

OLYMPUS[®]

用户手册

cellSens [Ver.1.18]

LIFE SCIENCE IMAGING SOFTWARE

与本说明相关的所有版权均属 Olympus CORPORATION 所有。Olympus CORPORATION 尽可能使本说明中所包含的信息精确可靠。尽管如此，Olympus CORPORATION 也不对与本说明相关的任何事项进行任何类型的明示或暗示担保，包括但不限于为特定目的而做的商业性和适用性的暗示的担保。Olympus CORPORATION 会不定期修改本安装指南中描述的软件，并保留在无需通知买方的情况下进行修改的权利。在任何情况下，对于因购买或使用本安装指南或其中所含的信息而导致的任何间接的、特殊的、意外的或后续的伤害，Olympus CORPORATION 均不承担任何责任。

未经 Olympus CORPORATION 事先书面允许，本文档的任何部分均不得出于任何目的以任何形式或通过任何手段 (电子或机械) 复制或传输。

商标信息

Microsoft 和 Windows 是 Microsoft Corporation, USA 在美国和其它国家/地区的注册商标。本说明中提及的所有其他品牌名称和产品名称均为其各自所有者的商标或注册商标。

© OLYMPUS CORPORATION

保留所有权利

版本 510_UMA_cellSens118-Shinano_ch_00_16august2017

目录

1.	关于本软件文档	7
2.	用户界面简介	8
2.1.	用户界面	8
2.2.	布局	9
2.3.	文档组	11
2.4.	工具窗口	13
2.5.	图像窗口视图	14
2.6.	使用文档	15
3.	采集拍照并进行讨论	17
3.1.	布局 - 简单	17
3.2.	采集拍照	18
3.3.	处理图像	21
3.4.	讨论图像	24
4.	配置系统	27
5.	采集拍照	29
5.1.	摄像控制	29
5.2.	活动窗口的行为	30
5.3.	采集 HDR 图像	33
5.4.	使用超分辨率系统	35
5.4.1.		35
5.4.2.	采集超分辨率图像	38
5.4.3.	超分辨率图像消卷积滤镜	38
6.	采集多维图像	39
6.1.	多维图像	39
6.2.	简介 - 采集流程	39
7.	采集图像序列	42
7.1.	时间栈	42
7.1.1.	缩时/录像	43
7.1.2.	采集录像	44
7.1.3.	采集时间栈	45
7.2.	Z 图像栈	46

8. 采集荧光图像	49
8.1. 多通道图像	49
8.2. 采集荧光图像之前和之后	51
8.3. 定义荧光采集的观测模式	53
8.4. 采集和组合荧光图像	57
8.4.1. 采集多个单幅荧光图像	57
8.4.2. 组合通道	58
8.5. 采集多通道荧光图像	62
9. 创建拼接图像	67
9.1. 总览	67
9.2. 采集拼接图像	68
9.2.1. 通过移动样品台来采集拼接图像（即时图像拼接）	68
9.2.2. 在不使用电动 XY 样品台的情况下采集拼接图像 (手动图像拼接)	70
9.2.3. 使用电动 XY 样品台采集拼接图像 (XY 位置 / 图像拼接)	73
9.2.4. 使用扩展焦距采集拼接图像	75
9.3. 将单幅图像组合成拼接图像	76
10. 生命科学应用	78
10.1. 亮度剖面	79
10.1.1. 总览	79
10.1.2. 测量多通道 Z 图像栈上的亮度剖面	80
10.1.3. 测量移动对象的亮度剖面	83
10.1.4. 在工具窗口中显示亮度剖面	85
10.2. 记波器	87
10.2.1. 总览	87
10.2.2. 周期性移动的视觉展示	88
10.2.3. 在记波图上进行测量	90
10.3. 荧光分解	92
10.3.1. 总览	92
10.3.2. 执行荧光分解	93
10.4. 共定位测量	97
10.4.1. 在整个帧上测量共定位	97
10.4.2. 测量部分图像上 (感兴趣区) 的共定位	98
10.4.3. 在特定图像结构中执行共定位测量	100
10.5. 消卷积	102
10.6. 比例分析	104
10.6.1. 总览	104
10.6.2. 执行比例分析	106

10.7.	FRAP	111
10.7.1.	总览	111
10.7.2.	执行 FRAP 实验	113
10.7.3.	执行 FRAP 分析	117
10.8.	FRET 分析	120
10.8.1.	总览	120
10.8.2.	执行 FRET 分析	122
11.	测量图像	128
11.1.	工具窗口 - 对象计数	128
11.2.	使用交互式测量功能	131
11.3.	测量图像	134
12.	自动图像分析	139
12.1.	自动检测和测量物体	139
12.1.1.	对象计数	139
12.1.2.	属于不同相的对象计数 (设置阈值)	141
12.1.3.	测量对象 (选择和输出测量参数)	143
12.1.4.	筛选对象	144
12.1.5.	为对象分类	146
12.2.	跟踪对象	148
12.2.1.	总览	148
12.2.2.	跟踪快速对象	150
12.2.3.	观察细胞分裂	155
12.2.4.	手动跟踪对象	157
12.2.5.	分析结果	159
13.	运行实验	165
13.1.	总览	165
13.2.	一般流程	168
13.3.	工具栏 - 实验计划	170
13.4.	示例实验	172
13.4.1.	采集荧光图像	172
13.4.2.	采集多通道荧光图像	176
13.4.3.	采集多维图像	180
13.4.4.	在样品不同位置上采集多通道荧光图像	185
13.5.	使用现有实验计划	187
14.	使用报表	189
14.1.	总览	189
14.2.	使用报表生成器	191
14.3.	使用 Olympus MS-Office 插件	194

14.4.	创建和编辑新模板	195
14.5.	编辑报表.....	197

1. 关于本软件文档

在哪里可以找到哪些信息?

本软件的文档包含若干部分: 安装手册、在线帮助以及随本软件一起安装的 PDF 手册。

安装手册随本软件提供。可以在其中找到系统要求。此外, 还可以找到有关如何安装和配置本软件的信息。

在该手册中, 可以找到对本产品的介绍和对用户界面的说明。通过阅读大量操作步骤说明, 即可快速掌握使用本软件的最重要步骤。

在在线帮助中, 您可以找到有关本软件的所有元素的详细帮助。每个命令、工具栏、工具窗口和对话框都提供有单独的帮助主题。

建议新用户使用本手册来了解该产品, 将来使用在线帮助获取更加详细的问题解答。

本文档中使用的书写规范

在本文档中, 术语“本软件”用于指代 **cellSens**。

00054

示例图像

本软件自带的 DVD 除包含大量其它信息外, 还包含了展示各种使用本软件的例子的图像。您可以从 DVD 中载入这些所谓的示例图像。然而, 在许多情况下, 将示例图像安装在本地硬盘上或网络驱动器上会更有帮助。这样, 不论含有本软件的 DVD 当前在哪里, 示例图像始终可用。

请注意: 在本软件的用户文档中会经常涉及到这些示例图像。当您载入相应的示例图像时, 您可以直接遵照这些操作步骤。

您可以通过本软件打开并查看示例图像。此外, 您还可以使用示例图像来测试本软件的某些功能, 例如, 自动图像分析、图像处理和创建报表。

由于示例图像也包含多维图像 (例如 Z 图像栈或缩时图像), 使用这些图像使您能够快速载入需要较复杂的采集设置的图像。

安装示例图像

您可以在安装本软件后, 或在随后的任意时间安装示例图像。

为此, 将含有本软件的 DVD 插入到 DVD 驱动器中。如果安装向导启动, 浏览至含有示例图像的目录并安装这些图像。

07005

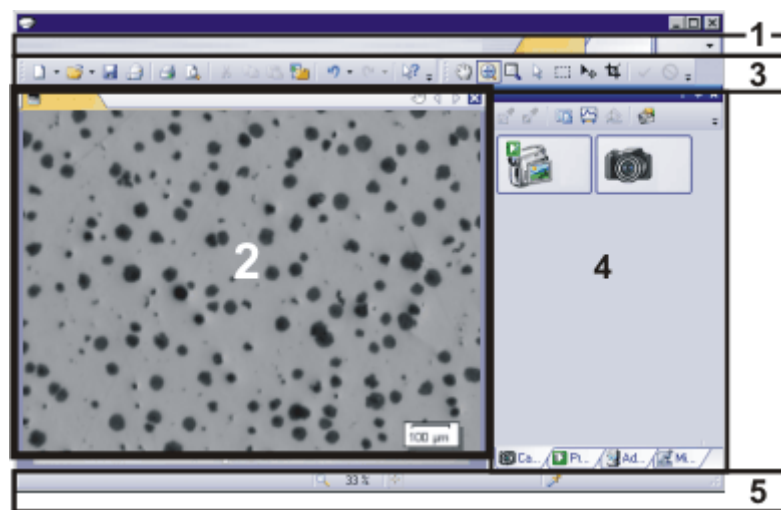
2. 用户界面简介

2.1. 用户界面

图形用户界面决定了本软件的外观。它可以指定有哪些菜单、如何调用各个功能、如何以及在何处显示数据 (如图像) 等相当多的内容。下面将描述用户界面的基本元素。

请注意: 本软件的用户界面可以通过调整来满足不同用户和任务的需求。例如, 可以配置工具栏、创建新布局或修改文档组, 使得可以同时显示多个图像。

用户界面的外观



插图显示了示意性用户界面及其基本元素。

- (1) 菜单栏 可以通过使用对应菜单调用多个命令。可以配置本软件的菜单栏从而满足您的需求。使用 [工具 > 自定义 > 启动自定义模式...](#) 命令可添加、修改或删除菜单。
- (2) 文档组 文档组包含所有已载入的文档。这些可为所有支持的文档类型。
启动本软件时, 文档组为空。随着本软件的使用, 文档组中会填入内容, 例如, 在载入或采集图像或执行各种图像处理操作来更改源图像和创建新图像时。
- (3) 工具栏 经常使用的命令链接到某个按钮, 从而可以快速便捷地访问这些功能。请注意, 有很多功能只能通过工具栏访问, 如为图像添加批注所需的绘图功能。使用 [工具 > 自定义 > 启动自定义模式...](#) 命令可修改工具栏的外观以满足您的需求。
- (4) 工具窗口 工具窗口将各种功能合并到不同的组中。这些可能是差别很大的功能。例如, 在 [属性](#) 工具窗口中, 您可以找到可用于活动文档的所有信息。
与对话框不同的是, 工具窗口只要开启就会始终在用户界面上可见。这样您即可随时访问工具窗口中的设置。
- (5) 状态栏 状态栏包含大量信息 (例如, 每个功能的简要描述)。只需将鼠标指针移到各命令或按钮上就可以查看此信息。

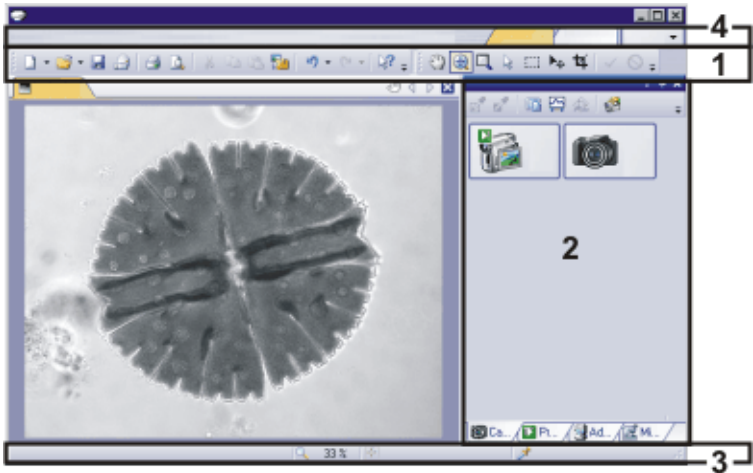
00108

2.2. 布局

什么是布局？ 本软件的用户界面有很大的配置灵活度，可方便地对其进行调整，以满足各种用户和任务的具体需求。您可以选定一种适合当前任务的布局。布局是一种排列方式，它能针对当前任务以最佳方式在显示屏上显示控制元素。在任何布局中，只有与该布局有关的重要软件功能才可用。

示例: **摄像控制**工具窗口仅在您采集图像时具有重要意义。当您想要测量图像而不是采集图像时，就不需要该工具窗口。
这就是**采集**布局包含**摄像控制**工具窗口，而该窗口在**处理**布局中则为隐藏的原因。

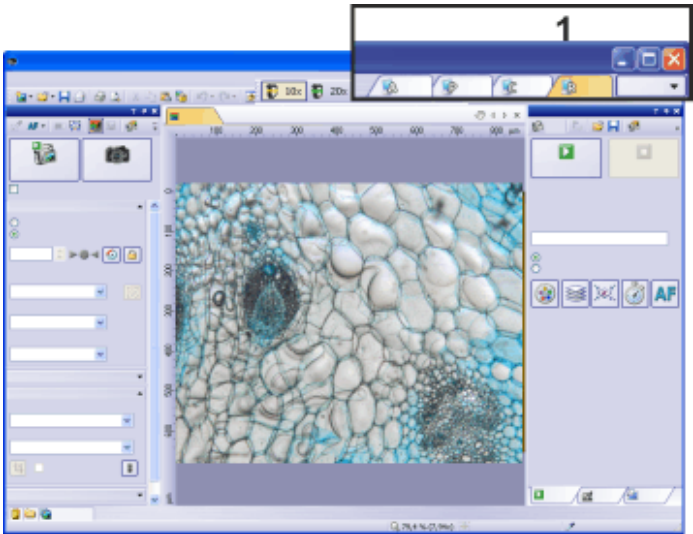
用户界面的哪些元素属于布局？



上图向您显示了属于布局的用户界面元素。无论元素是已显示还是已隐藏，布局都可保存元素的大小和位置。例如，当您**窗口**工具栏引入某布局时，它只对该布局可用。

- (1) 工具栏
- (2) 工具窗口
- (3) 状态栏
- (4) 菜单栏

切换到布局 要在不同布局间来回切换，请在菜单栏右边单击所需布局的名称，或使用**视图 > 布局**命令。



您会在菜单栏的右上角找到每种布局的选项卡 (1)。单击其中一个选项卡可切换至对应的布局。

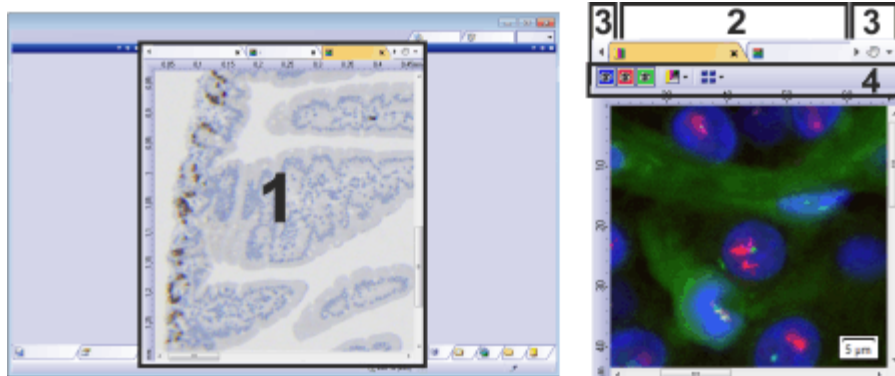
都有哪些预定义的布局？	已经为重要的任务定义了几种布局。有以下布局可供使用： • 采集图像 (采集布局) • 在滴定板上采集图像 (滴定板导航版本) • 处理图像 (处理版本) • 测量图像 (计测布局) • 生成报告 (报告布局) • 轻松采集图像并进行讨论 (简单版本)
恢复布局	与您自己的布局不同的是，预定义的布局不可删除。因此，您始终可以将预定义布局恢复为其最初定义的形式。为此，请选定预定义布局，然后使用视图 > 布局 > 还原当前布局命令。
在布局中保存功能集	在自定义功能工具窗口中，可以分配经常使用的软件功能到功能集中，并可在其自己的工具窗口中进行排列。为方便使用，可以在用户界面上排列工具窗口，并将其保存在随时可以使用的布局中。您可在在线帮助中找到有关如何使用功能集的更多信息。
布局 - 简单	简单布局是一种可支持您日常工作的特定布局。该布局可方便采集拍照、基本图像处理 and 共享。 当使用简单布局时，可能无法再访问所有其他布局

00013

2.3. 文档组

文档组包含所有已载入的文档。通常将载入图像。您还可以在文档组中找到其它类型的文档，如图表。

文档组的外观



- (1) 用户界面中的文档组
- (2) 文档组的文档工具栏
- (3) 文档栏中的按钮
- (4) 图像窗口中的工具栏

(1) 用户界面中的文档组

文档组位于用户界面的中间位置。在这里可找到所有已载入的文档，当然也可以找到所以已采集的图像。实时图像以及由任何图像处理功能所产生的图像都将显示在这里。

请注意: 同时，最多可在文档组中载入 150 个文档。

(2) 文档组的文档工具栏

文档栏就是文档组的标题。



对于每个已载入的文档，文档组中都会为其建立一个单独的选项卡，该选项卡会显示文档的名称。在文档栏中单击文档名可使该文档显示在文档组中。活动文档的名称将显示为彩色。每种文档类型都通过其特有的图标来标识。

在每一选项卡的右上方都有一个小 [x] 按钮。单击叉形按钮可关闭文档。如果尚未保存该文档，则会打开未保存的文档对话框。此时您可以决定是否还需要这些数据。

(3) 文档栏中的按钮

文档栏中包含多个按钮，分别位于左右两侧。



手形按钮

单击带有手形的按钮可从用户界面抽取文档组。这样您便可以创建可以自由定位或更改大小的文档窗口。

如果要合并两个文档组，请在其中一个文档组中单击带有手形的按钮。按住鼠标左键，将其中含有所有已载入文档的文档组拖动到现有文档组上。

先决条件: 只有当您处于专家模式下时才能定位文档组。在标准模式下，带有手形的按钮不可用。

箭头按钮

文档组的左上方和右上方有两个箭头按钮。

当本软件启动时，这些箭头按钮未激活。只有已载入大量文档以至于无法在文档组中显示所有文档名时，该箭头按钮才会变为活动状态。

如果您已载入很多图像，使得它们所有的名称无法再显示于文档组中，则可单击这两个箭头之一。该操作将向左或向右滚动含文档名称的字段。这使您能看到先前没有显示的文档。

已载入文档列表

单击右侧的小箭头，打开所有已载入文档的列表。如果您使用多个文档组，则载入的文档将按文档组排序。文档组彼此之间用水平线分隔。

左键单击要显示在显示屏上的文档。

此外，您也可使用文档工具窗口或画廊工具窗口获取已载入的文档的概述。

(4) 图像窗口中的工具栏

使用某些图像类型时，图像窗口中包含工具栏。一些其它的文档类型也在图像窗口中有直接属于自己的导航栏。例如报表指令或实验计划。

图像类型	图像窗口中的按钮		
所有图像		调节显示	单击该按钮可更改图像对比度。
多层图像		设置层可见性	使用此按钮可显示或隐藏层。
多通道图像		导航栏	多维图像 (如时间栈) 在图像窗口内有直接属于自己的导航栏。使用此导航栏可设置多维图像在显示屏上的显示方式，或更改该方式。
Z 图像栈			
时间栈			
多通道图像		图像窗口视图	同一图像可以有多个视图。例如，对于一个图像系列，您可以在图像窗口中显示单个图像或所有单个图像的预览。图像窗口的工具栏上有一个包含活动图像的所有图像窗口视图选项的菜单。
Z 图像栈			
时间栈			

00139 17072017

2.4. 工具窗口

什么是工具窗口？ 工具窗口将各种功能合并到不同的组中。这些可能是差别很大的功能。例如，在[属性](#)工具窗口中，您可以找到可用于活动文档的所有信息。

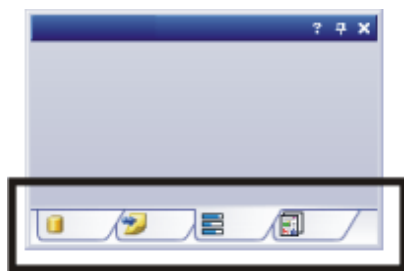
与对话框不同的是，工具窗口只要开启就会始终在用户界面上可见。这样您即可随时访问工具窗口中的设置。

显示和隐藏工具窗口 默认情况下显示哪些工具窗口取决于所选定的布局。当然，您可以随时手动显示或隐藏特定工具窗口。为此，请使用[视图 > 工具窗口](#)命令。

工具窗口的位置

用户界面具有很大程度的可配置性。因此，工具窗口可以停靠、自由定位或合并到文档组中。

停靠工具窗口 工具窗口可以停靠在文档窗口的左边、右边或下边。为了节省空间，几个工具窗口可以互相重叠。这时它们像选项卡一样排列。在这种情况下，通过在窗口下单击对应选项卡的标题即可激活所需工具窗口。



自由定位工具窗口 先决条件: 只有在专家模式下才能按照您的希望放置工具窗口。

您可以随时浮动工具窗口。要使工具窗口从停靠位置释放，请使用鼠标左键单击该窗口的标题。然后按住鼠标左键，将工具窗口拖放到您希望的任何位置。

保存工具窗口的位置 工具窗口及其位置随布局保存在一起，在下次启动本软件时位于相同位置。若使用[视图 > 布局 > 还原当前布局](#)命令复位到初始布局，则会导致只显示该布局默认设置的工具窗口。

标题中的按钮

在每个工具窗口的标题中，您都可以找到三个按钮：[帮助](#)、[启用自动隐藏](#)和[关闭](#)。



单击[帮助](#)按钮可打开该工具窗口的在线帮助。

单击[启用自动隐藏](#)按钮可最小化工具窗口。

单击[关闭](#)按钮可隐藏工具窗口。您可以随时通过使用[视图 > 工具窗口](#)命令让其再次显示。

标题的上下文菜单

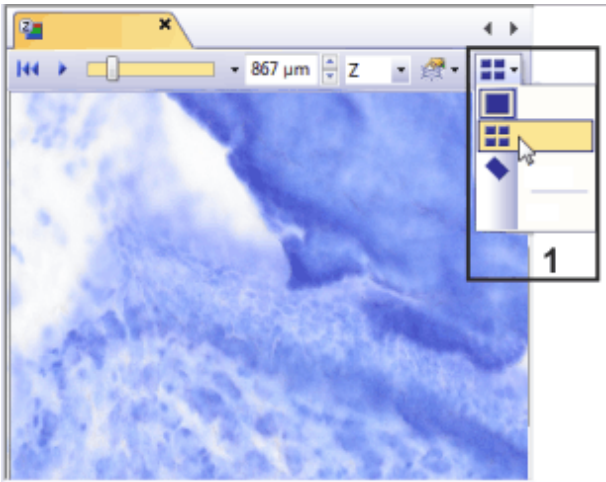
要打开上下文菜单，请右键单击工具窗口的标题。上下文菜单可以包含[自动隐藏](#)、[文档模式](#)和[透明度](#)命令。

另外，上下文菜单中还包含一系列所有可用工具窗口。每个工具窗口均由其图标标识。当前显示的工具窗口所对应的图标将呈被选中状态。您可通过图标的背景颜色识别这种状态。通过该列表，您可以显示各工具窗口。

00037 09012017

2.5. 图像窗口视图

图像窗口中显示了本软件载入的所有图像。处理某些图像类型 (例如, 所有多维图像) 时, 您可以在图像窗口中选择不同的图像视图。在这种情况下, 导航栏将显示在图像窗口中。单击导航栏中最后一个按钮旁的小箭头, 可打开一个包含多条命令 (对应各图像窗口视图) 的菜单。在该菜单内, 您可以选定所需的图像窗口视图并编辑某些视图的设置。



该插图显示上下文菜单及所有可用的图像窗口视图 (1)。

按钮的外观

该按钮被配置为只需单击一次即可在两种不同视图间来回切换。
单击该按钮可切换到当前在该按钮上显示为图标的图像窗口视图。每种图像窗口视图都有自己的图标。
该按钮上始终显示上一次选定的图像窗口视图。例如, 当您从单帧显示切换到切片视图图像窗口视图时, 该按钮的外观将自动变为显示单帧显示的图标, 从而使您能立即切换回该视图。

单帧显示



平铺



切片视图



体素视图



投影视图

扩展景深投影

默认设置为单帧显示。在单帧显示中, 图像窗口中只会显示一幅图像。

使用平铺视图可获得组成多维图像的所有单幅图像的简介。在此视图中, 您还可以选定多个单幅图像。

使用切片视图图像窗口视图可查看您希望的图像序列的任何横截面。切片视图工具窗口提供了用于配置该视图的各种方法。

您可以将 Z 图像栈显示为三维对象。为此, 请使用体素视图图像窗口视图和体素视图工具窗口。

对于图像序列 (如 Z 图像栈和时间栈), 可根据代表整幅多维图像的所有帧计算出一幅投影图像。可用的投影图像在算法方面存在不同。例如, 如果使用最大亮度投影, 在所有帧中您将只会看到具有最高亮度值的像素。

可以为 Z 图像栈使用扩展景深投影。扩展景深投影使用聚焦不同的单幅图像组成的序列 (聚焦序列) 来计算结果图像 (扩展景深图像), 也就是说结果图像的所有部分均已聚焦。

00354 03042014

2.6. 使用文档

当您需要打开、保存或关闭文档时，有多种方法可供选择。这些文档通常为图像。此外，本软件还支持其它文档类型。您可以在在线帮助中找到所支持文档的列表。

保存文档

对于重要的文档，应始终在采集后便立即保存。如果文档名称后面带有星号图标，则说明该文档尚未保存。

可通过多种方法来保存文档。

1. 要保存单个文档，请在文档组中激活该文档。然后使用 [文件 > 另存为...](#) 命令或按键盘上的 **[Ctrl + S]**。
2. 使用 [文档](#) 工具窗口。
选定所需文档，然后使用上下文菜单中的 [保存](#) 命令。对于选定文档，多重选定仍遵循 **MS-Windows** 的通用风格。
3. 使用 [画廊](#) 工具窗口。
选定所需文档，然后使用上下文菜单中的 [保存](#) 命令。对于选定文档，多重选定仍遵循 **MS-Windows** 的通用风格。
4. 将文档保存在数据库中。这样即可将属于同一对象的所有类型的数据存储在同一个位置。利用搜索和筛选功能可以快速便捷地查找到已保存的文档。您可在在线帮助中找到有关将文档插入到数据库中的详细信息。

自动保存

1. 退出本软件时，所有为保存的数据将会在 [为保存的文档](#) 对话框中列出。这样您就有机会决定仍需要保存哪些文档。
2. 可以通过配置软件使所有图像在采集之后便自动保存。为此，请使用 [采集设置 > 保存](#) 对话框。
可以在这里通过配置本软件使所有图像在采集之后便自动保存到数据库。
 - 您可在在线帮助中找到有关 [采集设置 > 保存](#) 对话框的说明。

关闭文档

可通过多种方法来关闭文档。

1. 使用 [文档](#) 工具窗口。
选定所需文档，然后使用上下文菜单中的 [关闭](#) 命令。对于选定文档，多重选定仍遵循 **MS-Windows** 的通用风格。
2. 要关闭单个文档，请在文档组中激活该文档，然后使用 [文件 > 关闭](#) 命令。或者，您也可以单击叉形按钮 **[x]**。您可以在文档选项卡的右上角的文档名称旁找到该按钮。
3. 使用 [画廊](#) 工具窗口。
选定所需文档，然后使用上下文菜单中的 [关闭](#) 命令。对于选定文档，多重选定仍遵循 **MS-Windows** 的通用风格。

关闭所有文档

要关闭载入的所有文档，请使用 [全部关闭](#) 命令或按键盘上的 **[Ctrl + Alt + W]**。该命令可在 [文件](#) 菜单以及 [文档](#) 和 [画廊](#) 工具窗口的上下文菜单中找到。

立即关闭文档

要立即关闭文档而不用询问，请在按住 **[Shift]** 键的同时将其关闭。未保存的数据将会丢失。

打开文档

可通过多种方法打开或载入文档。

1. 使用 [文件 > 打开...](#) 命令。
2. 将所需文档从 MS-Windows 资源管理器直接拖到软件的文档组中。
3. 要从数据库将文档载入文档组中，则使用 [数据库 > 载入文件...](#) 命令。可在 [在线帮助](#) 中找到更多信息。

请注意: 同时，最多可在文档组中载入 150 个文档。

生成测试图像

为了熟练掌握本软件，有时候可以通过任意图像来尝试某项功能。

按 [Ctrl + Shift + Alt + T] 可生成彩色测试图像。

使用 [Ctrl + Alt + T] 快捷键，可以生成灰度值为 256 的测试图像。

激活文档组中的文档

有以下几种方法可激活已载入文档组的其中一个文档，并进而将其显示在显示屏上。

1. 使用 [文档](#) 工具窗口。在该工具窗口中单击所需的文档。
2. 使用 [画廊](#) 工具窗口。在该工具窗口中单击所需的文档。
3. 在文档组中单击所需文档的标题。
4. 要打开当前所有已载入文档的列表，请使用 [Ctrl + Tab] 快捷键。左键单击要显示在显示屏上的文档。
5. 单击文档组右上角的小箭头 ，以打开所有载入文档的列表。左键单击要显示在显示屏上的文档。
6. 使用键盘快捷键 [Ctrl + F6] 或 [Ctrl + Shift + F6] 可显示文档组中的下一个文档。通过该键盘快捷键，您可以一个接一个地显示已载入的所有文档。
7. 在 [窗口](#) 菜单中可找到所有已载入文档的列表。从该列表中选定所需的文档。

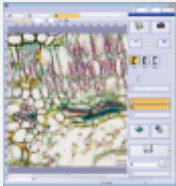
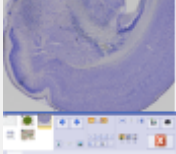
00143 09012017

3. 采集拍照并进行讨论

如果要使用本软件采集拍照并与其他人进行讨论，本软件将提供执行此操作的特定布局。[简单](#)布局可方便采集拍照、基本图像处理和共享。

3.1. 布局 - 简单

启用布局	首次打开本软件时，可以在 简单布局 对话框中激活 简单 布局。为此，请单击 选择简单布局 按钮。
	如果首次打开本软件时未显示 简单布局 对话框，请使用 工具 > 选项 命令。在树状视图中选定 简单布局 > 常规 条目。请选中在 启动时显示布局选取对话框 复选框。重新启动本软件。
简单布局及其他布局	当使用 简单 布局时，可能无法再访问所有其他布局。如果要使用不同的布局，请停用 简单 布局。 使用 工具 > 选项... 命令。在树状视图中选定 简单布局 > 常规 条目。单击 停用 按钮。
不同任务的最佳用户界面	简单 布局可方便采集拍照、基本图像处理和共享。为保持简单的布局，将不会显示这些功能不需要的所有软件功能。

(1)		采集拍照	当您打开 简单 布局时，本软件的用户界面将在方便采集拍照的前提下进行排列。
(2)		处理图像	您可以在 平滑控制 工具窗口中找到不同的功能组。在 图像 组中，单击 处理 按钮处理已采集的图像。
(3)		为图像添加标签并进行讨论	使用会议模式查看图像，为其添加标签以及与同事讨论。 要打开 会议模式 ，请单击位于 平滑控制 工具窗口中的 会议 按钮。

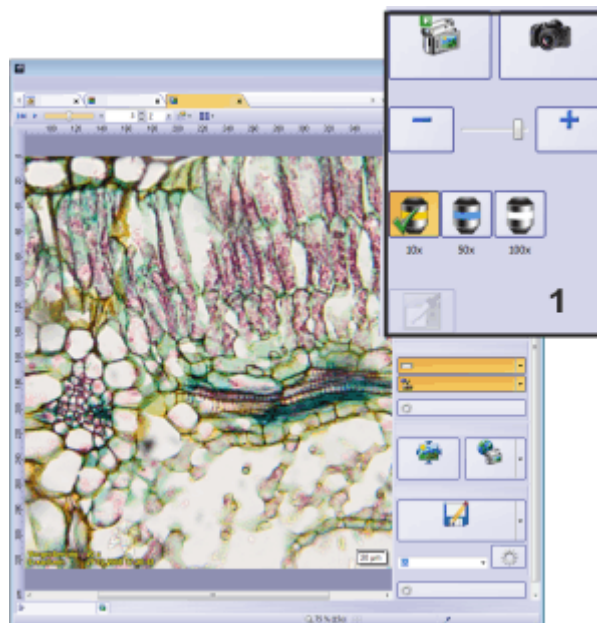
更改简单布局	您可以像对待任何其他布局一样更改 简单 布局。使用 视图 > 工具窗口 菜单中的命令可显示用户界面中的其他工具窗口。布局中所做的更改会自动保存。如果关闭本软件，然后重新启动，您将不会看到定义时的 简单 布局，而是看到已更改的布局。 使用 视图 > 布局 > 还原当前布局 命令，可将布局还原为它的默认配置。 工具窗口是重叠在一起的。通过在窗口下单击对应选项卡的标题即可激活所需工具窗口。
--------	--

00285 19072017

3.2. 采集拍照

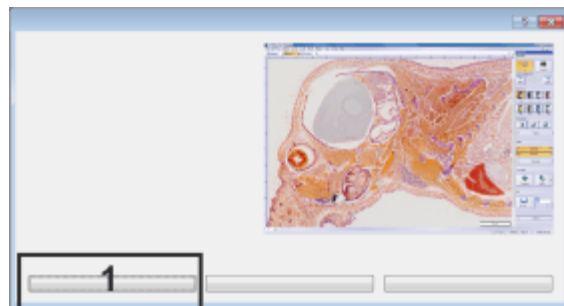
任务 您需要依次采集一个样本的多个图像。

先决条件: 系统已配置和校准完毕。



在简单布局中，您可以在文档组右侧找到平滑控制工具窗口。它包含采集组 (1)。

选择简单布局



首次启动本软件时，会显示简单布局对话框。如果要使用简单布局，请单击选择简单布局 (1) 按钮。

1. 本软件打开时，请单击选择简单布局按钮。
2. 如果打开本软件时简单布局对话框未打开：
请使用工具 > 选项...命令。
在树状视图中选定简单布局 > 常规条目。
请选中在启动时显示布局选取对话框复选框。重新启动本软件。
 - 使用简单布局时，本软件的用户界面将在方便采集拍照的前提下进行排列。

打开实时图像



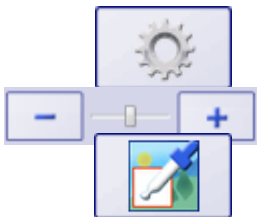
- 单击[实时观察](#)按钮。
 - 将为实时图像自动打开名为[实时观察 \(进行中\)](#)的新窗口。
 - 实时图像将在显示该动态窗口中。
 - 在实时模式时[实时观察](#)按钮将更改其外观。这使您可以立即认出已处于实时模式。
 - [白平衡](#)按钮现在处于启用状态。
- 使用显微镜移至样本中的所需位置。

选定物镜



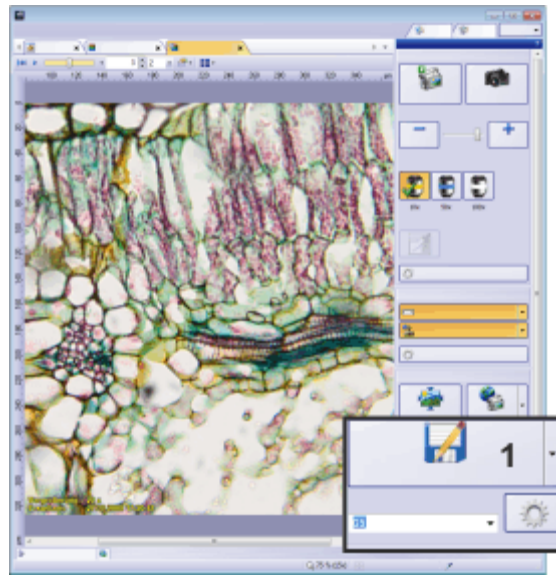
- 单击您想要用于图像采集的物镜所对应的按钮。
 - 图像窗口左下方有具有放大倍率的信息印记。如果未显示信息印记，请单击[信息印记](#)按钮。
 - 您可以在图像窗口右下方看到标尺。它对应选定的放大倍率。如果未显示标尺，请单击[标尺](#)按钮。

设置图像质量



- 对焦到样品上。
- 请确保使用自动曝光。单击[采集](#)组底部的[设置](#)按钮。单击[默认值](#)按钮，然后单击[关闭](#)按钮。
- 核对曝光时间。使用 [\[-\]](#) 和 [\[+\]](#) 按钮让图像变暗或变亮。
- 核对色彩再现。如有必要，请执行白平衡。为此，请单击[白平衡](#)按钮。
- 将指针移到将要显示成白色的图像片段的左上角。按住鼠标左键不放拖动矩形。
 - 随后会立即执行白平衡。这意味着图像中的各种颜色都将得到调整，使您所选定的图像片段显示成白色。您可以在图像中立即看到调整后的效果。

采集拍照



您可以在平滑控制工具窗口 (1) 的底部找到文件组。

1. 为图像指定名称。您可在文本字段中输入名称的第一部分。采集图像时将自动分配这一部分。您可以在平滑控制工具窗口的文件组中找到文本字段。
例如，使用 Sample-AB 替换默认文本图像。
2. 单击拍照按钮。
 - 已采集图像的新图像窗口将显示在文档组中。第一个采集的图像名为 Sample-AB_01。
 - 软件将自动返回实时模式。
 - 实时图像显示在文档组中。
3. 采集其他图像。移至样本中的不同位置并重新对焦。更改放大倍率或曝光时间。您可以在实时模式下控制所有这些功能。



离开实时模式并保存图像



1. 再次单击实时观察按钮可离开实时模式。
 - 实时窗口将关闭。
 - 图像窗口中会出现所采集的最后一个图像。
2. 单击另存为... 按钮可将活动图像保存为文件格式。选择要用于保存该文档的驱动器和目录。输入文件名称。请使用推荐的 TIF 或 VSI 文件格式。
 - 请注意: 当实时窗口处于活动状态时，单击另存为... 按钮将打开采集设置 > 保存对话框。在此对话框，可以指定采集图像后是否以及如何自动保存图像。
3. 关闭图像窗口并保存图像。图像窗口选项卡中有一个小按钮 [x]。单击叉形按钮可关闭图像窗口。
 - 现在图像窗口中会出现下一个图像。
4. 决定是否要保存每个图像。

- 如果无需单独保存每个图像，请使用[文件 > 全部关闭](#)命令。现在，尚未保存的所有图像均会在[未保存的文档](#)对话框中列出。这样您就有机会决定仍需要保存哪些文档。
- 您还可以在采集拍照后自动保存所有拍照。
为此，在实时模式时单击[另存为...](#) 按钮打开[采集设置 > 保存](#)对话框。从[自动保存 > 目标位置](#)列表选定[文件系统](#)选项。指定用于保存文档的目标位置。
现在，所采集的每个图像将自动保存至指定的目标位置。

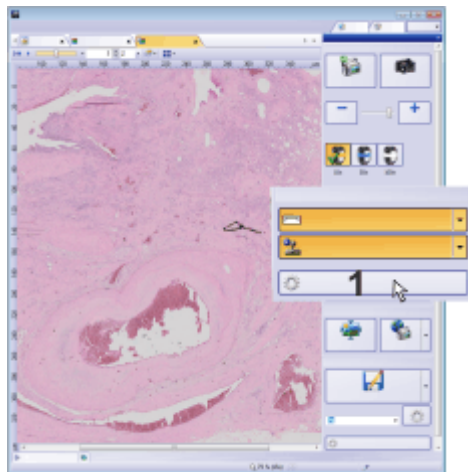
3.3. 处理图像

增加图像的对比度。还可裁剪图像，这样只会显示您所感兴趣的图像片段。

更改用户界面



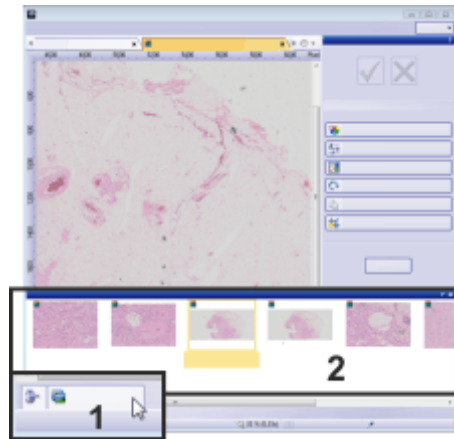
1. 使用[平滑控制](#)工具窗口中的[图像](#)组可访问多种图像处理功能。在[图像](#)组中，单击[处理](#)按钮。
 - [平滑控制](#)工具窗口将更改其外观。在工具窗口中，您现在可以找到用于更改所采集图像的多种功能。图像采集和保存命令将被隐藏。
 - 在用户界面的左下方，您可以看到两个带有[测量和感兴趣区](#)工具窗口和[画廊](#)工具窗口图标选项卡。



单击[处理](#)按钮 (1) 可更改平滑控制工具窗口的外观。

选定图像

1. 将鼠标悬停在画廊选项卡图标上。您可以在用户界面的左下方找到该图标。
 - 将打开已载入所有图像的画廊。
2. 在画廊中，单击要处理的图像。
 - 选定图像现在即会显示在图像窗口中。活动图像中的所有图像处理功能将会生效。

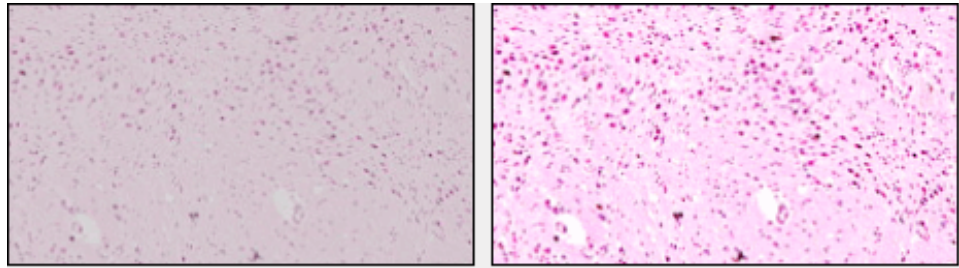


打开画廊 (1)，然后选择需要处理的图像 (2)。

增加图像的对比度



1. 在平滑控制工具窗口中，单击亮度调节...按钮。
 - 图像处理对话框随即打开。
 - 同样的图像片段将在对话框中显示两次。显示的第一幅为源图像。第二幅为应用当前参数后得到的图像。
2. 清除创建新文档作为输出复选框。现在，亮度调节... 命令将更改源图像。并且不会创建任何新图像文档。
3. 更改图像处理操作的参数。例如，您可以减小 Gamma 系数值并增加亮度。
 - 每次更改参数后，操作将立即应用于源图像，并且结果图像将会显示在预览窗口中。
4. 找到最佳参数后，单击确定按钮，按照预览图像中的显示效果更改图像对比度。
 - 图像处理对话框随即关闭。
 - 请注意，图像处理操作会更改源图像，并且不会创建任何新图像文档。不过，您可以使用编辑 > 撤消命令恢复源图像。
 - 更改后的图像不会自动保存。显示在文档组中图像名旁的星号表示必须保存更改。



源图像 (左) 的对比度较低。调整亮度以在结果图像 (右) 中获得较好的对比度。

裁剪图像



1. 在平滑控制工具窗口中，单击裁剪为新图像按钮。
2. 按住鼠标左键，标出您感兴趣的图像片段。
 - 已选定的片段将通过红色框标识。要剪掉的区域将为阴影。
 - 在平滑控制工具窗口中，确认输入和取消输入按钮变为活动状态。
3. 确认该片段就是您已选定的图像片段。为此，请单击确认输入按钮。
 - 随即会新建一个名为 图像_<序列号> 的图像文档。
 - 源图像将不会被更改。
4. 在平滑控制工具窗口中单击关闭按钮。
 - 平滑控制工具窗口将更改其外观。现在再次显示图像采集功能。

3.4. 讨论图像

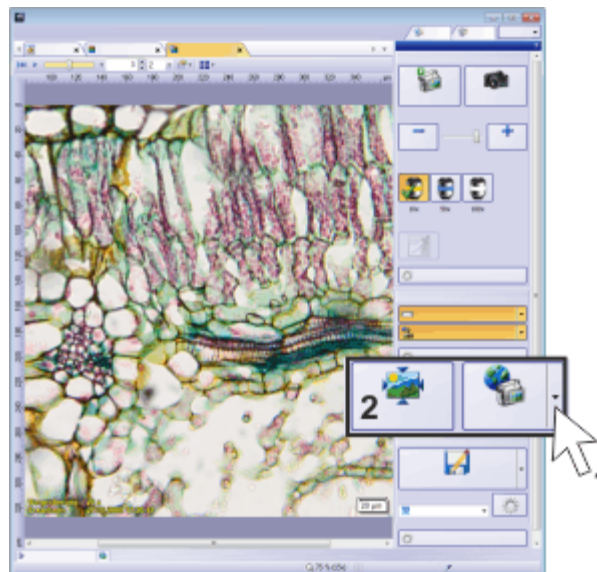
任务 您已采集大量的图像。使用内联网将图像传输到同事的计算机上。

先决条件: 已安装 **NetCam** 解决方案。

设置 NetCam 会议



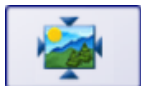
1. 载入所有您想要讨论的图像。
2. 在平滑控制工具窗口中，单击 **NetCam** 按钮旁边的小箭头。从菜单中选定 **设置** 条目。
 - **选项 > NetCam > 常规**对话框随即打开。在对话框左侧，有一个包含所有可用选项的树状视图。
3. 选定树状视图中的 **NetCam > 服务器** 条目。
4. 输入密码可确保只有知道密码的人才能访问通过 **NetCam** 客户端传送的图像。在 **密码** 字段中输入您的密码。
5. 在 **服务器 URL** 字段中，您将找到客户端 **Web** 浏览器所需的服务器地址。复制 **NetCam** 服务器地址。
6. 然后单击 **确定** 关闭 **选项** 对话框。
7. 将 **NetCam** 服务器地址和密码发送给所有您想要与其讨论图像的同事。
8. 在平滑控制工具窗口中单击 **NetCam** 按钮。
 - 按钮变为活动状态，从而告知您 **NetCam** 模式处于激活状态。
 - 只要 **NetCam** 模式处于激活状态，图像窗口的内容即会传输到 **NetCam** 服务器。
 - 现在，在您的同事已输入 **NetCam** 地址并使用密码进行身份验证后，即可在其网络浏览器中查看图像窗口的内容。请注意，在身份验证流程中用户名字段应留空。
9. 设置与同事的电话会议。



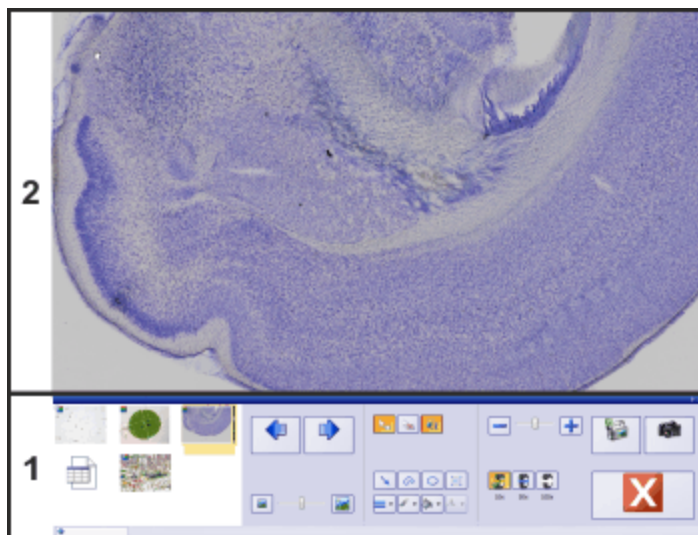
您可以在平滑控制工具窗口的底部找到会议组。使用 **NetCam** 按钮 (1) 可检查 **NetCam** 设置并切换至 **NetCam** 模式。单击会议按钮 (2) 可切换至会议模式。

切换至会议模式

请注意: 如果未使用 **NetCam** 功能, 您还可以在 **平滑控制** 工具窗口中使用会议模式在您的显示屏上讨论图像。用户界面上的所有软件控件将自动调整适应分辨率。也可适用非常高的分辨率。



- 单击 **会议** 按钮可切换至会议模式。
 - 在会议模式时, 本软件会自动切换至全屏模式。图像将填充整个显示屏。
 - 用户界面将会完全隐藏, **会议模式** 工具窗口除外。
 - 会议模式** 工具窗口处于最小化状态, 因此只有其标题显示在显示屏左下方。
 - 同事网络浏览器中的图像将以相同方式显示。您的同事也会看到您在图像窗口中所做的任何更改。



在会议模式下, 图像 (2) 将填充整个显示屏。当您鼠标指针移出工具窗口时, **会议模式** 工具窗口 (1) 将会自动隐藏。

注意特定图像片段

- 显示图像窗口中您特别感兴趣的图像片段。
 - 使用鼠标滚轮放大到图像或移出图像。
 - 如果整个图像无法在图像窗口中完全显示, 您可以在按住鼠标左键的同时拖动图像, 进而将其移动。
- 将鼠标悬停在 **会议模式** 选项卡图标上。您可以在用户界面的左下方找到该图标。
 - 会议模式** 工具窗口随即打开。
 - 会议模式** 工具窗口不是通过 **NetCam** 进行传输。**NetCam** 专门传输图像窗口的内容。
- 单击 **椭圆** 按钮可圈出您所感兴趣的图像片段。按住鼠标左键在图像上绘制一个椭圆。
 - 插入椭圆之后将会立即选定一个椭圆。您可以直接更改其属性。
 - 插入绘图对象时, 将自动切换为绘图模式。 **选定绘图对象** 按钮变为活动状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。





4. 例如，您可以更改椭圆的颜色并选定较粗的线条，使其在图像中更容易看见。为此，请使用[线宽](#)和[线条颜色](#)按钮。

- NetCam 将传输所有绘图对象。这可使您的同事看到正在讨论哪个图像片段。



5. 关闭绘图模式。为此，请单击[选定绘图对象](#)按钮。

- [选定绘图对象](#)按钮现在再次变成这个样子。

结束会议



1. 单击[关闭](#)按钮可离开会议模式。

- 现在可以再次在用户界面的右侧看到[平滑控制](#)工具窗口。

2. 释放 [NetCam](#) 按钮停止传输图像。

- 然后 [NetCam](#) 按钮现在再次变成这个样子。



00286 20072017

4. 配置系统

为什么必须配置系统？ 在成功安装软件后，您需要首先对图像分析系统进行配置，然后对其进行校准。只有执行这些操作后才算完成所需的准备工作，从而确保能够获得经过正确校准的高质量图像。使用电动显微镜时，您还需要对现有硬件进行配置，从而使程序能够控制显微镜的电动部件。

配置流程

要设置系统，请遵循以下必要步骤：



选定摄像头和显微镜	在完成安装后首次启动软件时，您可利用一些默认设置进行快速配置。在该步骤中，您只需要在 快速设备设置 对话框中指定摄像头和显微镜的类型。显微镜将被配置为选择典型的硬件组件。
指定可用硬件	软件应该清楚您的显微镜已配备哪些硬件组件。软件只能对这些硬件组件进行配置并进而对其进行控制。您可在采集 > 设备 > 设备列表对话框中选定可在显微镜上使用的硬件组件。 如果您使用快速设备设置对话框中提供的预配置，现在请确认本系统是否确实配备了该配置中定义的硬件组件。
配置接口	使用采集 > 设备 > 界面命令可配置显微镜或其它电动组件与运行本软件的计算机之间的接口。通常，界面会自动进行适当地配置。 如果您使用快速设备设置对话框中提供的预配置，您可以跳过此步骤。
配置指定硬件	您的系统通常包含多种不同设备，如摄像头、显微镜和/或载物台。使用采集 > 设备 > 设备设置...对话框可对已连接的设备进行配置，随后便可通过软件对这些设备实现正确驱动。 此外，您可以在设备设置对话框中找到所有摄像头设置。您可在在线帮助中找到更多可能的摄像头设置信息。
校准系统	当所有硬件组件都经过软件注册并已完成配置后，便可确保系统能良好运行。不过，只有在对软件进行校准后，使用系统以及采集品质一流的图像才能变成简单的工作。随后便可获得有助于您获得最佳采集的详细信息。 软件提供了一个向导，该向导可帮助您完成各个采集流程。使用采集 > 校准...命令可启动此软件向导。

关于系统配置

必须在什么时候配置系统？

只有已在计算机上完成该软件的初次安装时，您才需要重新对系统进行全面配置和校准，随后才可启动它。如果您在以后更改了显微镜的安装方式，则只需更改相应的硬件组件的配置即可，有时可能还需要重新校准它们。

系统配置的必需用户权限

必须以管理员或超级用户权限登录本软件，才能配置系统。如果您是自己安装的本软件，则会自动为您分配管理员权限。

相比之下，要使用本软件的其他用户也被指定[用户](#)角色。此角色无法更改或查看系统配置。[采集 > 设备 > 设备列表](#)和[采集 > 设备 > 设备设置](#)命令不再可用。

出于此原因，软件管理员必须为未自行安装软件，但被允许查看或更改系统配置的这些用户分配必要的用户权限。以管理员身份启动软件，然后选定[工具 > 用户权限...](#)命令，打开[用户权限](#)对话框。选定所需的用户，然后单击[属性...](#)按钮。

关闭操作系统的休眠模式

当您使用 **MS-Windows 7** 操作系统时：关闭计算机的省电选项，并确保计算机不会自动进入休眠模式。

1. 为此，请单击位于操作系统任务栏底部左侧的开始按钮。
2. 单击[控制面板](#)、[系统和安全](#)，然后单击[电源选项](#)。
3. 在[选择电源计划](#)页面上，单击[更改计划设置](#)。
4. 在[更改计划的设置](#)页面上，单击[更改高级电源设置](#)。
 - 您可在此处关闭计算机的省电和休眠模式。

当您使用 **MS-Windows 10** 操作系统时：关闭计算机的省电选项，并确保计算机不会自动进入休眠模式。

1. 为此，请右键单击位于操作系统用户界面左下方的“开始”按钮。
2. 从菜单中选定[电源选项](#)条目。
3. 单击[选择或自定义电源计划](#)页面上的[睡眠 > 更改计划设置](#)。
4. 在[更改计划的设置](#)页面上，单击[更改高级电源设置](#)。
 - 您可在此处关闭计算机的省电和休眠模式。

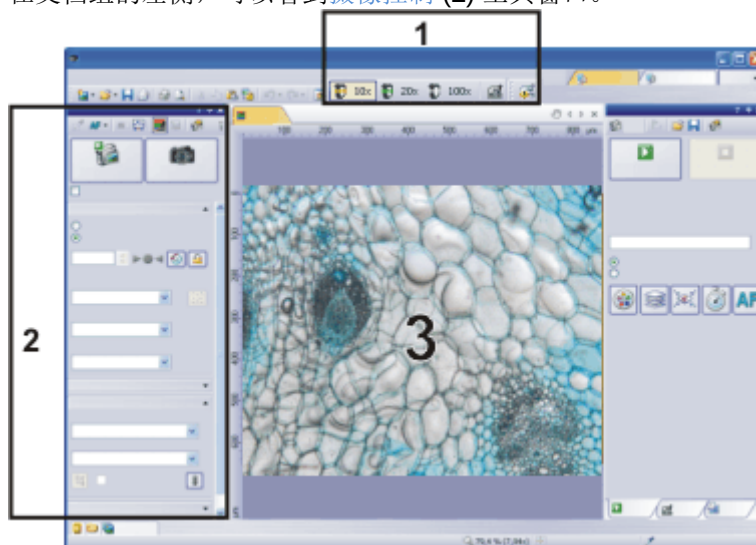
00159

5. 采集拍照

5.1. 摄像控制

您可以使用本软件在非常短的时间内采集到高分辨率的图像。在初次采集时，您应该按照下面说明的步骤逐步完成。这样当您以后对类似的样品再次采集时，您会发现初次采集时所做的许多设置都可以不用更改就直接采用。

1. 切换至“采集”布局。为此，请使用 (例如) **视图 > 布局 > 采集** 命令。
 - 可以在用户界面上边缘菜单栏的正下方找到**显微镜控制 (1)** 工具栏。在文档组的左侧，可以看到**摄像控制 (2)** 工具窗口。



选定物镜

打开实时图像



设置图像质量

2. 在**显微镜控制**工具栏上，单击您想要用于图像采集的物镜所对应的按钮。
3. 在**摄像控制**工具窗口中，单击**实时观察**按钮。
 - 实时图像 (3) 现在将显示在文档组中。
4. 转到实时图像中所需的样品位置。
5. 对焦到样品上。**聚焦指针**工具栏可帮助您对样品进行聚焦。

请注意: 如果使用 **Olympus Soft Imaging Solutions SC50 或 UC90** 摄像头采集图像，还可以使用**峰值聚焦**功能对样品进行聚焦。可在在线帮助中找到更多信息。

采集和保存图像



6. 核对色彩再现。如有必要，请执行白平衡。
7. 核对曝光时间。您既可以使用自动曝光时间功能，又可以手动输入曝光时间。
8. 选定所需的分辨率。
9. 在**摄像控制**工具窗口中单击**拍照**按钮。
 - 采集的图像将显示在文档组中。
10. 使用**文件 > 另存为...** 命令保存该图像。请使用推荐的 **TIF** 或 **VSI** 文件格式。

00027 26012015

5.2. 活动窗口的行为

实时图像将在软件文档组中获得各自的新窗口。该窗口标题将为**实时观察 (进行中)**。实时模式停止时此实时窗口的行为取决于**实时观察**对话框中的设置。活动窗口的行为取决于**采集设置 > 采集 > 常规**对话框中的采集选项。

执行拍照操作之后继续实时观察

1. 显示**摄像控制**工具窗口。为此，可以使用**视图 > 工具窗口 > 摄像控制**命令。
2. 打开**采集设置 > 采集 > 常规**对话框。
为此，在**摄像控制**工具窗口的工具栏中，单击**采集设置**按钮。然后在树状视图中选定**采集 > 常规**选项。
3. 选中**执行拍照操作之后继续实时观察**复选框。
4. 单击**确定**关闭**采集设置**对话框。
5. 单击**摄像控制**工具窗口中的**实时观察**按钮。
 - 文档组中将新建一个名为**动态观察 (进行中)**的临时动态窗口。
 - 实时图像将在显示该动态窗口中。
 - 您始终可以通过**摄像控制**工具窗口中的**实时观察**按钮更改的外观来识别动态模式。
6. 单击**拍照**按钮可以采集图像。
 - 已采集图像的新图像窗口将显示在文档组中。所采集的图像默认名称为**图像_<连续数字>**。
 - 软件将自动返回实时模式。
 - 实时图像显示在文档组中。
7. 采集其他图像。
8. 再次单击**实时观察**按钮可离开实时模式。
 - 动态模式将关闭。

打开和关闭实时图像，而不采集图像

1. 在**采集设置 > 采集 > 常规**对话框中选定以下设置。
 - 选择**停止实时观察时保留窗口**选项。
 - 清除**每次进行实时观察时新建窗口**复选框。
 - 清除**执行拍照操作之后继续实时观察**复选框。
2. 单击**摄像控制**工具窗口中的**实时观察**按钮。
 - 文档组中将新建一个名为**动态观察 (进行中)**的临时动态窗口。
 - 实时图像将在显示该动态窗口中。
 - 您始终可以通过**摄像控制**工具窗口中的**实时观察**按钮更改的外观来识别动态模式。
3. 再次单击**实时观察**按钮。
 - 动态模式将关闭。
 - 活动的实时图像将停止。

- 动态窗口的标题将改为**动态观察 (停止)**。您可以将位于动态窗口中的已停止的实时图像保存下来，就如保存其它任何图像那样。

请注意: 动态窗口看起来与图像窗口类似，但是会得到不同的处理。在您下一次切换到动态模式时，图像将被改写。另外，当软件关闭时，该窗口也会关闭，并且不会出现警告消息。

切换到实时图像并采集图像

1. 在**采集设置 > 采集 > 常规**对话框中选定以下设置。
 - 选择**停止实时观察时保留窗口**选项。
 - 清除**每次进行实时观察时新建窗口**复选框。
 - 清除**执行拍照操作之后继续实时观察**复选框。
2. 单击**摄像控制**工具窗口中的**实时观察**按钮。
 - 文档组中将新建一个名为**动态观察 (进行中)**的临时动态窗口。
 - 实时图像将在显示该动态窗口中。
 - 您始终可以通过**摄像控制**工具窗口中的**实时观察**按钮更改的外观来识别动态模式。
3. 单击**拍照**按钮。
 - 动态模式将关闭。动态窗口的标题将改为**动态观察 (停止)**。
 - 同时，文档组中将新建并显示新的图像文档。您可以对此图像进行重命名并保存。如果关闭软件时您还未保存此图像，系统会询问您是否要保存此图像。



同时显示实时图像和采集图像

任务

您需要同时查看实时图像和采集图像。执行该操作时，还可以在不结束实时模式的前提下查看采集图像。

1. 关闭打开的所有文档。
2. 打开**采集设置 > 采集 > 常规**对话框。
为此，例如，单击**摄像控制**工具窗口上的**采集设置**按钮。
3. 在这里进行以下设置：
 - 选择**停止实时观察时保留窗口**选项。
 - 清除**每次进行实时观察时新建窗口**复选框。
 - 选中**执行拍照操作之后继续实时观察**复选框。
4. 切换至实时模式。采集图像，然后再次关闭实时模式
 - **实时观察 (停止)**和**图像_<连续数字>**这两个图像窗口现在都在文档组中。
 - **实时观察 (停止)**图像窗口处于活动状态。即是说，现在可以在文档组中看到停止的实时图像。在文档栏中，名称**实时观察 (停止)**以彩色突出显示。
5. 拆分文档组，使两个图像彼此靠近地显示。
只有在载入了至少两个图像后才能实现。这就是为什么要在第一步中创建两个图像。
为此，请使用**窗口 > 拆分或堆积 > 拆分或堆积文档组 (左边)**命令。



- 该命令会在当前文档组左侧创建一个新的文档组。新创建的文档组中将自动显示活动文档。因为在这种情况下，活动文档为停止的实时图像，因此现在在左侧看到实时窗口，在右侧看到采集图像。

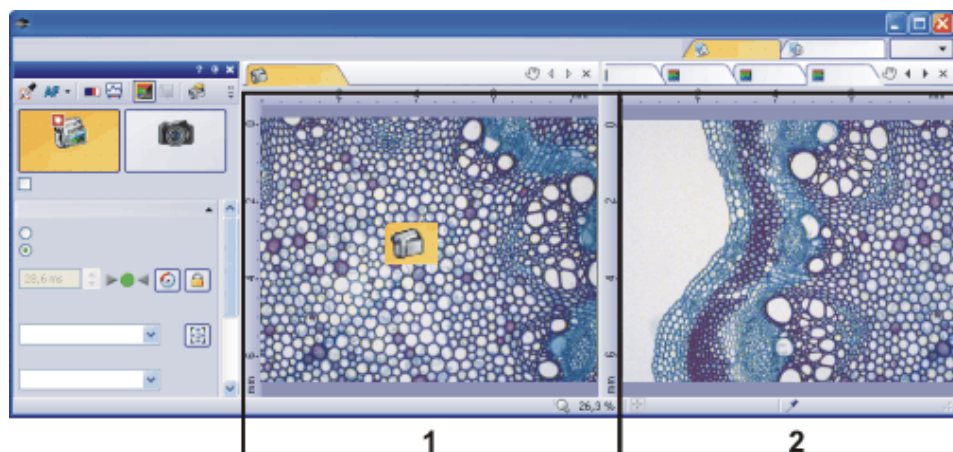
6. 启动实时模式。

- 在文档组中，左侧窗口将成为实时窗口**实时观察 (进行中)**。可在此处看到实时图像。

7. 激活右侧的文档组。为此，例如，单击此处显示的图像。

8. 单击**拍照**按钮。

- 采集图像将显示在活动文档组中。在这种情况下，它为右侧的文档组。
- 采集图像后，会再次自动启动实时图像，因此您能够在左侧重新看到实时图像。
- 实时图像显示在左侧时，可以在任何时间在目前为止已采集的图像之间切换。



可以设置本软件的用户界面，使得可以在相接近的位置查看实时图像 **(1)** 和目前为止已采集的图像 **(2)**。

00181 10012017

5.3. 采集 HDR 图像

HDR 是指高动态范围 (**High Dynamic Range**)。动态范围涉及摄像头或软件同时显示亮图像片断和暗图像片断的能力。

采集 HDR 图像之前, 需要确定当前样品的必要曝光范围。曝光范围由最小和最大曝光时间以及它们之间的多个曝光时间构成。将为所有 HDR 图像继续使用最近确定的曝光范围, 直到让本软件重新确定曝光范围为止。这和手动或是自动确定曝光范围无关。

如果采集样品相同或相似部分的多个图像, 则无需每次都确定曝光范围。如果更改样品或调整显微镜上的设置, 则建议重新确定曝光范围 (自动或手动)。

使用手动设置的曝光范围采集 HDR 图像

在该步骤中, 在**摄像控制**工具窗口中自行设置最小和最大曝光时间。本软件会通过相关消息框引导您完成流程。调整曝光时间的程度, 由本软件根据最小和最大曝光时间确定。

准备

1. 切换至“**采集**”布局。可使用**视图 > 布局 > 采集**命令进行该操作。
2. 在**显微镜控制**工具栏上, 单击您想要用于采集 HDR 图像的物镜所对应的按钮。
3. 切换至实时模式, 然后在**摄像控制**工具窗口中为您的采集选定最优设置。执行白平衡。选定大约的曝光时间。
4. 搜索需要采集其 HDR 图像的样品部分。它应为这样的位置: 亮度差异大到使得在最优照明下不能显示所有片断。
5. 结束实时模式。
6. 在**摄像控制**工具窗口中, 选定**启用 HDR**复选框。
 - 在工具窗口的上部, **拍照**按钮变为**HDR**按钮。
7. 在**确定曝光范围**组中, 单击**手动...**按钮重新定义该采集的曝光范围。
 - **确定曝光范围**消息框随即出现。它会提示您降低曝光时间, 使得可以识别亮图像片断中的足够图像细节, 并且没有任何片断曝光过度。
8. 在**曝光**组中更改曝光时间, 曝光组是**摄像控制**工具窗口的一部分。确保已选定**手动**选项。可以通过使用滑动游标或用键盘输入曝光时间并按 **[Enter]**键来更改该值。检查显示屏上的实时图像。一旦亮图像片断不再曝光过度, 则单击**确定曝光范围**消息框中的**确定**按钮。
 - 这样, 您就可以确定曝光范围的下限 (= 最短曝光时间)。
9. 现在, **确定曝光范围**消息框会提示您提高曝光时间, 使得暗图像片断不再曝光不足。在**曝光**组中更改曝光时间, 曝光组是**摄像控制**工具窗口的一部分。检查显示屏上的实时图像。一旦暗图像片断变得足够亮, 则单击**确定曝光范围**消息框中的**确定**按钮。
 - 这样, 您就可以确定曝光范围的上限 (最长曝光时间)。
10. 在**摄像控制**工具窗口的工具栏中, 单击**HDR**按钮启动图像采集。

采集 HDR 图像



 3.1 s / 5.5 s

它显示采集进行了多长时间以及整个的采集时间。该进度条包含了**取消**按钮, 使用它可以停止当前图像采集。

- 采集结束后, HDR 图像将在文档组中显示。

11. 检查图像。如果要更改设置 (例如, 为输出绘制使用不同的算法), 则打开 [采集设置](#) 对话框。选定树状视图中的 [采集 > HDR](#) 选项。
12. 如果不需要更改任何设置, 使用 [文件 > 另存为...](#) 菜单命令来保存图像。请使用推荐的 TIF 或 VSI 文件格式。
 - 将包括 HDR 条目在内的所有图像信息随图像一起保存时, 只能使用这些格式。例如, 通过这种方式, 可以查看图像是否使用 HDR 采集。打开 [属性](#) 工具窗口, 查看 [摄像头组](#) 中的数据。

不设置曝光范围重新采集更多 HDR 图像

如果刚采集了相同或相似样品的 HDR 图像, 通常情况下, 无需重新确定动态范围。在这种情况下, 即完成了采集的准备工作 (如执行白平衡), 并且正确设置了 HDR 图像采集设置 (如选择用于输出绘制的最优算法)。

这种情况下, 采集 HDR 图像非常容易。请按照下面的步骤操作:

1. 在 [摄像控制](#) 工具窗口中, 选定 [启用 HDR](#) 复选框。
2. 在 [摄像控制](#) 工具窗口的工具栏中, 单击 [HDR](#) 按钮启动图像采集。
 - 将开始图像采集。采集结束后, HDR 图像将在文档组中显示。
3. 保存图像前进行检查。
 - 如果本软件被配置为采集后直接将图像导入数据库, 则可以忽略该步骤。

07500

5.4. 使用超分辨率系统

什么是超分辨率系统？ 超分辨率系统包含可用于创建超分辨率图像的特定硬件组件和软件功能。

先决条件:

- Olympus Super Resolution (OSR) 功能在 [Super Resolution](#) 解决方案处于活动状态时才可用。
- 将会配置超分辨率硬件组件并安装软件。

软件提供了多种不同的超分辨率滤镜，可用于计算超分辨率图像。可以在正在采集或随后采集荧光图像时应用超分辨率滤镜。在这两种情况下，都必须满足超分辨率图像采集的光学和技术要求。



请注意: 使用超分辨率系统前，请务必确认根据适用的安全法规连接激光。

硬件要求

创建超分辨率图像时需要以下硬件组件和设置:

- 显微镜 (IX83 P2ZF)
- 共聚焦扫描仪设备 (CSU-W1(T1) 或 CSU-W1(T2))
- 摄像头 (Hamamatsu Orca Flash 4.0 v3)
- 电动放大倍率变换器 (3.2 倍放大倍率)
- 激光组合器
- 实时控制器 (RTC-E)

分辨率:

- 对于 60 倍物镜像素合并 1x1
- 对于 100 倍物镜像素合并 2x2

以下物镜适用于创建超分辨率图像。

物镜	数值孔径 (NA)	工作距离
UPLSAPO60XO	1.35	0.15
UPLSAPO60XW	1.2	0.28
UPLSAPO60XS	1.3	0.3
UPLSAPO60XS2	1.3	0.3
PLAPON60XO	1.42	0.15
PLAPON60XOSC	1.4	0.12
PLAPON60XOSC2	1.4	0.12
APON60XOTIRF	1.49	0.1
UPLSAPO100XO	1.4	0.13
UPLSAPO100XS	1.35	0.2
APON100XHOTIRF	1.7	0.08
UAPON100XOTIRF	1.49	0.1

以下激光波长适用于创建超分辨率图像。

激发 (nm)	405	445	488	514	561	640
---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

5.4.1. 配置超分辨率系统

以下流程图显示了该流程的基本步骤。



定义硬件配置

1. 选择**采集 > 设备 > 设备列表**命令。
2. 选择**摄像头**选项卡。
3. 选择**摄像头 1**列表中的摄像头。
如果正在使用多摄像头系统，请从相应的**多摄像头**列表中选择**多摄像头 #1**选项。如果正在使用其他摄像头，请从**摄像头 2**列表中选择第二个摄像头。从相应的**多摄像头**列表中选择**多摄像头 #2**条目。
4. 选择**共聚焦**选项卡。
5. 从**系统**列表中选择 **CSU** (共聚焦扫描仪设备)。
6. 如果 **CSU** 配有孔径光阑，请选中**可变孔径控制**复选框。
7. 激活**激光/LED**选项卡。
8. 选定**设备列表**中的**激光组合器**选项。
9. 选定**类型**列表中的 **OBIS 激光**选项。使用按钮扩展列表，然后添加要耦合至光纤的所有激光器。
10. 在**接口**对话框中单击**接口**按钮并配置 **CSU** 接口。
11. 关闭所有打开的对话框。



定义观测模式

本软件计算超分辨率图像之前，必须满足某些光学要求。定义在其中利用超分辨率滤镜的超分辨率图像的观测模式，并指定超分辨率需要的系统组件。

1. 选定**采集 > 设备 > 设备自定义**命令。激活**观测模式**选项卡。
2. 单击**新建观测模式**按钮。
3. 为新观测模式命名，然后单击**确定**关闭该对话框。例如，您可称该观测模式为**超分辨率**。
4. 选定**可用的组件**列表中的**摄像头 > <摄像头名称>**选项。
如果正在使用多摄像头系统，请在**可用的组件**列表中选择**摄像头 > 多摄像头 <摄像头名称>**选项。
5. 选定**状态**列表中的**使用**选项。
6. 如果正在使用包含两个摄像头的多摄像头系统，也请选中**多摄像头配置**复选框。
7. 在**可用组件**列表中，为每个摄像头选择**超分辨率**选项。
8. 对于每个摄像头，请选定**状态**列表中的**使用**选项。
 - 现在 **OSR 滤镜**列表处于活动状态。



9. 请从 **OSR 滤镜** 列表中为每个摄像头选择一个超分辨率滤镜。如果正在使用双摄像头，可以为其选择不同的滤镜。
 - **低、标准和高**滤镜是指超分辨率滤镜的强度。最适用于您的样品的滤镜取决于样品的属性。尝试不同的滤镜并选择具有最佳效果的滤镜。
 - 如果不想在采集图像时直接应用超分辨率滤镜，而是要在随后应用，请使用**脱机**选项。如果您正在使用实验管理员在敏感样品上执行实验，且要保留尽可能短的实验，这可能会很有用。当**脱机**选项处于活动状态时，将会使用超分辨率图像所需的设置采集图像。您可以将超分辨率滤镜追溯地应用至已使用**滤镜: 超分辨率**功能采集的图像。
 - 当使用 **OSR 滤镜** 的观测模式时，本软件会在采集 (实时观察、快照、采集流程) 之前检查是否满足超分辨率图像的要求。如果未满足条件，则不会启动采集。
10. 现在，您可将荧光色素和荧光色彩分配给摄像头。这样就可确保采集的图像自动以正确的色彩显示。
11. 超分辨率图像需要 **3.2 倍** 的放大倍率。在**可用组件 > 常规 > 放大倍率变换器**列表中为观测模式定义 **3.2 倍** 的放大倍率。或者，您可以在**显微镜控制**工具窗口中设置放大倍率。
12. 对于观测模式，请定义正在使用的任何其他组件。

5.4.2. 采集超分辨率图像

摄像控制

1. 在[显微镜控制](#)工具窗口中，选择使用超分辨率图像设置的观测模式。
2. 选定所需物镜。
3. 如果正在使用 60 倍物镜，请在[摄像头控制](#)工具窗口的[分辨率](#)组中，选择具有[像素合并 1x1](#)后缀的选项。如果正在使用 100 倍物镜，请选择具有[像素合并 2x2](#)后缀的选项。
4. 在[摄像头控制](#)工具窗口中，单击[实时观察](#)按钮或[拍照](#)按钮。
 - 本软件会检查设置是否满足超分辨率图像的要求。如果不满足超分辨率图像的要求，则会显示错误消息。
 - CSU 的速度自动设置为最大速度。
5. 您可以自动添加用于在图像名称上创建超分辨率图像的 OSR 滤镜。使用[所有选项](#)对话框将 [<OSR 滤镜>](#) 占位符添加至图像名称。您可在[在线帮助](#)中找到有关该对话框的更多信息。

请注意: 如果各个荧光色彩通道的图像偏移几个像素，您可以使用[多通道偏移校正](#)校准流程校正此问题。

通过实验管理员采集超分辨率图像

使用实验管理员在实验中采集超分辨率图像。



1. 使用[视图 > 工具窗口 > 实验管理员](#)命令显示[实验管理员](#)工具窗口。
2. 在[实验管理员](#)工具窗口中，单击[新建](#)按钮可创建新实验。
3. 定义第一个图像采集命令。
单击[图像采集](#)按钮旁的小箭头可打开一个菜单。例如，选择为 [Super Resolution](#) 超分辨率图像定义的观测模式。
4. 单击画布中要放置图像采集命令的位置，该命令在实验计划中使用[超分辨率](#)观测模式。
5. 可根据需要定义更多命令。
6. 请单击位于[实验管理员](#)工具窗口中的[开始](#)按钮来运行实验。
 - 本软件会检查设置是否满足超分辨率图像的要求。
 - 如果不满足这些要求，则会显示错误消息告知您缺失了哪些参数。

5.4.3. 超分辨率图像消卷积滤镜

使用[运算 > 消卷积 > 受限迭代](#)命令并选择[超分辨率](#)模式，将消卷积滤镜应用至超分辨率图像。该滤镜可消除漫射光以改进超分辨率图像。

先决条件:

- 当 [CI 消卷积](#)软件解决方案处于活动状态时，消卷积滤镜可用。
- 该消卷积滤镜可应用于 Z 图像栈和时间栈 Z 图像栈。

00247

6. 采集多维图像

6.1. 多维图像

什么是多维图像？ 您可将一系列单幅图像组合为一副图像。例如，您可以组合属于不同色彩通道的单幅图像。由多个帧组合得到的多维图像会因它们具体如何不同而有所差异。

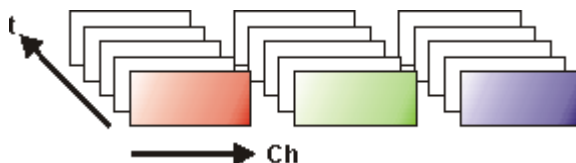
标准图像为二维。每个像素的位置都由其 **X** 和 **Y** 值来确定。荧光色彩、时间以及显微镜样品台的 **Z** 位置为多维图像可能具有的其它维度。

 **多通道图像**通常显示已经使用多种不同荧光色素标记的样品。多通道图像由单幅荧光图像的组合构成。

 **时间栈**中的每一帧采集于不同的时间点。时间栈为您显示样品的某一区域如何随着时间而变化。您可以像播放录像一样播放时间栈。

 **Z 图像栈**包含在不同聚焦位置所采集的帧。例如，您需要 **Z 图像栈**用于计算扩展景深图像。

包含多个维度的图像 不同的多维图像可以任意组合。例如，多通道时间栈就合并了多个色彩通道。图像中所合并的每个色彩通道都通过它自己的时间栈来再现。



图像窗口中的导航栏 多维图像在图像窗口内有直接属于自己的导航栏。使用该导航栏可设置多维图像在图像窗口中的显示方式。

00009

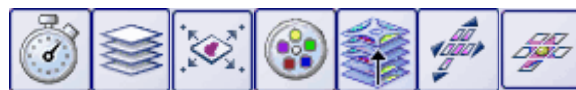
6.2. 简介 - 采集流程

本软件提供了大量不同的采集流程。

基本采集流程



复杂采集流程



基本采集流程

可使用**摄像控制**工具窗口来采集图像和录像。

您可以使用本软件在非常短的时间内采集到高分辨率的图像。

拍照



录像



您可以使用软件来录像。执行该操作时，摄像头会在任意时间段内采集尽可能多的图像。录像可保存为 **AVI** 或 **VSI** 格式的文件。随后便可使用软件播放。

复杂采集流程

使用**流程管理**工具窗口可处理复杂的采集流程。

缩时



在**缩时**采集流程中，您会陆续采集到一系列帧。此单幅图像序列组成了一个时间栈。时间栈为您显示样品的某一区域如何随着时间而变化。您可以像播放录像一样播放时间栈。

您可以将**缩时**采集流程和其它采集流程组合使用。如果本软件支持**多通道**采集流程，则使用 (例如) **缩时**采集流程来采集多通道时间栈。

AF

如果显微镜样品台配备了电动 **Z** 传动装置，则您可在采集时间栈时使用自动聚焦。您可以在采集流程说明中找到各项设置的说明。

Z 图像栈



使用自动采集流程 **Z 图像栈**可采集 **Z** 图像栈。**Z** 图像栈包含在不同聚焦位置所采集的帧。即是说，显微镜样品台位于不同的 **Z** 位置以采集每个帧。

或者，您也可以使用 **Z 图像栈**采集流程来采集扩展景深图像。然后会根据所采集的 **Z** 图像栈自动计算出一幅焦距实际上无限大的结果图像 (扩展景深图像)。该图像的所有部分均锐利聚焦。**EFI** 是扩展景深的缩写。

您可以将 **Z 图像栈**采集流程与其它采集流程组合使用。

如果软件支持**多通道**采集流程，则可将 **Z 图像栈**采集流程与该多通道采集组合，从而采集多通道 **Z** 图像栈。

XY 位置 / 图像拼接



只有在显微镜配备了电动 **XY** 样品台时才可使用该采集流程。这样，便可以在样品上的不同位置执行一个或多个自动采集流程，或采集更大样品位置的拼接图像。

如果显微镜样品台配备了电动 **Z** 传动装置，则您可在该采集流程中使用自动聚焦。您可以在采集流程说明中找到各项设置的说明。

多通道



您可以使用**多通道**自动采集流程来采集多通道荧光图像。

您可以 (例如) 将**多通道**采集流程与 **Z 图像栈**采集流程组合，从而采集多通道 **Z** 图像栈。

请注意: 使用 **DP80** 摄像头时，请注意以下限制。随多通道荧光图像一起同时采集透射光图像时，**多通道**采集流程无法组合其它采集流程，如 **Z 图像栈**采集流程。该限制会保护摄像头免于由于摄像头提供的两个 **CCD** 之间的持久切换而造成的损坏。

即时扩展景深



使用手动采集流程**即时扩展景深**可从摄像头的当前位置采集一幅所有部分均锐利聚焦的扩展景深图像。

手动图像拼接



使用**手动图像拼接**采集流程时，您可以采用显示不同相邻样品区域的方式手动移动样品台。您每次单击任一带箭头的按钮，都会采集一幅图像。利用该采集流程，您可以在采集期间将所有采集到的图像直接组合为拼接图像，就如同拼图一样。拼接图像将以比单次采集可获得的 **X/Y** 分辨率更高的分辨率显示一个大样品片段。

即时图像拼接



对于**即时图像拼接**采集流程，您要手动地将样品台缓慢移动过样品上方所有要采集图像拼接图像的位置。您的软件会连续采集图像，并自动组合它们。您只需要启动采集流程，随着您移动样品台，会自动采集单幅图像。

多个采集流程的组合

您可以组合多个自动采集流程。为此，请单击所需采集流程对应的按钮。

请注意: 哪些自动采集流程可以相互组合取决于具体软件。

示例



如果将多通道和 Z 图像栈这两个采集流程组合，则会在每个聚焦位置采集完整多通道图像。您可以在流程管理器工具窗口的 [C] 组中指定采集流程的顺序。可以在此组中定义多通道采集流程的采集参数。



将 Z 图像栈和 XY 位置/图像拼接这两个采集流程组合以在样品上的多个位置采集 Z 图像栈时，首先将在第一个位置采集完整的 Z 图像栈。完成该操作后，本系统将移动到下一个位置，采集下一个 Z 图像栈，以此类推。

00442 05072017

7. 采集图像序列

使用本软件可采集图像序列。图像序列可以是时间栈或 Z 图像栈。

7.1. 时间栈

什么是时间栈？



您可将一系列单幅图像组合为一副图像。时间栈中的每一帧采集于不同的时间点。时间栈为您显示样品的某一区域如何随着时间而变化。您可以像播放录像一样播放时间栈。

标准图像为二维。每个像素的位置都由其 X 和 Y 值来确定。对于时间栈，图像采集时间可以是一条附加信息，也可以是所有帧的“维度”。

构成时间栈的帧可以为 8 位灰度图像、16 位灰度图像或 24 位实彩色图像。

请注意: 时间栈也可以为 AVI 录像。您可以使用本软件载入和播放 AVI 格式的文件。

如何识别时间栈？



您可以通过图标迅速识别不同的图像类型，该图标位于文档组或文档工具窗口中的图像名称前。当图像为时间栈时，该图标中会增加一个小时钟。例如，由实彩色图像组成的时间栈具有此图标。

在属性工具窗口中，您可以使用帧数目选项来找出任何指定图像中包含多少帧单幅图像。

新建时间栈

有多种方法可用于生成时间栈。

要采集时间栈，请使用缩时或录像这两种采集流程中的一种。

使用图像 > 组合帧... 命令可将几幅单幅图像组合成时间栈。您可在在线帮助中找到有关组合帧对话框的说明。

显示时间栈

时间栈包含的数据远远多于可以显示在显示屏上的数据。

时间栈将自动在图像窗口中直接获得属于自己的导航栏。使用该导航栏可确定将时间栈中的哪些帧显示在显示屏上。您也可以像播放录像一样播放时间栈。

您可在在线帮助中找到有关导航栏的更多信息。

另外，您也可使用选维器工具窗口来确定如何在显示屏上显示时间栈或者对其进行修改。

您还可以隐藏导航栏。为此，请使用工具 > 选项... 命令。在树状视图中选定图像 > 常规选项。清除显示图像导航工具栏复选框。

保存时间栈

通常会使用 VSI 文件格式保存时间栈。您只有使用该文件格式，时间栈的大小才会没有限制。在保存较小的时间栈时，您还可以使用 TIF 或 AVI 文件格式。对于任何其它文件格式，保存过程中都将丢失大多数图像信息。为此，请使用文件 > 另存为... 命令。

转换时间栈	使用 图像 > 分离 > 时间帧 菜单命令，可将时间栈分解成选定的单幅图像。 在一个时间栈内，您可能只对较短一段时间感兴趣。使用 抽取 命令可新建一个时间栈，其仅包含来自现有时间栈的选定帧。这样就可以将时间栈内的帧数减少到仅包含那些您感兴趣的帧。您可以在时间栈平铺视图的上下文菜单中找到该命令。 当您以 TIF 或 VSI 之类的文件格式保存时间栈时，时间栈也会发生转换。时间栈这时会转换为标准的实彩色图像。该图像会显示显示屏上此时所显示的帧。
处理时间栈	图像处理操作 (如锐化滤镜) 会影响到全部图像，或仅影响已选定的单幅图像。您可从 运算 菜单中找到大多数图像处理功能。 在使用用于处理图像的各种操作时，每种操作中所打开的对话框的形式都是相同的。在该对话框中，请选定 应用于 > 选定的帧和通道 选项，以确定该功能仅会影响已选定的帧。 选定 应用于 > 所有帧和通道 按钮可处理所有单幅图像。 在平铺视图中，选定要处理的单幅图像。您可在在线帮助中找到有关该图像窗口视图的更多信息。浏览缩略图，并选定您要处理的图像。在平铺视图中，多重选定仍遵循 MS-Windows 的通用风格。 图像处理操作不会改变源图像的维度。因此，结果图像和源图像由相同数量的单幅图像组成。

00011

7.1.1. 缩时/录像

“缩时”和“录像”采集流程都可记录样品随时间变化的方式。这两种流程有什么不同？

我最好在什么时候采集时间栈？



在以下几种情况中，请使用“缩时”采集流程：

- 如果要记录运行缓慢的流程，例如每 15 分钟才采集一次，请使用“缩时”采集流程。
- 如果您想在采集进行的同时查看已经采集的帧，例如要检查实验的进展情况，则使用“缩时”采集流程。为此，请单击图像窗口导航栏中的 [平铺](#) 按钮。
- 如果您想使用软件的那些只能以 **VSI** 或 **TIF** 文件格式保存的附加功能，则使用“缩时”采集流程。
例如，测量对象、插入绘图元素 (如箭头或者文字)、让已经使用的摄像头和显微镜采集参数可供今后随时调用。
- 如果关键在于达到最佳的图像质量，而不必考虑文件大小，则使用“缩时”采集流程。

将时间栈另存为 AVI 文件

您还可以在以后将时间栈另存为 **AVI** 文件。为此，请将时间栈载入到文档组中，选定 [文件 > 另存为...](#) 命令，然后选定 **AVI** 文件类型。如有必要，请在 [设置 AVI 保存选项](#) 对话框中进行其它设置。

我最好在什么时候采集录像？

在以下几种情况中，请使用“录像”采集流程：

- 如果要记录的流程运行非常快 (录像的每秒采集数比时间栈的要大得多)，请使用“录像”采集流程。
- 如果您想将录像提供给不具有此软件 (使用 **MS Media Player** 也可播放 **AVI** 文件) 的第三者，请使用“录像”采集流程。
- 如果关键在于保持小的文件大小，请使用“录像”采集流程。

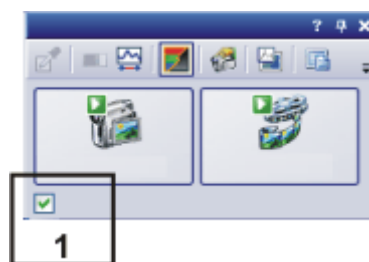
00107

7.1.2. 采集录像

您可以使用软件来录像。执行该操作时，摄像头会在任意时间段内采集尽可能多的图像。

- | | |
|---|--|
| 设置放大倍率

选定存储位置
 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 切换至“采集”布局。可使用 视图 > 布局 > 采集 命令进行该操作。 2. 在 显微镜控制 工具栏上，单击您希望用于采集录像的物镜的按钮。
如果您使用倍率变换器，则还必须选定使用的放大倍率级别。 3. 在 摄像控制 工具窗口的工具栏中，单击 采集设置 按钮。 <ul style="list-style-type: none"> • 采集设置 对话框即会打开。 4. 然后在树状结构中选定 保存 > 录像 选项。 5. 必须确定采集后如何保存录像。选定 自动保存 > 目标位置 列表中的 文件系统 条目，以自动保存采集的录像。 <ul style="list-style-type: none"> • 位于 目录 组中的 路径 字段显示录像自动保存时使用的目录。 6. 单击 路径 字段旁边的 [...] 按钮可更改此目录。 7. 在 文件类型 列表中，选定以何种文件格式保存录像。您可将录像保存为 VSI 图像或 AVI 录像。您可选定 AVI 录像文件 (*.avi) 条目。 |
| 选定压缩方法 | <ol style="list-style-type: none"> 8. 如果您希望压缩 AVI 文件以减小录像文件大小，请单击 选项... 按钮。 9. 例如，从 编码器 列表选定 Motion JPEG 条目。
选定 质量 列表中的 中 条目。
单击 确定 关闭 录像选项 对话框。 10. 单击 确定 关闭 采集设置 对话框。 |
| 设置图像质量 | <ol style="list-style-type: none"> 11. 切换至实时模式，然后在 摄像控制 工具窗口中选定录像采集的最优设置。请特别注意设置正确的曝光时间。 <ul style="list-style-type: none"> • 在录像过程中，曝光时间不能更改。即使您已将曝光时间设置为自动，曝光时间也不会再在录制录像时进行调整。 |
| 切换到录像模式 | <ol style="list-style-type: none"> 12. 找到样品上您感兴趣的部分并对其聚焦。 13. 选中 录像 复选框 (1)。该复选框位于 摄像控制 工具窗口中的 实时观察 按钮下。 |



开始录像



- [拍照](#) 按钮将替换为 [录像](#) 按钮。
14. 单击 [录像](#) 按钮可开始录像。
 - 随即显示实时图像并立即开始录像。
 - 状态栏中将显示进度指针。斜线左侧指示已经采集的图像的数目。斜线右侧显示估计的图像数目的最大值。此数目取决于摄像头的图像大小，并且不能超过 2 GB。

 71/3639

- [录像](#) 按钮上的图标标志当前正在录像。

停止录像



15. 再次单击录像按钮可结束录像。
 - 随即会显示录像的第一幅图像。
 - 时间栈的导航栏将显示在文档组中。使用此导航栏播放录像。
 - 本软件仍然会处于录像模式，直到清除录像复选框为止。

7.1.3. 采集时间栈

时间栈中的每一帧采集于不同的时间点。利用时间栈，可以记录样品上的位置随时间发生变化的情况。在开始时，为采集时间栈，在**摄像控制**工具窗口中进行与拍照采集相同的设置。此外，必须在**流程管理**工具窗口中定义采集图像的时间序列。

任务

您想采集 10 秒钟的时间栈。每秒采集一幅图像。

设置放大倍率

设置图像质量

选定采集流程



1. 切换至“采集”布局。可使用**视图 > 布局 > 采集**命令进行该操作。
2. 在**显微镜控制**工具栏上，单击您希望用于采集录像的物镜的按钮。如果您使用倍率变换器，则还必须选定使用的放大倍率级别。
3. 切换至实时模式，然后在**摄像控制**工具窗口中为您的采集选定最优设置。请特别注意设置正确的曝光时间。此曝光时间将会用于时间栈中的所有帧。
4. 从**分辨率 > 拍照/流程**列表中，选择时间栈的帧所需的分辨率。
5. 找到样品上您感兴趣的部分并对其聚焦。
6. 激活**流程管理**工具窗口。
7. 选定**自动处理**选项。
8. 单击**缩时**按钮。
 - 按钮将显示为已点击状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。
 - [t] 组会自动显示在工具窗口中。
9. 如果另一采集流程 (例如 **Z 图像栈**) 为活动状态，单击该按钮可关闭采集流程。
 - 现在，包含多个采集流程的组的外观可能 (例如) 如下所示:



设置采集参数



10. 清除**启动延迟**和**尽快**复选框。
11. 指定完成采集所需的时间，如 10 秒。在**记录时间**字段中输入值 00000:00:10,000，将录制时间设置为 10 秒。您可以在该字段中直接编辑每个数字。为此，只需在要编辑的数字前单击一下。
12. 单击位于该字段右侧的带锁按钮，以将采集时间指定为不再更改。
13. 指定您要采集的帧数。
 - 在**周期数**字段中输入，例如 10。
 - 随即会更新**间隔**字段。它表示两个连续帧之间经过的时间。

采集时间栈



14. 单击开始按钮。

- 随即会立即开始采集时间栈。
- 开始按钮会变为暂停按钮。单击此按钮将中断采集流程。
- 停止按钮将变为激活状态。单击此按钮将停止采集流程。到此时为止所采集的时间栈图像将得到保留。
- 在左下部的状态栏中将出现进度条。它会指示还需要采集多少幅图像。
- 当您在流程管理器工具窗口中再次看见开始按钮，同时不再显示进度条时，即表示采集已完成。
- 您将在图像窗口中看到已采集的时间栈。使用位于图像窗口中的导航栏可以查看此时间栈。
- 默认情况下，所采集的时间栈将自动保存。存储目录将显示在采集设置 > 保存 > 流程管理对话框中。预设的文件格式为 VSI。您可在在线帮助中找到有关采集设置 > 保存对话框的说明。

请注意: 如果您的计算机正在运行其它程序，例如病毒扫描程序，则在采集录像时这些程序可能会对性能造成干扰。

00304 04072017

7.2. Z 图像栈

什么是 Z 图像栈?



您可以将一系列单幅图像组合成一幅图像文件。Z 图像栈包含在不同聚焦位置所采集的帧。您在执行一些操作时需要使用 Z 图像栈，例如，通过使用运算 > 增强 > 扩展景深处理... 命令计算扩展景深图像。

标准图像为二维。每个像素的位置都由其 X 和 Y 值来确定。使用 Z 图像栈时，聚焦位置 (或样品高度) 是每个像素的附加信息项目。

构成 Z 图像栈的帧可以为 8 位灰度图像、16 位灰度图像或 24 位实彩色图像。

如何识别时间栈?



您可以通过图标迅速识别多维图像，该图标位于文档组或文档工具窗口中图像名称的前面。当图像为 Z 图像栈时，该图标中会增加一个小 Z。

创建 Z 图像栈

有多种方法可用于生成 Z 图像栈。

- 使用采集流程 Z 图像栈可采集 Z 图像栈。
- 使用图像 > 组合帧... 命令可将几幅单幅图像组合成 Z 图像栈。

显示 Z 图像栈

Z 图像栈包含的数据远远多于可以显示在显示屏上的数据。

Z 图像栈将自动在图像窗口中直接获得属于自己的导航栏。使用该导航栏可确定将 Z 图像栈中的哪些帧显示在显示屏上。您也可以像播放录像一样播放 Z 图像栈。您可在在线帮助中找到关于导航栏的详细说明。



另外，您也可使用选维器工具窗口来定义如何在显示屏上显示 Z 图像栈图像或者对其进行修改。

保存 Z 图像栈

请注意: Z 图像栈只能以 TIF 或 VSI 文件格式保存。否则，大量图像信息会在保存过程中丢失。

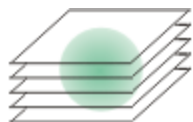
00012

采集 Z 图像栈

Z 图像栈包含在不同聚焦位置所采集的帧。即是说，显微镜样品台位于不同的 Z 位置以采集每个帧。

请注意: 在显微镜配备有电动 XY 样品台时，您仅可以使用 **Z 图像栈** 采集流程。

任务 您想要采集一个 Z 图像栈。样品厚度约为 50 μm 。两帧之间的 Z 距离为 2 μm 。



选定物镜
设置图像质量

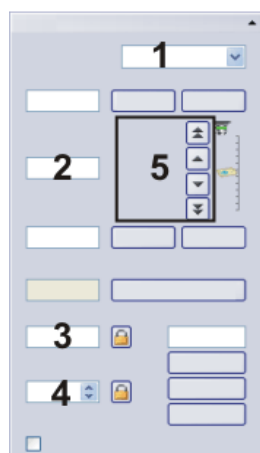
选定采集流程



1. 切换至“采集”布局。为此，请使用 (例如) **视图 > 布局 > 采集** 命令。
2. 在**显微镜控制**工具栏上，单击您想要用于图像采集的物镜所对应的按钮。
3. 切换至实时模式，然后在**摄像控制**工具窗口中为您的采集选定最优设置。请特别注意设置正确的曝光时间。此曝光时间将会用于 Z 图像栈中的所有帧。
4. 在样品上搜索所需位置。
5. 激活**流程管理**工具窗口。
6. 选定**自动处理**选项。
7. 单击 **Z 图像栈** 按钮。
 - 按钮将显示为已点击状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。
 - **[Z]** 组即会自动显示在工具窗口中。
8. 如果有其它采集流程 (例如**多通道**) 处于激活状态，则单击该按钮可关闭采集流程。
 - 包含各种采集流程的组现在显示为:



设置采集参数



在**流程管理**工具窗口中设置采集 Z 图像栈的参数。为此，请使用字段和按钮 **(1-4)**。

9. 选定**定义列表 (1)** 中的**范围**选项。
10. 请在**范围**字段 **(2)** 中输入所需的 Z 范围。在本例中，输入略大于样品厚度 (= 50 μm) 的值，例如值 60。

采集图像



11. 在**步距**字段 (3) 中, 输入所需的 Z 距离, 例如值 2, 表示 Z 距离为 2 μm 。该值应大致相当于物镜的焦距。
 - 随后 **Z 切片**字段 (4) 中将显示要采集多少帧。在本例中, 将采集 31 帧。
12. 找到样品上您感兴趣的部分并对其聚焦。为此, 请使用箭头按钮 (5)。双箭头按钮会以更大的步距移动样品台。
13. 单击**开始**按钮。
 - 本软件现将会显微镜样品台的 Z 传动装置移至起始位置。起始位置低于样品台当前 Z 位置的 Z 范围的中心。
 - 一旦到达起始位置, 即会开始采集 Z 图像栈。显微镜样品台按步距向前移动, 并在每个新的 Z 位置处采集一幅图像。
 - 当您在**流程管理器**工具窗口中再次看见**开始**按钮, 同时不再显示进度条时, 即表示采集已完成。
 - 您可以在图像窗口中看到所采集的 Z 图像栈。使用位于图像窗口中的导航栏可以查看此 Z 图像栈。
 - 所采集的 Z 图像栈将被自动保存。您可以在**采集设置 > 保存 > 流程/实验**对话框中查看存储目录。预设的文件格式为 VSI。

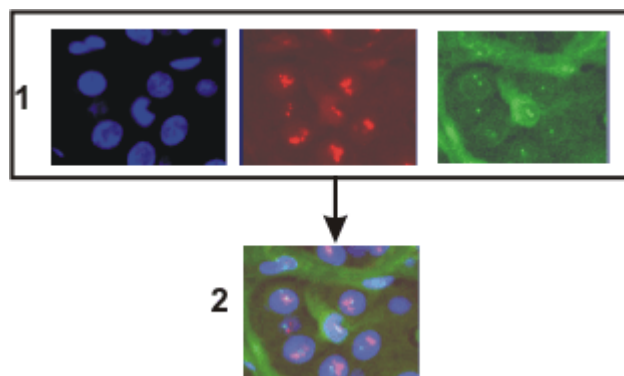
请注意: 如果您的计算机正在后台运行其它程序, 例如病毒扫描程序, 则这些程序可能会影响采集 Z 图像栈时的性能。

00367

8. 采集荧光图像

8.1. 多通道图像

什么是多通道图像? 多通道图像将一系列单色图像组合成一幅图像。多通道图像通常显示已经使用多种不同荧光色素标记的样品。多通道图像由单幅荧光图像的组合构成。您可以单独显示单幅荧光图像或者显示所有荧光图像的叠加。



在插图的上侧，您可以看到单幅荧光图像 **(1)**。
在下侧，您可以看到单幅荧光图像的叠加 **(2)**。

构成多通道图像的单幅图像可以为 8 位灰度图像或 16 位灰度图像。

多通道图像可与时间栈或 Z 图像栈组合。多通道时间栈合并了多个色彩通道。图像中所合并的每个色彩通道都通过它自己的时间栈来再现。

如何识别多通道图像?



您可以通过图标迅速识别多通道图像，该图标位于文档组或**文档**工具窗口中图像名称的前面。

在**属性**工具窗口中，您可以使用**通道**选项来找出任何给定图像中包含多少通道。

新建多通道图像

本软件提供多种采集多通道图像的方法。

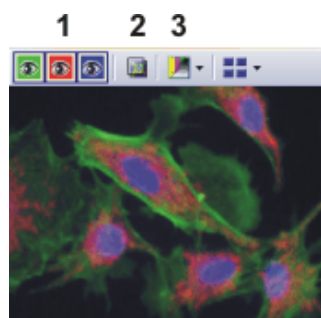
1. 使用**多通道**自动采集流程可采集多通道图像。
2. 使用实验管理员可以定义并运行涉及使用本软件采集图像的复杂实验。使用**多通道组**命令将多幅图像组合为一幅多维图像。
3. 使用**图像 > 组合通道...**命令可将几幅单幅图像组合成多通道图像。

采集多通道荧光图像的特殊硬件

本软件支持图像分割工具和多摄像头系统。这两个系统可让您同时采集多个色彩通道，并将它们组合为一幅多通道荧光图像。

显示多通道图像

多通道图像包含的数据远远多于可以显示在显示屏上的数据。



将多通道图像载入本软件时，您将在图像窗口中看到导航栏，您可通过它访问所有荧光通道。

- 您可分别显示每幅荧光图像，或者以叠加形式显示所有荧光图像 **(1)**。
- 如果采集了样品的明场以及荧光图像，您可以显示或隐藏该明场 **(2)**。
- 各个荧光图像是单色的。出于该原因，您可以根据需要任意更改色彩映射。您可以用荧光色彩显示荧光通道，或者使用调色板自行选择色彩，也可显示原始图像 **(3)**。

您还可以隐藏导航栏。为此，请使用 **工具 > 选项...** 命令。在树状视图中选定 **图像 > 常规** 选项。清除 **显示图像导航工具栏** 复选框。

另外，您也可以使用 **选维器** 工具窗口来定义多通道图像在显示屏上的显示方式，或对此进行更改。例如，您可以在这里更改单个色彩通道的荧光色。

保存多通道图像

请注意：多通道图像只能以 **TIF** 或 **VSI** 文件格式保存。否则，大量图像信息会在保存过程中丢失。

转换多通道图像

使用 **分离** 命令可将多通道图像分解为已选定的色彩通道。结果图像仍然为“多通道”类型，虽然它只包含一个色彩通道。

可通过以下几种方法访问该命令：

- 单击 **选维器** 工具窗口中的 **分离通道** 按钮。
- 使用 **选维器** 工具窗口上下文菜单中的 **分离** 命令。
- 使用 **图像 > 分离 > 通道** 菜单命令。

使用 **抽取** 命令可创建由比源图像少的色彩通道组成的新多通道图像。

在 **选维器** 工具窗口中选定要保留的所有色彩通道。然后使用工具窗口上下文菜单中的 **抽取** 命令。

当您将其它文件格式的多通道图像保存为 **TIF** 或 **VSI** 时，同时会转换该多通道图像。多通道图像随即变为标准 **24** 位实彩色图像。该图像总是会准确显示显示屏上当前所示的信息，也就是说，例如，这可能是所有通道的叠加或者只有一个通道。

处理多通道图像

图像处理操作 (如锐化滤镜) 会影响到全部图像，或仅影响已选定的单幅图像。您可从 **运算** 菜单中找到大多数图像处理功能。

在 **选维器** 工具窗口中选定要处理的帧。在工具窗口中，已选定的通道将会以彩色形式突出显示。

在使用用于处理图像的各种操作时，每种操作中所打开的对话框的形式都是相同的。在该对话框中，请选定 **应用于 > 选定的帧和通道** 选项，以确定该功能仅会影响已选定的帧。

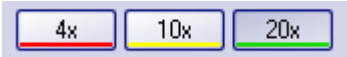
选定 **应用于 > 所有帧和通道** 按钮可处理所有单幅图像。

图像处理操作不会改变源图像的维度。因此，结果图像和源图像由相同数量的单幅图像组成。

8.2. 采集荧光图像之前和之后

在您采集荧光图像之前

- | | |
|---|--|
| 定义观测模式 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 为色彩通道定义观测模式。 |
| 设置采集荧光图像的显微镜

 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 使用 视图 > 工具窗口 > 显微镜控制 命令可显示 显微镜控制 工具窗口。 <ul style="list-style-type: none"> • 物镜 组中提供用于改变物镜的按钮。
  • 观测模式 组中提供对应于每个已设置观测模式的按钮。至少应针对明场和每个色彩通道定义观测模式。 2. 点击所需物镜的按钮。 3. 单击使用最长激发波长 (如“红色”) 的激发的观测模式所对应按钮。 |
| 设置采集荧光图像的摄像头

 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 使用 视图 > 工具窗口 > 摄像控制 命令可显示 摄像控制 工具窗口。 2. 设置采集的图像分辨率.使用高物镜放大倍率,则需要更低的分辨率。为此,从拍照/流程列表分辨率组中选择所需分辨率。 3. 在动态模式下降低图像分辨率.在动态模式中使用更高像素合并时,帧频率将降低,从而可以更好地对焦。为此,从位于分辨率组中的实时观察与录像列表中选择带有附件像素合并 2x2的选项。 4. 如果使用彩色摄像头: 开启摄像头的模式。您可以在摄像控制工具窗口的工具栏中找到该按钮。 <ul style="list-style-type: none"> • 切换彩色灰度模式按钮现在显示为这样。 5. 如果可以为摄像头设置不同的位深度,则单击切换位深度按钮,从而设置最大位深度。 |
| 关闭明场采集的校正

 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 使用 视图 > 工具栏 > 校准 命令来显示 校准 工具栏。 2. 关闭白平衡和阴影校正。
为此,如果这些按钮存在并且可用,请释放这些按钮。 |
| 聚焦荧光样品





 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 选定自动曝光时间。 2. 在 摄像控制 工具窗口中,单击实时观察按钮。 <ul style="list-style-type: none"> • 如果动态图像太暗,则在摄像控制 > 曝光 > 曝光补偿列表中选择更高的值。 • 如果曝光时间长于 300 ms,则可通过提高感光度或增益来将其缩短。 3. 对焦到样品上。 <ul style="list-style-type: none"> • 在摄像头的黑白模式中,您可以降低漫射光。在摄像控制工具窗口的工具栏中,单击动态反虚化按钮。此时您可以决定是否需要应用消卷积滤镜。可能必须通过曝光时间校正来延长曝光时间。 4. 结束实时模式。为此,请单击摄像控制工具窗口中的实时观察按钮。 |

- 设置存储位置 默认情况下，完成采集后将立即保存多通道图像。将使用 **VSI** 文件格式作为文件格式。
-  1. 在开始采集前，请先指定保存文件的位置。
2. 为此，请单击位于[流程管理](#)工具窗口工具栏中的[采集设置](#)按钮。选定树状视图中的[保存 > 流程管理](#)选项。
- 您可以在[目录 > 路径](#)字段中找到当前目录。
3. 单击[路径](#)字段旁的 [...] 按钮，更改用于在采集图像后保存图像的目录。

采集荧光图像之后

- 查看多通道图像 多通道图像由单独的荧光图像组成。您可以设置将哪些色彩通道或色彩通道的组合显示在显示屏上。为此，请使用图像窗口中的导航栏。
- 单击颜色字段可让通道显示或消失。此时，所有显示在显示屏上的色彩通道都通过眼睛图标标识。
- 导航栏还提供更改多通道图像外观的其它方式。
- 属性工具窗口 - 许多采集参数将随图像一起保存。
- 使用[视图 > 工具窗口 > 属性](#)命令可显示[属性](#)工具窗口。在[属性](#)工具窗口中，您将发现每一个色彩通道均拥有自己的[通道](#)信息组。其包含通道名称、发射波长、观测模式名称以及曝光时间。
- 保存多通道图像 会自动保存多通道图像。您可以在[采集设置 > 保存 > 流程管理](#)对话框中设置存储目录。使用的文件格式为 **VSI**。
- 对于 **VSI** 格式，预设 **JPEG** 压缩比为 **90%**。您可以在[保存 > 流程管理 > 自动保存 > 选项...](#)下的[采集设置](#)对话框中更改压缩比。

00363

8.3. 定义荧光采集的观测模式

采集荧光图像之前，您必须为色彩通道定义观测模式。通常情况下，已预定义可以根据显微镜配置进行调整的观测模式。

先决条件 系统已配置和校准完毕。为此，您必须在 **采集 > 设备 > 设备列表** 对话框中输入硬件组件，并在 **设备设置** 对话框中对其进行配置。在此操作的最后，使用 **采集 > 校准...** 命令校准系统。

以下表格包含针对电动显微镜和非电动显微镜的示例配置。其中仅列出了与采集多通道荧光图像有关的硬件组件。

设备列表		示例选项	
		非电动显微镜	电动显微镜
显微镜镜体	<显微镜的名称>	BX51	BX61
显微镜			
物镜转盘	<物镜转盘的名称>	手动物镜转盘	电动 (UCB)
分光镜组件盒	<分光镜组件盒的名称>	手动分光镜组件盒	BX-RFAA
样品台			
Z 轴	<样品台 Z 传动装置的控制器的名称>	非电动	电动 (UCB)
荧光与反射光路			
快门	<反射光快门的名称>	手动快门	电动 (UCB)
透射光路			
光源	<透射光源的名称>	未使用	UCB 卤素灯
聚光镜	<聚光镜的名称>	手动聚光镜	U-UCD8A

设备设置	选项
物镜转盘	<物镜>
分光镜组件盒	U-MNU U-MWB U-MWG 对于没有棱镜模块的位置，请选定 空闲 选项。
聚光镜	使用电动聚光镜： 设备设置下还会列出硬件组件 孔径光阑 和 上透镜 。

定义透射明场的观测模式

示例: 透射明场中的硬件组件: 在透射明场中，光路中没有荧光棱镜模块。反射光快门是关闭的。



- 使用 **采集 > 设备 > 自定义设备...** 命令。激活 **观测模式** 选项卡。
- 单击 **新建观测模式** 按钮。
 - 随即打开一个对话框，您可以在其中输入名称。
- 为新观测模式命名，然后单击 **确定** 关闭该对话框。您可以 (例如) 将您的观测模式命名为 **MyBF**。



配置分光镜组件盒

4. 选定**可用的组件**列表中的分光镜组件盒。
 - 对话框的中央区域将显示已经选择的硬件组件的设置。
5. 在透射明场中，不允许分光镜组件盒中含有棱镜模块。因此，请在位于对话框中部的**状态**列表选定**自动调整**选项，并在该列表下方的列表选定**空闲**选项。
 - 对于手动显微镜: 涉及手动显微镜时，不能将分光镜组件盒自动移到您希望的位置。使用手动显微镜时，将显示消息，提示您进行手动设置。
在您定义观测模式时也会出现该消息。单击**确定**确认操作。

对于电动显微镜:
设置聚光镜

6. 选定聚光镜。
在位于对话框中部的**状态**列表选定**自动调整**选项，并在该列表下方的列表选定**空闲**选项。
7. 选定硬件组件**孔径光阑**。
在位于对话框中部的**状态**列表选定**调节**选项。在其下方的字段中输入“75%”。
8. 选定硬件组件**上透镜**。
选择**状态**列表中的**按每个物镜调节**选项。
 - 在**自定义设备**对话框的中央，现在可以单独设置每个物镜的上透镜。
 - 上透镜仅用于更高放大倍率 (10x 以上) 的物镜，在更低放大倍率下处于退出状态。
9. 指定对于哪些物镜应将上透镜带入光路，以及对于哪些物镜应将上透镜从光路移除。
为此，选中所有物镜的**使用这个物镜**复选框。
在**选定的组件**列表中，放大倍率低于 10x 的每个物镜需要显示**出**状态。否则，单击**出**按钮上的对话框的中央。
在**选定的组件**列表中，放大倍率高于 10x 或正好为 10x 的每个物镜需要显示**入**状态。否则，单击**入**按钮上的对话框的中央。

对于电动显微镜: 打
开透射光源。

保存观测模式

10. 选定透射光源。您将在**可用的组件**列表的**透射**选项下找到该光源。
11. 在位于对话框中部的**状态**列表选定**调节**选项。为该光源设置 9 V。
使用显示小光源的按钮开启光源。
 - 当光源开启时，该按钮具有如下外观。
 - 在**选定的组件**列表中，还可以看到该观测模式的光源将被开启。
12. 单击**确定**按钮以保存新观测模式。
 - 随后，**显微镜控制**工具窗口将出现一个新按钮，其名称为此观测模式的名称。
 - 现在您就可以使用**流程管理**工具窗口中的观测模式来采集多通道荧光图像。

定义荧光通道的观测模式

- 任务

为采集荧光图像定义观测模式。不使用电动显微镜时，执行该操作也非常有用，因为在这种情况下，采集图像会以正确的荧光色彩自动上色。
- 摘要

以下硬件组件属于荧光通道的观测模式。这些操作步骤中详细描述了将这些硬件组件与观测模式整合的方法。

硬件组件	设置
 荧光色素	指派荧光色彩。
 分光镜组件盒	选择要使用的棱镜模块。
 荧光快门	打开图像采集的荧光快门。
 透射光光源	关闭透射光光源。



 定义荧光色素

- 使用采集 > 设备 > 自定义设备... 命令。激活观测模式选项卡。
- 单击新建观测模式按钮。
- 为新观测模式命名，然后单击确定关闭该对话框。为观测模式命名，如蓝色。
- 为荧光通道分配荧光色素 (例如 DAPI) 和色彩 (例如 470 nm 的蓝色)。为此，选定可用的组件列表中的荧光色素选项。
选定状态列表中的使用选项。
在位于其下方的荧光色素列表中，选择要使用的荧光色素，如条目 DAPI。
如有必要，您可以在颜色列表中更改荧光颜色。
 - 在所有情况下，定义荧光观测模式的荧光色素都非常重要，即使不自动更改任何设备设置也是如此。荧光色彩与观测模式链接后，使用该观测模式采集的每个图像都会以相应颜色自动上色。这是有效的，而与您是使用手动显微镜还是电动显微镜无关。

 对于电动显微镜：
设置分光镜组件匣

为电动显微镜和手动显微镜使用该设置以及其他设置也非常有用。使用手动显微镜时，将显示消息，提示您进行手动设置。除此之外，设备设置随采集图像一起保存。

 对于电动显微镜：
设置荧光光路的快门

- 选定可用的组件列表中的分光镜组件盒。
 - 对话框的中央区域将显示已经选择的硬件组件的设置。
- 对于荧光图像的采集，必须使用特定棱镜模块。因此，在位于对话框中央的状态列表中选择调节选项，并在其下方的列表中选择所需棱镜模块。
- 在可用的组件列表中，选择位于荧光与反射光选项下方的快门。
- 采集荧光后，必须打开该快门。因此，请在位于对话框中部的状态列表选定用于采集选项。
 - 随后，快门会在采集图像之前打开，并在完成图像采集后关闭，以避免样品褪色。

 对于电动显微镜：关闭透
射光源。

- 选定透射光源。您将在可用的组件列表的透射选项下找到该光源。
- 要采集荧光图像，必须关闭光源。在位于对话框中部的状态列表选定调节选项。
使用显示小光源的按钮关闭光源。
 - 当光源关闭时，该按钮具有如下外观。
 - 在选定的组件列表中，还可以看到该观测模式的光源将被关闭。





包含摄像头设置

使用黑白摄像头来采集荧光图像通常会更好。如果使用可在彩色模式和灰度模式之间切换的摄像头，则可将灰度模式整合到观测模式中。

如果使用多通道采集流程采集荧光图像，则该设置并非必需的。在多通道采集流程启动之前，本软件会检查摄像头是否工作在灰度模式下。随后会收到相应消息，并且可以在进行图像采集之前重设摄像头。

保存观测模式

11. 在可用的组件列表中选择摄像头。
12. 选定状态列表中的使用选项。
13. 一些摄像头提供不同位深度的灰度模式。从图像类型列表选择位深度最高的灰度模式。
14. 单击确定按钮以保存新观测模式。
 - 随后，显微镜控制工具窗口将出现一个新按钮，其名称为此观测模式的名称。
 - 现在您就可以将该色彩通道用于多通道采集流程。

使用预定义观测模式

通常情况下，无需完整地重新定义所需观测模式。使用其中一个预定义观测模式，然后针对显微镜进行自定义。



abl

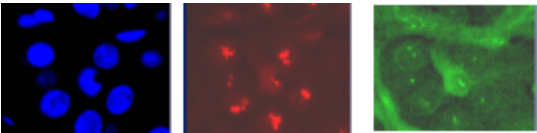
1. 使用采集 > 设备 > 自定义设备... 命令。激活观测模式选项卡。
 - 您可以在名称列表中找到所有预设的观测模式。如果没有观测模式可用，则单击选定预定义的观测模式按钮。单击全选按钮。单击确定。
 - 一旦分光镜组件盒安装了滤色块，将在设备设置中自动设置相应的观测模式。滤色块的名称随时可在观测模式下方找到。
2. 在名称列表选择一个荧光通道 (例如 U-MNU)。
3. 单击重命名观测模式按钮。
 - 输入新观测模式名称对话框即会打开。
4. 输入更通用的名称 (例如蓝或 DAPI)，然后单击确定。
 - 选定的组件列表包含以下硬件组件。组件数量可能更多或更少，具体取决于在设备列表中为硬件组件选择的选项。
 - 在分光镜组件盒中，相应的棱镜模块 (例如 U-MNU) 将被选中。
 - 透射光源将关闭。
 - 透射光路的快门将具有用于采集状态。这表示它将在图像采集时打开。
5. 将荧光色素 (如蓝色或 DAPI) 指派给荧光通道。
6. 单击确定按钮以保存新观测模式。
 - 随后，显微镜控制工具窗口将出现一个新按钮，其名称为此观测模式的名称。

00370

8.4. 采集和组合荧光图像

8.4.1. 采集多个单幅荧光图像

本软件支持多种图像类型。多通道图像通常显示已经使用多种不同荧光色素标记的样品。然而，也可以采集只由一个通道组成的多通道图像。



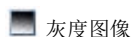
插图显示了相同样品位置的三幅荧光图像。每个图像均显示其它荧光色素。

切换到暗用户界面	1.	如果受到显示器光线的干扰，可以将本软件切换到暗用户界面。为此，请使用 视图 > 切换程序暗外观 命令。
选定荧光观测模式	2.	使用 视图 > 工具栏 > 观测模式 命令可显示 观测模式 工具栏。
	3.	要载入观测模式，请单击名称为所需荧光观测模式的按钮。 - 对于手动显微镜: 载入荧光观测模式即定义了要采集荧光图像。对于本软件，使用荧光色素组件的所有观测模式均被自动指定为荧光观测模式。 - 对于电动显微镜: 载入观测模式时，显微镜会进入到该观测模式设定的状态。为此，显微镜的所有电动组件都将被准确地移动到观测模式中针对这些组件所设置的位置。
为采集选择曝光时间	4.	使用 视图 > 工具窗口 > 摄像控制 命令可显示摄像控制工具窗口。
	5.	切换至实时模式。为此，请单击 摄像控制 工具窗口中的 实时观察 按钮。 对于电动显微镜: 将自动打开反射光快门。此操作将在定义观测模式时指定。对于快门，应当已经选中用于采集状态。
	6.	在 摄像控制 工具窗口中，选定 曝光 > 手动 选项。
	7.	一些摄像头可为荧光采集提供 SFL 模式 (例如 DP72)。开启此模式。
	8.	优化曝光时间。 如果曝光时间长于 500 ms，则可通过提高增益来将其缩短。 为此，更改 曝光 > 感光度 字段中的值，或使用 增益 滑动游标。
聚焦荧光样品	9.	对焦到图像上。 如果显微镜样品台配备有电动 Z 传动装置，则显微镜控制工具窗口中将提供聚焦调节器供您使用。
	10.	结束实时模式。为此，请单击 摄像控制 工具窗口中的 实时观察 按钮。 - 对于电动显微镜: 将关闭反射光快门。 - 现在您将在图像窗口中看到已经采集到的荧光图像。即使荧光图像仅包含单个通道，但其图像类型仍为“多通道图像”。您可以通过图标迅速识别多通道图像，该图标位于文档组或文档工具窗口中图像名称的前面。 - 荧光图像将以您在定义观测模式时一同定义的荧光色彩显示。
更改荧光图像的显示	11.	可以使用 选维器 工具窗口来定义荧光图像在显示屏上的显示方式，或者更改其显示方式。您可以在此 (例如) 更改荧光色彩。
保存荧光图像	12.	使用 文件 > 另存为... 命令可保存新的多通道图像。请使用 TIF 文件格式。

8.4.2. 组合通道

[图像 > 组合通道...](#) 命令用于根据多个单幅图像创建一幅新的多通道图像。You can find a description of this dialog box in the online help.

哪些图像可进行组合？



灰度图像

您可将一系列灰度图像组合成一幅多通道图像。这些灰度图像可以是 8 位灰度图像或 16 位灰度图像。不过前提条件是，所有这些单幅图像都必须具有相同的位深度、图像大小和图像校准。



多通道图像

多通道图像不必由多个色彩通道构成。一些多通道图像也可以仅包含一个荧光通道。也可将这些图像组合为包含多个荧光通道的新多通道图像。不过前提条件是，所有这些单幅图像都必须具有相同的位深度、图像大小和图像校准。



多维图像

您可将多个多维图像组合成一幅图像。此类操作的先决条件是，所有独立图像仅在一个维度 (色彩通道、聚焦位置或时间点) 上不同，并且图像大小相同。

一个示例是两个单独的颜色时间栈 (每个栈由 50 个单幅图像组成)。每个时间栈使用不同的色彩通道采集。在这种情况下，您可以创建一个多通道时间栈。

透射光图像

在透射光模式下，在样品上显示具有相同位置的其他图像有时属于一系列荧光图像。可将此类透射图像与多通道图像组合。

透射图像不必具有与单幅图像相同的图像类型。然而，图像大小、图像校准和位深度必须与荧光图像相同。

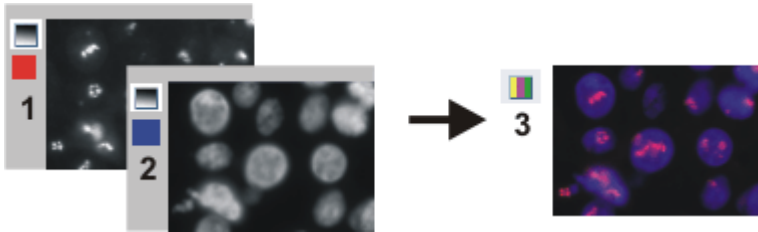
示例: 可以使用实彩色图像作为透射图像。各个荧光图像的位深度为 16 位时，仅可以使用 48 位实彩色图像作为透射图像。

组合荧光图像

组合通道

1. 载入您希望组合成一幅多通道荧光图像的灰度图像。该样品 (例如) 使用荧光色素、DAPI 和德克萨斯红标记。
2. 激活本软件的文档组中的第一个图像。
3. 使用 [图像 > 组合通道...](#) 命令。
 - [组合通道](#) 对话框随即打开。
 - 该激活的图像将作为第一色彩通道被自动输入到 [可用图像](#) 表中。
 - 使用合适的观测模式采集多个单独的荧光图像后，色彩通道和荧光色彩的名称将从图像读出，并自动用于 [组合通道](#) 对话框中。
4. 如果已更改了通道名称或需要进行该操作: 在 [名称](#) 单元格中单击一次。输入对色彩通道的描述，例如输入使用了“德克萨斯红”的荧光色素的名称。
您可以增加行宽，使描述正好能完全显示。
5. 无法从图像读出荧光色彩时，默认情况下，将为第一个通道指派颜色“红色”。要更改活动颜色，请单击该颜色字段。从 [标准](#) 选项卡上的调色板中选定一种颜色，或激活 [自定义](#) 选项卡以自定义一种颜色。
单击 [确定](#) 按钮可关闭颜色调色板并返回 [组合通道](#) 对话框。
6. 在下一可用行中，单击 [图像](#) 单元格。随即会出现一个取值表，表中包含所有可与此活动图像组合的图像。选定下一幅图像。单击另一行后，新图像便会立即被包含到该表格中。
7. 现在，您可以更改新通道的属性。为新通道命名，并为其分配颜色。
8. 可以相对于彼此移动单幅图像。为此，如有必要，使用 [像素偏移](#) 组中的箭头按钮。

- 9. 可以设置各个色彩通道的权重。例如，增加亮度字段中的值，可显著增加通道的权重。
- 10. 单击确定按钮创建多通道图像。
随即会新建一个默认名为“Image_<序列号>”的新图像文档。



使用组合通道命令可将荧光图像 (1) 和 (2) 组合为多通道图像 (3)，对于两个以上的图像也可实现。

保存多通道图像

- 11. 使用文件 > 另存为... 命令保存新的多通道图像。保存图像时，请始终使用TIF 或 VSI 文件格式。

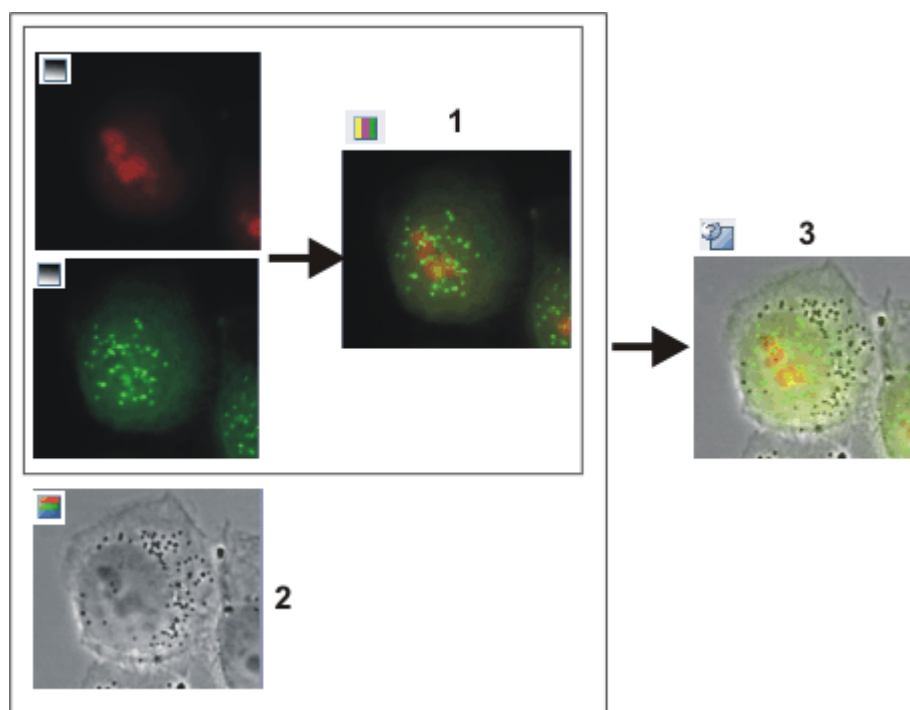
查看多通道图像

- 12. 使用选维器工具窗口，可更改荧光色彩，选择其他色彩映射，或关闭各个色彩通道然后重新打开。
- 13. 使用调节显示工具窗口，可更改多通道图像在显示屏上的显示。例如，可以相对于彼此更改各个色彩通道的权重。

组合荧光图像和透射图像

- 1. 载入一个或多个荧光图像，以及需要覆盖色彩通道的透射图像。
- 2. 激活本软件的文档组中的透射图像。
- 3. 使用图像 > 组合通道... 命令。
 - 组合通道对话框随即打开。
 - 如果要将实彩色图像用作透射图像，则会在透射列表中自动选择该图像。
透射图像为灰度图像时，会将其自动输入到可用图像表中。
- 4. 如有必要，在透射列表中选择透射图像。
- 5. 在图像单元格中单击一次。将获得包含可以与所选透射图像组合的所有载入图像的取值表。选择所需荧光图像。
- 6. 如有必要，更改新荧光通道的属性。为通道命名，并为其分配颜色。
- 7. 单击确认按钮可创建结果图像。
随即会新建一个默认名为“Image_<序列号>”的新图像文档。
 - 在文档组中，随后可以看到已组合的所有图像的叠加。
 - 结果图像为具有两个图像层的多层图像。通常情况下，两个图像层不属于相同图像类型。因此，文档组中的图像具有该图标。





使用**组合通道**命令，可以将多个荧光图像组合为多通道图像 **(1)**。如果在样品 **(2)** 上的相同位置采集了透射图像，则可以将其与多通道图像组合以形成多层图像 **(3)**。



查看多层图像



8. 单击导航栏中的这个按钮可隐藏透射图像。

- 现在您只会看到多通道荧光图像。

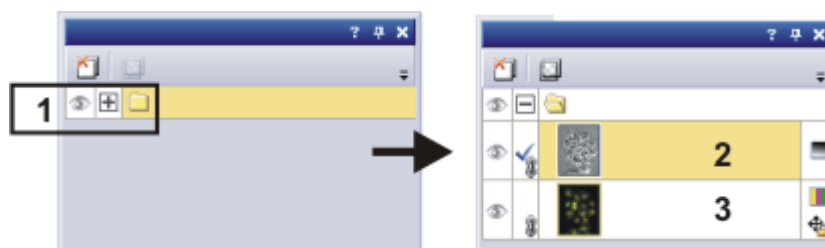


9. 单击这个按钮可再次显示透射图像。

- 现在，您会看到透射图像和多通道荧光图像的叠加。

10. 使用**视图 > 工具窗口 > 层**命令可显示**层**工具窗口。

11. 在**层**工具窗口中，单击 **[+]** 符号 **(1)** 并打开该图像的层。



- 现在，您可以查看图像的各层：透射图像 **(2)** 和多通道图像 **(3)**。由于透射光图像当前绝对透明，因此无法进行查看。多通道图像左侧的图标  表示该多通道图像无法移动。

12. 在**层**工具窗口中选择透射图像。

13. 激活**工具箱**工具栏。为此，请使用 (例如) **视图 > 工具栏 > 工具箱**命令。



14. 单击**工具箱**工具栏上的**移动工具**按钮。

- 在图像窗口上，鼠标指针将改变形状。

15. 按住鼠标左键，移动整个图像。



16. 单击[工具箱](#)工具栏上的 (例如) [选择工具](#)按钮可离开移动模式。

更改透射图像和多通道
图像之间的权重

同时在图像窗口中显示透射图像和多通道图像时，透射图像将覆盖多通道图像，因此不能看到多通道图像。可以透明地显示这两个图像，从而能够看到这两个图像的一些部分。



1. 首先，在[层](#)工具窗口中选定图像层。为此，只需单击层名即可。
 - 随后，所选定的层将显示在工具窗口中并带有彩色背景。
2. 然后单击[设置层不透明度](#)按钮。该按钮位于工具窗口的工具栏中。
 - 在工具窗口中，随后将出现滑动游标，您可以通过它来设置透明度。



3. 使用滑动游标设置所需的透明度。值为 100% 则图像层不透明。值为 0% 则图像层将完全隐藏。
4. 如果满意透明度设置，请在用户界面中的任意位置单击一次。
5. 使用[文件 > 另存为...](#) 命令保存新的多层图像。保存图像时，请始终使用 TIF 或 VSI 文件格式。

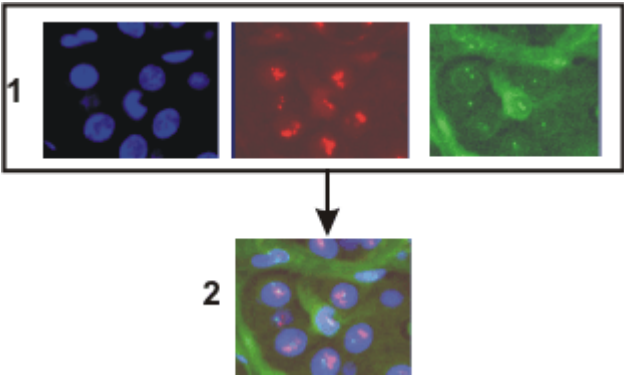
保存多层图像

00067

8.5. 采集多通道荧光图像

使用多通道自动采集流程可采集多通道荧光图像。

示例: 定义采集多通道荧光图像 (例如“蓝色”、“绿色”和“红色”色彩通道) 的流程。设置荧光样品时, 尽可能少地照射该样品, 以使漂白效果最小化。



在插图的上侧, 您可以看到单幅荧光图像 (1)。在下侧, 您可以看到单幅荧光图像的叠加 (2)。

采集多通道荧光图像的特殊硬件

本软件支持图像分割工具和多摄像头系统。这两个系统可让您同时采集多个色彩通道, 并将它们组合为一幅多通道荧光图像。

定义“多通道”采集流程

选定采集流程

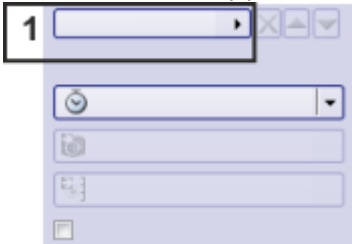


- 使用视图 > 工具窗口 > 流程管理命令可显示流程管理工具窗口。
- 选定自动处理选项。
- 单击多通道按钮。
 - 按钮将显示为已点击状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。
 - [C] 组会自动显示在工具窗口中。
- 如果另一采集流程 (例如 Z 图像栈) 为活动状态, 单击该按钮可关闭采集流程。
 - 现在, 具有多个采集流程的组的外观应该 (例如) 如下所示:



添加色彩通道

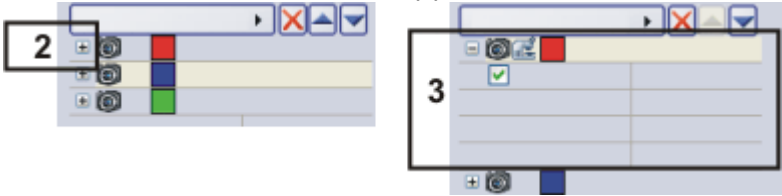
- 单击添加通道按钮 (1)。



- 上下文菜单随即被打开。
该上下文菜单中将列出所有当前设置的观测模式。
- 选定首先要采集的色彩通道, 例如“红色”。

查看色彩通道设置

7. 以相同的方式选定其它通道，例如“绿色”和“蓝色”。请注意，荧光图像随后将按照此处所列相同顺序采集。
8. 单击第一个色彩通道旁边的小加号 (2)。



- 该通道现已激活 (3)。激活的色彩通道将在工具窗口中以彩色形式突出显示。
- 流程管理工具窗口中的色彩通道条目组织为树状视图的形式。展开某个条目可打开一个列表，其中包含关于所选色彩通道的更多信息。
- 激活色彩通道时，也将自动选定对应的观测模式。您可以通过显微镜图标来识别哪个观测模式是活动的。同时这还意味着现在已经为采集第一个色彩通道的荧光图像正确设置了显微镜。



选择色彩通道的曝光次数

9. 单击一次性自动曝光按钮 (4) 旁的小箭头，并从上下文菜单中选择针对所有命令命令 (5)。
- 现在，本软件设置了显微镜上每个通道的观测模式，并自动确定最佳曝光时间。
 - 现在，一次性自动曝光按钮的图标显示成这样。例如，您可以单击该按钮，在更改物镜后重新确定所有通道的自动曝光次数。
 - 曝光次数在流程管理工具窗口中被用于每个通道，并在采集通道时应用。
 - 曝光次数将为每个通道单独保存。您可以随后在属性工具窗口中查看每个通道的这些值。



10. 结束实时模式。为此，请单击摄像控制工具窗口中的实时观察按钮。
- 将关闭反射光快门。

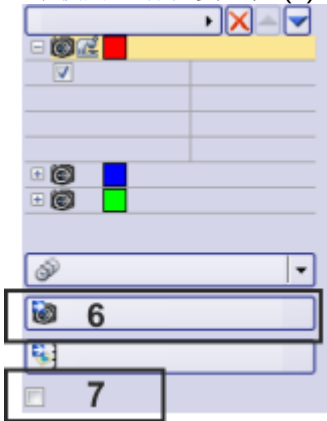
聚焦荧光样品



先决条件: 您拥有带电动 Z 传动装置的样品台。若没有，现在就完成流程定义。

1. 激活第一个通道。
2. 切换至实时模式。
3. 对焦到图像上。
- 如果显微镜样品台配备有电动 Z 传动装置，则显微镜控制工具窗口中将提供聚焦调节器供您使用。
4. 单击流程管理工具窗口中的读取 Z 补偿 (6) 按钮，为显微镜样品台采用当前 Z 位置。
- 当前的 Z 位置被用于第一个通道下的 Z 偏置参考字段。
 - 随后，本软件会在采集图像前自动移动到 Z 位置。

5. 选中使用 Z 补偿复选框 (7)。



6. 激活其它通道，聚焦于样品，并将显微镜样品台的当前 Z 位置发送给采集流程。
- 第一个色彩通道始终被用作 Z 补偿的参考。在其它色彩通道下，您可以找到 Z 补偿值。该值显示各个色彩通道的焦点位置之间如何不同。
7. 结束实时模式。
- 将关闭反射光快门。
8. 单击[流程管理](#)工具窗口顶部工具栏中的[保存流程定义](#)按钮，可保存刚刚定义的流程的采集参数。
- 通道的定义包含观测模式、曝光时间、增益值，必要时还包含焦点位置。所有这些设置都将与流程定义一并保存。
 - 现在，只要所使用的观测模式可用，您就可以在任何时间为此采集流程重用采集参数。
 - 若所使用的观测模式之一不再可用，当载入流程定义时，对应的色彩通道将自动关闭。

完成流程定义



采集和查看多通道荧光图像

切换到暗用户界面

定义采集流程

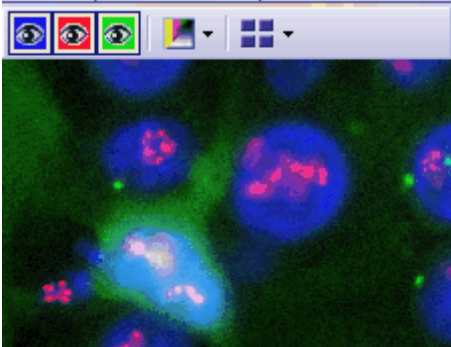


启动采集流程



1. 如果受到显示器光线的干扰，可以将本软件切换到暗用户界面。为此，请选择[视图 > 程序暗外观](#)命令，并重启本软件。
2. 定义多通道荧光图像的采集流程，或载入已保存的采集参数。为此，请单击位于[流程管理](#)工具窗口工具栏中的[载入流程定义](#)按钮。
3. 在[流程管理](#)工具窗口中，单击[开始](#)按钮。
 - 如果您使用非机动显微镜，将收到关于切换棱镜模块和关闭快门的几条不同消息。
4. 对于非电动显微镜: 遵照说明并对显微镜进行必要设置。
 - 会立即开始采集多通道荧光图像。[流程管理](#)工具窗口中色彩通道的顺序与色彩通道的采集顺序相同。
 - 当您可以在[流程管理](#)工具窗口中再次看到[开始](#)按钮时，表明采集已经完成。
 - 多通道荧光图像将被自动保存。您可以在[采集设置 > 保存 > 流程管理](#)对话框中设置存储目录。预设的文件格式为 VSI。

- 图像窗口中将显示所有通道的叠加荧光图像。



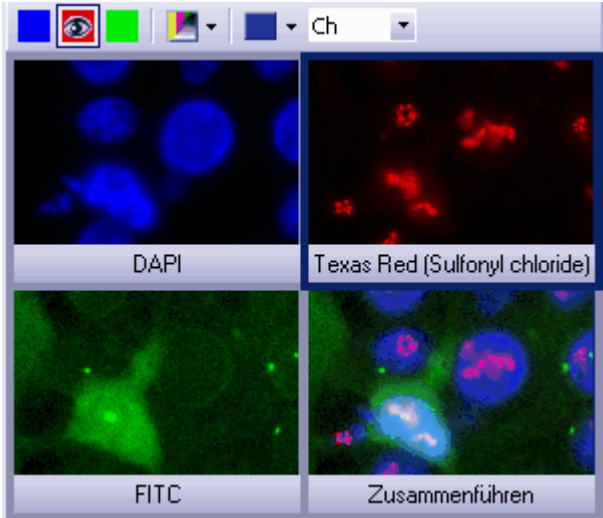
查看多通道图像

- 导航栏将显示在图像窗口的顶部。此栏中包含了对应于每个通道的按钮，利用这些按钮您就能够显示或隐藏通道。眼睛图标表明该通道当前可见。

5. 单击导航栏中的色彩通道按钮可显示或隐藏某一色彩通道。逐一观察所有色彩通道。
6. 完成之后，请重新叠加所有通道。
7. 单击图像窗口导航栏中的平铺按钮可切换图像窗口视图。



- 随后您将看到已经采集的所有色彩通道。



8. 比较色彩通道。
9. 单击导航栏中的单帧显示按钮。
 - 随后您将在图像窗口中再次看到所有色彩通道的叠加结果。
10. 使用视图 > 工具窗口 > 属性命令可显示属性工具窗口。
 - 在属性工具窗口中，您将发现每一个色彩通道均拥有自己的通道信息组。
11. 如果信息组已被折叠: 单击加号  可重新显示所有信息。
 - 将显示每个色彩通道的名称、对应波长、观测模式以及曝光时间。



查看各个色彩通道的信息

同时采集多通道荧光图像和透射光图像

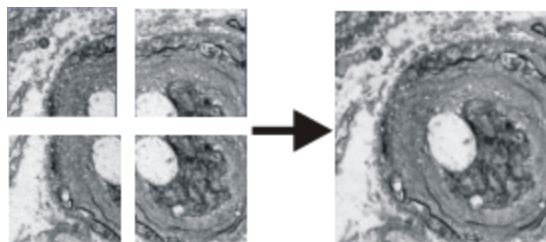
任务	与多通道荧光图像一起同时采集透射光图像，例如相反差图像。	
定义采集流程	1.	定义多通道荧光图像的采集流程。为此，请遵照上述操作步骤。 在流程管理工具窗口中，所有已定义的荧光通道都将显示在 [C] 组中。
将采集透射光图像添加到采集流程中	2.	单击 添加通道 按钮。为采集透射光图像选择一种观测模式，例如相衬、微分干涉对比 (DIC) 或明场。
	3.	在 流程管理 工具窗口中单击透射光通道。 该通道现已激活。显微镜将被设置为透射光模式。
	4.	单击透射光通道旁边的小加号。 现在您将看到一张表格，其中包含关于该透射光通道的更多信息。
	5.	确保 输送上衬 复选框已被选中。只有这样，透射光图像才被指派至其自己的位于荧光通道之上的层。
定义透射光图像采集	6.	切换至实时模式。
	7.	在 摄像控制 工具窗口中选定手动曝光时间。为将感光度设置为最低的 ISO 值，将增益设置为值 0。优化曝光时间。
	8.	在 流程管理 工具窗口中，单击 读取设置 按钮。 将为通道采用该曝光时间。
	9.	结束实时模式。
启动采集流程	10.	在 流程管理 工具窗口中，单击 开始 按钮。 随后，透射光图像还将与荧光图像一同采集，并与多通道荧光图像一同保存。该采集流程的结果是多层图像，您可以使用层工具窗口查看它。
	11.	在图像窗口中观察多通道荧光图像和叠加的透射光图像。

00369 04082016

9. 创建拼接图像

9.1. 总览

什么是拼接图像？ 如果采集拼接图像，则在移动样品台时使样品的不同相邻部分得到显示。会将所采集的所有图像组合在一起形成拼接图像，就如同拼图一样。拼接图像将以比简单拍照可获得的 X/Y 分辨率更高的分辨率显示一个大样品片段。



插图左边显示了四个单幅图像。而右边则是由这四个单幅图像组成的拼接图像。

创建拼接图像 本软件为您提供多种创建拼接图像的方法。

- 通过移动样品台来采集拼接图像（即时图像拼接）
- 在不使用电动 XY 样品台的情况下采集拼接图像（手动图像拼接）
- 使用电动 XY 样品台采集拼接图像（XY 位置 / 图像拼接）
- 使用扩展焦距采集拼接图像
- 自动采集多个拼接图像

请注意：如果图像边缘的缺陷降低了拼接图像的质量或影响了各图像的组，则可以在采集期间通过**摄像控制**工具栏窗口中的**子阵列**模式来裁减这些图像。您可在在线帮助中找到有关这一主题的更多信息。

通过实验管理员采集拼接图像

如果软件版本包含**实验管理员**工具窗口，您也可以通过实验管理员采集拼接图像。

9.2. 采集拼接图像

9.2.1. 通过移动样品台来采集拼接图像（即时图像拼接）

先决条件 对于拼接图像的采集而言，务必要正确设置系统。例如，如果未正确执行阴影校正，则在拼接图像中，各单幅图像会造成平铺的效果。另外，还务必要将摄像头平行对齐样品台的 XY 轴。摄像头相对于样品台歪斜时，拼接图像中的单幅图像也相对于彼此歪斜。摄像头与样品台之间的角度应小于 1° 。

针对图像采集进行设置

1. 切换至“采集”布局。可使用 **视图 > 布局 > 采集** 命令进行该操作。**摄像控制** 工具窗口和 **流程管理器** 工具窗口会自动显示。
2. 使用 **即时图像拼接** 流程的默认采集设置。为此，请打开 **采集设置 > 采集 > 即时图像拼接** 对话框。单击 **默认值** 按钮并关闭该对话框。
 - 您可以 (例如) 通过 **流程管理** 工具窗口来打开该对话框。在工具窗口的工具栏中，单击 **采集设置** 按钮。在树状视图中选择 **采集 > 即时图像拼接** 条目。
3. 选定所需的显微镜设置。尤其要选定所需的放大倍率。如果您已定义观测模式，则选定所需的观测模式。
 - 在这种情况下，拼接图像的背景颜色取决于已选定的观测模式。背景对于所有荧光观测模式和所有暗场观测模式自动设为黑色。背景对于所有其他观测模式设为白色。



选择、配置和启动采集流程



1. 激活 **流程管理** 工具窗口。
2. 选择 **手动流程** 选项，并单击 **即时图像拼接** 按钮。
3. 检查该采集流程的配置。您可在在线帮助中找到有关这些选项的更多信息。
4. 单击 **开始** 按钮。
 - **调整采集条件** 对话框随即打开。
 - 本软件随即将自动切换到实时模式。
 - 摄像头的分辨率将设置为采集设置中指定的值。
 - 无法对 **即时图像拼接** 采集流程使用 HDR。如果启动该采集流程时激活了 HDR，会收到关于此效果的错误消息。在 **摄像控制** 工具窗口中停用 HDR，然后重新启动采集流程。
 - 本软件会检查有多少可用的存储容量。如果可用存储容量过少，将显示错误消息。
 - **即时图像拼接** 采集流程无法中断。因此，**暂停** 按钮为灰显并且无法使用。
5. 在 **摄像控制** 工具窗口中，选定采集的最佳设置。您仍可调整摄像头的分辨率。
 - 这些设置适用于构成拼接图像的所有单幅图像 (曝光时间、分辨率、子阵列、白平衡)。



- 现在默认的聚焦设置也会用于所有构成拼接图像的单幅图像。[即时图像拼接](#)采集流程期间会停用自动聚焦功能。但是，您仍可以在运行采集流程时手动调整聚焦。只有在特殊的聚焦视图中才能进行该操作。

请注意: 样品充分曝光以及当前曝光时间尽可能短这两点都尤为重要。如果曝光时间过长，您会收到错误消息。

6. 在样品上找到您想要开始采集拼接图像的位置。
7. 在[调整采集条件](#)对话框中，单击[开始](#)按钮。
 - 图像窗口中显示了拼接图像的第一幅图像。
 - 大多数软件功能现在不可用。摄像控制也被锁定。
 - 软件切换到特殊的图像拼接图像视图。该视图使用图像拼接光标。它由一个方框构成，可以有不同的颜色（请参阅下表）。

采集拼接图像

1. 缓慢将样品台移动到样品上的下个位置。
 - 只要您在移动样品台，摄像头就会连续采集图像。单幅图像将立即组合。您可以在图像窗口中观察拼接图像如何生成。
 - 如果需要，使用鼠标滚轮来缩放拼接的图像。另外，还可以使用[缩放](#)工具栏进行该操作。



在[即时图像拼接](#)采集流程中显示拼接图像。图像拼接光标表明了图像采集的状态。

2. 请注意图像拼接光标。方框的颜色表明了图像采集的状态。

	浅蓝色方框表示组合拼接图像不会遇到问题。
	黄色方框表示仍可能能够组合图像。但设置并不是最优。例如，可能是样品台移动过快。
	橙色方框表示拼接位置暂时丢失。例如，可能是样品台移动过快，或在当前样品台位置上，样品包含的、可用于图像组合的图像信息太少。但是，在这种状态下，软件经常可以通过自己的方式来重新找到拼接位置。
	红色方框表示拼接位置完全丢失。在这种状态下，软件无法通过自己的方式来重新找到拼接位置。 但是，在某些情况下，您可以手动将软件设置到可以重新找到拼接位置的状态。您可在在线帮助中找到有关这一主题的更多信息。 或者您现在可以完成即时图像拼接采集流程。拼接的图像中包含在拼接位置丢失之前所采集到的全部信息。

- 调整样品上的聚焦
3. 如果需要调整样品上的聚焦（例如，如果您导航到了样品上稍微厚一些的位置），请单击[聚焦视图](#)按钮。
 - [聚焦视图](#)按钮会变成[图像拼接图像视图](#)按钮。
 4. 调整图像上的聚焦。使用显微镜上的聚焦旋钮，或如果您的显微镜装有电动 Z 驱动器，则使用[显微镜控制](#)工具窗口中的滑动游标来进行。[即时图像拼接](#)采集流程处于活动状态时，自动聚焦功能无法使用。
 - 在聚焦视图中，实时图像显示在新的选项卡中。图像拼接图像视图仍显示在图像窗口中其自身的选项卡上。但只要您停留在聚焦视图中，拼接的图像就不会刷新。
 5. 当您调整了样品上的聚焦之后，单击[图像拼接图像视图](#)按钮。
 - 切回图像拼接图像视图，您就可以继续进行图像采集了。

请注意: [即时图像拼接](#)采集流程不能无限期运行。采集流程会在约 30 分钟后自动结束。

停止图像采集



1. 如果您想要结束采集拼接图像，请单击[停止](#)按钮。
 - 您可以在图像窗口中看到完整的拼接图像。它通常不是矩形，而是在边界上包含空白区域。这些区域显示为白色，或将暗色区域图像在拼接图像中显示为黑色。
 - 默认情况下会自动保存已拼接的图像。存储目录将显示在[采集设置 > 保存 > 流程管理](#)对话框中。预设的文件格式为 VSI。
 - 单幅图像不会被另外保存。

9.2.2. 在不使用电动 XY 样品台的情况下采集拼接图像 (手动图像拼接)

任务	您想要采集样品的一个较大区域的图像。使用 手动图像拼接 采集流程来采集样品上相邻位置的多个单幅图像，并将其组合为一幅拼接图像。MIA 代表图像拼接。
先决条件	摄像头平行于 XY 样品台。摄像头与样品台之间的角度应小于 1°。
选定显微镜设置	1. 切换至“采集”布局。可使用视图 > 布局 > 采集命令进行该操作。 2. 选定所需的显微镜设置。尤其要选定所需的放大倍率。为此，在显微镜控制工具栏上，单击您想要用于采集拼接图像的物镜所对应的按钮。如果您使用倍率变换器，则还必须选定使用的放大倍率级别。如果您已定义观测模式，则选定所需的观测模式。 • 在这种情况下，拼接图像的背景颜色取决于已选定的观测模式。背景对于所有荧光观测模式和所有暗场观测模式自动设为黑色。背景对于所有其他观测模式设为白色。
设置图像质量	3. 切换至实时模式，然后在摄像控制工具窗口中为您的采集选定最优设置。请特别注意设置正确的曝光时间。该曝光时间将用于拼接图像的所有单幅图像。 4. 在样品上找到您想要开始采集拼接图像的位置。 5. 结束实时模式。
选定采集流程	6. 激活流程管理工具窗口。 7. 选定手动处理选项。



8. 单击**手动图像拼接**按钮。

- 按钮将显示为已点击状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。
- **手动图像拼接**组将会自动显示在工具窗口中。
- 如果**即时扩展景深**采集流程已被激活，则其将被自动关闭。但是，您可以将具有扩展焦距的图像用于拼接图像。为此，在采集每一个单幅图像之前，请单击位于**手动图像拼接**组中的**即时扩展景深**按钮。



设置采集参数



9. 请确定**自动对齐**按钮显示为已点击状态。该按钮应该显示为。

- 随后，本软件便会在相邻单幅图像中搜索相同的图像结构。拼接图像将按照叠加相同图像区域的方式放置在一起。

采集拼接图像



1. 单击**开始**按钮。

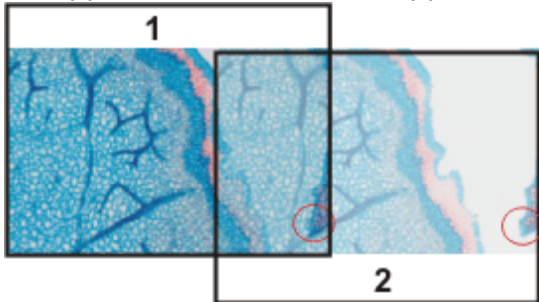
- 本软件将切换到实时模式。

2. 对焦到样品上。



3. 单击某个箭头按钮可设置要将下一幅图像排列在当前图像的哪一侧。例如，如果要将下一幅图像置于当前图像的右侧，请单击该按钮。

- 本系统即会在样品的当前位置采集一幅图像。现在您可在图像窗口的左边 **(1)** 看到采集的图像，而右边 **(2)** 则显示实时图像。

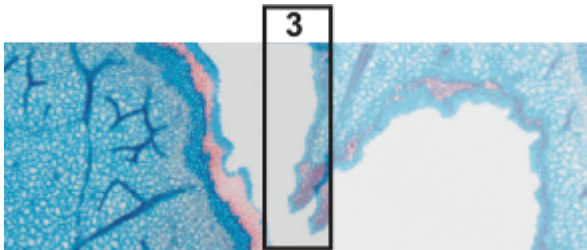


由于您未移动样品，实时图像仍显示样品上的当前位置。这意味着，您现在看到的是当前图像的两个视图。
这两幅图像重叠。由于实时图像是透明的，因此两幅图像均在重叠区域显示。

4. 记住实时图像右边框上一处明显的结构。您将在重叠区域发现相同的样品结构。插图中已用圆圈标出一个明显的结构。

5. 现在，非常缓慢地移动样品台，令实时图像上的该结构向左移动。持续移动样品台，直到重叠区域中的图像结构彼此尽可能重叠。图像结构之间无需精确重叠，因为本软件将令单幅图像相互匹配。

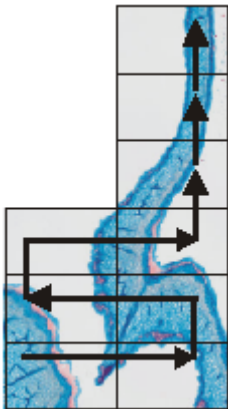
- 现在，重叠区域 **(3)** 中将显示相同的图像片段。这使本软件能够无缝地组合这两幅图像。



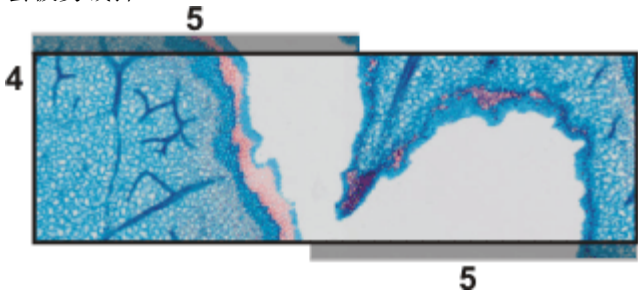
- 您可以在 [设备设置 > 样品台](#) 对话框中倒转样品台移动的方向。在您将样品台右移时，根据您最易适应的方向，实时图像将向左或向右移动。



- 检查这两幅图像是否已正确组合。您也可以使用 [撤消上一帧](#) 按钮撤销上一步骤。然后可以重新移动样品台以使结构更好地匹配。
 - 在采集过程中，您可以更改当前拼接图像的缩放比例，(例如) 以便更清楚地观察重叠区域中的某些部分。
- 使用箭头按钮定义浏览样品的方式，并在使用样品台时遵照该方式。这样，您可以在拼接图像中以您偏爱的任何形式来显示样品。插图显示了一个由 9 个单幅图像组成的拼接图像以及样品台路径。



- 如果您想要结束采集拼接图像，请单击 [停止](#) 按钮。
 - 您可以在图像窗口中看到完整的拼接图像 (4)。由于单幅图像相互之间可能有些歪斜，所以拼接图像通常不是矩形，而会在其边界 (5) 上包含一些空白区域。这些区域在拼接图像中通常会被剪裁掉。

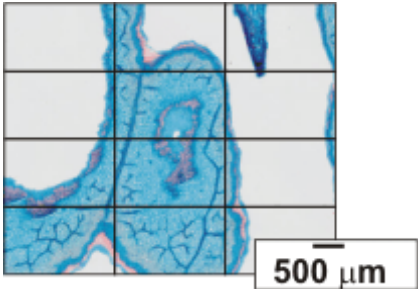


- 默认情况下会自动保存已拼接的图像。存储目录将显示在 [采集设置 > 保存 > 流程管理](#) 对话框中。预设的文件格式为 VSI。
- 默认情况下，在重叠区域中，两个相邻单幅图像的亮度值会相互匹配，以使图像的整体效果比较均匀。
- 拼接图像已校准。这意味着您可以在拼接图形上测量距离和对象。

拼接图像的属性

9.2.3. 使用电动 XY 样品台采集拼接图像 (XY 位置 / 图像拼接)

任务



您想要采集样品的一个较大区域的图像。使用自动 **XY 位置/图像拼接** 采集流程来扫描样品的一个矩形区域，并将相邻图像组合为一幅拼接图像。MIA 代表图像拼接。

先决条件: 仅当显微镜配备有电动 XY 样品台时，您才可以使用 **XY 位置/图像拼接** 采集流程。

先决条件

- 样品台已经设置和初始化完毕，例如已经定义其样品台界限。
- 摄像头平行于 XY 样品台。摄像头与样品台之间的角度应小于 1°。
- 阴影校正已设置完毕。

选定显微镜设置

1. 切换至“**采集**”布局。可使用 **视图 > 布局 > 采集** 命令进行该操作。
2. 选定所需的显微镜设置。尤其要选定所需的放大倍率。为此，在 **显微镜控制** 工具栏上，单击您想要用于采集拼接图像的物镜所对应的按钮。如果您使用倍率变换器，则还必须选定使用的放大倍率级别。
如果您已定义观测模式，则选定所需的观测模式。
 - 在这种情况下，拼接图像的背景颜色取决于已选定的观测模式。背景对于所有荧光观测模式和所有暗场观测模式自动设为黑色。背景对于所有其他观测模式设为白色。

选定采集流程

3. 激活 **流程管理** 工具窗口。
4. 选定 **自动处理** 选项。
5. 单击 **XY 位置/图像拼接** 按钮。
 - 按钮将显示为已点击状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。
 - **XY** 组会自动显示在工具窗口中。



使用软件自动聚焦



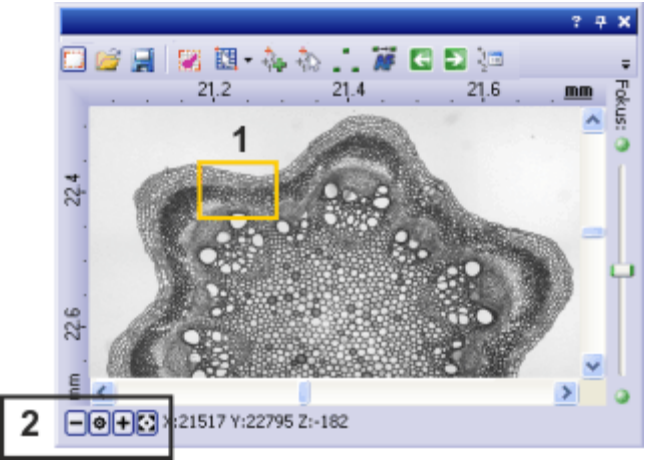
6. 如果显微镜配有电动 Z 传动装置，您可以开启软件自动聚焦。在 **流程管理** 工具窗口中，单击 **自动聚焦** 按钮。
 - **自动聚焦** 组会自动显示在工具窗口中。
7. 在 **自动聚焦** 组中，选中 **多位置 / 图像拼接自动聚焦** 复选框。
如果样品表面不平或向物镜倾斜，则选择 **图像拼接的每个帧** 选项。现在，将在每次图像采集之前执行软件自动聚焦。

显示样品台导航器



8. 在 **流程管理** 工具窗口中，单击此按钮。
 - **样品台导航器** 工具窗口即会显示。当您采集了样品的总览图像后，将在样品台导航器的图像部分看到图像的该区域。
9. 设置 **样品台导航器** 工具窗口中图像片段的放大倍率。为此，请使用该工具窗口左下方的缩放按钮 **(2)**。
当前样品台位置将在图像片段中显示为一个黄色矩形 **(1)**。您应该选择能

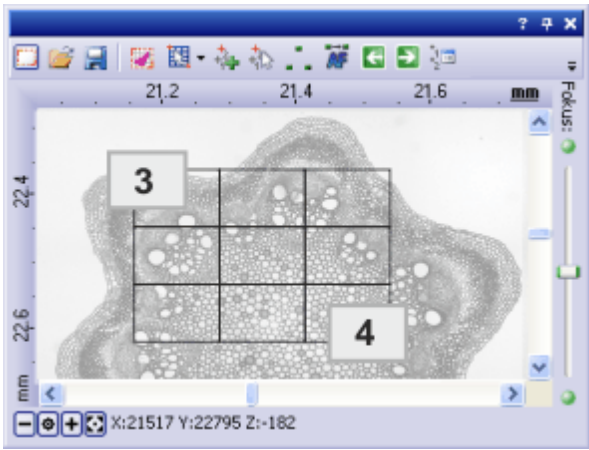
够让您清楚看到该矩形的放大倍率。



定义图像拼接的扫描区域



10. 您可在在线帮助中找到有关[样品台导航器](#)工具窗口的更多信息。
在[流程管理](#)工具窗口中，单击此按钮。
 - 系统将自动切换到实时模式。
 - [定义图像拼接扫描区域](#)对话框将即会打开。
11. 将 XY 样品台移至您希望的多图像拼接扫描区域的左上角 **(3)**。
12. 聚焦，然后在[摄像控制](#)工具窗口中选定图像采集的最佳设置。请特别注意设置正确的曝光时间。该曝光时间将用于拼接图像的所有单幅图像。
13. 在[定义图像拼接扫描区域](#)对话框中单击**确定**确认起始位置。
14. 将 XY 样品台移至多图像拼接扫描区域的右下角 **(4)**。在[定义图像拼接扫描区域](#)对话框中单击**确定**以确认该位置。
 - [样品台导航器](#)工具窗口中即会显示已经定义的图像拼接扫描区域。在此您可以立即看到在使用当前放大倍率的情况下，采集拼接图像需要多少单幅图像。



采集拼接图像



15. 单击**开始**按钮。
 - 采集随即启动。将采集单幅图像并将其立即组合。您可以在图像窗口中观察拼接图像如何生成。
 - 在用户界面左下方的状态栏中，您会发现一个进度条，表明已经采集到的图像数量以及总帧数 (例如 3/9)。
 - 当您再次在[流程管理器](#)工具窗口中看见**开始**按钮，同时进度条不再显示时，即表示采集已完成。



- 您可以在图像窗口中看到完整的拼接图像。单幅图像不会被另外保存。
- 默认情况下会自动保存已拼接的图像。存储目录将显示在[采集设置 > 保存 > 流程管理](#)对话框中。预设的文件格式为 **VSI**。

自动采集多个拼接图像

您可以定义样品上的几个图像拼接。采集启动后，会依次移动到所有图像拼接，并且会在每个位置采集拼接图像。



显示样品台导航器



采集拼接图像

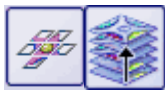


1. 选定 [XY 位置/图像拼接](#) 采集流程。
2. 定义多个多图像拼接的扫描区域。您可从下面找到有关如何定义多图像拼接扫描区域的操作步骤。
从首先要扫描的样品区域开始。
3. 在[流程管理](#)工具窗口中，单击此按钮。
 - [样品台导航器](#)工具窗口即会显示。当您采集了样品的总览图像后，将在样品台导航器的图像部分看到图像的该区域。
 - [样品台导航器](#)工具窗口中即会显示已经定义的图像拼接扫描区域。将按照定义这些区域时的先后顺序对其进行连续编号。
4. 单击[开始](#)按钮开始采集拼接图像。
 - 现在将扫描每个多图像拼接扫描区域，并创建拼接图像。将按照编号预先定义的顺序对这些扫描区域进行扫描。
 - 将使用当前摄像头和当前采集设置采集所有拼接图像。
 - 采集流程完成后，您将在文档组中找到各个多图像拼接扫描区域的拼接图像。

9.2.4. 使用扩展焦距采集拼接图像

请注意: 无论使用电动 XY 样品台与否，均可以使用扩展焦距采集拼接图像。

不使用电动 XY 样品台



1. 启动[手动物镜校准](#)校准流程。
您可从下面找到执行该操作的操作步骤。
2. 在[手动图像拼接](#)组中单击[即时扩展景深](#)按钮。
 - [即时扩展景深](#) 采集流程即会启动。现在您将看到扩展景深图像，而非实时图像。
3. 现在，缓慢移动显微镜 Z 传动装置，并更改图像的聚焦。观察扩展景深图像如何形成。
 - 对于采集的每个图像，扩展景深图像中将采用最清晰的图像片段。
4. 当所有图像结构都清晰地显示时，单击[手动图像拼接](#)组中的一个方向箭头可继续采集拼接图像。

请注意: 现在您会看到在最后一个焦距位置的实时图像。通常这个实时图像并不清晰。

5. 对焦到图像上。
6. 对您想要为其使用[即时扩展景深](#)采集流程的拼接图像的每个单幅图像重复最后几个步骤。



7. 如果您想要结束采集拼接图像，请单击[停止](#)按钮。
 - 您可以在图像窗口中看到完整的拼接图像。

使用电动 XY 样品台

先决条件: 只有当样品台配有电动 Z 传动装置时，您才可以使用[扩展景深](#)采集流程。



1. 选定 [XY 位置/图像拼接](#) 采集流程。
2. 定义图像拼接扫描区域。
您可从下面找到执行该操作的操作步骤。
3. 此外，请选定 [Z 图像栈](#) 采集流程。
 - 在包含不同采集流程的组中，有两个采集流程现在为活动状态：



4. 为 Z 图像栈的采集定义所有参数。
5. 在 [[Z](#)] 组中，选中[扩展景深图像](#)复选框。
6. 单击[开始](#)按钮开始采集拼接图像。
 - 在每个多图像拼接扫描区域的样品台位置上，将首先采集 Z 图像栈，然后根据其计算扩展景深图像。扩展景深图像将被组合为拼接图像。
 - 采集流程完成后，您将在图像窗口中看到完成的拼接图像。



9.3. 将单幅图像组合成拼接图像

使用[运算 > 图像拼接...](#) 命令可将多个单幅图像如同拼图一般组合成一幅拼接图像。这些单幅图像将以其全 X/Y 分辨率进行组合。拼接图像将以比单次采集可获得的 X/Y 分辨率更高的分辨率显示一个大样品片段。

采集图像

1. 载入您希望组合的图像，或者采集一组合适的图像。
 - 您要合并的所有单幅图像都必须具有相同的图像类型。例如，您不能使灰度图像和实彩色图像自动合并。
 - 采集图像后，请对它们的名称进行连续编号，例如“图像 001”、“图像 002”等。很多情况下，图像会已按照正确的顺序在[图像拼接](#)对话框中排列。

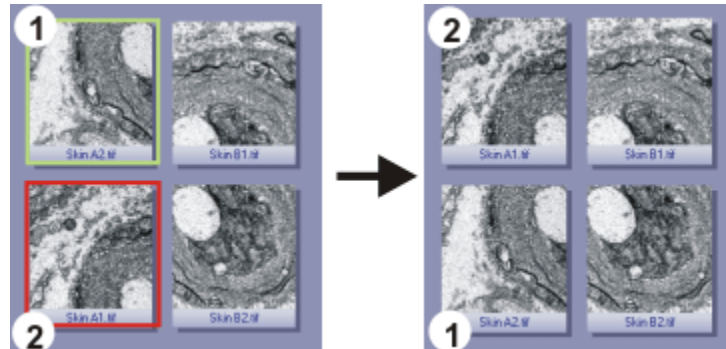
选择图像

2. 打开[画廊](#)工具窗口。为此，可以使用[视图 > 工具窗口 > 画廊](#)命令。
3. 在[画廊](#)工具窗口中，选定您希望合并的所有图像。

组合图像

1. 使用[运算 > 图像拼接...](#) 命令。仅在选中了同一图像类型的多个图像时，该命令才可用。
 - [图像拼接](#)对话框即会打开。
 - 该对话框的拼接区域将显示单幅图像的预览。
2. 如有必要，按住鼠标左键，拖动对话框的左下角将其放大。或者，双击对话框的标题将对话框放大到全屏幕大小。
3. 检查图像的位置是否正确。您可以使用拖放方法，(例如) 在拼接区域中通过调换两幅图像来更改单幅图像的排列。

- 上图显示了含有四幅单幅图像的拼接区域。在左边，图像 1 和 2 的位置不正确。因此要将图像 1 (绿框) 拖放到图像 2 (红框) 上。在右边，您可以看到在交换这两幅单幅图像后的拼接区域。



- 如果单幅图像发生重叠，请选定**输出 > 拼接**列表中的**相关**选项。随后，本软件便会在相邻单幅图像中搜索相同的图像结构。拼接图像将按照叠加相同图像区域的方式放置在一起。
- 单击**确定**按钮，执行自动图像拼接。
 - 手动图像拼接**对话框即会打开。
 - 将显示拼接图像。

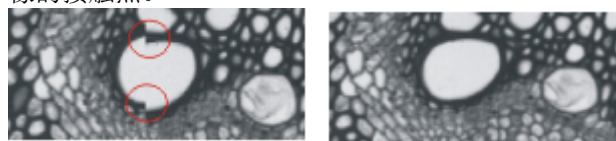
检查拼接图像

- 检查显示屏上的拼接图像。
使用对话框中的缩放按钮可放大对话框中的拼接图像。



- 如果单幅图像没有正确地组合，您可以手动移动它们中的一个或多个的相对位置。
为此，单击想要移动的图像，然后按住鼠标左键沿需要的方向将其拖动。

- 当前选定的图像将显示为半透明，以使您能够更轻松找到与相邻图像的接触点。



- 插图中的两幅图像没有正确地对齐。发生了错位。进行手动拼接后，这两幅图像无缝地组合在一起。
- 选中**裁剪边缘**复选框可对图像进行修剪，直到其边界上再无任何可见的空白区域。
 - 在预览中，要修剪的图像边缘将显示为半透明。
 - 如果图像亮度不一致，请选中**适配大小**复选框。这样单幅图像的亮度值将变得彼此一致，使得背景看起来更加均匀。
 - 单击 **OK** 按钮。
 - 此时将创建一个名为“图像_<序列号>”的新图像。

00383 07072016

10. 生命科学应用

生命科学应用工具栏提供对图像的多种评估方式。如果此工具栏未显示，请使用视图 > 工具栏 > 生命科学应用命令。



下表列出了工具栏上默认提供的按钮。

	选定测量对象	单击该按钮，在图像上选定现有测量对象和感兴趣区。您可以编辑和删除选定的测量对象和感兴趣区，或是将它们保存在一个参数集中。 选择对象时，关于多重选定的标准 MS-Windows 习惯适用。
	新建感兴趣区	使用其中一个选项可在活动图像中将图像段定义为感兴趣区 (ROI)。
		请注意，您还可以定义测量单个点或单条线的感兴趣区。
	亮度剖面	亮度剖面显示在一个或多个图像片段 (感兴趣区) 中，亮度在一段时间或不同 Z 位置的变化。
	荧光分解	使用荧光分解可从多通道荧光图像中删除光谱混合。
	明场分解	使用明场分解将包含三种不同色彩的明场图像分解到其各自的色彩组件中。
	共定位	在多通道荧光图像上，测量共定位以识别各个荧光重叠的图像片段。
	比例分析	测量时间栈中钙离子浓度的变化程度。
	FRAP 分析	对来自 FRAP 实验的亮度剖面进行归一化并分析。可以将结果导出为不同的输出格式。
	FRET 矫正 FRET 分析	执行 FRET 分析。
	验证消卷积通道参数	对于处于活动状态的图像，检查以确保所有参数都得到了正确的定义，这是成功进行消卷积所必需的。

	二维卷积
	最近邻
	Wiener 滤镜
	受限迭代滤镜

使用卷积滤镜消除图像中会造成干扰的漫射光。

6619

10.1. 亮度剖面

10.1.1. 总览

亮度剖线的具体含义是什么？

使用 [测量 > 亮度剖面...](#) 命令，您可以测量在不同时间 (时间栈) 或不同 Z 位置 (Z 图像栈) 的亮度剖面。图像序列可以是时间栈或 Z 图像栈。

要对亮度剖面进行计算，则将对特定图像片段内的所有像素进行评估。本软件可以确定所有像素的平均亮度。值为 0 的亮度被认为是背景的一部分，将被计算忽略。

因此，您将获得一条亮度剖面，其显示一个或多个图像片段中的亮度随时间段或 Z 位置的不同如何变化。

使用命令前

必须先定义该图像片段，之后才能测量亮度剖面。为此，请在图像上定义一个或多个 ROI (感兴趣区)。要定义这些 ROI，您可以使用 [生命科学应用](#) 工具栏上的相关按钮。您可在在线帮助中找到有关如何使用感兴趣区的更多信息。

支持的图像类型

使用 [测量 > 亮度剖面...](#) 命令，您可以测量以下图像类型：

-  时间栈，其帧为灰度图像。
-  Z 图像栈，其帧为灰度图像。
-  多通道 Z 图像栈
-  多通道时间栈

先决条件: 此命令只可用于单色图像。如有需要，请使用 [图像 > 模式 > 灰度](#) 命令将图像转换为灰度图像。

亮度剖面有什么用途？

1. 您可以使用亮度剖面来测量浓度随时间如何变化。例如，当您通过使用 ATR 触发钙流来进行实验时，或使用适当的荧光染色剂时。
2. 如果随本软件购买了 [Photo Manipulation](#) 解决方案，可以使用激光选择性地对样品上的特定区域进行褪色。此类 FRAP 实验会产生时间栈。可以通过计算样品上的褪色区域的亮度剖面来分析得到的时间栈。

亮度剖面和数据集

您可同时计算一幅图像上的许多不同亮度剖面。例如，对于多通道时间栈，您可计算每个图像片段 (ROI) 的亮度剖面 and 每个通道的亮度剖面。

所有已计算出的亮度剖面将汇集成为一个数据集。每次您在 [亮度剖面](#) 工具窗口中单击 [执行](#) 按钮，都会计算一条或多条亮度剖面，因此每次都将自动创建新数据集。所有已计算出的数据集将显示在 [亮度剖面](#) 工具窗口工具栏的列表中。

数据集在被删除前或者软件关闭前都一直可用。您可以将数据集和亮度剖面保存到文件中，以便将来载入到 [亮度剖面](#) 工具窗口。

亮度剖面 and 实验管理员

先决条件: [实验管理员](#) 工具窗口仅可用于最高版本的软件包。

您可以使用本软件执行复杂的采集流程。使用实验管理员可以定义并运行涉及使用本软件采集图像的复杂实验。

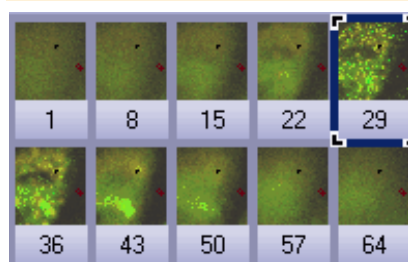
您可以将[亮度剖面](#)命令插入到实验计划中，例如，用于在样品上的不同位置采集时间栈，然后计算其亮度剖面。

00324 06012017

10.1.2. 测量多通道 Z 图像栈上的亮度剖面

任务

您已采集了若干荧光的焦距序列。您想了解在不同的 Z 位置，样品上多个位置的亮度如何变化。



上图显示了某个多通道 Z 图像栈中帧的总览。该多通道图像包含红色通道和蓝色通道。为采集 Z 图像栈，从样品获得了离焦序列。只有在 Z 图像栈中部才能清楚显现样品并使样品锐利聚焦。

以下流程图显示了该流程的基本步骤。

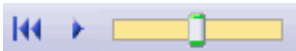


准备分析

显示合适的图像以便定义图像片段

定义感兴趣区 (ROI)



1. 本软件随附有多个示例图像。您可以遵照这些操作步骤使用 **PeroxysomOrganelles.tif** 示例图像。这一示例图像是一幅多通道 I Z 图像栈图像。
 - 载入多通道 Z 图像栈时，它会自动显示在图像窗口中的单帧视图中。
2. 请使用图像窗口顶部的导航栏。

3. 慢慢移动滑动游标，通过该操作在图像窗口中显示在不同 Z 位置所采集的帧。找到能够样品能够被明确识别的 Z 位置。
4. 使用 **视图 > 工具栏 > 生命科学应用** 命令来显示 **生命科学应用** 工具栏。您可以在该工具栏上找到定义感兴趣区和测量亮度剖线的功能。
5. 旋转鼠标滚轮可更改缩放比例。放大图像，直到您可以在图像窗口中看到样品的至少一个发出红色荧光的放大片段。
6. 在 **生命科学应用** 工具栏中单击 **新建感兴趣区 - 多边形** 按钮。
7. 单击鼠标左键，在图像定义一个只包含红色荧光样品位置的区域。
8. 单击鼠标右键完成感兴趣区的定义。
9. 然后在图像片段上定义只包含绿色荧光样品位置的另一个感兴趣区。



10. 单击 **新建感兴趣区 - 矩形** 按钮。
11. 在暗图像片段中定义一个不含荧光对象的正方形。该感兴趣区将用作背景矫正的参照。

计算亮度剖面



1. 在 **生命科学应用** 工具栏中单击 **亮度剖面** 按钮。
 - **亮度剖面 - <活动图像的名称>** 对话框即会打开。
 - 本软件会识别图像类型，并自动选定相应的选项。在本例中，已预设为 **Z 剖面** 选项。
2. 选中 **结果: > 平均值** 复选框。
清除所有其它复选框。
 - **感兴趣区数据** 组中将列出已在活动图像上定义的所有感兴趣区。在本例中，您将看到三个感兴趣区 (其中两个位于显示不同荧光颜色的样品位置上，另外一个位于背景上)。
3. 每个感兴趣区均定义了特定的图像片段。现在，选定要进行亮度剖面计算的图像片段。
在本例中，选定荧光样品位置的两个感兴趣区。
4. 在 **背景减除** 组中，选定 **感兴趣区** 选项。
 - 在 **感兴趣区** 选项旁的列表中，将列出已在活动图像上定义的所有感兴趣区。
5. 在该列表选定在图像背景上定义的感兴趣区。

6. 单击**执行**按钮。
 - 将计算亮度剖面，并在**亮度剖面**工具窗口中显示。

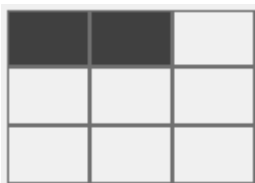
查看亮度剖面

1. 如有必要，请使用**视图 > 工具窗口 > 亮度剖面**命令显示工具窗口。该工具窗口提供了几种显示已测量的亮度剖面的方式。



2. 在**亮度剖面**工具窗口的工具栏中单击**排列亮度剖面图表**按钮。
 - **排列亮度剖面图表**对话框即会打开。

3. 在该对话框中进行如下设置。
 选定**显示图表**组中的**全选**复选框。
 在**布局**组中，指定 **2x1** 的网格大小。

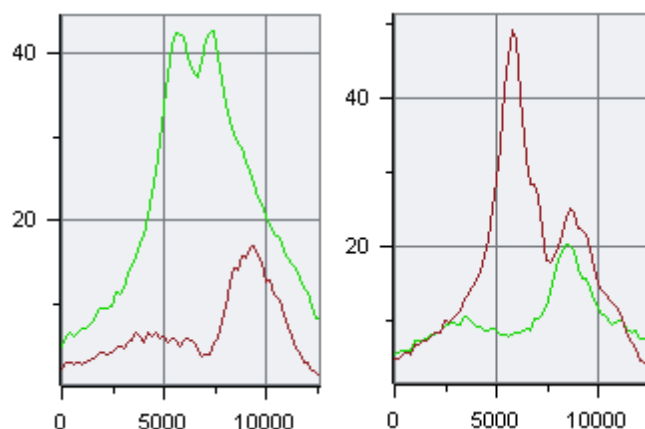


使用**确定**关闭对话框。



4. 在**亮度剖面**工具窗口的工具栏中单击**排列亮度剖面数据**按钮。
 - **排列亮度剖面数据**对话框随即打开。

5. 在该对话框中进行如下设置。
 选定**按通道分隔图表**复选框。
 清除其它复选框。
 使用**确定**关闭对话框。
 - 您可以看到两个图表，每张包含两条亮度剖面。沿 X 轴绘制的是 Z 位置 (即高度)。亮度范围将沿 Y 轴绘制。



将为图像的每个色彩通道创建单独的图表。对应色彩通道的名称将显示在各图表的标题中。左图显示绿色通道，右图显示红色通道。

在每个图表中，您可以看到每个已定义 **ROI** 的亮度剖面。可以显示图例，使感兴趣区的名称位于图表中。绿色亮度剖面在样品上绿色荧光位置的 **ROI** 上测得，红色亮度剖面在样品上红色荧光位置的 **ROI** 上测得。

导出和保存亮度剖面

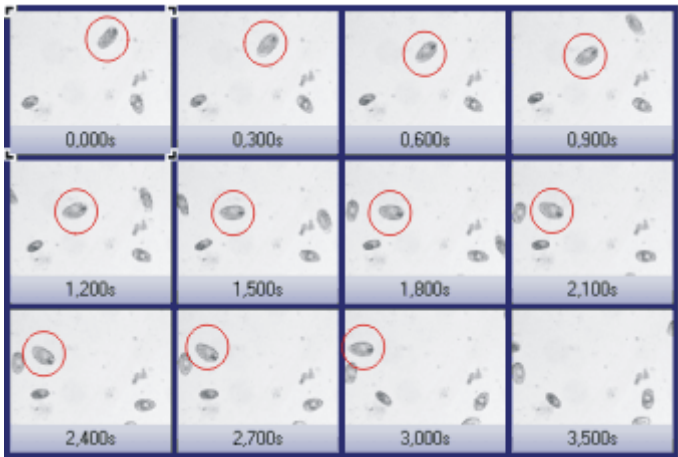


6. 在**亮度剖面**工具窗口的工具栏中单击**导出为工作簿**按钮。
 - 将在文档窗口中创建一个新的工作簿。该工作簿的结果表格中包含所有结果。
 当多通道图像测量完毕后，您可以找到每个色彩通道各自的工作表。

7. 使用文件 > 另存为... 命令可保存工作簿。
- 工作簿将以 OWB 文件格式保存。该格式为专用的文件格式，只能用本软件打开。因此，工作簿显然不适合用于与其它应用程序交换数据。如果要使用不同应用程序中的结果，则使用文件 > 导出为 > Excel... 命令。

10.1.3. 测量移动对象的亮度剖面

任务 您已采集了活动草履虫的时间栈。定义包含草履虫的动态感兴趣区，并移动感兴趣区使其在时间栈中的所有帧中都跟随草履虫。
测量亮度剖面



上图显示了某个 Z 图像栈中帧的总览。与帧关联的时间点显示在图像下方。红色圆圈显示了单个草履虫的移动。

指定用户界面和默认设置

1. 本软件随附有多个示例图像。您可以遵照该操作步骤使用 ParameciumTimeSeries.tif 示例图像。
2. 使用视图 > 工具栏 > 生命科学应用 命令来显示生命科学应用工具栏。您可以在该工具栏上找到定义感兴趣区和测量亮度剖线的功能。
3. 使用视图 > 工具窗口 > 测量和感兴趣区 命令来显示测量和感兴趣区工具窗口。在当前图像中定义的感兴趣区会在该工具窗口中列出。
4. 使用工具 > 选项... 命令。在树状视图中选定测量和感兴趣区 > 动态感兴趣区 选项。
选定线性插值，使用当前设置继续选项。
您现在已定义了定义动态感兴趣区在帧上的位置时，动态感兴趣区的行为如何。
使用确定关闭对话框。

查看草履虫的移动

5. 请使用图像窗口顶部的导航栏。

6. 将滑动游标缓慢地移动到右侧，查看在第一帧中位于图像左上方边界处的草履虫的移动。
 - 草履虫先向左下方移动。之后改变方向向上移动，最后消失在图像的左侧。

定义感兴趣区 (ROI)



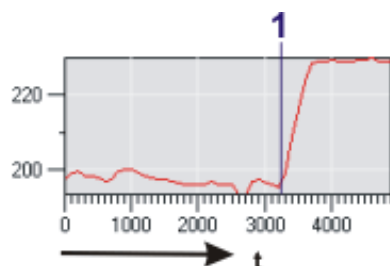
使用动态感兴趣区跟随
对象的移动

1. 在图像窗口中显示第一帧为此，请使用图像窗口顶部的导航栏。
2. 在**生命科学应用**工具栏中单击**新建感兴趣区 - 矩形**按钮。
 - 感兴趣区会显示在**测量和感兴趣区**工具窗口的表格中。在**类型**列中，关键字 **(ROI)** 会被添加到类型名称中。
3. 通过鼠标单击两次，在图像左上方边界处的草履虫周围定义一个小矩形。
4. 将鼠标指针移动到您刚定义的感兴趣区上。单击鼠标右键打开上下文菜单。从上下文菜单中选定**转换为随时间变化的动态感兴趣区**命令，将静态感兴趣区转换为动态感兴趣区。
 - 在**测量和感兴趣区**工具窗口中，**类型**列中的关键字 **(ROI)** 会变为新关键字 **(dROI [t])**。
5. 在图像窗口中，显示其中的草履虫方向发生变化的帧。
 - 已定义的感兴趣区的位置在所有帧中都是相同的。
6. 在这一帧上移动感兴趣区，使其再次将草履虫包含在内。
 - 系统现在将在第一帧和当前帧之间的每一帧上自动重新放置感兴趣区。位置的计算方法为对第一帧和当前帧中的感兴趣区位置进行线性插值。检查在这些帧中草履虫是否完全位于感兴趣区内。
7. 在图像窗口中，显示草履虫在图像中仍然完全可见的最后一帧。
8. 在这一帧上再次移动感兴趣区，使其再次将草履虫包含在内。确保感兴趣区不包含其它草履虫。
9. 检查到目前为止的所有帧中，感兴趣区位置是否都正确。
 - 在之后的帧中，草履虫消失在图像的左侧，所以不能再继续测量。仍然在图像序列中的所有后续帧上定义了动态感兴趣区。您不能仅删除某些帧的动态感兴趣区。

计算亮度剖面



1. 在**生命科学应用**工具栏中单击**亮度剖面**按钮。
 - **亮度剖面 - <活动图像的名称>** 对话框即会打开。
 - 本软件将识别图像类型，并将在**方法**组中选定适当的选项。在本例中，已预设为**随时间**选项。
2. 在**亮度剖面**对话框中进行如下设置。
 - 选中**结果: > 平均值**复选框。
 - 清除其它复选框。
 - 在**感兴趣区数据**组中选定动态感兴趣区。
 - 在**背景减除**组中，选定**无**选项。
3. 单击**执行**按钮。
 - 将计算草履虫的亮度剖面，并在**亮度剖面**工具窗口中显示。



亮度剖面显示了感兴趣区中的平均亮度如何随时间而变化。直到约 3000 ms 处，感兴趣区均包含草履虫。亮度相对恒定。在时间点 (1)，草履虫开始离开图像。亮度随后增加到亮图像背景的级别。该时间点位于约 3300 ms 处。

10.1.4. 在工具窗口中显示亮度剖面

计算多个图像片段的亮度剖面

计算同一时间栈上多个图像片段的亮度剖面。在单一图表中显示亮度剖面。通过为每条亮度剖面创建单独的图表，更改亮度剖面的排列。

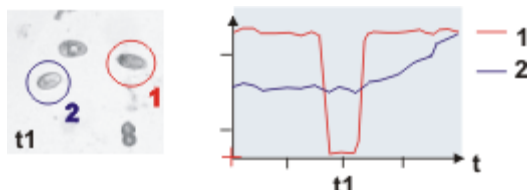
计算亮度剖面



在同一个图表中显示多条亮度剖面



1. 加载或采集单色时间栈。
2. 在图像上定义多个图像片段 (ROI)。
3. 使用 **测量 > 亮度剖面...** 命令打开 **亮度剖面** 对话框。
4. 在 **亮度剖面** 对话框中，选择 **ROI 数据** 列表中的所有 ROI。为此，请单击每个未突出显示的 ROI。
5. 选择 **结果 > 平均值** 复选框，以计算图像片段中的平均亮度值。清除 **所有 ROI 上的结果** 组中的复选框。
6. 单击 **执行** 按钮，为每个 ROI 创建亮度剖面。
 - 亮度剖面显示在 **亮度剖面** 工具窗口中。
 - 亮度剖面以其 ROI 的默认颜色显示。
7. 单击 **排列亮度剖面数据** 按钮。该按钮位于 **亮度剖面** 工具窗口的工具栏中。
8. 在 **排列亮度剖面数据** 对话框中，选择 **按测量分隔图表 (平均值、最小值、最大值、累积值)** 复选框。清除所有其它复选框。
 - 在 **亮度剖面** 工具窗口的图表区域中，已定义每个 ROI 有自己的亮度剖面。亮度剖面的颜色与 ROI 的颜色一致。该图表的名称为 **平均值**。



插图显示了两个图像片段上的亮度剖面示例。在左边的时间栈上定义了两个感兴趣区。这里只显示了时间点 t1 的帧。

右图是为在每个感兴趣区上测得的随时间变化的亮度剖面。对每一个感兴趣区，绘出了感兴趣区内的平均亮度值。

红色亮度剖面属于 ROI1。您可以清楚地看到在感兴趣区 1 中，暗细胞非常快地进入该感兴趣区然后离开。其亮度剖面在时间点 t1 有个明显的最小值，因为仅在该时刻暗细胞 (低亮度值) 才将整个感兴趣区几乎充满。在其它时间点，感兴趣区中只有明亮的背景 (高亮度值)。

对比发现，感兴趣区 2 中细胞的移动速度没那么快。蓝色亮度剖面没有任何明显的最小值。

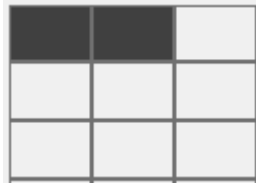
在各自的图表中显示每条亮度剖面



1. 再次单击**排列亮度剖面数据** 按钮。
2. 在**排列亮度剖面数据**对话框中，选择按 **ROI 分隔图表**复选框。清除所有其它复选框。
使用**确定**关闭对话框。

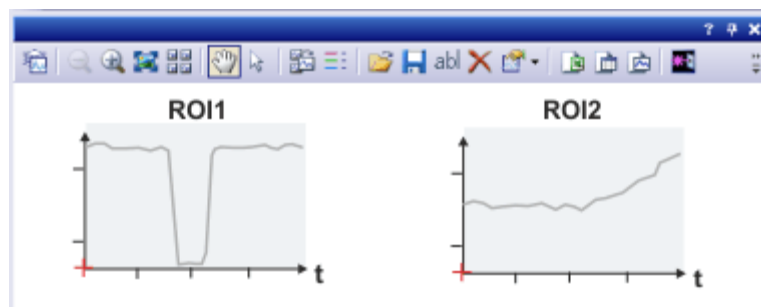


3. 单击**排列亮度剖面图表** 按钮。该按钮位于**亮度剖面**工具窗口的工具栏中。
4. 在该对话框中进行如下设置。
选定**显示图表**组中的**全选**复选框。
在**布局**组中，指定 **2x1** 的网格大小。



使用**确定**关闭对话框。

- **亮度剖面**工具窗口中的亮度剖面现在按不同的方式排列。现在，您可以看到每个已定义 **ROI** 的单独图表。两个图表的位置相互靠近。图表标题对应 **ROI** 的名称。



亮度剖面工具窗口包括两个图表，其位置相互靠近。

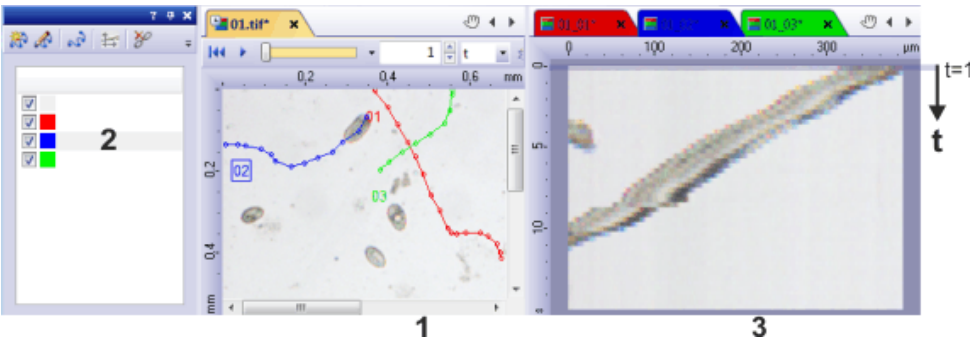
00379

10.2. 记波器

10.2.1. 总览

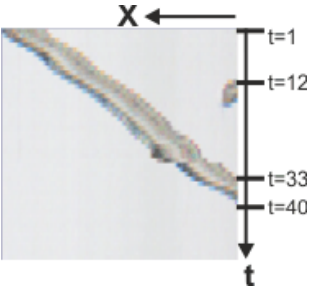
记波器用于测量什么？

使用记波器工具窗口可以创建图像序列中对象的运动的视觉展示。
在图像序列上定义一个或多个轨迹。轨迹是可以跟随任何所需路线的线条。可以为其分配特定宽度。对于每个轨迹，记波器会计算沿线条的亮度值，并根据时间或 Z 值绘制这些值。结果是定义的每个轨迹均有一个记波图。记波图是在水平和垂直轴上进行不同校准的图像。例如，对于时间栈，以长度单位校准记波图的 X 方向，以时间单位校准 Y 方向。



在以上示例中，在图像序列 (1) 上定义了三个轨迹。为每个轨迹计算记波图。记波图自动排列在图像序列的右侧。
每个轨迹都指定有不同颜色。相应记波图在文档组中的标题具有相同颜色。
在插图中，在工具窗口中选择了蓝色轨迹 (2)。这会将文档组中的相应记波图 (3) 显示在工具窗口的右侧。记波图中最上面的线显示时间点 $t=1$ 时沿蓝色线条轨迹的亮度剖面。此时，暗对象位于轨迹的最右侧。记波图显示，对象持续向左侧更远处移动。

记波图属性



插图显示了从其中暗对象跨越亮背景移动的时间栈计算得出的记波图。

沿图像的 X 方向绘制沿图像中线条的亮度值。定义了线条以精确跟随对象的轨迹。沿 Y 方向绘制时间。
在时间点 $t=1$ ，对象正好位于轨迹起点。
在时间点 $t=12$ ，其他对象进入了图像。
在时间点 $t=33$ ，对象开始移出图像。
在时间点 $t=40$ 之后，所定义轨迹上没有对象可见。

保存结果

可以如同一般图像一样保存记波图。使用 VSI 或 TIF 图像格式保留校准。
保存在其上定义了轨迹的图像序列时，轨迹会随图像一起保存。使用记波器工具窗口，在按按钮时从轨迹重新计算记波图。

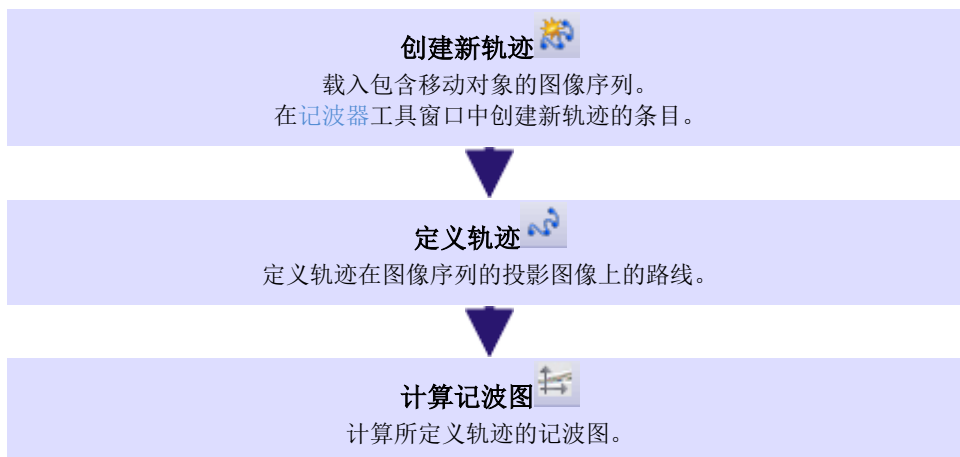
在记波图上进行测量

使用记波图折线测量功能在记波图上进行测量。您可在在线帮助中找到关于此测量功能的说明。
测量和感兴趣区工具窗口中的其余交互测量功能不能用于记波图的测量。

10.2.2. 周期性移动的视觉展示

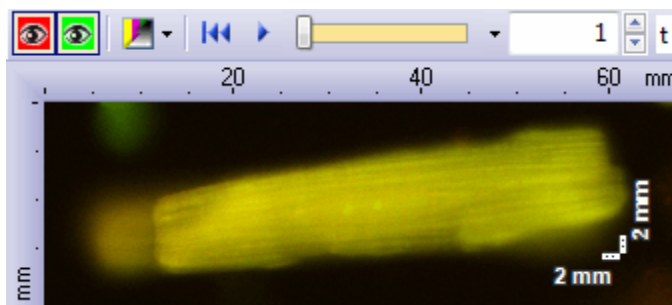
任务 已采集多通道时间栈。荧光的亮度在样品中不断增加和降低。需要创建亮度剖线的视觉展示。

以下流程图显示了该流程的基本步骤。



准备分析

1. 载入要分析的图像序列。
 - 载入多通道时间栈时，它会自动显示在图像窗口中的单帧视图中。
2. 使用记波器时，应在图像中显示水平和垂直标尺。为此，请使用 **工具 > 选项...** 命令。在树状视图中选定 **标尺 > 显示** 选项。选定 **方向 > 水平和垂直** 选项。
3. 如果图像窗口中未显示标尺，请选择 **视图 > 标尺** 命令显示它们。



插图显示了多通道时间栈的第一幅图像。

4. 使用 **视图 > 工具窗口 > 记波器** 命令可显示记波器工具窗口。

创建新轨迹



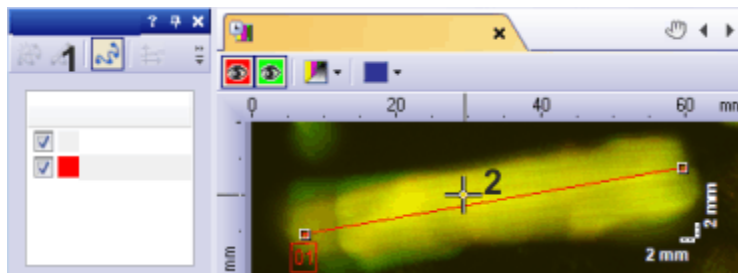
1. 单击记波器工具窗口中的 **创建轨迹** 按钮可在活动图像序列上创建新轨迹。
 - **创建轨迹** 对话框即会打开。
2. 在 **轨迹定义 > 名称** 字段中输入轨迹的名称，如 **Heart_Muscle-01**。
在 **颜色** 字段中，选择易于在图像上看见的颜色，如红色。
在 **视图** 列表中，检查是否使用了正确的投影方法。在该示例中，由于移动对象较亮且背景较暗，因此从列表中选择 **最大亮度投影** 选项。
单击 **确定** 关闭 **创建轨迹** 对话框。

- 即会在记波器工具窗口中的轨迹列表中创建新条目。

定义轨迹



1. 单击记波器工具窗口中的定义轨迹折线按钮。
 - 图像序列会自动显示在图像窗口的最大亮度投影视图中。
 - 鼠标指针会跳到图像窗口并变为十字。
 - 本软件中的其它所有功能现在均被阻止。



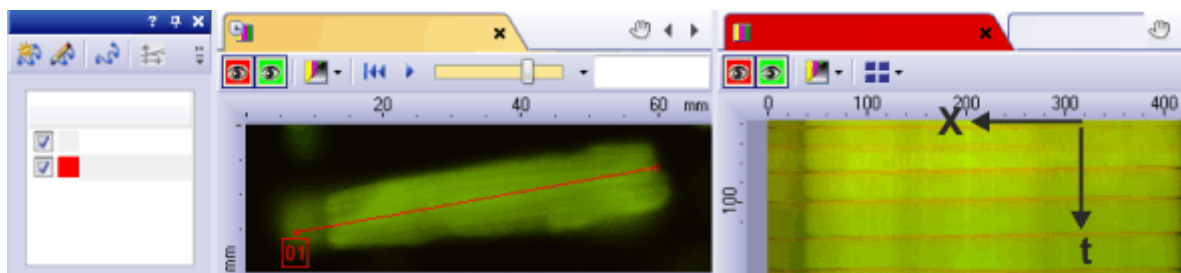
定义轨迹折线 (1) 按钮显示为已点击状态，以指示当前模式。在图像序列的投影视图上定义轨迹 (2)。

2. 通过左键单击定义轨迹。
3. 单击鼠标右键完成轨迹的定义。

计算记波图



1. 单击记波器工具窗口中的计算记波图按钮可计算所定义轨迹的记波图。
 - 记波器会计算沿轨迹路线的亮度值，并按时间绘制这些值。结果为记波图。记波图是在水平和垂直轴上进行不同校准的一般图像。
 - 记波图自动排列在源图像的右侧。
 - 记波图的名称由图像的名称加轨迹的名称组成。
 - 记波图在文档组中的标题与轨迹具有相同颜色。
 - 为每个色彩通道单独计算记波图。使用导航栏中的色彩通道按钮可查看各色彩通道的记波图。

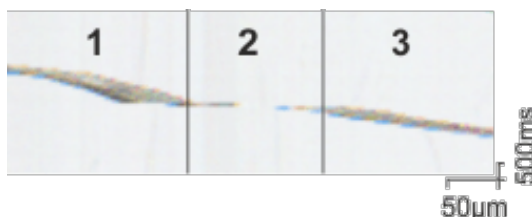


插图左侧显示了记波器工具窗口。在上面定义了一个红色轨迹。可以在中间看到时间栈。在这种情况下，它是多通道时间栈。红色轨迹直接穿过对象。该对象为肌肉组织。右侧记波图清晰示出了对象的周期性移动。组织在收缩和扩张。记波图上显示了带图像维度的坐标系。记波图的宽度由轨迹的长度定义。记波图的高度由时间栈中帧的数量确定。

保存结果

1. 激活文档组中的图像序列。选择 **文件 > 另存为...** 命令，将图像序列随定义的轨迹一起保存。使用 TIF 或 VSI 图像文件格式。
2. 激活文档组中的记波图。选择 **文件 > 另存为...** 命令，将记波图保存为图像文件。使用 TIF 或 VSI 图像文件格式。

10.2.3. 在记波图上进行测量



插图显示了从其中暗对象跨越亮背景移动的时间栈计算得出的记波图。运动大致可分为三个相 (1-3)。在相 (1) 和 (3) 中，对象以相似速度运动。例如，它需要大约相同的时间来运行 150 µm 的距离。对象在相 (2) 中的运动要快得多。

任务

测量以上示例图像上的对象在相 1-3 中的速度。

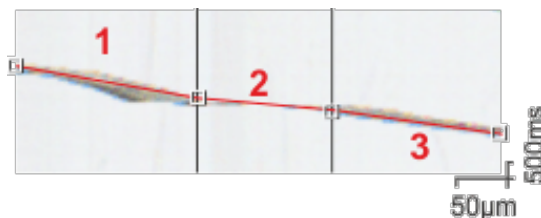
1. 载入要测量的记波图，或创建一幅新图。

定义测量对象



2. 单击 **测量和感兴趣区** 工具栏上的 **记波图折线** 按钮。
 - 本软件随即会自动切换到测量模式。在图像窗口中，鼠标指针会变成叉形。
 - 选定的测量功能将显示在鼠标指针的右下方。
3. 左键单击鼠标按钮可在记波图上定义折线。沿移动对象的轨迹单击。
 - 本软件会用直线连接两个相邻的控制点。
 - 每次单击将定义折线的一个片段。测量结果将提供专门参考这些片段的测量值。
4. 单击鼠标右键结束测量对象的定义。请注意，上一次单击也将定义折线的一个片段。

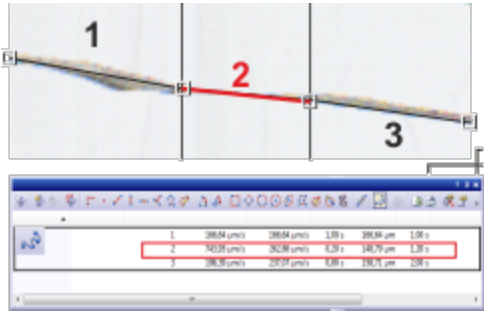
请注意: 如果可以，定义的折线应无任何重叠或交叉。



已在记波图上定义测量对象 (红色)。测量对象为通过精确位于对象的运动相边界上的控制点来定义的折线。

查看测量结果

1. 使用[视图 > 工具窗口 > 测量和感兴趣区](#)命令来显示[测量和感兴趣区](#)工具窗口。
 - 在[测量和感兴趣区](#)工具窗口中的表格中，将输入[记波图](#)类型的新测量值。
 - 请注意，会测量属于测量对象的多个片段。每个片段都有其自身的测量值。在[测量和感兴趣区](#)工具窗口中的表格中，多个测量值已被指派给[类型](#)或[名称](#)列中的单个条目。



执行测量后，您可以在[测量和感兴趣区](#)工具窗口中查看测量结果。您将得到包含每个已定义片段的测量值的测量对象。可以在属于片段 2 的行中找到相 2 中对象的速度。

选定测量参数

本软件为在记波图上进行测量提供了多个测量参数。此时，您应检查感兴趣的测量参数是否也显示在[测量和感兴趣区](#)工具窗口中。



1. 在[测量和感兴趣区](#)工具窗口中单击[选定测量参数](#)按钮。
 - [选定测量](#)对话框将打开。在该对话框中，您将在左上角看到包含所有可用测量参数的列表。在该对话框底部，您将会看到现在为所有对象计算并显示的测量参数的列表。
2. 在[现有测量](#)列表中，选择[记波图线条](#)类型的测量参数，例如[当前速度](#)。
 - 现有测量的列表下的较大按钮显示所选测量参数的名称。
3. 单击[添加“当前速度”](#)按钮以将测量参数添加到已计算测量参数的列表中。
 - 该测量参数将添加到将要计算的测量参数的列表。所有这些测量参数将显示在[测量和感兴趣区](#)工具窗口中。
4. 单击[确定](#)关闭[选定测量](#)对话框。
 - [测量和感兴趣区](#)工具窗口中的结果表现在将显示选定测量参数。



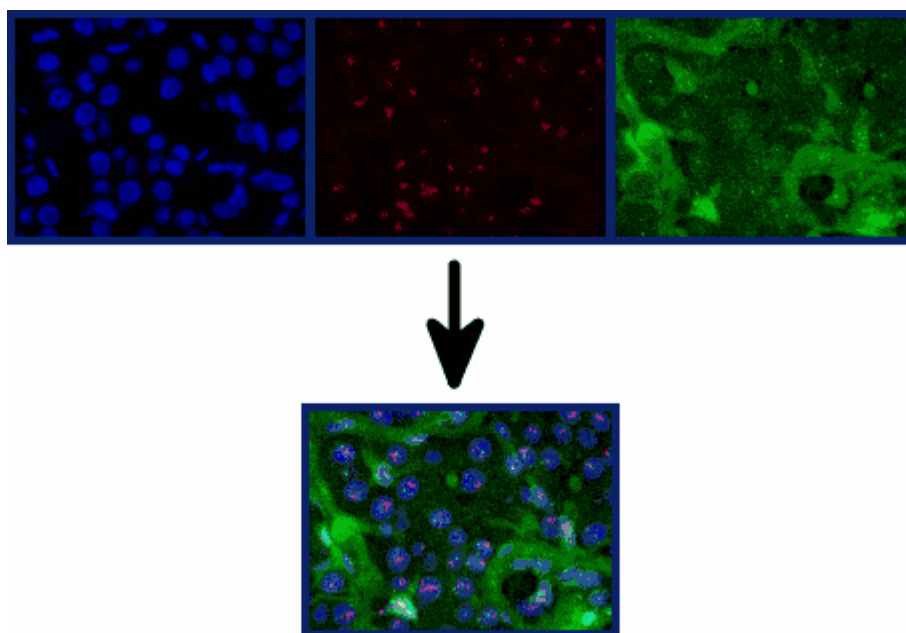
00550

10.3. 荧光分解

10.3.1. 总览

多通道荧光显微学

在多通道荧光显微学中，通过分别采集不同细胞结构然后将其以不同颜色显示，来使不同细胞结构视觉分离。为此，采用多种适当选择的荧光色素将样品着色。这些荧光色素中的每一种均标记特定的细胞结构。随后采集荧光图像。利用荧光色素 1 生成的荧光图像 1 显示细胞结构 1，利用荧光色素 2 生成的荧光图像 2 显示细胞结构 2，以此类推。单幅图像将被组合成多通道荧光图像，以不同颜色显示不同细胞结构。(例如) 使用三种荧光色素时，将生成一幅三通道荧光图像。



将结构视觉分离存在的问题

显微镜的滤镜组

本显微镜为每种荧光色素设有适合的滤镜组，该组包括激发滤镜、二色镜和发射滤镜。当荧光色素 1 被波长范围 1a 中的光激发时，发射出波长范围 1b 的光。采集荧光图像 1 时，激发滤镜 1 使得显微镜照明光源的光只有波长范围 1a 内的较窄范围的光到达样品。同时，二色镜 1 和发射滤镜 1 使得样品的光只有发射波长范围 1b 内的较窄范围的光到达摄像头。

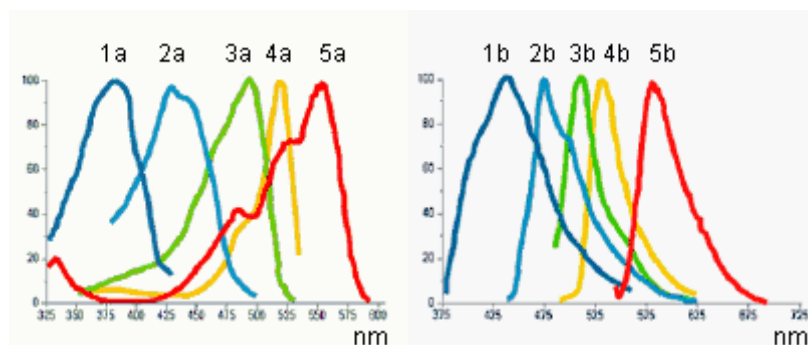
波长范围的重叠

该过程的问题在于不同荧光色素的波长范围会重叠。如果没有发生该重叠，则在结果多通道荧光图像中不同细胞结构的视觉分离将非常理想。

涉及到多种荧光色素时，激发波长范围和发射波长范围均没有明显界限，并且彼此位置十分接近。因此，荧光色素 1、2、3...对应的激发波长范围 1a、2a、3a...通常会重叠。发射波长范围 1b、2b、3b...也同样如此。此外，激发波长范围和发射波长范围之间也存在重叠。

激发光谱和荧光光谱

在下面的光谱中，您可以看到几种经常使用的荧光色素随波长变化的激发强度和发射强度的图形演示。在这些光谱中可以清楚发现不同波长范围是怎样重叠的。



光谱分解

由于存在光谱重叠，所需的细胞结构的视觉分离只能获得部分成功。当 (例如) 激发滤镜 1 允许通过的光还会轻微激发荧光色素 2 时，荧光色素 2 随后发射的光的一部分也可以通过发射滤镜 1；细胞结构 2 也会在荧光图像 1 中稍微可见。可将其认为是单幅荧光图像的不希望的“光谱合并”。

光谱分解

随后可以通过重新计算来删除以数字方式记录的多通道荧光图像中的光谱合并。也就是说，将对图像执行“光谱分解”。执行该操作后，可以改善图像中不同细胞结构的视觉分离效果并提高图像质量。为此，请使用 [运算 > 增强 > 荧光分解...](#) 命令。

00360

10.3.2. 执行荧光分解

多通道荧光图像的光谱分解分为两个步骤。第一步是借助参照图像对色彩通道进行校准。在实验条件不变的情况下，您只需执行该步骤一次。第二步是对实际光谱进行分解。

每个要校准的色彩通道正好需要一个参照图像。每个参照图像的色彩通道数量必须与要分解的图像的色彩通道数量完全相同。在下面的操作步骤中，将假设您已经采集了一幅三通道的荧光图像并希望对其执行光谱分解。对于双通道荧光图像，步骤与此类似。

校准色彩通道

在实验条件不变的情况下，您只需执行一次校准。完成此操作后，您可以在校准的基础上对后来采集的所有三通道荧光图像进行光谱分解。

采集参照图像

1. 设置三个样品，每个样品只用三种荧光色素中的一种进行染色。或者，您可以使用一个已经由所有三种荧光色素染色的样品。在这种情况下，该样品上必须有这样的三个区域，每个区域均只被一种荧光色素染色。
2. 为三个样品中的每一个 (或者为样品上三个区域中的每一个) 采集三通道荧光图像。
执行此操作时，使用适于其中每一个图像的激发滤镜和一个多频带发射滤镜，或者使用一个多频带激发滤镜和适于其中每一个图像的发射滤镜。
实验条件必须与采集要进行光谱分解的图像时的实验条件相同。
 - 执行光谱分解时，将自动对各个色彩通道曝光时间的差异进行线性矫正。不过，一般说来在采集参照图像时不要更改曝光时间，这一点十分重要。
 - 采集的结果将是三幅多通道荧光图像。每幅图像均包含三个通道。在下文中，这些图像将被命名为“参照图像 1”、“参照图像 2”和“参照图像 3”。参照图像 1 用于校准属于荧光色素 1 的色彩通道 1。对于参照图像 2 和 3，方法类似。
 - 每幅参照图像将显示在文档组内其自己的窗口中。最后采集的参照图像将会是当前显示的活动图像。
 - 如果您在先前的某个时间点已经采集了这三个参照图像，则可以使用 [文件 > 打开 > 图像...](#) 命令将其载入文档组。

定义感兴趣区



1. 激活文档组中的参照图像 1。
2. 在[生命科学应用](#)工具栏中，单击[新建感兴趣区 - 三点圆](#)按钮。
 - 如果该工具栏没有显示，请使用[视图 > 工具栏 > 生命科学应用](#)命令使其显示。
3. 在参照图像 1 中搜索这样的区域: 其中荧光色素 1 特别明亮，并且发光尽可能均匀。
4. 在该区域内使用鼠标单击三次，定义一个圆形感兴趣区。
 - 即为荧光色素 1 定义了该感兴趣区。将自动为其分配名称“ROI 1”。
 - 以后您仍可以更改该感兴趣区的大小和位置。
 - 您可以更改这个自动创建的名称。为此，请使用[测量和感兴趣区](#)工具窗口。在该窗口中单击感兴趣区的名称即可进行更改。如果该工具窗口没有显示，请使用[视图 > 工具窗口 > 测量和感兴趣区](#)命令使其显示。



5. 再次单击[新建感兴趣区 - 三点圆](#)按钮。
6. 在参照图像 1 的背景中搜索这样的暗区域: 其中尽可能看不到任何荧光色素。
7. 在该区域内使用鼠标单击三次，定义一个圆形感兴趣区。
 - 即为图像背景定义了该感兴趣区。将自动为其分配名称“ROI 2”。

8. 使用相同的步骤，在参照图像 2 中为荧光色素 2 定义感兴趣区，并为图像背景定义感兴趣区。
9. 使用相同的步骤，在参照图像 3 中为荧光色素 3 定义感兴趣区，并为图像背景定义感兴趣区。

结束校准



1. 激活文档组中的参照图像 1。
2. 在生命科学应用工具栏中，单击[荧光分解](#)按钮打开[荧光分解](#)对话框。
3. 激活[校准](#)选项卡。
4. 在[名称](#)字段中输入荧光色素 1 的标签。这同时也是色彩通道 1 的校准的名称。
5. 在[图像](#)列表中选择参照图像 1。
6. 在紧靠[图像](#)列表下方的[感兴趣区](#)列表中，选择为荧光色素 1 定义的“ROI 1”。
7. 在[背景减除](#)组中，为参照图像 1 的背景校正选择[感兴趣区](#)选项。
8. 在右侧的相邻列表中，选择为参照图像 1 中的图像背景定义的“ROI 2”。
9. 单击[保存](#)按钮。
 - 色彩通道 1 的校准现在已经完成。
 - [荧光色素 2 >>](#) 按钮将变为可用。
10. 单击[荧光色素 2 >>](#) 按钮可跳过色彩通道 2 的校准。
 - [荧光色素 1](#) 组的名称随后将更改为[荧光色素 2](#)。
11. 然后，使用相同的步骤，利用参照图像 2 和荧光色素 2 校准色彩通道 2。
12. 然后，使用相同的步骤，利用参照图像 3 和荧光色素 3 校准色彩通道 3。
13. 单击[取消](#)按钮可关闭[荧光分解](#)对话框。

对三通道荧光图像进行光谱分解

1. 在文档组中，激活您想要进行光谱分解的三通道荧光图像。
 - 如果您在先前的某个时间点已经采集了图像，则可以使用 [文件 > 打开 > 图像...](#) 命令将其载入文档组。
2.  在 [生命科学应用](#) 工具栏中，单击 [新建感兴趣区 - 三点圆](#) 按钮。
3. 在图像的背景中搜索这样的暗区域：其中尽可能看不到任何荧光色素。
4. 在该区域内使用鼠标单击三次，定义一个圆形感兴趣区。
 - 即为图像背景定义了该感兴趣区。将自动为其分配名称“ROI 1”。
5.  在 [生命科学应用](#) 工具栏中，单击 [荧光分解](#) 按钮打开 [荧光分解](#) 对话框。
6. 激活 [线性分解](#) 选项卡。
7. 在 [荧光色素 1](#) 列表中，选定要用于校正多通道荧光图像的色彩通道 1 中的荧光图像的校准。
 - 该校准的名称与您执行校准时赋予荧光色素 1 的标签相同。
8. 在 [荧光色素 2](#) 列表中，选定要用于校正多通道荧光图像的色彩通道 2 中的荧光图像的校准。
9. 在 [荧光色素 3](#) 列表中，选定要用于校正多通道荧光图像的色彩通道 3 中的荧光图像的校准。
10. 在 [背景减除](#) 组中，为图像的背景校正选定 [感兴趣区](#) 选项。
11. 在右侧的相邻列表中，选择在图像中为图像背景定义的“ROI 1”。
12. 单击 [确定](#) 按钮执行光谱分解并关闭该对话框。
 - 随即会为已光谱分解的图像创建一个新的图像文档。源图像将不会被更改。
 - 光谱分解之后，图像可能不会以最优效果显示在显示屏上。在这种情况下，请单击 [调节显示](#) 工具窗口中的 [应用](#) 按钮。执行该操作时，显示屏上的图像对比度将自动优化。实际的图像数据不会改变。
13. 如果需要，可将光谱分解后的图像保存。

00361

10.4. 共定位测量

使用[共定位](#)按钮启动共定位测量。该按钮可以在[生命科学应用](#)工具栏上找到。

先决条件: 该按钮在所有软件版本中均不可用。

什么是共定位测量?

在荧光显微学中, 它指的是检查使用不同荧光色素染色的样品。共定位测量可确定两个不同荧光通道同时存在的样品荧光信号区域。共定位测量会生成散点图、共定位图像和不同的测量参数。

10.4.1. 在整个帧上测量共定位

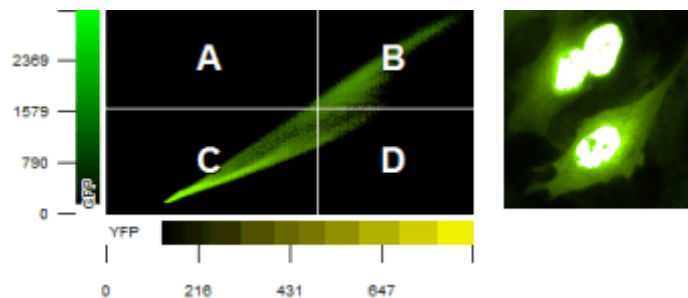


1. 载入要用于共定位测量的多通道图像。
2. 在[生命科学应用](#)工具栏上, 点击[共定位](#)按钮。如果此工具栏未显示, 请使用[视图 > 工具栏 > 生命科学应用](#)命令。
 - [共定位](#)对话框即会打开。
3. 从[散点图 > 通道 1](#)和[通道 2](#)数据段, 选择要在其中执行共定位测量的两个色彩通道。
4. 在[预览](#)组中, 单击该按钮。从菜单选择[目标通道和共定位通道](#)命令。
 - 活动预览功能可通过勾号识别。
5. 在[目标区域](#)组中, 从[区域](#)列表中选择[整个帧](#)选项。
6. 在散点图中, 定义需要共定位测量分析的亮度范围。为此, 例如选择[模式 > 阈值](#)选项。
 - 在散点图中显示网格, 将其分为多个象限。
7. 在[使用象限](#)列表中选择 [B \(右上角\)](#) 选项。现在共定位通道将包含两个通道中亮度较高的所有像素。请注意预览如何变化。
 - 在预览中, 亮度值在象限内的选定像素以白色显示。

选定预览功能



在散点图中选择亮度范围



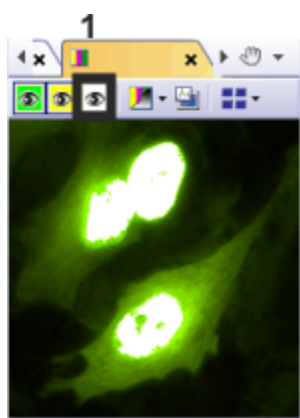
左图显示的散点图像素大约沿对角线分布。也就是说, 两个荧光通道中的像素亮度值大约相同。在右侧生成的图像中, 亮度处于 **B** 象限中的所有像素以白色显示。这允许您快速确定两个通道荧光亮度特别高的图像区域。

选择用于共定位测量的帧

8. 在使用多通道时间栈或多通道 **Z** 图像栈时: 在[应用于](#)组中确定, 是否在所有帧或只是在选定帧上执行共定位测量。如果要限制图像选择, 可选择[选定的帧](#)选项, 然后单击[选维器](#)按钮。
 - 然后就可以在[选维器](#)工具窗口中限制图像选择。您可在在线帮助中找到有关该工具窗口的更多信息。
9. 使用图像窗口中的导航栏可浏览图像序列。选择要为其确定散点图的帧。
10. 在[共定位](#)对话框中, 您可以在[预览](#)和[结果 \(当前帧, 所有感兴趣区\)](#)组中看到图像序列中当前帧的结果。请注意, 您可以调整该对话框的大小。您可以双击对话框的标题, 将对话框放大到全屏幕大小。

查看结果

11. 单击**选项...**按钮，然后选择**共定位通道 (图像)** 和**测量结果 (工作簿)** 复选框。使用**确定**关闭对话框。
12. 在**共定位**对话框中单击**确定**按钮结束共定位测量。
 - 将会创建包含共定位测量结果的工作簿。该工作簿包含两个工作表。第一个工作表 **<源图像的图像名> 的 <通道 1>/<通道 2> 共定位**显示选定象限的测量结果。例如，已测量 **Pearson 相关系数 $R(r)$** 。第二个工作表 **<阈值>** 显示所有象限的测量结果。已测量象限中的像素数量。
 - 包含共定位通道的新图像随即被创建。在导航栏中可以看到，每个图像的色彩通道都有一个对应的按钮 (以相应的荧光色显示)。共定位通道为白色。使用此按钮显示或隐藏共定位通道。
13. 如果需要，可使用**文件 > 另存为...** 菜单命令来保存新的图像和工作簿。



共定位图像在源图像中显示为其他通道。单击 **(1)** 按钮可隐藏共定位图像。

10.4.2. 测量部分图像上 (感兴趣区) 的共定位

荧光信号的共定位通常只出现在小图像片段中。在这种情况下，定义 ROI (感兴趣区)，然后只确定该感兴趣区内的共定位将是有益的。您也可以定义几个感兴趣区。感兴趣区可以是您希望的任何形状。



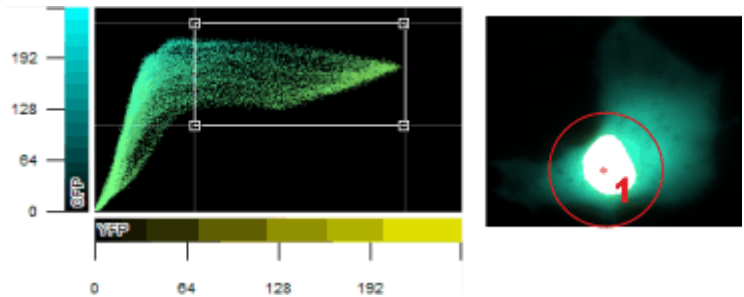
选定预览功能



定义感兴趣区

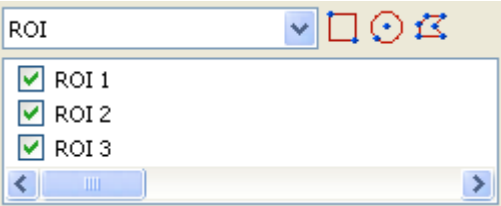
1. 载入要用于共定位测量的多通道图像。
2. 在**生命科学应用**工具栏上，点击**共定位**按钮。
3. 从**散点图 > 通道 1** 和**通道 2** 数据段，选择要在其中执行共定位测量的两个色彩通道。
4. 在**预览**组中，单击该按钮。从菜单中选择**目标通道和共定位通道**和**显示目标区域**命令。
 - 活动预览功能可通过勾号识别。
5. 在散点图中，定义需要共定位测量分析的亮度范围。为此，例如选择**模式 > 矩形**选项。
 - 散点图内会出现一个矩形。
 - 在预览中，亮度值在矩形内的定义像素以白色显示。
6. 如有必要，请使用鼠标移动散点图中的矩形。
7. 在**目标区域**组中，从**区域**列表中选择**感兴趣区**选项。
 - 在字段的右侧会显示带有各种感兴趣形式的按钮。
8. 单击要设置的所需 ROI 形式的按钮。您可在矩形、圆形和多边形之间选择。

- 鼠标指针随即会出现在图像窗口中。共定位对话框为隐藏状态。
9. 定义 the first ROI with 单击 s of your 点击鼠标左键定义第一个如果已完成了感兴趣区的定义，可单击鼠标右键，然后选择上下文菜单中的确认输入命令。
- 您将再一次看到共定位对话框。
 - 所定义的感兴趣区将显示在预览图像中。
 - 散点图现在仅显示选定感兴趣区内像素的亮度值。
10. 如果需要，可定义更多感兴趣区。



左图显示了一个散点图。右图显示了目标通道和共定位通道。在图像上定义了感兴趣区 (1)。只有所定义感兴趣区内的像素会在散点图中表示出来。

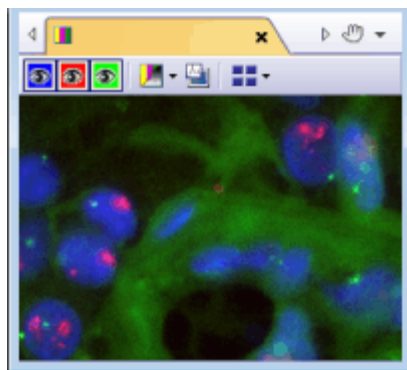
查看结果

11. 清除或选中感兴趣区旁边的复选框。为此，可在感兴趣区名称左侧的框中单击一下。
- 
12. 注意在预览中以及结果组中显示的结果。
13. 点击确定按钮结束共定位测量。
- 将会创建包含共定位测量结果的工作簿。工作簿包含已定义的每个感兴趣区的测量结果。

10.4.3. 在特定图像结构中执行共定位测量

您可以在图像结构上测量共定位。如果图像上要分析的图像结构很多，并且散布在整个图像上，则该步骤将比设置大量感兴趣区更快。例如，如果想在已沾染 (蓝色荧光) 荧光色素 DAPI 的图像结构上测量共定位，则可选择蓝色通道。然后定义该通道的阈值。

示例: 在图像上，将测量以蓝色 (细胞核) 标记的区域内的红色和绿色像素的共定位。将忽略图像上的其它所有位置。



源图像为一个具有三个色彩通道的多通道图像。



选定预览功能



定义用于通道分离的阈值

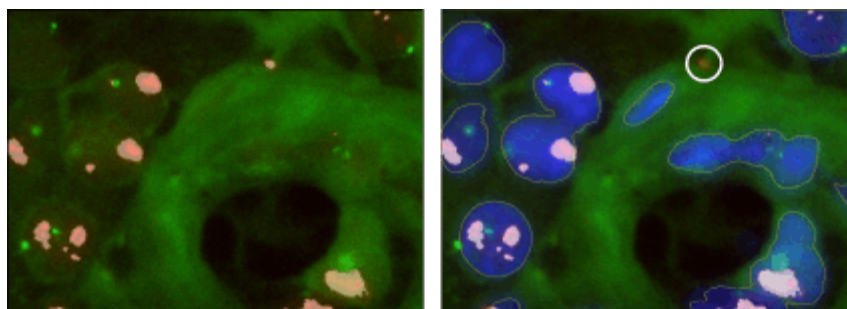


1. 载入要执行共定位测量的多通道图像。
2. 在生命科学应用工具栏上，点击共定位按钮。
3. 从散点图 > 通道 1 和通道 2 数据段，选择要在其中执行共定位测量的两个色彩通道。对于该示例，可以选择红色和绿色通道。
4. 在预览组中，单击该按钮。从菜单中选择目标通道和共定位通道和显示目标区域命令。
 - 活动预览功能可通过勾号识别。
5. 在目标区域组中，从区域列表中选择通道分离选项。
6. 单击按钮，该按钮位于区域字段的右侧。
 - 将开启具有设置阈值的不同方法的取值表。
7. 选定自动阈值...方法。
 - 使用该方法时，用户要进行的设置是最少的。因此，如果使用自动阈值...方法得不到需要的结果，则只有使用设置阈值的其他方法。
 - 自动阈值对话框即会打开。本软件将自动设置阈值。在图像窗口中，现在您将看到由自动阈值设置探测到的图像结构。
8. 从通道列表选定您需要的通道。对于荧光图像，请在自动阈值对话框的背景组中选择暗选项。
9. 单击确定关闭自动阈值对话框。
 - 您将再一次看到共定位对话框。
 - 所有可用的通道会显示在区域取值表下方的字段中。

10. 选择要分析的图像结构已沾染的荧光色素的通道。在本例中，选定了 DAPI 通道。

TRITC: 1
FITC: 2
DAPI: 3

- 选定通道现在也显示在预览中。
- 所显示的共定位像素专门显示在选定色彩通道的阈值所定义的图像结构内。



左图显示了设置阈值之前的预览图像。在图像亮区域，已在绿色和红色通道中执行共定位测量。

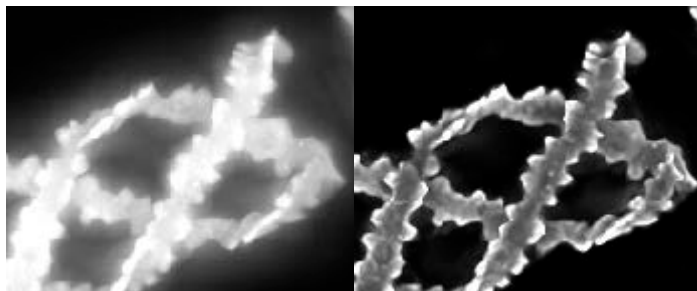
右图显示了设置阈值之后的预览图像。现在也会显示蓝色通道，因为共定位测量限制为蓝色图像结构。蓝色结构周围的细线显示通过阈值设置所选择的图像区域。白色圆圈显示不在蓝色细胞上的一个位置。设置阈值前在此执行共定位测量。

11. 如有必要，请在散点图中限制需要共定位测量分析的亮度范围。
12. 点击 **确定** 按钮结束共定位测量。
 - 包含共定位通道的新图像随即被创建。
 - 同时将会显示包含共定位测量结果的工作簿。工作簿中的列包含补充性的 **[分离通道]**。
 - 在源图像中，将另外显示分离图像。分离图像显示了每个通道的阈值设置。使用 **选维器** 工具窗口可显示或隐藏分离图像。
13. 如果需要，可使用 **文件 > 另存为...** 菜单命令来保存新的图像和工作簿。
14. 如果定义了通道分离，则多通道图像也将更改。如果不想保留这些设置，请勿进行保存。

00709 14072017

10.5. 消卷积

[运算 > 消卷积](#)子菜单提供消卷积滤镜，您可利用这些滤镜消除单幅图像或多维图像中造成干扰的漫射光。通过适当选择参数，图像会变得更加锐利并且更加清晰。



在使用消卷积滤镜之前

消卷积流程的结果在很大程度上取决于用于采集图像的特定参数是否已知。这些参数包括 (例如) 物镜的数值孔径和折射系数。在对图像使用消卷积滤镜之前，使用 [运算 > 消卷积 > 验证通道参数...](#) 命令可检查图像的相关参数，并在需要时更改。您可在在线帮助中找到关于此对话框的说明。

什么是消卷积？

在荧光显微术和明场显微术中，来自焦平面上方或下方区域的漫射光会导致过度曝光、畸变和模糊。描述该问题的合适的数学模型是卷积运算：

$$g(x) = f(x) * h(x) + n(x)$$

x : XY 空间中的点

$g(x)$: 观察到的图像

$f(x)$: 理想图像

$h(x)$: 点扩散函数

$n(x)$: 噪声函数

$*$: 卷积

为了能够从观察到的图像 $g(x)$ 重建理想图像 $f(x)$ ，您必须知道噪声函数 $n(x)$ 和点扩散函数 $h(x)$ 。当很可能获得噪声函数 $n(x)$ 的估计量时，点扩散函数 $h(x)$ 通常明显取决于显微镜和样品的光学特性，而无法通过实验直接确定此函数。因此，即使是为了近似确定点扩散函数 $h(x)$ 进而尽可能利用消卷积重建理想图像 $f(x)$ ，也需要使用数学算法。由于卷积运算中会丢失信息，因而通常不可能做到完美、精确的重建。

消卷积滤镜

对于确定点扩散函数和噪声函数的方式 (图像消卷积和降噪时所必需), 各个消卷积滤镜在本质上是不同的。

用于计算点扩散函数的图像数据越多, 结果就越精确, 但计算所花费的时间越长。

二维消卷积	二维消卷积滤镜使用理论点扩散函数, 其中仅使用采集参数, 而不使用任何图像数据。 可以在所有受支持图像类型上应用二维消卷积滤镜。然而, 二维消卷积滤镜始终仅影响各个帧。 由于处理的数据量非常小, 因此二维消卷积滤镜非常快。它使图像显现得锐利得多, 但不允许随后对图像数据进行任何定量分析。 该滤镜特别适合图像信息来自样品中非常窄的 Z 范围的 TIRF 图像。
最近邻滤镜	最近邻滤镜将理论点扩散函数用于消卷积运算, 在该计算中考虑了被检查图像的数据和 Z 图像栈的两个相邻图像的数据。点扩散函数应用于相邻图像。随后从被检查图像减去以这种方式处理后的相邻图像的标量和。对于单幅图像和简单时间栈, 最近邻滤镜的效果与无近邻滤镜相似。在这种情况下, 计算点扩散函数时只使用观察到的图像的数据。
Wiener 滤镜	Wiener 滤镜利用线性函数来近似计算点扩散函数, 使得均方差最小化。实际滤镜是根据线性反函数计算得到的。对于 Z 图像栈, 计算中使用了完整的 Z 图像栈数据, 对于单幅图像, 计算中只使用了观察到的图像的数据。
受限迭代滤镜	受限迭代滤镜不对点扩散函数做任何假定, 而是直接从 Z 图像栈中提取该函数。此操作迭代执行。开始时使用估计的点扩散函数。然后进行这样的假设: 通过该点扩散函数, 理想图像将生成观察到的图像。再进行这样的估计: 点扩散函数使得源图像转换成观察到的图像。可以根据需要重复这一交替估计。使用特殊数学运算以确保这些迭代收敛到合理值。 受限迭代滤镜可以得到所有消卷积滤镜所能得到的最佳结果, 但是需要的计算时间最长。由于滤镜反复作用于完整 Z 图像栈, 因此无法将其用于单幅图像或简单时间栈。

00355 091032012

10.6. 比例分析

10.6.1. 总览

特定多通道荧光显微学检查模式允许您监控细胞结构中离子浓度或 pH 值的变化。其激发特征取决于离子浓度的荧光染料用于该目的。

例如，在钙例子浓度降低时，Fura-2 荧光染料的激发水平从 340 nm 偏移至 380 nm。在激发波长 340nm，当钙浓度增大时，亮度增加。在激发波长 380nm，情况完全相反。钙浓度越高，发射的光就越少。

在多通道荧光图像上进行比例分析的流程

1. 采集一幅多通道荧光图像

依次用两个不同的波长激发荧光染料。多通道荧光图像包含使用相同荧光染料但在不同激发波长下创建的两个色彩通道。

激发波长 340 nm 和 380 nm 通常用于 Fura-2 荧光染料。

2. 执行背景校正

在两个色彩通道上都会执行背景校正。您可以在[比例分析](#)对话框中对背景校正进行设置。您可在在线帮助中找到关于此对话框的说明。

3. 计算比例图像

一个色彩通道除以另一个色彩通道 (按像素)。结果为比例图像，其中亮度与离子浓度成正比。

使用 Fura-2 荧光染料时，将 340 nm 激发波长下采集的图像除以 380 nm 激发波长下采集的图像：

色彩通道 (340 nm) / 色彩通道 (380 nm)

4. 查看比例图像

结果为一幅多层图像。一层为源图像，另一层为比例图像。比例图像使用伪色彩显示离子浓度。伪色彩图像会叠加在源图像上，因此可以同时看到样品中的结构以及离子的浓度。

您可以更改图像窗口中结果图像的显示，以便 (例如) 仅查看比例图像。

在多通道时间栈上进行比例分析的流程

1.采集一幅多通道时间栈

2.执行背景校正

3.计算亮度剖面

如果在多通道时间栈上执行了比例分析，那么除了比例图像以外，您还可以计算亮度剖面。亮度剖面显示特定图像片段中的离子浓度变化。您可以通过定义一个感兴趣区来确定图像片段。您可以在[比例分析](#)对话框中定义感兴趣区。

您可以同时测量多个图像片段的亮度剖面。

4.查看比例图像

结果为一幅多层图像。一层为源图像，另一层为比例图像。比例图像使用伪色彩显示钙离子浓度。伪色彩图像会叠加在源图像上，因此可以同时看到样品中的结构以及钙离子的浓度。

您可以更改图像窗口中结果图像的显示，以便 (例如) 仅查看比例图像。

00244 25072013

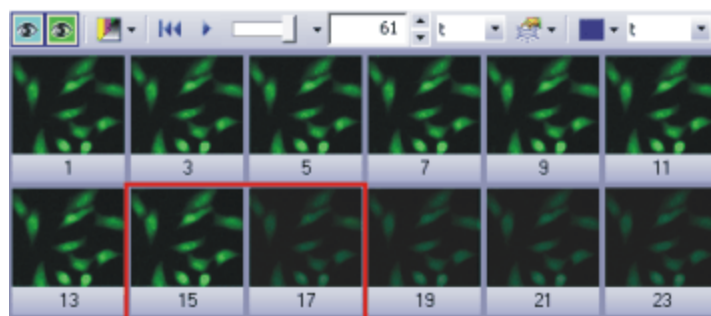
10.6.2. 执行比例分析

使用 **测量 > 比例分析...** 命令可测量一个时间栈中钙离子的浓度。该命令也可以作为 **生命科学应用** 工具栏上的按钮出现。

测量时间栈中钙离子浓度的变化

任务

利用 **Fura-2** 荧光染料可以测量自由钙离子的浓度，因为在钙离子浓度增大时，该染料的激发水平从 **340 nm** 偏移到 **380 nm**。使用比例分析计算两个细胞中随时间变化的比例图像以及亮度剖面。

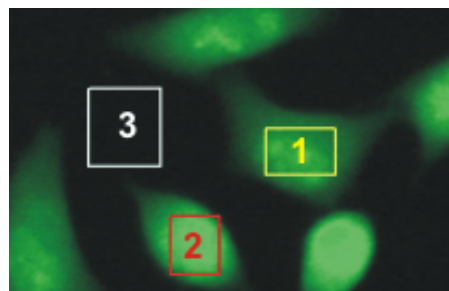


图像显示了有两个色彩通道的多通道时间栈中的帧的总览。已使用 **Fura-2** 荧光染料为样品染色。在插图以红色边框标出的帧之间，图像亮度明显减小。这是由于钙离子浓度的变化所导致的。

准备分析

1. 本软件随附有多个示例图像。您可以遵照该操作步骤使用 **Fura.tif** 示例图像。这一示例图像是一幅多通道时间栈图像。
2. 使用 **视图 > 工具栏 > 生命科学应用** 命令来显示 **生命科学应用** 工具栏。您可以在该工具栏上找到定义感兴趣区和比例分析的功能。
3. 在 **生命科学应用** 工具栏中单击 **新建感兴趣区 - 多边形** 按钮。
4. 在一个细胞内拖出一个矩形。
5. 在另一细胞内再定义一个感兴趣区。
6. 在不含荧光对象的暗图像片段中再定义一个感兴趣区。该感兴趣区将用作背景矫正的参照。
7. 重命名已定义的感兴趣区。
为此，请打开 **测量和感兴趣区** 工具窗口。在 **测量和感兴趣区** 工具窗口中，双击第一个感兴趣区的名称。为感兴趣区输入一个描述性名称。例如，将感兴趣区命名为 **细胞 01**、**细胞 02** 和 **背景**。

定义感兴趣区 (ROI)

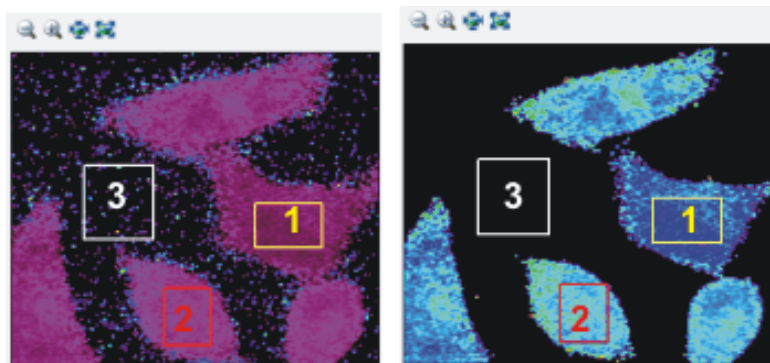


在图像上定义了三个感兴趣区。红色和黄色的感兴趣区包含细胞。白色的感兴趣区在背景上。

执行比例分析



1. 单击生命科学应用工具栏上的比例分析按钮。
 - 比例分析对话框随即打开。
2. 在背景组中为背景矫正进行设置。选定感兴趣区选项。在两个列表中，为背景矫正选定参照感兴趣区。
3. 在比例组中，选定计算比例图像的参数。从分子列表选定 Fura340 色彩通道，并从分母列表选定 Fura380 色彩通道。
 - 比例分析对话框中的预览图像显示根据当前图像窗口中显示的时间点计算的比例图像。比例图像即是 Fura340 色彩通道的亮度除以 Fura380 色彩通道的亮度的结果。
 - 比例图像是灰度图像，其自动具有在预览窗口中应用在其上的预定义伪色彩查对表。根据该伪色彩查对表，高比例值显示为红色，低比例值显示为品蓝色。
 - 比例图像的背景中具有亮度较高的独立像素。这是图像噪声。
4. 增大阈值字段中的值，直到图像噪声消失，仅细胞仍然可见。
5. 在比例列表中，接受给出的值 1000。

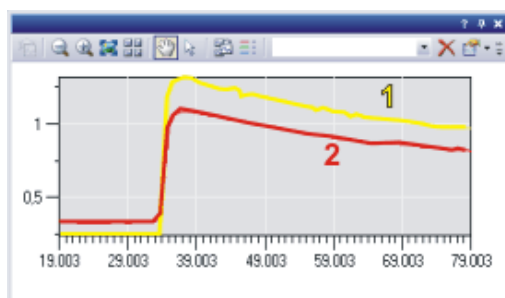


在左侧，您可以看到在设置阈值前的预览图像。

在右侧，您可以看到在设置阈值后的预览图像。图像的背景现在是黑色的。预览图像中的颜色已变化，这是因为预览窗口中的图像始终以最有可能的对比度显示。

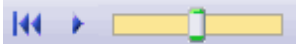
查看结果

1. 在输出组中，选定图像作为新层和亮度剖面复选框。如果您想将两度剖面作为一个表格输出，请选定导出为工作簿复选框。
2. 选定在细胞上定义的感兴趣区。选定的感兴趣区会在对话框中突出显示。
3. 单击确定关闭比例分析对话框。
 - 如果之前没有显示亮度剖面工具窗口，那么现在它会自动显示出来。工具窗口包含两个亮度剖面，每个已定义的感兴趣区一个。
 - 源图像现在为多层图像，除了显示图像信息外，还显示钙离子的浓度。
4. 使用文件 > 另存为... 命令保存该生成的图像。请以 TIF 或 VSI 文件格式保存结果图像。



亮度剖面显示了两个感兴趣区 (1) 和 (2) 中的比值如何随时间变化。亮度剖线的颜色与所描述的感兴趣区的颜色一致。

设置比例图像的显示

1. 执行一个比例分析。
 - 由比例分析所产生的图像是多层图像。一层为源图像，另一层为比例图像。有几种在显示屏上显示结果图像的方式。
2. 使用 **视图 > 工具窗口 > 层** 命令可显示层工具窗口。在层工具窗口中，您可以访问各个图像层。
3. 选定 **视图 > 工具窗口 > 调节显示** 命令可显示调节显示工具窗口。在调节显示工具窗口中，您可以指定图像如何在显示屏上显示。
4. 在文档组中激活比例分析产生的图像。
5. 查看该时间栈中亮度剖线的顶点。
为此，请使用图像窗口顶部的导航栏。

6. 如果图像窗口中未出现信息印记，请使用 **视图 > 信息印记** 命令将其显示出来。
 - 信息印记应显示每一帧的时间。
 - 如果该时间未显示，请选定 **工具 > 选项...** 命令。
在树状视图中，选定 **信息印记 > 属性** 选项。在可用属性列表中，选定 **图像 > 时间** 复选框。
使用 **确定** 关闭对话框。

浏览时间栈

分别查看比例图像和源图像

在任何所需时间，在图像窗口中仅能查看比例图像或源图像。

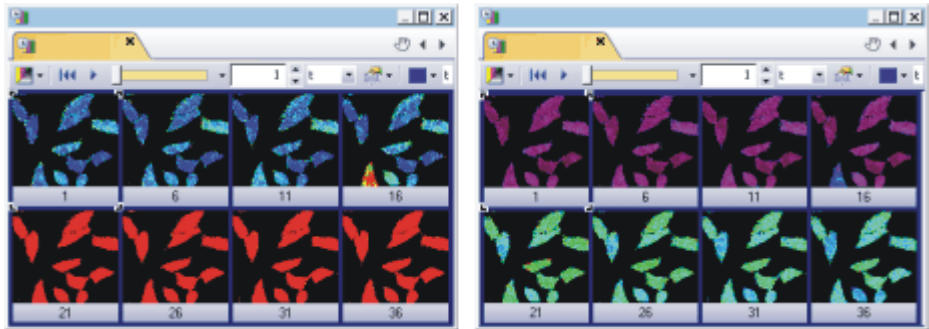
1. 在层工具窗口中，单击源图像可选定该图像层。该工具窗口中的图像层的名称对应于图像的名称。
2. 单击比例图像旁的眼睛图标。
 - 比例图像现在即不会显示在图像窗口中。您只能看到源图像。
3. 在层工具窗口中，单击比例图像可选定该图像层。
 - 当您在层工具窗口中选定了图像层后，该图像层会自动显示出来。
4. 单击源图像旁的眼睛图标。
 - 源图像现在即不会显示在图像窗口中。现在您只会看到比例图像。



插图显示了含有由比例分析所产生的图像的层工具窗口。
在左侧，没有显示比例图像 (1)。在右侧，没有显示源图像 (2)。

优化比例图像的显示

1. 仅在图像窗口中显示比例图像
2. 使用调节显示工具窗口可优化比例图像的显示。
3. 选定自动适配选项。
这样便可确保比例图像在图像窗口中以最有可能的对比度显示。使用该设置，所使用的伪色彩查对表中的所有色彩均会应用至比例图像。
所有帧的直方图复选框决定是否将只优化时间栈中当前显示的帧的对比度，或者是否将优化时间栈中所有帧的对比度。
4. 选定所有帧的直方图复选框。
本软件现在会提取所有帧中的最小值和最大值，然后分别为这些值分配黑色和红色。
5. 单击应用按钮，使更改的设置可在图像窗口中可见。



插图显示了在调节显示工具窗口中进行了不同设置的相同比例图像。
在左侧，已为第一帧优化了对比度。未选定所有帧的直方图复选框。由于比例图像中的值随时间而增大，因此颜色会朝红色偏移。
在右侧，优化了所有帧的对比度。选定了所有帧的直方图复选框。使用该设置，可以在所有帧中看到比例图像的差异。

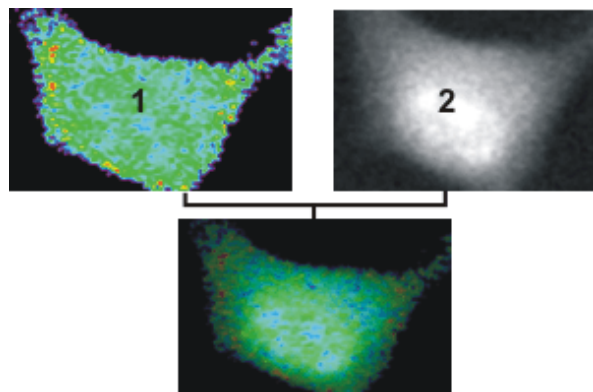
同时查看比例图像和源图像

1. 在图像窗口中显示所有图像层。在层工具窗口中的每一图像层旁，您都能看到一个眼睛图标。
2. 在层工具窗口中选定比例图像，然后单击鼠标右键可打开上下文菜单。
3. 然后从上下文菜单中选定模式 > 亮度调制命令。如果已设置该模式，则保留它。
 - 比例图像中的颜色会保持不变，且其颜色值反映了其比例值。
 - 比例图像的亮度调整为源图像的亮度。在源图像中亮度较低的位置，比例图像也较暗。

显示色彩通道

4. 使用视图 > 彩色条命令或 [Shift + F6] 键盘快捷键可在图像窗口中显示或隐藏带有默认调色板的彩色条。

- 该彩色条显示比例图像中的比例值分布。高比例值显示为红色，低比例值显示为品红色。您可在在线帮助中找到有关彩色条的更多信息。



图像 **(1)** 仅为比例图像。颜色均为同样明亮。图像 **(2)** 为源图像。本软件还未对其应用色彩映射。

在底部的图像中，比例图像中的亮度对应于源图像中的亮度。可以看出，在向细胞边缘移动时，亮度下降很明显。

00245

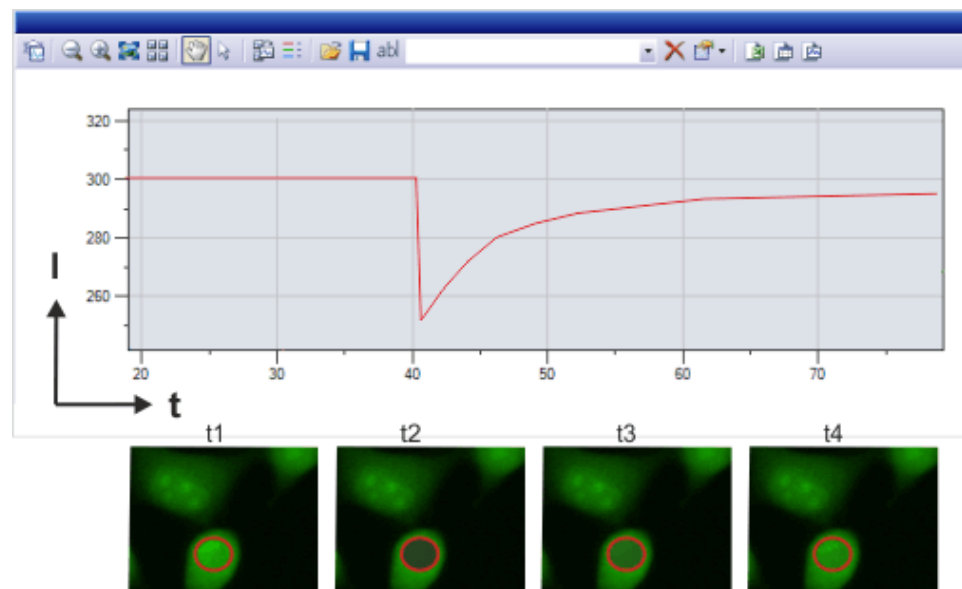
10.7. FRAP

10.7.1. 总览

本软件可用于执行 **FRAP** 实验。**FRAP** 实验涉及时间栈的采集。在采集过程中，需要用激光为一个或多个图像片段照明。随后可以对采集的时间栈执行 **FRAP** 分析。

什么是 FRAP?

FRAP (光脱色荧光恢复) 是荧光显微镜中的一种检查模式。它会检查使用荧光染料染色的分子。**FRAP** 实验期间，会随时间测量样品上特定位置的亮度剖面。实验期间，会使用激光将样品上的这些位置照明。激光会摧毁荧光分子。这会使样品局部褪色（光褪色）。会检查样品上褪色位置中荧光亮度的恢复。恢复的原因可能是邻近的样品区域的分子扩散，或者新蛋白质的产生。



底部的图像显示了时间栈中已在其上定义了圆形感兴趣区 (ROI) 的多个帧。上图显示了感兴趣区内的亮度剖面。

在时间点 **t2**，红色感兴趣区内的区域被激光照明。感兴趣区内的亮度会突然下降。随着时间栈的进行，感兴趣区内的亮度会再次增加。例如，这可能由于扩散过程导致。

请注意: 利用 Olympus FRAP 系统，还能进行要求激光精确照射到样品上的其它实验。

FRAP 的先决条件

先决条件: 只有在随本软件一起购买了 [Photo Manipulation](#) 解决方案后，**FRAP** 功能才可用。

硬件要求 对于 FRAP 方法，需要具有特殊硬件的荧光显微镜：

- 一台或多台用于使样品褪色的 FRAP 激光器。如果要使用多台激光器，则需要用到激光组合器。
- FRAP 激光扫描系统。FRAP 激光扫描系统具有用于控制扫描系统和 FRAP 激光快门的控制盒。
该 FRAP 激光扫描系统可以安装在 Olympus IX3 显微镜 (如 IX73 P2F) 的光路中。FRAP 激光扫描系统允许 FRAP 激光照射到样品上的特定位置。
- Olympus RTC (实时控制器) 本软件使用 RTC 来控制 FRAP 激光、激光扫描系统和图像采集。

软件要求 在安装本软件期间必须选择所有 FRAP 设备。

如果您想要采集多通道荧光图像，那么在定义实验之前，定义色彩通道的观测模式就很有意义。仅在定义了观测模式后，才能在 (例如) 采集荧光图像时将荧光色彩分配至各个色彩通道。

FRAP 实验的常规过程

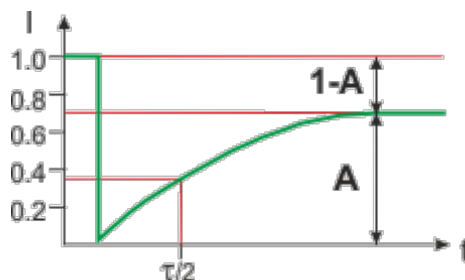
以下流程图显示了执行 FRAP 实验所需的步骤。



FRAP 分析

FRAP 分析可对 FRAP 实验的亮度剖面进行归一化和评估。

在通过 FRAP 激光对样品褪色后，荧光亮度将恢复。但亮度会低于褪色前。这可能是由 FRAP 激光对分子造成不可逆的损伤而引起的。此流程的特征值可以从亮度剖面中确认。



图中显示了亮度剖线和特征值。

静态比 ($1-A$)、动态比 (A) 和 $\tau/2$ 。

A 值为动态比，是样品褪色后重新获得的最大相对亮度值。

$1-A$ 值为静态比，是褪色前荧光亮度值和褪色后最大亮度值之差。

$\tau/2$ 值是荧光亮度上升到褪色后最大值的一半的间隔时间。

00555

10.7.2. 执行 FRAP 实验

定义硬件配置

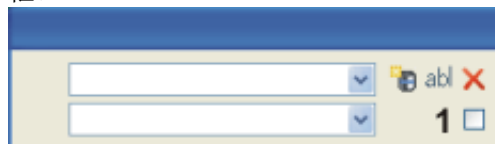
先决条件

- 对于 FRAP 实验，需要一台或多台 FRAP 激光器、FRAP 激光扫描系统、Olympus RTC (实时控制器) 和摄像头。在安装本软件期间必须选择所有设备。
- 软件和所有可控制设备已安装并已连接到计算机和 RTC。
- MS-Windows 中已安装摄像头驱动程序。
- 已配置与 RTC 的网络连接。
- 所有设备已打开。

注册设备

使用 [设备列表](#) 对话框可注册使用本软件的所有 FRAP 设备。

- 使用 [采集 > 设备 > 设备列表...](#) 命令。
- 在 [设备列表](#) 对话框中，选中 **RTC** 复选框。复选框 **(1)** 位于右侧 **显微镜镜体** 列表旁。只有在安装本软件期间选择了 RTC 的情况下，才会显示该复选框。



选定摄像头

- 激活 [摄像](#) 选项卡。
- 从其中一个 [摄像头](#) 列表选择摄像头及其端口。

选择 FRAP 激光扫描系统

- 激活 [显微镜](#) 选项卡。
 - 对于 IX3 系列显微镜，可以选择在第一个或第二个卡座中安装 FRAP 激光扫描系统。从 [层面 1 \(上部\)](#) 或 [层面 2 \(下部\)](#) 列表选择 [IX3 FRAP](#) 选项。

- | | |
|------------|--|
| 选定 FRAP 激光 | 6. 激活 激光/LED 选项卡。
7. 在 设备 列表中选定 FRAP 激光 选项。如果使用多台 FRAP 激光器，则选择 FRAP 组合器 选项。
8. 从 类型 列表中选择要用于 FRAP 实验的激光。只能使用已连接至 RTC 的激光。所有这些激光均以 RTC 激光 开始。 <ul style="list-style-type: none"> • 会为 FRAP 激光自动选中快门和亮度复选框。 |
| 关闭设备列表 | 9. 单击 确定 按钮以确认输入的硬件配置。 <ul style="list-style-type: none"> • 设备列表对话框随即关闭。 • 会自动保存更改后的硬件配置。 |

执行校准流程

对每台 FRAP 激光器执行 **IX3 FRAP 校准**校准流程。校准可以确保 FRAP 激光可以在样品上精确定位。

先决条件。对于 FRAP 校准流程，需要具有均匀荧光区域的特殊校准样品。Olympus 随 **Photo Manipulation** 软件解决方案一起提供这些校准样品中的一种。

- | | |
|----------|---|
| 准备软件用户界面 | 1. 选择允许在实时图像中查看 FRAP 激光的观测模式。
2. 选择之后要用于 FRAP 实验的物镜。 <ul style="list-style-type: none"> • 如果搭配显微镜使用倍率变换器，则在此处选择物镜和倍率变换器设置的组合。 3. 使用 视图 > 工具窗口 > 摄像控制 命令可显示摄像控制工具窗口。可以在此处切换到实时图像并优化曝光时间。
4. 使用 视图 > 工具窗口 > FRAP 控制 命令可显示 FRAP 控制 工具窗口。需要使用工具窗口来控制 FRAP 激光。
5. 隐藏图像窗口中可能会覆盖图像部分的信息，例如标尺和信息印记。为此，请使用 视图 菜单中的相关命令。
6. 使用 视图 > 工具窗口 > 调节显示 命令可显示 调节显示 工具窗口。在 调节显示 工具窗口中，选择 自动适配 选项。在 自动适配 > 右 字段中，输入值 0。 <ul style="list-style-type: none"> • 该设置可防止图像中的激光亮光斑总是曝光过度。 |
| 准备实时图像 | 7. 将 FRAP 校准样品放在样品台上。
8. 切换至实时模式。
如果激光光斑难以看到，则更改 FRAP 激光的聚焦或亮度。 |
| 启动校准流程 | 9. 使用 采集 > 校准... 命令。
选择 校准 对话框中的 IX3 FRAP 校准 校准流程。
单击 校准... 按钮以打开软件向导。 <ul style="list-style-type: none"> • 本软件随即将自动切换到实时模式。 • 在校准对话框中，会列出在设备设置中当前输入的所有物镜。如果搭配显微镜使用倍率变换器，则也会显示其设置。 10. 选中要用于 FRAP 实验的物镜旁的复选框。 <ul style="list-style-type: none"> • 您可以在手动或自动校准之间进行选择。这些操作步骤中说明了手动校准。 11. 选中 手动校准 复选框。使用 校准点 字段中建议的数字。
12. 单击 下一步 > 按钮。 |

- 如果使用多台 FRAP 激光: 校准对话框中列出了所有的 FRAP 激光器。
- 13. 选定要用于 FRAP 实验的 FRAP 激光器旁的复选框。
- 14. 单击 [下一步 >](#) 按钮。
 - FRAP 激光现在应在实时图像中显示为亮光斑。
 - 如果 FRAP 激光在实时图像中不可见, 则单击[使激光光斑居中](#)按钮。您可以在 [FRAP 控制](#) 工具窗口的工具栏中找到该按钮。
 - 如果 FRAP 激光在实时图像中仍然不可见, 可能是由于摄像头的视场太大。在这种情况下, 请取消校准流程。在[摄像控制](#)工具窗口中降低摄像头图像区域的大小。选择中央区域。可在在线帮助中找到更多信息。
 - 校准分为两步。首先, 使用三个点定义坐标系。为接下来的精细校准指定一个网格, 该网格由 4、16、36 或 64 个点组成。
- 15. 单击[启动校准](#)按钮启动粗略校准。
 - 现在实时图像中会显示十字准线。
- 16. 在实时图像中的激光光斑的中心单击一次。
如果激光光斑非常小, 则转动鼠标滚轮以放大图像窗口中的实时图像。
 - 激光现在会将当前 XY 位置与 FRAP 激光扫描系统的当前设置链接起来。
 - 激光会被自动引导至总共三个点中的第二个点。
 - 如果激光光斑现在在图像中不再可见, 则单击[轮廓移动激光光斑](#)按钮。
- 17. 单击第二个激光光斑, 然后单击第三个激光光斑。
 - 粗略校准现已完成。
- 18. 会自动开始精细校准。为此, 本软件会按顺序将 FRAP 激光定位在网格中的所有点上。在实时图像中, 每次单击激光光斑的中心。
 - 校准完成时, 会自动返回[校准](#)对话框。
- 19. 关闭[校准](#)对话框。
 - 可使用 [FRAP 控制](#) 工具窗口来控制 FRAP 激光扫描系统以及为样品的特定区域照明。

使用 FRAP 激光曝光图像片段

任务

在参照图像上, 定义要使用激光照明的一个或多个图像片段。使用 [FRAP 控制](#) 工具窗口测试 FRAP 激光的照明情况。

采集参照图像

1. 采集要使用 FRAP 激光褪色的样品的图像。
 - 例如, 所采集图像的名称可以为 [Image_01](#), 并用作参照图像。

定义感兴趣区 (ROI)

2. 使用[视图 > 工具栏 > 生命科学应用](#)命令来显示[生命科学应用](#)工具栏。您可以在该工具栏上找到定义感兴趣区和测量亮度剖线的功能。

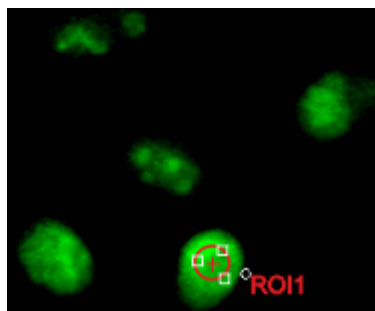


3. 在[生命科学应用](#)工具栏中单击[新建感兴趣区 - 三点圆](#)按钮。

4. 单击鼠标左键在图像上定义圆形感兴趣区。

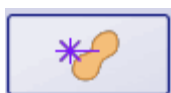
5. 必要时, 在图像上定义更多感兴趣区。

- 现在可以使用 FRAP 激光照明感兴趣区中的区域, 从而使荧光色素褪色。

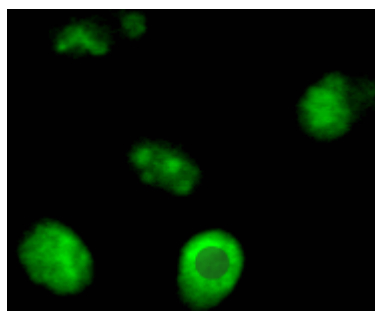


在参照图像上定义了圆形感兴趣区。

进行使用 FRAP 激光照明的设置



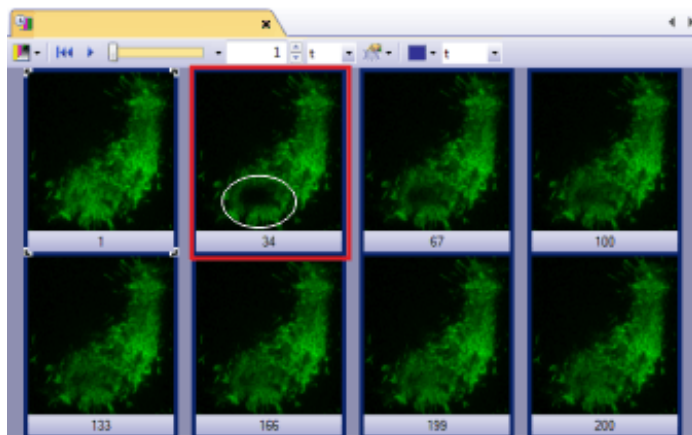
6. 如果使用多台 FRAP 激光: 在 **FRAP 控制** 工具窗口中, 选定要为样品照明的 FRAP 激光。指定激光的亮度。
7. 在 **FRAP 控制** 工具窗口中单击 **FRAP** 按钮。
 - 在 **FRAP 控制** 对话框底部, 现在会显示褪色组。
8. 在褪色组中进行如下设置:
从参照图像列表中选择刚采集的参照图像的名称, 如 **Image_01**。
选定**全选**复选框, 考虑所选参照图像上的所有感兴趣区。
从褪色模式列表中选择**感兴趣区**选项。
9. 选中**连续**复选框。可以在 **FRAP 控制** 工具窗口中的**开始**按钮下直接找到该复选框。
10. 单击 **FRAP 控制** 工具窗口的工具栏中的**实时观察**按钮可观察实时图像中样品的褪色。
11. 单击**开始**按钮。
 - 实际照明开始之前, 所有必需数据均会传输至连接的 **FRAP** 设备。该流程的进度会在**传输状态**字段中由绿色条显示。所有数据均被传输且整个条均为绿色时, 样品的照明即会开始。
 - **FRAP** 激光现在会连续扫描感兴趣区中的区域。
12. 单击**停止**按钮可中止使用 **FRAP** 激光对样品的照明。
13. 在样品的褪色位置采集一幅图像。为此, 可以使用**采集 > 拍照**命令。



使用 **FRAP** 激光对所定义感兴趣区中的样品区域进行照明后, 该区域会褪色。该区域在荧光图像中的亮起程度会显著降低。

10.7.3. 执行 FRAP 分析

任务 您已执行了 FRAP 实验并采集了多通道时间栈。从 FRAP 激光照明的样品上的位置创建亮度剖面。然后，评估该亮度剖面。



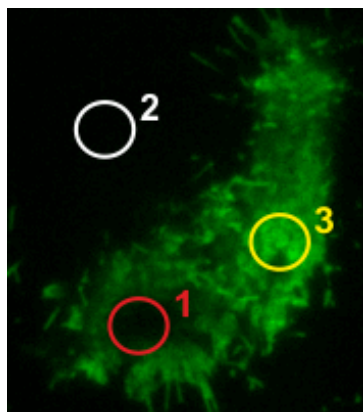
图像显示了多通道时间栈中帧的总览。在采集到图中以红色轮廓标出的帧之前，FRAP 激光会照明样品以白色圈出的区域。荧光的亮度首先降低，然后再次增加。

1. 加载通过 FRAP 实验采集到的多通道时间栈。
2. 使用 [视图 > 工具栏 > 生命科学应用](#) 命令来显示 [生命科学应用](#) 工具栏。您可以在该工具栏上找到定义感兴趣区和比例分析的功能。

定义感兴趣区 (ROI)

1. 在图像窗口中，使用导航栏可显示帧，其中由 FRAP 激光照明的样品区域轻易可见。
2. 在 [生命科学应用](#) 工具栏中单击 [新建感兴趣区 - 三点圆](#) 按钮。
3. 通过单击鼠标三次，定义由 FRAP 激光照明的样品区域中的感兴趣区。
 - 在图像上定义的第一个感兴趣区将自动命名为 [ROI1](#)。
4. 在不含荧光对象的暗图像片段中再定义一个感兴趣区 ([ROI 2](#))。该感兴趣区将用作背景矫正的参照。
5. 在样品上含有荧光但 FRAP 激光未对其照明的位置定义另一个感兴趣区 ([ROI 3](#))。
6. 重命名已定义的感兴趣区。
为此，请打开 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口。在 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口中，双击第一个感兴趣区的名称。为感兴趣区输入一个描述性名称。例如，将感兴趣区命名为 [FRAP](#)、[光褪色](#) 和 [背景](#)。



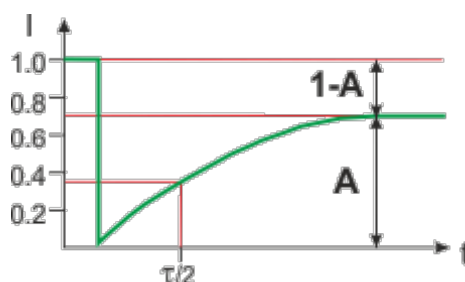


在图像上定义三个感兴趣区。**ROI1** 位于 **FRAP** 激光照明的样品区域中。**ROI2** 位于背景上。**ROI3** 位于未照明的荧光样品区域上。

执行 FRAP 分析



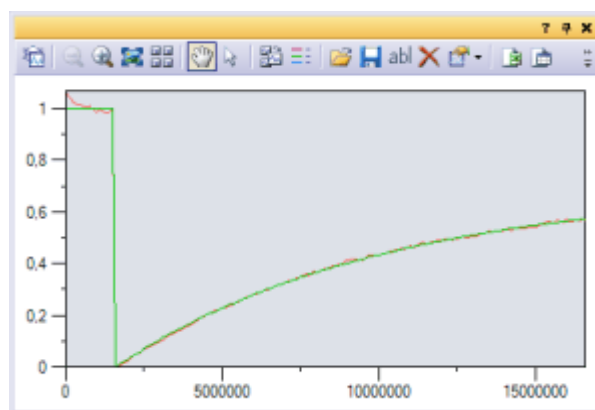
- 单击生命科学应用工具栏上的 **FRAP 分析** 按钮。
 - FRAP 分析** 对话框随即打开。
 - 激发的感兴趣区** 列表中将列出已在当前图像上定义的所有感兴趣区。
- 单击 **默认值** 按钮可将亮度剖面显示的所有设置还原为默认值。
- 在 **通道** 列表选定要执行 **FRAP** 分析的色彩通道。默认选择活动图像的第一个荧光通道。
- 在 **激发的感兴趣区** 列表中，选定包含样品上的褪色位置的感兴趣区旁边的复选框。在该例中，选定 **FRAP** 感兴趣区。
 - 该感兴趣区中的亮度剖面显示在对话框左上角的 **原始数据** 图表中。
- 在 **背景** 组中为背景矫正进行设置。
 - 选定 **感兴趣区** 选项。从列表选定背景的感兴趣区。
- 从 **光褪色矫正** 列表选定位于未照明的荧光样品感兴趣区。
 - 归一化和矫正后的亮度剖面显示在对话框右上角的 **归一化数据** 图表中 (绿色曲线)。



图中显示了亮度剖线和特征值。
静态比 (**1-A**)、动态比 (**A**) 和 $\tau/2$ 。

查看结果

1. 单击[选项...](#)按钮。
 - [选项](#) > [测量](#) > [FRAP](#) 对话框即会打开。
2. 选定[输出选项](#)组中的[亮度剖面](#)复选框。
如果您想将亮度剖面作为一个表格输出，请选定[工作簿](#)复选框。
3. 单击[确定](#)关闭[选项](#)对话框。
4. 在 [FRAP 分析](#)对话框中，单击[执行](#)按钮。
 - 如果之前没有显示[亮度剖面](#)工具窗口，那么现在它会自动显示出来。工具窗口包含两条亮度剖面。绿色曲线是归一化和矫正后的曲线，从中可计算结果。红色曲线是归一化的原始数据。
5. 可以保存亮度剖面。为此，请单击位于[亮度剖面](#)工具窗口工具栏中的[保存亮度剖面](#)按钮。



亮度剖面工具窗口显示 [FRAP](#) 分析结果。

00556

10.8. FRET 分析

10.8.1. 总览

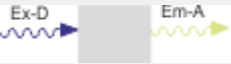
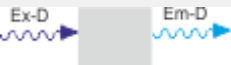
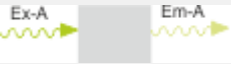
FRET 是什么？

FRET 表示 Förster Resonance Energy Transfer。它测量从激发供体到受体两种不同荧光色素之间的非辐射能量转移。结果为 FRET 指数或 FRET 效率。这两个值将提供有关蛋白质之间相互作用以及距离的信息。荧光颜色的典型示例为用于供体的 CFP 和用于受体的 YFP。

通过本软件执行 FRET 分析的先决条件

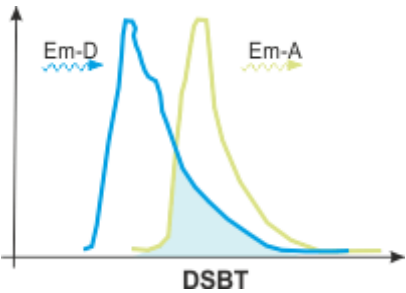
本软件可使用[测量 > FRET 校正...](#)和[测量 > FRET 分析...](#)命令。两个命令都需要可以使用适用于 FRET 校正和 FRET 分析的荧光图像。

对于 FRET 校正和 FRET 分析的荧光图像的采集，必须在荧光显微镜中设置激发和发射过滤器的三种不同组合：

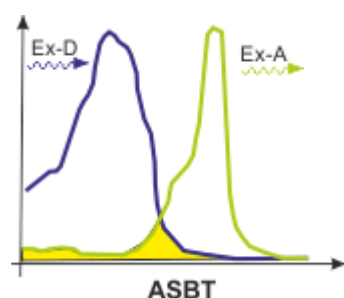
Ffret		通过供体的激发光 (Ex-D) 照亮样本，观察到受体的发射光 (Em-A)。
Fdon		通过供体的激发光 (Ex-D) 照亮样本，观察到供体的发射光 (Em-D)。
Facc		通过受体的激发光 (Ex-A) 照亮样本，观察到供体的发射光 (Em-D)。

FRET 校正

来自供体发射的受体通道 (DSBT) 中的光谱渗透 (SBT) 以及由供体激发 (ASBT) 引起的受体分子激发都在 FRET 信号上叠加。



该插图显示供体和受体的发射光谱。光谱重叠。和 FRET 实验的情况一样，在受体的发射光中观察到包含供体的样本时，观察到的光的亮度一部分来自供体的发射。此发射光并非通过 FRET 效应产生。



该插图显示供体和受体的激发光谱。光谱重叠。通过供体的激发光照亮包含受体的样本时，此光还伴随着激发受体发光的一定可能性。

可使用 **测量 > FRET 校正...** 命令来使用参考图像指定此效应的校正因子。要指定 $DSBT = F_{fret}/F_{don}$ 和 $ASBT = F_{fret}/F_{acc}$ 因子，需要两个仅包含供体的样本的图像和两个仅包含受体的不同样本的图像。



需要两个样本来指定 **DSBT** 和 **ASBT** FRET 校正因子。第一个应仅包含供体，第二个应仅包含受体。该插图显示所需的采集条件。

FRET 分析

对于 FRET 分析，需要通过两种适用荧光颜色染色的样本的荧光图像。在 FRET 实验中，染料承担供体和受体的功能。将激发一种染料，即供体。将观察到另一种染料（即受体）的荧光亮度。

FRET 分析 对话框提供计算 **Ffret**、**Fdon** 和 **Facc** 相对于彼此的源图像的不同方法。这些计算方法引用自以下出版物：

- Xia, Liu.2001.Reliable and Global Measurement of FRET Using Fluorescence Microscopes.Biophys.J. (81), 2395-2402
- M.Elangovan, H.Wallrabe, Y.Chen, R.N.Day, M.Barroso and A.Periasamy.2003.Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy.Methods 29 (2003) 58-73
- Gordon et al.1998.Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements Using Fluorescence Microscopy.Biophys.J. (74), 2702-2713
- Youvan, D. C., W. J. Coleman, C.M. Silva, J. Petersen, E. J. Bylina, and M.M.Yang.1997.Fluorescence imaging microspectrophotometer.(FIMS).Biotechnology et alia.1:1 - 16

FRET 分析显示计算后的图像，其中亮度对应于 FRET 指数或 FRET 效率，具体取决于选定的计算方法。结果图像将被添加到 FRET 图像的附加图像层中。FRET 图像是通过供体的激发光 (Ex-D) 照亮并在受体的发射光 (Em-A) 中观察到的源图像。

00557 03082015

10.8.2. 执行 FRET 分析

您可以在[测量](#)菜单或[生命科学应用](#)工具栏上的按钮中找到 FRET 分析的命令。

指定 FRET 分析的校正因子

任务 您需要通过 CFP 和 YFP 荧光染料执行 FRET 分析。CFP 为供体，YFP 为受体。指定 DSBT 和 ASBT 校正因子。DSBT 为来自供体发射的受体通道中的光谱渗透。ASBT 为供体激发引起的受体分子的激发。

先决条件: 参照样本可用，每个样本仅包含一种荧光染料。在此示例中，需要一个仅包含 CFP 染料的样本和另一个仅包含 YFP 染料的样本。

- 采集参照图像
1. 采集供体样本的两个荧光图像。为此，请使用 **Ffret** 和 **Fdon** 采集条件。为两个荧光图像使用相同的曝光时间。

Ffret		通过供体的激发光 (Ex-D) 照亮样本，观察到受体的发射光 (Em-A)。
Fdon		通过供体的激发光 (Ex-D) 照亮样本，观察到供体的发射光 (Em-D)。

2. 采集受体样本的两个荧光图像。为此，请使用 **Ffret** 和 **Facc** 采集条件。为两个荧光图像使用相同的曝光时间。

Ffret		通过供体的激发光 (Ex-D) 照亮样本，观察到受体的发射光 (Em-A)。
Facc		通过受体的激发光 (Ex-A) 照亮样本，观察到受体的发射光 (Em-A)。

请注意: 根据显微镜配置，您可以采集单个荧光图像或多通道荧光图像。然而，参照图像的图像类型必须为[多通道图像](#)。

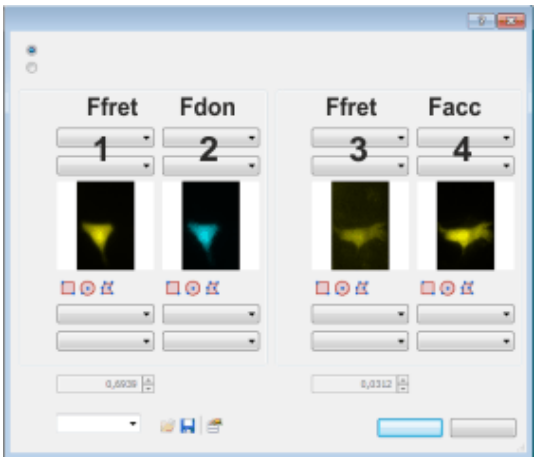
载入参照图像

3. 在软件的文档组中载入参照图像。下表显示示例图像。

1	Ffret		
2	Fdon		
3	Ffret		
4	Facc		

4. 查看参照图像。
- 供体的图像 (1, 2) 不仅在供体的蓝通道 (2) 中显示发射，也在受体的黄通道 (1) 中显示。
 - 蓝通道 (3) 中激发的受体的图像也在受体的黄通道中显示发射。
5. 单击生命科学应用工具栏上的 FRET 校正按钮。
- FRET 校正对话框即会打开。
6. 选定校准选项。
- 输入供体样本和输入受体样本组变为活动状态。
 - 图像列表中列出当前在软件中载入的所有多通道图像。
7. 在图像和通道列表中选择上述参照图像 1-4。
- 如果使用多通道图像作为参数图像，您必须选择图像和色彩通道。

校正光谱渗透



选择相应的参照图像。

执行背景校正



8. 在每个图像上选择两个感兴趣区以进行背景校正。
- 为此，您可以单击图像 (1) 下面的创建矩形感兴趣区按钮。
- 本软件将关闭对话框并自动激活图像窗口中的相应图像。



9. 在不含荧光对象的暗图像片段中定义一个感兴趣区。该感兴趣区将用作背景矫正的参照。
10. 单击右键并选择**确认输入**命令以返回到 **FRET 矫正**对话框。
11. 在具有荧光亮度的图像片段中再定义一个感兴趣区。
12. 从**感兴趣区信号**和**感兴趣区背景**列表中选择相应的感兴趣区。
 - **DSBT a (Ffret/Fdon)** 和 **ASBT b (Ffret/Facc)** 字段中现在将显示确定的矫正因子。



DSBT 和 ASBT 矫正因子显示在 **FRET 矫正**对话框底部。

保存矫正因子



13. 例如，在**名称**字段中输入 **cfp-yfp** 并单击**保存**按钮。
 - 您现在可以随即使用这些矫正因子进行 **FRET** 分析。
14. 关闭 **FRET 矫正**对话框。

执行 FRET 分析

任务

您需要通过 **CFP** 和 **YFP** 荧光染料执行 **FRET** 分析。**CFP** 为供体，**YFP** 为受体。使用 Gordon (1998) 计算方法分析 **FRET** 图像。

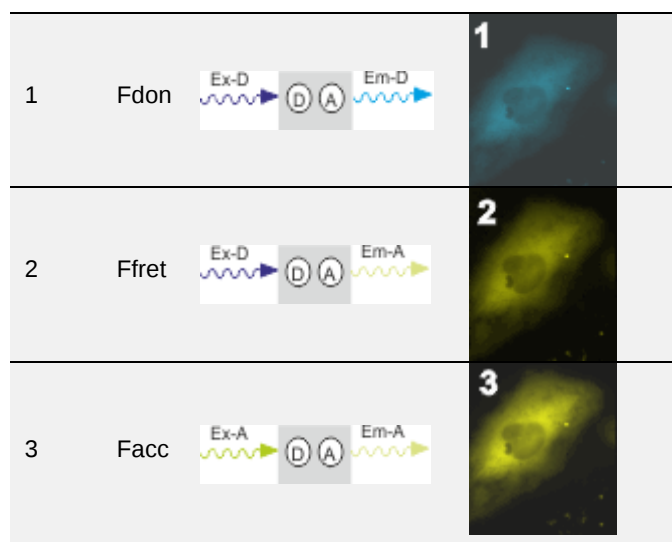
采集 FRET 图像

1. 采集 **FRET** 样本的三个荧光图像，同时包含供体和受体荧光染料。为此，请使用 **Fdon**、**Ffret** 和 **Facc** 采集条件。对所有 **FRET** 图像使用相同的摄像设置，尤其是相同的曝光时间。

Fdon		通过供体的激发光 (Ex-D) 照亮样本，观察到供体的发射光 (Em-D)。
Ffret		通过供体的激发光 (Ex-D) 照亮样本，观察到受体的发射光 (Em-A)。
Facc		通过受体的激发光 (Ex-A) 照亮样本，观察到受体的发射光 (Em-A)。

载入 FRET 图像

2. 在软件的文档组中载入 **FRET** 图像。下表显示示例图像。



3. 查看 FRET 图像。

- 包含供体激发的图像 **(1, 2)** 在蓝通道 **(1)** 中显示供体的发射，在黄通道 **(2)** 中显示由 FRET 效应引起的受体发射。由供体的激发光激发的供体的发射光和受体的荧光也促成了在 FRET 通道 **(2)** 中观察到的亮度。这些部分将从 FRET 通道中观察到的亮度中减除。
- 包含受体激发的图像 **(3)** 在黄通道中显示受体的发射。

定义背景校正的感兴趣区



启动 FRET 分析



4. 在不含荧光对象的暗图像片段中的每个图像上定义一个感兴趣区。为此，在生命科学应用工具栏中单击新建感兴趣区 - 矩形按钮。

5. 完成定义感兴趣区后，在生命科学应用工具栏中再次单击新建感兴趣区 - 矩形按钮。

6. 激活图像窗口中的一个 FRET 图像。

7. 单击生命科学应用工具栏上的 FRET 分析按钮。

- FRET 分析对话框即会打开。

8. FRET 分析对话框提供计算 Ffret、Fdon 和 Facc 相对于彼此的源图像的不同方法。

单击此按钮以打开信息窗口。

- 信息窗口显示 FRET 分析对话框中可用的所有计算方法。

9. 在方法列表中选定 Gordon (1998) 选项。

Gordon (1998):

$$FRET_N = \frac{MicroFRET}{Fdon * Facc * G}, \quad G = \frac{QY_a \phi_a T_f}{QY_d \phi_d T_d}$$

- 计算方法引用自以下出版物:

Gordon et al.1998.Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements Using Fluorescence Microscopy.Biophys.J. (74), 2702-2713

- 图像列表中列出可通过当前图像计算的所有已载入图像。

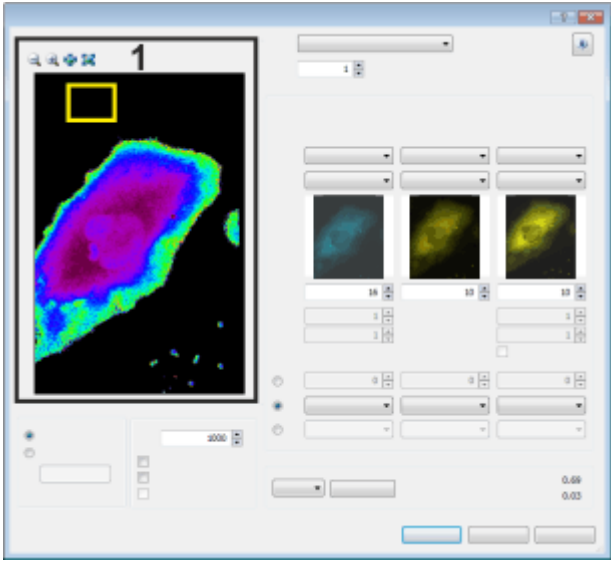
10. 为在矫正 G 字段中使用的采集条件和荧光色素输入 Gordon 矫正因子。如果不知道 Gordon 矫正因子，请输入 1。

11. 在图像和通道列表中选择上述参照图像 1-3。



选择相应的 FRET 图像。

12. 选定背景 > 感兴趣区选项。选择之前在每个列表中图像的背景上定义的感兴趣区。
13. 为 DBST/ASBT 校正因子列表中的参照样本选择在上一次操作步骤说明中指定的校正因子。在此示例中，该条目为 [cfy-yfp](#)。
- DSBT (Fdon) 和 ASBT (Facc) 字段中现在将显示载入的校正因子。
 - FRET 分析对话框中的预览图像现在将显示通过 Gordon 方法生成的 FRET 图像。
 - 通过 Gordon 方法生成的 FRET 图像是灰度图像，其自动具有在预览窗口中应用在其上的预定义伪色彩查对表。根据该伪色彩查对表，高值显示为红色，低比例值显示为品红色。



预览图像 (1) 将生成的 FRET 图像显示为伪彩色图像。用于背景校正的感兴趣区在预览图像中显示。如有必要，请使用预览图像上方的按钮来更改预览图像的缩放比例。

14. 如果生成的 FRET 图像的背景中显示高亮度的单个像素，则此为图像噪声。增大阈值字段中的值，直到图像噪声消失。
15. 单击确定关闭 FRET 分析对话框。
- 生成的 FRET 图像将被添加到 FRET 图像的图像层中。这意味着生成的图像将是多层图像。

查看生成的 FRET 图像



此处显示的结果图像为包含两个图像层的多层图像：通过 **Gordon** 方法生成的 **FRET 图像 (1)** 和 **FRET 源图像 (2)**。示例中显示的两个图像层都是多通道时间栈。

请注意: 如果 **FRET** 分析失败，则不会显示除源图像外的任何图像。在这种情况下，您将在图像窗口中看到源图像。重新打开 **FRET 分析** 对话框，并检查已经设置的参数。

00558

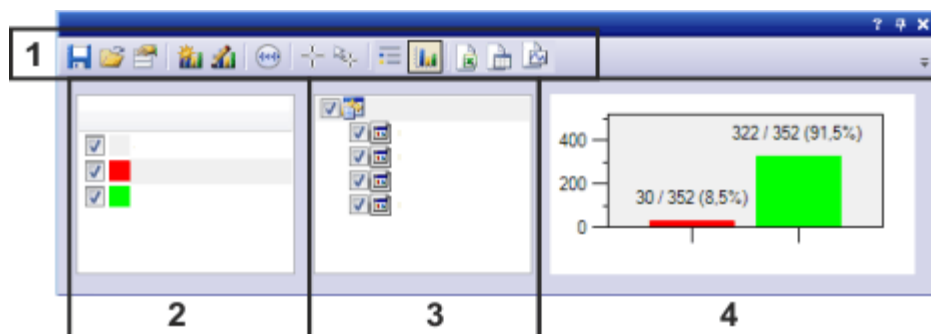
11. 测量图像

11.1. 工具窗口 - 对象计数

使用[对象计数](#)工具窗口可手动为图像上的对象计数。为此，只需单击图像上的对象即可。可以定义不同对象类别，并且可以直接在计数过程中为对象分配所需类别。

使用[视图 > 工具窗口 > 对象计数](#)命令可显示该工具窗口。

该工具窗口的结构



- (1) 工具窗口的工具栏
- (2) 定义、选择和编辑对象类别
- (3) 选择图像
- (4) 查看结果

工具窗口中的工具栏



	保存、载入和管理类别定义	可以将对象的类别定义保存至参数集。随后，在下次希望为对象计数时，只需载入对象类别并再次使用它们。 您可在在线帮助中找到有关如何使用参数集的更多信息。
	创建类别	单击此按钮可创建新类别。
	编辑类别	单击该按钮可更改活动类别定义。
	显示或隐藏数字标线	单击此按钮可在图像窗口中显示数字标线。
	对象计数	单击此按钮可为对象计数
	编辑对象	单击此按钮可矫正测量。
	在不同结果视图之间切换	结果显示在 对象计数 工具窗口中。在柱状图和列表视图之间进行选择。单击相应按钮可设置所需显示。
	导出结果	可以将结果导出至 MS-Excel 文件、工作簿或图表。

对象计数



1. 载入您想要在其上为对象计数的图像，或采集一幅图像。也可在实时模式下为对象计数。
2. 在对象计数工具窗口中选择一个对象类别，或定义一个对象类别。
3. 单击对象计数按钮可为对象计数。
 - 为对象计数时，您将处于特殊测量模式。按钮显示为已点击状态，从而告知您哪个测量模式处于活动状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。
4. 在测量模式中，单击活动图像中要为其计数的对象。
 - 已计数的所有对象均会自动分配至活动对象类别。

请注意: 在测量模式中，只能为对象计数。在该模式中，本软件的大多数其它功能都不可用。

要结束测量模式，请释放对象计数按钮。在定义新类别或激活其他图像时，测量模式会自动结束。

编辑对象



在图像上，已计数的对象会显示为带有标记。例如，在计数期间单击了错误的对象时，可以删除或切换现有标记。

导出结果

可以将结果导出至 MS-Excel 文件、工作簿或图表。

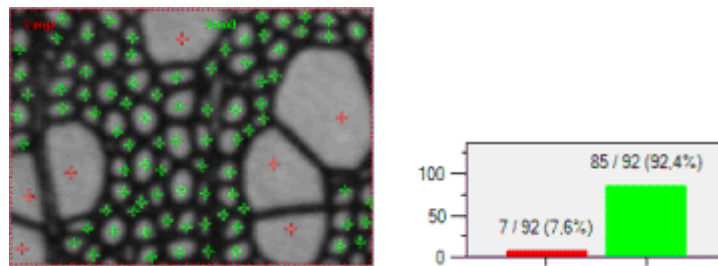
定义、选择和编辑对象类别

使用对象计数工具窗口中的类别区域可定义、选择和编辑对象类别。

什么是对象类别？

在计数时，可以为对象分配所需类别。例如，如果要为图像上的小对象和大对象计数，则定义两个类别。

请注意: 定义的所有类别仅对于图像窗口中当前处于活动状态的图像有效。如果要为多个图像使用类别，则保存类别定义，然后为下一个图像重新载入它。



在所示图像中，已为小对象和大对象计数。为小对象定义了绿色类别。为大对象定义了红色类别。柱状图显示了结果。为图像上的 7 个大对象和 85 个小对象进行了计数。所有已计数对象中的 92% 为小对象。

定义对象类别

通过名称和颜色来定义一个类别。属于相同类别的所有对象均会以自己的类别颜色在图像中和柱状图中显示。对象名称用于柱状图中的标签，以及结果表格。类别名称也会显示在图像中。

有多种方法可用于定义类别。



- 在对象计数工具窗口的工具栏中，单击创建类别按钮。
- 单击类别区域中的 <输入类别名称> 选项。
- 右键单击工具窗口的类别区域。从上下文菜单中选定创建类别命令。
- 采用其他图像的类别定义。为此，请在对象计数工具窗口中的对象计数文档组中选择包含所需类别定义的图像。然后选择将类别定义复制至活动文档上下文菜单。

选择图像

使用对象计数工具窗口的中间部分，可管理已对其上的对象进行计数的图像。

所有已测量图像的列表

已对其上的对象进行计数的所有图像均在对象计数工具窗口的为文档计数选项下列出。活动图像在列表中以粗体显示。

显示和隐藏结果

选中图像名称旁的复选框，可在工具窗口右侧的结果视图中显示结果。

清除图像名称旁的复选框，可在结果视图中隐藏相应结果。

选中最上方为文档计数选项旁的复选框，可一次性显示所有图像的结果。清除该复选框可一次性隐藏所有结果。

为对象计数时，会累加所有已选择图像的结果。

在多个图像上使用相同对象类别时，会累加属于该对象类别的所有对象。使用不同对象类别时，结果视图会显示已定义的所有对象类别。

请注意: 在位于工具窗口左侧的类别区域中，只能看到已为活动图像定义类别。在工具窗口右侧的结果视图中，会显示已在所选图像上定义的所有类别。



在所示例中，对 4 幅图像上的对象进行了计数。在左侧，仅考虑图像 (1) 和 (4) 的结果。在右侧，考虑所有图像的结果。可以看到，在图像 (2) 和 (3) 上对额外对象类别进行了计数。

查看结果

结果显示在对象计数工具窗口中。在柱状图和列表之间进行选择。

显示哪些结果?

结果会显示各对象类别的已计数对象数量。另外，列表视图还会显示总共为多少个对象进行了计数。

在计算测量结果时，会考虑工具窗口树状视图中选择的所有图像。

12250

11.2. 使用交互式测量功能

本软件提供了大量测量功能。它们使您能够快速对对象进行计数并测量片段和区域。所有结果都会随图像一起保存，并且可将这些结果以表格形式输出。

先决条件

为了进行测量，正确校准的图像是基本的先决条件。

如果您已经指定要使用哪个物镜，那么您使用软件所采集的图像将会自动获得正确校准。如果系统具有电动物镜转盘或物镜转盘的编码器，在采集图像之前，会自动读出正确的放大倍率。

如果图像尚未得到校准，请使用 [图像 > 校准图像...](#) 命令来执行校准。

本软件中的额外测量功能

除了交互测量功能外，本软件还提供更多测量功能。

生命科学应用	生命科学应用 工具栏提供对图像的多种评估方式。
剖面	使用 剖面 工具窗口可在图像上测量沿某直线的亮度剖面。
对象计数	使用 对象计数 工具窗口可手动为图像上的对象计数。
自动图像分析	可使用本软件探测和分析图像中的对象。
对象跟踪	您可使用软件跟踪和分析对象运动 (例如格运动)。

选定测量环境

利用工具窗口进行测量

如果要测量图像，则切换到 [计测](#) 布局。您将在该布局的底部找到 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口。在该工具窗口中，您可以快速访问会影响测量的所有测量功能和设置。该工具窗口同时也是测量视图，它包含已在活动图像上测量到的所有数值。

请注意: 如果在用户界面的右下方，多个工具窗口彼此重叠，则通过单击  [测量和感兴趣区](#) 选项卡的标题来激活 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口。可以在工具窗口下方找到该选项卡。

启动测量

通过选定所需测量功能开始测量。您可以在 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口中、[测量和感兴趣区](#) 工具栏上或 [测量](#) 菜单中找到各种测量功能。

在测量模式下工作

单击测量功能后，本软件会立即自动切换到测量模式。在测量模式中，您的鼠标指针在图像上呈十字形状。一个用来表明选定的测量功能的小图标会附加到鼠标指针的右下方。

您可使用已选定的测量功能在活动图像上执行任意所需次数的测量。连续测量模式对于所有已载入的图像都有效。因此，在该模式下您可以轻松地连续测量许多幅图像。

所选测量功能的按钮将保持已点击状态，本软件从而通过这种方式向您显示当前的测量功能。您可通过按钮的背景颜色识别这种状态。

结束测量模式

可以明确关闭测量模式。为此，请再次单击活动的测量功能的按钮。



当您切换到另一鼠标指针模式时，将会自动关闭该测量模式。例如，单击 [选定测量对象](#) 按钮，切换到选择模式。您可以在 [测量](#) 工具窗口，[ROI](#) 工具窗口或工具栏上找到该按钮。在该鼠标指针模式下，您可以选定并编辑测量对象。

更改默认测量模式

上述连续测量模式为预设的默认值。您可以更改该默认设置。为此，请使用 [工具 > 选项...](#) 命令。从树状视图中选定 [测量和感兴趣区 > 常规选项](#)。选中 [创建测量对象后切换到“选定测量对象”模式](#) 复选框。随后，在您完成测量时您将重新自动离开测量模式。这意味着，每次开始交互测量前您都必须重新选定测量功能。

显示和保存测量结果

测量结果会直接显示在图像上以及 [测量](#) 工具窗口和 [ROI](#) 工具窗口中。如果该工具窗口没有显示，请使用 [视图 > 工具窗口 > 测量和感兴趣区](#) 命令来显示该工具窗口。

保存测量结果

如果以 [TIF](#) 或 [VSI](#) 文件格式保存图像，则测量结果将随图像一起保存。不过，也可以将测量结果导出到结果表格中，并将该表格以文件形式保存。

在图像中显示和隐藏测量结果

测量结果会显示在图像上的特殊数据层中，即测量层。在荧幕画面上图像和测量层一起显示。不过，如果使用 [TIF](#) 或 [VSI](#) 图像文件格式，则每幅图像的数据都将被单独存储。请试着将测量层想象为一个位于图像上的透明层。当您测量图像时，图像数据不会因为测量结果显示在它上面而发生变化。

您可以随时隐藏或显示测量层。

为此，请使用 [层](#) 工具窗口。在该工具窗口中，您可以访问所有的图像层。眼睛图标  用于标识当前显示在显示屏上的所有层。

单击 [测量和感兴趣区](#) 层前的眼睛图标可隐藏测量。单击没有眼睛图标的空白格，可重新显示对应层。

编辑测量

您可以随时对现有测量对象进行编辑。[测量](#) 工具窗口和 [ROI](#) 工具窗口中的测量数值随后将进行相应地更新。

请注意: 当您载入含有测量对象的图像文件时，只有该图像文件是以 [TIF](#) 或 [VSI](#) 图像文件格式保存时，才可对测量对象进行编辑。

选定测量对象



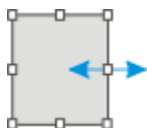
必须首先选定测量对象，然后才能进行编辑。为此，请单击 [选定测量对象](#) 按钮，然后选定测量对象。您可以在 [测量](#) 工具窗口，[ROI](#) 工具窗口或工具栏上找到该按钮。

如果图像非常大，并且定义了很多测量对象，则可能难以在图像中找到特定测量对象。在这种情况下，在 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口中选择要搜索的测量对象。单击鼠标右键，并在上下文菜单中选择 [导航至测量对象](#) 命令。查找的测量对象随后会显示在图像窗口中。

更改测量对象的位置和大小

您可以通过在按住鼠标左键的同时移动整个测量对象。

您也可以更改测量对象的大小。将指针移动到标记上。通过在按住鼠标键的同时拖动该标记，您就可以根据需要调整方框的大小。



通过移动手柄来更改测量对象。

删除测量对象

单击键盘上的 [\[Del\]](#) 键以删除已选定的测量对象。您可以在图像中，也可以在 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口的表格中选定您想要删除的测量对象。

更改各个测量对象的颜色、字体和线条宽度

您可以随时更改各个测量对象的颜色、字体和线条宽度。为此，请从图像中选定一个或多个测量对象，然后单击鼠标右键以打开上下文菜单。在上下文菜单中，您将找到下列命令。可以使用它们来更改所选测量对象的外观。

- 自动重新上色
- 改变颜色
- 辅助线
- 设置线条宽度
- 调节位置
- 更改字体

在动态模式下测量

所有测量功能也都可用于实时图像。因此您可以 (例如) 在实时图像中快速测量片段。如果通过 [采集 > 拍照](#) 命令结束实时模式，您在实时图像中进行的测量将应用于采集的图像。

在不同图像类型和文档类型上测量

图像序列上的测量



您可将一系列单幅图像组合为一副图像。例如，结果会形成时间栈，此时间栈中的所有帧都将在不同时间采集。

您可以在每幅单幅图像上进行测量。在显示屏上显示所需帧。为此，请使用图像窗口中的导航栏。然后在该帧上执行测量。测量会永久性地链接到该帧上，换句话说，只有该测量所对应的帧显示在显示屏上时，该测量才会也显示在显示屏上。

测量结果将显示在 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口中。您可以将每个测量所针对的帧的编号分派给该测量。例如，对于时间栈，可以使用 [索引 \(t\)](#) 测量参数来执行该操作。

多通道图像上的测量



多通道图像由单独的荧光图像组成。对于多通道图像，您可以选择单独地在每个荧光图像上测量，或者同时为所有色彩通道定义一个测量对象。

清除 [工具 > 选项 > 测量和感兴趣区 > 常规 > 测量所有通道](#) 复选框。

现在，您可以单独测量每个荧光图像。为此，请在您的显示屏上设置所需的色彩通道。为此，请使用图像窗口中的导航栏。然后在该图像上执行测量。测量会永久性地链接到该色彩通道上，换句话说，只有该测量所对应的色彩通道显示在显示屏上时，该测量才会也显示在显示屏上。

测量结果将显示在 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口中。您可以将每个测量所针对的色彩通道的名称分派给该测量。为此，请使用 [通道](#) 测量参数。

选定 [工具 > 选项 > 测量和感兴趣区 > 常规 > 测量所有通道](#) 复选框。

现在将在每个色彩通道上测量您定义的每个测量对象。所有测量结果将显示在 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口中。

多层图像上的测量



使用某些功能，例如，使用 [图像 > 组合彩色图像...](#) 功能可以创建多层图像。该多层图像由几个层组成。您可在线帮助中找到有关多层图像的更多信息。

测量始终针对一个图像层。所以，请在显示屏上显示您要测量的图像层。为此，请使用 [层](#) 工具窗口。然后在该图像上执行测量。测量会永久性地链接到该图像层上，换句话说，只有该测量所对应的图像层显示在显示屏上时，该测量才会也显示在显示屏上。

测量结果将显示在 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口中。您可以将每个测量所针对的图像层的名称分派给该测量。为此，请使用“[层](#)”测量参数。

在记波图上测量



使用 [记波器](#) 工具窗口可以创建对象运动的视觉展示。源图像通常为时间栈。结果为记波图。记波图是沿水平和垂直轴进行不同校准的图像。例如，以长度单位校准 X 方向，以时间单位校准 Y 方向。

使用 [记波图折线](#) 测量功能在记波图上进行测量。此测量功能不会得到其他图像类型的任何结果。

在图表上测量



本软件装有自带的图表文档。图表可保存、可编辑并且可测量。例如，使用 [剖线](#) 工具窗口可在图像上测量沿某直线的亮度剖线。在工具窗口中，单击 [导出为图表](#) 按钮可将剖线导出为图表。您可在在线帮助中找到有关 [剖线](#) 工具窗口的更多信息。

当图表在文档组中成为活动状态时，[测量和感兴趣区](#) 工具窗口的外观会立即更改。此后，只有能够用于图表的测量功能才可用。

按钮名称		描述
	水平线	在图表中，测量两个交互测定点之间的水平距离。
	多个水平线段	在图表中，测量参照线和交互测定点之间的水平距离。

00150

11.3. 测量图像

本软件提供了大量测量功能。它们使您能够快速测量图像上的距离和面积。以下操作步骤借助几个示例为您展示这些交互测量功能。

交互测量图像对象

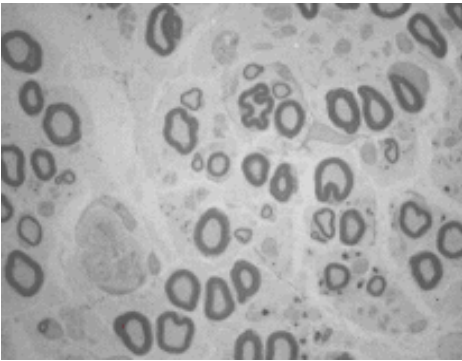
任务

您想测量某些细胞的直径。为此，请载入合适的图像，或采集一幅图像。测量某些细胞的直径。然后编辑测量，并删除已执行的一些测量。将结果输入 [MS-Excel](#) 表格。

- 使用 [视图 > 工具窗口 > 测量和感兴趣区](#) 命令来显示 [测量和感兴趣区](#) 工具窗口。
 - 您可以在用户界面的底端找到该工具窗口。可能位于其他工具窗口下。在这种情况下，单击用户界面底部的 [测量和感兴趣区](#)  选项卡可将该工具窗口放入前景。

载入图像

- 采集或载入图像。



在本软件的安装过程中，同时会安装一些样品图像。当您使用样品图像 [Neurons.tif](#) 时，您可以遵照 [这些操作步骤](#) 来测量图像。

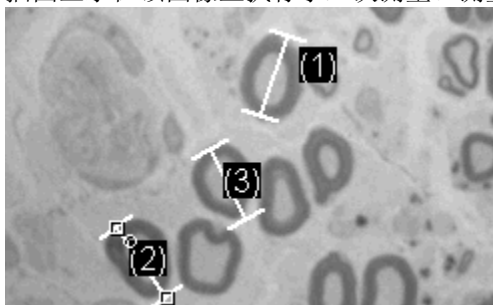
设置标记颜色 将根据默认设置以红色字体并且不使用背景把测量结果写入图像。在某些图像上，可能难以读取它。请更改标记设置。

1. 使用 **工具 > 选项...** 命令。
2. 在树状视图中单击 **测量和感兴趣区 > 测量显示** 选项。
3. 单击 **背景颜色** 字段并选择颜色，例如黑色。
4. 选定 **文字颜色 > 固定颜色** 选项，从调色板中选定一种合适的颜色。如果选定白色，会在黑色背景上以白色显示测量并以白色显示标签。
5. 使用 **确定** 关闭对话框。

测量长度

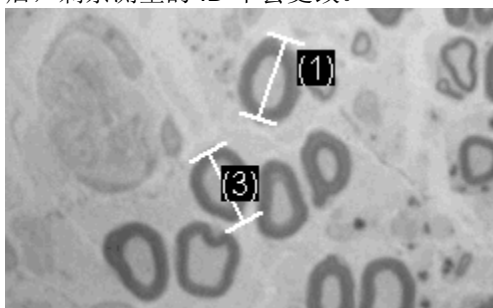


1. 单击位于工具窗口顶部的工具栏上的 **任意线段** 按钮。
2. 使用鼠标左键单击以确定参照距离的起点和终点。
3. 如果已经测量了参照距离，则可立即执行下一个测量。
4. 再次单击 **任意线段** 按钮可结束长度测量。
5. 查看工具窗口和图像中的结果。
 - 插图显示在该图像上执行了三次测量。测量 2 已被选定



删除测量

1. 在 **测量和感兴趣区** 工具窗口中单击其中一个测量结果。
 - 图像中将选定相应的线段。
2. 按下 **[Del]** 键。
 - 图像和工具窗口中的测量都将被删除。
 - 删除某个测量之后，图像和工具窗口中将减少一个测量。删除测量后，剩余测量的 ID 不会更改。



请注意: 测量完成之后，应该关闭测量模式，否则可能会无意中选定测量并使其移动。

3. 查看 **测量和感兴趣区** 工具窗口的工具栏中是否有按钮处于已点击状态。释放该按钮。

将结果导出至 MS-Excel



关闭图像

1. 单击[导出至 Excel](#)按钮。
2. 在输入/输出对话框中设置保存数据的目录，然后输入 MS-Excel 表格的名称。采用 [Excel 表格 \(*.xls\)](#) 文件类型。
3. 单击[保存](#)按钮将测量结果保存在 MS-Excel 表格中。
4. 在文档组中单击图像名右侧带叉号 [x] 的按钮。
 - 由于您添加了交互测量，因而图像已被更改。因此，无论您是否要保存图像，都会收到系统询问。
5. 请以 TIF 或 VSI 文件格式保存图像。测量结果也随之保存在图像文件中。您可随时对它们进行编辑、删除或增加。

输出各种测量参数

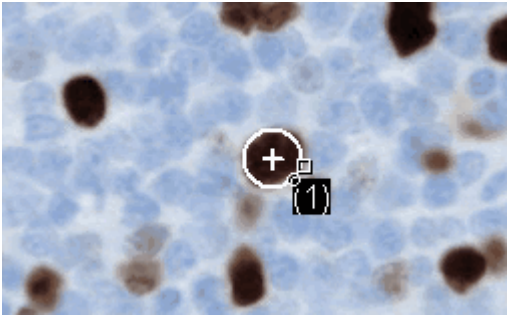
任务

您想测量一些细胞。
将细胞作为圆形对象进行测量。输出各种参数，例如面积、周长以及直径。在图像中显示直径。

测量面积



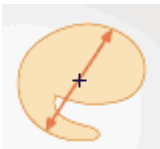
1. 采集或载入一幅图像，如 **BadTissue.tif** 示例图像。
2. 在[测量和感兴趣区](#)工具窗口中，单击[二点圆](#)按钮。
3. 使用鼠标左键单击待测量细胞的中心。
4. 移动鼠标，在该过程中拖出圆。使圆形对象尽可能地匹配该格。按鼠标左键。
5. 再次单击[二点圆](#)按钮，然后关闭测量模式。
6. 查看[测量和感兴趣区](#)工具窗口中的结果。
 - 下图显示了已执行圆测量的图像。



查看测量参数的列表



输出其它测量参数



1. 在[测量和感兴趣区](#)工具窗口中单击[选定测量参数](#)按钮。
 - 在该对话框中，您将看到包含所有可用测量参数的列表。在该对话框底部，您将会看到现在为所有对象计算的测量参数的列表。
 - 您可在在线帮助中找到关于此对话框的详细说明。
2. 转到所有可用参数的列表，然后单击[直径](#)测量参数。
 - 右图显示如何计算该参数。
您可以发现，可采用不同方法来计算二维对象的直径。
3. 单击插图下方列表中的[平均值](#)选项，选定[平均值 \(直径\)](#)测量参数。执行该操作时，将确定所有可能直径的平均值。
4. 单击[添加 “平均值 \(直径\)”](#)按钮。
 - 该测量参数将添加到将要计算的测量参数的列表。所有这些测量参数都将显示在该工具窗口中。

5. 使用确定关闭对话框。
6. 查看测量和感兴趣区工具窗口中的圆直径结果。

输出图像中的测量参数



1. 打开选定测量参数对话框。
2. 在所有已计算测量参数的列表的底部，单击平均值 (直径) 测量参数。
3. 在该列表右侧，有一个带蓝色箭头的按钮。单击该按钮可将测量参数移到列表顶部。
4. 使用确定关闭对话框。
5. 查看图像中圆直径的结果。

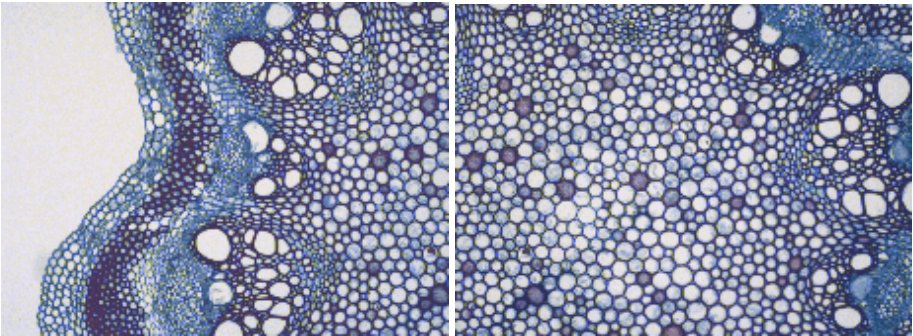
测量多幅图像

任务

您想测量多幅图像中的细胞。为此，采集一些图像并逐个对它们进行测量。使所有图像的结果同步显示。查看所有测量结果的平均值。

载入图像

1. 采集或载入一些图像。

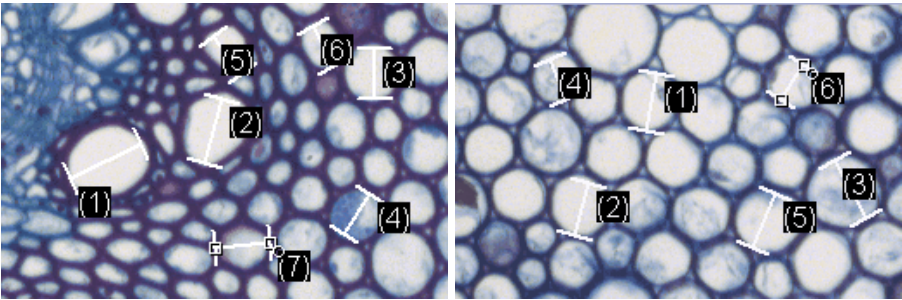


- 在本软件的安装过程中，同时会安装一些样品图像。您可以遵照这些操作步骤使用 Clematis04.tif 和 Clematis05.tif 示例图像。

测量细胞



2. 激活文档组中的第一个图像。
3. 单击位于测量和感兴趣区工具窗口顶部的工具栏上的任意线段按钮。测量多个细胞的直径。
4. 激活下一幅图像。同样测量该图像上多个细胞的直径。
5. 再次单击任意线段按钮结束长度测量。
 - 即对两幅图像上的细胞都进行了测量。



显示所有图像的测量结果



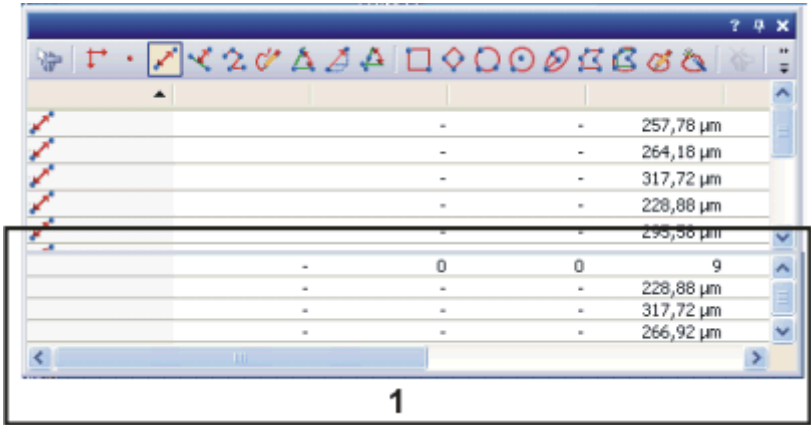
1. 在测量和感兴趣区工具窗口中，单击测量和感兴趣区选项按钮。
2. 从树状视图中选定测量和感兴趣区>结果选项。
3. 清除显示测量对象 > 仅活动图像的测量对象复选框。
4. 使用确定关闭对话框。

- 现在，这两个图像的结果将同时显示在工具窗口中。
- 使用文档测量参数可在结果表格中显示与测量结果关联的图像的名称。现在可以将测量结果明确地匹配至图像，即使所有测量结果都在工具窗口中一并显示。

查看统计参数



1. 在测量和感兴趣区工具窗口中，单击测量和感兴趣区选项按钮。
2. 从树状视图中选定测量和感兴趣区>结果选项。
 - 在统计组中您可找到各种统计参数。
3. 选中平均值复选框。
4. 使用确定关闭对话框。
 - 现在，在测量结果下的测量和感兴趣区工具窗口中，将显示选定的统计参数 (1)。您可以在这里查看所有已测量图像的层厚度平均值。



00154

12. 自动图像分析

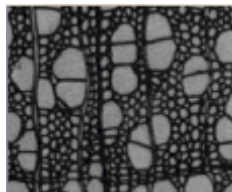
您可以使用自动图像分析来执行许多测量任务。此处描述了一些典型任务及其处理流程。

12.1. 自动检测和测量物体

请注意: 本软件为自动对象分析提供了两个不同软件包。在基本版中, 并非描述的所有功能都可用。可在各操作步骤说明中找到更多信息。

12.1.1. 对象计数

任务 您的一幅图像中含有您感兴趣的对象。您想知道图像中这些对象的数量。



先决条件 您要计数的对象不得相连, 且互相之间必须清楚地分离。前景中的对象应当与图像背景在视觉上清楚地分离。在所示示例图像中, 背景为黑色。对象位于前景中, 并以彩色显示。

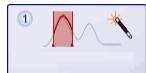
- 准备**
1. 使用 **视图 > 工具窗口 > 计测** 命令打开 **计测** 工具窗口。
 2. 采集或载入图像。
 - 在本软件的安装过程中, 同时会安装一些样品图像。您可以遵照这些操作步骤使用 **WoodVessels.tif** 示例图像。

设置选项



1. 单击 **计测** 工具窗口中的 **计测选项** 按钮可打开 **选项** 对话框。
2. 在树状视图中选定 **计测 > 探测** 选项。
3. 在 **选项** 组中, 在 **最小对象尺寸** 字段中输入值 **5**。对象的大小必须至少为 **5** 像素, 才能被当作对象。通过该操作, 您可以避免将那些颜色或亮度可能与对象相同却不属于对象的单个像素当作对象进行计数, 从而避免导致错误结果。这样, 便可排除噪声和灰尘颗粒。
4. 单击 **确定** 关闭此对话框。

设置阈值



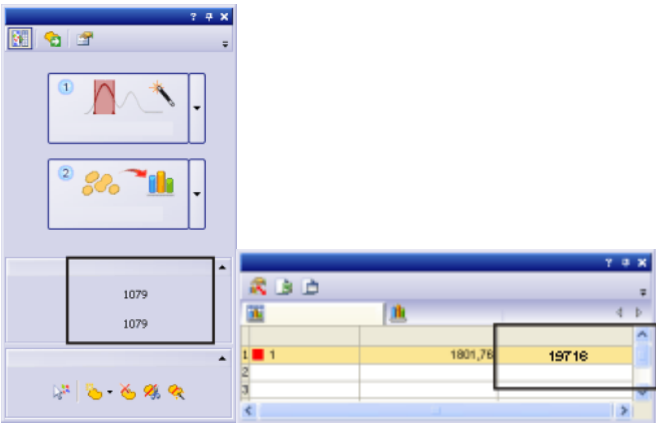
1. 在 **计测** 工具窗口中单击 **自动阈值...** 按钮可打开 **自动阈值** 对话框。
 - 如果 **自动阈值** 按钮尚未激活, 则您必须先将其激活。为此, 请在 **阈值** 按钮的菜单中选定 **自动阈值...** 选项。要打开该菜单, 请单击该按钮旁的小箭头。
 - 阈值是在 **自动阈值** 对话框中自动设置的。
 - 检测到的所有对象都将以彩色显示。
2. 检查这些对象是否已被正确识别。
如果这些对象未被正确识别, 请转到 **背景** 组, 输入背景是明还是暗。
例如, 根据如上所示的图像, 选定 **背景 > 暗** 选项, 因为该图像以暗背景显示明亮的对象。

3. 仅当相组中的删除相按钮激活后，才能：
通过不断单击删除相按钮删除所有相 (仅留下一个)，直到该按钮变为非活动为止。
- 通过该操作，您可以确定没有任何来自先前分析的相保持为已定义。

查看结果

1. 要获取结果，请单击自动阈值对话框中的计测按钮。
- 自动阈值对话框随即关闭。
 - 找到的对象数量显示在计测工具窗口中的对象数组中。
 - 经过分析的对象随后在自己的图像层上以彩色显示。该图像层称为探测到的对象。使用层工具窗口可显示或隐藏这些图像层，或删除它们。

先决条件: 您正在使用计测完整解决方案。在基本版中，以下功能不可用:



检测到的对象的数量将显示在下方，即显示在计测工具窗口的对象数组中。如果您无法看到该数字，请单击黑色小箭头使其可见。如果您选择了对象数测量参数，那么对象的数量还会显示在计测结果工具窗口的结果表格中。

分离对象

先决条件: 您正在使用计测完整解决方案。在基本版中，无法编辑对象。

在一些情况下，彼此靠近的两个对象由于 (就本软件而言) 连接在一起而不能单独探测。可以手动分离这类对象。



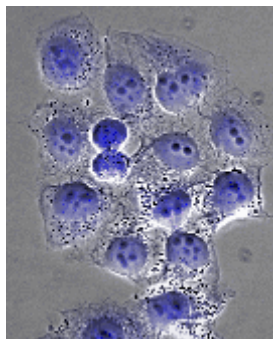
1. 放大图像以便可以更好地处理对象。
2. 然后单击位于编辑对象组中的手动拆分对象按钮，再将鼠标指针移动到图像上。
3. 现在通过单击鼠标左键定义穿过对象的分离线。在执行该操作时，确保在对象的外边缘上拖动该线，否则无法分离它。
4. 右键单击以确认分离线。
 - 对象随后将划分为两个独立对象。结果将会随即更新。



左图: 两个对象彼此接触，因此被当作一个对象。
中图: 连接的对象已被选定。
右图: 连接的对象已分离，现在有两个独立对象。

12.1.2. 属于不同相的对象计数 (设置阈值)

任务 您在一幅图像上定义了两个相。您想知道该图像中每个相有多少个对象。



要在图像中定义两个相。第一个相用于映射蓝色圆形对象内的黑色对象。第二个相用于映射蓝色圆形对象。

先决条件 您要计数的对象不得相连，且互相之间必须清楚地分离。两个相中的对象的亮度值必须不同，以便于通过亮度来区分它们。

设置选项



1. 在**计测**工具窗口中，单击该按钮打开**选项**对话框。
2. 在树状视图中选定**计测 > 探测**选项。
3. 在**选项**组中，在**最小对象尺寸**字段中输入值 **5** 以指定最小对象尺寸。通过该操作，您可以避免将那些可能属于该相却不属于对象的单个像素当作对象进行计数，从而避免导致错误结果。
4. 在树状视图中选定**计测 > 测量**选项。
 - 在基本版中：
在**分类测量**列表中，选定**对象数**和**对象类**选项。
 - 仅对于**计测完整解决方案**：
单击位于**测量**组中的**选定分类测量**按钮。在**选定分类测量...**对话框中，添加**对象数**和**对象类**测量参数，然后关闭对话框。
5. 单击**确定**关闭此对话框。

设置阈值

1. 在**计测**工具窗口中单击**手动阈值...**按钮可打开**手动阈值**对话框。
 - 如果**手动阈值**按钮尚未激活，则您必须先将其激活。为此，请在**阈值**按钮的上下文菜单中选定**手动阈值...**选项。要打开该菜单，请单击该按钮旁的小箭头。
2. 仅当**相**组中的**删除相**按钮激活后，才能：
通过不断单击**删除相**按钮删除所有相 (仅留下一个)，直到该按钮变为非活动为止。
 - 通过该操作，您可以确定没有任何来自先前分析的相保持为已定义。
3. 双击**相名**字段并指定第一个相的名称。单击该字段外的任意位置，或按 **[Enter]** 键以再次离开该字段。
 - **通道的相阈值 “...”** 组中的第一个相将被自动选中。
4. 单击**新建阈值**按钮可为所选相的阈值范围设置初始值。
 - 将鼠标指针移动至该图像上时，指针将变为取色器的形状。
5. 单击一个像素或一个图像区域，其亮度值将被采纳为阈值范围的初始值。
 - 初始值设置完毕之后，鼠标指针将自动变为带加号的取色器图标。

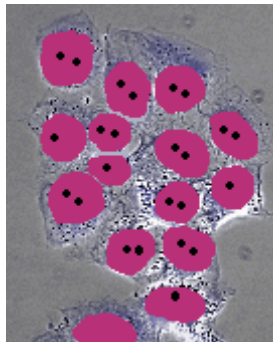


6. 接着，继续单击第一个相中代表性的像素，直到图像中所需的结构成为该相的一部分。
7. 如果选择了过多的像素，单击**缩小阈值**按钮可重新将这些像素排除于该相之外。
 - 阈值范围将持续缩小，直到该范围不再包含您所选择的像素为止。
 - 或者，单击**撤消取色**按钮。
8. 单击**添加相**按钮添加第二个相，然后完全按照第一个相的步骤进行操作。



查看结果

1. 要获取结果，请单击**手动阈值**对话框中的**计测**按钮。
 - **手动阈值**对话框随即关闭。
2. 使用**视图 > 工具窗口 > 计测结果**命令打开**计测结果**工具窗口。



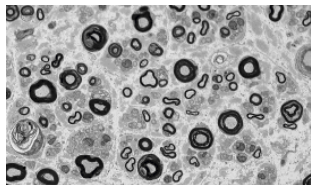
1	1	10644,13	1683
2	2	10053,61	487
3			

在所有相中检测到的对象的总数将显示在下方，即显示在**计测**工具窗口的**对象数组**中。**对象类**和**对象数**测量参数 (即每个相的对象总和) 将显示在结果表格中。此外，您可以通过为这些相指派的色彩来识别它们。您可以将这两个相的结果直接相互比较。

12.1.3. 测量对象 (选择和输出测量参数)

先决条件: 您正在使用[计测完整](#)解决方案。在基本版中, 无法测量单个对象。

任务 您的一幅图像中含有大小不同的对象。您想知道最大对象的面积, 并仔细查看图像中的该对象。除此之外, 您还想将结果导出至表格中。



准备

1. 采集或载入图像。
2. 在图像上执行自动对象分析。

选择测量参数



3. 单击[计测](#)工具窗口中的[计测选项](#)按钮可打开[选项](#)对话框。
4. 在树状视图中, 选择[计测](#) > [测量](#)选项, 然后单击位于[测量](#)组中的[选定对象测量](#)按钮。
5. 在[选定对象测量](#)对话框中, 添加[面积](#)和[对象 ID](#) 测量参数, 然后关闭任何打开的对话框。
6. 然后在[计测](#)工具窗口中, 单击[计测](#)按钮输出结果。

查看结果并为其排序

1. 在[计测结果](#)工具窗口中, 选择[对象测量](#)结果视图。
 - 对象面积的测量值显示在[面积](#)列中。
2. 为[面积](#)列排序, 以找到最小或最大的值。为此, 请双击[面积](#)列的标题。
 - 该列的测量值随即以升序或降序排序。
3. 再次双击列标题, 可将测量值以相反顺序排列。
 - 标题中的箭头将显示其排序方向。

对象 - 表格链接

4. 选择[面积](#)列中的最大值。
 - 图像窗口中也将选定相应对象。这样您可以轻易找到属于特定值的对象并查看它。

将结果导出至表格



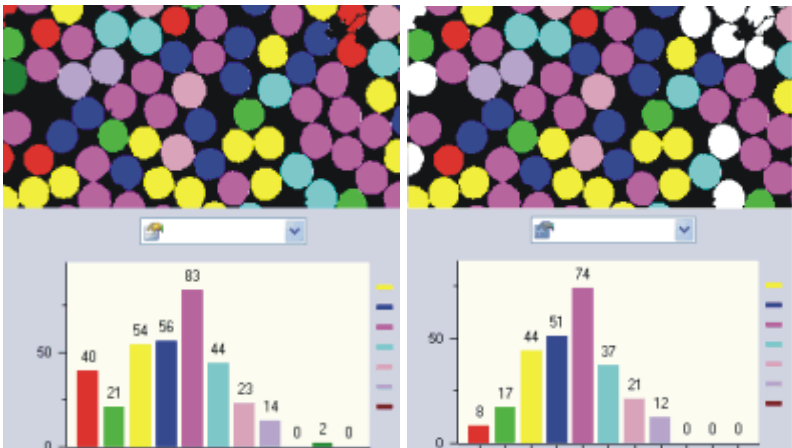
5. 在[对象测量](#)结果视图中, 单击[导出至 Excel](#) 按钮。
6. 在[导出对象结果](#)对话框中, 为表格指定有意义的名称, 然后将其保存到所需的目录中。

12.1.4. 筛选对象

先决条件: 您正在使用**计测完整**解决方案。在基本版中，无法筛选对象。

可以将会给您造成干扰或不感兴趣的对象排除在测量结果之外。位于定义测量值区域外的所有测量值都不会显示，也不会被考虑进任何结果视图中。

任务 在包含不同大小的球形的图像上，定义了 9 个大小类别。您想知道有多少个球形位于哪个大小类别中。在执行分析后，发现小球形的数量被高估了，因为球形没有正确分离，因此也考虑了进来 (左图)。定义仅为大致呈圆形的对象计数的对象筛选。



左图: 在图像右上角，可以看到一些球形未正确分离。它们被划入小球形类别，并且以红色显示。
右图: 定义对象筛选后，每个类别的对象数量发生了变化。特别的是，小球形的红色类别现在的对象更少。

- 准备
1. 载入要分析的图像，或采集一幅图像。
 2. 在图像上执行自动对象分析。
 3. 在**计测结果**工具窗口中，切换到**对象筛选**结果视图。
 - 在表格中，您将看到所有选定的测量参数及其对应筛选范围的列表。始终只有一个测量参数处于激活状态。

- 直接输入筛选范围
1. 在表格中，单击您要定义筛选范围的测量参数。
 2. 双击位于测量参数旁的 **[最小值]** 字段，以输入筛选范围的下限值。
 3. 直接输入所需测量值，或使用箭头键。
 4. 双击 **[最大值]** 字段，然后输入筛选范围的上限值。
 - 上限值本身不再属于筛选范围。
 - 可以通过单击值然后按 **[Del]** 键来删除单个值。

- 交互定义筛选范围
- 
5. 在表格中，单击您要定义筛选范围的测量参数。
 6. 单击位于**测量**列表上方的**选定最小值**按钮，可定义筛选范围的下限值。
 - 鼠标指针的形状也将发生改变。
 7. 单击其测量值要用做筛选范围下限值的对象。
 - 测量值随后在 **[最小值]** 字段中自动采用。在您 (例如) 定义了**面积**参数的筛选范围后，单击要测量的最小对象。

- 在图像窗口中，可以直接看到对对象进行筛选的结果。位于定义筛选范围外的所有值都将被排除在结果之外。
- 筛选范围精确包含要出现在测量结果中的这些值。位于定义筛选范围外的所有值都将被排除在结果之外。
- **切换对象筛选**按钮显示为已点击状态，从而告知您对象筛选处于激活状态。



8. 如果要撤销进行的筛选，请单击**清除最小值**按钮。

9. 单击**选定最大值**按钮以定义筛选范围的上限值。

10. 单击其测量值要用做筛选范围上限值的对象。单击仍要测量的最大对象。

- 测量值会向上舍入，并在 **[最大值]** 字段中自动采用。对象仍然位于筛选范围内。

关闭对象筛选



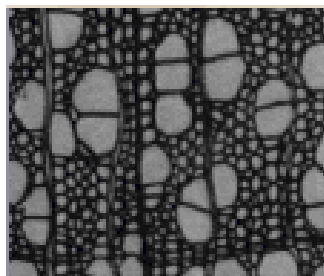
11. 释放**切换对象筛选**按钮。

请注意: 在载入其他图像时，不会自动取消激活已定义的对象筛选。如果 (例如) 没有显示对象，请确保对象筛选已取消激活。

12.1.5. 为对象分类

先决条件: 您正在使用**计测完整**解决方案。在基本版中, 无法定义您自己的类别。

任务 您的图像有两个对象类别, 如大细胞和小细胞。您想知道有多少个对象位于哪个大小类别中。



- 准备**
1. 采集或载入图像。您可以遵照这些操作步骤使用 [WoodVessels.tif](#) 示例图像。
 2. 在图像上执行自动对象分析。
 3. 选择**面积**对象测量。

选择对象类别的测量参数



1. 在**计测结果**工具窗口中, 选择**分类测量**结果视图。
2. 单击**选定分类测量**按钮, 然后在**选定分类测量**对话框中, 添加**平均值 (面积)**、**对象类**和**对象数**测量参数。
 - 利用**平均值 (面积)**参数, 将计算某个类别中所有对象的平均面积。也就是说, 对于该类别中的对象在平均程度上有多大, 该参数给出了测量值。
 - 利用**对象类**参数, 还可以在结果表格中写入对象的名称和颜色。您应无误地将该参数应用于结果表格中, 从而将测量结果正确分配至各个类别。还可以在**对象测量**结果表格中采用该参数。然后, 在结果表格中, 您将能够直接识别各个对象属于哪个类别。
 - 最后, **对象数**参数获得您在任务中寻找的值: 每个分类中找到的对象数量。
3. 关闭**选定分类测量**对话框。

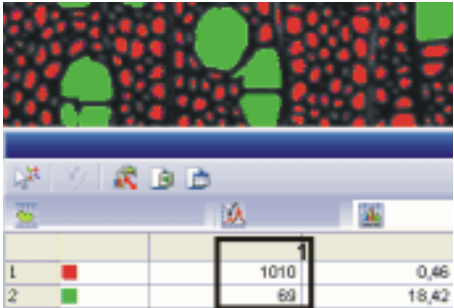
定义类别



1. 单击**计测**工具窗口中的**计测选项**按钮可打开**选项**对话框。
2. 在树状视图中选定**计测 > 分类方案**选项。
3. 在**当前分类方案**组中, 单击**新建分类方案**按钮, 然后选择**新建单参数分类方案**选项。
 - **定义单参数分类方案**对话框随即打开。
4. 在**名称**字段中输入新分类方案的说明性名称, 如**大小级别**。
5. 选定**测量**列表中的**面积**选项。
6. 单击**自动分类方案**按钮切换为**自动分类方案**对话框。
7. 在**自动分类方案**对话框中, 单击**从图像获取最小值和最大值**按钮。然后将使用**最小值**和**最大值**字段中输入的所选参数最小值和最大值。
 - 通过这种方式, 即可确保图像中的所有对象都能分配至定义的其中一个类别。

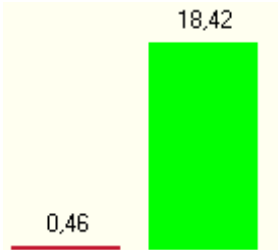
8. 在**类别数字**字段中输入值 **2**，并在**比例**字段中选择**对数**选项。
- 通过执行该操作，就定义了两个大小类别。

查看结果



在插图中，可以看到有两个大小类别的图像。**(1)** 列显示了所查看的大细胞 (绿色) 和小细胞 (红色) 的数量。

- 单击**确定**，然后单击位于**定义单参数分类方案**对话框中的**计测**按钮。
 - 类别将在图像中以彩色显示。为类别选择的测量参数将成为**分类测量**结果视图中的输出。
- 关闭**定义单参数分类方案**对话框。
 - 在**选项 > 计测 > 分类方案**对话框中，新分类方案在列表中处于激活状态。现在还可以将该分类方案用于其它分析。
- 单击**确定**关闭**选项**对话框。
- 然后，在**计测结果**工具窗口中，激活**分类直方图**结果视图以将类别结果显示为柱状图。



在插图中，可以在**分类直方图**结果视图中看到对象类别的结果。对象类别的平均面积比例以柱状图显示。可以清楚地看到，绿色对象比红色对象大很多。

00513

12.2. 跟踪对象

您可以使用软件来跟踪和分析对象的运动 (例如细胞运动)。可同时跟踪许多对象。被跟踪的对象可以分支, 或者两个对象可以合并为一个。

12.2.1. 总览

如何跟踪物理对象?

自动跟踪对象

采集时间栈或正在移动的物理对象录像。通常会自动跟踪对象移动。首先会探测时间栈的各帧中的所有对象。软件将决定哪些所探测到的对象属于一个分类, 并将它们连接到同一轨迹。对象的轨迹显示了物理对象在录制期间所行进的路径。



插图显示了时间栈中的第一幅图像。可以看到两个细胞及其轨迹。

手动跟踪对象

如果仅要跟踪几个对象, 可以手动跟踪其移动。通过手动对象跟踪时, 可以使用鼠标指定对象的位置。

执行对象跟踪

[对象跟踪](#)工具窗口包括跟踪对象时需要的所有功能。在[对象跟踪](#)工具窗口中按照各步骤的显示顺序执行这些步骤。

在跟踪对象时, 您会得到什么?

成功执行对象跟踪后, 图像窗口中将显示特定结果。您可以查看物理对象的轨迹, 以及在图像窗口中当前所示帧中探测到的所有对象。可以使用多种方法给轨迹和对对象涂色。

可以测量和分类所有已探测到的对象和轨迹。可以查看具有精确测量结果的表格以及可帮助在[对象跟踪结果](#)工具窗口中显示测量结果的图表。

对象跟踪结果将随图像一起保存。这意味着无需单独保存结果表格。执行对象跟踪后, 将时间栈保存为 TIF 或 VSI 文件。结果将会在下次载入时间栈时被载入本软件。

导出结果

可以将[对象跟踪结果](#)工具窗口中的数据导出到工作簿或图表中。还可以将结果表格导出到 MS-Excel 以进一步处理数据。

对象跟踪的先决条件

需要使用什么软件?

仅在已购买 [Object Tracking](#) 解决方案后, 对象跟踪功能才可用。

还需要使用自动对象分析功能。购买 [Count and Measure Full](#) 软件解决方案后, 即可使用这些功能。请注意, 本软件中有两种不同的自动对象分析软件包。需要更高级的 [Count and Measure Full](#) 软件包。

跟踪对象时所在的图像的类型是什么?

对象跟踪需要可在其中清楚识别对象移动的时间栈。

可以使用[录像](#)或[缩时](#)采集过程创建时间栈。构成时间栈的帧可以为 8 位灰度图像、16 位灰度图像或 24 位实彩色图像。

AVI 视频还可以用作对象跟踪源。

还可以在多通道时间栈中跟踪对象。在这种情况下，将在所有色彩通道中探测属于一个分类的对象，并为其分配一个轨迹。例如，可以跟踪在图像采集过程中更改荧光色彩的对象。

源图像的先决条件

并非所有时间栈都适合对象跟踪。请注意以下要求：

- 您要跟踪的对象不得相连，且互相之间必须清楚地分离。对象位于图像的前景，应该与图像背景具有不同的视觉效果。
- 采集时间栈时样品必须聚焦。
- 样品应尽可能得到均匀照明。如有必要，请检查阴影校正。
- 时间栈的间隔为两个连续帧之间的时间间隔。
间隔应匹配对象移动的速度，以使每个帧在物理对象移动中显示清楚的发展情况，但是步距不应太大。
时间栈的间隔必须相同以支持对象跟踪。这意味着所有帧之间具有相同的时间间隔。
- 对象数量没有限制。但是，大量对象会导致测量结果过多，并增加对象跟踪所需的时间。
- 必须正确地对图像进行 X/Y 校准。只有这样才能正确测量轨迹。如有必要，请使用[手动放大倍率校准](#)校准流程。
- 采集时间栈时不应移动样品台，否则对象移动将会歪曲。

对象跟踪的步骤

自动对象跟踪的步骤

每次执行对象跟踪时，都必须执行粗体打印的步骤。其它步骤是可选的。通常将采用所执行的最后一个对象跟踪使用的设置。

准备对象跟踪

载入显示要跟踪的对象的时间栈。查看时间栈以获得要跟踪对象的类型和数量的预览。
如有必要，请处理时间栈以便能够更轻松地探测对象。

执行对象跟踪

可以使用[对象跟踪](#)工具窗口跟踪移动对象。在[对象跟踪](#)工具窗口中按照各步骤的显示顺序执行这些步骤。选择适当的情况，探测并筛选帧中的对象，并计算轨迹。

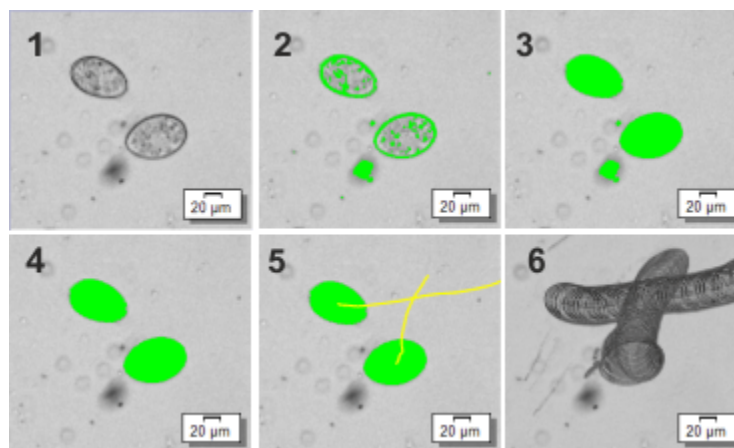
定义、查看和保存结果

选择已探测到的轨迹和对象所需的测量参数。使用[对象跟踪结果](#)工具窗口查看结果。
可以将结果导出为表格或图表格式。

00830 05012017

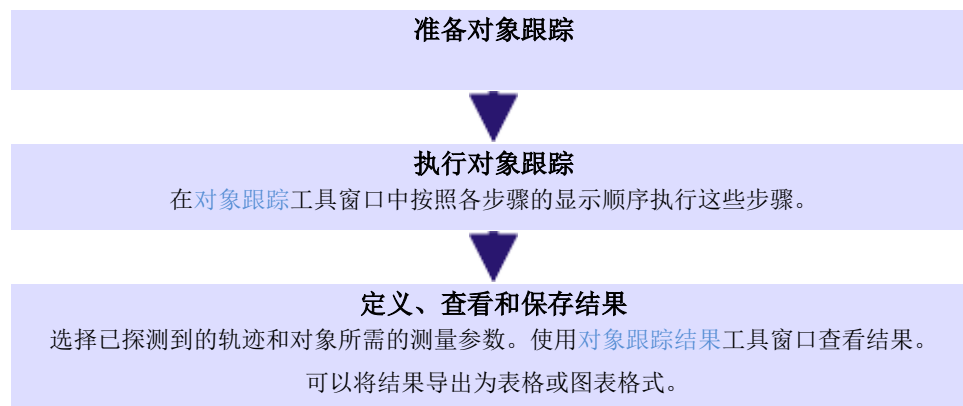
12.2.2. 跟踪快速对象

任务 采集活动细胞的时间栈。您需要了解细胞的移动速度以及在时间栈期间移动的距离。



图像 (1) 显示了时间栈中包含两个细胞的帧。首先，将定义探测细胞 (2) 的阈值。可以填充所探测对象 (3) 中的空洞。在探测过程中还会查找细胞以外的对象。对象筛选 (4) 将排除细胞以外的所有对象。轨迹 (5) 显示了细胞的移动过程。图像 (6) 显示了整个时间栈的投影图像。可以使用该图像检查对象跟踪过程的准确性。最小亮度投影还显示了细胞的轨迹。

以下流程图显示了该流程的基本步骤。



准备对象跟踪

1. 载入或采集显示要跟踪的移动对象的时间栈。
2. 查看时间栈以获得要跟踪对象的类型和数量的预览。为此，请使用图像窗口中的导航栏。可以像录像一样播放时间栈，或者将其从一个帧手动移动到下一个。
3. 使用 [视图 > 标尺](#) 命令可在图像窗口中显示标尺。

执行对象跟踪

1. 使用 **视图 > 工具窗口 > 对象跟踪** 命令打开 **对象跟踪** 工具窗口。



对象跟踪 工具窗口包括跟踪对象时需要的所有功能。一些步骤是可选的。在该情况下，需要进行以下操作：

(1) 移动情况, (2) 探测对象, (3) 筛选对象, (4) 定义轨迹链接, (5) 开始跟踪

2. 细胞大致以直线移动。未分离或合并。在 **移动情况** 列表选定 **快速对象** 条目。
3. 在 **对象跟踪** 工具窗口中，单击 **探测对象** 按钮可探测并测量当前时间栈的所有帧中的对象。
 - 检测到的所有对象都将以彩色显示。
4. 使用当前设置执行对象分析。检查是否已正确探测到对象。如果未正确探测到对象，请定义当前图像的阈值并检查探测设置。
5. 跟踪很多对象需大量计算时间。因此，请尽可能排除不相关的对象。这减少了计算时间，并使得更轻松地获得结果的清晰预览。
6. 定义将对象分配给轨迹的一些设置。为此，请单击 **开始跟踪** 按钮右侧的箭头打开上下文菜单。从上下文菜单选定 **定义轨迹链接...** 命令。
7. 选择搜索范围。搜索范围会极大影响对象跟踪过程的结果。本软件仅在轨迹中下一对象的搜索范围内进行搜索。如果对象跟踪过程不成功，请尝试更改搜索范围。尽可能以较小的搜索范围开始。可尝试选择 **搜索范围 > 绝对值** 选项。在字段中输入所需数值。图像中标尺的长度指示出适当值。
8. 关闭 **定义轨迹链接** 对话框。
9. 开始对象跟踪。为此，请单击 **对象跟踪** 工具窗口中的 **开始跟踪** 按钮。
 - 将自动跟踪对象移动。
 - 根据对象数量，探测和测量完所有轨迹可能需要一些时间。注意位于状态栏中的进度条。通过单击 **取消** 按钮，您可以随时中止流程。
 - 本软件跟踪对象时，可以使用其它软件功能。例如，可以采集下一个时间栈。

探测对象



筛选对象



定义轨迹链接

开始对象跟踪



- 对象跟踪完成时，轨迹将显示在图像窗口中。
- 轨迹位于图像中各自的层中。该层称为**轨迹**。

定义、查看和保存结果

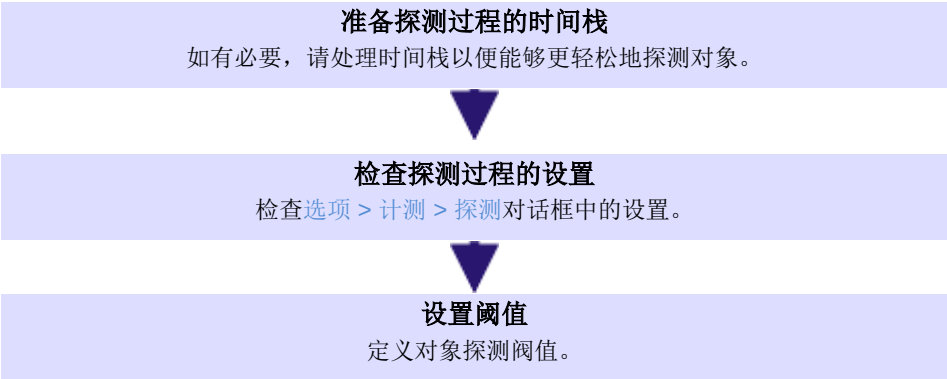
- 

1. 指定图像窗口中轨迹的颜色。
为此，请使用 **工具 > 选项...** 命令。在树状视图中选定 **跟踪 > 显示** 条目。
选定 **固定轨迹颜色** 选项可通过相同颜色显示所有轨迹。
 2. 使用 **设置层可见性** 按钮，可在图像窗口中显示或隐藏轨迹和对象。该按钮位于图像窗口的导航栏中。
 - 您也可以通过 **层** 工具窗口来显示或隐藏图像层。如果删除 **轨迹** 层，将自动删除所有对象跟踪结果。
 3. 如果未显示 **对象跟踪结果** 工具窗口: 在 **对象跟踪** 工具窗口中，单击 **对象跟踪结果** 按钮，可显示 **对象跟踪结果** 工具窗口。
 4. 在 **对象跟踪结果** 工具窗口中，激活 **轨迹测量** 结果视图。
 5. 选定 **平均值 (轨迹速度)** 和 **轨迹长度** 测量参数以测量轨迹。
 6. 在 **对象跟踪结果** 工具窗口的 **轨迹测量** 结果视图中查看各个轨迹的结果。
 - 将在表格中显示对象的平均速度和轨迹长度。这指示细胞的移动速度以及在时间栈期间移动的距离。
 7. 激活图像窗口。选定 **文件 > 另存为...** 命令，将图像随测量结果一起保存。
选定 **标记图像文件格式 (*.tif)** 或 **虚拟载玻片图像 (*.vsi)** 文件格式。
- 保存对象跟踪结果

探测对象

为成功运行物理对象自动跟踪，必须首先在图像中探测到对象。无法跟踪尚未探测到的对象。该过程将探测时间栈的各帧中的所有对象。

以下流程图显示了该流程的基本步骤。



- 准备探测过程的时间栈

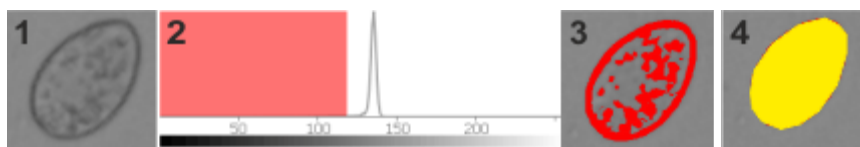
检查探测过程的设置
1. 对象必须易于探测。如有必要，请使用 **运算** 菜单中的命令编辑包含对象的时间栈。例如，可以执行背景矫正、阴影矫正或平滑图像。
 2. 在 **对象跟踪** 工具窗口中，单击 **探测对象** 按钮旁边的小箭头。从上下文菜单中选定 **探测选项...** 命令，打开 **选项 > 计测 > 探测** 对话框。
 3. 使用大小筛选以阻止探测小对象。为此，例如可以在 **选项组** 的 **最小对象尺寸** 字段中输入数值 **10**。对象大小必须至少为 **10** 个像素，才能被计为对象。
 4. 可以自动填充对象中的空洞。如果要忽略空洞，并以这种方式将其作为对象的一部分进行评估，则选中 **填充空洞** 复选框。

- 处理空洞的方式将影响对象的重心等其它选项。通过对象跟踪，轨迹将连接属于一个分类的对象的重心。

5. 单击**确定**关闭此对话框。

设置阈值 设置阈值时，可以确定对象亮度或颜色必须位于的范围。对象由一些连续像素 (其亮度或颜色处于特定范围内) 形成。

1. 转到可以最清楚识别各个对象的帧。
2. 在**对象跟踪**工具窗口中，单击**探测对象**按钮旁边的小箭头。从上下文菜单中选定**自动阈值...**命令，打开**自动阈值**对话框。
 - 该对话框将显示活动帧的直方图。
 - 阈值是在**自动阈值**对话框中自动设置的。
 - 检测到的所有对象都将以彩色显示。
3. 检查这些对象是否已被正确识别。
如果这些对象未被正确识别，请转到**背景组**，输入背景是明还是暗。
4. 单击**计测**按钮。
 - **自动阈值**对话框随即关闭。
 - 现在将在时间栈的所有帧中搜索亮度在定义的阈值范围内的所有对象。由于帧和小对象较多，探测过程可能需要一些时间。
 - 检测到的所有对象都将以彩色显示。对象的颜色由当前对象分类方案决定。使用**选项 > 计测 > 分类方案**对话框选定或定义分类方案。You can find a description of this dialog box in the online help.
 - 已探测到的对象随后在自己的图像层上显示。该图像层称为**探测到的对象**。使用**层**工具窗口可显示或隐藏这些图像层，或删除它们。
5. 探测到对象后，可以开始跟踪物理对象。为此，请单击**对象跟踪**工具窗口中的**开始跟踪**按钮。



图像 1: 原始图像包含一个细胞。

图像 2: 图像的直方图显示了亮度分布情况。亮像素具有高亮度，暗像素具有低亮度。红色区域对应阈值范围。阈值内的所有亮度值均定义为图像的前景。

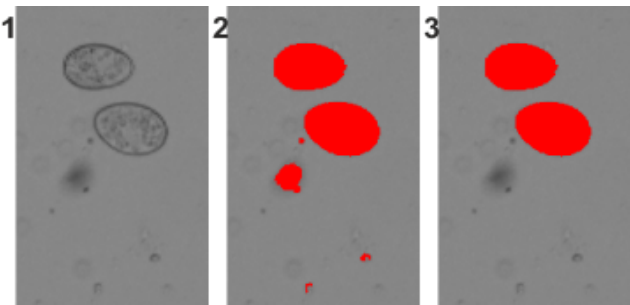
图像 3: 设置自动阈值以将对象置于前景中。打开阈值对话框后，将以对话框中为相选定的颜色显示图像中的对象。

图像 4: 完成探测过程时，图像中的对象将以彩色显示。对象的颜色现在取决于当前对象分类方案。在该例中，探测过程已填充空洞。

筛选对象

开始跟踪前，请尽可能排除不相关的对象。这减少了计算时间，并使得更轻松地获得结果的清晰预览。

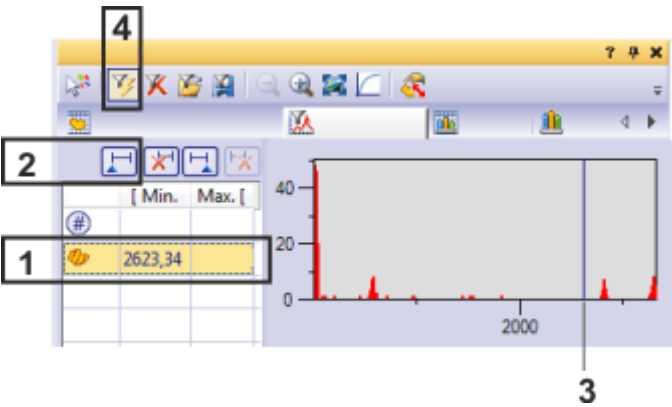
任务 除了要在时间栈中跟踪的对象，还会探测不需要的对象。定义仅包括特定大小对象的对象筛选。



图像 (1) 显示了要跟踪其移动过程的两个细胞。除这些细胞外，探测过程发现了与这些细胞具有相同亮度的其它对象。探测到的对象在图像 (2) 中显示为红色。定义对象筛选后，在图像 (3) 中仅探测到两个细胞。其它对象已被筛选排除。

- 
1. 载入或采集显示要跟踪的移动对象的时间栈。
 2. 跟踪时间栈中的对象。
 3. 在对象跟踪工具窗口中，单击筛选对象按钮。
 - 计测结果工具窗口随即显示。将自动激活对象筛选选项卡。
 - 计测结果 > 对象筛选选项卡左侧的表格显示当前为对象分析选定的所有测量参数的列表。相应的筛选范围列在测量参数旁边。
 - 如果要用于对象筛选的测量参数未显示在列表中，请单击选定对象测量按钮。您可在计测结果工具窗口的工具栏上找到该按钮。例如，如果要根据区域面积筛选，请选定面积测量参数。

交互定义筛选范围



使用计测结果工具窗口中的对象筛选选项卡，可以排除不需要跟踪的对象。

- 
4. 在表格中选定面积 (1) 测量参数。
 - 包含所探测对象面积分配的直方图将显示到包含测量参数的表格的右侧。这将显示所有对象，而无论探测对象位于哪个帧。
 5. 单击测量参数列表上方的选定最小值 (2) 按钮，可以定义筛选范围的最小值。
 - 鼠标指针的形状也将发生改变。
 6. 在图像窗口中，单击要在对象跟踪过程中包括的最小对象。

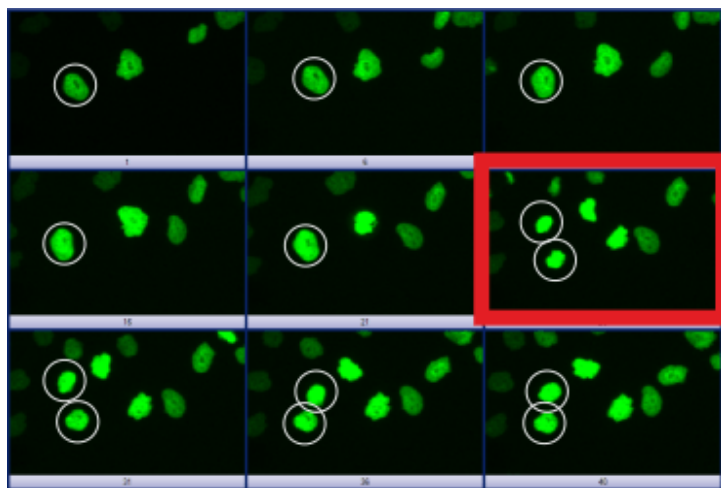
- 测量值随后在 [最小值] 字段中自动采用。
- 将在直方图 (3) 中显示一条线。可以在直方图中左右拖动此线。这将立即更改当前最小值。
- 在图像窗口中，可以直接看到对对象进行筛选的结果。位于定义筛选范围外的所有对象都将被排除。
- [切换对象筛选](#) (4) 按钮显示为已点击状态，从而告知您对象筛选处于激活状态。



请注意: 在载入其他图像时，不会自动取消激活已定义的对象筛选。如果图像中未显示任何对象，请确保对象筛选已停用。

12.2.3. 观察细胞分裂

任务 采集正在分裂的细胞的时间栈。您需要了解分裂前后细胞的大小变化。



插图显示了具有分裂细胞的时间栈中的一些帧。其中一个细胞已使用白色圆圈标识。红色轮廓中的帧标识了细胞分裂后的第一个帧。在该例中，细胞未以任何特定方向移动。而是大致保持在相同的位置。

1. 载入或采集显示要跟踪的移动对象的时间栈。
2. 查看时间栈以获得要跟踪对象的类型和数量的预览。
3. 在该例中，细胞未以任何特定方向移动。而是大致保持在相同的位置。在 [移动情况](#) 列表选定 [生长中细胞](#) 条目。
 - [开始跟踪](#) 按钮现在的样子为。
4. 探测对象
5. 定义将对象分配给轨迹的一些设置。为此，请单击 [开始跟踪](#) 按钮右侧的箭头打开上下文菜单。从上下文菜单选定 [定义轨迹链接...](#) 命令。
6. 单击 [定义搜索范围](#) 按钮在图像中交互定义搜索范围。
 - 鼠标指针随即会出现在图像窗口中。
7. 单击一个对象。移动鼠标以更改搜索范围的大小。
 - 将在图像中绘制一个圆形，帮助您估计搜索范围的适当大小。定义包括已分裂细胞的搜索范围。
8. 再次单击可指定搜索范围的大小。
9. 单击鼠标右键，并在上下文菜单中选定 [确认输入](#) 命令，确认您定义的搜索范围。



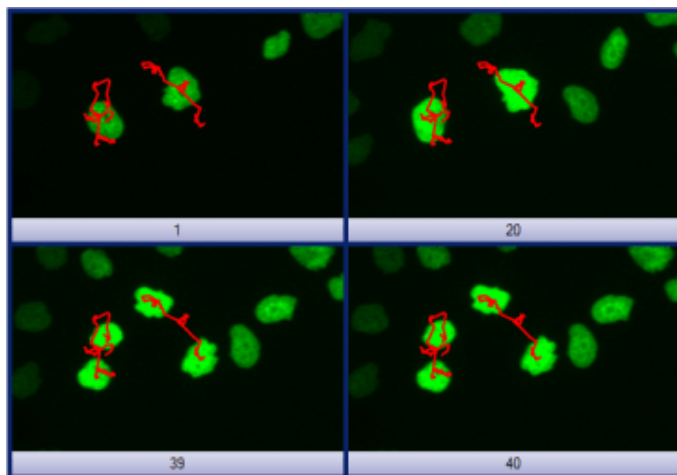
定义轨迹链接



开始对象跟踪



10. 单击**确定**关闭**定义轨迹链接**对话框。
11. 开始对象跟踪。为此，请单击**对象跟踪**工具窗口中的**开始跟踪**按钮。
 - 将自动跟踪对象移动。
 - 对象跟踪完成时，轨迹将显示在图像窗口中。

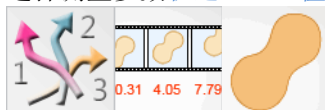


对象跟踪过程完成时，两个轨迹将显示在图像窗口中。插图显示了在不同时间点找到的轨迹和帧。按预期，轨迹进行了一次分支。

定义、查看和导出结果



1. 在**对象跟踪**工具窗口中，单击**对象跟踪结果**按钮，可显示**对象跟踪结果**工具窗口。
2. 在**对象跟踪结果**工具窗口中，激活**轨迹对象测量**结果视图。
3. 选择测量参数**轨迹 • ID**、**值 • (t)** 和**面积**。

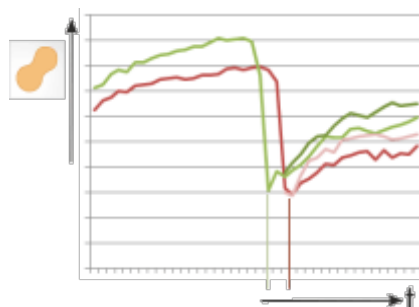


4. 在**对象跟踪结果**工具窗口的**轨迹对象测量**结果视图中查看各个轨迹的结果。
 - 表格现在显示了每个对象的面积以及在其中探测到对象的帧的时间点。此轨迹 ID 指示对象属于的轨迹。

导出对象跟踪结果



5. 在**对象跟踪结果**工具窗口中，单击**导出至 • Excel** 按钮将结果导出到 MS-Excel 文件。
6. 为表格输入描述性名称，然后将其保存到所需目录中。
7. 例如，可以创建一个 MS-Excel 格式的图表，绘制出对象面积随着时间的变化。



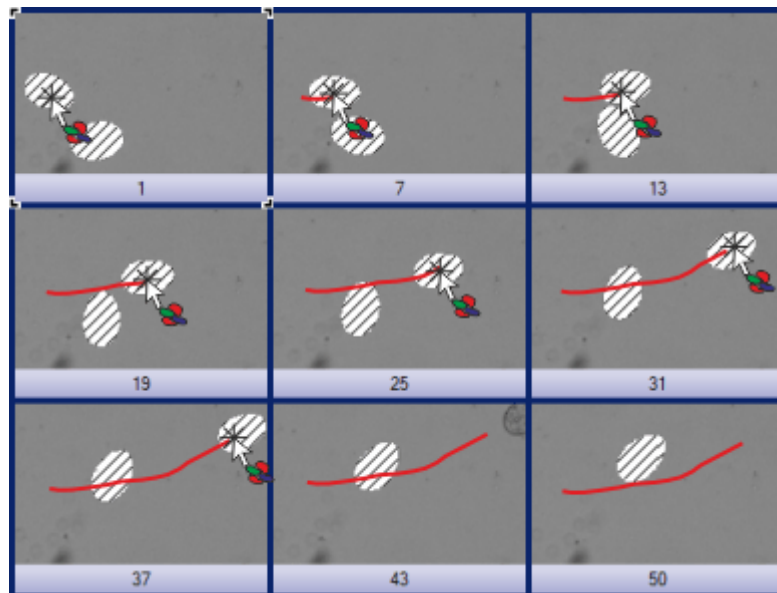
图表显示了细胞的大小如何随着时间变化。在图表中还可以清楚看到细胞分裂的时间点。细胞分裂的时间点稍微交错。

12.2.4. 手动跟踪对象

如果自动对象跟踪未成功且仅有几个要跟踪的对象，可以手动进行跟踪。

任务

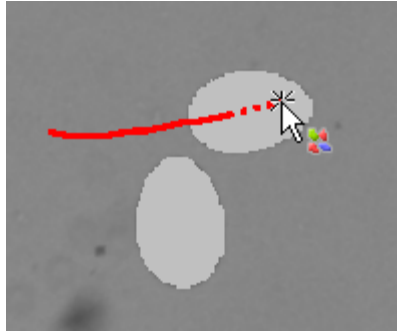
手动跟踪细胞。



插图显示了共有 50 个帧的时间栈的一些帧。探测到的对象包含网纹图案，因为其不属于任何对象类。已在每个帧中点击该对象。可以看到对象的轨迹如何在帧之间逐渐变长。轨迹在帧 37 终止。在最后两个帧中，对象已离开图像区域。

1. 载入或采集显示要跟踪的对象的时间栈。
2. 即使在手动跟踪对象时，也必须首先在帧中被探测到。执行对象分析以探测帧中的对象。
 - 检测到的所有对象都将以彩色显示。
3. 在时间堆栈中，进入要跟踪的对象首次出现的帧。为此，请使用图像窗口中的导航栏。
4. 在**对象跟踪**工具窗口中，从**移动情况**列表选定**手动**条目。
 - **开始跟踪**按钮现在的样子为。
5. 在**对象跟踪**工具窗口中单击**开始跟踪**按钮。
 - 本软件随即会自动切换到选择模式。图像上鼠标指针的形状指示当前模式。
6. 单击要跟踪的对象。只可点击已被探测到的对象。但在对象中，您的点击并不会影响对象跟踪过程。位于对象中时，鼠标指针尖上将会出现一个星形。
 - 新轨迹的起点将自动置于选定对象的重心。
 - 本软件自动在图像窗口中显示下一个帧。
7. 在每个帧中单击要跟踪的对象。





插图显示了上层对象手动跟踪过程中的一个特定时间点。红色实线为截至该时间点时上层对象的轨迹。从当前轨迹末端到鼠标指针的线条为虚线。由于鼠标指针位于对象上面，将在鼠标指针尖处显示星形。

- 本软件将在图像窗口中显示截至当前时间点的对象轨迹。在当前帧中指定的轨迹片段为虚线。
8. 当跟踪的对象消失时，将结束所在帧中的轨迹定义。单击鼠标右键，并在上下文菜单中使用[确认输入](#)命令。
 - 结果将会立即更新。新添加的轨迹会显示在图像窗口以及[对象跟踪结果](#)工具窗口中的表格和图表中。将在[对象跟踪](#)工具窗口中更新找到的轨迹的总数。
 - 随即会显示消息框。系统将会询问您是否要创建更多轨迹。
 9. 决定结束对象跟踪过程或者跟踪更多对象。如果要跟踪更多对象，请单击消息框中的[是](#)按钮。
 10. 在时间栈中，进入要跟踪的新对象首次出现的帧。为此，请使用图像窗口中的导航栏。
 11. 如果要跟踪其它对象，请注意以下几点：
 - 手动跟踪对象时，所有现有轨迹将自动隐藏在图像窗口中。
 - 将鼠标指针移动到已属于轨迹的对象上后，将显示轨迹。
 - 如果单击已属于不同轨迹的对象，将连接两个轨迹。通过执行该操作，将自动创建分支事件。

12.2.5. 分析结果

选择测量参数

任务 采集活动细胞的时间栈。您需要识别最快的 10 个对象。还要密切关注对象速度最快的帧。除此之外，您还想将结果导出至表格中。

准备

1. 采集或载入图像。
2. 跟踪时间栈中的对象。

选择测量轨迹的参数



3. 在**对象跟踪**工具窗口中，单击**对象跟踪结果**按钮，可显示**对象跟踪结果**工具窗口。

4. 在**对象跟踪结果**工具窗口中，激活**轨迹测量**结果视图。

5. 单击**选定轨迹测量**按钮。
 - 对话框将显示可在轨迹中测量的所有可用参数的列表。在对话框底部，将看到当前在**对象跟踪结果**工具窗口的**轨迹测量**结果视图中显示的测量参数的列表。



6. 在**可用轨迹测量**列表中，选定**轨迹速度**测量参数。

- 轨迹速度**测量参数指示轨迹整个长度中被跟踪对象的速度。被跟踪对象的速度通常不是恒定的。将确定连续帧之间的速度。这意味着只可计算轨迹速度的一个统计值。

7. 单击图下方列表中的**平均值**选项，选定**平均值 (轨迹速度)**测量参数。这将确定对象的平均速度。

8. 单击**添加“平均值 (轨迹速度)”**按钮。

- 测量参数将显示在**针对所有轨迹计算的测量**列表中。所有这些测量参数都将显示在该工具窗口中。



9. 还可选定**轨迹 • ID**测量参数。

- 轨迹 • ID**测量参数是一个唯一轨迹 ID 号。

10. 单击**确定**关闭**选定轨迹测量**对话框。

11. 在**对象跟踪结果**工具窗口的**轨迹测量**结果视图中查看各个轨迹的结果。

- 现在将在表格中显示对象的平均速度。这可指示对象的移动速度。

选择测量对象的参数



1. 在**对象跟踪结果**工具窗口中，激活**轨迹对象测量**结果视图。单击**选定轨迹对象测量**按钮。

- 对话框将显示可在对象中测量的所有可用参数的列表。在对话框底部，将看到当前在**对象跟踪结果**工具窗口的**轨迹对象测量**结果视图中显示的测量参数的列表。

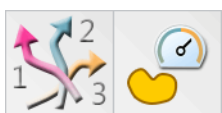
2. 选定测量参数**轨迹 • ID**和**对象速度**。

- 对象速度**测量参数指示对象的当前速度。将测量前后帧之间的速度。

3. 单击**确定**关闭**选定轨迹测量**对话框。

4. 在**对象跟踪结果**工具窗口的**轨迹对象测量**结果视图中查看各个对象的结果。

- 现在将在表格中显示对象的速度。这指示被跟踪对象在不同时间点的移动速度。

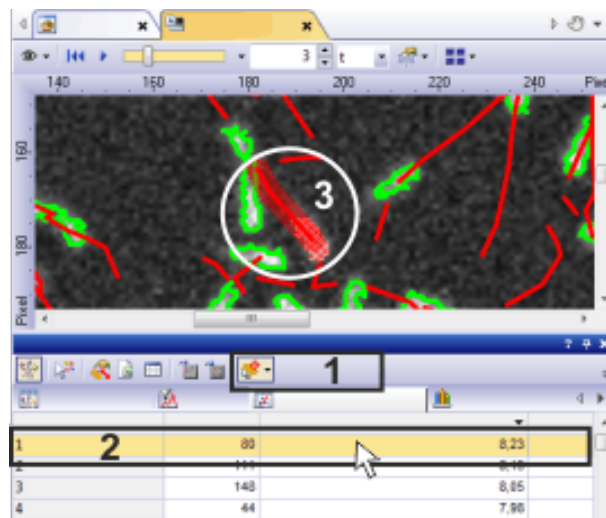


5. 按对象速度对表格进行排序，以找到最快的对象。为此，请双击包含对象速度测量参数的列的标题。
 - 标题中的箭头将显示其排序方向。箭头应指向下方。
 - 现在对象速度列中的测量值按从高到低的顺序排序。探测到的最快的对象现在位于第 1 行。
 - 其它列中的轨迹 · ID 测量参数指示对象属于的轨迹。

在图像窗口中查找最快的对象



1. 单击这两个按钮中的其中一个打开上下文菜单。这些按钮位于工具窗口的工具栏中。选定平移并缩放至对象命令，可切换为选择模式。
 - 按钮变为活动状态，指示其中一个模式处于活动状态。
 - 按钮会针对选定模式显示相应图标。
2. 选定轨迹对象测量结果表格中的第一行以查看最快的对象。
 - 图像窗口中将选定最快的对象。
 - 如果仅在图像窗口中显示图像的一部分: 在图像窗口中显示的图像片段会自动移动以显示对象。将更改缩放比例以显示全部对象和轨迹。
 - 还会选定对象的轨迹。
 - 如果对象不在当前帧中，则软件会自动转到含有该对象的帧中。

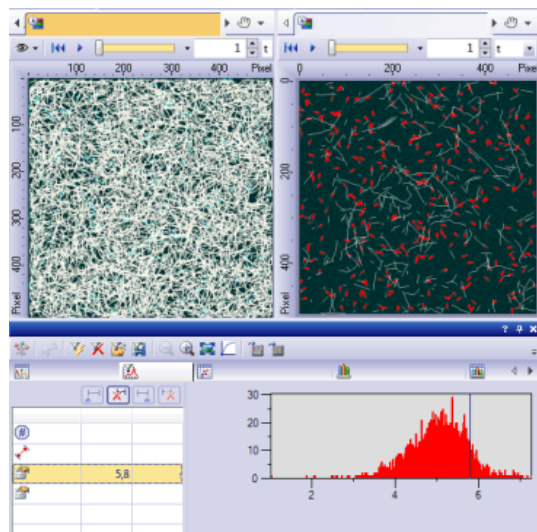


在底部可以看到轨迹对象测量结果视图，其中列出了所有探测到的对象的速度和轨迹。单击平移并缩放至对象按钮 (1)。这可指示所激活的相应选择模式。第一行中的对象在表格 (2) 和图像窗口 (3) 中都被选定。

筛选轨迹

可以同时分析时间栈中的许多轨迹。定义筛选以限制所显示的轨迹数量。

任务 您已在时间栈中跟踪许多对象。您仅对快速对象感兴趣。隐藏所有慢速对象。

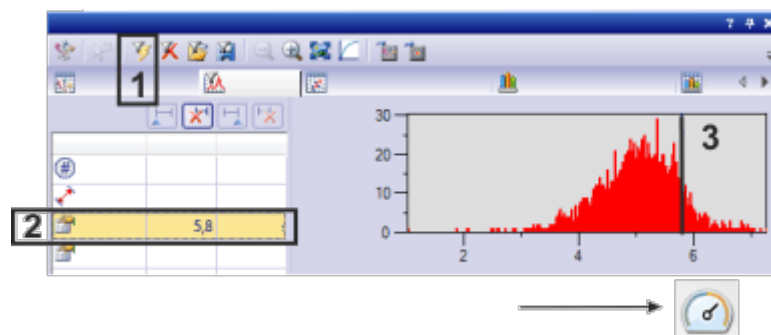


左侧图像中包含过多轨迹，因此无法解释对象跟踪过程中的结果。在右侧图像中已应用仅显示快速对象轨迹的轨迹筛选。其它轨迹已被筛选排除。

1. 载入或采集显示要跟踪的移动对象的时间栈。
2. 跟踪时间栈中的对象。
3. 在对象跟踪结果工具窗口中，单击轨迹筛选选项卡。
 - 在轨迹筛选选项卡左侧的表格中，可以看到当前为轨迹测量选定的所有测量参数的列表。相应的筛选范围列在测量参数旁边。
 - 如果要用于轨迹筛选的测量参数未显示在列表中，请激活对象跟踪结果 > 轨迹测量结果视图。单击选定轨迹测量按钮。
例如，如果要根据对象速度筛选，请选定平均值 (轨迹速度) 测量参数。



定义筛选范围



使用对象跟踪结果工具窗口中的轨迹筛选选项卡，可以隐藏轨迹。



4. 单击切换轨迹滤镜按钮 (1) 切换轨迹筛选。
 - 按钮将显示为已点击状态。
 - 对象跟踪工具窗口中的轨迹计数组可指示处于活动状态的轨迹筛选。在筛选范围内字段中，将显示位于已定义筛选范围内的轨迹的数量。
5. 在表格中选定平均值 (轨迹速度) (2) 测量参数。

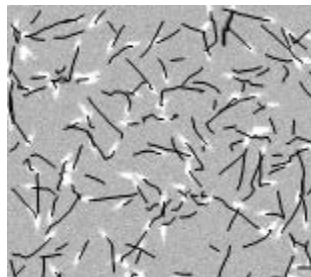
- 包含物理跟踪对象速度的直方图将显示到包含测量参数的表格的右侧。将在 X 轴绘制速度，在 Y 轴绘制轨迹数量。
6. 双击**最小值**字段。输入仍要考虑对象时的最低速度。
- 将在直方图**(3)**中显示一条线。仍可以在直方图中左右拖动此线。这将立即更改当前最小值。
 - 在图像窗口中，可以直接看到筛选的结果。位于定义筛选范围外的所有轨迹都将被排除。
 - 在**对象跟踪结果**工具窗口的结果视图中，属于隐藏轨迹的所有测量值也将被隐藏。可以随时再次显示这些测量值，而无需重复对象跟踪过程。

请注意: 重复对象跟踪过程时，不会自动停用已定义的对象筛选。如果图像窗口中未显示任何对象，请确保轨迹筛选已停用。

分类轨迹

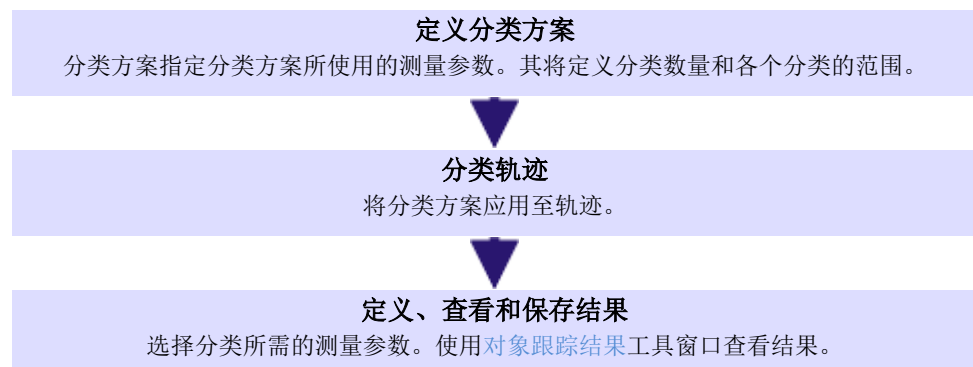
任务

您已在时间栈中跟踪对象。它们的轨迹具有不同的长度。您需要了解时间栈中存在的短轨迹和长轨迹数量。轨迹长度与对象速度之间是否具有相关性？



插图显示了时间栈中的帧。所探测到的轨迹为黑色。

以下流程图显示了该流程的基本步骤。



准备分类方案

1. 载入或采集显示要跟踪的对象的时间栈。
2. 跟踪时间栈中的对象。

定义分类方案

无需在每次跟踪对象时定义新的分类方案。通常将自动使用上次选定的分类方案。

1. 在**对象跟踪**工具窗口中，单击**开始跟踪**按钮旁边的小箭头。从上下文菜单中选定**轨迹分类方案选项...**命令，打开**选项 > 跟踪 > 分类方案**对话框。
2. 在**当前分类方案**组中，单击该按钮。
 - 定义单参数分类方案对话框随即打开。



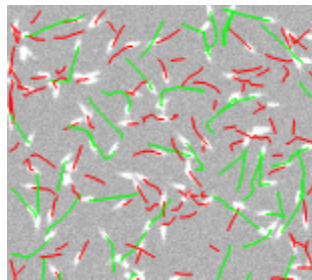
3. 在名称字段中输入新分类方案的说明性名称，如长度分类。
4. 选定测量列表中的轨迹长度条目。
 - 仅在列表中显示在对象跟踪结果 > 轨迹测量结果视图中显示为轨迹测量的测量参数的测量参数。轨迹长度参数除外。该测量参数始终显示在列表中。
 - 如果所需的测量参数未显示在测量列表中，请单击该按钮打开选定轨迹测量对话框。将所需的测量参数添加至针对所有轨迹计算的测量的列表中。
5. 单击自动分类方案按钮切换为自动分类方案对话框。
6. 在自动分类方案对话框中，单击从图像获取最小值和最大值按钮。然后将使用最小值和最大值字段中输入的所选参数最小值和最大值。
 - 通过这种方式，即可确保图像中的所有对象都能分配至定义的其中一个类别。
7. 在类别数字段中输入值 2，并在比例字段中选定线性条目。
8. 单击确定关闭自动分类方案对话框。
 - 通过执行该操作，就定义了两个长度分类。
 - 返回定义单参数分类方案对话框。



分类轨迹

1. 在定义单参数分类方案对话框中，单击分类按钮。
 - 活动时间栈中的所有轨迹现在排序到短轨迹或长轨迹分类中。
2. 关闭定义单参数分类方案对话框。
 - 在选项 > 跟踪 > 分类方案对话框中，新分类方案在列表中处于活动状态。现在还可以将该分类方案用于其它跟踪对象。
3. 单击确定关闭选项对话框。

定义、查看和保存结果

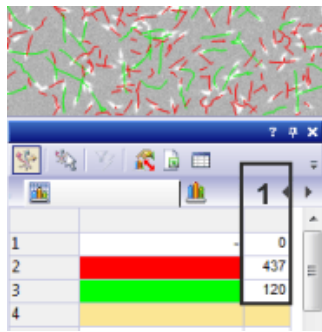


执行分类后，在图像窗口中所有短轨迹显示为红色，所有长轨迹显示为绿色。

1. 图像窗口中的轨迹可以其分类对应的颜色进行显示。
如果执行分类后图像窗口中的轨迹颜色未更改，请检查轨迹显示设置。
 - 要更改轨迹在图像窗口中的显示方式，请在对象跟踪工具窗口中单击开始跟踪按钮旁的小箭头。在上下文菜单中选定轨迹显示选项... 命令，打开选项 > 跟踪 > 显示对话框。选定颜色定义方式 > 分类方案选项。
2. 在对象跟踪结果工具窗口中，激活轨迹分类测量结果视图。
3. 单击选定轨迹分类测量按钮，并在选定轨迹分类测量对话框中，添加轨迹计数、平均值 (平均值 (轨迹速度)) 和 轨迹分类名称测量参数。
 - 轨迹计数参数将提供该任务中要查找的值: 每个分类中找到的对象数量。

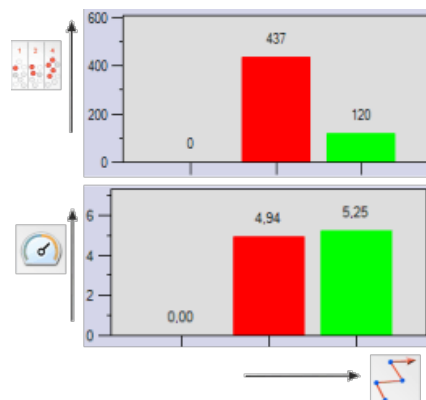


- 利用**轨迹分类名称**参数，还可以在结果表格中写入分类的名称和颜色。您应无误地将该参数应用于结果表格中，从而将测量结果正确分配至各个类别。还可以在**轨迹测量**和**轨迹对象测量**结果表格中显示这些参数。然后，在结果表格中，您将能够直接识别各个对象和轨迹属于哪个分类。
 - **平均值 (平均值 (轨迹速度))** 参数指示分类中对象的平均速度。
4. 关闭**选定轨迹分类测量**对话框。
 5. 转至**对象跟踪结果**工具窗口中的**轨迹分类测量**结果视图，查看表格中的分类结果。
 6. 然后，在**对象跟踪结果**工具窗口中，激活**轨迹分类直方图**结果视图以将分类结果显示为柱状图。



在插图中，可以看到结果图像和两个长度分类。**(1)** 列显示了所查看的长轨迹 (绿色) 和短轨迹 (红色) 的数量。

7. 然后，在**对象跟踪结果**工具窗口中，激活**轨迹分类直方图**结果视图以将分类结果显示为柱状图。
8. 选定**测量**列表中的**轨迹计数**条目。
 - 直方图显示了每个分类的轨迹数量。这可指示活动时间栈中存在的短轨迹和长轨迹数量。
9. 在**测量**列表选定**平均值 (平均值 (轨迹速度))** 条目。
 - 直方图现在显示了每个分类的平均对象速度。根据其轨迹的长度将对象排序到了相应分类中。这可以显示对象速度与其轨迹长度之间的潜在相关性。



可以在**轨迹分类直方图**结果视图中显示各个分类的不同测量参数。

顶部直方图显示了每个分类的轨迹数量。当前时间栈包含的短轨迹比长轨迹多很多。

底部直方图显示了根据分类移动对象的平均速度。两个对象的速度大致相同。这说明了不同的轨迹长度并非由于不同的对象速度导致。

13. 运行实验

13.1. 总览

实验管理员准确地说是
什么？

您可以使用本软件执行复杂的采集流程。使用实验管理员可以定义并运行涉及使用本软件采集图像的复杂实验。始终可以重新使用现有实验计划，或根据新条件对它们进行调整。您可以在实验过程中采集多维图像。如果您的显微镜有电动硬件组件，您可以在实验过程中通过本软件控制它们。或者您可以使用 **RTC** (实时控制器) 来在实验中使用外部设备。

实验管理员背后的理念

实验管理员是图形化的
流程管理

可以利用 [实验管理员](#) 工具窗口创建图形化的实验计划。这一实验计划包含相继执行的一系列的命令，例如图像采集。

示例: 使用实验管理员可以以特定间隔采集样品上特定位置的多个多通道荧光图像。

实验管理员与流程管理
的区别

与实验管理员一样，您也可以使用 [流程管理](#) 工具窗口来处理复杂的采集流程。可将实验管理员作为流程管理的替代方法使用。它对于更复杂的流程而言更为直观，并且提供了更多选项。

- 例如，在 [实验管理员](#) 工具窗口中，可以使用 **RTC** 在特定时间触发特定设备向样品添加化学品，或者加热或照射样品。
- 只有使用“实验管理员”才能定义循环内的循环。这样便可以以特定间隔多次重复快速时间栈。
- 通过“实验管理员”可以使用流化，在时间栈中获得两次单独图像采集之间更短的间隔 (相对于使用流程管理可以实现的间隔)。

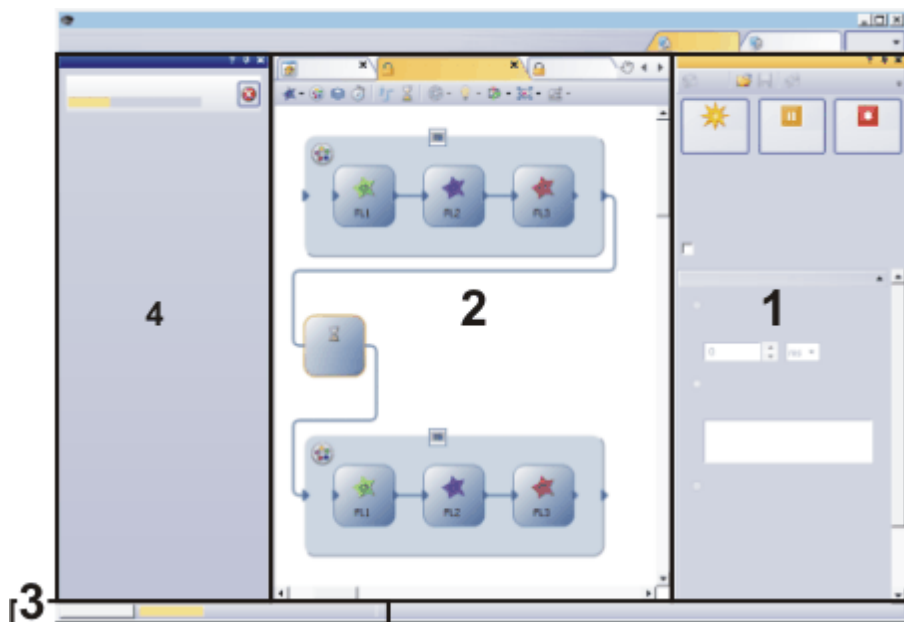
使用实验管理员的先决条件

先决条件: [实验管理员](#) 工具窗口仅可用于最高版本的软件包。

1. 系统已配置完毕。
 - 确保本软件得到了正确的配置。
2. 已定义了观测模式。
 - 如果您想要采集多通道荧光图像，那么在定义实验之前，定义色彩通道的观测模式就很有意义。仅在定义了观测模式后，才能在 (例如) 采集荧光图像时将荧光色彩分配至各个色彩通道。

实验管理员的用户界面

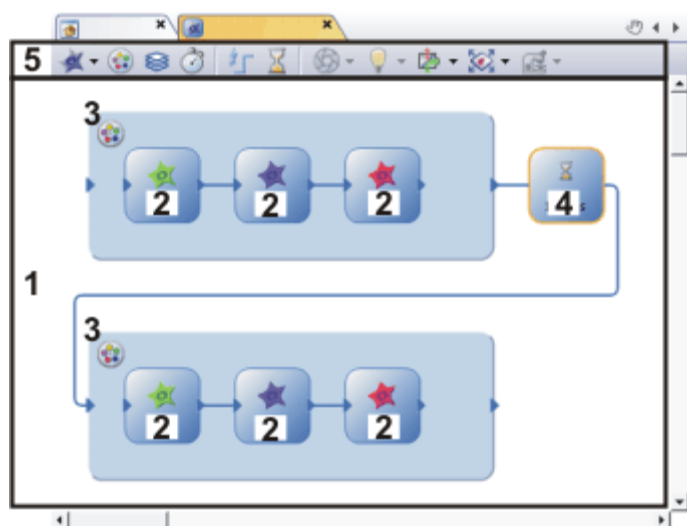
实验管理员是由[实验管理员](#)工具窗口和实验计划组成的。



实验管理员是由[实验管理员](#)工具窗口 (1) 和实验计划 (2) 组成的。当您运行一个实验时，显示屏下方状态栏的左侧会显示一个进度条 (3)。当一个实验运行了很长一段时间，您也可以显示[任务工具窗口](#) (4) 来获得更多有关实验进度的信息。

使用[实验管理员](#)工具窗口，可创建实验计划、编辑现有实验计划或启动一个实验计划。要在整体上对实验计划的流程图有较好的了解，请在[实验管理员](#)工具窗口中指定所用命令的设置。

实验计划



插图显示了属于实验计划的用户界面上的元素。实验计划是以与图像和其它文档完全相同的方式显示在本软件文档组中的文档。

[实验计划](#)类型的文档本质上是一块画布，您通过创建流程图 (1) 在这块画布上定义实验。

实验计划包含特定命令，通常是关于图像采集的命令。在实验计划中，每个命令均通过自己的图标以图形方式显示。上面显示的例子包含采集荧光图像的图标 (2)、创建多通道图像的图标 (3) 和[等待](#)命令的图标 (4)。

命令通过直线相连接，由箭头清晰地定义命令的顺序。

在文档窗口 **(5)** 中实验计划有其自己的工具栏。在该工具栏上您可以找到所有可以在实验中使用的命令。

激活文档组中的实验计划



请注意: 当您在运行一个实验时，采集的图像通常显示在文档组中。在执行该操作时，它们会隐藏实验计划。

如果正在使用实验计划，则单击[保持实验可见](#)按钮。您可以在[实验管理员](#)工具窗口的工具栏中找到该按钮。现在，实验计划会在自己的文档组中显示。在启动实验时，会自动显示文档组。这样就可确保实验计划始终可见，从而可以轻易使用它。

减小实验计划的大小



如果实验计划包含大量命令，可以减小其大小以保持预览。

使用[缩放](#)工具栏上的[缩小](#)和[放大](#)按钮。实验计划的缩放比例显示在[缩放](#)工具栏上。最大缩放比例为 **100%**。

或者激活实验计划。按住 **[Ctrl]** 键。现在可以使用鼠标滚轮来放大和缩小实验计划。

13.2. 一般流程

您可以为两种不同类型的任务使用实验管理员。

- 定义并运行新实验
- 使用现有实验计划

定义并运行新实验

以下流程图显示了该流程的基本步骤。



使用现有实验计划

您可以随时载入一个现有实验计划并再次运行该实验。以下流程图显示了该流程的基本步骤。



恢复数据

使用数据恢复对话框恢复计算机或软件崩溃时当前已采集但尚未保存的图像。

00800

13.3. 工具栏 - 实验计划

实验计划是以与图像和其它文档完全相同的方式显示在本软件文档组中的文档。实验计划包含自己的工具栏，其中提供可以在实验计划中使用的所有命令。

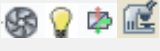
将命令添加到实验计划中

单击实验计划的工具栏上的一个按钮，选定相应的命令。现在您可以通过单击画布来将选定的命令插入到实验计划中。

按钮简介



下表列出了工具栏上提供的按钮。

	图像采集	图像采集是每个实验的基本组成部分。单击该按钮，将图像采集添加到实验中。
	多通道组	您可将一系列荧光图像组合成一幅多通道图像。
	Z 图像栈循环	将 Z 图像栈采集添加到实验。
	样品台循环	在实验期间，将样品台移动到样品上的不同位置。可以使用在 样品台导航器 工具窗口中定义的位置列表，或者也可以在样品预览图像上为实验定义自己的位置。
	缩时循环	将时间栈采集添加到实验。
	数字端口	在图像采集之前或之后远程触发设备。例如，可以使用它来添加化学品，或以特定波长或亮度的光来照射样品。
	等待	合并两次图像采集之间的延迟。
 	比例 亮度剖面	可以在实验中使用以下评估方法来直接分析采集的图像。单击按钮旁的小箭头可打开一个菜单。上次所用命令对应的按钮显示在工具栏上。 例如，可以使用比例命令来测量时间栈中钙离子的浓度变化。 使用亮度剖面命令。亮度剖面显示在一个或多个图像片段(感兴趣区)中，亮度在一段时间或不同 Z 位置的变化。
	硬件组件	您的系统通常包含多种不同设备，如摄像头和显微镜。在某些系统中，您可以使用本软件来控制这些硬件组件。您可以在实验中使用这些硬件组件并(例如)打开或关闭快门。 先决条件: 仅当在本软件中正确注册并校准硬件组件后，才能实验过程中通过本软件控制它。
	IX3 FRAP	使用 FRAP 系统时，可以使用激光为荧光样品上的特定区域褪色。

	TIRF	使用 TIRF 系统时，可以在一个命令中定义 TIRF 照明的激光位置，从而定义穿透深度。
	移动 XY	使用 移动 XY 命令可在样品上指定一个不同的位置。
	移动 Z	使用 移动 Z 命令可将样品台上下移动。
	自动聚焦	使用 自动聚焦 命令，在图像采集前聚焦样品。
	Z 漂移补偿	使用 Z 漂移补偿 命令对不需要的 Z 传动装置移动进行补偿。
	ZDC 分色镜	如果您使用 IX3-ZDC2 ZDC 设备，则可以通过 ZDC 分色镜 命令移动分色镜。这会将激光束引导至样品上或引导激光束离开样品。
	实验模板	您可使用多种预定义典型实验计划作为实验计划的基础。 可将实验计划的元素保存为构建块。这将方便您再次使用它们。
	保持实验可见	单击该按钮可在实验计划自己的文档组中显示该实验计划。在启动实验或切换至实时模式时，会自动显示文档组。这样便可确保实验计划始终可见，从而可以在实验完成时就立即使用它。 该模式处于活动状态时，该按钮也处于活动状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。 如果需要为图像显示使用更多空间，则释放该按钮。采集的图像现在会显示在与实验相同的文档组中，并覆盖实验计划。 您可在在线帮助中找到有关如何使用文档组的更多信息。

00803 19072017

13.4. 示例实验

使用实验管理员可以定义并运行涉及使用本软件采集图像和分析图像的复杂实验。

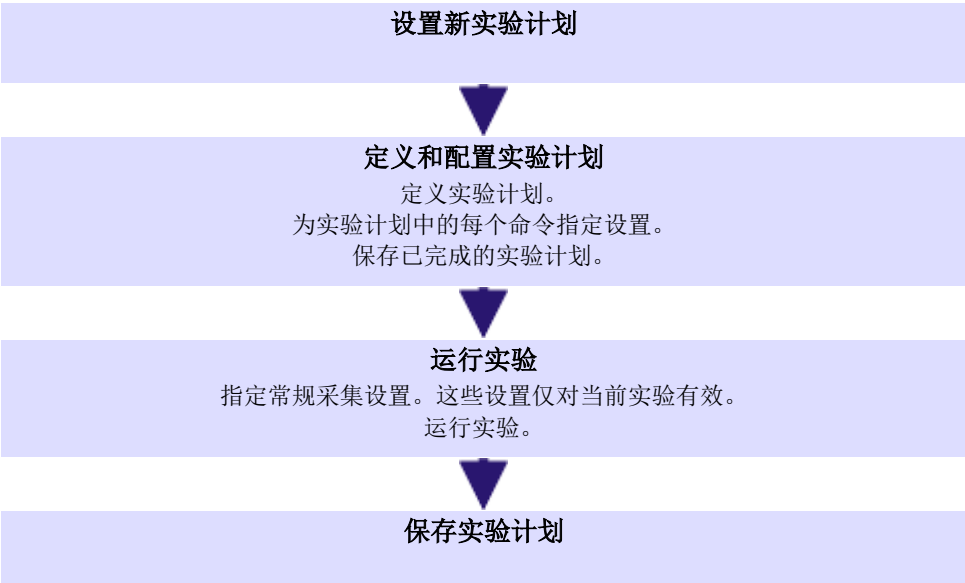
下面的说明将指导您逐步完成典型实验的定义。各个例子所描述的实验的复杂度逐渐增加。

- 采集荧光图像
- 采集多通道荧光图像
- 采集多维图像
- 采集快速荧光时间栈
- 在样品不同位置上采集多通道荧光图像

13.4.1. 采集荧光图像

任务	样品已使用 DAPI、FITC 和 TRITC 荧光色素染色。为采集若干荧光图像定义一个实验计划并运行实验。
先决条件	1. 系统已配置完毕。 2. 您已为色彩通道定义了合适的观测模式。

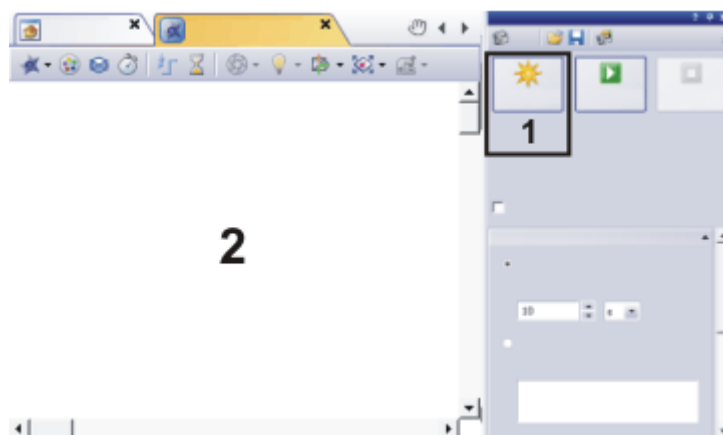
以下流程图显示了该流程的基本步骤。



设置新实验计划

1. 如有必要，请使用视图 > 工具窗口 > 实验管理员命令显示实验管理员工具窗口。
2.  在实验管理员工具窗口中，单击新建按钮可创建新实验。
 - 这会自动在文档组中创建一个新的实验计划类型的文档。
 - 实验计划包含自己的工具栏，其中提供可以在实验计划中使用的所有命令。到底哪些命令会显示在工具栏上取决于您的系统配置。
3.  在文档组中，实验计划由标题中的该图标标识。

- 实验计划的默认名称是 [实验 <序列号>](#)。在保存实验计划时，也可以将其名称更改为任意所需名称。名称旁的小星号表明文档还没有被保存。
请注意，该实验计划的名称没有链接到您在[实验管理](#)工具窗口中输入的实验名称。默认情况下，[实验名称](#)字段中的输入内容会成为利用该实验计划采集的图像的名称的一部分。



单击新建按钮 (1) 可创建新的空白实验计划 (2)。

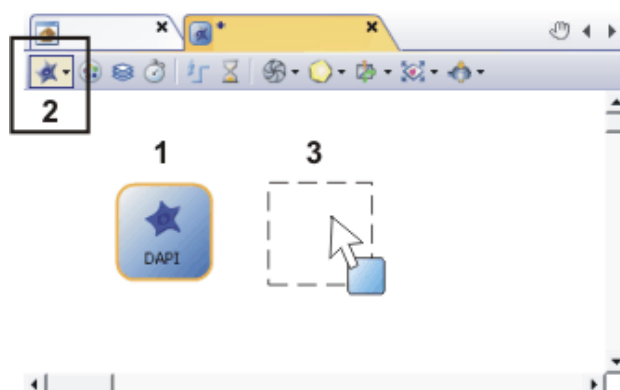
定义实验计划



- 定义第一个图像采集命令。
单击[图像采集](#)按钮旁的小箭头可打开一个菜单。选定您要为第一幅图像采集使用的观测模式，例如 [DAPI](#)。
 - 当前在本软件中定义的所有观测模式都会在该菜单中列出。

请注意: 实验开始时，会在整个实验期间使用当前设置的物镜和摄像头。如果已为观测模式中的摄像头或物镜定义了设置，然后将该观测模式添加至实验计划，则实验中不会自动采用这些设置。开始实验之前选择所需摄像头和物镜。为此，首先从[显微镜控制](#)工具窗口中的[观测模式](#)组中选择相应观测模式。

- 单击画布中要放置图像采集命令的位置，该命令在实验计划中使用 [DAPI](#) 观测模式。

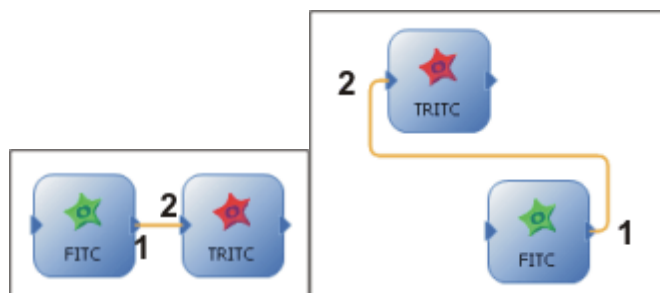


实验计划已经包含了使用 [DAPI](#) 观测模式 (1) 的图像采集命令。
单击[图像采集](#)按钮，将另一个图像采集命令添加到实验计划中 (2)。
您现在可以使用鼠标 (3) 在实验计划上移动图像采集命令了。

- 另外添加使用 [FITC](#) 和 [TRITC](#) 观测模式的其它两个图像采集命令，并将这些命令排列为一行。



- 这三个命令必须用直线彼此连接。该直线有箭头，由箭头明确地定义命令的顺序。根据命令相对于彼此放置的位置，它们可能已连接。
 - 默认情况下，会持续检查实验计划中是否存在错误。如果两个图像采集命令未连接，则会在实验计划的左上角显示黄色警告符号。将鼠标指针移动到警告标志上时，将显示针对已发现的语法错误的描述。
4. 可以手动定义实验计划中两个命令之间的连接口。为此，通过将命令边缘上的其中一个控制点拖动到后面的命令上的控制点，创建连接口。执行该操作时，始终必须将输出控制点（位于命令右侧）与输入控制点（位于命令左侧）相连接。
- 本软件会自动在实验计划中绘制连接口。移动实验计划中的命令时，会自动调整这些命令之间的连接口。



两个实验计划显示的是相同实验。首先使用 **FITC** 观测模式采集图像，然后使用 **TRITC** 观测模式采集图像。绿色 **FITC** 命令的输出控制点 (1) 已正确连接至红色 **TRITC** 命令的控制点 (2)。

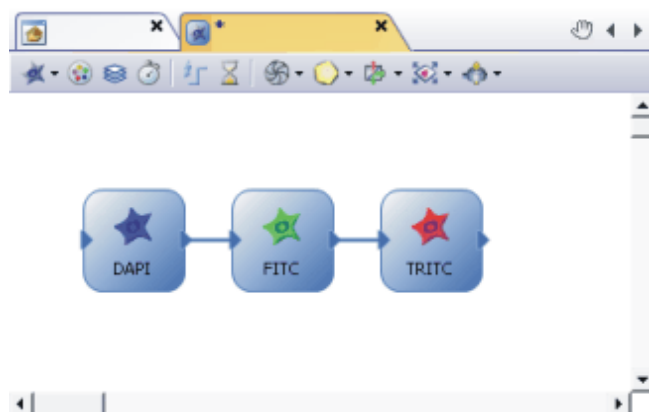
连接口在两个实验计划中均已选定，因此显示为彩色。

配置实验计划

为图像采集命令定义曝光时间和其它采集设置。

1. 在实验计划中选定 **DAPI** 命令。
 - 在**实验管理员**工具窗口中，**图像采集**、**摄像头设置**和**显示**组现在会显示出来。
2. 单击**应用设置**按钮。您可以在**实验管理员**工具窗口中的**图像采集**组中找到该按钮。
 - **DAPI** 观测模式在显微镜上指定。
3. 单击**实验管理员**工具窗口顶部的工具栏上的**实时观察**按钮可切换到实时模式。在实时图像中，检查曝光时间并在样品上进行聚焦。
 - 请注意: 实时图像覆盖了文档组中的实验计划。
当您再次关闭实时模式后，在默认情况下，实时图像会被关闭，您将会再次看到实验计划。
如果您为实时图像选定了不同的设置，您可以在结束实时模式后激活实验计划，例如，在**画廊**工具窗口中。
4. 在**实验管理员**工具窗口中设置分辨率和位深度。
设置曝光时间以及感光度或增益，以获得最优图像。
 - 请注意: 您也可以使用**摄像控制**工具窗口来优化实时图像。然而，“摄像控制”工具窗口中的采集设置不会自动传输至实验计划中的所选命令。为此，请单击**实验管理员**工具窗口中的**获取设置**按钮。
5. 以同样方式为 **FITC** 和 **TRITC** 命令定义采集设置。您可以为每一图像采集命令进行不同的设置。例如，以不同方式为不同荧光图像曝光，从而填补平光亮度中的差异。





实验计划包含三个单幅图像采集命令。由于图像采集命令已链接至观测模式，因此在图像采集之前，本系统会自动采用您在观测模式中定义的设置。(例如) 对于荧光图像的采集，会将所需棱镜模块放入光路。实验会生成三幅荧光图像。

运行实验

为运行实验指定若干常规采集设置。这些采集设置不会与实验计划一起被保存。



1. 单击位于 [实验管理员](#) 工具窗口的工具栏上的 [采集设置](#) 按钮。
2. 选定树状视图中的 [保存 > 流程/实验](#) 选项。
您可以在此指定是否要自动保存采集的图像以及如何自动保存采集的图像。您可以将采集的图像保存在一个数据库中或您选择的目录中。也可以关闭自动保存流程。在这种情况下，在完成实验后，采集的图像在本软件的文档组中保持打开状态。
3. 选定树状视图中的 [文档名 > 流程/实验](#) 选项。
您可以在此处指定应如何命名采集的图像。
4. [摄像控制](#) 工具窗口中的某些摄像头设置，如动态反虚化等，会针对整个实验进行全局设置。与采集设置一样，这些设置也不会与实验计划一起被保存。



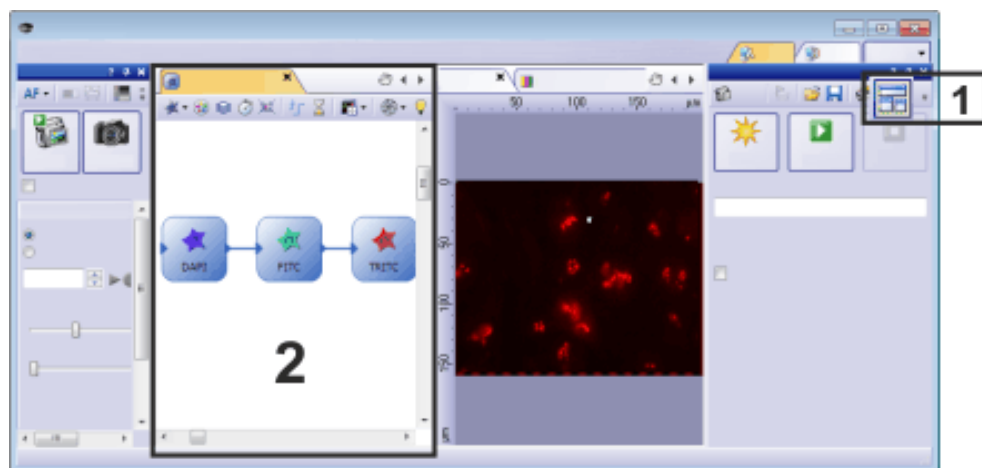
5. 单击位于 [实验管理员](#) 工具窗口顶部的工具栏上的 [保持实验可见](#) 按钮。
 - 该模式处于活动状态时，该按钮也处于活动状态。您可以通过按钮的背景颜色识别这种状态。



6. 请单击位于 [实验管理员](#) 工具窗口中的 [开始](#) 按钮来运行实验。
 - 请注意: 当实验计划在文档组中未处于活动状态时，您也可开始进行实验。如果已打开多个实验计划，则总是会开始最后一个活动的实验。
 - 实验随即启动。将采集三个单幅荧光图像。



- [保持实验可见](#) 按钮处于活动状态时，在开始实验后，会在实验计划中自动创建新的文档组。现在，在实验运行时，实验计划将保持可见状态。



按钮 (1) 处于活动状态时，会为实验计划自动创建新的文档组 (2)。

保存实验计划

1. 激活文档组中的实验计划。
2. 使用 [文件 > 另存为...](#) 命令保存实验计划。例如，在名称 [3_FL_Images](#) 下保存实验计划。
 - 实验计划将以 OEX 文件格式保存。
 - 如果已自动保存实验结果，则也会自动保存实验计划，因此会尽可能好地记录实验。自动保存的实验计划的命名与采集的第一幅图像类似。
可以在保存其它数据的相同目录中找到保存的实验计划。可以在 [采集设置](#) 对话框中指定存储位置。

13.4.2. 采集多通道荧光图像

采集具有三个色彩通道的荧光图像

样品已使用 DAPI、FITC 和 TRITC 荧光色素染色。为采集多通道荧光图像定义一个实验计划。
运行实验并采集一幅多通道图像。

1. 载入依次采集三幅荧光图像的实验计划。
2. 使用 [文件 > 另存为...](#) 命令可将实验计划以新的文件名保存。

插入“多通道属性”系统模板

本软件提供多个预定义典型图像采集命令。您可以使用这些系统模板快速创建实验计划。



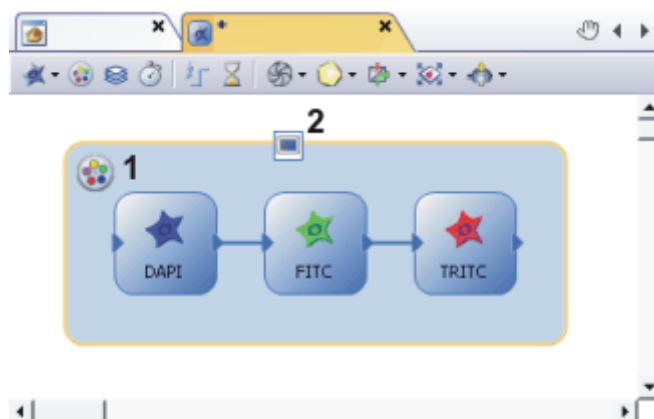
1. 单击 [实验模板](#) 按钮。该按钮位于实验计划的工具栏中。
 - 随即打开适用于实验模板的命令菜单。
2. 选择 [实验模板](#) 命令打开可用预定义实验计划列表。
3. 选择 [多通道属性](#) 条目将用于采集 3 通道荧光图像的命令插入当前实验计划中。
4. 单击实验计划中要放置该命令的所在位置的画布。
 - 本软件会将用于采集 3 通道荧光图像的命令插入当前实验计划中。该命令包含四个单独的命令：其中三个图像采集命令用于采集各个色彩

通道，另一个命令可在采集完三个色彩通道后将其合并为一个多通道图像。



- 本软件使用当前设备配置和当前观测模式。
- 您通常需要调整预定义采集命令。黄色警告符号指示可能的错误。将鼠标指针移动到警告符号上时，将显示针对已发现的错误的描述。

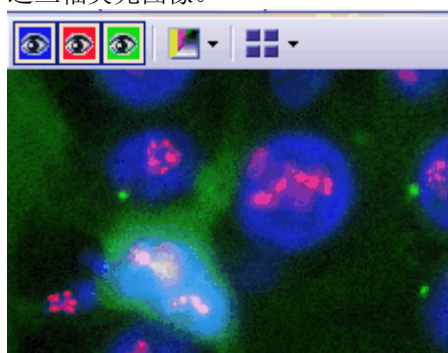
5. 选择单个命令并在[实验管理员](#)中配置这些命令。例如，您可以向一种图像采集命令分配不同的观测模式，或更改曝光时间。



插图显示了一个采集多通道图像的实验计划。
多通道组的名称 **(1)** 和动态显示的状态 **(2)** 显示在实验计划中。
实验会生成一幅具有三个色彩通道的多通道图像。



6. 测试实验。为此，请单击[实验管理员](#)工具窗口中的[开始](#)按钮。
 - 会立即开始采集多通道荧光图像。
 - 当您可以在[实验管理员](#)工具窗口中再次看到[开始](#)按钮时，表明采集已经完成。
 - 默认情况下，采集的荧光图像会在实验结束后显示在图像窗口中。在图像窗口中，所有三个色彩通道都彼此叠加，因此可以同时看到所有这三幅荧光图像。



7. 在图像窗口中，查看已经采集到的多通道荧光图像。如需必要，更改实验计划中各个命令的设置。

为各个色彩通道定义 Z 偏置

通常，每个色彩通道的聚焦位置不尽相同。扩展实验计划，并为每个色彩通道选择最优聚焦位置。



使用该实验计划采集具有三个色彩通道的多通道荧光图像。

1. 在实验计划中选择一个色彩通道。
2. 选择属于所选色彩通道的观测模式，并切换为动态模式。
3. 对焦到样品上。
4. 选中**实验管理**工具窗口中的**使用 Z 偏置**复选框。该复选框位于工具窗口的顶部。
 - **实验管理**工具窗口底部的**Z 偏置**组现在可用于图像采集命令。
5. 单击**Z 偏置**组中的**定义 Z 参考**按钮可将所选色彩通道定义为 Z 偏置的参考。
 - 该图标现在会显示在实验计划中的所选色彩通道上。
 - 当前 Z 位置显示在**定义 Z 参考**按钮旁。此 Z 位置用作其他色彩通道的 Z 偏置的参考值。
 - 由于不能输入参考图像的 Z 偏置，因此只要选择了参考色彩通道，**Z 偏置 (以 μm 为单位)** 字段便不可用。



在此实验计划中，定义了各个色彩通道的 Z 偏置。绿色通道用作参考。在**实验管理**工具窗口 **(1)** 中，选择一个其他色彩通道以查看其 Z 偏置值。在所示示例中，在采集红色通道之前，显微镜的 Z 传动装置相对于参考色彩通道的当前 Z 位置上升了 $8\ \mu\text{m}$ 。

6. 选择多通道组中的下一个色彩通道。
7. 选择属于所选色彩通道的观测模式，然后在样品上聚焦。
8. 单击**Z 偏置**组中的**读取 Z 偏置**按钮以采用显微镜样品台的当前 Z 位置。
 - 本软件会计算相对于参考色彩通道的 Z 位置的差异，并在**Z 偏置 (以 μm 为单位)** 字段中输入该值。
9. 定义多通道组中其他色彩通道的 Z 偏置。
 - 之后载入并运行实验计划时，在采集参考色彩通道之前进行聚焦。随后会相应调节其余色彩通道的聚焦位置。



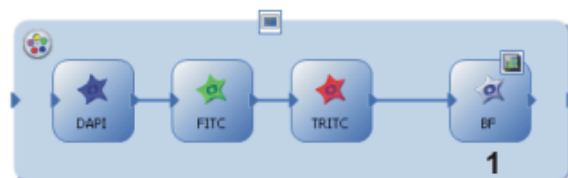
同时采集多通道荧光图像和透射光图像

任务

例如，展开实验计划，并使用明场观测模式另外采集透射光图像。



1. 在实验计划中选定多通道组。使用鼠标放大方框，使得组内有足够空间可用于其他图像采集命令。
2. 单击**图像采集**按钮旁的小箭头可打开一个菜单。为采集透射光图像选择一种观测模式，例如相衬、微分干涉对比 (DIC) 或明场。
将命令放置在多通道组中最后一个荧光图像采集的右边。
3. 将最后一个荧光图像采集命令与透射光图像采集命令连接。为此，请单击一个控制点，并在按住鼠标左键的同时，将鼠标指针移到另一个控制点。
4. 在实验计划中选定透射光采集的命令。
 - 在**实验管理员**工具窗口中，**图像采集**、**摄像头设置**和**显示**组现在会显示出来。
 - 当实验计划中选定的命令链接到透射光观测模式时，**图像采集**组中的**透射上衬**复选框可用。
5. 选定**实验管理员**工具窗口中的**透射上衬**复选框。现在，透射光图像被指派有位于荧光图像之上的自有图像层。
 - 该图标会显示在实验计划中采集透射光图像的命令上。
6. 为透射光图像的采集进行其它设置。
7. 请单击位于**实验管理员**工具窗口中的**开始**按钮来运行实验。
 - 随后，透射光图像还将与荧光图像一同采集，并与多通道荧光图像一同保存。该采集流程的结果是多层图像，您可以使用**层**工具窗口查看它。



插图显示了包含透射光图像的多通道采集的实验计划 **(1)**。

透射光图像采集命令在多通道组内。实验会生成一幅具有两个图像层的多层图像。一层为多通道图像，另一层为透射光图像。



或者，也可以使用该实验计划来采集包含透射光图像的多通道图像。在这种情况下，透射光图像采集命令在多通道组外。实验之后会生成两幅图像，一幅多通道图像和一幅透射光图像。在这种情况下，您无法将一幅图像放到另一幅图像上以查看叠加。

13.4.3. 采集多维图像

任务 为采集多通道 Z 图像栈定义一个实验计划。您希望以一小时为间隔多次重复采集多通道 Z 图像栈图像。
运行实验。

- 先决条件**
- 系统已配置完毕。
 - 您已为色彩通道定义了合适的观测模式。
 - 您的显微镜有电动 Z 传动装置。已经设置并校准了 Z 传动装置。

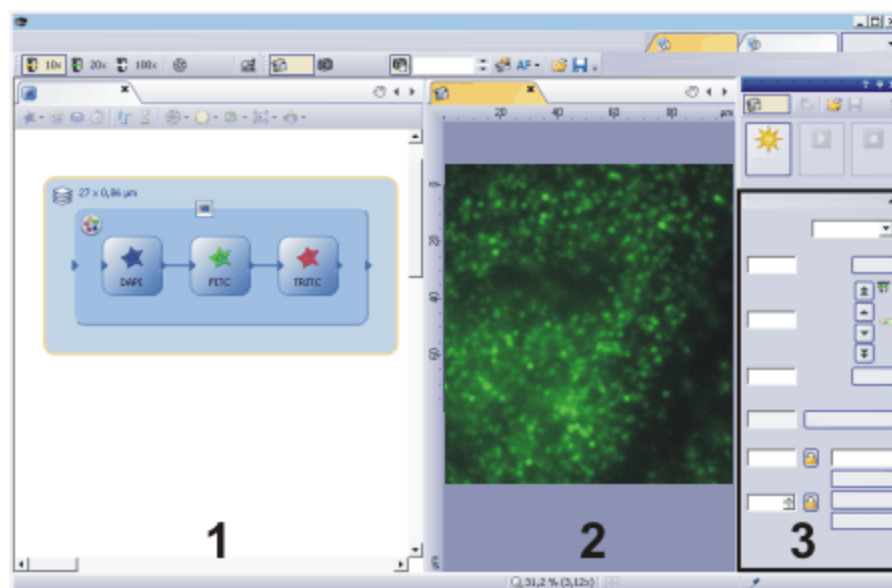
以下流程图显示了该流程的基本步骤。



准备采集



1. 为采集多通道荧光图像载入一个实验计划。或制定一个新的实验计划。
2. 使用 [文件 > 另存为...](#) 命令可将实验计划以新的文件名保存。
3. 在实验计划中选定一个图像采集命令，例如 **DAPI**。单击 [实验管理员](#) 工具窗口中的 [获取设置](#) 按钮，在显微镜上设置 **DAPI** 观测模式。
4. 单击位于 [实验管理员](#) 工具窗口顶部的工具栏上的 [实时观察](#) 按钮。
5. 排列文档窗口中的实时图像以及实验计划，以便可以同时看到两个文档。为此，请使用 (例如) [窗口 > 拆分与堆积 > 文档组 \(右边\)](#) 命令。
6. 对焦到图像上。



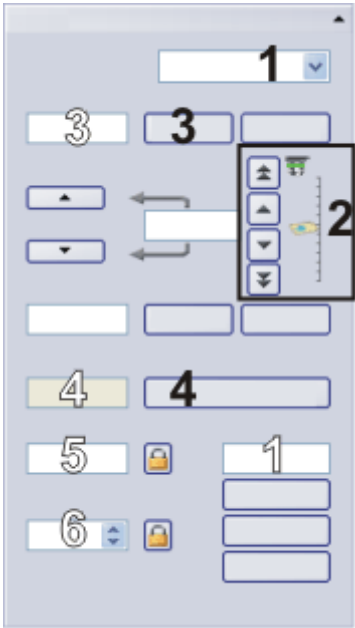
Z 图像栈采集的一些设置可以在实时图像中很方便地检查。您可以同时将实时图像 (2) 和实验计划 (1) 显示在文档窗口中。在实验计划中，选定了 Z 图像栈循环。在实验管理员工具窗口中 Z 图像栈组 (3) 现在可见。在此处设置采集参数。

添加 Z 图像栈循环



1. 单击 Z 图像栈循环按钮。您可以在实验计划顶部的工具栏上找到该按钮。
2. 在多通道组周围拖出一个方框。在执行 Z 图像栈循环中的所有命令后，显微镜的 Z 传动装置现在将自动移动到不同的 Z 位置。
 - Z 图像栈组会显示在实验管理员工具窗口中。在此处设置 Z 图像栈循环的采集参数。
3. 在实验管理员工具窗口中定义 Z 图像栈循环的采集参数。
 - 在描述的情况中，首先在 Z 位置采集整个多通道图像。只有在这之后，样品台才移动至下一个位置。还可以定义实验，以首先采集一个色彩通道的整个 Z 图像栈。然后观测模式会改变，之后为下一个色彩通道采集整个 Z 图像栈。

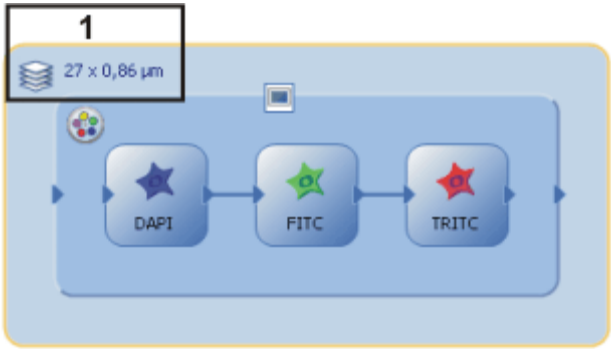
选定 Z 图像栈循环的采集参数



在实验管理员工具窗口中设置采集 Z 图像栈的参数。采集参数适用于当前实验计划中选择的 Z 图像栈循环。为此，请使用带有黑色数字的字段和按钮 (1-4)。本软件会自动计算并更新带有白色数字的字段中的值。

4. 在定义列表 (1) 中选定上下选项。
 - 样品台的当前 Z 位置将显示在位置 (1) 字段中。因为您已经进行了聚焦，这是聚焦位置。
5. 使用箭头按钮 (2)，将显微镜的 Z 传动装置向上移动至紧邻样品表面下方的结构清晰聚焦的 Z 位置。双箭头按钮会以更大的步距移动样品台。现在，沿相同方向再次移动 Z 传动装置相同距离。单击向上设置按钮 (3)。
 - 开始字段 (3) 将采用当前 Z 位置。
6. 现在，以完全相同的方式定义最终位置。
 - 建议步距字段 (4) 显示了 Z 图像栈中两个 Z 位置间所需的距离。所需距离取决于物镜的数值孔径及其它因素，会使用 Nyquist 法则自动计算。此流程可确保样品的任何部分在两帧之间都不会出现模糊。物镜的放大倍率和数值孔径越大，所需的距离就越小。
7. 如有必要，释放显示锁形图标的两个按钮。
8. 单击位于建议步距字段旁的应用按钮 (4)。
 - 步距字段 (5) 会采用建议步距字段中的值。
 - Z 切片字段 (6) 现在会显示 Z 图像栈循环会移动至多少个 Z 位置。将根据起始和结束值以及 Z 间距自动计算 Z 位置的数量。
9. 结束实时模式。





插图显示了一个采集多通道 Z 图像栈图像的实验计划。
实验计划会显示将移动到的 Z 位置的数量，以及 Z 间距 (1)。在本例中，将为每个通道采集 Z 间距为 0.86 µm 的 27 个单幅图像。

添加缩时循环



1. 单击**缩时循环**按钮。您可以在实验计划顶部的工具栏上找到该按钮。
2. 在整个多通道 Z 图像栈图像周围拖出一个方框。现在将重复采集多通道 Z 图像栈图像。采集的所有图像将组合为单个多维图像，即多通道 Z 图像栈图像。
 - **缩时循环**组会显示在**实验管理员**工具窗口中。在此处设置缩时循环的采集参数。
3. 在**实验管理员**工具窗口中，定义缩时循环的采集参数。

选定缩时循环的采集参数

The screenshot shows the 'Experiment Manager' tool window with several input fields and checkboxes. The first field is labeled '1' and contains the value '1'. The second field is labeled '3' and contains the value '3'. Below these are two checkboxes: the first is labeled '2' and is checked, and the second is labeled '1' and is unchecked. At the bottom, there are two more input fields: the first is labeled '1' and contains the value '1', and the second is labeled '2' and contains the value '2'.

在**实验管理员**工具窗口中设置采集缩时循环的参数。采集参数适用于当前实验计划中选择的缩时循环。为此，请使用带有黑色数字的字段和复选框 (1-3)。本软件会自动计算并更新带有白色数字的字段中的值。

4. 在**周期数**字段 (1) 中，输入命令在缩时循环中应以怎样的频率重复。例如，输入值 5，采集五幅多通道 Z 图像栈图像。
5. 清除**尽快**复选框 (2)。
6. 在**间隔**字段 (3) 中，输入两个周期之间所需的时间间隔。例如，输入值 0.5 h。现在，在之前采集开始后半个小时，将会开始采集新的多通道 Z 图像栈图像。
 - **大约最小间隔时间**字段 (1) 显示了执行当前缩时循环中所有命令所需的最小时间。在您选中**尽快**复选框时将需要该时间。
 - **整个循环所需时间**字段 (2) 显示了执行缩时循环所需的时间。

运行实验



插图显示了一个已完成的采集多通道图像的实验计划。它由三个嵌套循环构成。一个多通道组 (1)、一个 Z 图像栈循环 (2) 和一个缩时循环 (3)。结果是一个图像文件。



1. 请单击位于[实验管理员](#)工具窗口中的[开始](#)按钮来运行实验。
 - 实验随即启动。始终从外向内测量覆层。具体而言，在这种情况下，它意味着：
首先会采集一幅多通道荧光图像。
完成后，样品台的 Z 位置将更改，并会在新的 Z 位置上采集其它多通道荧光图像。
Z 位置会持续变化，直到使用了所有 Z 位置。
系统会等待半小时，然后重复图像采集。
 - 当您再次在[流程管理器](#)工具窗口中看见[开始](#)按钮，同时进度条不再显示时，即表示采集已完成。
 - 现在已根据为最后所使用的观测模式指定的设置来设置本系统的硬件组件。
 - 实验会生成单个多维图像。



采集快速荧光时间栈

现在可以使用实验管理员来采集非常快速的荧光时间栈。通过这种方式，可以用本系统的最高时间分辨率采集动态流程。



1. 定义一个包含荧光图像和缩时循环的实验计划。
2. 在实验计划中选定采集荧光图像的命令。
选定[实验管理员](#)工具窗口中的[流化](#)复选框。
 - 请注意[实验管理员](#)工具窗口的[图像采集](#)组中显示的采集时间。采集时间减少，这直接反映了流化产生的效果。
 - 请注意，流化会减少采集的持续时间，但总持续时间会稍微增加。总持续时间显示在[实验组](#)中[实验管理员](#)工具窗口的顶部。这是因为摄像头需要一些时间将自身切换到流化模式。此时间会加到总持续时间中。
 - 实验计划中荧光图像采集的命令现在看上去会稍微不同。



在左侧，可以看到使用 DAPI 观测模式的荧光图像采集的命令。
在右侧，流化复选框被选定。复选框的状态由实验计划中稍微变化的图标指示。



3. 在实验计划中选定缩时循环的命令。
选定实验管理员工具窗口中的尽快复选框。
4. 请单击位于实验管理员工具窗口中的开始按钮来运行实验。
 - 现在会以最高的帧速率采集时间栈中的所有图像，而不等待软件或硬件触发。例如，可以指定一种在图像采集之前打开快门并在图像采集之后重新关闭快门的观测模式。使用流化时，在时间栈采集的整个持续时间内，快门将保持打开状态。在不使用流化时，快门会在单幅图像采集之前打开，然后重新关闭。



这是使用 TRITC 观测模式快速采集荧光时间栈的实验计划的外观。

13.4.4. 在样品不同位置上采集多通道荧光图像

任务 定义可以用于在样品不同位置上采集多通道荧光图像的实验计划。实验始终应从特定样品台位置开始。
样品已使用 DAPI 和 FITC 荧光色素染色。

- 先决条件**
- 系统已配置完毕。
 - 您已为色彩通道定义了合适的观测模式。
 - 您的显微镜有电动 Z 传动装置。已经设置并校准了 Z 传动装置。
 - 您的显微镜有电动 XY 样品台。已经设置并校准了 XY 样品台。

1. 载入用于采集多通道荧光图像的实验计划，或创建新实验计划。
2. 检查每一图像采集命令的设置。

添加样品台位置



1. 单击 样品台循环按钮。您可以在实验计划顶部的工具栏上找到该按钮。
2. 在多通道组周围拖出一个方框。
 - 样品台循环组会显示在实验管理员工具窗口中。使用该组中的功能可定义样品上要采集多通道荧光图像的位置。
3. 将样品台移动至第一个位置并聚焦。
 - 要移动样品台，可使用显微镜控制工具窗口中的操纵杆或导航滚轮。如果已采集样品的预览图像，还可以在样品台导航器工具窗口的预览图像中单击样品上的位置。
4. 单击样品台循环组中的该按钮可将当前样品台位置添加至位置列表。
5. 选择更多位置以进行多通道荧光图像的采集。
 - 当前位置编号会在实验计划中显示。



- 实验开始时，样品台会依次到达位置列表中的所有位置。会在样品台循环内定义的每个位置执行实验。在该示例中，将在每个位置采集多通道荧光图像。



实验计划包含具有 8 个样品台位置的样品台循环 (1)。在每个样品台位置采集双通道荧光图像。

检查样品台位置

可以返回已定义的样品台位置来检查它们，必要时可以随时从位置列表删除它们。



1. 选择实验计划中的样品台循环。
2. 在[实验管理员](#)工具窗口中，单击该按钮。
 - [位置列表](#)对话框随即打开。它会显示当前定义的所有样品台位置。
3. 在列表选定一个位置。
4. 单击[移至位置](#)按钮可将显微镜样品台移动到所选位置。
5. 单击[删除位置](#)按钮可删除所选位置。现在，无法再为实验使用该位置。
6. 请单击位于[实验管理员](#)工具窗口中的[开始](#)按钮来运行实验。

开始实验



- 样品台会依次移动到所有样品台位置。在每个样品台位置采集多通道荧光图像。
- 实验会生成 8 幅多通道荧光图像。
- 该实验现在会在样品上的相同位置生成不同荧光的时间栈。
- 可以在[亮度剖面](#)工具窗口中查看计算得到的亮度剖面。在该工具窗口工具栏的列表中，选择要查看其亮度剖面的图像。
- 该图像将在下次分析中用作感兴趣区的参照图像。

13.5. 使用现有实验计划

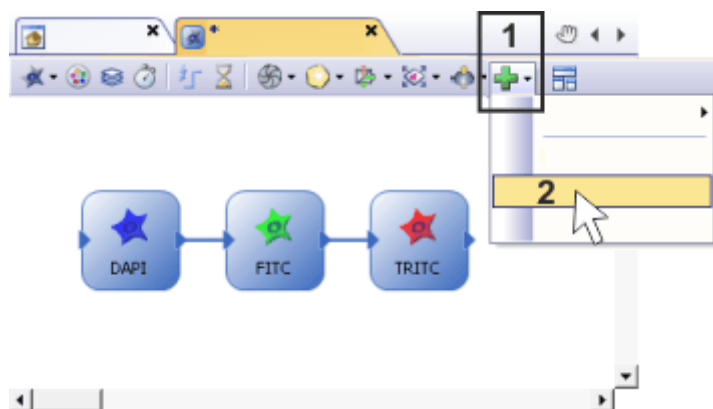
调整现有实验

您可以随时查看并编辑各个命令的设置。

1. 如果**实验管理员**工具窗口没有显示，请使用**视图 > 工具窗口 > 实验管理员**命令使其显示。
2. 载入一个已保存的实验计划。实验计划的文件扩展名为 OEX。
3. 选定实验计划中您想要编辑的命令，例如，图像采集。
 - 您可以在**实验管理员**工具窗口中查看并更改选定命令的所有当前设置。
4. 使用更改后的设置保存实验计划。

创建自己的实验模板

您可以将实验计划中的命令或命令组保存为实验模板。这将方便您再次使用它们。



此实验计划可以连续采集三个荧光图像。将组保存为实验模板。



1. 定义实验计划。例如，您可以定义依次采集三个荧光图像的实验计划。
2. 单击 **实验模板** 按钮 (1)。该按钮位于实验计划的工具栏中。
 - 随即打开适用于实验模板的命令菜单。
3. 选择**将当前实验添加到收藏夹模板** 命令 (2)。
 - 用于保存实验模板的对话框即会打开。
4. 在**名称**字段中输入实验模板的描述性名称。
5. 在**访问**选项中，您可在对话框底部指定实验模板仅可供您自己使用，或供所有用户使用。
 - 系统初始预设为新实验模板仅供保存它的用户使用。您可以通过名称旁的小图标 (🔒) 识别这种状态。
 - 选定**公共**选项。现在实验模板便可供其他用户使用了。您可以通过实验模板名称旁的小图标 (👤) 识别这种状态。
6. 单击**保存**按钮保存新实验模板。
 - 现在即可在**收藏夹模板**菜单中找到新实验模板。单击**实验模板**按钮打开菜单。



- 将使用该实验当前所选择的同一设置保存实验模板中的命令。如果更改设备配置，例如删除观测模式，实验模板将不会进行相应调整。黄色警告符号指示可能的错误。将鼠标指针移动到警告符号上时，将显示针对已发现的错误的描述。

00801 19072017

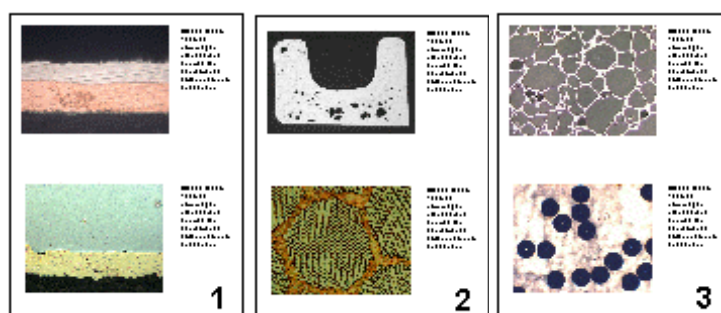
14. 使用报表

14.1. 总览

您能够利用本软件创建报表，以记录工作成果，并将其提供给第三方。可将报表以文件或打印文档形式共享。

报表的创建总是涉及两个程序：您的图像分析软件和微软公司的 MS-Word 应用程序。

因此，在您使用报表时，计算机上必须安装有这些程序。您可以使用 MS-Word 2007、2010 或 2013 来处理报表。



插图显示 MS-Word 格式的报表。

生成报表的不同方式

使用报表的需求根据用户和工作方式的不同有很大不同。因此有不同的创建报表的步骤。

使用“报表生成器”工具窗口创建 MS-Word 报表

适用于经常创建以相同方式构成且包含大量图像的报表的用户，以及需要这些报表采用 MS-Word 格式的用户。

为此，本图像分析软件应在前台打开。在**报表生成器**工具窗口中，打开或创建一个报表指令 (RCI 文件)，在其中指定报表应包含哪些图像以及哪一页布局。然后，通过按一下按钮便可创建在 MS-Word 中显示的报表。现在在 MS-Word 中，您只需要对报表进行小的修改。您可在在线帮助中找到有关**报表生成器**工具窗口的更多信息。

使用 Olympus MS-Office 插件创建并编辑报表

适用于要将通过图像分析程序创建的图像或文档插入新的或现有 MS-Word 文档的用户。

为此，本图像分析软件应在后台打开。可使用 Olympus MS-Office 插件将图像、工作簿或图表从软件插入 MS-Word 文档。为此，可以使用模板。通过 MS-Word 报表，您定义了 DOC 或 DOCX 文件格式的**页面模板**。

使用“报表生成器”工具窗口创建报表时的流程



使用 Olympus MS-Office 插件生成报表



00112 27012015

14.2. 使用报表生成器

报表生成器工具窗口将在您创建和更新报表指令时提供支持。在该工具窗口中，您还可找到用于启动报表创建的**创建**按钮。

请注意: 使用**报表生成器**工具窗口创建报表涉及两个程序: 本软件和 MS-Word 应用程序。您可以使用 MS-Word 2016、2013 (SP1) 或 2010 (SP2) 来处理报表。

如果**报表生成器**工具窗口没有显示，请使用**视图 > 工具窗口 > 报表生成器**命令使其显示。

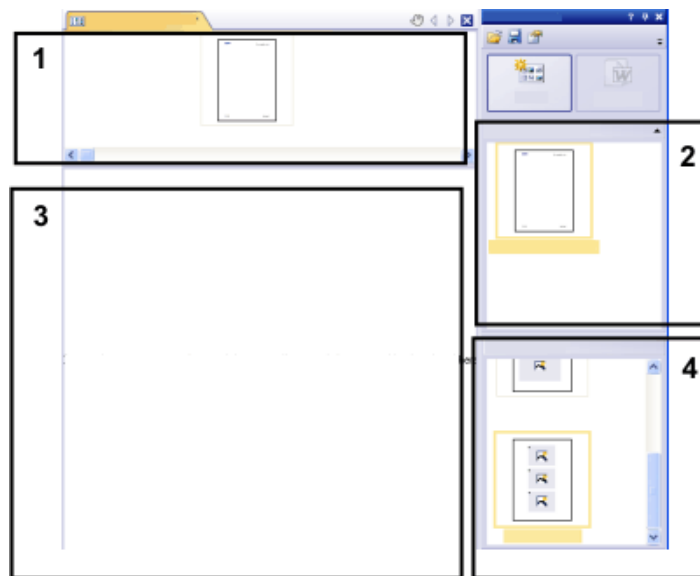
创建新报表指令

要创建报表，请首先在本软件中创建新报表指令。您也可以使用已保存的报表指令。

请注意: 报表指令必须包含至少一个已注册的页面模板。您可以在在线帮助中找到有关注册页面模板的更多信息。



1. 切换至**报表**布局。
2. 单击**新建报表指令**按钮。该按钮位于**报表生成器**工具窗口中。
 - 文档组中即会创建**报表指令**类型的新文档。该文档同时也是您将报表整合在一起的工作界面。



3. 如果尚未定义默认文档模板: 将您想要的文档模板拖动至报表指令的上部**(1)**。您会在**报表生成器**工具窗口的上部**(2)**找到可用文档模板列表。
 - 如果已经定义了默认文档模板，则该模板将被自动插入新报表指令的上部。
 - 在报表指令的上部留空时，也可以创建报表。在这种情况下，将使用默认的 MS-Word 文档模板。
4. 将您想要的页面模板拖动至报表指令的下部**(3)**。您可在**报表生成器**工具窗口的下部**(4)**找到可用页面模板的列表。
 - 每个报表必须包含至少一个页面模板。



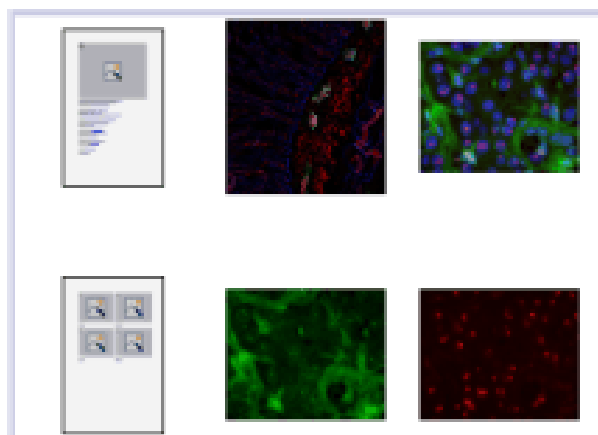
- 确保该页面模板包含您想要拖动至报表指令的文档类型的正确占位符。相应地，如果您的报表要包含图像或图表，请选择包含一个图像占位符和一个图表占位符的页面模板。
- 如果要在报表中使用工作簿，则计算机上必须安装有 MS-Excel。MS-Excel 的最低版本要求为 MS-Excel 2007。
- 工作簿占位符也可用于 MS-Excel 文件。为此，请将 MS-Excel 文件从 MS-Windows Explorer 拖至报表指令。在报表指令中，MS-Excel 文件显示为该图标：

5. 将您想要的文档拖动至报表指令的下部 (3)。



- 在报表布局中，数据库、文档和画廊工具窗口在文档窗口左边。在每个工具窗口中，您可以选择一个或多个文档并将其拖动至报表指令上。如果您使用数据库工具窗口，同样无需打开这些文档。打开数据库即可。然而，画廊工具窗口仅允许您选定本软件中当前打开的文档。
- 您还可以将 MS-Word 文件 (例如关于项目的背景信息) 集成到 MS-Word 报表中。MS-Word 文件不需要报表指令中的占位符。将 MS-Word 文件从 MS-Windows Explorer 拖至报表指令。在报表指令中，MS-Word 文件显示为该图标：
- 文档必须已经保存，因为未保存的文档无法包括在报表中。

6. 现在检查报表指令。您仍然可以对其进行编辑，还可删除或移动文档，或者选定其它页面模板。

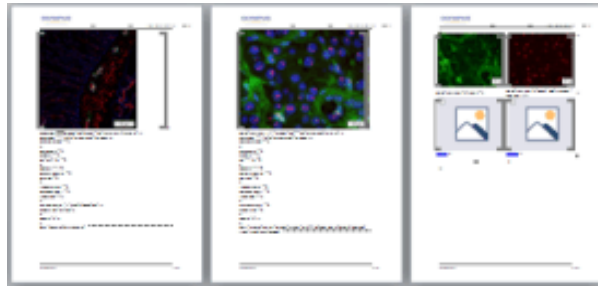


插图显示了报表指令的一个示例。该报表中使用两个不同的页面模板。第一个页面模板包含一个图像占位符，第二个页面模板包含两个图像占位符。页面模板的后面显示的是要插入报表页面的图像。

创建报表



1. 单击创建按钮。该按钮位于报表生成器工具窗口中。
 - 报表即被创建。当涉及包含许多图像和文档的大型报表时，创建报表可能会耗费一些时间。请留意显示的进度条。MS-Word 应用程序将自动打开并显示新报表。在如下所示的示例中，报表含有三个页面。(第一个页面模板仅包含一个图像占位符，而且报表指令中已添加了两个图像，这会自动导致创建两个报表页面。)
2. 如果需要，您仍然可以在 MS-Word 应用程序中进行其它更改。为此，请使用 Olympus 加载项。
3. 如果需要，请保存报表指令和报表。



编辑报表指令

您可以对报表指令进行下述更改。这些更改不会应用于已经根据该报表指令创建的报表。因此您必须创建新的报表才能看到您所作的更改。这将生成新的 **MS-Word** 文档。您在原报表中所作的所有更改不会包含在新创建的 **MS-Word** 文件中。

- | | |
|--------|--|
| 更换文档模板 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 载入您要编辑的报表指令。 <ul style="list-style-type: none"> • 报表指令的文件扩展名为 RCI。 2. 要删除文档模板，请将其选定并按键盘上的 [Del] 键。 3. 将新文档模板拖动至该报表指令的上部。 <ul style="list-style-type: none"> • 通过执行此操作，文档模板即被更换。请注意，报表指令只能包含一个文档模板。 • 报表指令不得包含任何文档模板。当您把报表指令的上部留空时，将采用 MS-Word 默认文档模板。 |
| 更改页面模板 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 载入您要编辑的报表指令。 2. 在报表指令中选定您要更换的页面模板。 3. 按键盘上的 [Del] 键从报表指令中删除已选定的页面模板。 <ul style="list-style-type: none"> • 通过执行此操作，您仅取消选择了页面模板，而没有删除任何文件。 4. 将新页面模板拖动至报表指令中已删除的页面模板曾经所在的位置。 <ul style="list-style-type: none"> • 每个报表必须包含至少一个页面模板。 |
| 移动页面模板 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 要将页面模板移至报表指令中的其它位置，请将其选定，然后按住鼠标左键将其拖放至新的位置。 <ul style="list-style-type: none"> • 在某些情况下，这可能会显著改变报表的外观。报表指令中继该页面模板之后的所有文档都将在报表中使用该页面模板。 |
| 删除文档 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 载入您要编辑的报表指令。 2. 在报表指令中选定您要删除的文档。 <ul style="list-style-type: none"> • 标准 MS-Windows 惯例适用于多重选择。 3. 按键盘上的 [Del] 键可删除报表指令中的所有选定文档。 <ul style="list-style-type: none"> • 通过执行此操作，您仅会撤消文档选择，而不会删除任何文件。 |

添加文档 您可以随时将新文档添加至现有报表指令。

1. 载入您要编辑的报表指令。
2. 只需将新文档拖动至报表指令中您希望的位置。
 - 可将来自数据库、文档和画廊工具窗口的图像拖放至报表指令中。
 - 请注意，拖放图像之前必须先放置页面模板。

移动文档 您可以随时更改所选文档在报表指令中排列的顺序。

1. 载入您要编辑的报表指令。
2. 选定一个图像，按住鼠标左键，将其拖放至另一位置。

00153 27012017

14.3. 使用 Olympus MS-Office 插件

安装本软件后，Olympus 的加载项会被添加到 MS-Word 应用程序中。启动 MS-Word 时，可以通过显示的 Olympus 选项卡识别它。

请注意: Olympus 选项卡上的语言与您在本地图像分析软件中设置的语言相对应。该语言可能与 MS-Word 应用程序中的语言不同。

插件的功能

该加载项会协助您完成许多不同的任务。

1. 将当前在图像分析软件中打开的文档插入到 MS-Word 文档。
2. 将保存在本地或图像分析软件的数据库中的文档插入到 MS-Word 文档。
3. 将包含保存在本地图像分析软件中的信息的数据段插入到 MS-Word 文档。例如，在需要查看特定图像的采集日期时，该操作就很有帮助。
4. 添加一个或多个细节放大到图像。
5. 例如，更改图像属性，以及设置是否显示信息印记和标尺。
6. 更改报表中的一个或全部图像的分辨率。如果要共享报表，降低分辨率很有用，因为这样可以降低文件大小。
7. 更新报表中的所有占位符。例如，如果在本地图像分析软件中对报表尚未包含的文档进行了更改，该操作就很有帮助。
8. 您将 MS-Word 文档插入到您的软件的数据库中。此命令仅在您的软件支持数据库功能时可用。
9. 定义要用于报表的模板。通过 MS-Word 报表，您定义了 DOC 或 DOCX 文件格式的页面模板。

10404 27012015

14.4. 创建和编辑新模板

创建 MS-Word 的模板

在安装图像分析软件的过程中，一些预设的模板也会被安装。除此之外，您也可以定义自己的模板。通过 MS-Word 报表，您定义了 DOC 或 DOCX 文件格式的 **页面模板**。

模板内容

在模板中，占位符设置用于报表要包含的文档。占位符可用于图像、图表、工作簿和字段。例如，当报表要包含的页面的顶部有图像且图像下面有图表时，您应设置这样的模板，其有分别用于图像和图表的占位符。

请注意：出于技术原因，模板必须由且仅由一个页面构成。因此，如果您需要若干自定义的模板页面，则需创建一些独立的文件。

创建模板和添加文档占位符

1. 在 MS-Word 应用程序中，选定 [文件](#) 选项卡，然后选择 [新建](#) 选项。
2. 如果不想使用现有的页面模板作为模板，而是要从新模板开始，请选择 [空白文档](#) 选项。
3. 确定是否为图像、图表或工作簿插入占位符。在 [Olympus](#) 选项卡上，单击以下按钮之一：[插入图像占位符](#)、[插入图表占位符](#)、[插入工作簿占位符](#)。这些按钮属于 [模板组](#)。您可在在线帮助中找到有关工作簿的更多信息。
 - 即会插入所选的占位符。
4. 如有必要，可更改占位符的大小。为此，请将鼠标移到手柄上，然后按住鼠标左键不放，将其拖动到所需方向。长宽比将保持不变，以便对象不会因该操作而变形。
5. 双击图像的占位符可更改其外观的默认设置。
 - [图像属性](#) 对话框即会打开。可在在线帮助中找到更多信息。
6. 如果需要，可为图像、图表或工作簿插入更多占位符。确保模板不大于页面。
7. 如果您愿意，可以为字段插入占位符。该字段可显示有关占位符的附加信息，例如名称或设置该占位符的日期。可在下方更远处获得有关插入字段或为字段插入占位符的更多信息。
8. 保存模板。对页面模板使用 DOC 或 DOCX 文件格式。选择在软件中为用户模板或工作组模板设置的相同目录作为存储位置。
9. 关闭文件。

调整插入顺序

占位符按照插入时的顺序进行编号。如果最初已经为两个图像设置了占位符，然后决定为页面正上方的图表设置占位符，则插入顺序将如以下左图中所示。

1. 这种情况下，单击 **Olympus** 选项卡上的**调整插入顺序**按钮，将从顶部到底部对插入顺序进行连续编号 (见示例)。



为字段插入占位符

1. 在模板中，选定要插入到字段中的占位符。
2. 在 **Olympus** 选项卡上，单击**插入字段占位符**按钮。您可以在**模板**组中找到该列表。
 - **插入数据段**对话框将会打开。您可在在线帮助中找到关于此对话框的说明。
 - 在**占位符**列表中，将显示您要插入到字段中的占位符的名称。
3. 在**可用数据段**列表中，选择要插入的字段。该列表中的条目按照层级排列。单击加号可展开此列表。
 - 有两种类型的数据段可用。
文档属性列表包含在本软件中默认为该文档类型管理的数据段。
数据库数据段列表包含在所选占位符的数据库中可用的所有数据段。
 因此，数据库必须已经打开。
4. 保持**插入数据段**对话框打开。将鼠标指针放在报表中您想插入数据段的位置。
5. 在**插入数据段**对话框中，单击**插入**按钮。
 - 随后将显示字段的占位符。可通过花括号和所显示的字段名称来识别它。
6. 如有必要，请为其它字段添加占位符。为此，请重复以上三个步骤。
7. 关闭**插入数据段**对话框。
8. 保存模板

00402

14.5. 编辑报表

使用报表生成器工具窗口创建 MS-Word 报表的用户注意事项

有多种方法可以编辑报表，并针对其预期用途进行优化。为此，请使用 Olympus 加载项。

如果需要对您使用报表生成器工具窗口创建的报表进行一些更改，那么在进行更改之前，应确定是在报表中 (即在 MS-Word 中) 还是在报表指令中 (即在本软件中) 进行更改更好。

通常，建议首先更改报表指令，然后创建新报表。对于使用该报表指令创建的每一个后续报表，在报表指令中进行的更改都是有效的。只能在报表指令中进行的更改有很多种，如选择其它页面模板。但是，在报表中进行的更改仅对于这一特定报表有效。

更改图像属性

图像传送到报表时，也会传送图像链接。这样，便可更改报表中的图像显示 (如滚动图像片段)。

1. 双击图像可打开图像属性对话框。如果图像位于组合在一起的对象中，首先选定该组合，然后双击图像。
2. 如果显示校准标尺、信息印记和边界这些元素未显示，则在显示组中选中其复选框。
 - 可以在选项 > 图像信息对话框中定义这些元素的属性。点击选项按钮打开该对话框。
3. 在大小组中，选择其中一个选项来指定图像在报表中的显示大小。您可在在线帮助中找到有关这些选项的更多信息。
4. 如果要将设置应用于以后的图像，请单击设置为默认值按钮。
5. 单击 OK 按钮。
 - 图像属性对话框即会关闭。更改的图像属性现在将会显示在报表中。

调整文档

在报表中，您可以选择“图像”或“图表”类型的文档，然后选择 Olympus 选项卡中的调整文档选项卡。随后可在图像分析软件中进行更改，您可以在软件中编辑文档，然后自动更改回报表。

示例:
在 MS-Word 应用程序中，编辑包含多个图像的报表。对于特定图像，注意到丢失了重要的测量。如果使用调整文档按钮，便可以在图像分析软件中进行更改，添加丢失的测量，然后更改回 MS-Word 以继续编辑报表。

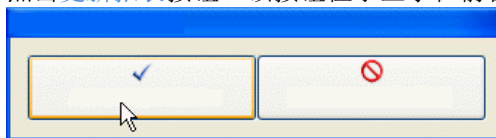
调整图像

1. 打开报表，然后选择需要调整的图像。如果图像位于组合在一起的对象中，首先选定该组合，然后选定该图像。
2. 在 Olympus 选项卡上，单击调整文档按钮。
 - 切换到图像分析软件。如果该软件已关闭，则会启动并显示在前台。
 - 即会打开要调整的图像。如果该图像来自当前已关闭的数据库，则数据库会在后台打开。

请注意: 图像分析软件现在处于特殊的“调整-文档”模式。在该模式下，仅可以对图像进行特定调整。这就是为什么隐藏了其它多个功能。

3. 进行所需的更改。

4. 如果图像信息已更改: 在图像分析软件中保存图像。
 - 对图像进行的某些更改并非必须保存, 如选择多维图像中的其它帧时。而必须保存其它更改, 如添加测量。显示在文档组中文件名后的星号表示必须保存更改。
5. 点击[更新报表](#)按钮。该按钮位于显示在前台的[调整文档](#)消息框中。



- MS-Word 应用程序现在又会显示在前台。已编辑的图像将被显示。您现在可以继续编辑报表。
- 如果在您单击[调整文档](#)按钮之前, 图像分析软件已关闭, 那么它会再次关闭。如果对于该命令, 必须打开任何图像或数据库, 那么它们也会关闭。

编辑报表中的工作簿

本软件支持工作簿的处理。例如, 在您打开[测量和感兴趣区](#)工具窗口并导出结果表格时, 创建工作簿。

您可在在线帮助中找到有关工作簿的更多信息。

请注意: 如果要在报表中使用工作簿, 则计算机上必须安装有 MS-Excel。您需要 MS-Excel 2007、2010 或 2013。

除了“图像”和“图表”文档类型外, 报表还可包含工作簿。工作簿作为 Excel 对象导入 MS-Word。您可以在报表中继续编辑。

1. 在报表中, 双击工作簿。如果工作簿位于组合在一起的对象中, 首先选定该组合, 然后选定该工作簿。
 - 您将会更换到编辑模式。现在, 会显示列标题和行号, 这时即可识别该模式。编辑模式下, 您可以查看工作簿的所有工作表。
2. 如果需要, 请选择需要编辑的工作表。
3. 双击工作簿切换到编辑模式。进行所需的更改。
 - 要为各个单元格设置不同的格式时, 请选择单元格然后使用上下文菜单中的[设置单元格格式...](#)命令。
 - 要为完整工作表设置不同的格式 (如其它字体或其它背景色) 时, 选择完整工作表 (如使用键盘快捷键 [Ctrl + A]), 然后选择上下文菜单中的[设置单元格格式...](#)命令。
 - 要隐藏某列时, 单击列的标题, 然后选择上下文菜单中的[隐藏](#)命令。
4. 通过单击报表中工作簿以外的任何点退出编辑模式。

更改图像分辨率

默认情况下, 报表的所有图像均以 192 dpi 的分辨率传输至报表。在某些情况下, 更改报表中各个图像或所有图像的分辨率很有用, 例如, 如果要打印报表, 则可以提高分辨率。另外, 如果要 will 报表发布到互联网上, 可以降低分辨率。

1. 在 MS-Word 中打开报表。决定是要更改所有图像的分辨率, 还是只更改特定图像的分辨率。
2. 如果只需要更改一个单幅图像的分辨率, 请选定该图像。如果您要更改所有图像的分辨率, 则不需要进行选定。
3. 在 [Olympus](#) 选项卡上, 单击[更改图像分辨率](#)按钮。

- [更改图像分辨率](#)对话框即会打开。
- 4. 在[应用至](#)组中选定所需的选项。您可以在[选定图像](#)和[报表中的所有图像](#)之间选择。
 - 如果单击该按钮时未选择任何图像，则[选定图像](#)选项处于非活动状态。
- 5. 在[图像分辨率](#)组中指定要如何更改图像分辨率。如果选择[用户定义](#)选项，则可以在 [DPI](#) 字段中输入在 96 和 600 dpi 之间选择的任何分辨率。
- 6. 单击[确认](#)按钮更改图像分辨率。
- 7. 检查是否满意更改过的图像分辨率。如不满意，请重新更改图像分辨率。
 - 您可以降低图像分辨率后保存报表，然后再次增大图像分辨率。这是可行的，因为每次单击[更改图像分辨率](#)按钮时，均会再次将图像从本软件传输至 MS-Word。
- 8. 当您对图像分辨率的变化满意后，保存报表。查看 Windows Explorer 中新文件的大小。

更新占位符

利用[更新占位符](#)按钮，可以轻易地使在创建报表后对图像进行的任何更改也显示在报表中。请注意，如果要在单击[更新占位符](#)按钮时使在本软件中进行的所有更改均显示出来，则必须保存这些更改。

示例: 在 MS-Word 中，打开之前创建的报表。同时，在图像分析软件中更改了很多图像 (如添加了测量)。现在，需要更新报表以使其显示所有图像的最新版本。

1. 如果只需要更新一个占位符，则只选定该占位符。
2. 在 [Olympus](#) 选项卡上，单击[更新占位符](#)按钮。
 - [更新占位符](#)对话框随即打开。
3. 在[更新占位符](#)对话框中，指定是否应更新所有占位符。
4. 当报表中含有需要更新的数据段时，选中[更新与占位符链接的数据段](#)复选框。
 - 您可在在线帮助中找到有关这一主题的更多信息。
5. 单击 [OK](#) 按钮。
 - 占位符将会随即更新。

插入文档

您可以在报表中的任意位置插入文档。例如，如果您已使用[报表生成器](#)工具窗口创建了一个报表，并且正在查看它时，发现忘记了某个图像，就可以逆向将它插入报表中。

1. 将鼠标指针放在报表中您想插入文档的位置。
2. 在 [Olympus](#) 选项卡上，单击[插入文档](#)按钮。
 - [插入文档](#)对话框将会打开。
3. 在左侧区域中，选择文档的来源。您有以下几种方法:
 - 如果想插入的文档当前在本软件中已打开，请选择[打开文档](#)选项。
 - 如果您想插入的文档为当前所选数据库文件夹中一部分，请选择[数据库](#)选项。为此，必须在本软件中打开数据库。如果您使用的软件版本不支持数据库，则[数据库](#)选项将被隐藏。

- 如果您想插入的文件保存于计算机或您的网络中，请选择[文件浏览器](#)选项。
- 4. 选择文档预览中的所需文档。单击[插入](#)按钮。
 - 所需文档即会插入报表中。
 - [插入文档](#)对话框保持打开。
- 5. 立即插入更多文档，或关闭对话框。
 - 将保存所插入的所有文档的路径。这样，稍后便可使用[更新占位符](#)按钮 (在文档插入报表后经过修改的情况下) 更新插入的文档。

插入字段

您可以在报表中插入更加详细描述图像的数据段。本图像分析软件中为该图像保存的所有值均会显示在该数据段中。

1. 选择报表中要插入数据段的图像。如果图像位于组合在一起的对象中，首先选定该组合，然后选定该图像。
2. 在 [Olympus](#) 选项卡上，单击[插入数据段](#)按钮。
 - [插入数据段](#)对话框将会打开。您可在在线帮助中找到关于此对话框的说明。
 - 在[占位符](#)列表中，将显示您要插入数据段的图像的名称。
3. 在[可用数据段](#)列表中，选择要插入的数据段。该列表中的条目按照层级排列。单击加号可展开此列表。
 - 有两种类型的数据段可用。
[文档属性](#)列表包含在本软件中默认为该文档类型管理的数据段。
[数据库数据段](#)列表包含在所选占位符的数据库中可用的所有数据段。
 因此，数据库必须已经打开。
4. 保持[插入数据段](#)对话框打开。将鼠标指针放在报表中您想插入数据段的位置。
5. 在[插入数据段](#)对话框中，单击[插入](#)按钮。
 - 字段内容将显示在报表中。
6. 如有必要，添加更多字段。为此，请重复以上三个步骤。
7. 关闭[插入数据段](#)对话框。
8. 保存报表。

请注意: 如果要使特定字段的内容经常显示在报表中，您可以将该字段 (或该字段的占位符) 插入页面模板中。然后，每个报表中均会自动填写该数据段。

00403 27012015

OLYMPUS[®]

www.olympus-global.com

制造商:

OLYMPUS CORPORATION

Shinjuku Monolith, 2-3-1, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-0914, Japan

发布商:

OLYMPUS EUROPA SE&CO.KG

Wendenstrasse 14-18, 20097 Hamburg, Germany

OLYMPUS SCIENTIFIC SOLUTIONS AMERICA CORP.

48 Woerd Avenue Waltham, MA 02453, U.S.A.

OLYMPUS SINGAPORE PTE LTD.

491B River Valley Road, #12-01/04 Valley Point Office Tower, Singapore 248373

OLYMPUS AUSTRALIA PTY.LTD.

3 Acacia Place, Notting Hill VIC 3168, Australia

OLYMPUS LATIN AMERICA, INC.

5301 Blue Lagoon Drive, Suite 290, Miami, FL 33126, U.S.A.

OLYMPUS KOREA CO., LTD.

8F Olympus Tower, 446 Bongeunsa-ro, Gangnam-gu, Seoul, 06153 Korea