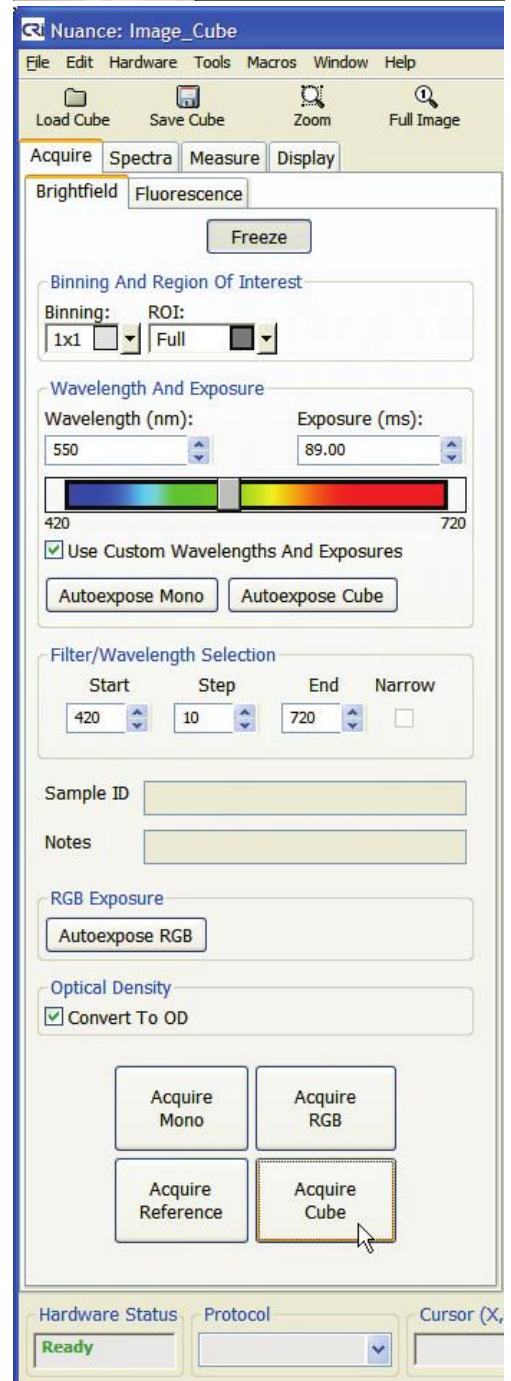
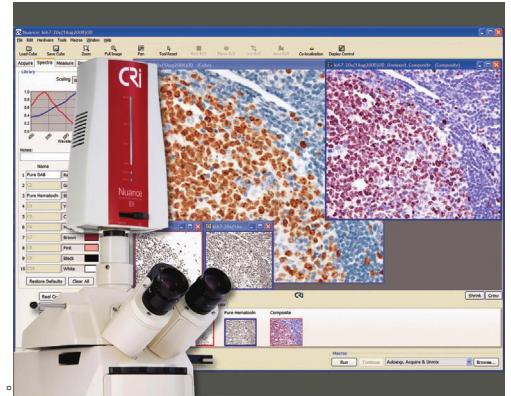


# 明场成像

**快速指南前提:** 基于 Nuance 多光谱成像系统的正确安装、连接和配置以及与显微镜准确校准

1. 启动电脑并连接 Nuance 的电源。在电脑启动的过程中, Nuance 进行初始化: 滤光片自检时前面板上的扫描波长指示灯滚动闪烁。当 **CAMERA** 和 **STATUS** 指示灯稳定时初始化完成, 打开 Nuance 操作软件。
2. 放置样本, 显微镜调焦。调节光路使检测光全部进入 Nuance 系统。如果进行多光谱成像, 将面板前方 “**MONO/MS**” I 滑块向右调节至 “**MSI**” 位置。
3. 选择 “**Acquire > Brightfield**” 面板。如不能看到 “实时图像显示” (**Live Stream**) 窗口, 点击 “**Live**” 按钮以显示样本的实时图像。
4. 在 “**Wavelength And Exposure**” 框中, 输入期望获得样本图像的波长(使用 500nm 或以上波长进行调焦)。点击 “**Autoexpose Mono**” 按钮, 提高实时图像显示质量。手动调整曝光时间方法:
  - a) 如果实时图像太暗, 在 “**Exposure (ms)**” 选项增加曝光时间。
  - b) 如果实时图像太亮或者曝光过度(出现红色像素点), 减少曝光时间。
5. 最大化实时图像窗口或者按 “**Zoom**” 按钮, 点击实时图像(以点击位置为中心放大图像)或者在图像上选取矩形区域(将该区域图像放大), 然后微调焦距。
6. 根据成像区域和图像质量的要求, 选择 “像素合并比” (“**Binning**”) 和 “感兴趣区域” (“**Region-Of-Interest (ROI)**”)。感兴趣区域越小; 像素合并比越高; 图像文件就越小。像素合并比越高; 成像灵敏度就越高, 但是图像分辨率会降低。明场成像系统默认的像素合并比是 1x1。
7. 在 “**Filter/Wavelength Selection**” 组中对扫描波长进行 “**Start**”, “**Step**” 和 “**End**” 设置。选择 “**Narrow**” 复选框时, 扫描带宽是 20nm, 无选择时带宽为 40nm。具体参考 *Nuance User's Manual*。
8. 点击 “**Autoexpose Cube**” 自动选择成像的曝光设置, 当自动曝光完成时 “**Use Custom Wavelengths and Exposures**” 复选框为选择。该情况适用于某一波长需要不同的曝光时间。
9. 在 “**Optical Density**” 选择框中注意 “**Convert To OD**” 复选框默认是选择的。当该复选框为选中状态时, 在获得多光谱 cube 前一定要先获得参考 cube。具体操作过程:
  - a) 将采集样本移出视野
  - b) 点击 “**Acquire Reference**” 按钮获得参考 cube
  - c) 将样本移回视野
10. 点击 “**Acquire Cube**” 按钮采集设置波长范围内的数据 cube。如果你想采集当前波长下的单色快照, 点击 “**Acquire Mono**” 按钮。如果想获得当前波长下的 RGB 快照, 点击 “**AutoExpose RGB**” 按钮再点击 “**Acquire RGB**”。
11. 当数据采集完成, 数据浏览区显示一个标有代表色的图像结果。
12. 点击 “**Save Cube**” 工具条图标存储数据模型, 选择存储路径并输入文件名。  
(建议文件名格式: 项目\_样本\_实验人\_日期及时间)。
13. 选择数据 cube 的存储格式:
  - a) “**Image Cubes**” 将以 CRI 既定的 .im3 格式存储, 此数据中包括硬件信息等设置信息。
  - b) “**TIFF Cubes**” 将以一系列的 TIFF 图像的格式存储, 此时每一图像的文件名会添加相应的波长信息。
14. 图像分离将下页说明。

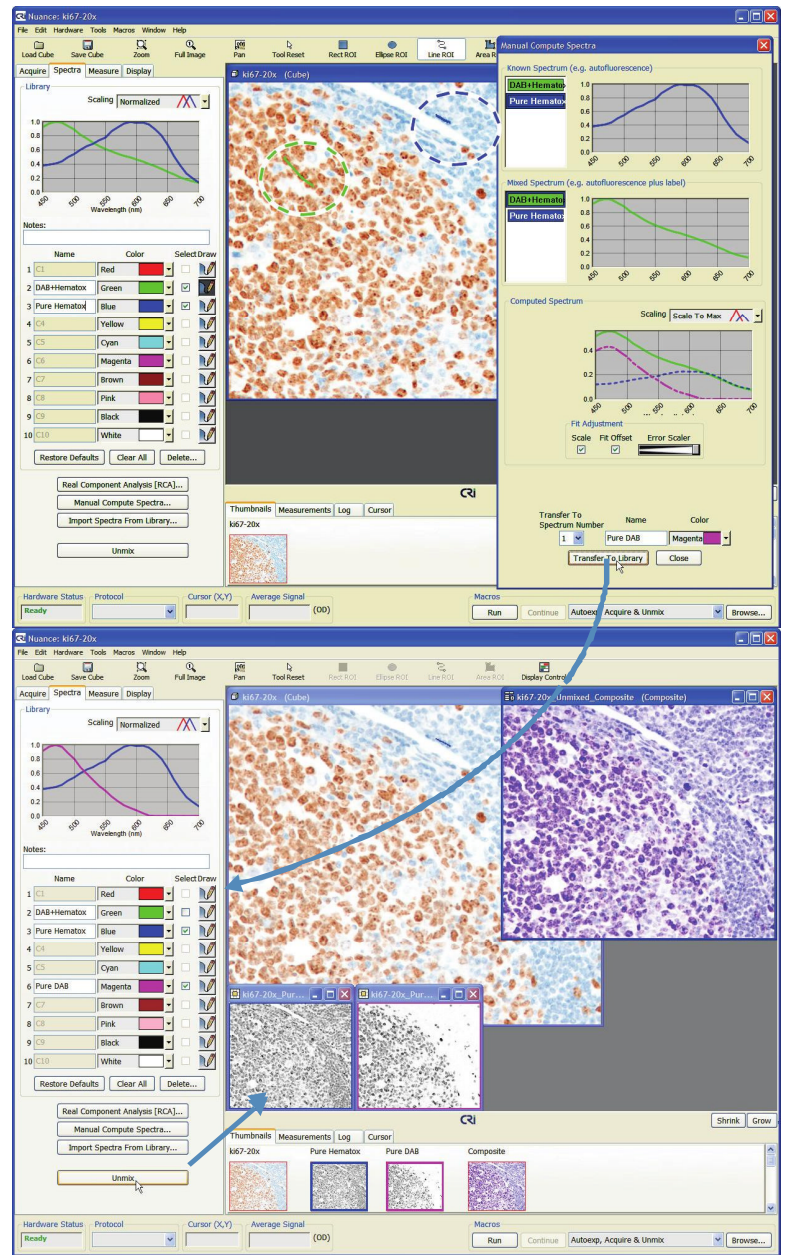


# 明场图像分离



工作站无须连接 Nuance 成像模块也可实现图像分离和数据分析

- 在屏幕左边选择“Spectra”面板。
- 如果数据文件已经打开，它将在数据浏览区域显示。如果需要打开一个文件，点击工具栏的“Load Cube”。Cube 格式有 CRI 既定格式 (\*.im3) 和 TIFF 格式 (\*.tif)。
- 本指南中的演示数据位于如下的文件夹：  
C:\Nuance Data\Images\Sample Data\ki67-20x\ki67-20x stack
- 如果实时观察窗口仍然处于打开状态，点击 关闭窗口。
- 在进行明场图像分离前，先把明场 cube 转化为光密度 (OD) 数据。选择“Tools > Convert to Optical Density”实现转化（如果这个选项不可用，说明 cube 已经在采集的时候自动转化为 OD 了）。
- 光谱信号分离有两种方法“Manual Compute Spectra”和“Real Component Analysis”。本指南中演示使用的是明场图像，我们将采用手动分离光谱的方法。
- 通过点击 按钮选择光谱库中光谱样本的颜色，再在 cube 显示图像上用光标在感兴趣部分划线即可。
- 光谱显示区可看到和所划每一条线对应的同颜色的光谱曲线（在“Scaling”的下拉菜单中选择其他的光谱显示选项）。
  - 该实例中，用蓝线在蓝色细胞核区域（上图中蓝色圆圈所示）划线取纯光谱样本。通过“Zoom”按钮可以放大图片，更清楚的看到细胞核区域。
  - 用绿线在被染成棕蓝色的细胞区域（上图绿色圆圈所示）划线取混合光谱样本
  - 如果需要可以调整光谱库中各光谱的说明标签，使之更直观。
- 上述步骤完成后，点击“Manual Compute Spectra”按钮。
- 在对话框中，选择已知光谱“Known Spectrum”和混合光谱“Mixed Spectrum”计算纯光谱。本实例中，选择蓝色光谱为“Known Spectrum”，选择绿色光谱为“Mixed Spectrum”。计算得到的光谱“Computed Spectrum”显示为红色，本例子中将颜色改为品红色。
- 点击“Transfer to Library”。
- 当进行“纯光谱计算”时观察光谱曲线图。每个点都应该有如上图所示类似的高斯曲线。在这个示例中，“Scale”和“Fit Offset”选项为纯光谱计算都处于选择状态。
- 关闭“Manual Compute Spectra”对话框。
- 在下方图像中绿线代表的光谱已经消失取而代之的是代表棕色染料纯光谱的品红色线。
- 点击“Unmix”按钮，一个新的“Unmixed Composite”图像在原来图像右显示。在原图像下边显示的是分离出的各种光谱的灰色图像。示例中用 ki67 标记的样本分离出 2 张灰色图像，一种用蓝色标记外框，一种用品红色标记。
- 存储结果图像：



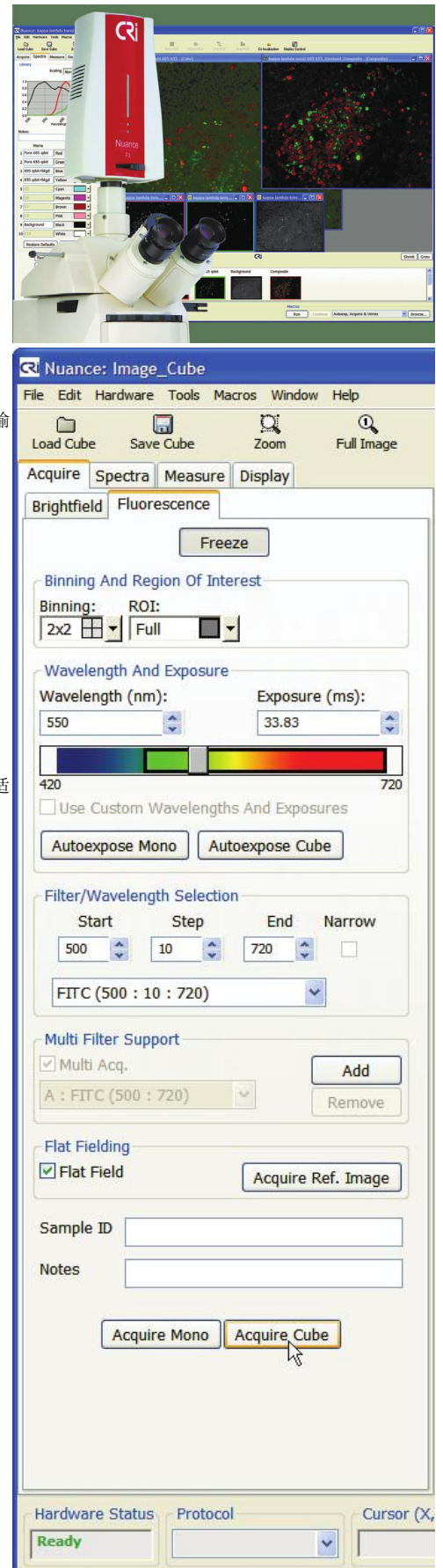
- 选择如下菜单：“File > Save Image > Save All (As Displayed)”。
  - 将结果图像全部存储于数据文件目录中。图像的存储格式为 TIFF，该格式可以在大部分的图像处理软件中打开、预览等操作。
  - 选择如下菜单：“File > Save Image > Save All Images (As Unscaled Data)”。
  - 选择如下菜单：“File > Save Result Set”，命名后，所有工作区中的文件存储至单一文件中。
- 存储“协议文件”/“光谱库文件”，以备今后实验所用：
    - 存储 Nuance 协议文件：该文件包括光谱库文件。操作为：“File > Save Protocol”。
    - 存储光谱库文件操作：“File > Save Spectral Library”。



# 荧光成像

**快速指南前提：**基于 Nuance 多光谱成像系统的正确安装、连接和配置以及与显微镜准确校准

1. 根据样本选择合适的激发光和发射光滤光片，当选择长通滤光片时确保其它滤光片不会对它起到干扰作用。激发光快门尽可能处于关闭状态以防止样本产生光漂白现象。
2. 启动电脑并连接 Nuance 的电源。在电脑启动的过程中，Nuance 进行初始化：滤光片自检时前面板上的扫描波长指示灯滚动闪烁。当 CAMERA 和 STATUS 指示灯稳定时初始化完成，打开 Nuance 操作软件。
3. 放置样本，显微镜调焦。调节光路进行使检测光全部进入 Nuance 系统。如果进行多光谱成像，将前面板上“MONO/MSI”滑块调节至“MSI”一侧。
4. 选择“Acquire > Fluorescence”面板。如不能看到“实时图像显示”（“Live Stream”）窗口，点击“Live”按钮以显示样本的实时图像。
5. 在“Wavelength And Exposure”中，输入期望获得样本图像的波长(使用 500nm 或以上波长进行调焦)，输入的波长应该在使用的发射光滤光片允许范围以内。点击“Autoexpose Mono”按钮，提高实时图像显示质量。手动调整曝光时间方法：
  - a) 如果实时图像太暗，在“Exposure (ms)”选项增加曝光时间。
  - b) 如果实时图像太亮或者曝光过度（出现红色像素点），减少曝光时间。
6. 最大化实时图像窗口或者按“Zoom”按钮，点击实时图像（以点击位置为中心放大图像）或者在图像上选取矩形区域（将该区域图像放大），然后微调焦距。
7. 根据成像区域和图像质量的要求，选择“像素合并比”（“Binning”）和“感兴趣区域”（“Region-Of-Interest (ROI)”）。感兴趣区域越小，像素合并比越高；图像文件就越小。像素合并比越高成像灵敏度就越高，但是图像分辨率会降低。荧光成像系统默认的像素合并比是 2x2。
8. 在“Filter/Wavelength Selection”组中，选择与已经选定的滤光片组对应的滤光片选项。如没有发现适用于样本的滤光片选项，可以手动编辑“Start”，“Step”和“End”设置。具体参考 *Nuance User's Manual*
9. “Narrow”复选框对扫描带宽进行选择：选择“Narrow”时，扫描带宽为 20nm。没有选择“Narrow”时，带宽为 40nm。
10. 点击“Autoexpose Cube”自动选择图像的曝光设置
11. 为采集均匀发光的结果，选择“Flat Field”复选框。将样本移出视野，放入一个塑料的荧光载玻片（不包含在产品里）。点击“Acquire Ref. Image”获得各个波长下的参照图像，最后再将样本放回。
12. 点击“Acquire Cube”按钮获得设定波长范围内的数据 cube（采集当前波长下的单色快照，单击“Acquire Mono”按钮）。
13. 数据采集完成时，数据浏览区域显示一个标有代表色的图像结果。
14. 点击“Save Cube”工具条图标存储数据模型，选择存储路径并输入文件名。（建议文件名格式：项目\_样本\_实验者\_日期及时间）。
15. 选择数据 cube 的存储格式：
  - a) “Image Cubes”将以 CRI 既定的 .im3 格式存储，此时数据中包括硬件信息等设置信息。
  - b) “TIFF Cubes”将以一系列的 TIFF 图像的格式存储，此时每一图像文件名会添加相应的波长信息。
16. 图像分离将在下页说明。

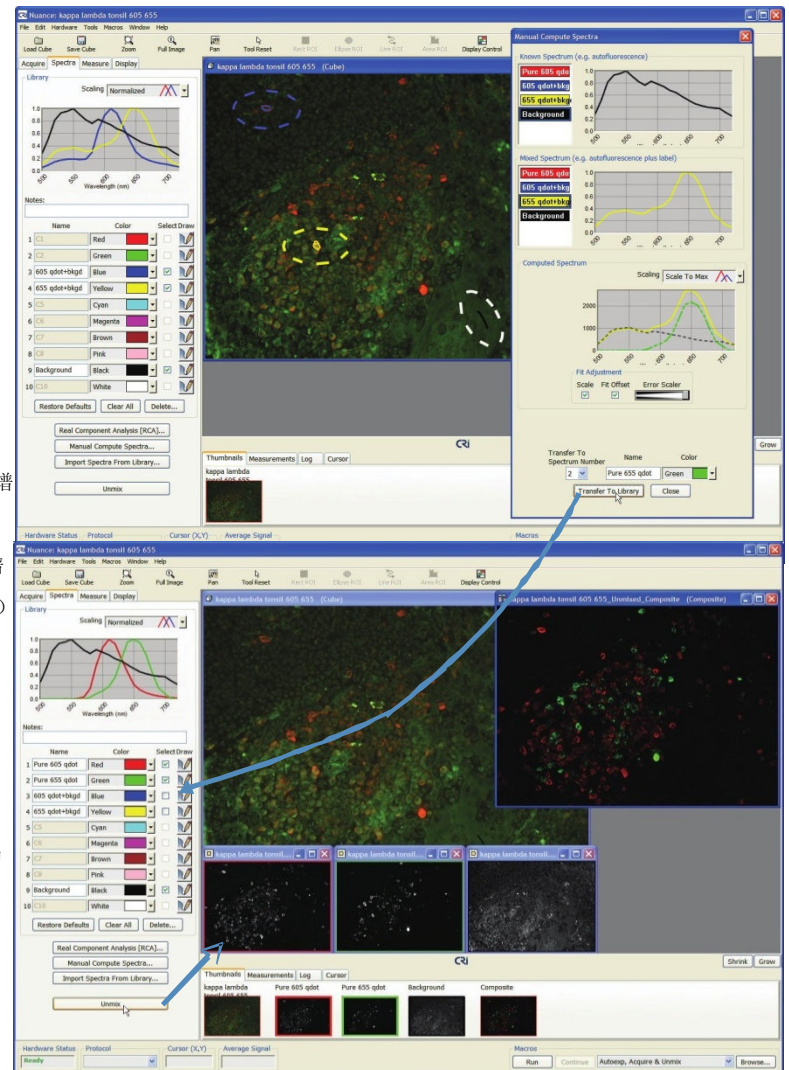


# 荧光图像分离



工作站无须连接 Nuance 系统也可实现图像分离和数据分析

- 选择屏幕左边“Spectra”面板。
- 如果数据文件已经打开，将显示在数据浏览区域。如果需要打开一个文件，点击工具栏的“Load Cube”。Cube 格式有 CRI 既定格式 (\*.im3) 和 TIFF 格式 (\*.tif)。
- 本指南中的演示数据位于如下的文件夹：  
C:\Nuance Data\Images\Sample Data\Ventana kappa lambda.
- 如果实时观察窗口仍然处于打开状态，点击 关闭窗口。
- 光谱信号分离有两种方法：
  - 如果使用“Manual Compute Spectra”，需要先获得样本中的纯光谱和混合光谱（从第 6 步往后继续）。
  - 如果使用“RCA (Real Component Analysis)”方法无需先采集光谱信号，系统自动检测不同光谱信号。（详见 *Nuance User's Manual*）
- 识别样本中各种光谱：通过点击 按钮选择光谱库中光谱样本的颜色，然后在 cube 图像用光标在感兴趣部分划线即可。
- 光谱显示区可看到和所划每一条线对应的同颜色的光谱曲线（在“Scaling”的下拉菜单中选择其他的光谱显示选项）。
  - 该实例中，用黑线画笔在暗色背景（如图中白色圆圈所示）划取自发荧光光谱样本。（通过“Zoom”按钮可以放大图片，更清楚的看到信号区域）
  - 蓝色画笔勾画 605nm 量子点探针和背景混合信号。（蓝色圆圈表示）
  - 黄色画笔勾画 655nm 量子点探针和背景混合信号。（黄色圆圈表示）
  - 如果需要可以调整光谱库中各光谱的说明标签，使之更直观。
- 上述步骤完成后，点击“Manual Compute Spectra”按钮。
- 当进行“纯光谱计算”时观察光谱曲线图。每个点都应该有如上图所示类似的高斯曲线。在该示例中，“Scale”和“Fit Offset”选项为纯光谱计算都处于选择状态。
- 对话框中选择已知光谱“Known Spectrum”和混合光谱“Mixed Spectrum”计算纯光谱。在这个例子中，这个过程分为两步：
  - 将 605nm 量子点探针信号和背景信号分离  
选择黑色背景光谱作为“Known Spectrum”，选择蓝色 605nm 探针和背景混合光谱作为“Mixed Spectrum”。将“Computed Spectrum”用红色表示并命名为“Pure 605 qdot”。点击“Transfer to Library”。
  - 将 655nm 量子点探针信号和背景信号分离  
选择黑色背景光谱作为“Known Spectrum”，选择黄色 605nm 探针和背景混合光谱作为“Mixed Spectrum”。将“Computed Spectrum”用绿色表示并命名为“Pure 655 qdot”。点击“Transfer to Library”。
- 关闭“Manual Compute Spectra”对话框。
- 在下方图像中黄线和蓝线代表的光谱消失，取而代之的是代表 605nm 量子点



探针光谱（红线）和 655nm 量子点探针光谱（绿线）。

- 点击“Unmix”按钮，新的“Unmixed Composite”图象在原来图象右侧显示。原图像下边显示的是分离出的各种信号的灰度图像。示例中的 kappa lambda 样本分离出 3 张灰度图像，一种用黑色标记外框（自发光），一种用红色标记外框（605nm 量子点探针），一种用绿色标记（655nm 量子点探针）。
- 存储结果图像（详见：*Nuance User's Manual*）：
  - 选择如下菜单：“File > Save Image > Save All (As Displayed)”，将结果图像全部存储于数据文件目录中。图像的存储格式为 TIFF，该格式可以在大部分的图像处理软件中打开、预览等操作。选择如下菜单：“File > Save Image > Save All Images (As Unscaled Data)”。
  - 选择如下菜单：“File > Save Result Set”，命名后，所有工作区中的文件存储至单一文件中。
- 存储“协议文件”/“光谱库文件”，以备今后实验所用。
- 存储 Nuance 协议文件：该文件包括光谱库文件。操作为：“File > Save Protocol”。
- 存储光谱库文件操作：“File > Save Spectral Library”。