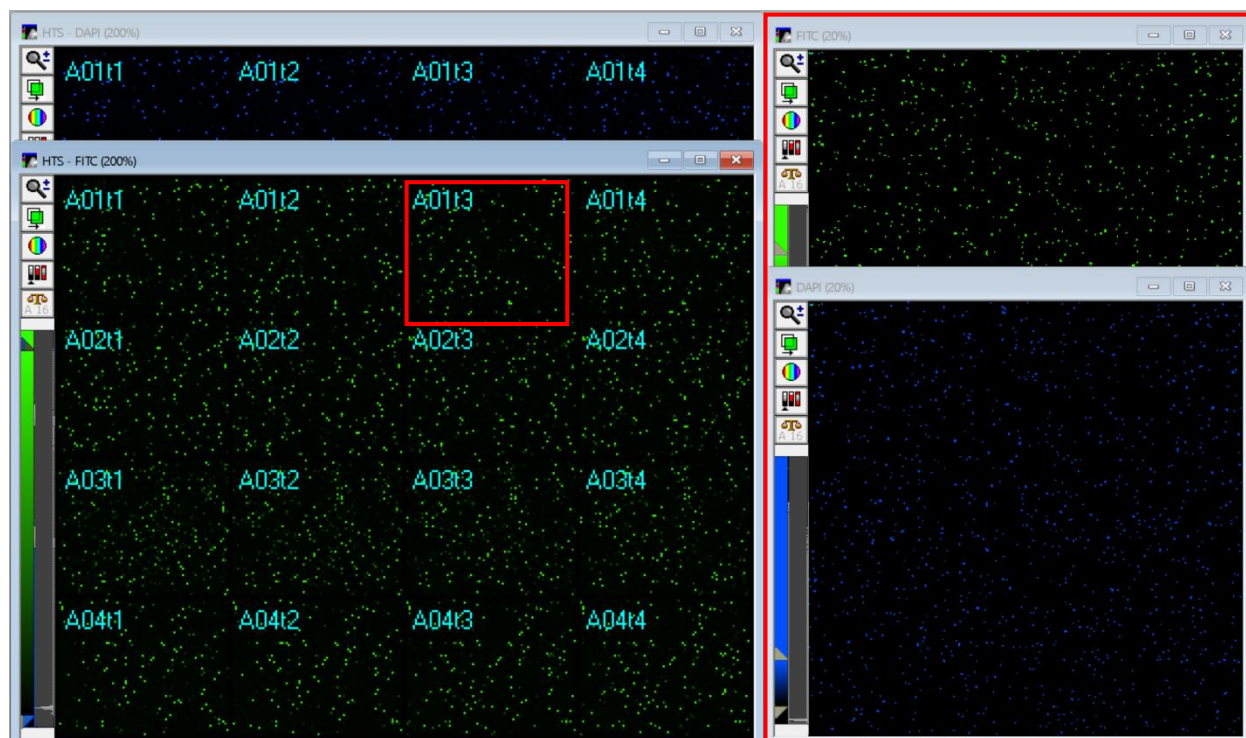
多个时间点缩略图的查看

查看多个时间点的缩略图，请将 **Data View** 更改为 “Time Point vs Well”。视图排布会发生改变，时间点在 X 方向排列，孔位置信息在 Y 方向排列。单击并拖动，选择时间点范围，或选择用一系列相邻的孔创建一个时间点的缩略图。延时成像图像缩略图的左上角显示孔的位置信息和时间点（t1、t2、t3 等）。



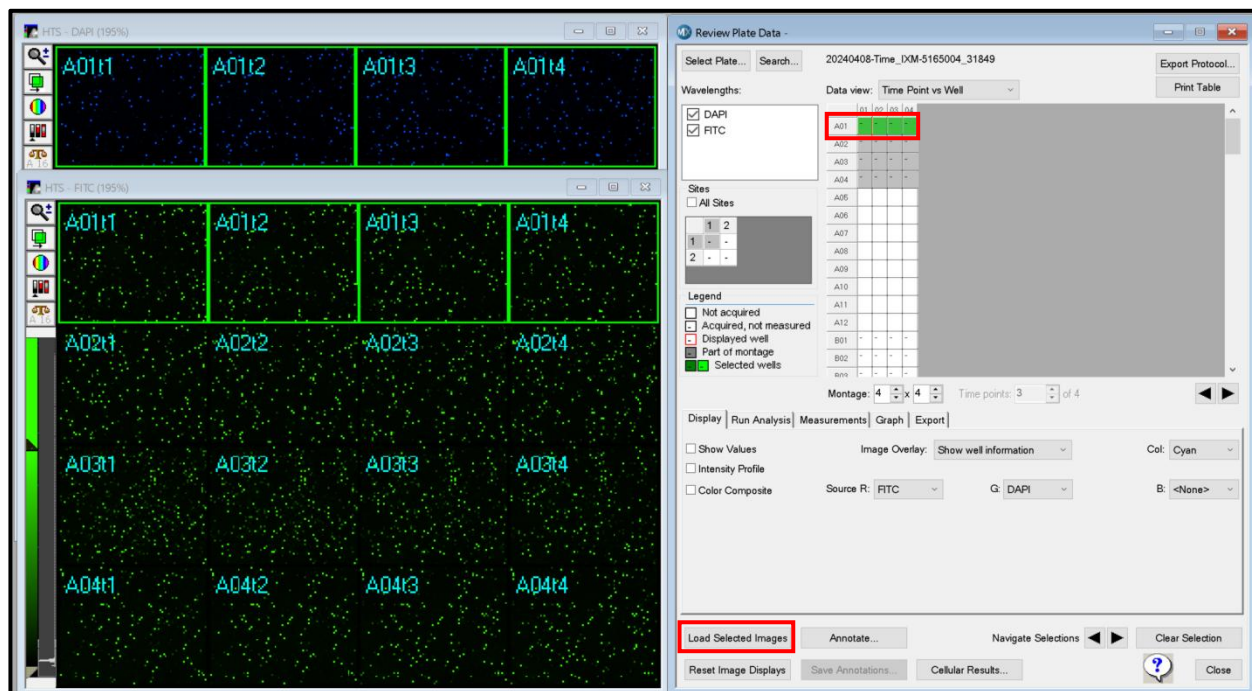


鼠标左键单击缩略图即可打开相应视野的高分辨率图像。

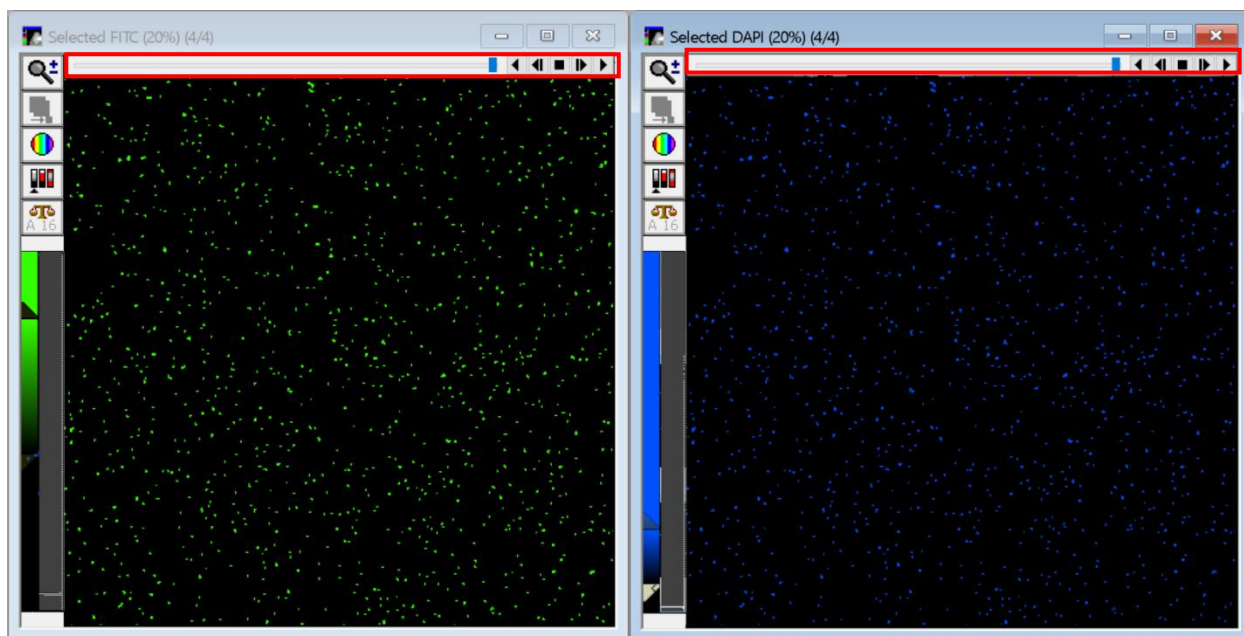


IXM & MetaXpress 常用操作指南

创建某一 site/well 一系列时间点的 Stack 堆栈 (.stk) 文件。鼠标右键单击面板视图或缩略图中感兴趣的孔，相应的图像和孔将以绿色高亮显示。点击 **Load Selected Images** 加载选中的图像。如果每个孔中拍摄了多个视野，则取消选择 “all sites” 并只突出显示一个要查看的视野。



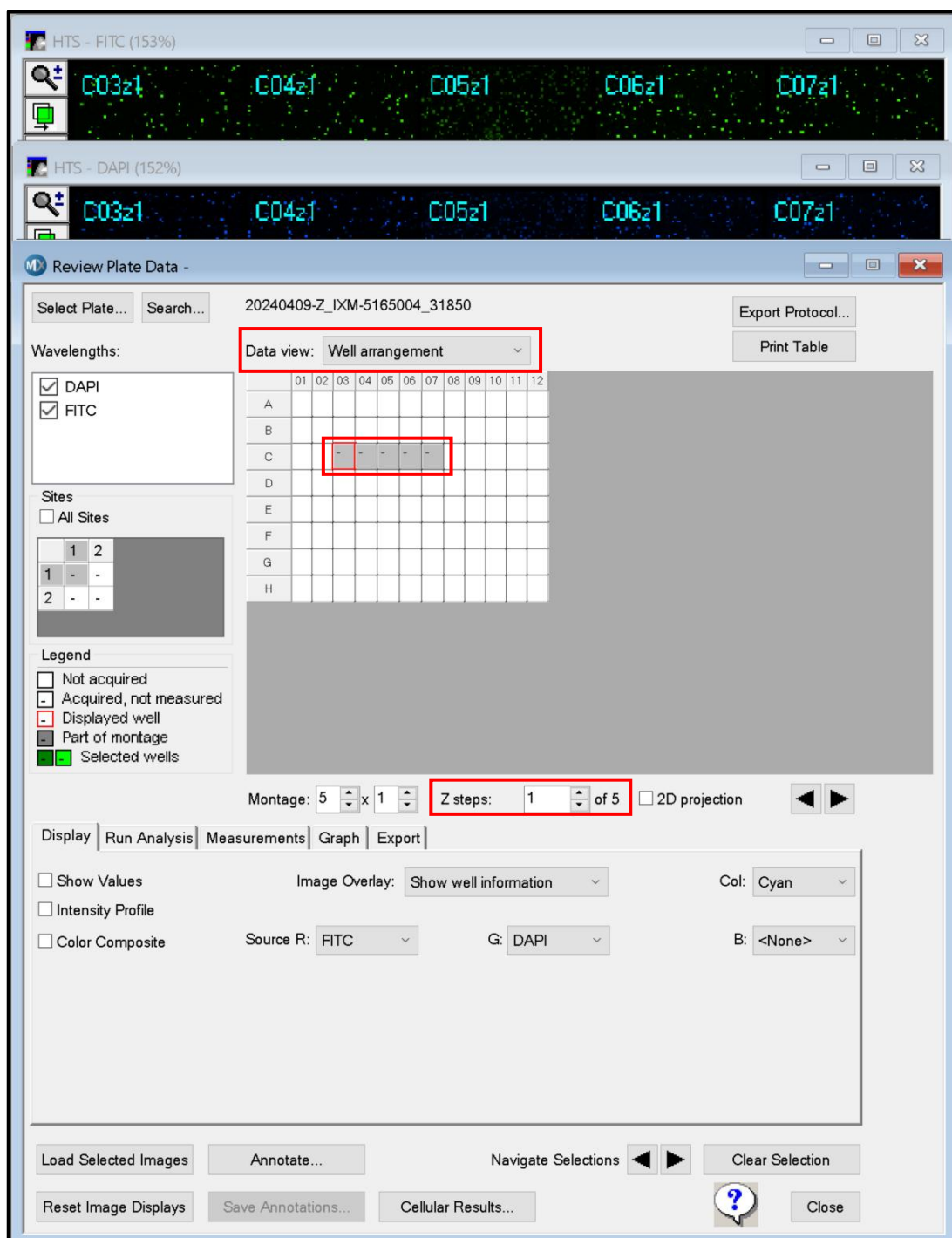
若需要滚动时间间隔，请单击并拖动图像滑块或使用播放控件。



Z series 多层图像的查看

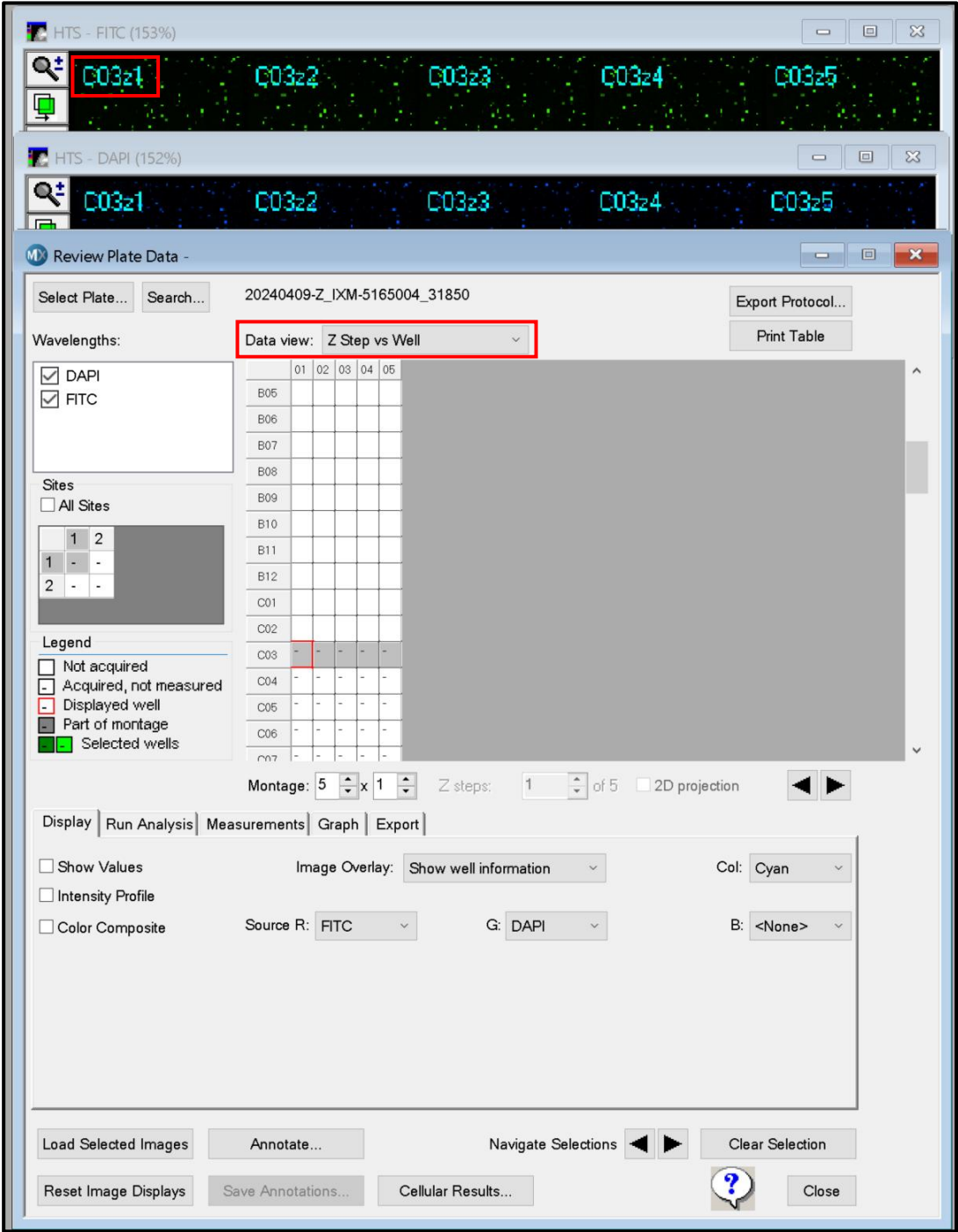
单层缩略图的查看

查看单层的缩略图，请将 **Data View** 更改为 “Well Arrangement”。左键点击并拖动可选择一系列的孔，图像以缩略图的形式显示。在 **Z steps** 处选择所需的 Z 层面。

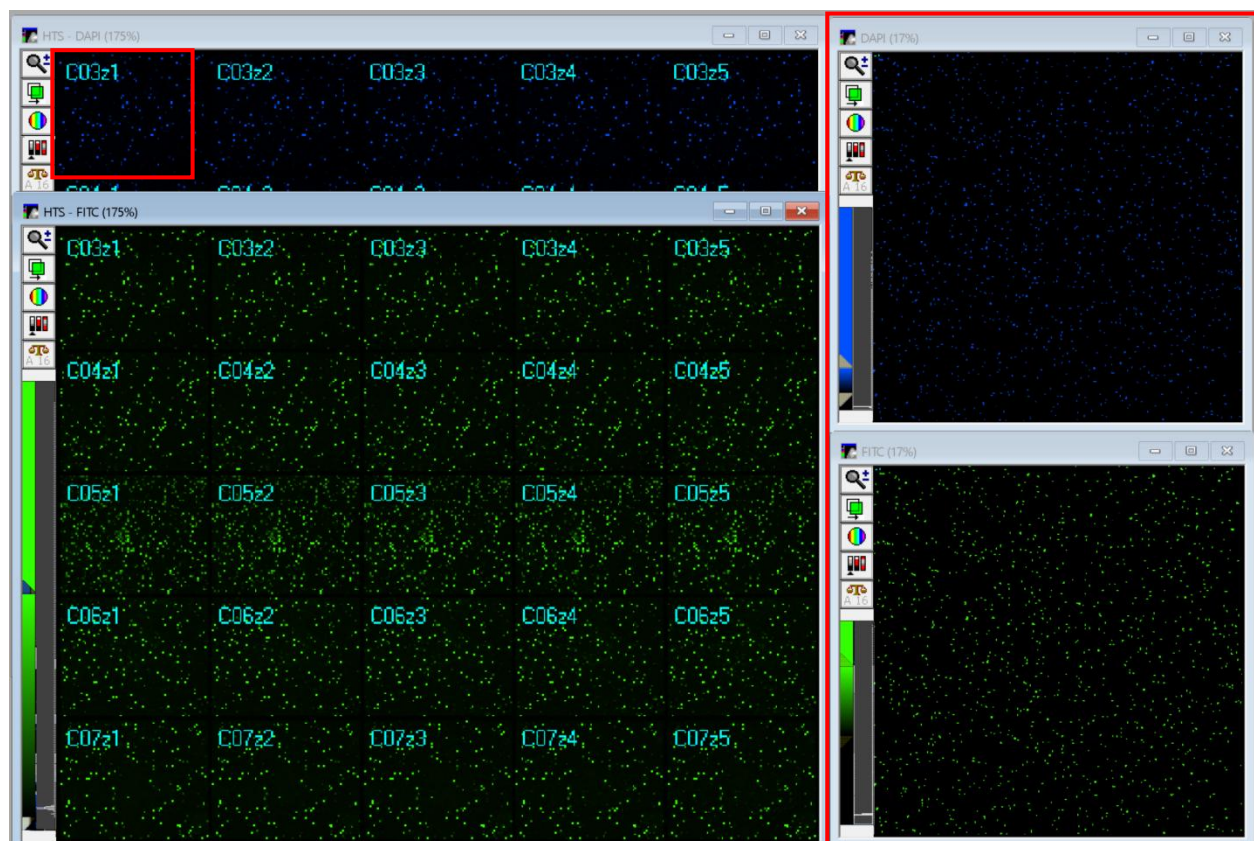


多层缩略图的查看

查看多层的缩略图，请将 **Data View** 更改为 “Z Steps vs Well”。视图排布会发生改变，Z 层面在 X 方向排列，孔位置信息在 Y 方向排列。单击并拖动，选择 Z 层面范围，或选择用一系列相邻的孔创建一个时间点的缩略图。多层扫描成像图像缩略图的左上角显示孔的位置信息和 Z 层（z1、z2、z3 等）。

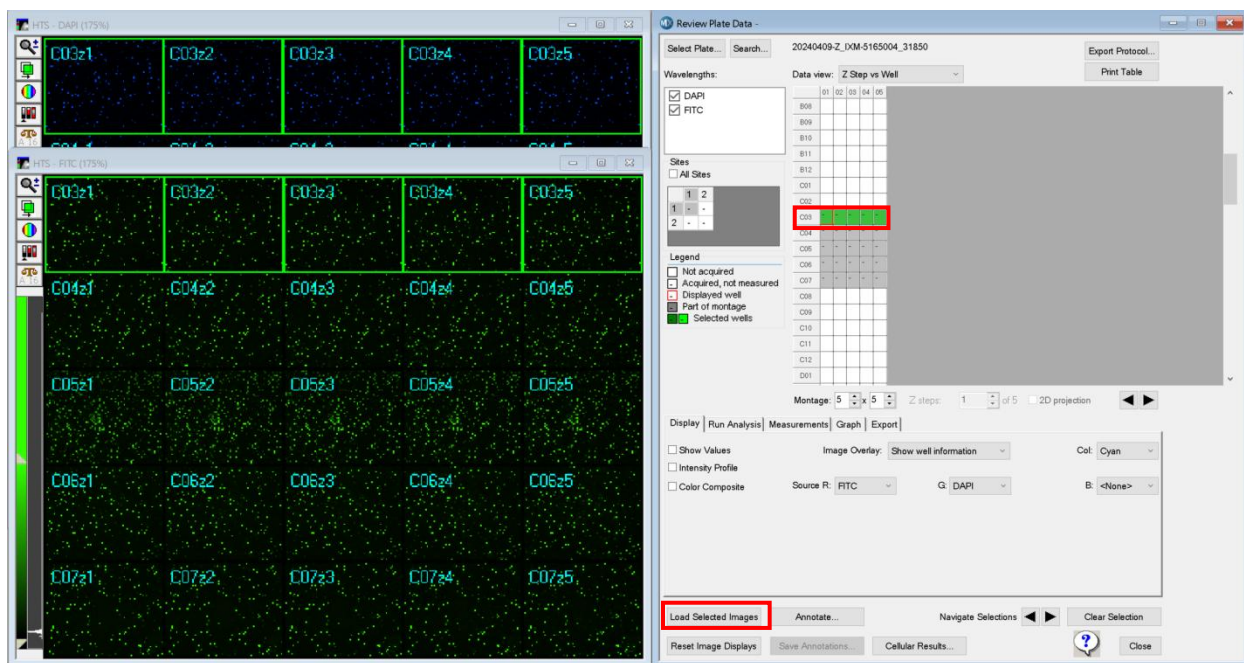


鼠标左键单击缩略图即可打开相应孔的高分辨率图像。

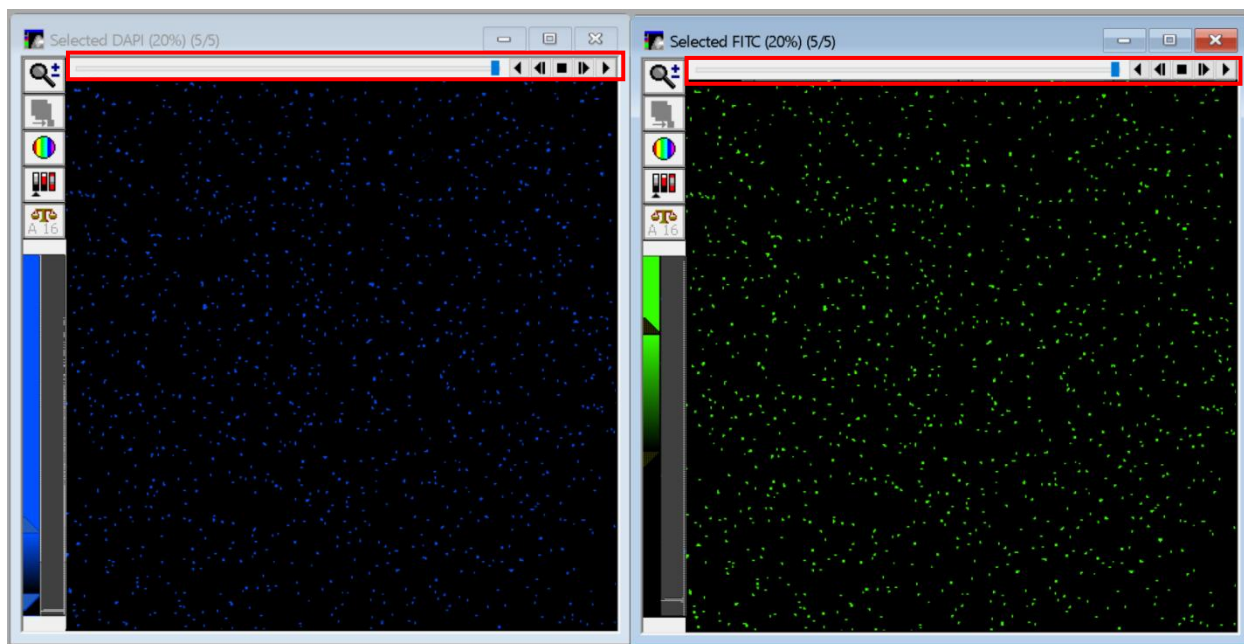


IXM & MetaXpress 常用操作指南

选择并创建单个 site/well 一系列多层扫描的 stack 堆栈 (.stk) 文件。右键单击面板视图或缩略图中感兴趣的孔，相应的图像和孔将以绿色高亮显示。点击“Load Selected Images”加载选中的图像。如果每个孔中拍摄了多个视野，则取消选择“all sites”并只突出显示一个要查看的视野。



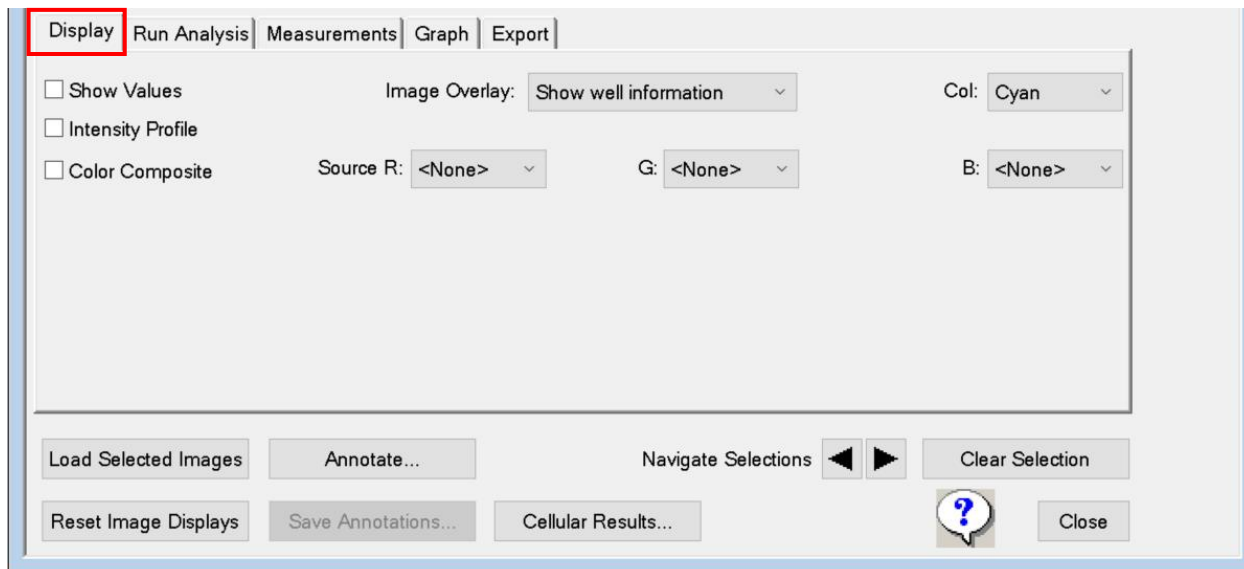
若要滚动 Z 层面，请单击并拖动图像滑块或使用播放控件。



Review Plate Data 标签区解释

标签区域包含 **Display**, **Run Analysis**, **Measurement**, **Graph**, **Export** 选项。

Display 可配置图像的显示方式。

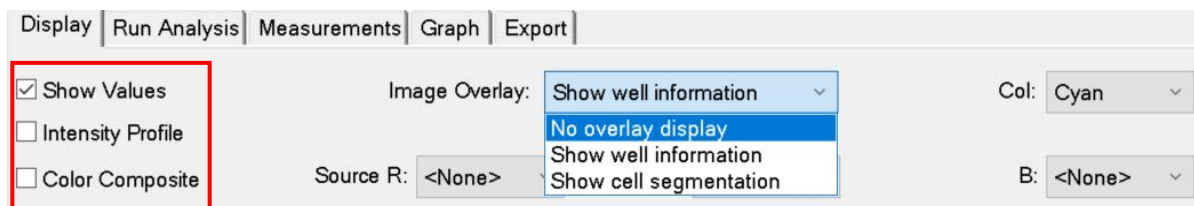


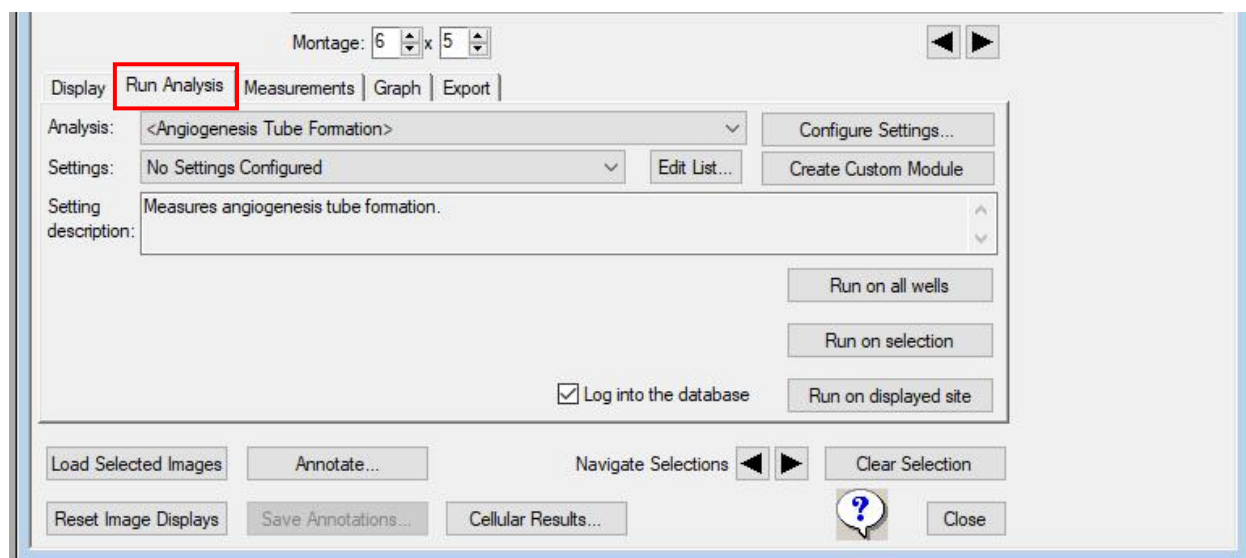
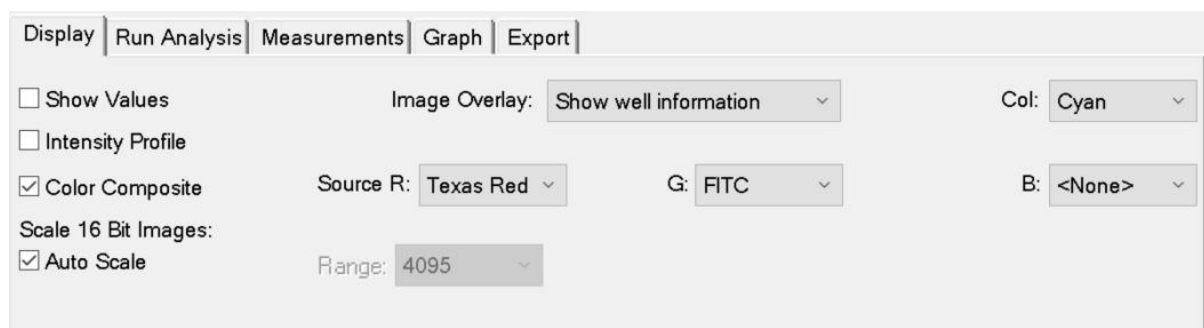
Run Analysis 可选择及设置图像分析用的模块，包括 Custom Module（自定义模块）。

注：用 ExportPro 批量导出彩色图像时切记不勾选 Log into the database，否则彩图会存入数据库，占据空间。

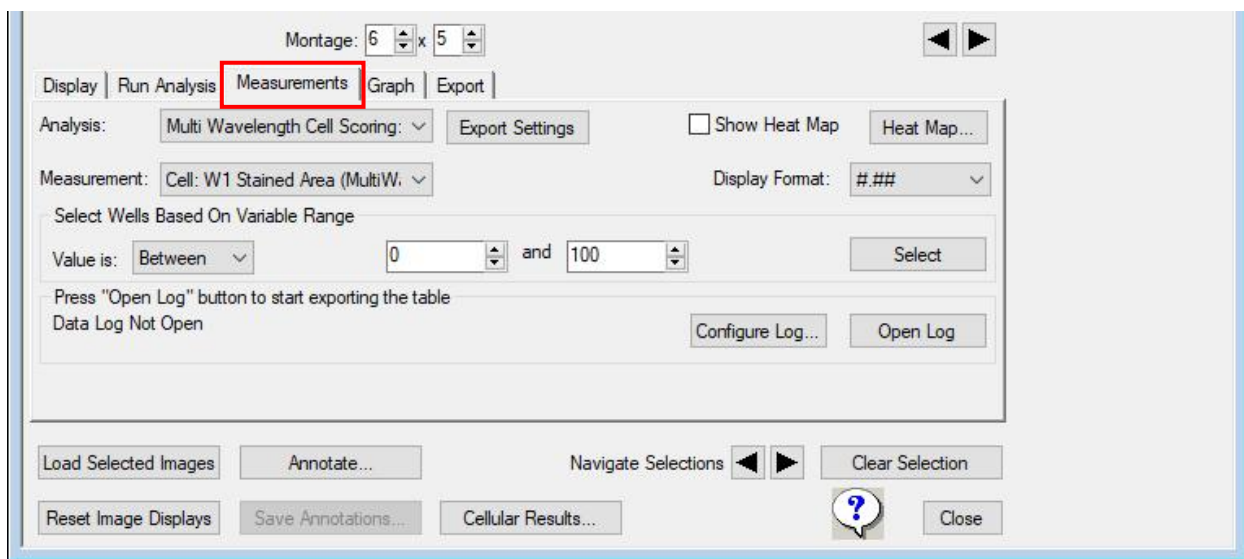
Show Values：选择图像的显示方式。**Intensity Profile：**将图像以荧光强度的形式显示。

Color Composite：查看最多 3 个波长（RGB）的颜色叠加。

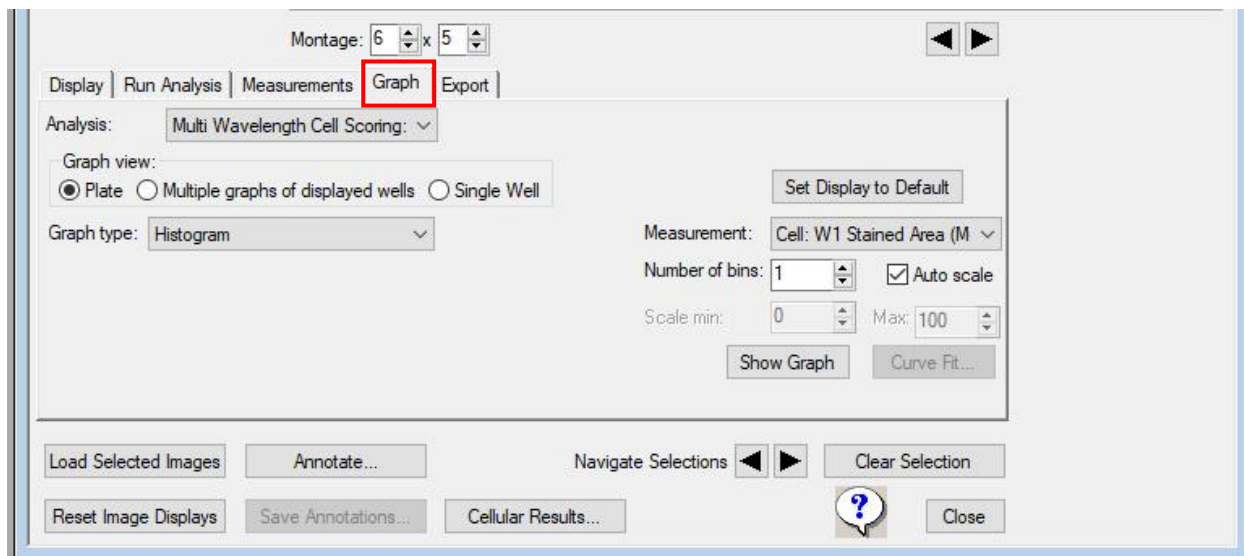




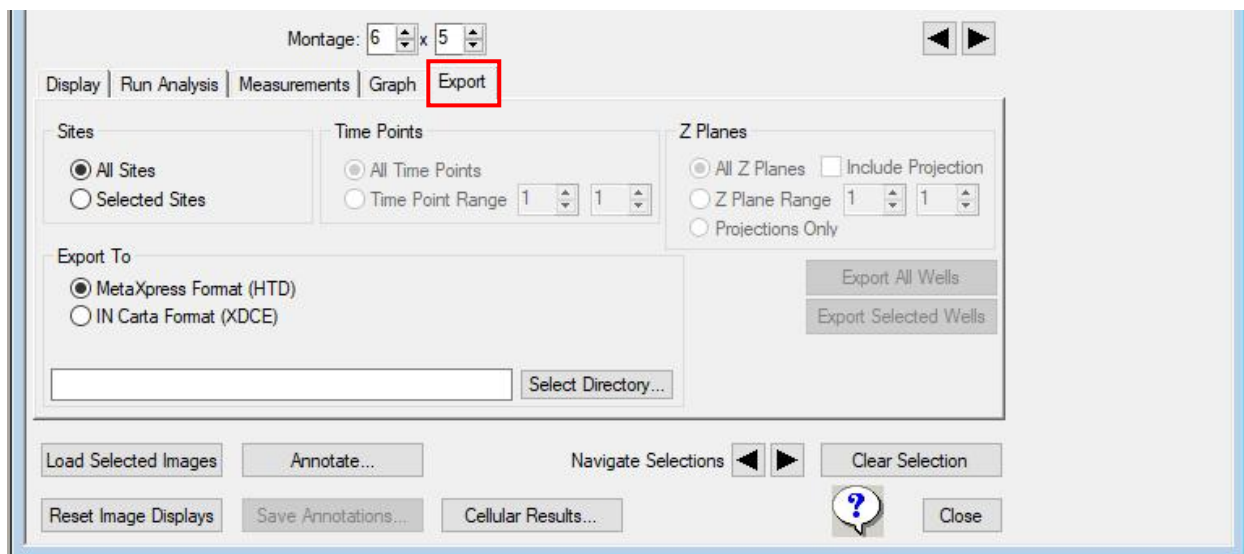
Measurement 在数据分析完成之后可来查看数据，其中 **Measurement** 下拉框可选择要查看的参数。Show Heat Map 可将数据按照热图的形式展示。Display Format 可定义要显示的小数位数。Open Log 点击后可选择要导出的 data log 的类型，此时 Open Log 变为 Log Data，点击 Log Data 可将数据导出。



Graph 可以将选中的数据导出为图表。点击 Show Graph 即可展示图表，右击图表并选择 Print 可将图表保存为 pdf 格式。



Export 可将原始图像导出，只需选择相应的 sites, Time points 及 Z planes, 最后选择导出 All wells 还是 Selected Wells 即可。导出格式分为两种：MetaXpress Format (HTD) 后续可导入 MetaXpress 进一步分析，而 IN Carta Format (XDCE) 可导入 IN Carta 软件进行分析。

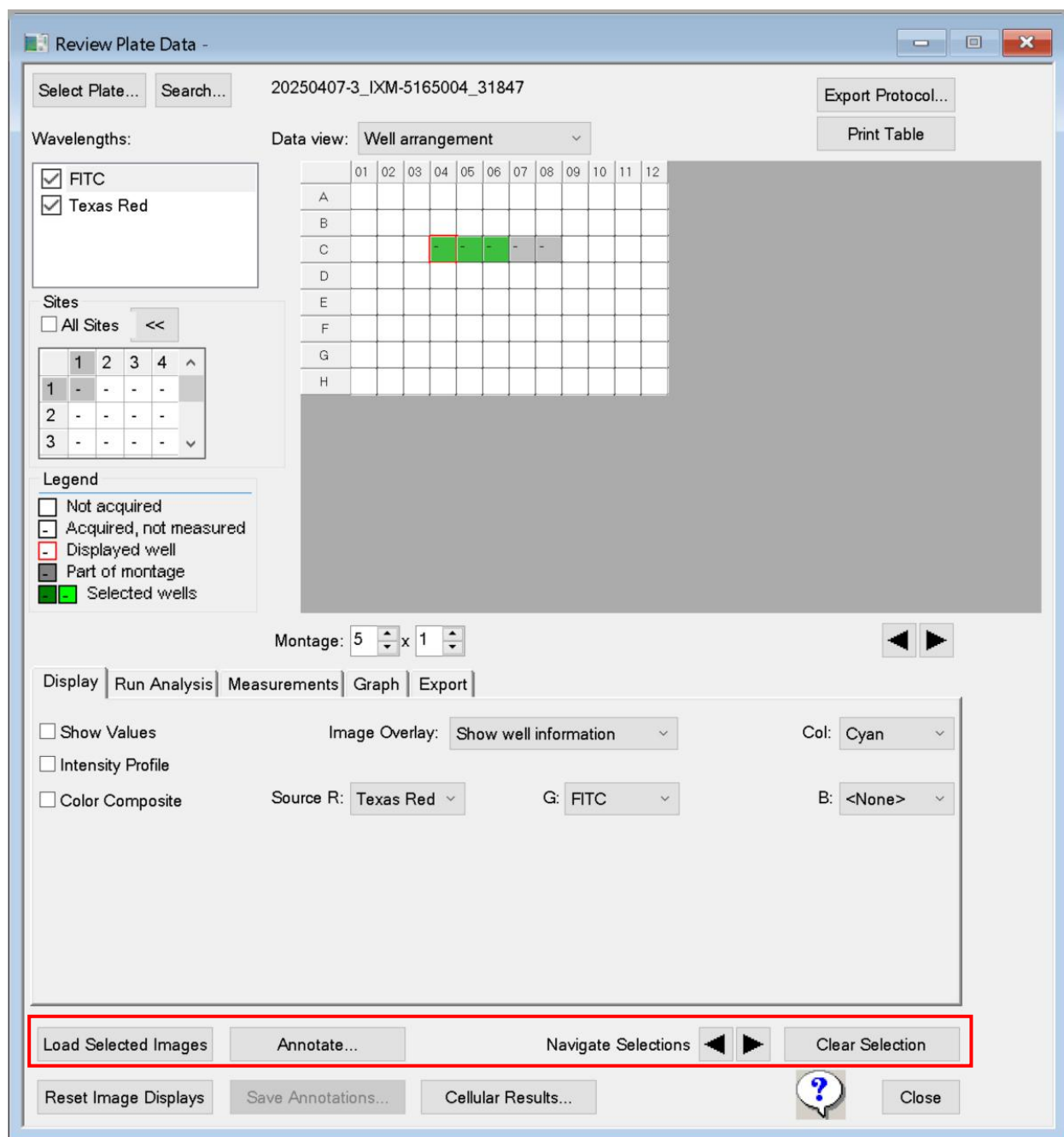


选定的图像（右键选中，以绿色高亮显示）

Load Selected Images: 加载选定的图像或图像合集，包含图像的孔以绿色高亮显示。

Navigate Selections: 点击黑色箭头可移动到相邻的绿色高亮显示的孔。

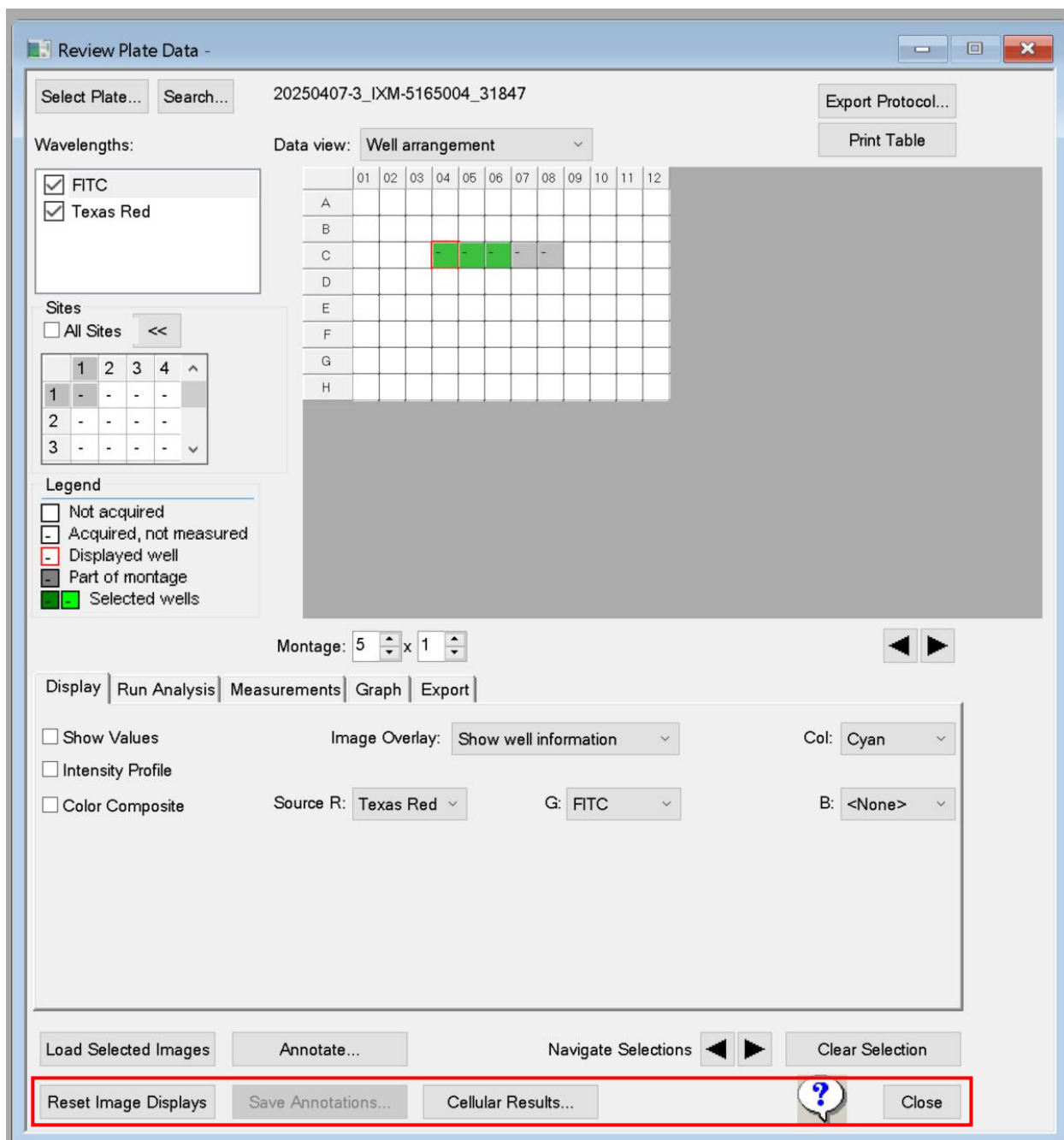
Clear Selection: 取消选中的孔。



Reset Image Displays: 将预览图及高分辨率图像返回到软件默认显示设置。

Cellular Results: 显示高分辨率图像中的细胞分析结果。

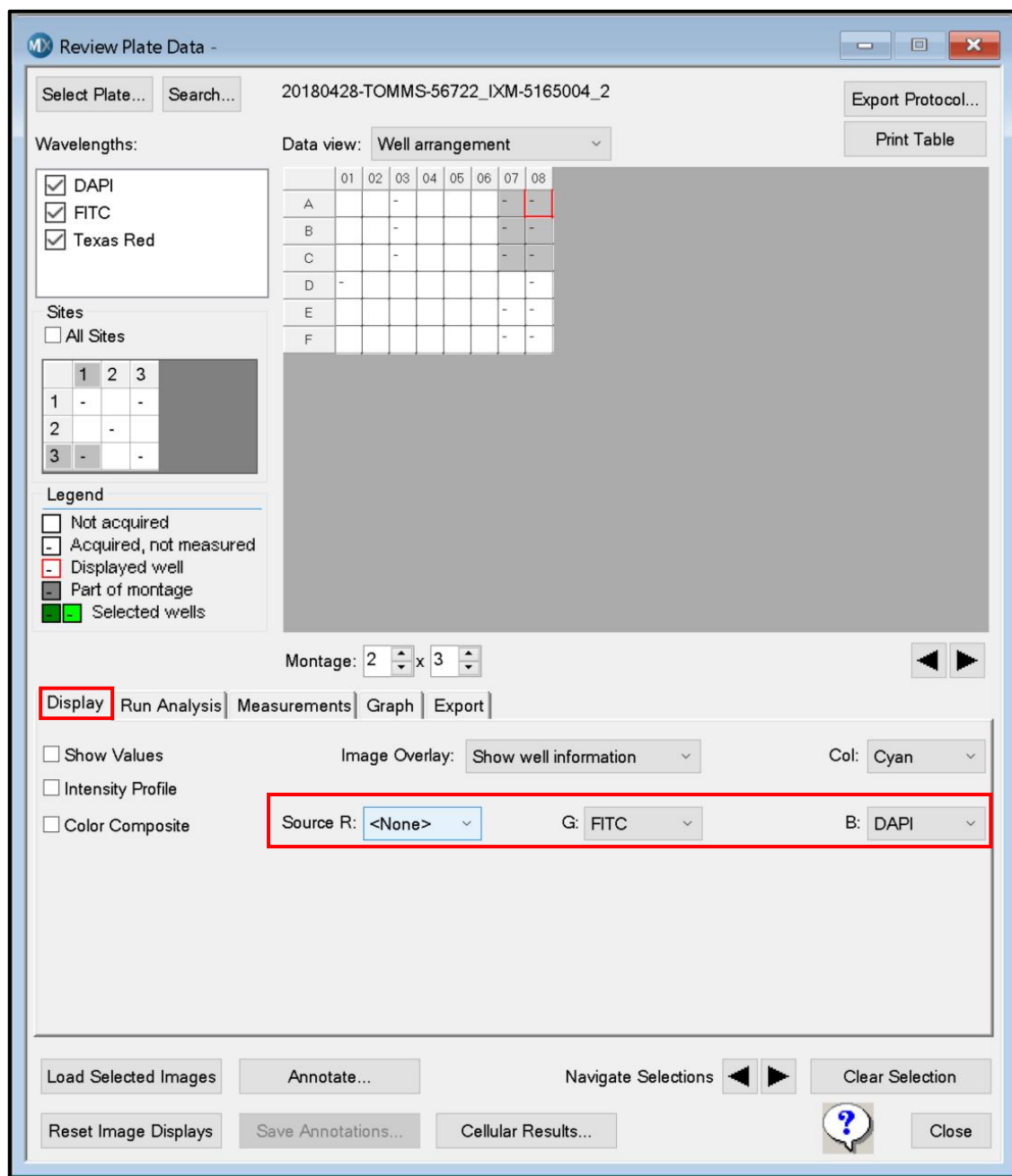
Close: 关闭退出“Review Plate Data”对话框。



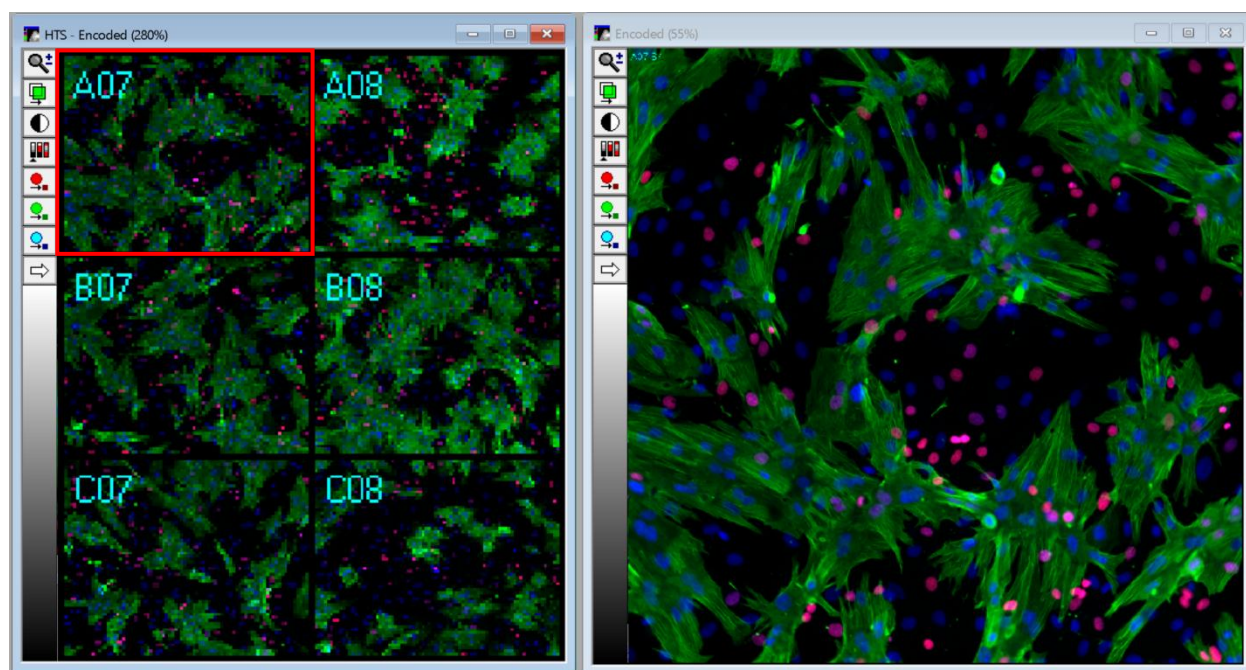
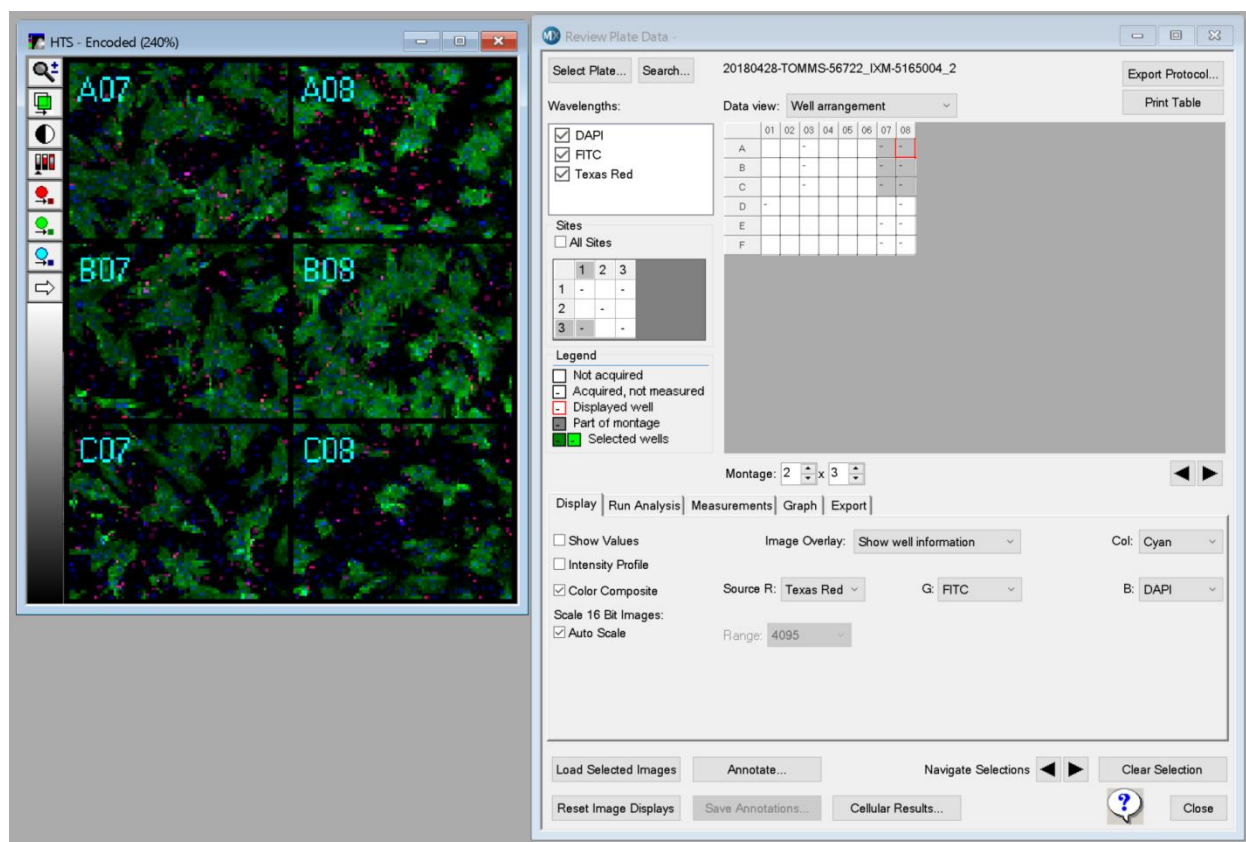
2. 单通道及多通道单个视野彩色图像的导出

多通道彩色图像的查看

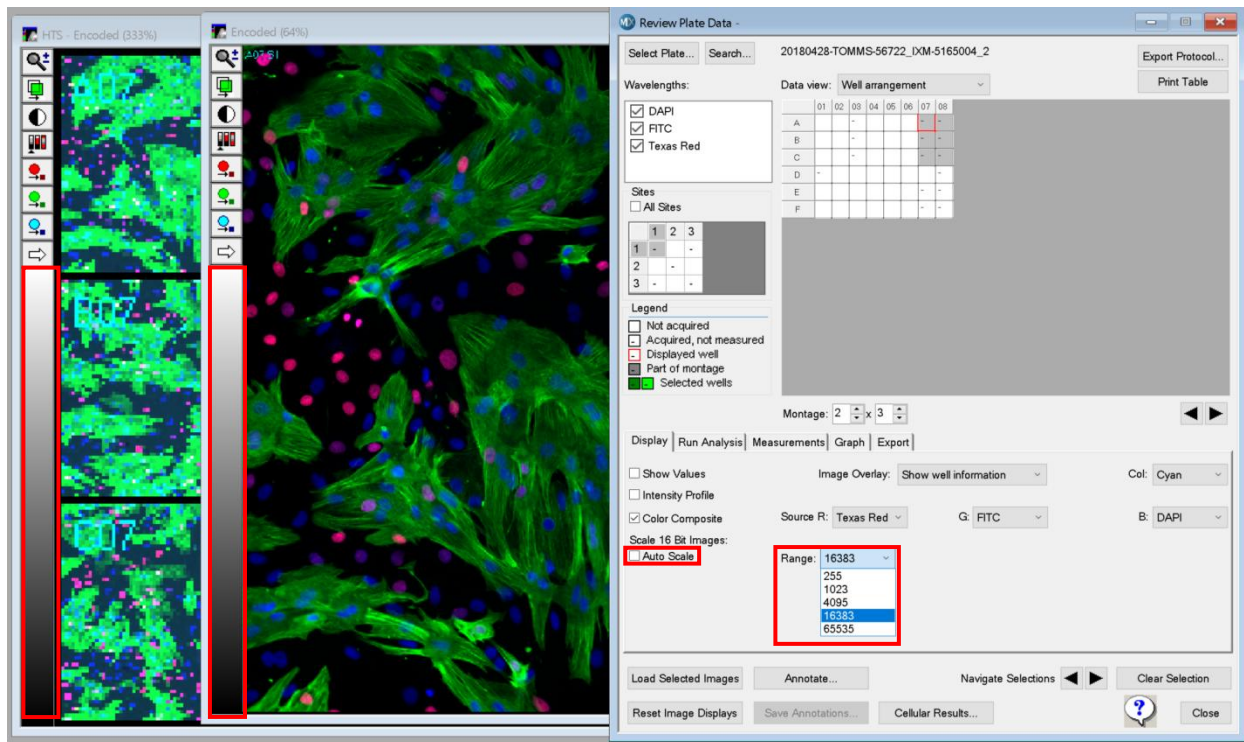
- 1) 如前所述打开高分辨率图像。
- 2) 在 **Review Plate Data** 界面点击 **Display**，可配置图像的显示方式。在 Source RGB 下拉菜单中选择合适的波长。“R”代表 Red，“G”代表 Green。“B”代表 Blue。



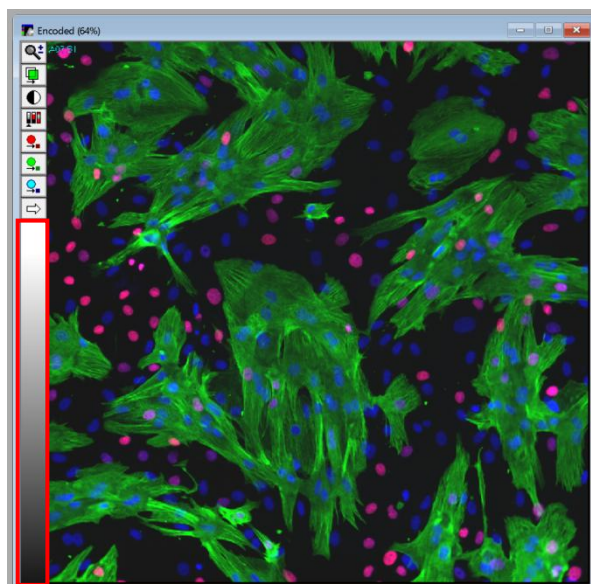
3) 选择 **Display** 中的 **Color Composite**，将显示一个 HTS-Encoded 的缩略图，取代单个通道的缩略图。点击缩略图图像，可显示高分辨率图像。



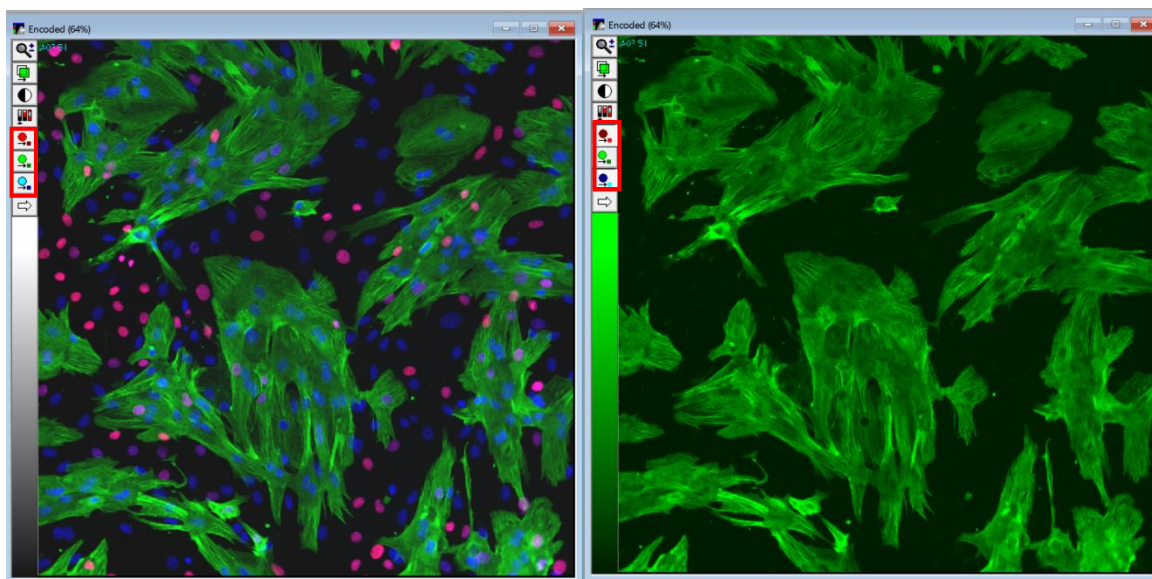
4) 如选择自动缩放 (Auto Scale), 几个通道叠加在一起的彩色图像 (Encoded) 是自动缩放的。如需要自己设定强度范围, 取消选择自动缩放, 可从下拉菜单中选择所需要的强度范围。如需要调节叠加图的亮度 and 对比度, 可在图像窗口右侧灰色栏单击并拖动。



5) 点击图像窗口左侧的白色箭头图标 , 可在红、绿、蓝三个通道进行切换, 以选择需要单独调整的通道。鼠标点击并拖动下方灰色区域, 可调节亮度和对比度。

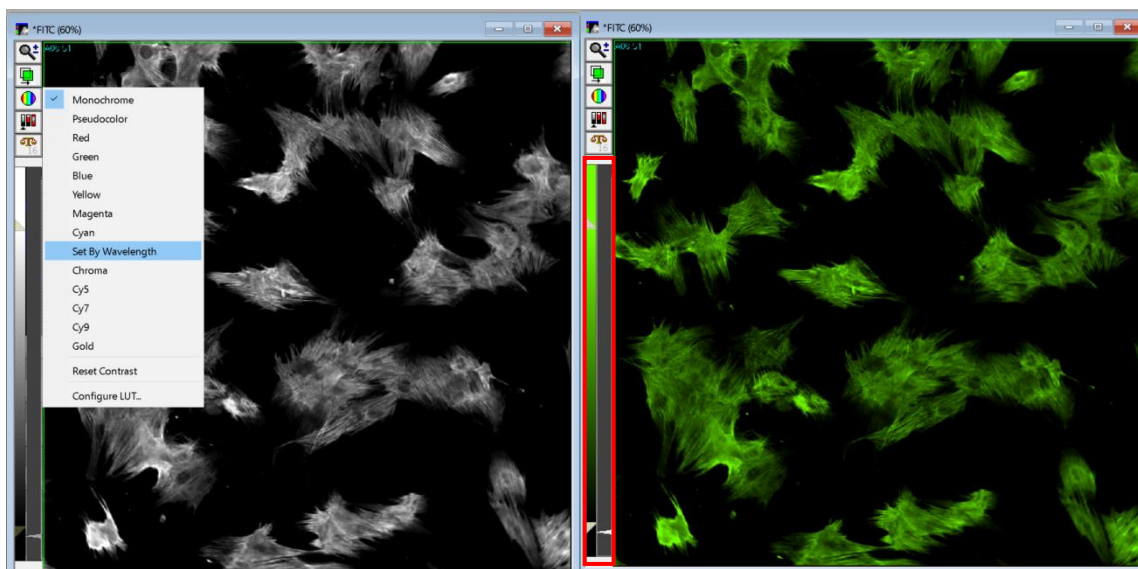


6) 点击单独的红-绿-蓝图标可打开或关闭特定的通道。

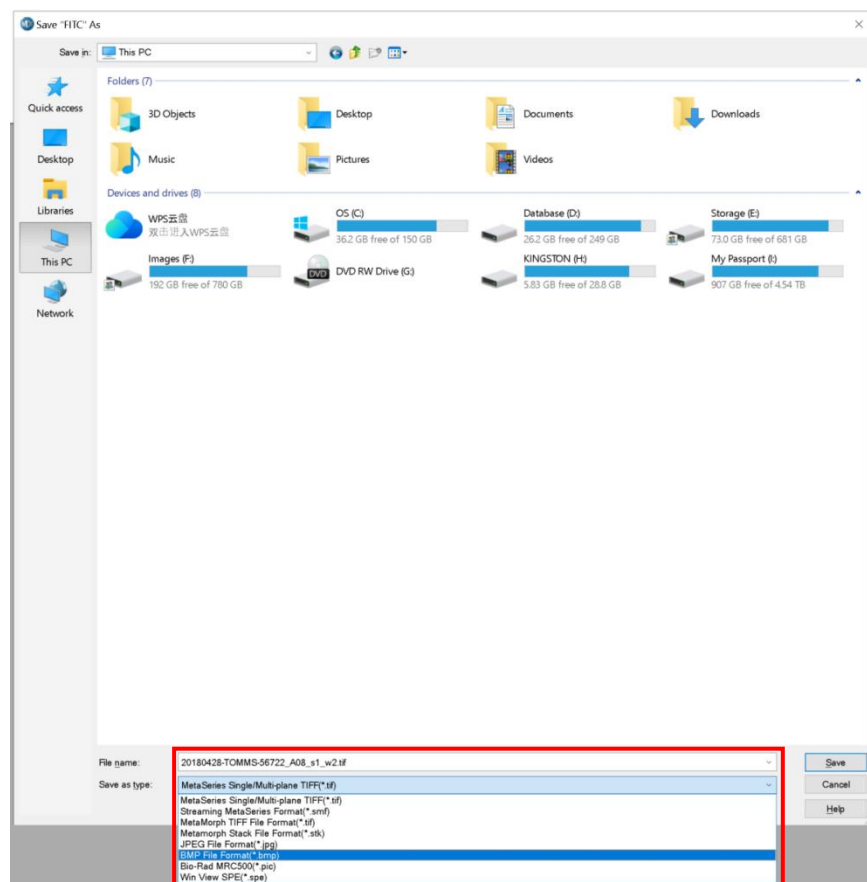


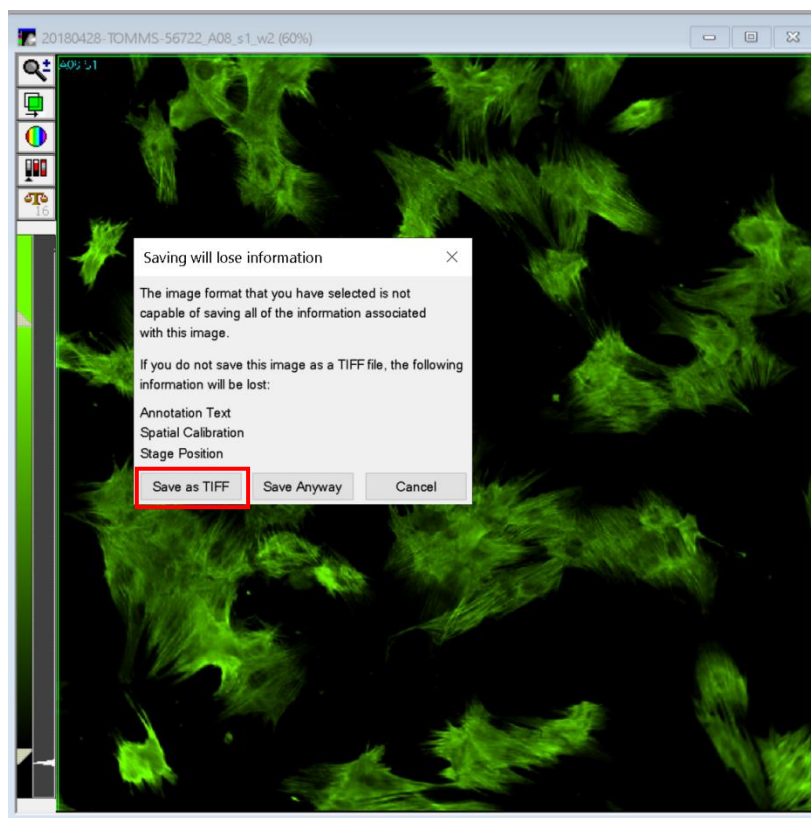
创建单通道彩色图像及导出

1) 选择图像右侧的 Look-Up Table, 选择需要的伪彩颜色。鼠标点击并拖动下方灰色区域, 可调节亮度和对比度。



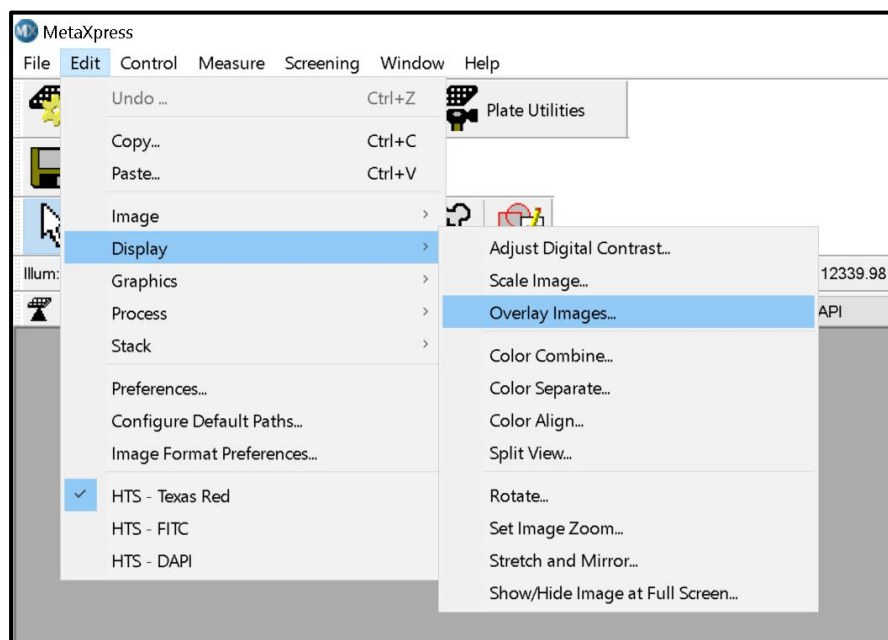
2) 点击鼠标右键，选择保存 (Save as)，设置存储的路径、图片名称及文件格式。文件名称的默认格式为实验名称+孔位置+视野位置+通道，文件格式选择 bmp 格式，点击 Save 保存图像。接下来可选择保存为 Tiff 格式。



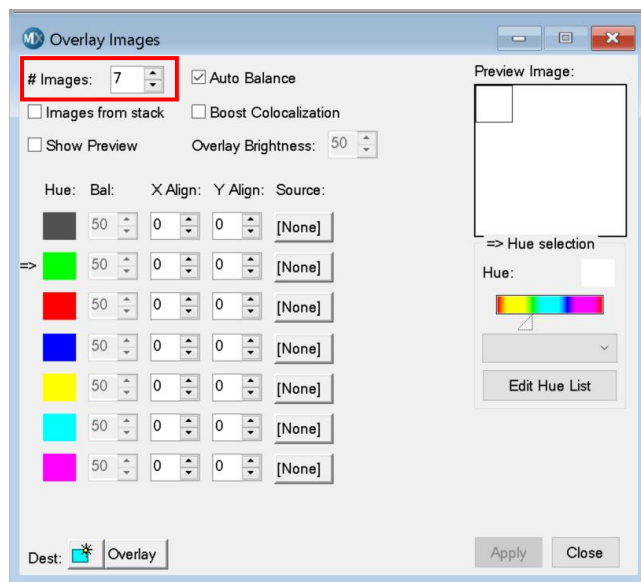


创建多通道单个视野彩色图像及导出

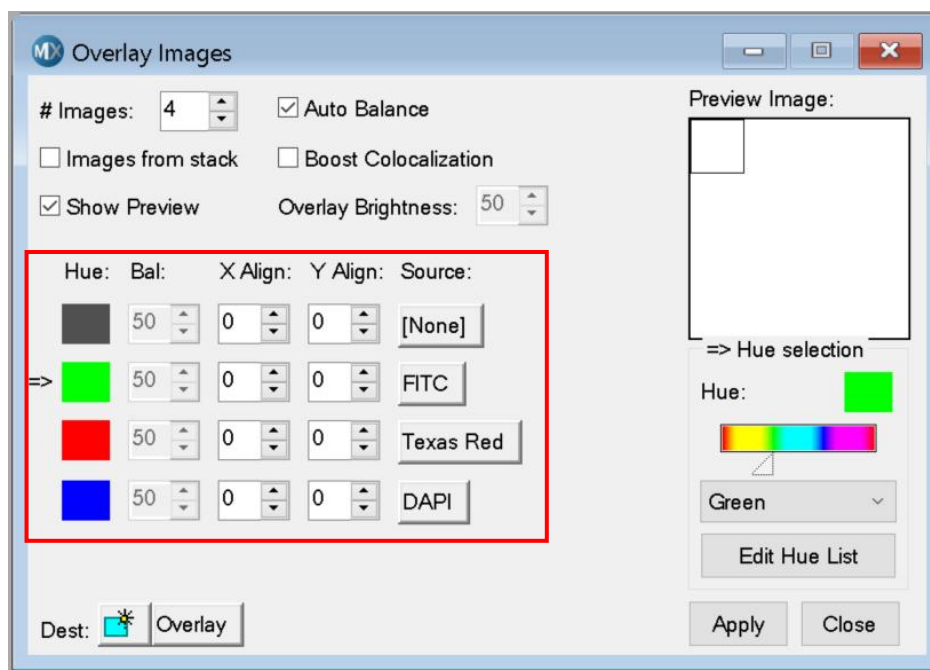
1) 在主工具栏 Edit--Display--Overlay Images。



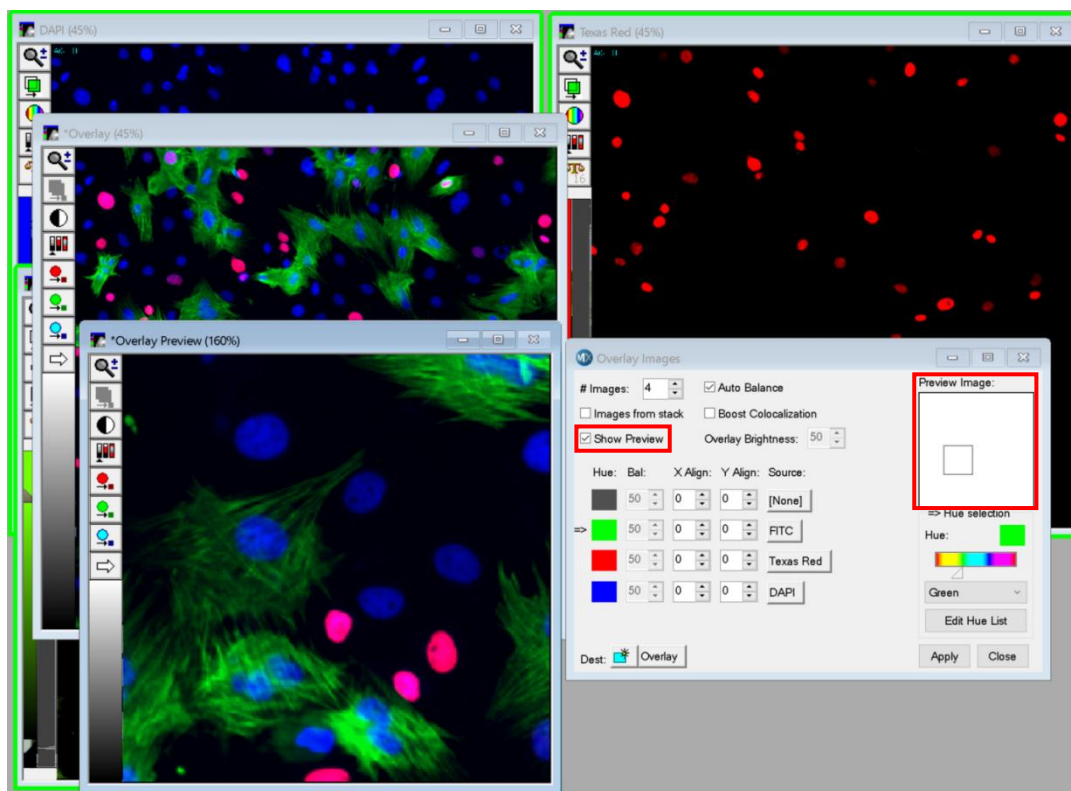
2) 在#Images 中输入需要叠加伪彩的通道数量（最高 7 个），第一个颜色默认为灰度图像（透射光图像），此外可设置 6 种荧光。如：进行 2 色荧光通道，将#Images 设置为 3。



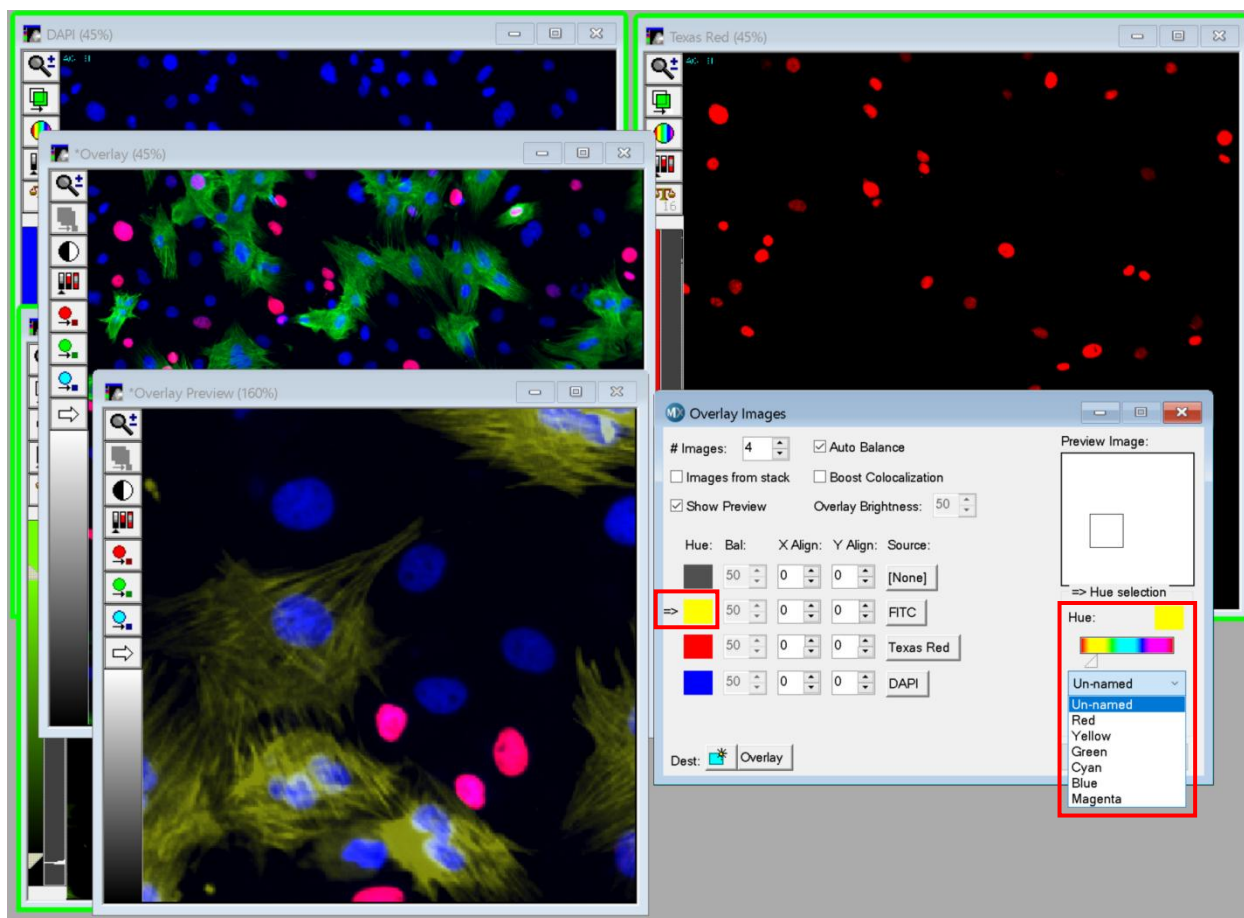
3) 前面颜色代表的是为图像赋予的伪彩颜色，Source 下面可选择对应图像。**注意：**HTS 前缀的为缩略图。如没有拍摄明场图像，Source 下面选择 None。



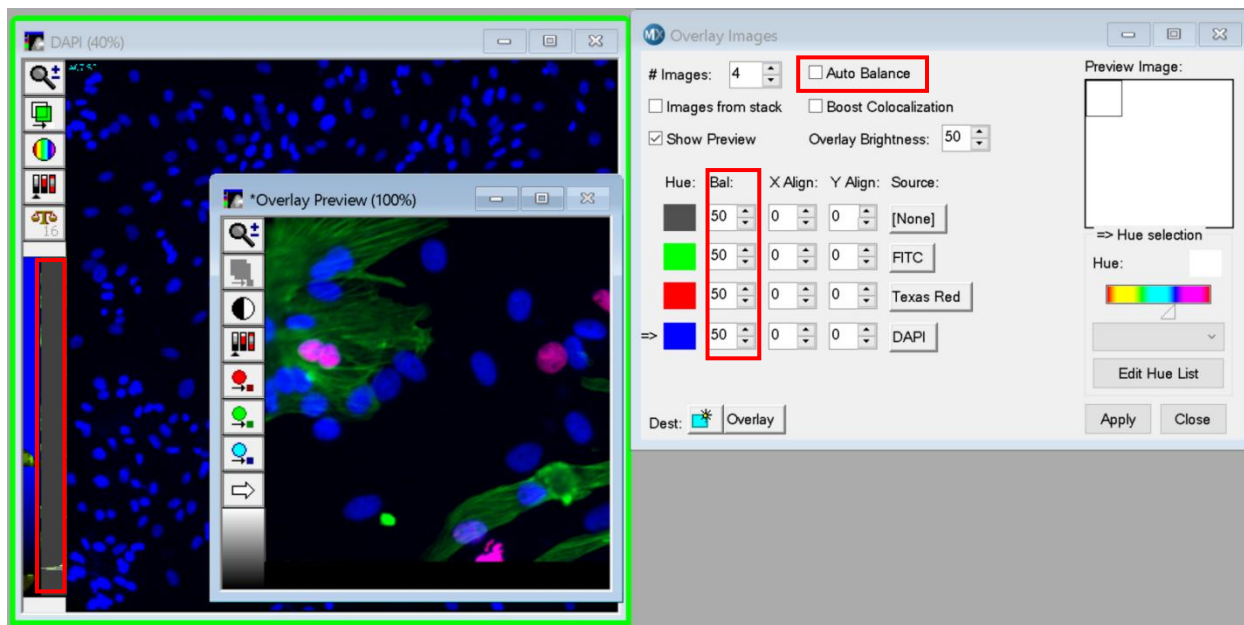
4) 选择显示预览图像（**Show Preview**），可以通过移动方块的位置预览叠加图像的缩放区域。



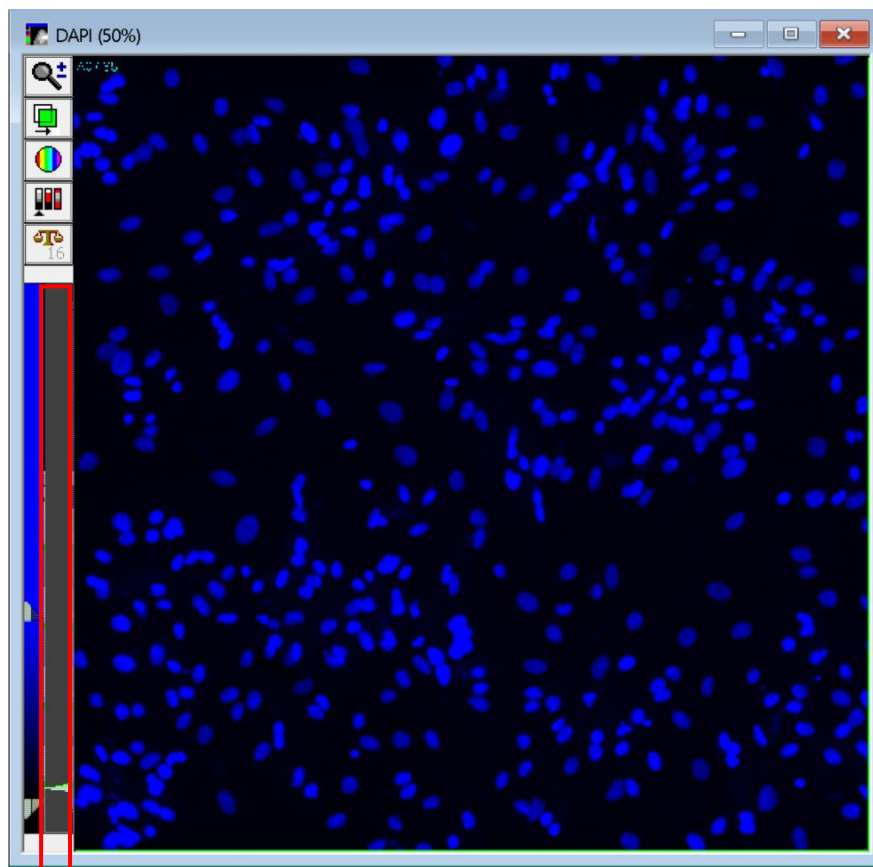
5) 鼠标左键点击 Hue 可分配不同的伪彩颜色，箭头表示选择的要更改的伪彩颜色。可通过右侧的移动滑块或下拉列表选择伪彩颜色。伪彩图像颜色的改变会在预览窗口中自动更新。



6) 通过调节平衡 (Balance) 可以调节每张图像对于最终叠加图像的影响 (可选): 取消 Auto Balance, 调整 Bal 下的平衡, 可实时显示在预览图像 (Preview Image) 中。

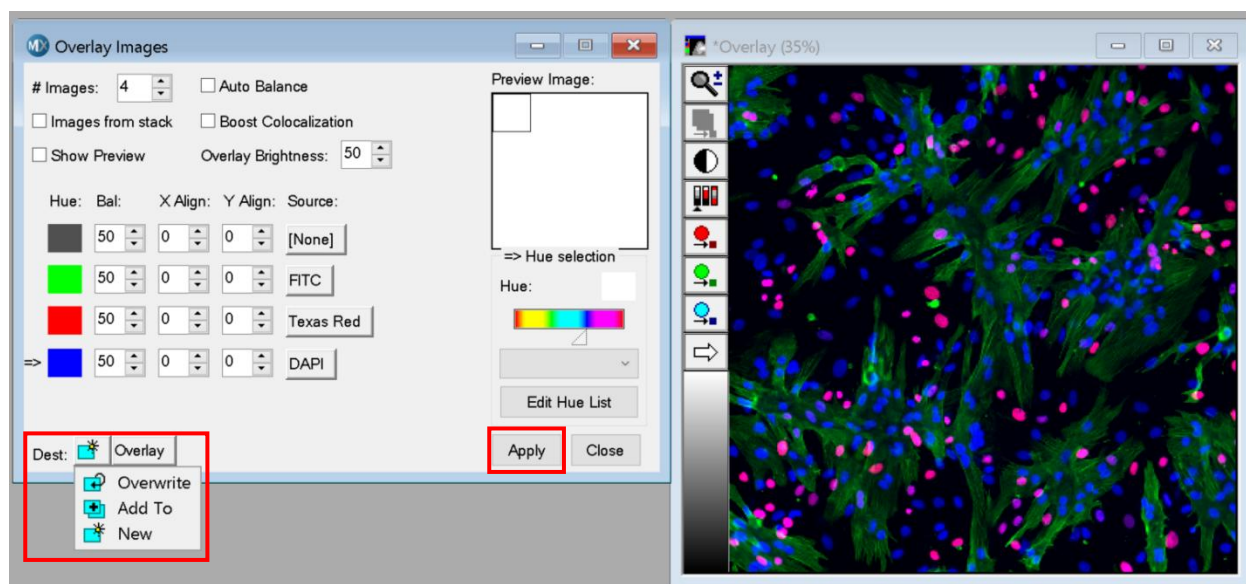


7) 生成的叠加图像具有源图像的特征，例如，在源图像中增加亮度和对比度也会在叠加图像中增加。如果启用显示预览图像（Preview Image），则可以对原图像进行调整，如增加对比度或缩放强度范围，将在预览中更新。



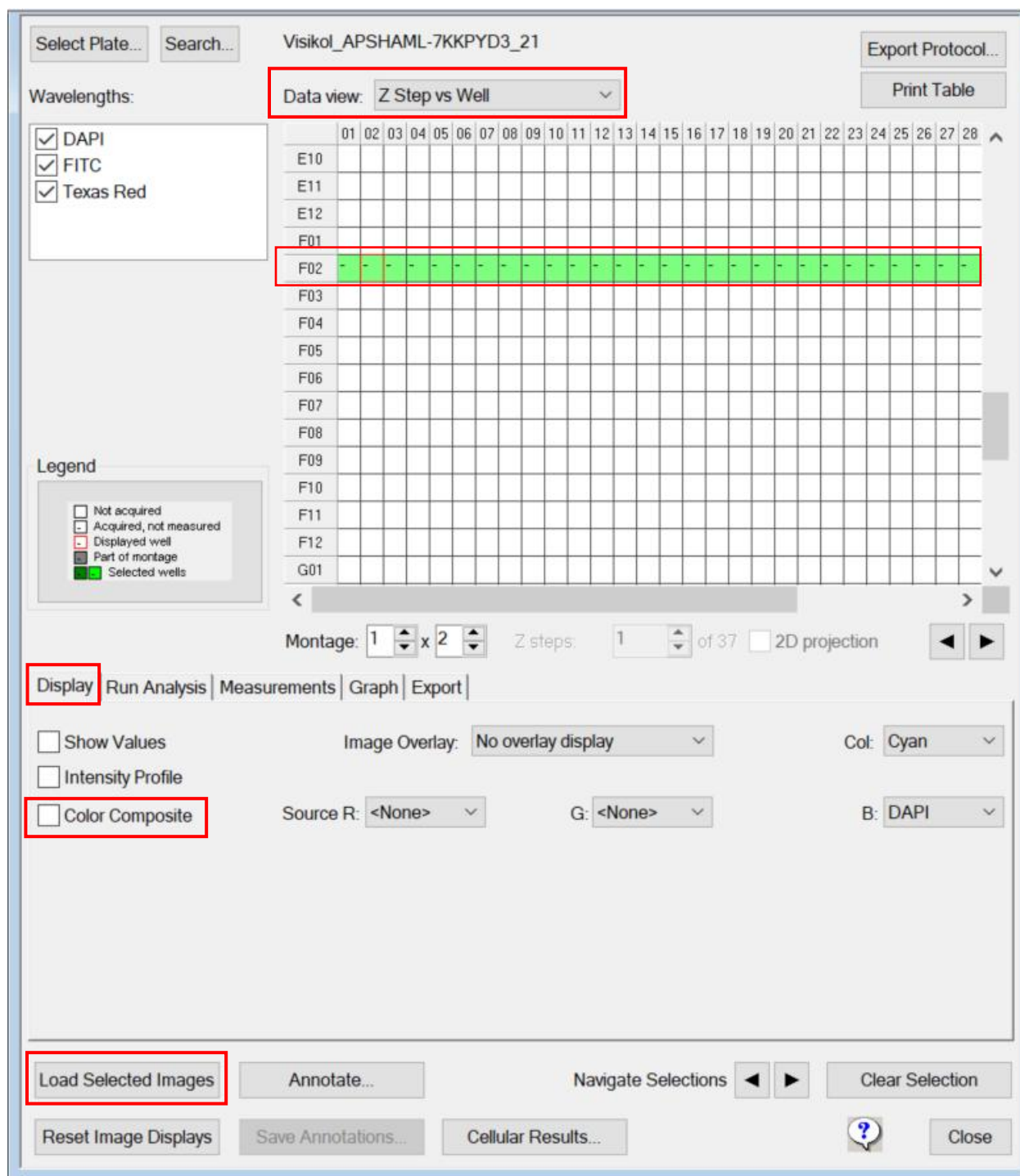
8) 点击 **Apply** 生成不同通道图像叠加的彩色图像（24 bit）。如果要保存叠加图像，右键点击图像，选择 **save as**，可直接保存为 Tif 格式图像。

注：每次点击 **Apply**，会生成新的同通道图像叠加的彩色图像。如需要覆盖显示的图像，可点击左下角 **Dest** 进行选择。

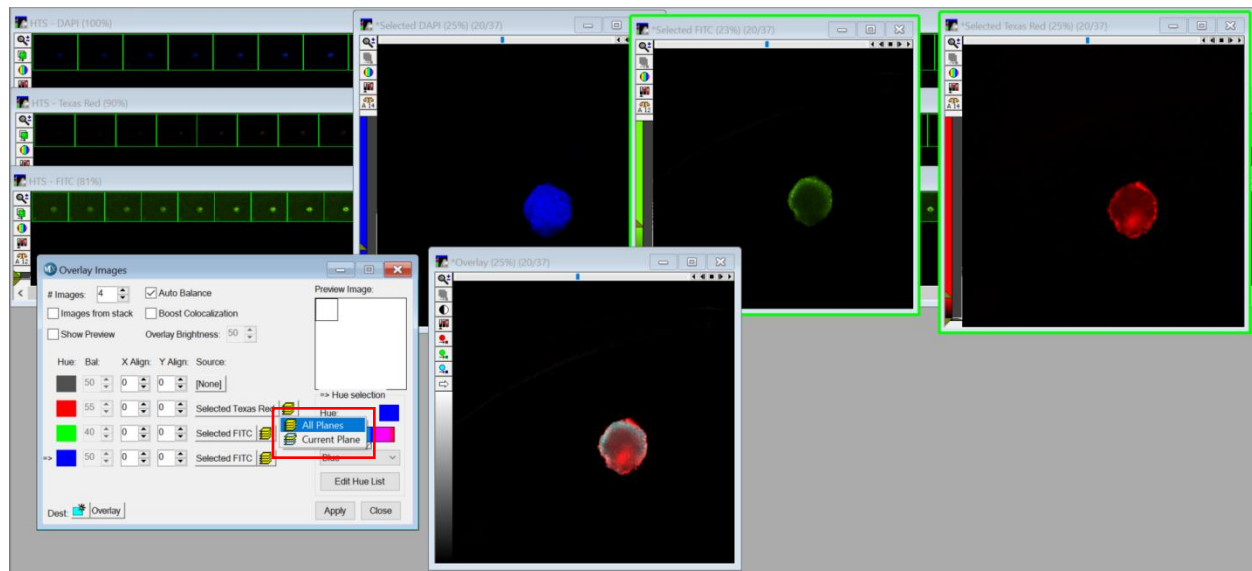


创建图集的多通道单个视野彩色图像及导出（延时成像或多层扫描）

- 1) 对图像堆栈（Stack）添加伪彩，打开 Select Plate for Review ， 选择要查看的数据。
- 2) 在 **Data View** 中，选择 “Time Point vs Well” 或 “Z Steps vs Well ”。
- 3) 点击鼠标右键，选择一个孔中所有的时间点或 Z 层面范围。
- 4) 在 **Display** 中，取消选择 “Color Composite”。
- 5) 单击 **Load Selected Images**， 创建延时成像或多层扫描的堆栈。

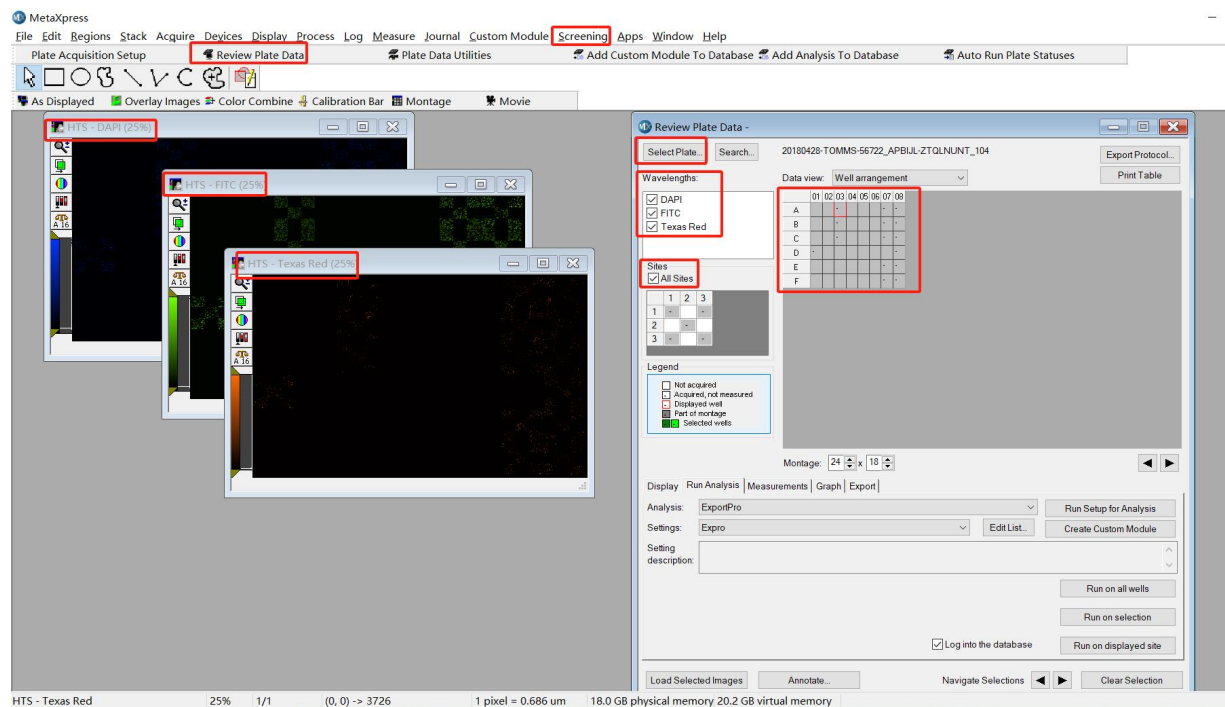


6) 在主工具栏 Edit—Display--Overlay Images。选择”All Plane”生成所有堆栈的伪彩图像。

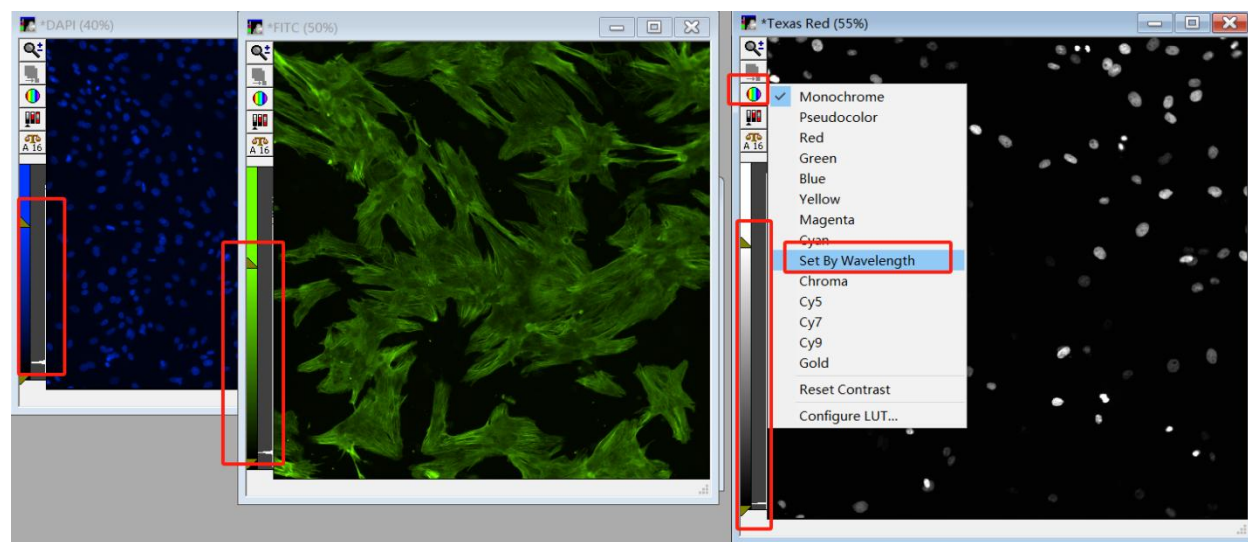


3. 彩色图像的批量导出

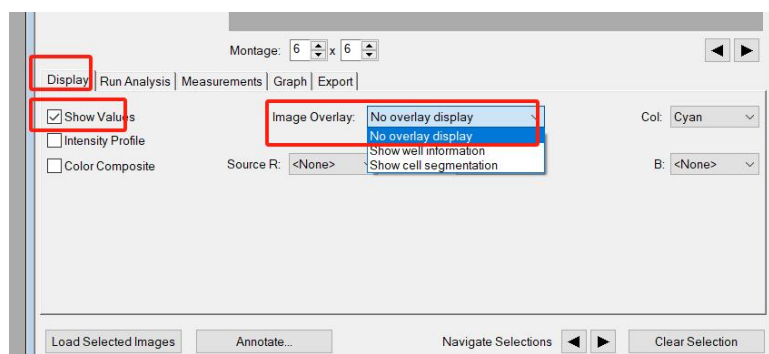
1) 打开 **Review Plate Data**，点击 **Select Plate**，选择要导出的图片文件，勾选相应的 Wavelengths、sites 及 wells，从而打开 HTS 缩略图。



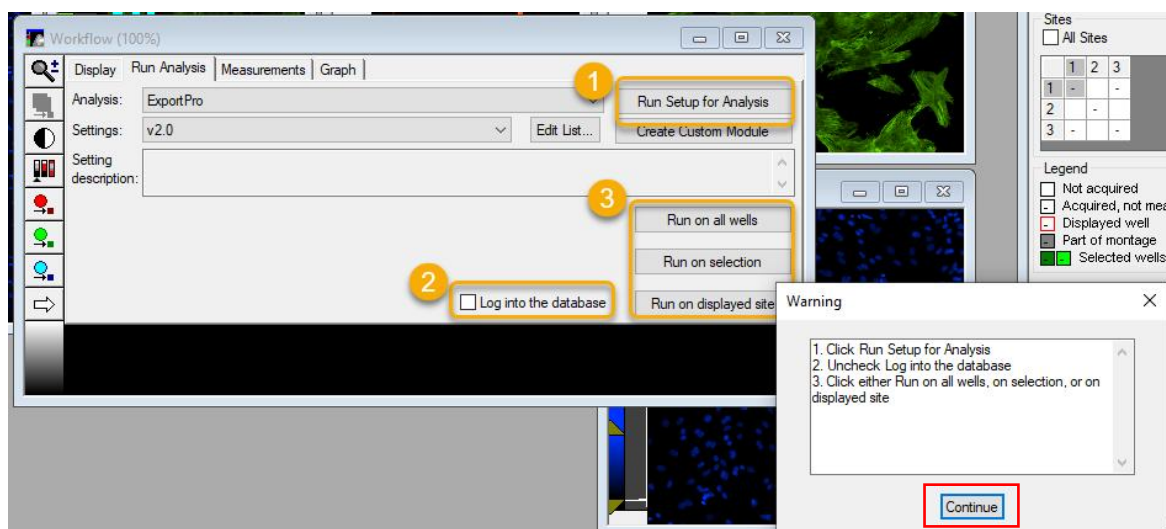
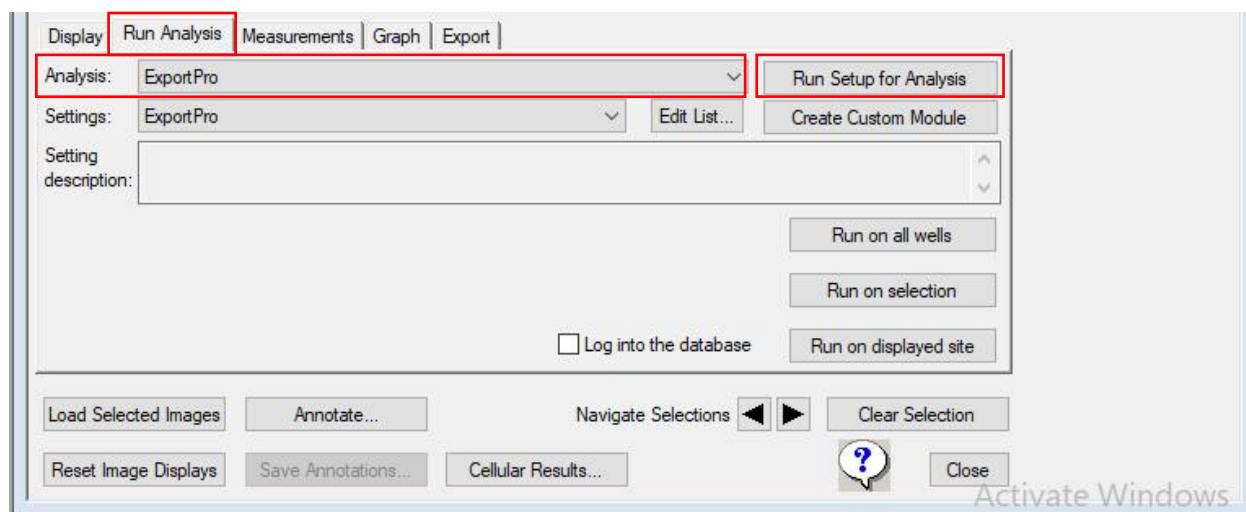
2) 随意点击某个视野，可打开各个通道的高清图，若伪彩颜色有误，可点击左侧 **LUT** 调节，选择 **Set By Wavelength**（或直接选择颜色）。**注：**可提前调节好各个图片的对比度。



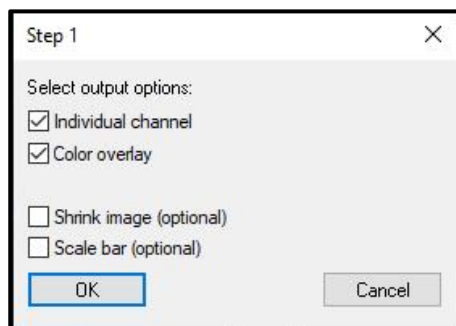
3) 如果图像已经分析过，在 **Display** 界面的 **Show Values**，选择 **No overlay display**。



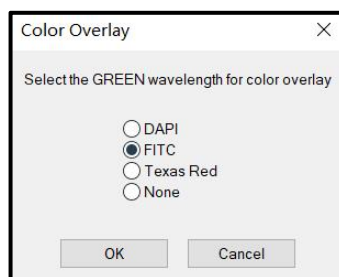
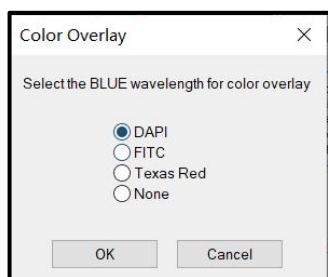
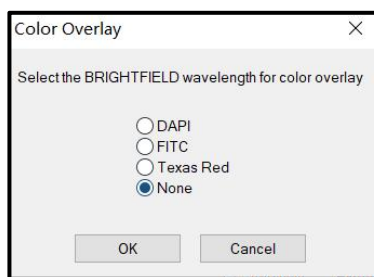
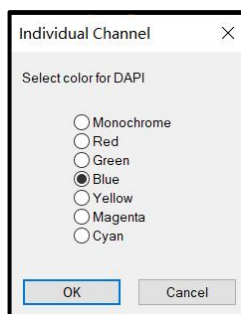
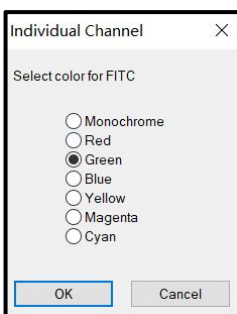
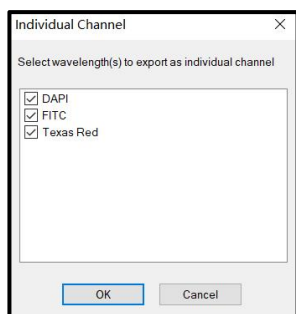
4) **Run Analysis** 界面的 **Analysis**，选择 **ExportPro**，点击 **Run Setup for Analysis**，此时会弹出 **Workflow** 及 **Warning** 界面，点击 **Continue**，进入 **Step 1**。



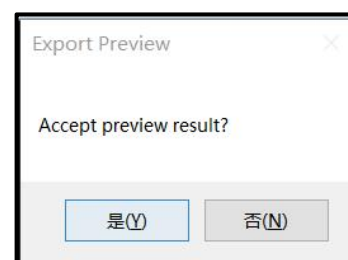
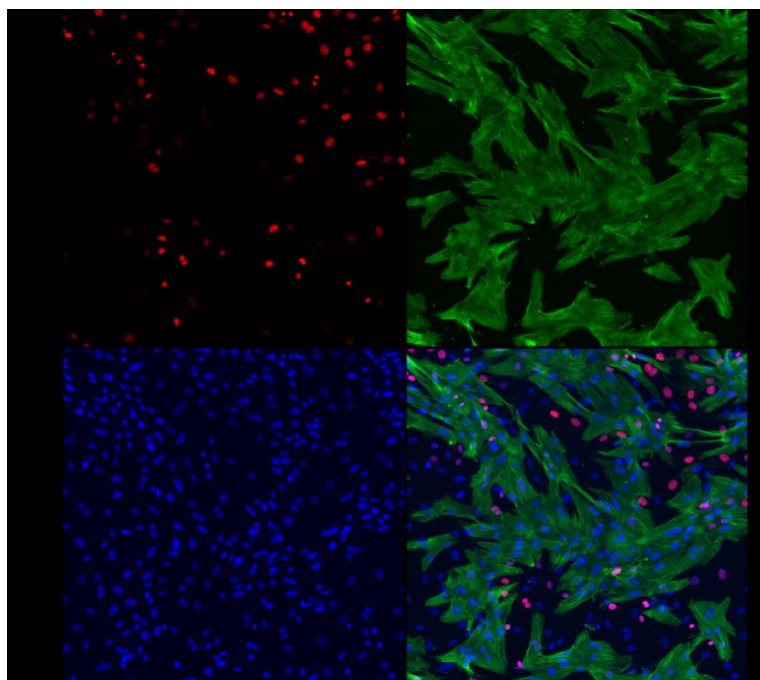
5) 如果需要单通道图像, 勾选 **Individual channel**, 如果需要叠加图像, 继续勾选 **Color overlay**。此处不建议勾选 **Shrink image** (缩略图) 及 **Scale bar** (比例尺)。点击 **OK** 继续。



6) 勾选要导出单通道的 **wavelength**, 为每一个 **wavelength** 选择相应的颜色, 确保 **Color Overlay** 的颜色所对应的通道与前面一致, 点击 **OK** (若无透射光通道, **Brightfield** 选择 **None**)。

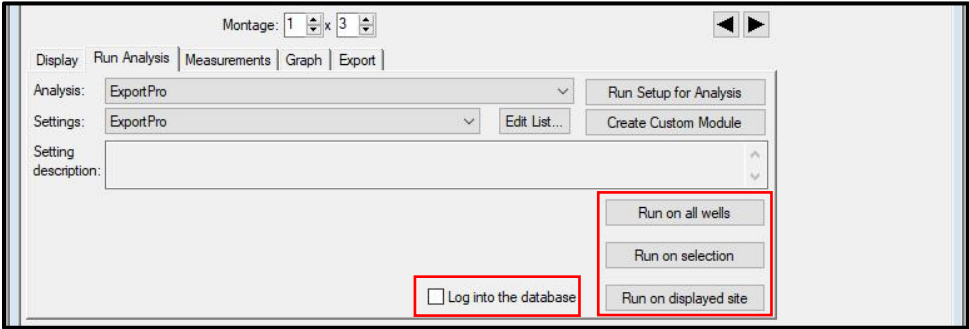


7) 操作完以上步骤后出现单通道及 **Overlay** 图片, 点击鼠标左键, 若无误在弹出的 **Accept preview result** 对话框选择是/Yes, 指定存储路径, 点击 **OK**。此时已设置完图像导出程序, 但图像仍未导出。

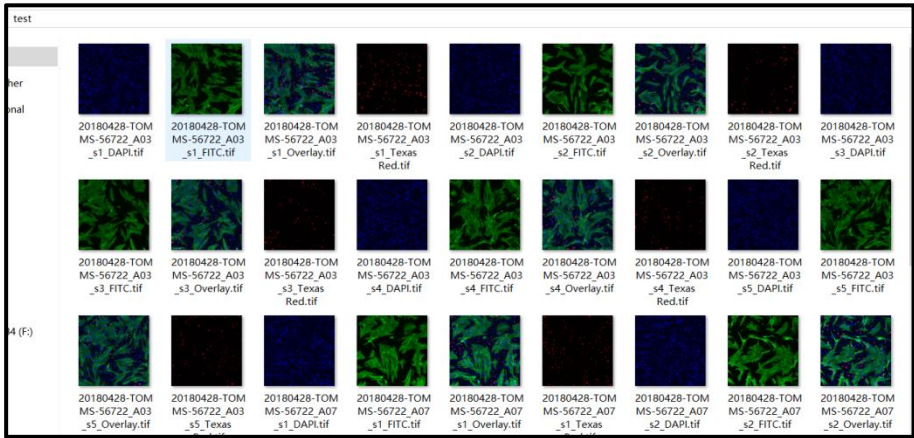


8) 在 Run Analysis 界面有 3 个选项，Run on all wells 表示导出所有图像，Run on selection 表示仅导出被选中为绿色的孔的图像，而 Run on displayed site 表示仅导出当前已打开的视野的图像。

注：确保 Log into the database 未勾选，否则彩色图像将保存入数据库，占据数据库空间。



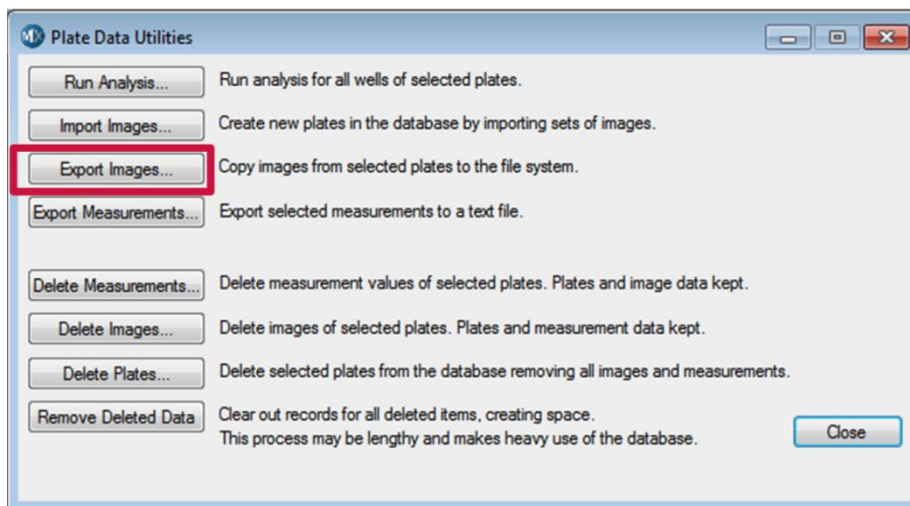
9) 在指定路径下可以查看导出的图像。



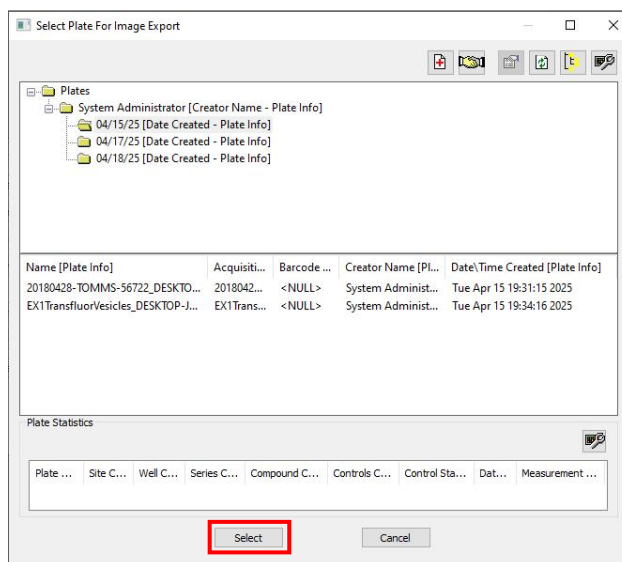
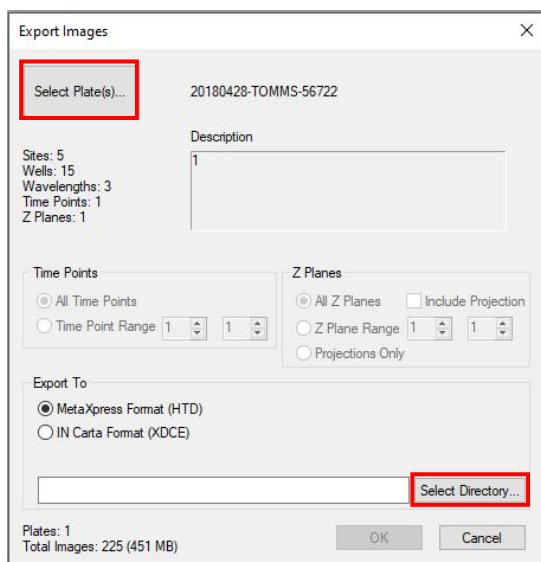
4. 原始图像的导出及导入

原始图像的导出

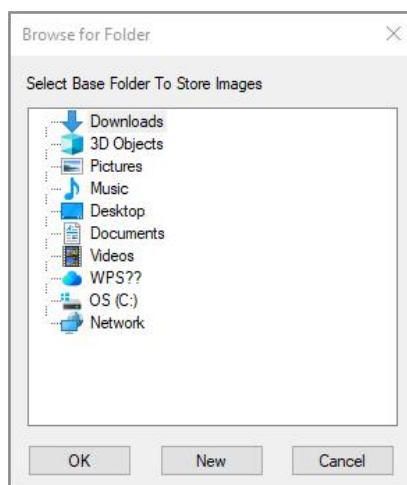
- 1) 打开 **Plate Data Utilities**，点击  **Plate Data Utilities** 或 **Screening--Plate Data Utilities**。
- 2) 在弹出的界面点击 **Export Images...**。



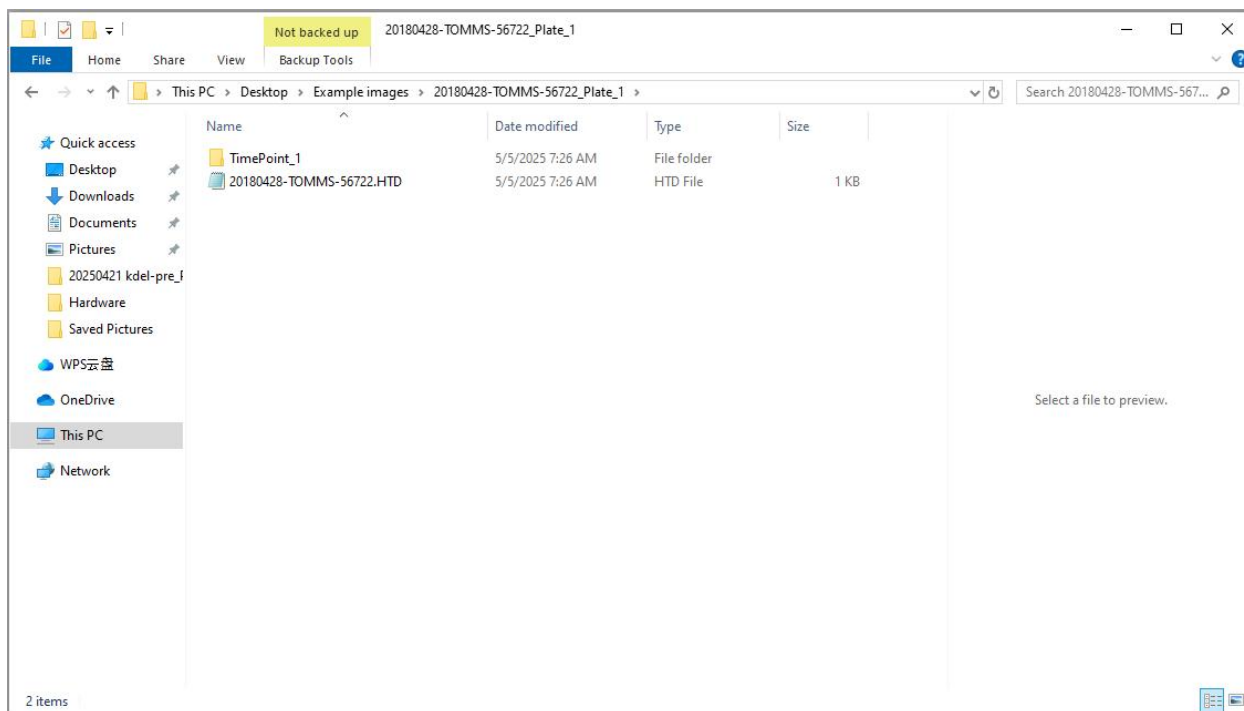
- 3) 在 **Export Images** 界面点击 **Select Plate(s)...**，打开 **Select Plate For Image Export** 界面，双击要导出图像所在的文件夹，选择要导出的图像，可以 ctrl 或 shift 选择多组图像。点击 **Select**。



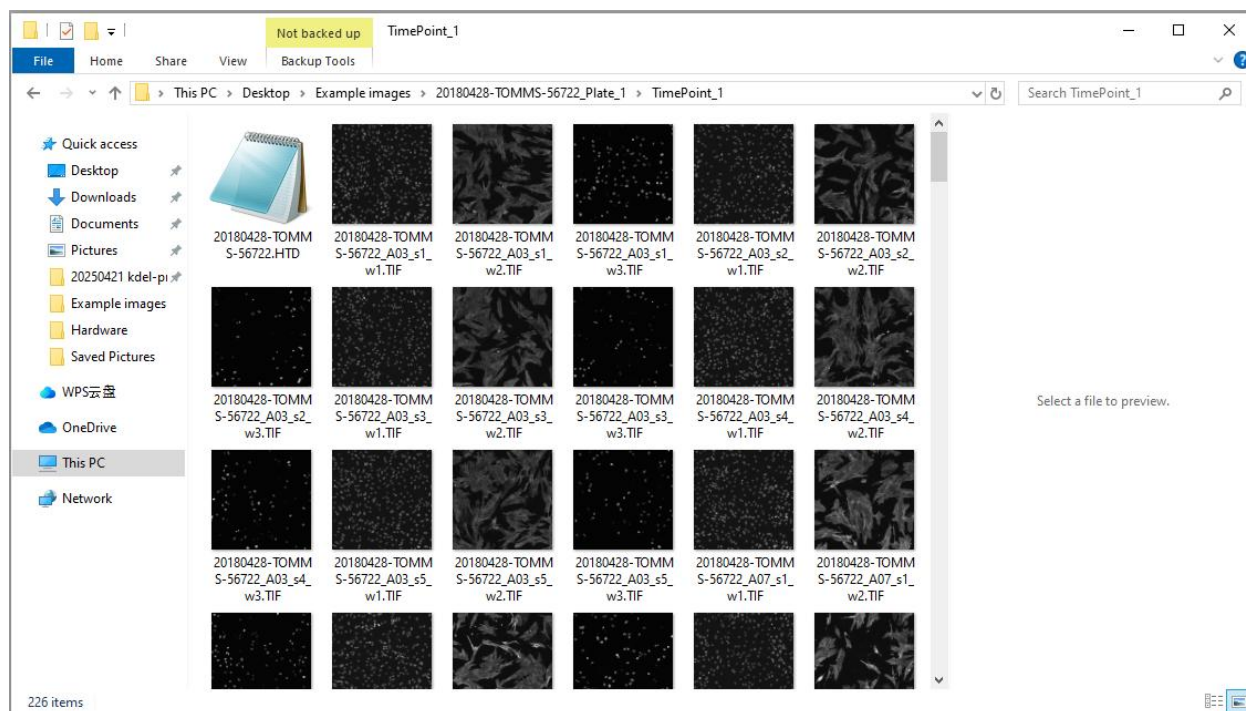
4) 此时返回 **Export Images** 界面，点击 **Select Directory...**，指定导出路径（文件夹）。



5) 路径确定后，返回 **Export Images** 界面，点击 **OK** 即可导出。打开文件夹，可以看到生成的 HTD 文件，该文件会记录孔板类型、采集的孔、视野数、通道等信息，一定要保留，后续图像导入会用到。

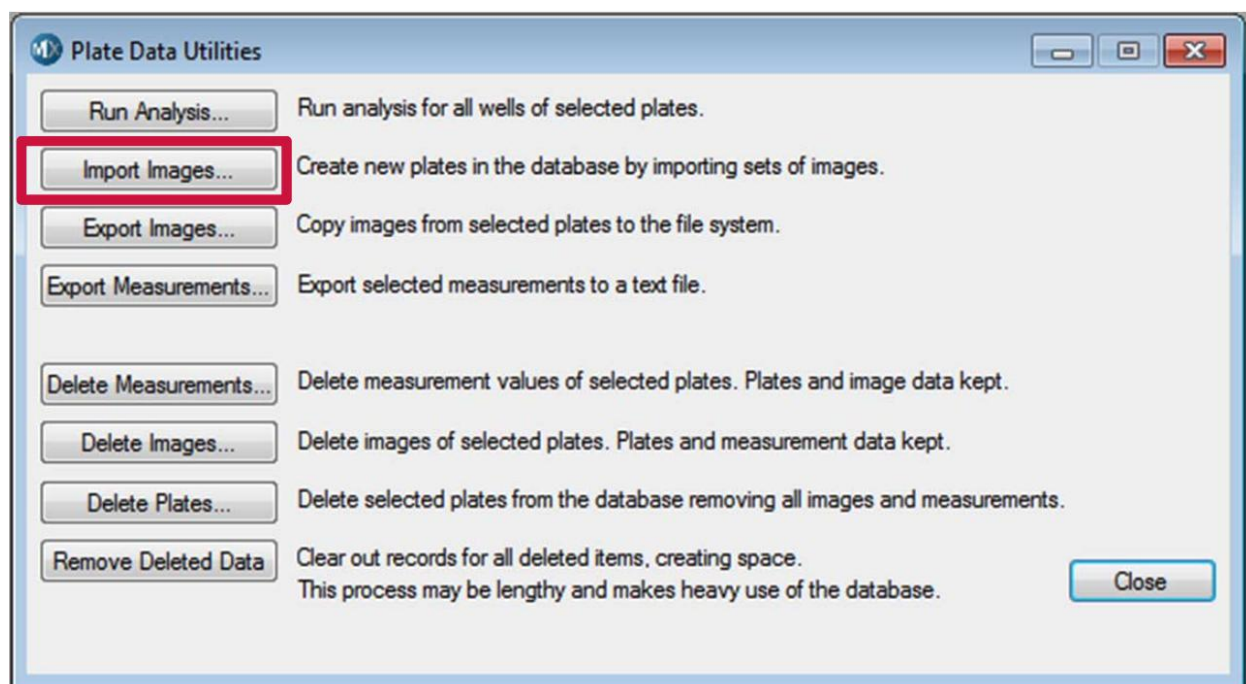


6) 进一步打开 Timepoint_1 文件夹，可以看到另一个 HTD 文件，图片的命名按照孔板_孔_视野_wavelength。如果要保存导出的原始图像要保存路径选择的文件夹，并保持内部文件完整，不做更改。

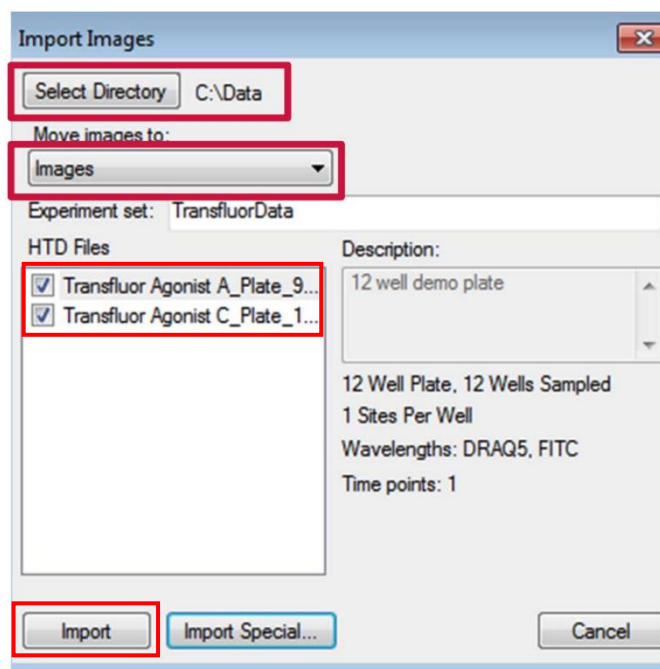


原始图像的导入

- 1) 打开 **Plate Data Utilities**，点击  **Plate Data Utilities** 或 **Screening--Plate Data Utilities**。
- 2) 在弹出的界面点击 **Import Images...**。



3) 在弹出的 **Import Images...** 界面点击 **Select Directory...**，选择要导入图像所在的文件夹，在 **Move images to** 下拉框可以选择要导入的位置（或者默认位置即可）。**HTD Files** 下勾选要导入图像对应的 HTD 文件。点击 **Import** 即可。



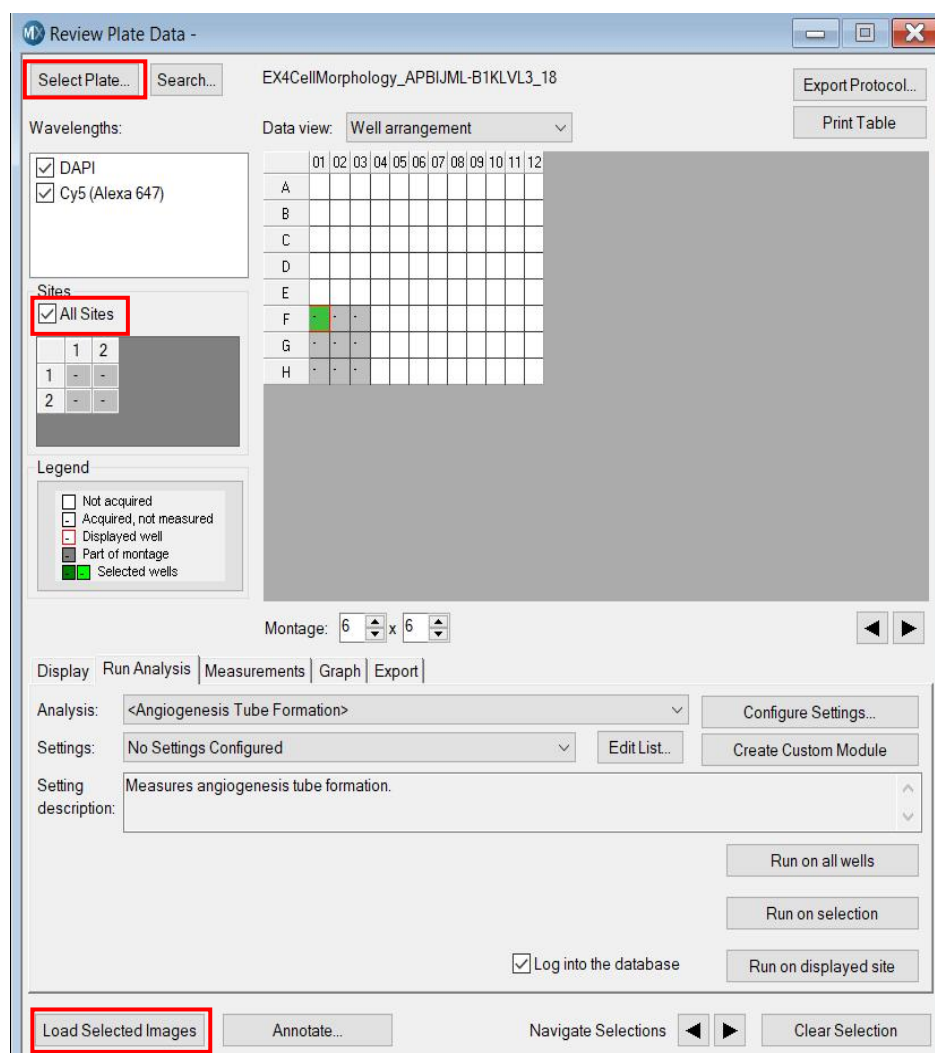
4) 若要查看导入的图像，打开 **Review Plate Data** 即可查看。

5. 图像的拼接及视频生成

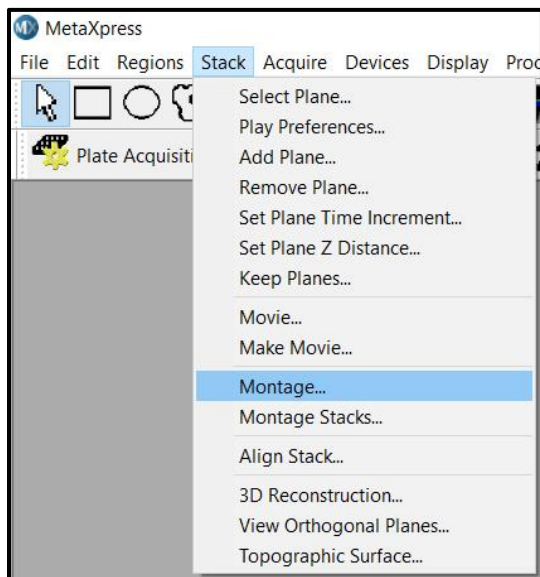
图像拼接

1) 打开 **Review Plate Data**，点击 **Select Plate**，选择要拼接的图片文件，勾选相应的 Wavelengths，勾选 All Sites，鼠标右击选中要拼接的孔，每次只选一个，点击 Load Selected Images 加载图像文件为 stack 文件。选择最亮的视野，调节对比度。

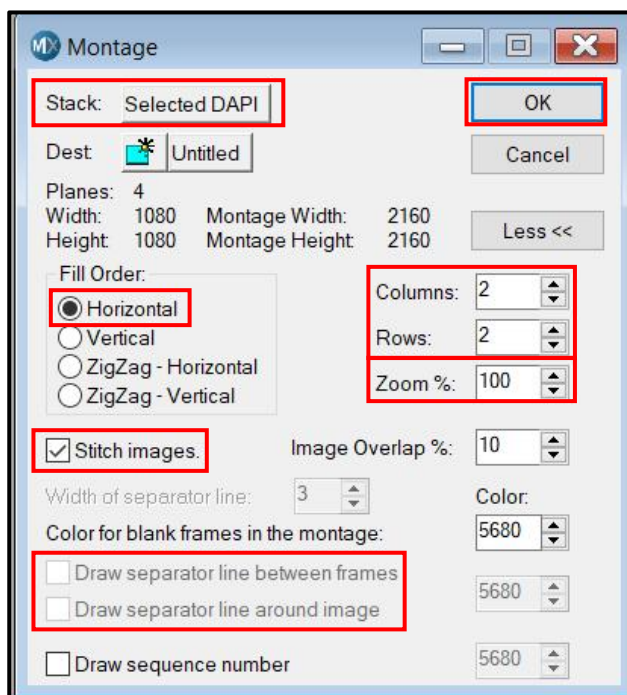
注：可以一次加载多个 wavelength，生成各自的 stack 文件，但不可以一次加载多个孔。



2) 按照 Edit--Stack--Montage（或 Stack—Montage）打开 **Montage** 界面。



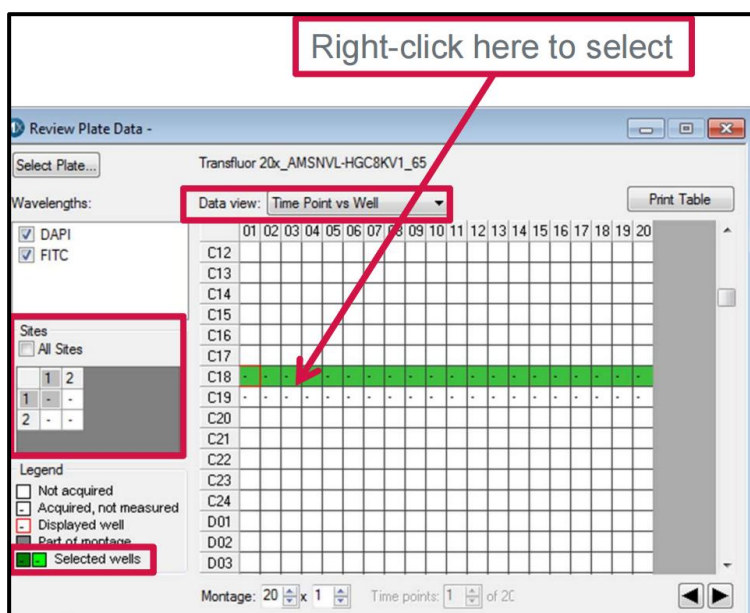
3) **Montage** 界面，先在 Stack 右侧选择要拼图的 wavelength，勾选 Horizontal 模式，Columns 和 Rows 的输入框中会自动生成拍摄时设定的 Sites 排列方式，确认无误即可。如果拍摄时在 Sites 里选择了 Overlay sites 10%，则需要勾选 Stitch Images，并将 Overlay 比例设为 10%。Zoom% 可以缩放拼接图像的比例，如果原图非常大，可能导致电脑无法直接打开，可以选择一定比例缩小拼接大图，以便打开查看。Draw separator line 一般不勾选。设置完成后，点击 OK，即可生成拼接图像。多个 wavelength 的拼接图像可以进一步叠加。



视频生成

视频的生成不仅仅包括 Timelapse 图像生成的视频还包括 Z-series 图像生成的视频。

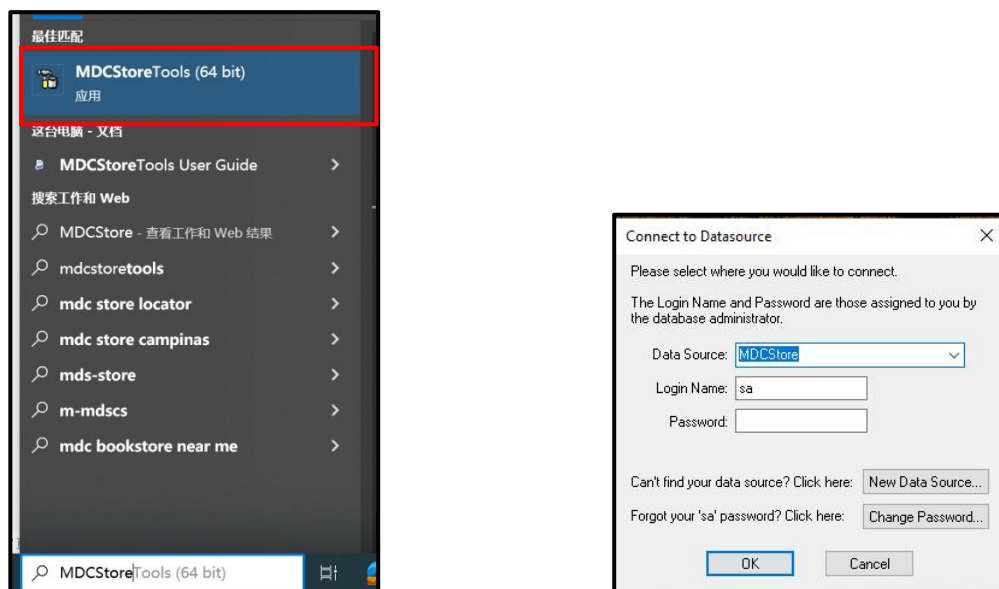
1) 打开 **Review Plate Data**，点击 **Select Plate**，选择要生成视频的图片文件，勾选相应的 Wavelengths。Data view 切换到 Z Step vs Well 或者 Time Point vs Well。右击选中某个孔中的 Time series 或 Z series 图像，此时该孔图像都变为绿色。



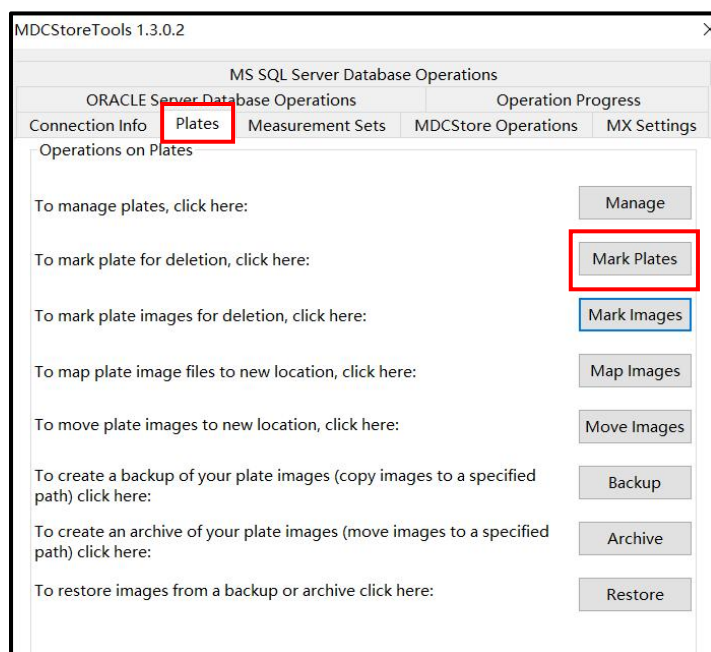
6. 图像的彻底删除

本章节的方法为彻底删除 Plate,包括采集的图像,分析生成的 mask 及数据。

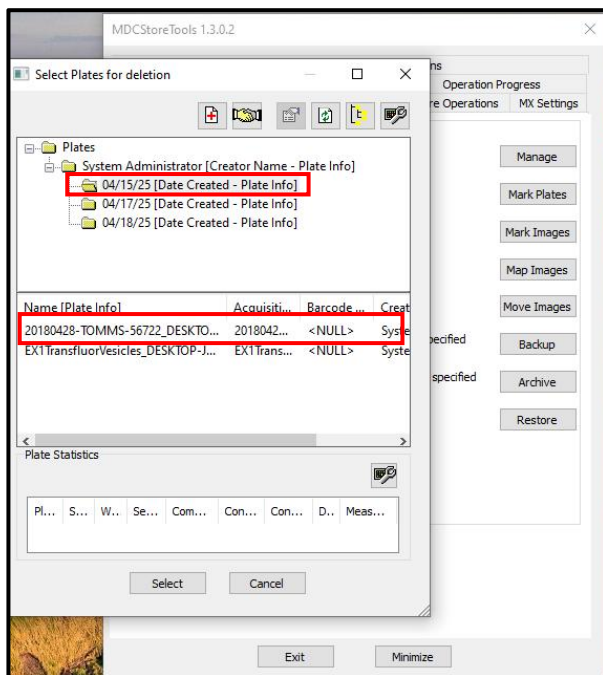
1) 在电脑系统开始的搜索框中输入 MDCStoreTools, 单击打开 MDCStoreTools 应用程序, 输入账号及密码即可进入。(账号密码为 MDCStore 数据库的, 同 MetaXpress 一致)



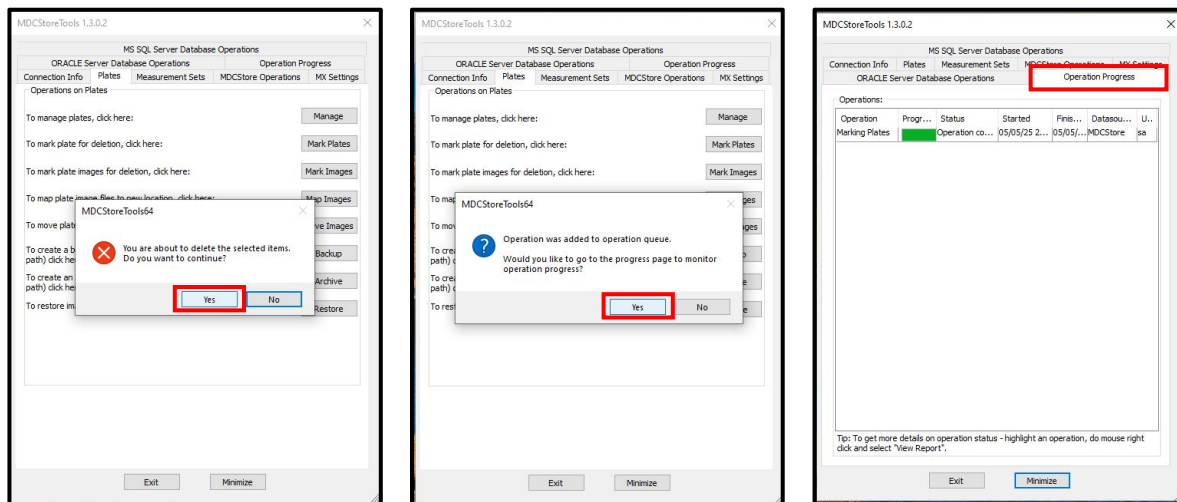
2) 在 MDCStoreTools 界面找到 Plates 标签, 点击 Mark Plates。



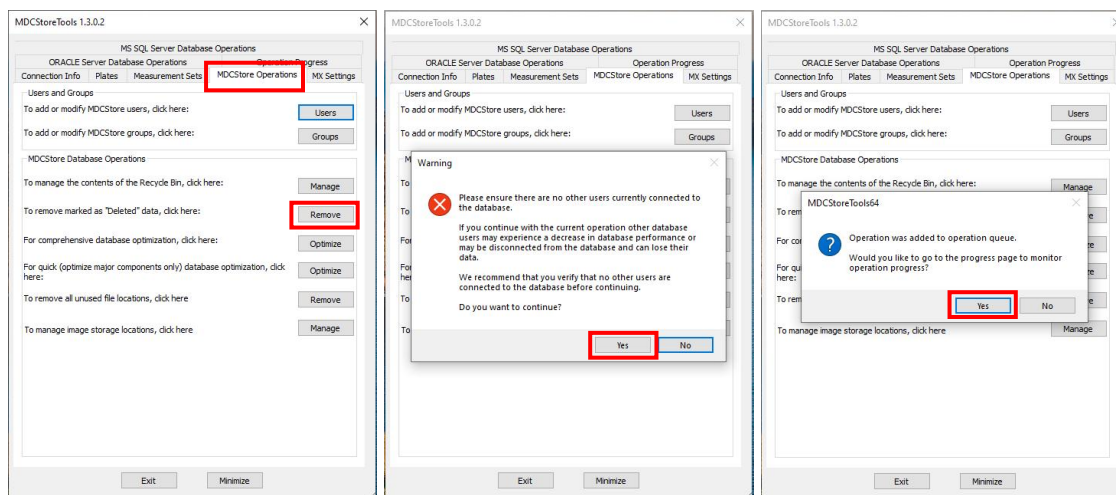
3) 在弹出的 Select Plates for deletion 界面，选择相应的 plate。



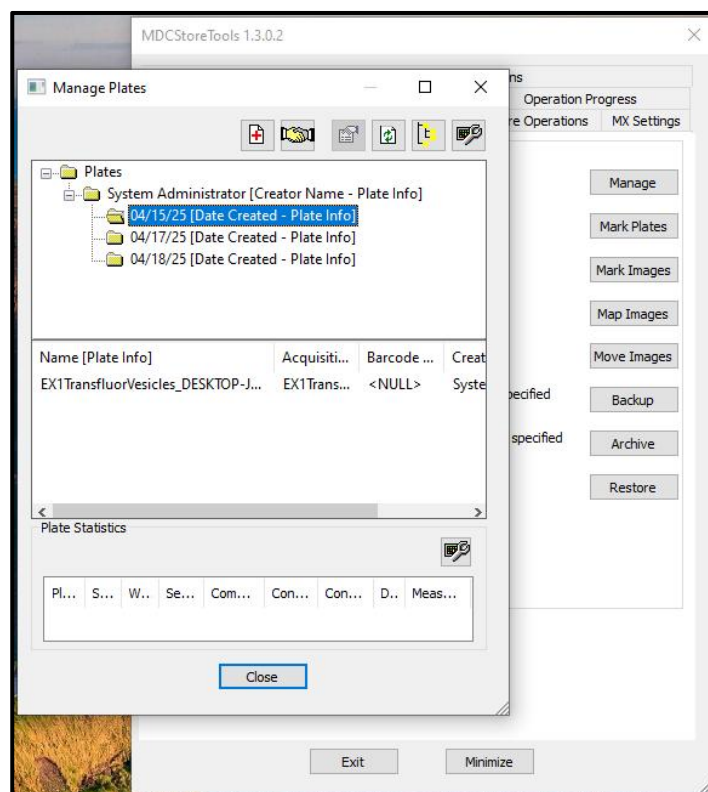
4) 点击 **Select**，在弹出的提示框点击 **Yes**，最后会跳转到 Operation Progress 显示 Plate 已经被 mark 完成。



5) 点击 **MDCStore Operations** 标签，并在 To remove marked as “deleted” data, click here 右侧点击 **Remove**。并在接下来的提示框点击 **Yes**，即可彻底删除 Plate。



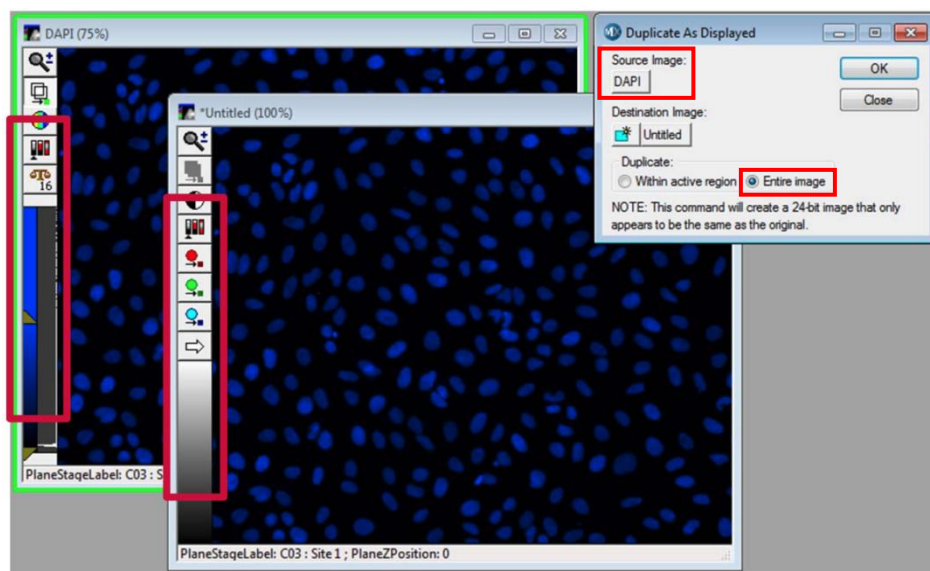
6) 当我们再次查看 Plate 时，可以看到原先的 Plate 已经被彻底删除。



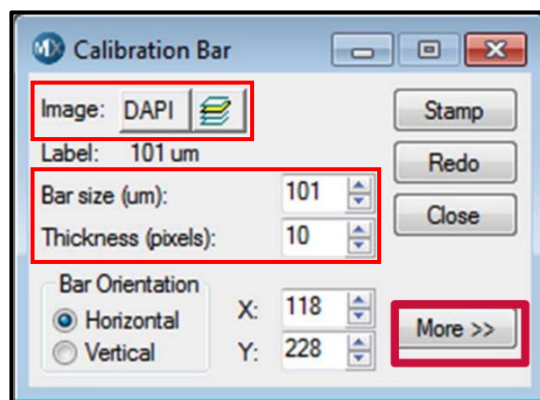
7. 图像添加标尺

1) 打开要添加标尺的高清图像，按照 Edit--Image--Duplicate As Displayed 将图像转换为 24bit 图像。在 **Duplicate As Displayed** 界面，Source Image 下选择要添加标尺的图像 wavelength，在 Duplicate 部分选择 **Entire Image**，点击 OK，此时复制出了一张 24bit 图像。

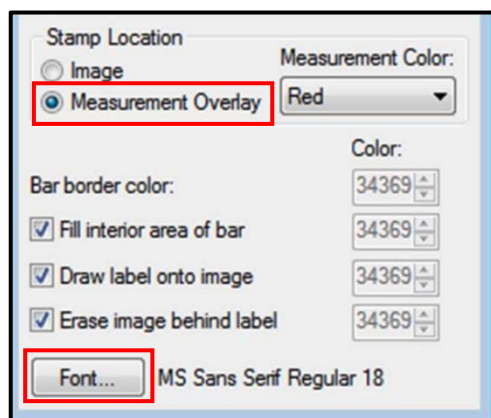
注：高内涵采集到的图像为 16bit，如果对 16bit 图像加标尺，标尺的颜色跟图像的伪彩是一致的，而 24bit 则可以随意选择标尺颜色。



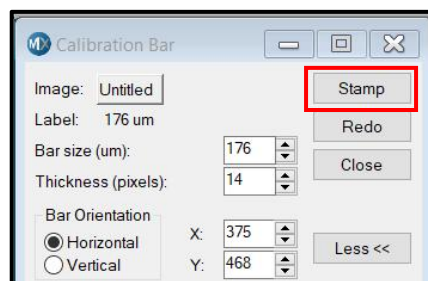
2) 按照 Edit--Graphics--Calibration bar 打开 **Calibration bar** 界面，在 Image 右侧点击选择要添加标尺的图像（此处为 Untitled），Bar size 处设置标尺长度，Thickness 设置标尺的粗细，在图像上拖动活动框可以选择标尺添加的位置。



3) 点击 **More>>** 扩展更多选项，在 Stamp Location 下选择 **Measurement Overlay**，并在 Measurement Color 下拉框选择标尺的颜色。点击 **Font** 可调整标尺的字体、格式及字号等。



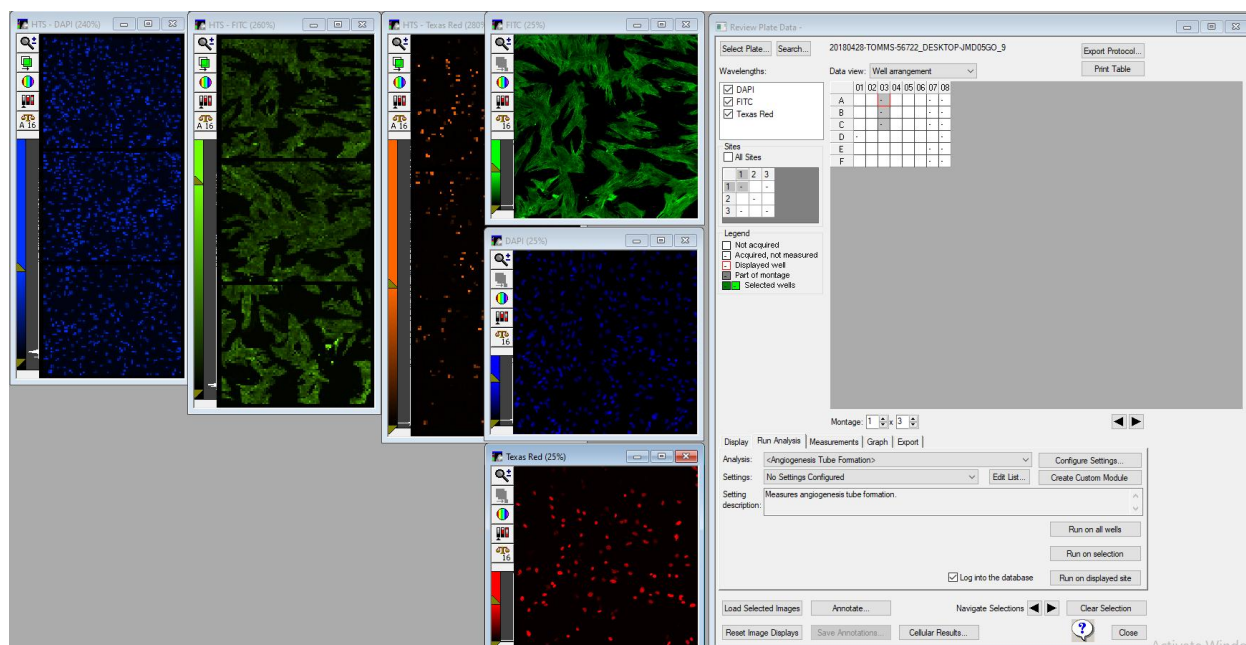
4) 所有选项设置完成后在 **Calibration bar** 界面右上角点击 **Stamp** 即可添加标尺。



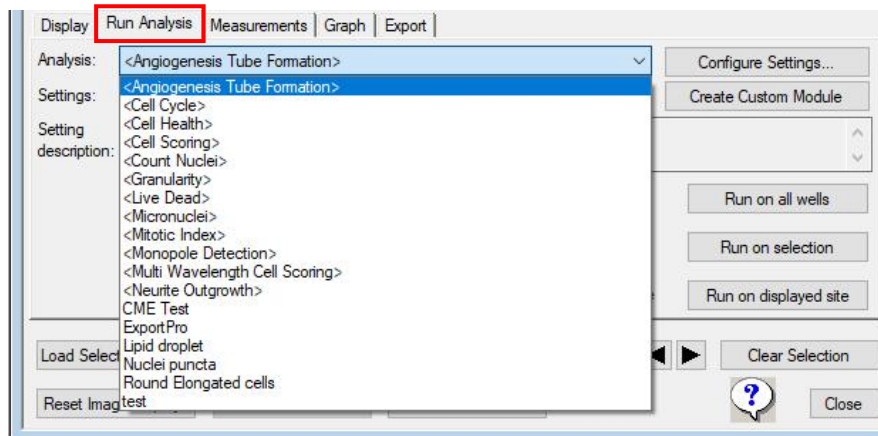
四、图像分析

1. 图像分析概论

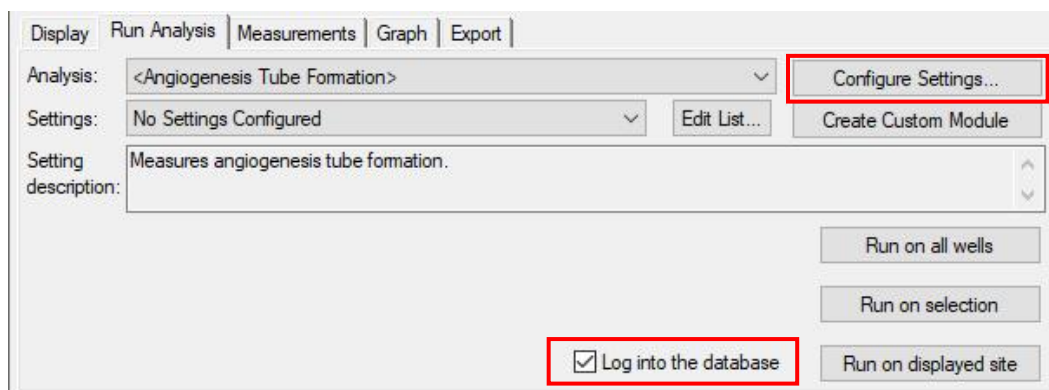
1) 打开 **Review Plate Data**，点击 **Select Plate**，选择要分析的图像，勾选相应的 Wavelengths，鼠标左键滑动选取要打开图像的孔。此时各个 wavelength 的 HTS 图像打开，点击任一 site，打开高清图像。



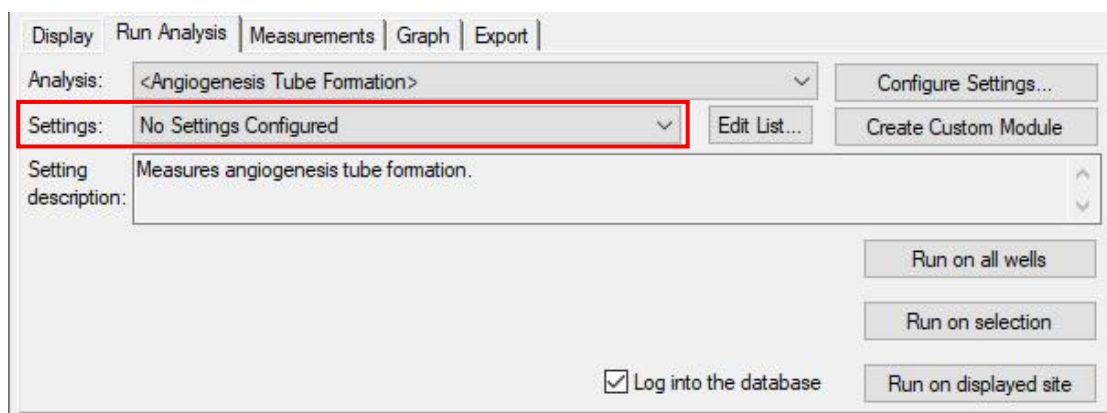
2) 点击 **Run analysis** 标签，并在下方 Analysis 右侧的下拉框选取要用的常规分析模块。其中带<>的为常规模块，不带的为 CME 或 journal。



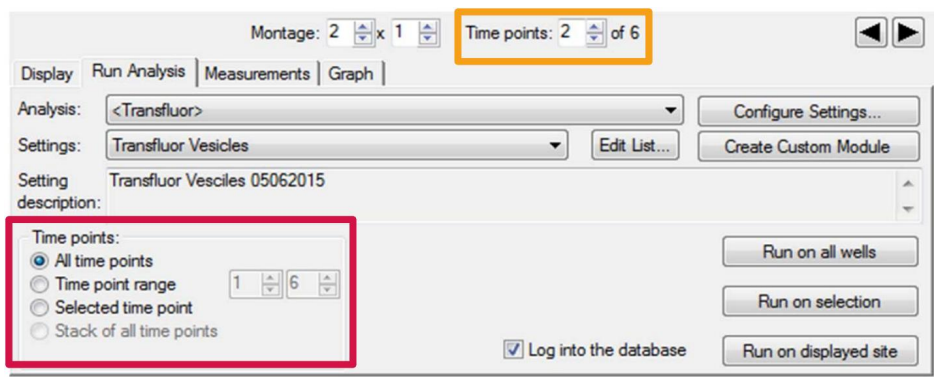
3) 勾选 **Log into the database**，将分析后的数据及生成的 mask 保存到 database 中。点击 **Configure Settings**，对模块进行设定。



4) 设定完成后，在 Settings 右侧会自动显示刚刚新建的 setting 名称。点击 **Run on all wells** 对所有孔进行分析，**Run on selection** 对右击选中的绿色孔进行分析，**Run on displayed site** 对已打开的高清图像进行分析。



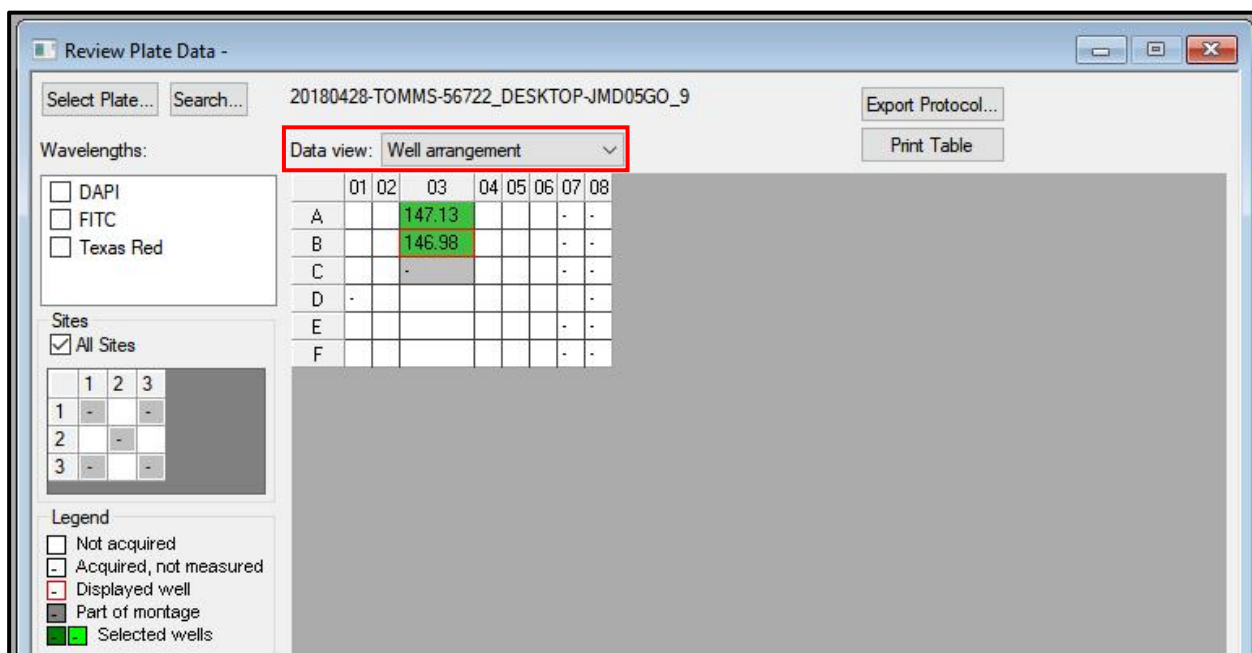
5) 对于 Timelapse 图像，选择 **All time points** 对所有时间点的图像进行分析，选择 **Time point range** 可以选要分析的时间段，**Selected time point** 即当下正查看的时间点。



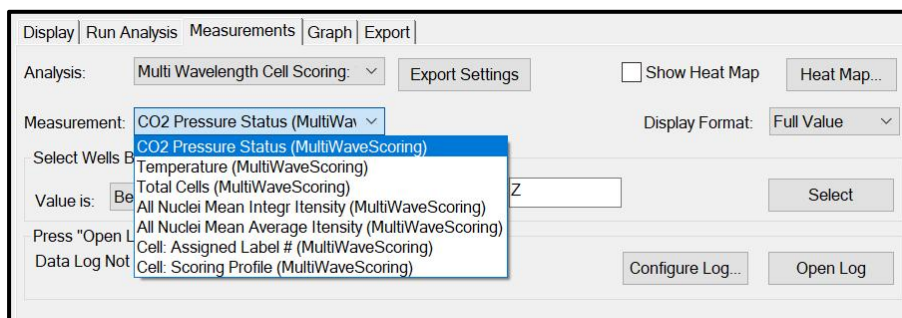
6) 对于 Z series 图像，选择 All Z steps 表示分析每一层的图像，Z step range 则表示分析某一段层面的图像，Selected Z step 则表示分析正在查看的这层图像，2D projection 表示对 2D 投影进行分析。

2. 分析结果 Measurements 的导出方法

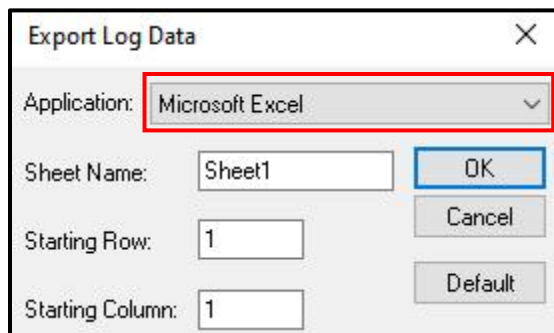
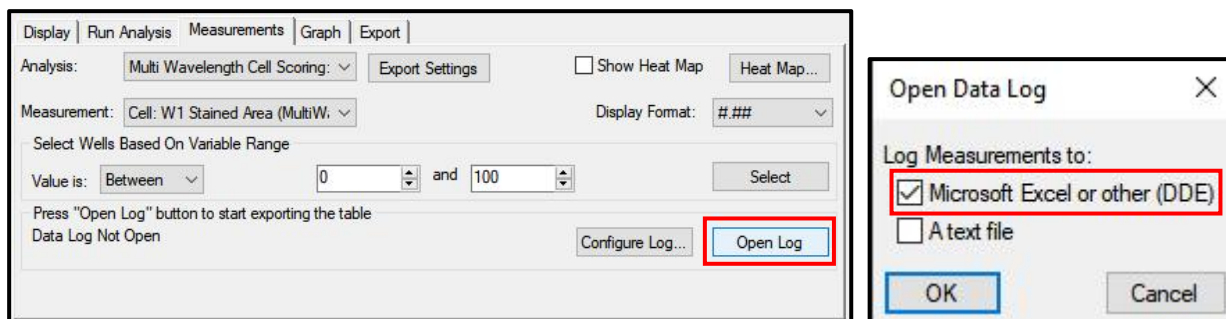
1) 在 **Review Plate Data** 界面，通过 Select Plate 选好要导出数据的孔板，然后在 Data View 选择 **Well arrangement**。如果有多个 sites，想导出每孔多个 sites 的平均值，则在 Sites 处勾选 All sites，若想导出某个 site 的值，则在 sites 处选择某个 site，该 site 会变深灰色。



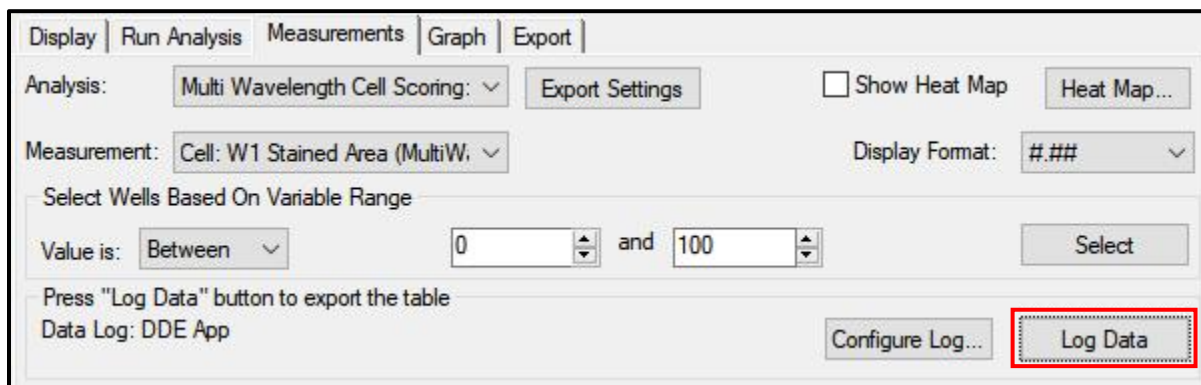
2) 去 Measurement 界面，选择想要导出的参数。



3) 点击右下角的 **Open Log**，在接下来的对话框选择 Microsoft Excel，继续点击 OK，会自动打开一个空白的 Excel 表格。然后会发现 **Open Log** 按键变成了 **Log Data**。



4) 点击 **Log Data**，当前 data view 界面的结果就会导出到 excel 表格上。



5) 如果需要继续导出其他分析参数，可在第 2 步里面选择其他分析参数，然后点击 **Log Data**，则新的分析参数会继续导出在 Excel 表格里。

6) 导出所需参数后，将 Excel 表格另存，关闭即可。

注：如需一次导出所有参数，则可以在 DataView 界面选择 **Measurement vs Well**，则所有参数会横向排列，所有孔会纵向排列。然后按照 3) -4) 步操作即可。

IXM & MetaXpress 常用操作指南

Select Plate...

Search...

20180428-TOMMS-56722_DESKTOP-JMD05GO_9

Export Protocol...

Wavelengths:

☐ DAPI
☐ FITC
☐ Texas Red

Sites

☒ All Sites

1	2	3
1	-	-
2	-	-
3	-	-

Legend

☐ Not acquired
☐ Acquired, not measured
☒ Displayed well
☒ Part of montage
☒ Selected wells

Data view: Measurement vs Well

Print Table

	Cell: W1 Stained Area (MultiWaveScoring)	Scoring Profile 12- (MultiWaveScoring)	Scoring Profile 1-3 (MultiWaveScoring)	Scoring Profile 123 (MultiWaveScoring)	Percentage Scoring Profile 1- (MultiWaveScoring)	Percentage Scoring Profile 12- (MultiWaveScoring)	Percentage Scoring Profile 1-3 (MultiWaveScoring)	Percentage Scoring Profile 123 (MultiWaveScoring)	Subtotal Profile 1xx (MultiWaveScoring)	Subtotal Profile 12x (MultiWaveScoring)	Subtotal Profile 1x3 (MultiWaveScoring)	Cell: W1 Integrated Intensity
A01												
A02												
A03	147.13	183.20	55.80	37.80	29.63	46.51	14.36	9.50	391.40	221.00	93.60	578079
A04												
A05												
A06												
A07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B01												
B02												
B03	146.98	192.60	65.20	54.20	30.53	42.88	14.56	12.04	449.00	246.80	119.40	589831
B04												
B05												
B06												
B07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C01												
C02												
C03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C04												

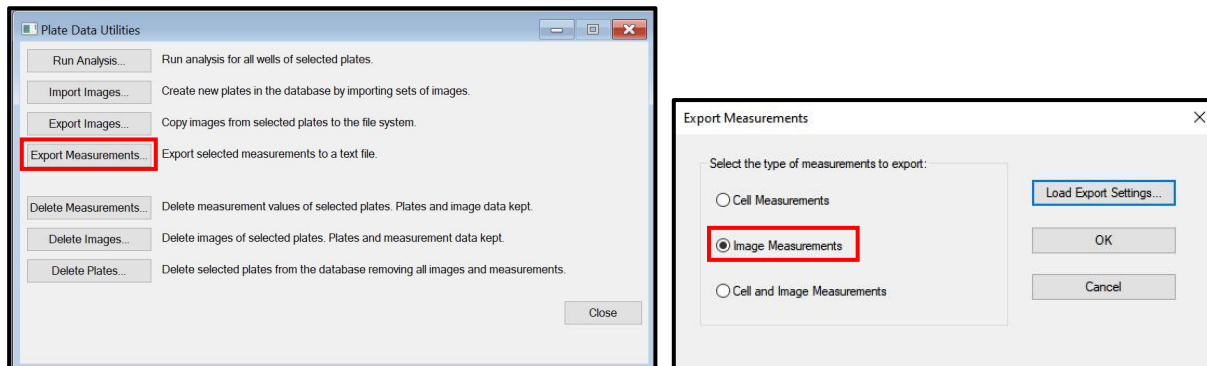
Montage: 3 x 9

◀ ▶

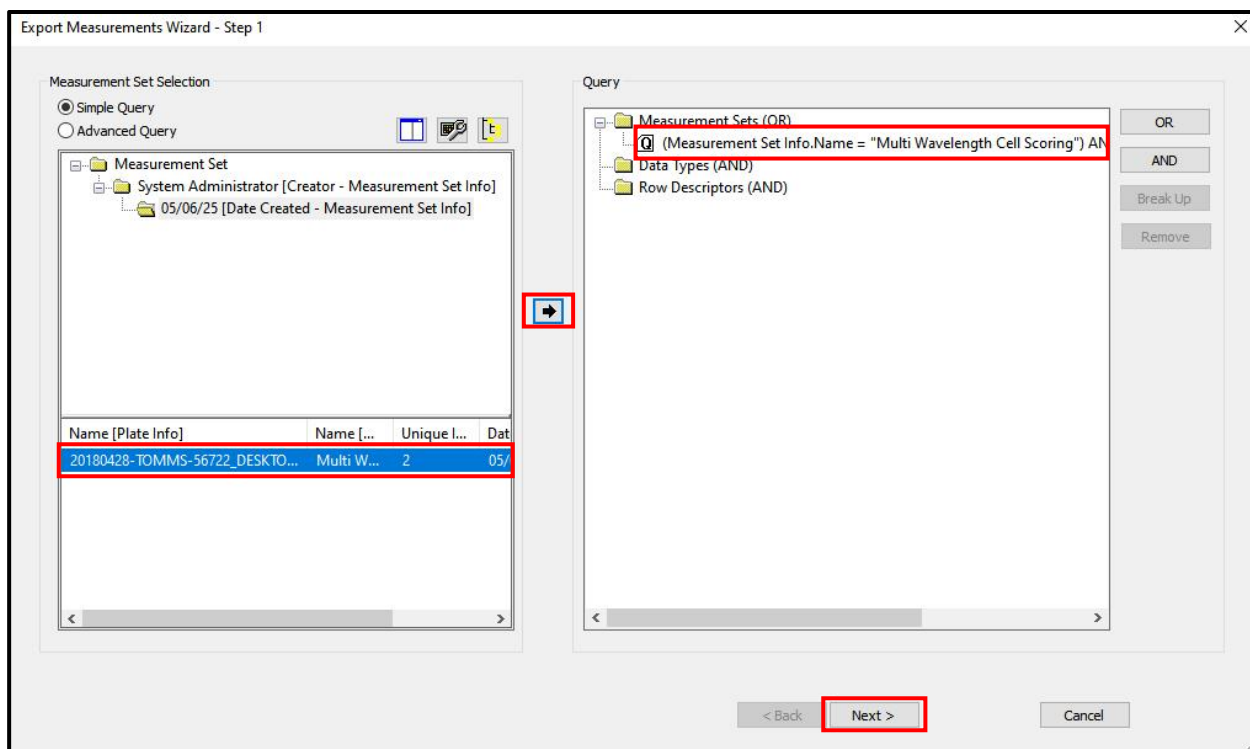
3. Cell 及 image measurements 的导出方法

每个 site Image Measurement 的导出

1) 打开 **Plate Data Utilities**，并点击 **Export Measurements**。选择 **Image Measurements**，点击 OK。



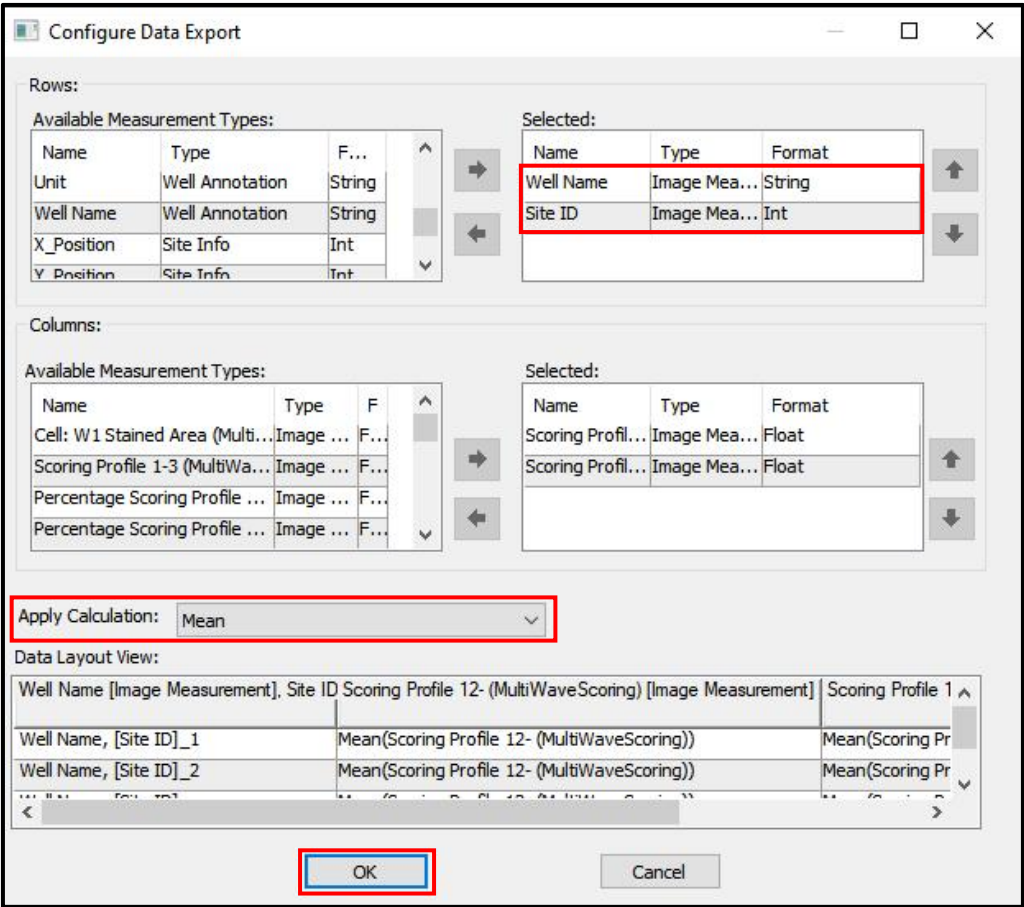
2) 选择想要导出的分析，点击向右箭头选择进入右侧 Query，点击 **Next**。



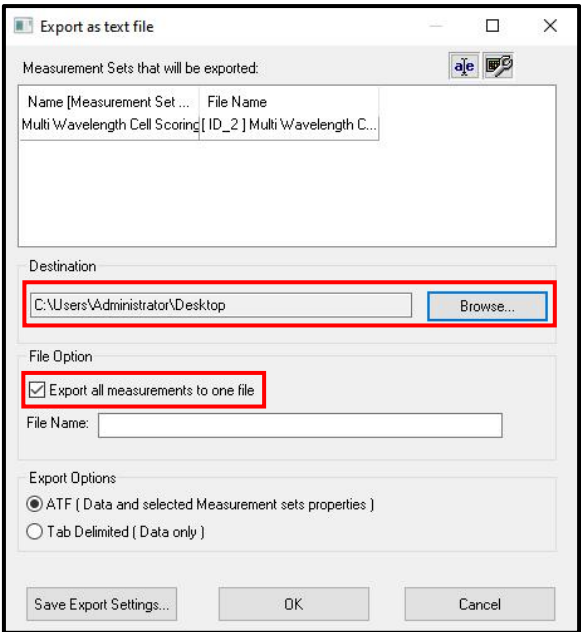
3) 在弹出的界面点击 **Finish**。

4) 在 Rows 里面，依次选择 Well Name (Image Measurement)和 Site ID。在 Columns 里面，

选择参数。在 Apply Calculation 下拉框不要选 None，可以选 Mean，Sum 等。点击 OK。



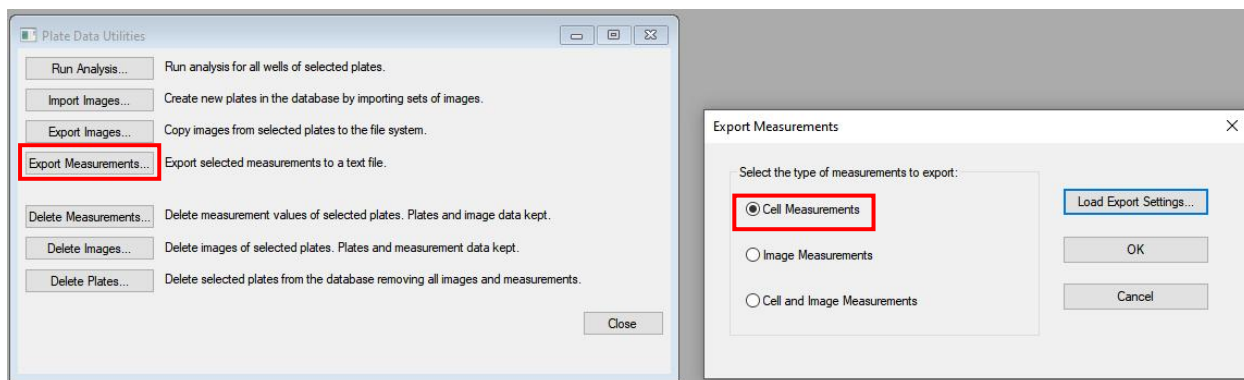
5) 确定导出位置等信息，点击 OK 进行导出操作。



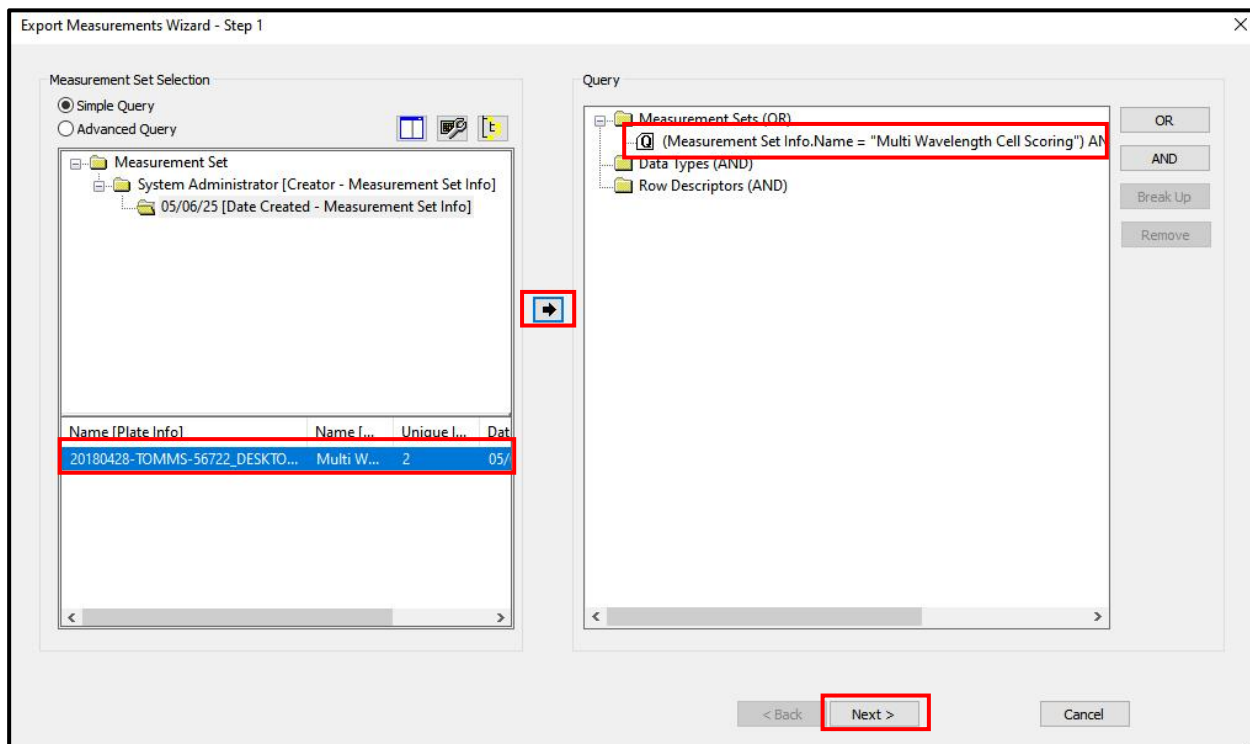
6) 去导出位置打开 txt 文档，Ctrl+A 全选，Ctrl+C/Ctrl+V 复制到 Excel 文件。

每个 site Cell Measurement 的导出

1) 打开 **Plate Data Utilities**，并点击 **Export Measurements**。选择 **Cell Measurements**，点击 OK。



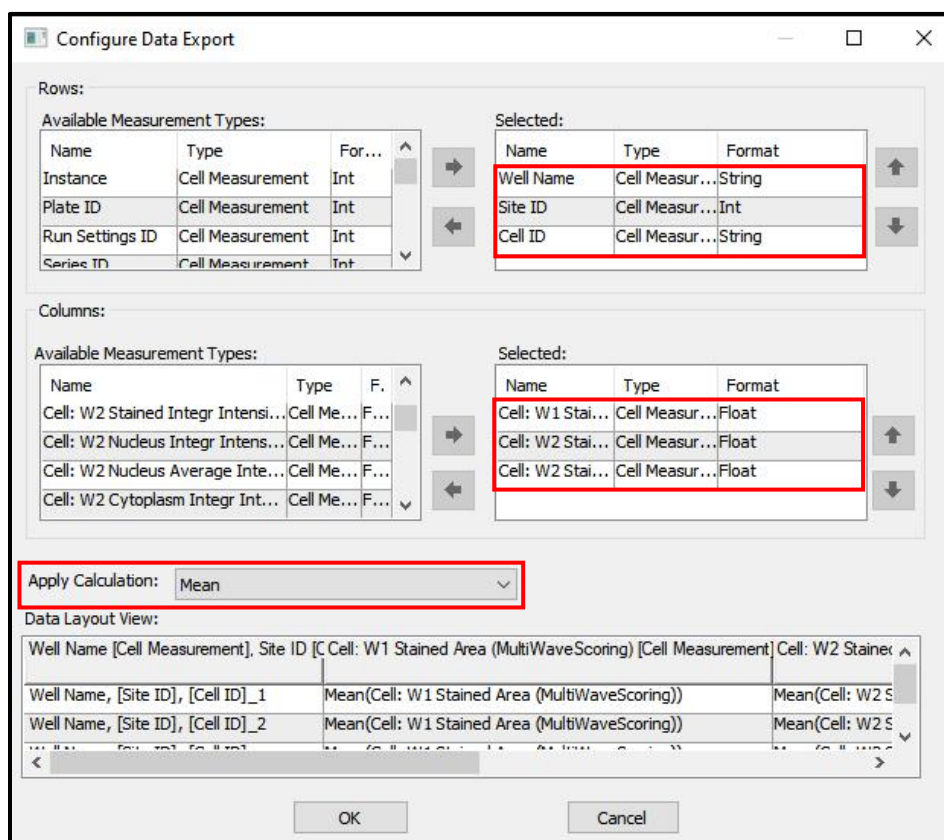
2) 选择想要导出的分析，点击向右箭头选择进入右侧 Query，点击 Next。



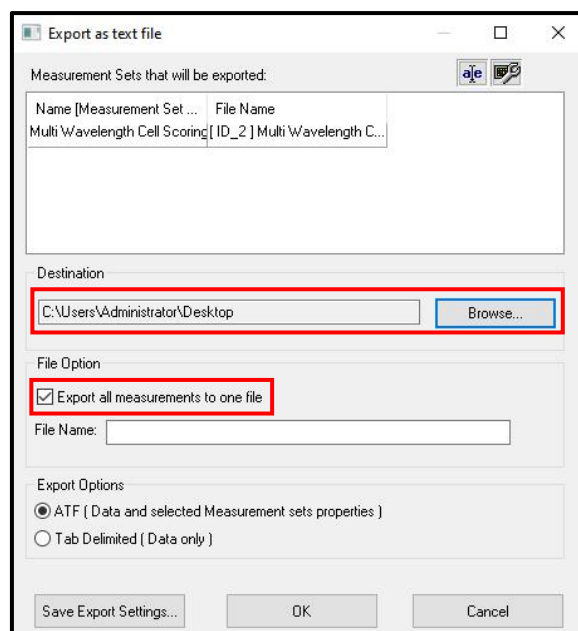
3) 在弹出的界面点击 Finish。

4) 在 Rows 里面，依次选择 Well Name (Cell Measurement), Site ID, 和 Cell ID。在 Columns 里面, 选择参数 (Cell:开头)。在 Apply Calculation 下拉框不要选 None，可以选

Mean, Sum 等。点击 **OK**。



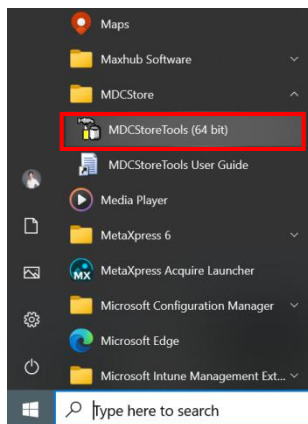
5) 确定导出位置等信息，点击 **OK** 进行导出操作。



6) 去导出位置打开txt文档，Ctrl+A全选，Ctrl+C/Ctrl+V复制到Excel文件。

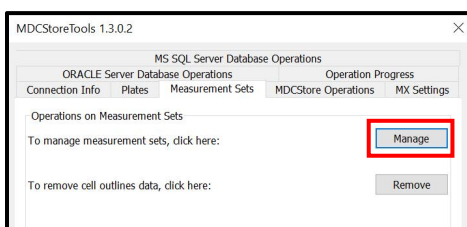
全部数据导出

1) 按照以下路径：Start > All Programs > MDCStore > MDCStoreTools 。

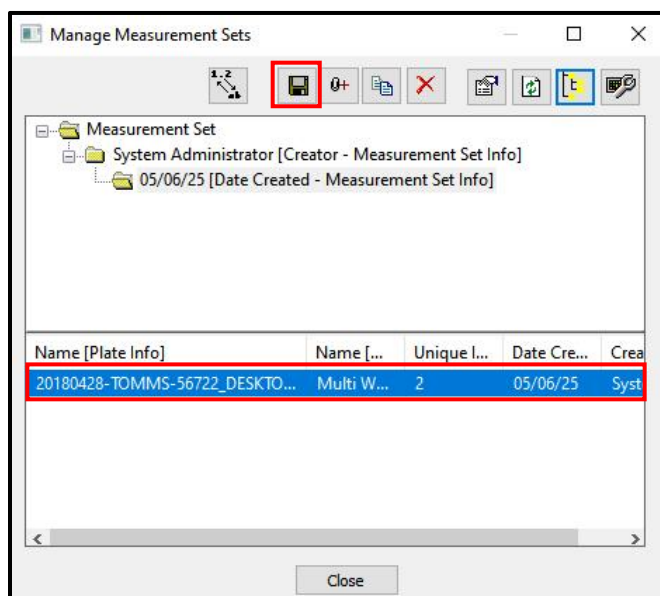


2) 登录进入database（密码同MetaXpress软件登录密码）。

3) 进入Measurement Sets页面。点击Manage。



4) 选择一个或多个Measurement sets（按照分析日期选择），用Shift或Ctrl键来多选。点击保存键（Export as text file）。



5) 设置导出的location, name及header information, 点OK导出, 这样能创建制表符分割的文本文件, 可进一步Ctrl+A全选, Ctrl+C/Ctrl+V复制到Excel文件。

