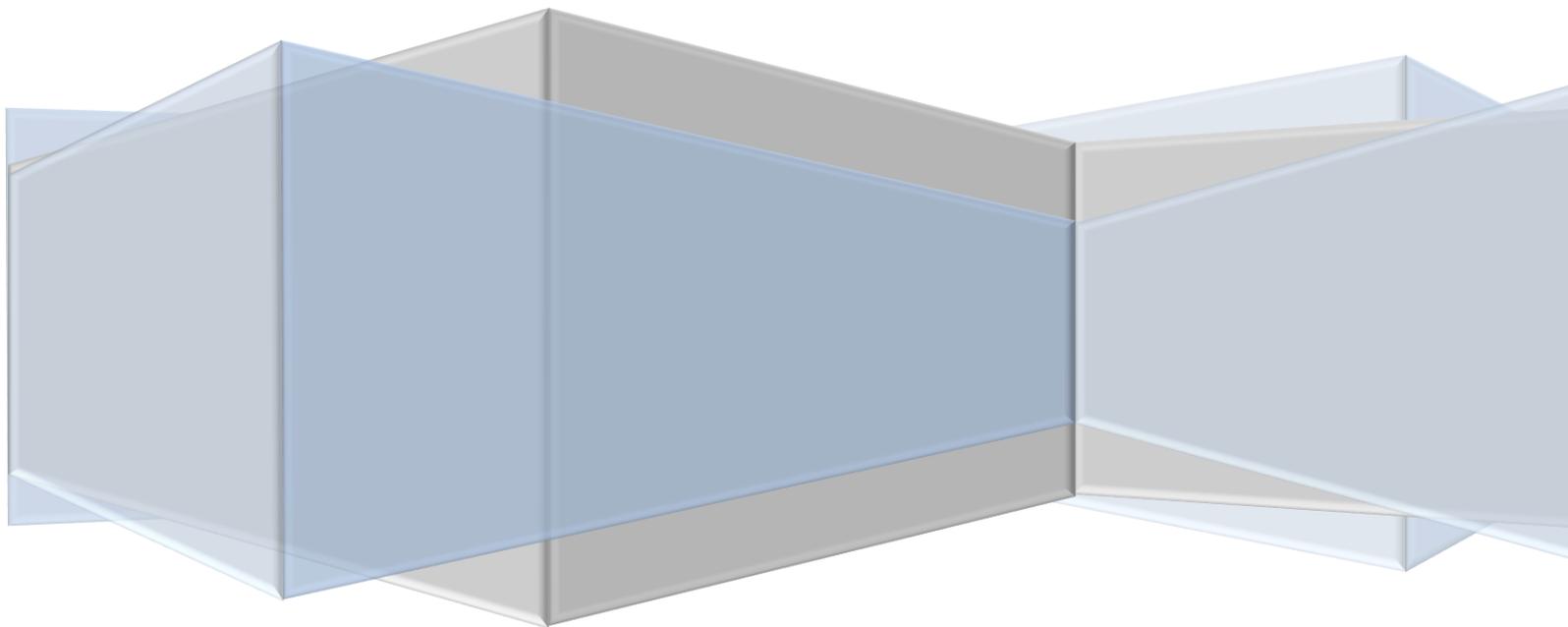


Think Possible



Cell Imaging 中文操作手冊

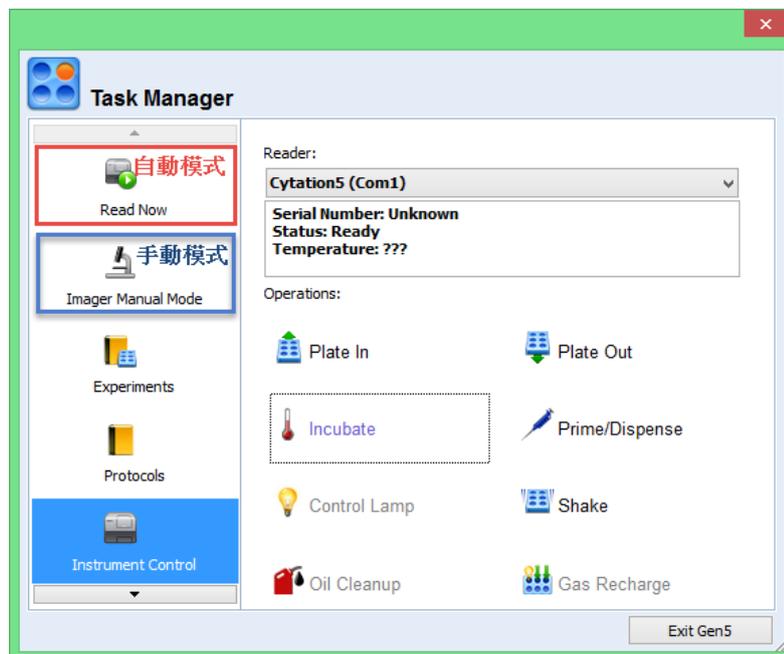


1 啟動軟體(手動模式 )

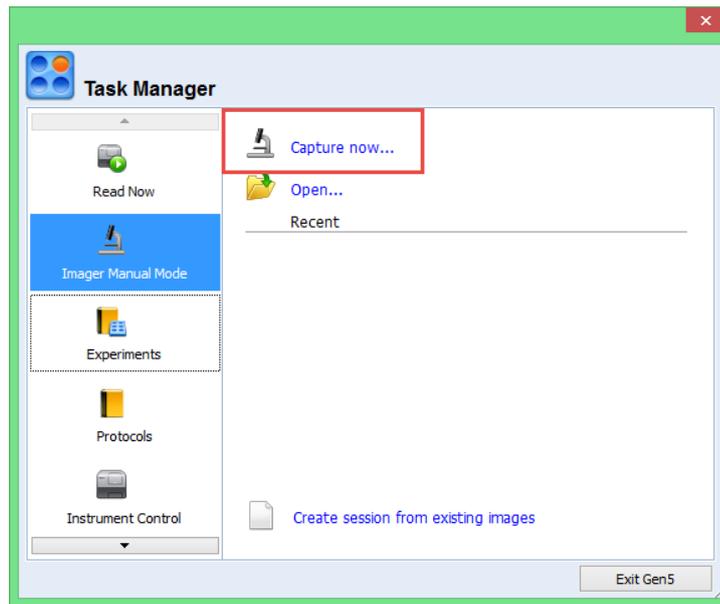
1.1 於桌面上雙擊點選Gen5  圖示，隨即啟動Gen5 軟體。



1.2 於彈出的Task Manger 視窗中，可點擊Imager Manual Mode 進入手動模式，或點擊Read Now (新增實驗)進入自動模式。

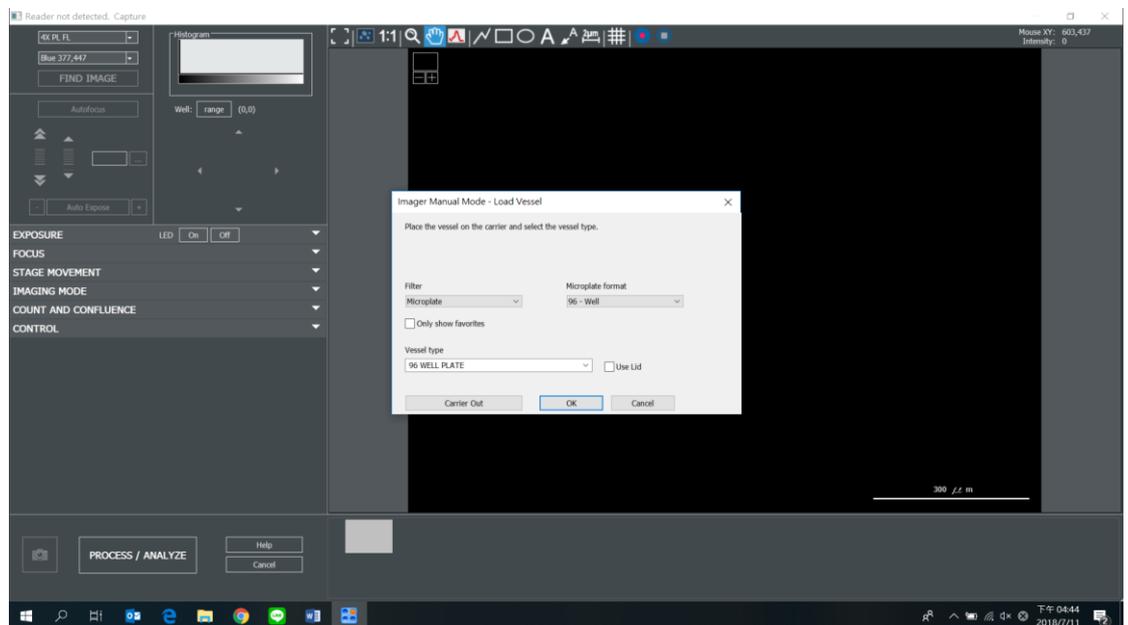


1.3 點選Imager Manual Mode，選擇右側Capture Now

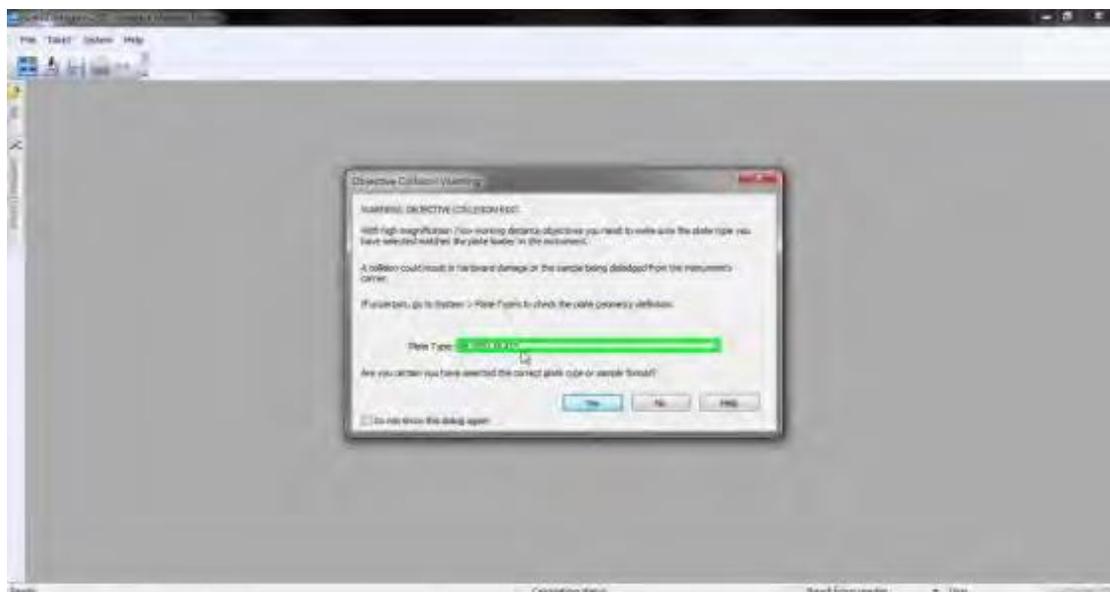


2 孔盤類型(手動模式)

2.1 於彈出的Load Plate視窗內，Plate Type 下拉式選單中選取欲讀取的孔盤類型。若盤子有使用蓋子，則於右側Use Lid 前面的方格內點擊一下，確定後點擊OK。

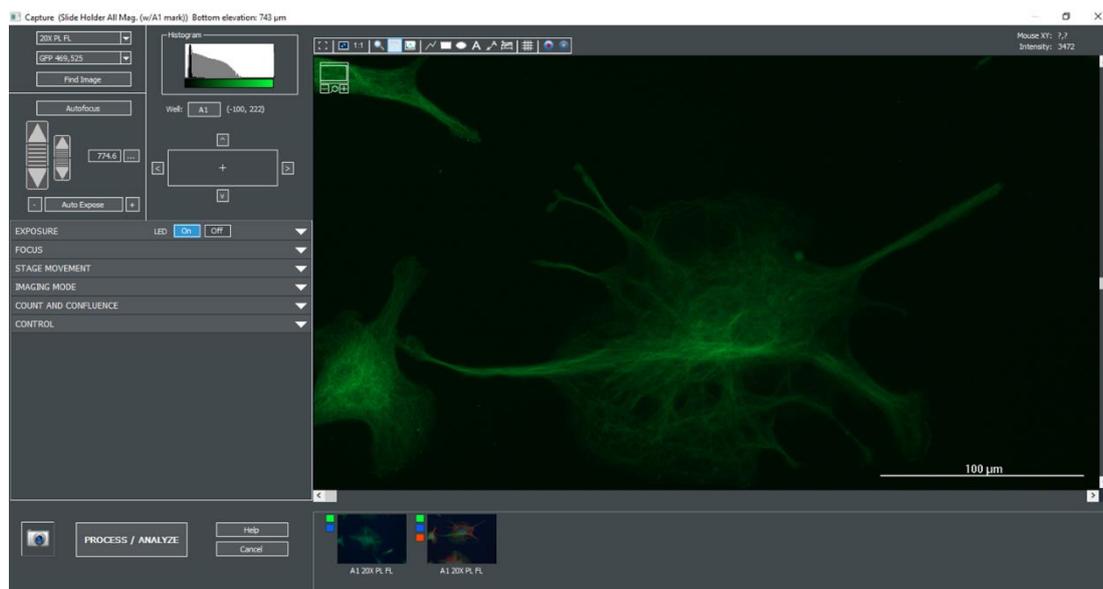


- 2.2 若彈出Objective Collision Warning 視窗，則再度確認選擇的盤型是否正確(例如：96 WELL PLATE)，確定後點擊Yes。若無則跳過。

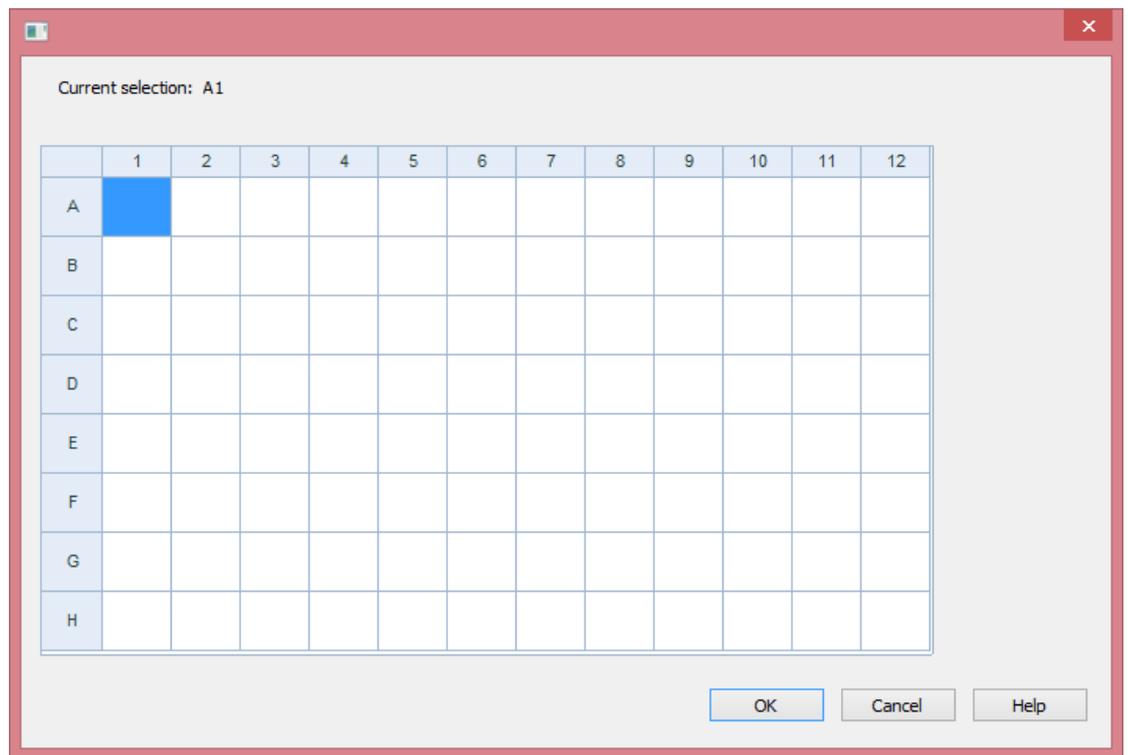


3 影像擷取(手動模式)

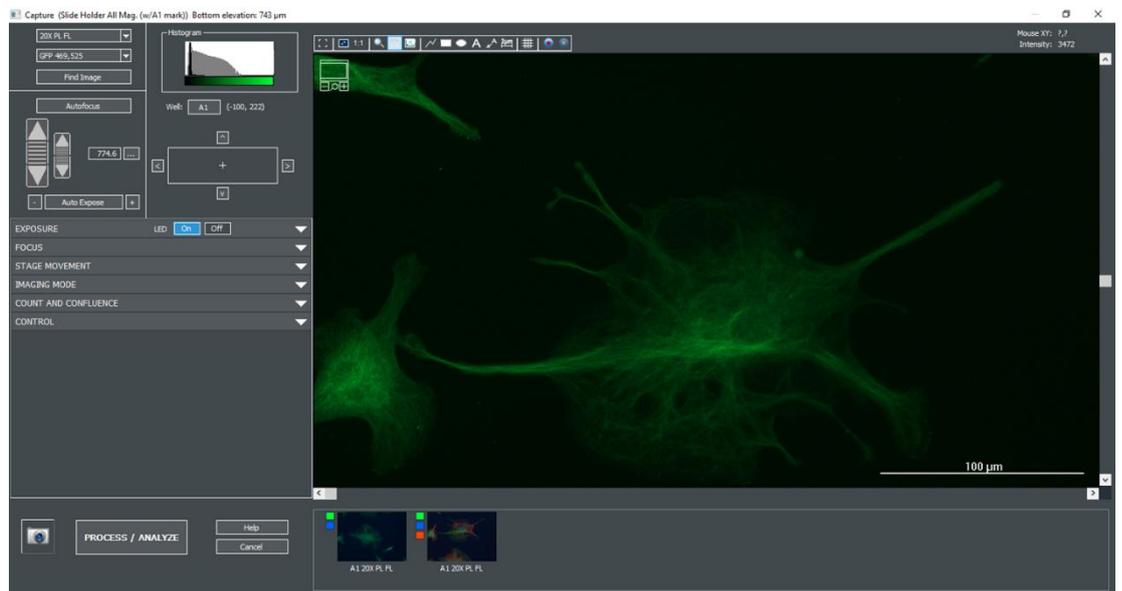
- 3.1 於彈出的Capture 視窗內，左上角Objective 下拉式選單中選取欲使用的物鏡倍率。
- 3.2 於左上角下拉式選單中選取欲使用的拍照模式或濾鏡顏色/波長，(例如：螢光DAPI 377,447、明視野、彩色明視野、相位差)。
- 3.3 點擊A1，更改欲讀取的位置。預設為讀取A1，故若要讀取A1 則可跳過此步驟。



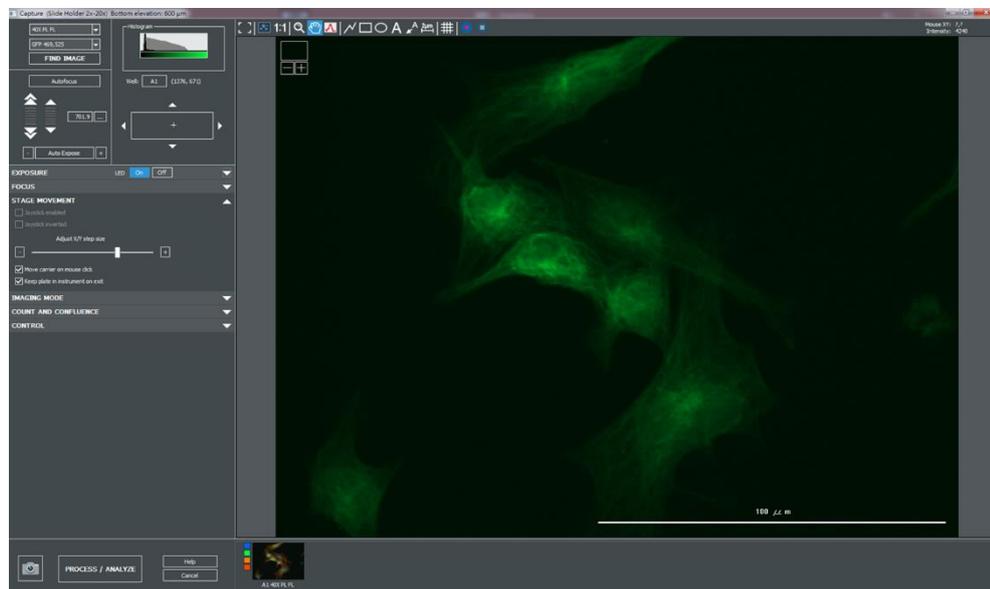
3.4 於孔盤中選取欲讀取的位置，所選位置為藍色，確定後點擊OK。



3.5 分別按下方“自動曝光”與“自動對焦”，找到最佳影像。



- 3.6 Stage Movement: (JoyStick)若要進行X/Y方向的位移，則勾選Joystick enabled，前後左右移動搖桿進行XY軸移動。右方藍框可看到鏡頭的位置。



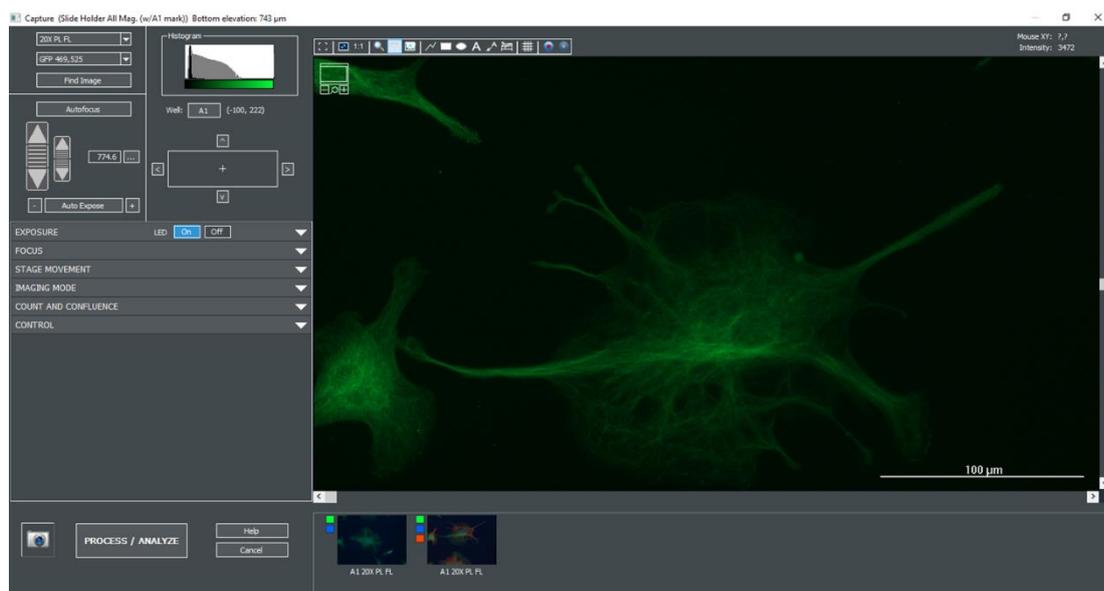
- 3.7 (無JoyStick)若要進行X/Y 方向的位移，可利用上下左右的箭頭，下方括號內的數值顯示相對應的位置，(例如：0,0 為正中間，-193,0 為左移)。



- 3.8 (JoyStick)若要手動調整焦距，勾選Joystick enabled，並轉動搖桿上方，進行對焦。
- 3.9 (無JoyStick)若要手動調整焦距，可利用上下的箭頭(例如：< 和 >為細調節輪，<< 和 >>為粗調節輪)，右方的數值顯示目前的焦距位置。

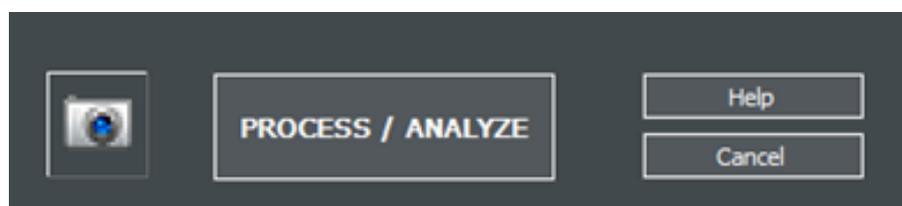


3.10 若要擷取目前顯示的影像畫面，可點擊下方的相機圖示。

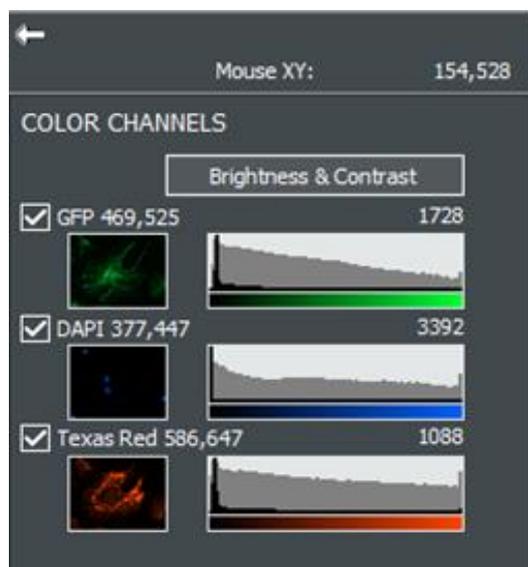


3.11 若要擷取其他顏色的影像，可於Color 下拉式選單中變更欲使用的濾鏡顏色/波長，(例如：RFP 531,593)。並再次點擊下方的相機圖示。手動模式底下可拍攝四個channel(例如：DAPI+GFP+TexasRed+明視野)。

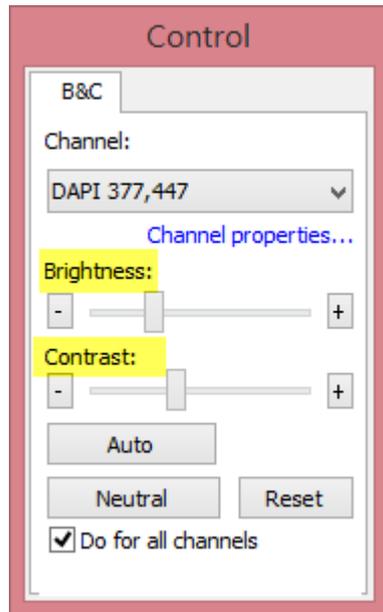
3.12 若要針對影像進行分析，可點擊右下方的**Process / Analyze** 按鈕。



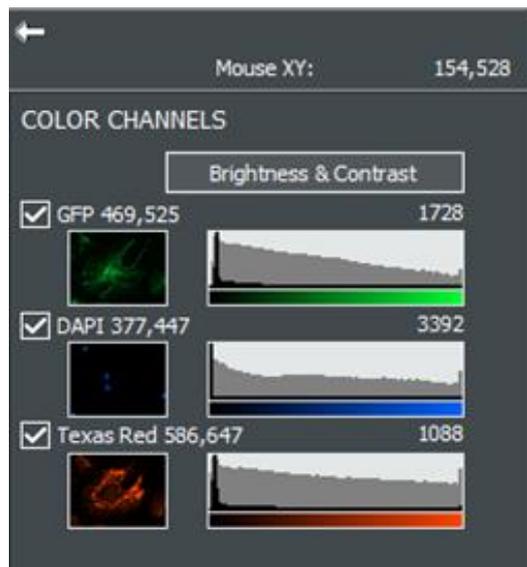
3.13 若要調整明亮和對比，可點擊上方工具列中的Brightness & Contrast 圖示。進行調整。



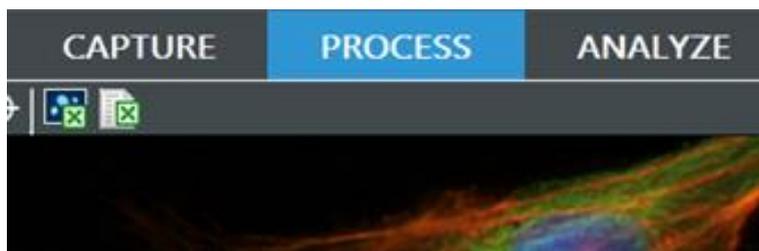
3.14 在彈出的小視窗中，可點擊Auto 自動調整明亮對比或手動調整。



3.15 於左方的Image Collection 欄位中，以勾選/取消勾選的方式顯示欲觀看的螢光影像，(例如：取消勾選DAPI，則僅顯示出GFP 的螢光影像)。

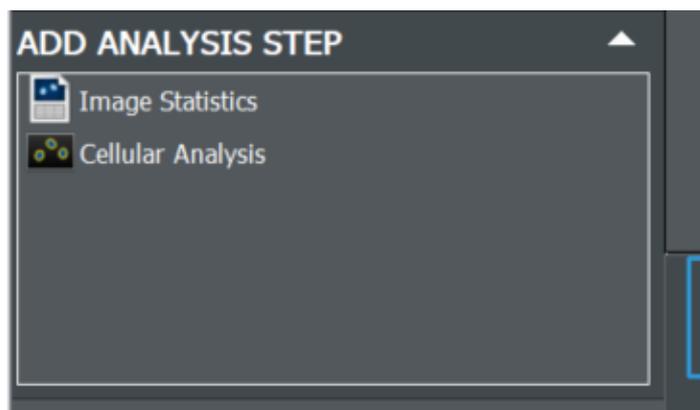


3.16 若要進行螢光強度和細胞分析，可於上方選擇ANALYZE

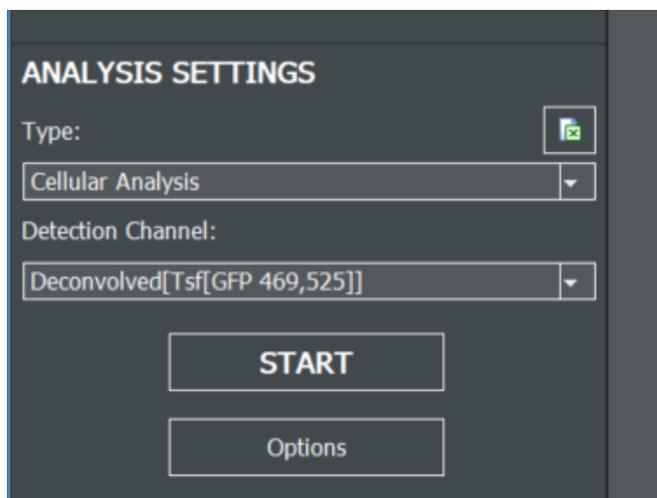


4 影像分析

4.1 於左下選單中選取Image Statistics 或Cellular Analysis。



4.2 於Detection Channel選單中選取欲分析的螢光，(例如：DAPI)。



4.3 分析方法若選擇” Image Statistics”，點選Data In 下方Options，可於彈跳視窗中，勾選Lower value 或Upper value 來設定閾值範圍，確定後點擊Apply，即可針對目前設定的螢光條件進行分析。
若欲分析部分範圍，而非全畫面，將Analyze entire image打勾取消，並點選右方Plug。

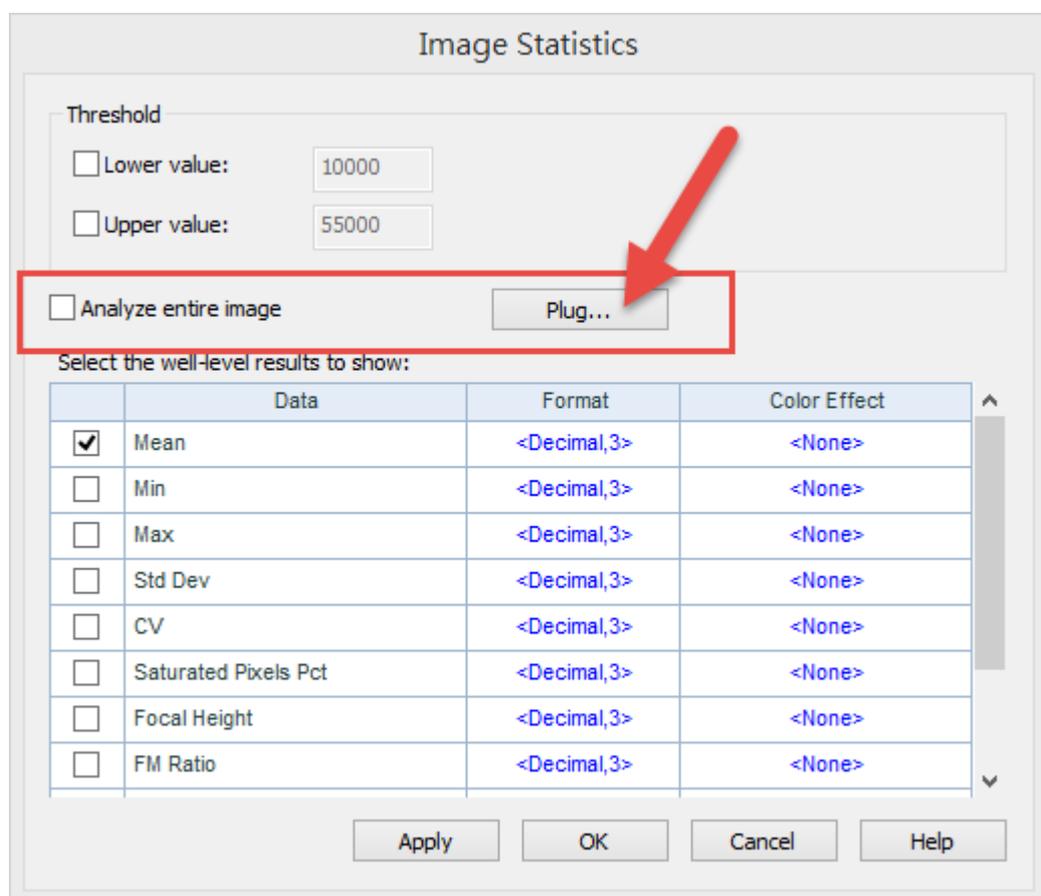
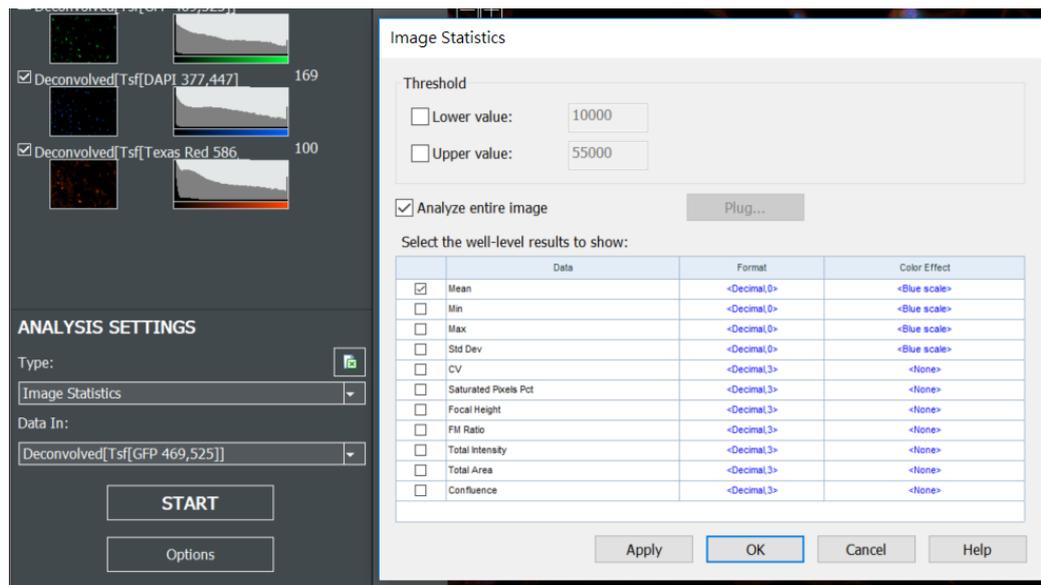
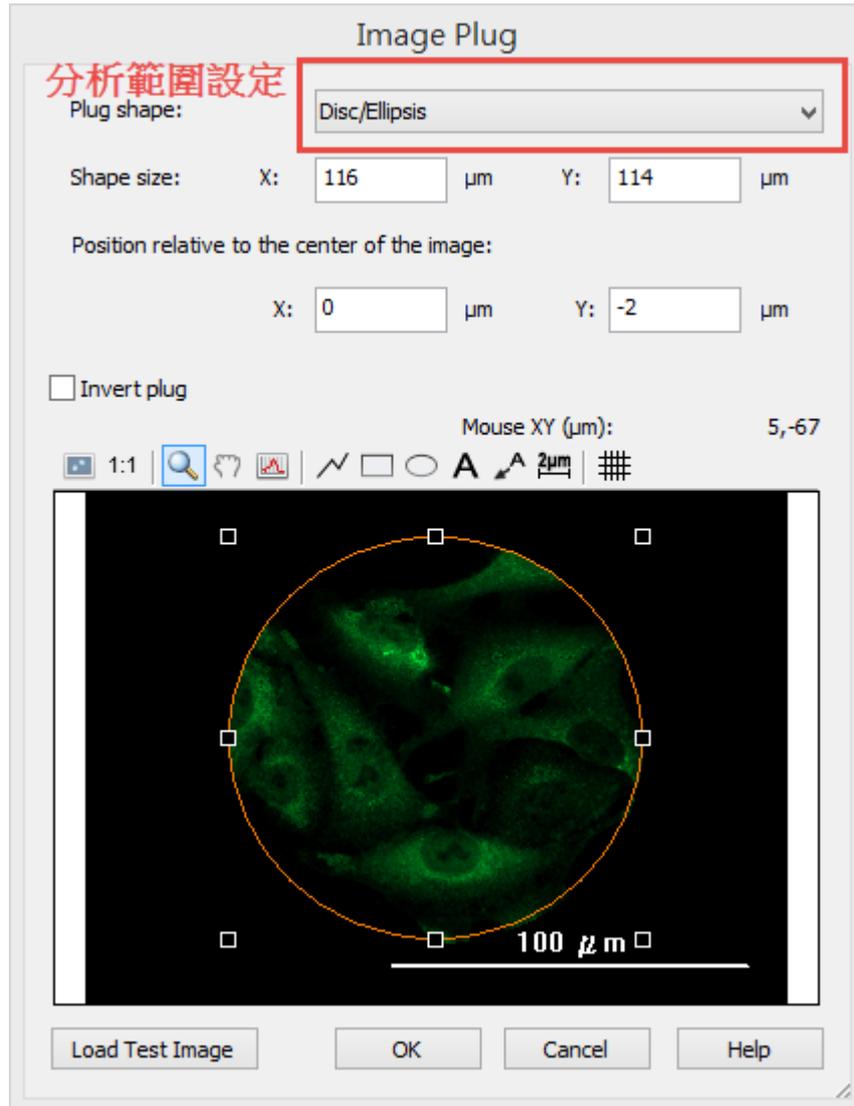
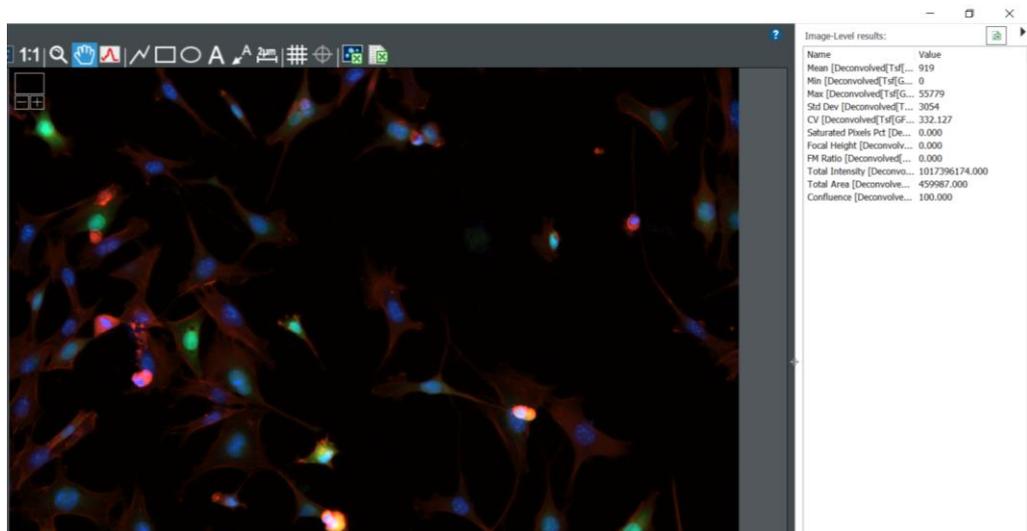


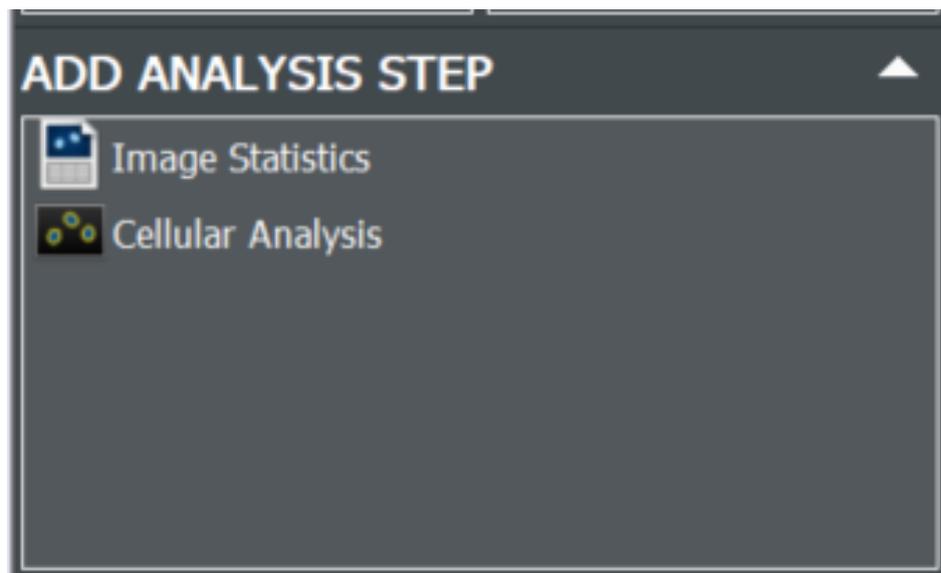
Image Plug彈跳視窗中，可以選定分析範圍，分別有圓形、正方形與任意形狀。大小可由滑鼠移動決定。確認之後ok，即可分析指定範圍。



- 4.4 於右方Results 欄位，即可看到螢光分析數據，(例如：平均螢光強度、最小螢光強度、最大螢光強度、加總螢光強度、總面積和覆蓋率等)。

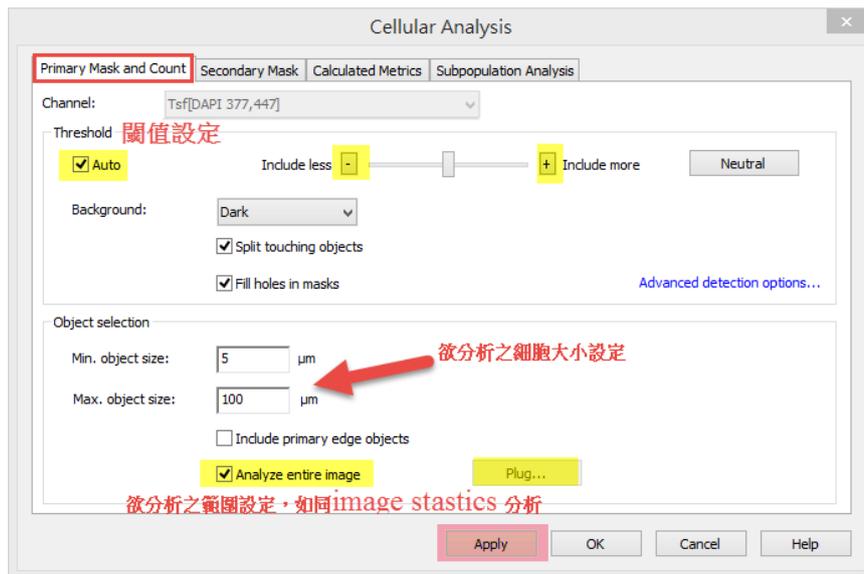


- 4.5 分析方法若選擇” Cellular Analysis”，可以進行細胞分析。

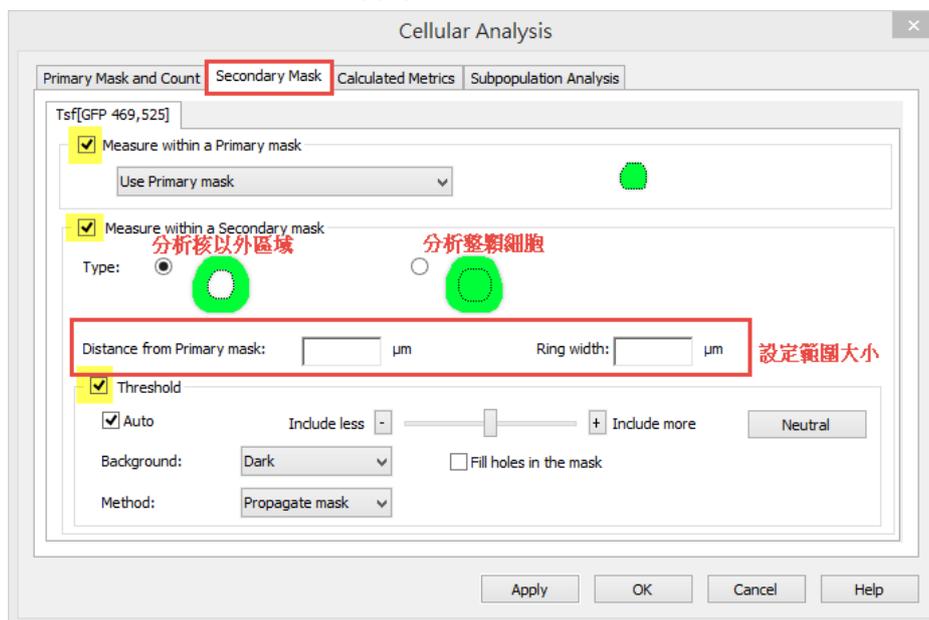


- 4.6 分析方法若選擇” Cellular Analysis”，點選Options，可於彈跳視窗中進行設定。

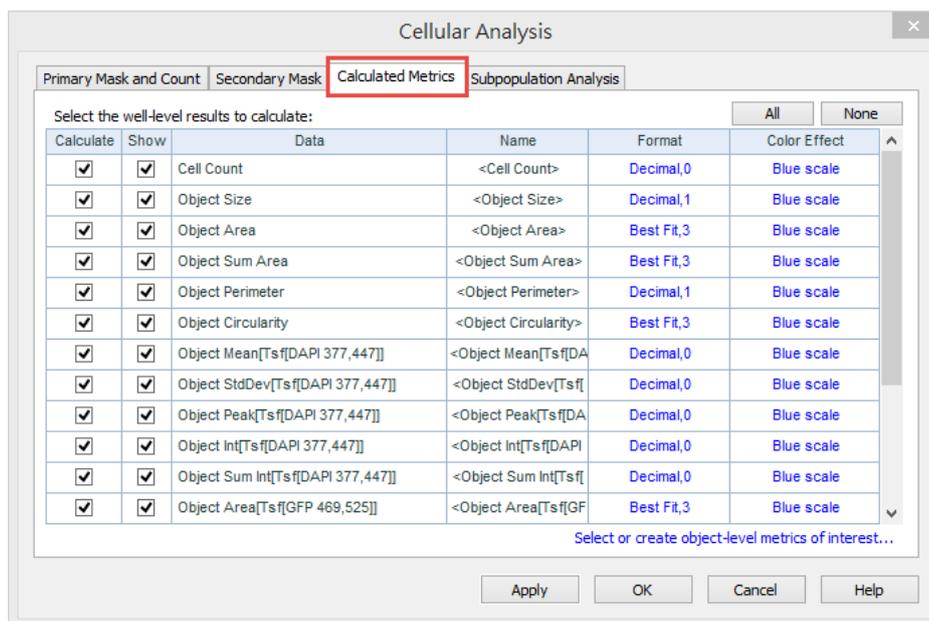
- 4.6.1 於Primary Mask and Count 欄位中，設定Threshold (閾值)、Min. Object size (最小體積)、Max. Object size (最大體積)與分析範圍，確定後點擊Apply。閾值可以勾選Auto，讓軟體定義，或是點擊”-“和”+”增減閾值。



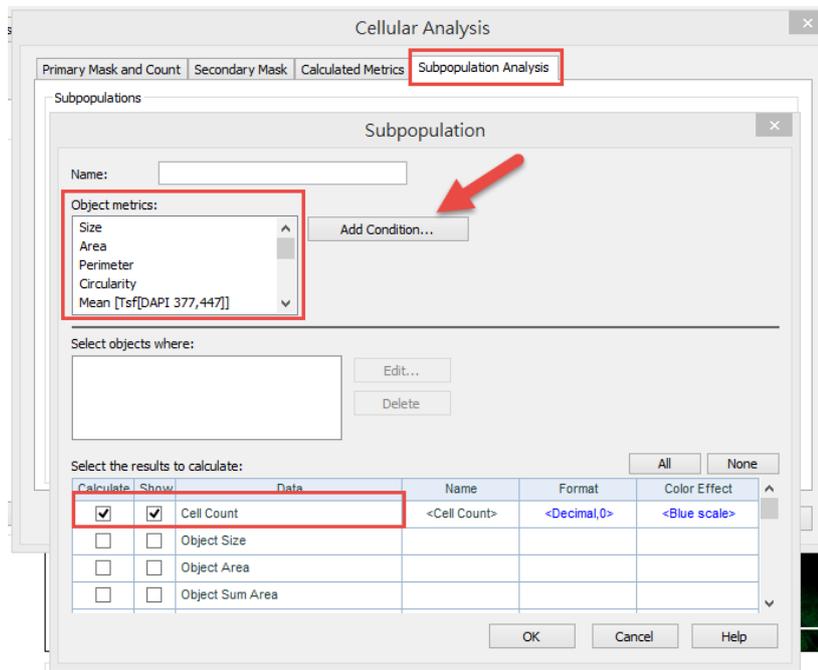
- 4.6.2 於Secondary Mask欄位中，default設定會直接勾選Measure with a Primary mask，即為分析primary mask為基礎中所有的螢光數值。若欲分析其他範圍，可以點選Measure within a Secondary mask，並可選擇“分析核以外區域”或是“整顆細胞”。同時可以點選Threshold>Auto，讓軟體自動計算閾值。確認條件之後點選Apply。



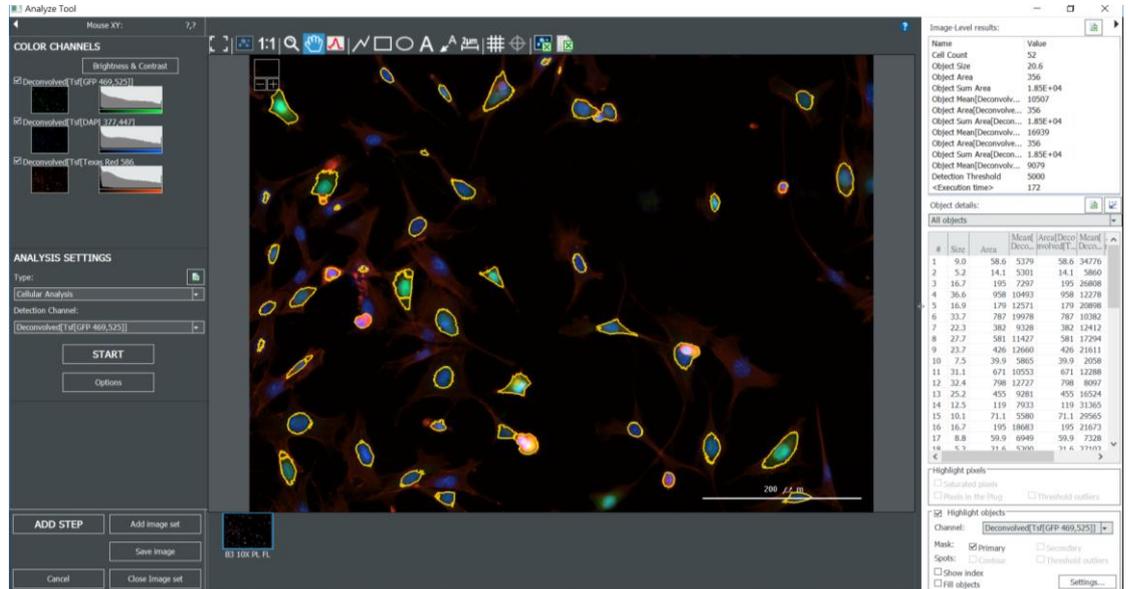
- 4.6.3 於Calculated Metrics欄位中，可以看到欲觀察之數值。(例如：總細胞數、細胞平均大小、面積、周長、圓形度、螢光強度、最大螢光強度、加總螢光強度)。若有不想查看的數值，可將勾勾取消。確認之後勾選Apply。



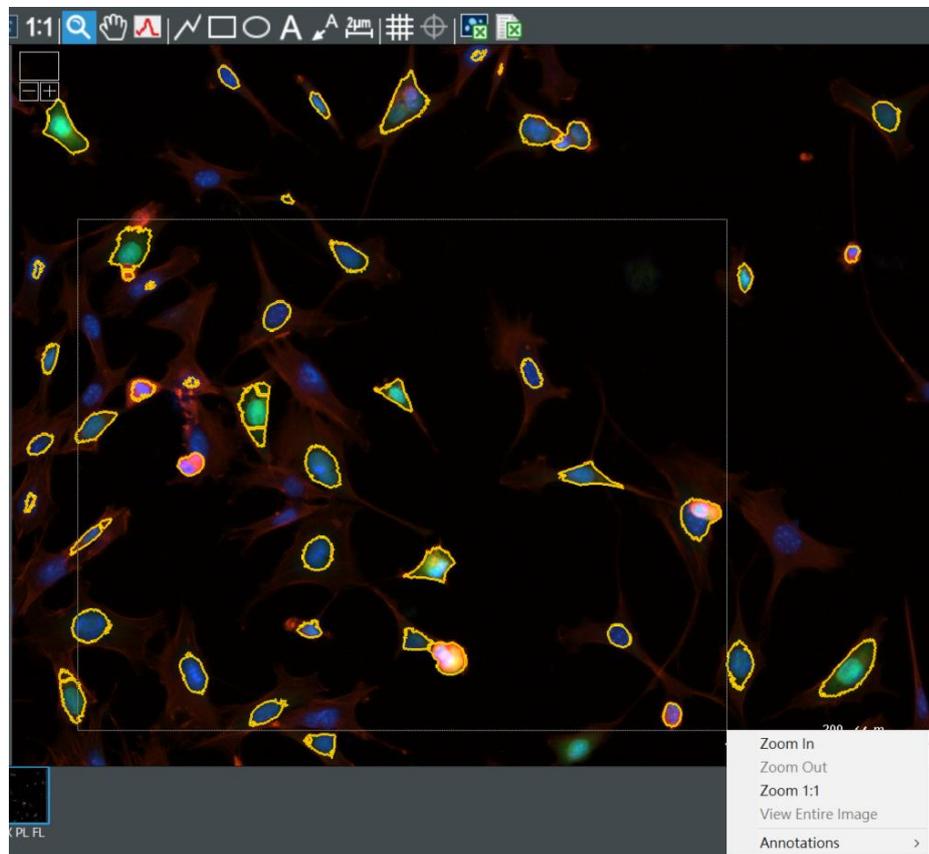
4.6.4 於Subpopulation Analysis欄位中，若欲以多種條件篩選細胞，可點選Add 新增篩選條件，條件可以是總細胞數、細胞平均大小、面積、周長、圓形度、螢光強度、最大螢光強度、加總螢光強度等數值。確認好後點選 Apply 。



- 4.7 確認無誤後，於右方Results 欄位，即可看到細胞分析數據，(例如：總細胞數、細胞平均大小、面積、周長、圓形度、螢光強度、最大螢光強度、加總螢光強度)。



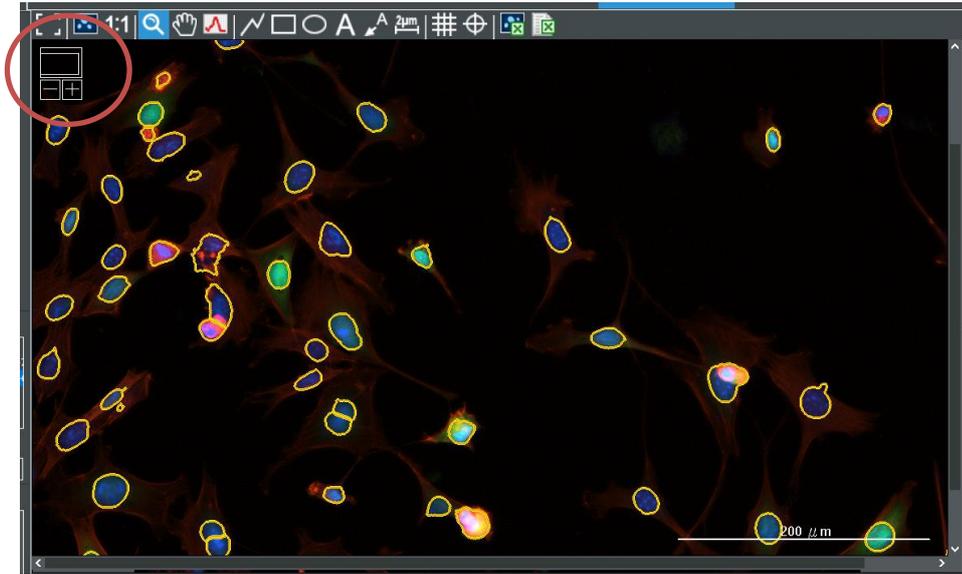
- 4.8 點選上方工具列的放大鏡圖示於影像中任意拖曳，點擊右鍵，選擇Zoom In，即可放大觀看。



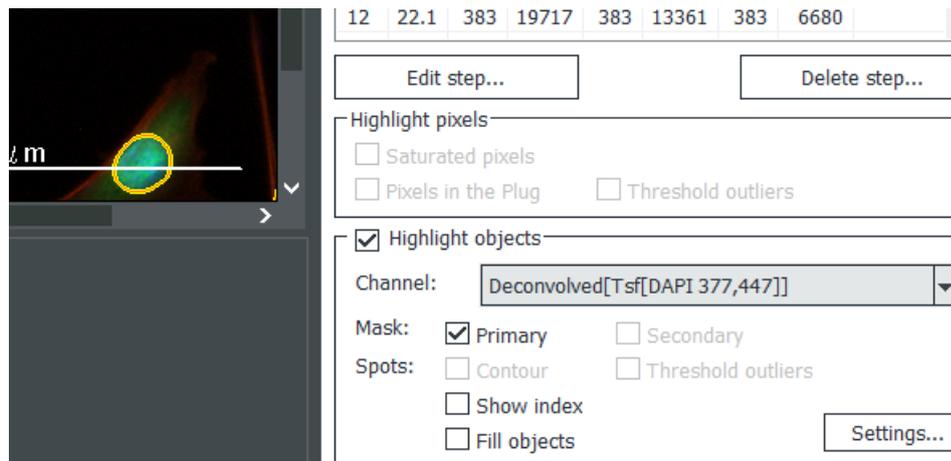
Think Possible



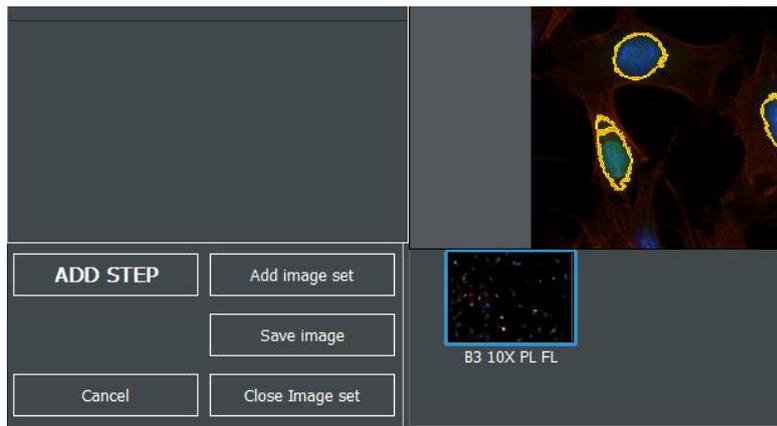
4.9 影像左上角的小方框為目前局部放大的位置，可利用影像右側的垂直卷軸列和下方的水平卷軸列做上下左右的位移。



4.10 於下方的Highlight objects 欄位中，以勾選/取消勾選的方式重點標示列入計算的物件。

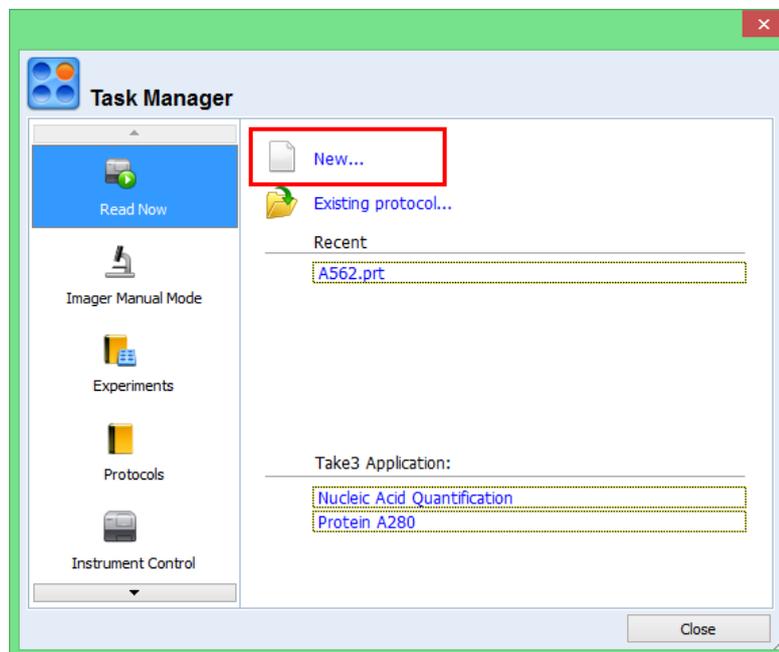


4.11 確認分析無誤之後，點選左下方Add step，即完成分析。



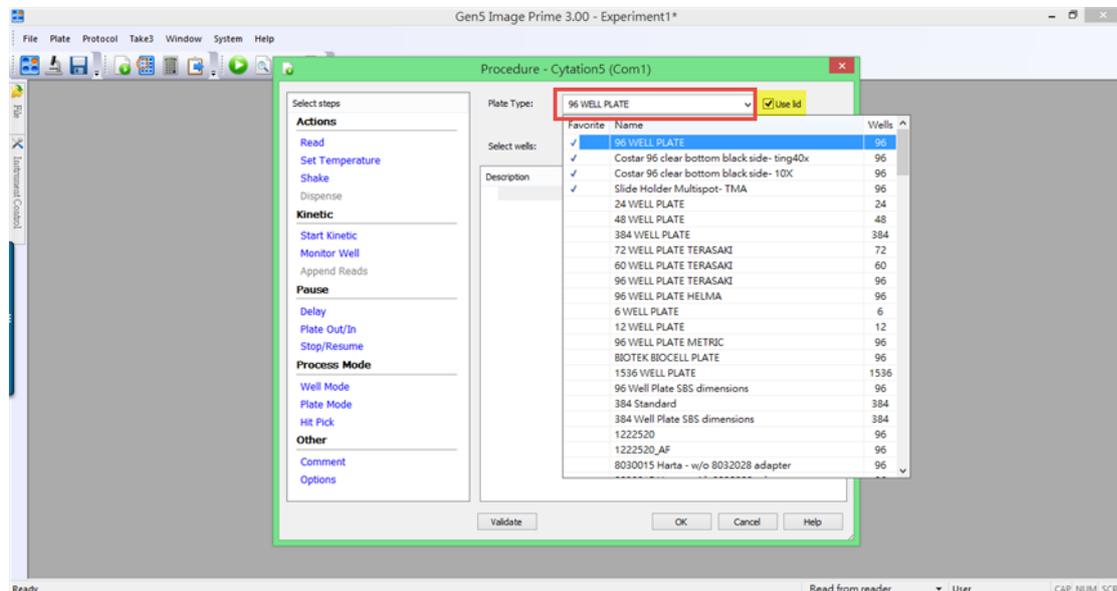
5 啟動軟體(自動模式 )

5.1 於彈出的Task Manger 視窗中，可點擊New (新增實驗)進入自動模式。



6 孔盤類型(自動模式)

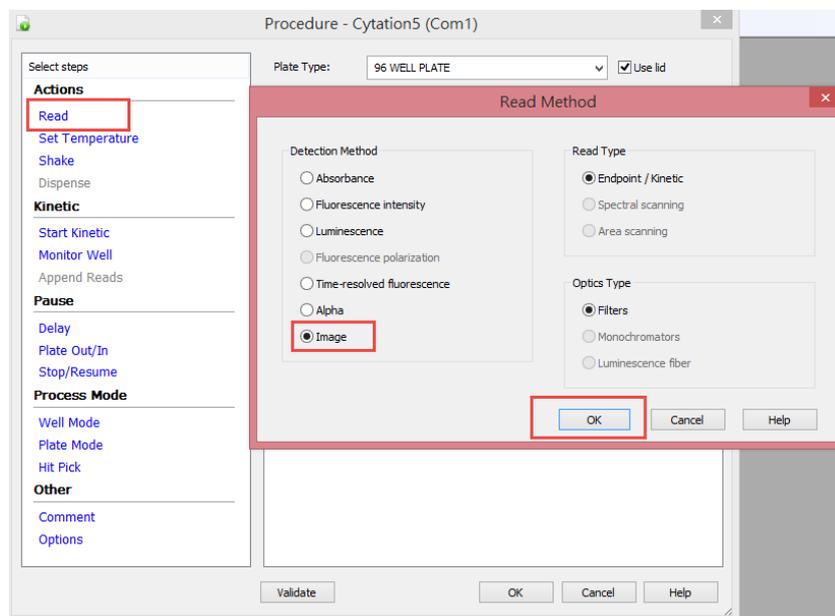
6.1 於彈出的Procedure 視窗內，Plate Type 下拉式選單中選取欲讀取的孔盤類型。若盤子有使用蓋子，則於Use Lid 前面的方格內點擊一下。



7 影像擷取 (自動模式)

7.1 於左方Select Steps 的Actions 欄位中，點擊Read。

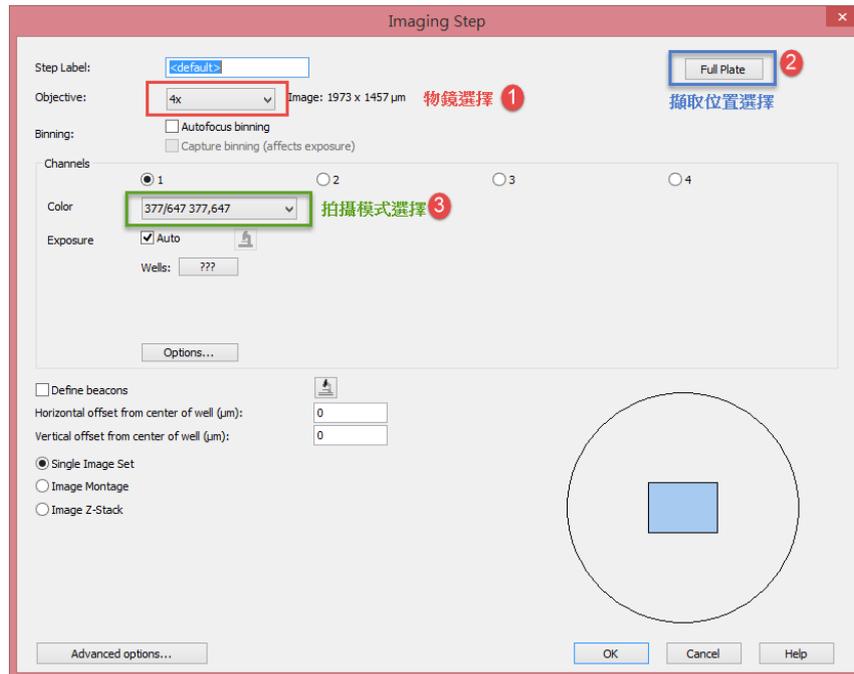
7.2 Detection Method 欄位中選取Image，確定後點擊OK 即可。



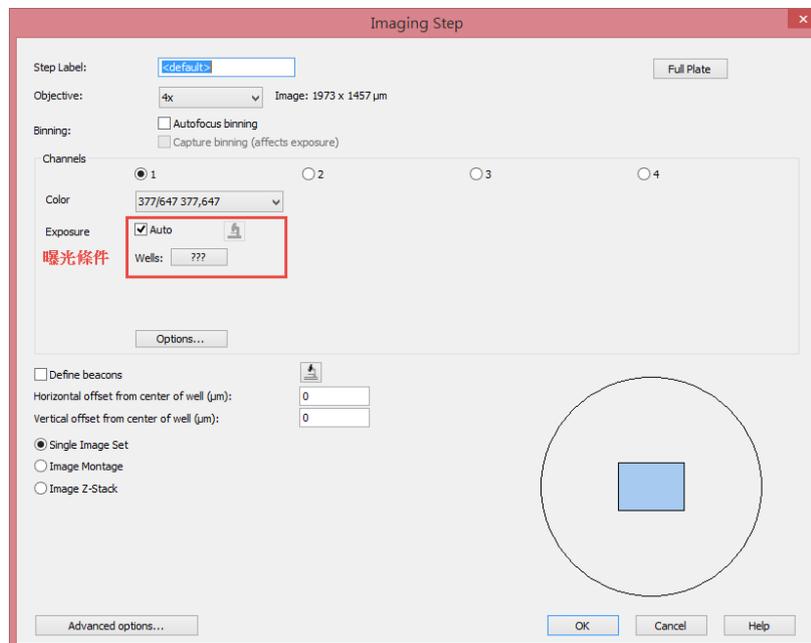
7.3 於彈出的Read Step 視窗內，Objective 下拉式選單中選取欲使用的物鏡倍率(例如：4x、20x)。

7.4 點擊Full Plate，選擇欲讀取的位置。預設為Full Plate (全盤讀取)，故若要全盤讀取則可跳過此步驟。

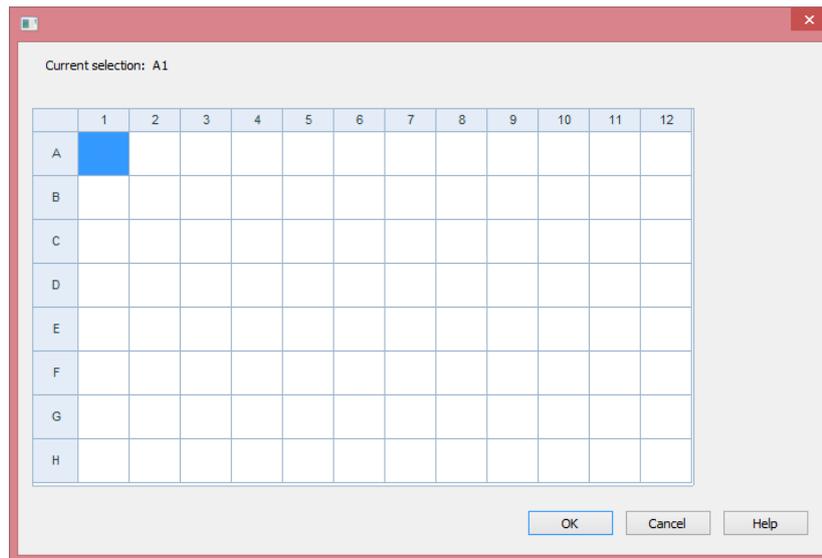
- 7.5 於Color 下拉式選單中選取欲使用的拍照模式或濾鏡顏色/波長，(例如：螢光DAPI 377,447、明視野、彩色明視野、相位差)



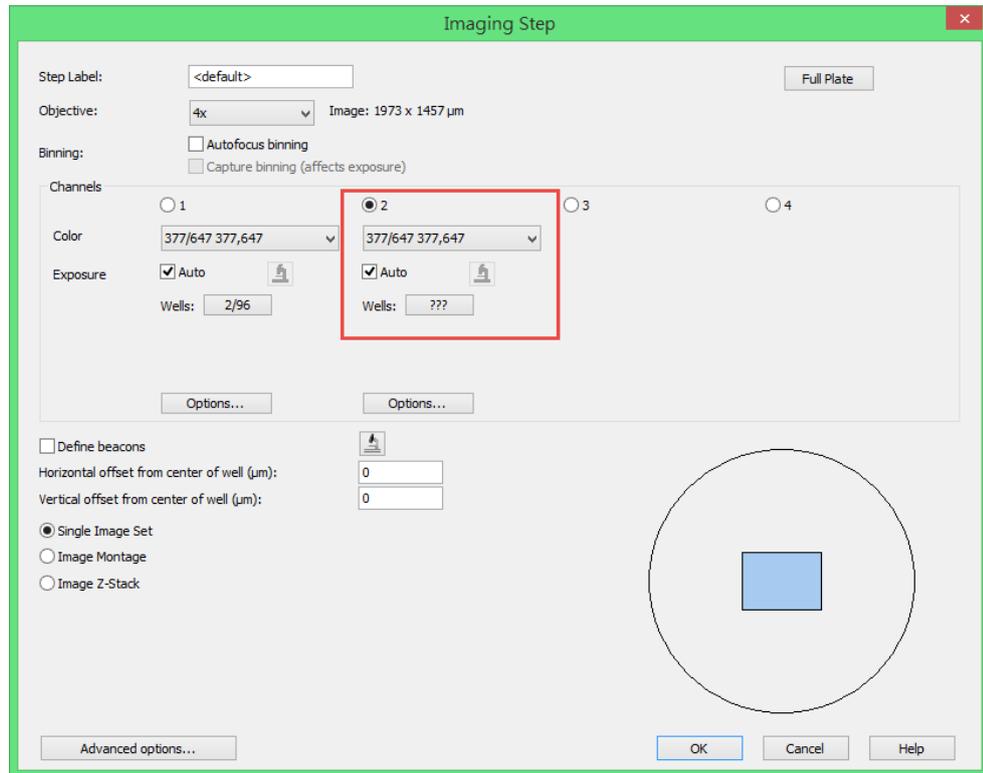
- 7.6 於Exposure 欄位中，點擊Wells 後方的???, 選取設定自動曝光條件的位置。或點選隔壁的  自訂曝光範圍。



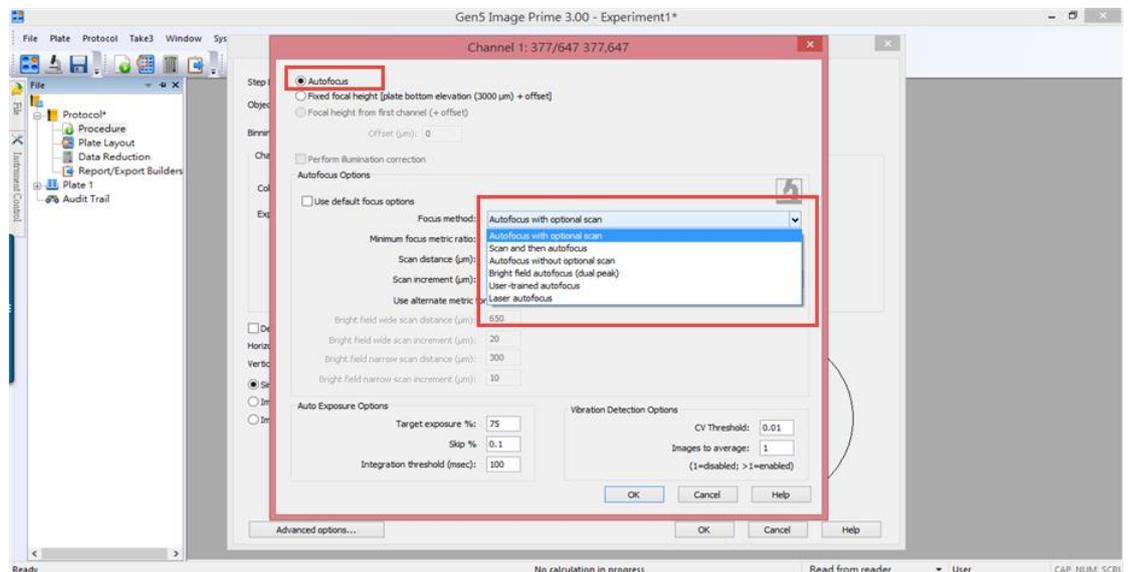
- 7.7 於彈出的視窗中，中選取欲設定曝光的位置，所選位置會反白呈現，確定後點擊OK。



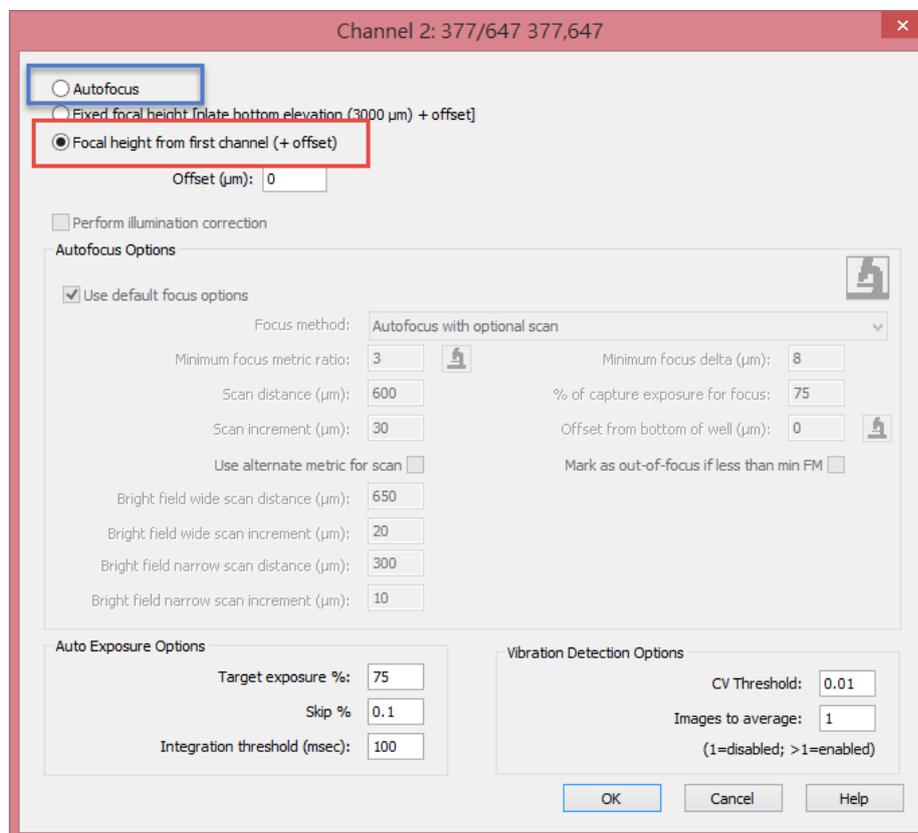
7.8 若欲擷取另一顏色影像，則於數字2 前面的圈圈內點擊一下。其餘設定步驟同上。



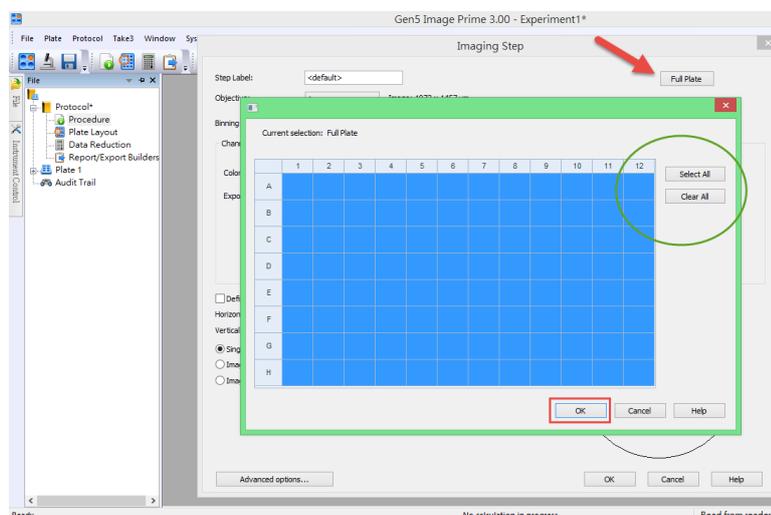
7.9 於Channel1下方，點擊Options，更改自動對焦的條件，預設為使用“Autofocus with optional scan”的焦距設定，若不更改則可跳過此步驟。



- 7.10 於Channel 2~4下方options，焦距設定視窗中，可點擊“Auto-focus”自動對焦，選擇對焦模式，確認後點擊OK。或是點選紅框內的“focal height from first channel (+ offset)”，遵照第一個channel的對焦方法即可。



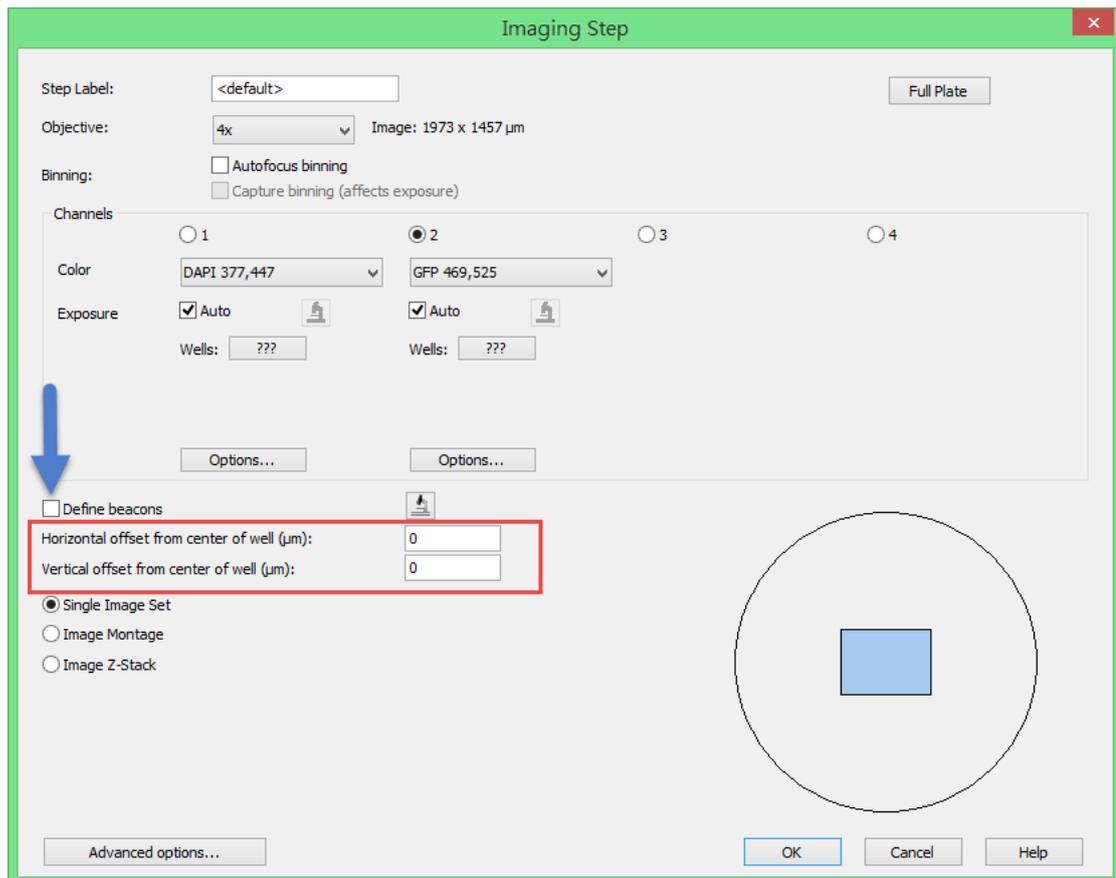
- 7.11 點擊Full Plate，選擇欲讀取的位置。預設為Full Plate (全盤讀取)，故若要全盤讀取則可跳過此步驟。
- 7.12 於彈出的視窗內，點擊Clear all。
- 7.13 於孔盤中拖曳選取欲讀取的位置，所選位置會反白呈現，確定後點擊OK。影像擷取



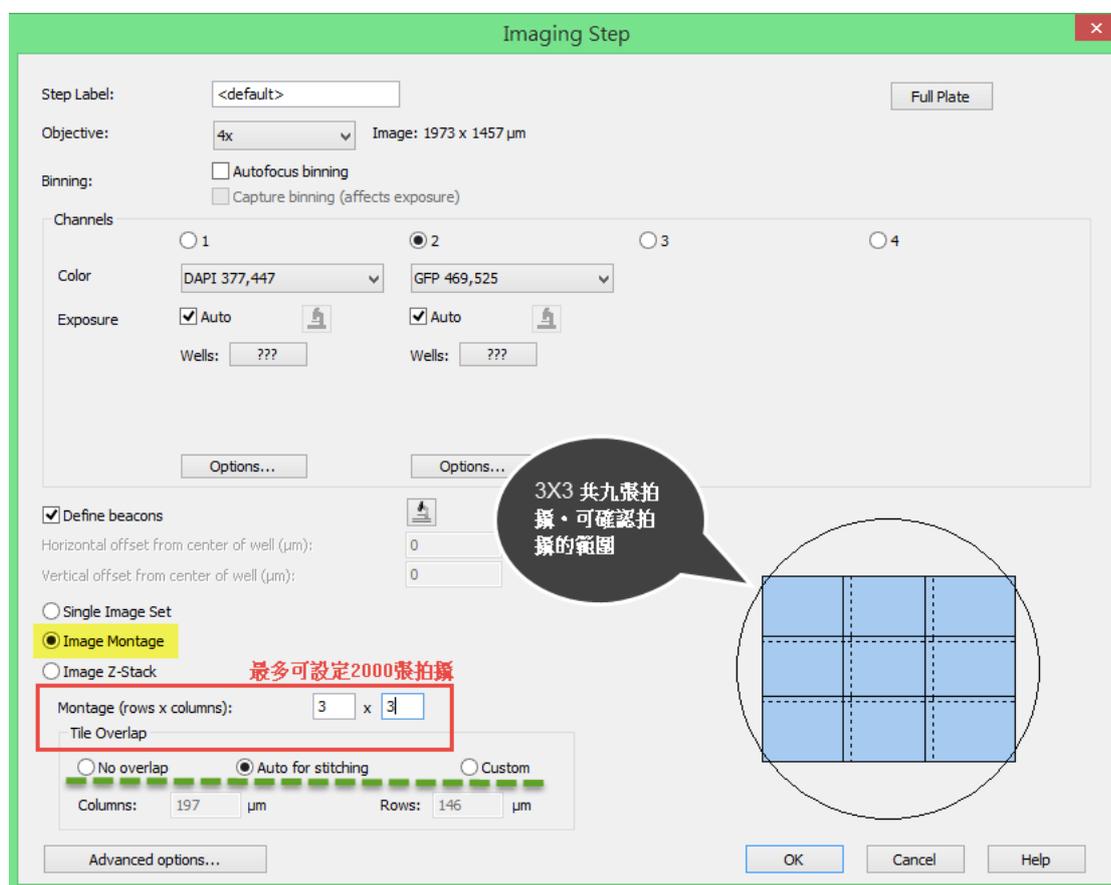
7.14 於Horizontal offset from center of well (μm)後方輸入數值，即可進行X方向的位移(例如下圖紅框內:0 為正中間,500 為右移,-500 為左移)。

7.15 於Vertical offset from center of well (μm)後方輸入數值，即可進行Y方向的位移 (例如下圖紅框內:0 為正中間,500 為上移,-500 為下移)。

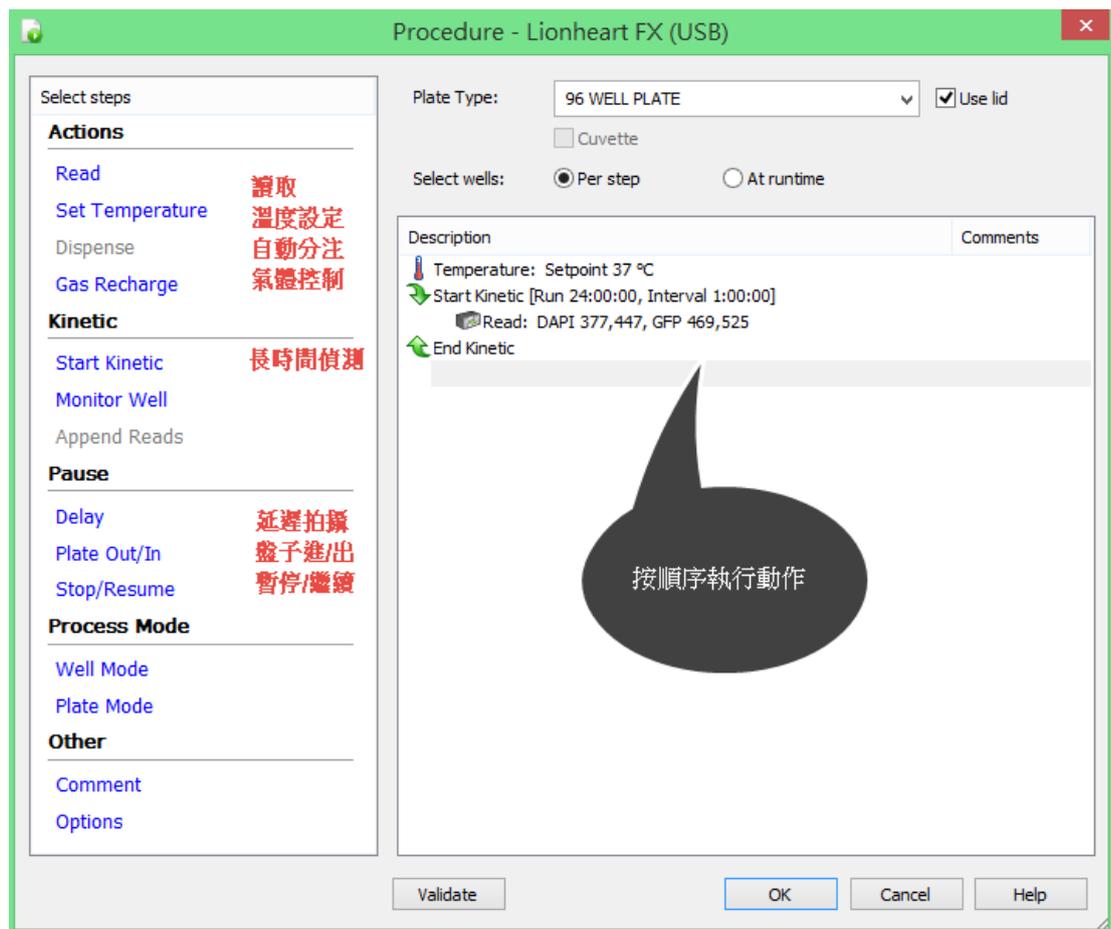
7.16 若每個well的拍攝位置不同，可以勾選Define Beacon(藍色箭頭)個別設定拍攝位置。



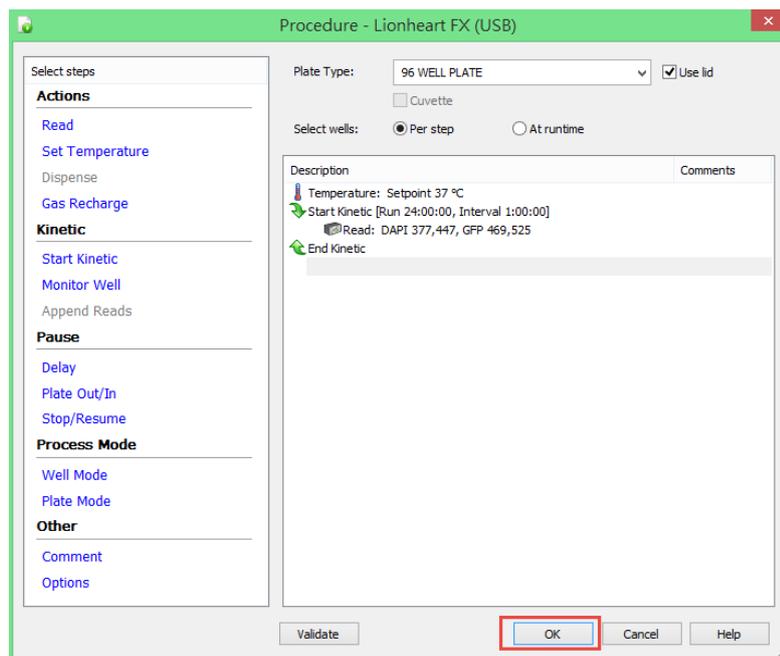
- 7.17 點擊Image Montage，即可進行多點拍攝，若只需單點拍攝則可跳過此步驟。
- 7.18 於Montage (rows x columns)後方輸入數值，前方方框為橫列數 (例如：輸入3 為三橫列)。
- 7.19 於Montage (rows x columns)後方輸入數值，後方方框為直欄數 (例如：輸入2 為二直欄)。
- 7.20 於下方The Overlap 欄位中(綠色虛線)，點擊Custom，即更改影像間的距離，預設為Auto for stitching (影像縫合)，故若要縫圖則可跳過此步驟。
- 7.21 於Columns 後方輸入數值，即可調整左右相鄰影像間的距離 (例如：0 為相鄰而不重疊，500 為重疊，-500 為相隔)。
- 7.22 於Rows 後方輸入數值，即可調整上下相鄰影像間的距離 (例如：0 為相鄰而不重疊，500 為重疊，-500 為相隔)，確認後點擊OK 即可。



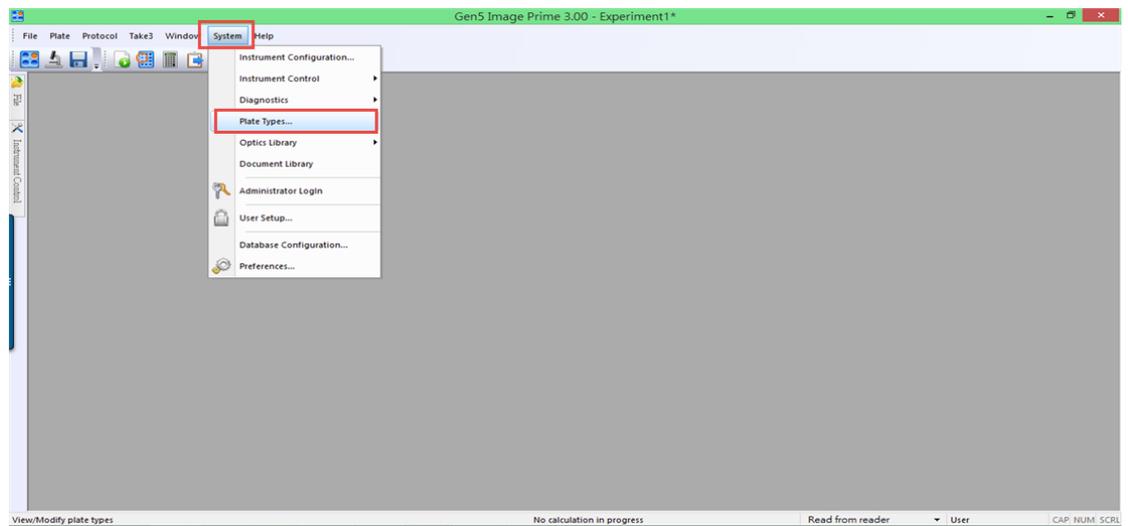
7.23 若有其他設定需求，可於Procedure視窗左側，點選步驟。



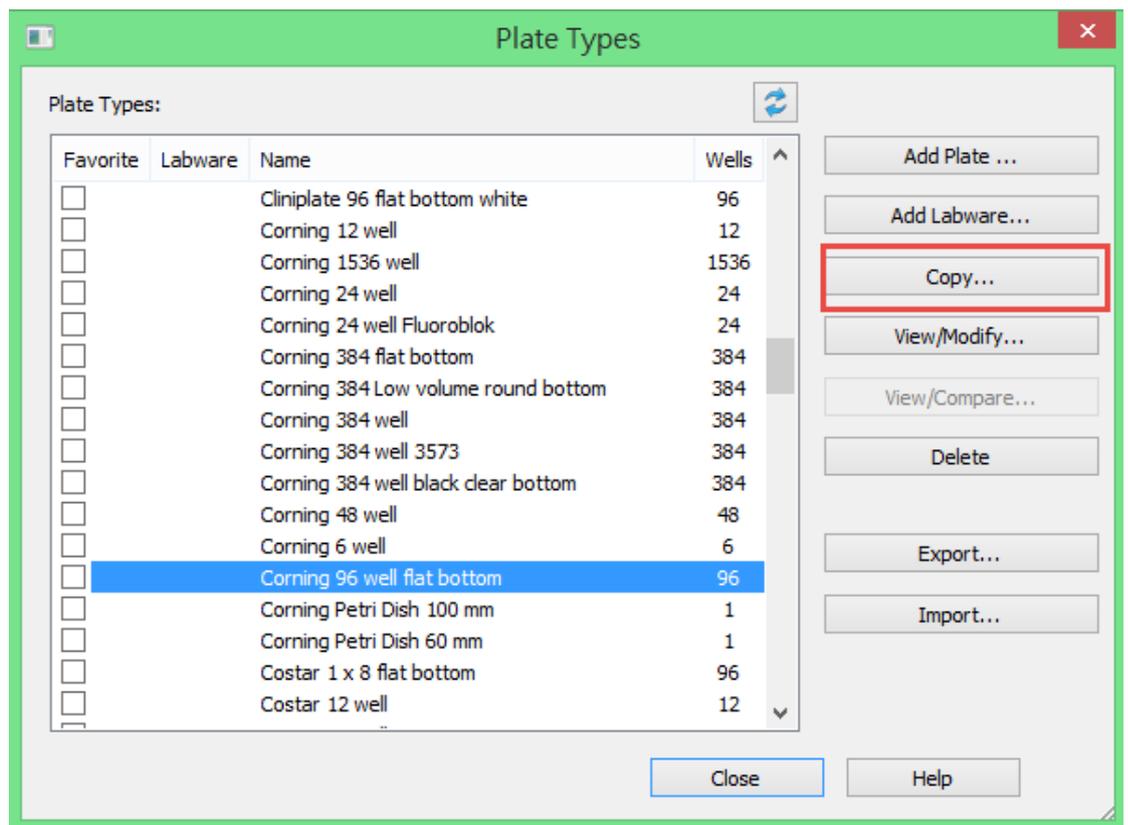
7.24 回到原本Procedure 視窗，在Description 欄位中可看到已新增之項目，為此次讀取的波長和位置，確認後點擊Ok 即可。



- 8 孔盤Bottom Elevation設定 (自動化實驗之前需設定)，點選上方System>Plate Type



點選相符合之孔盤，點選右側Copy。



於Plate Description視窗中，自訂名稱。點選右側Imaging Parameters，進行Bottom Elevation 設定

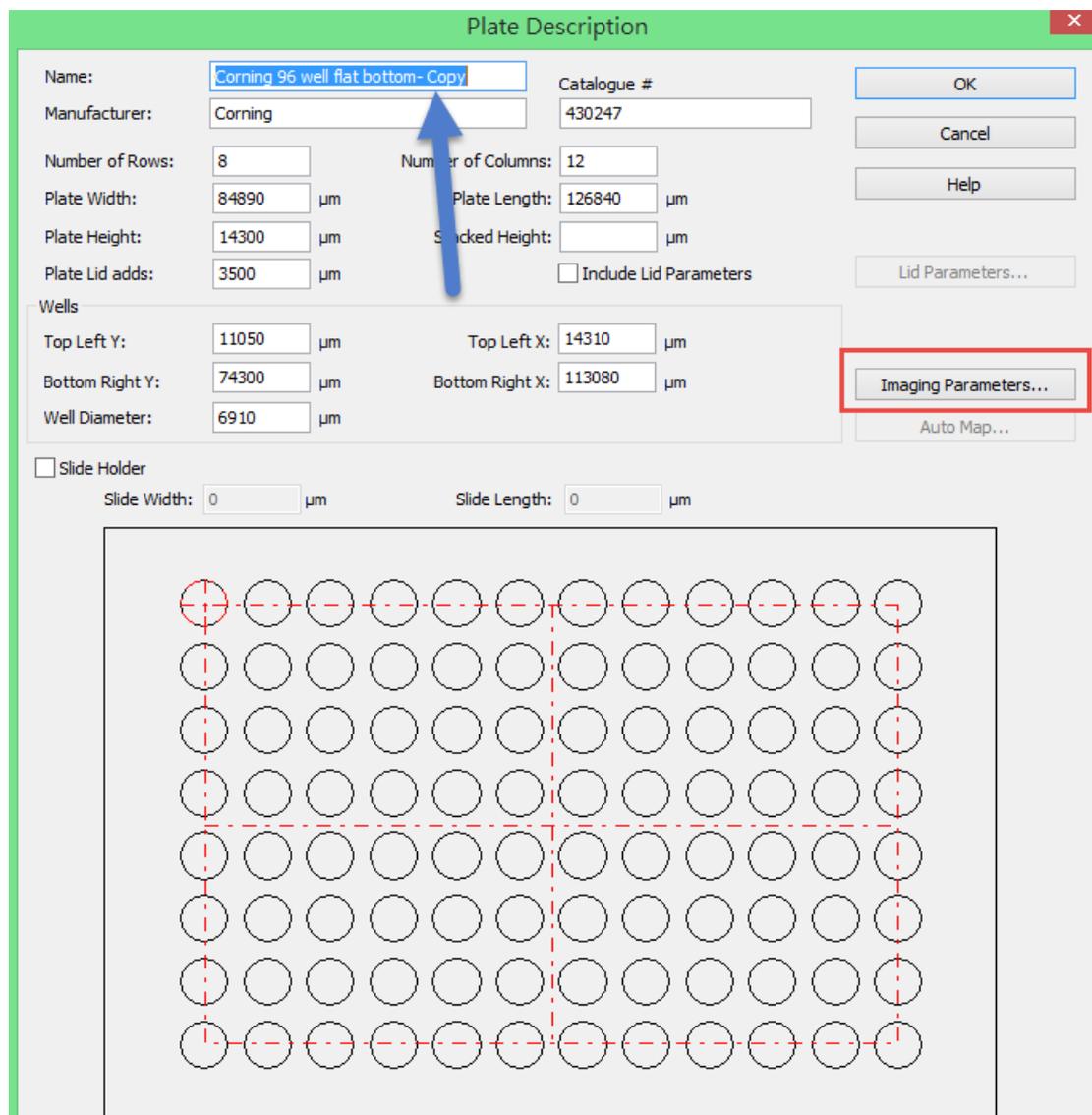


Plate Description

Name: Catalogue #:

Manufacturer:

Number of Rows: Number of Columns:

Plate Width: μm Plate Length: μm

Plate Height: μm Stacked Height: μm

Plate Lid adds: μm Include Lid Parameters

Wells

Top Left Y: μm Top Left X: μm

Bottom Right Y: μm Bottom Right X: μm

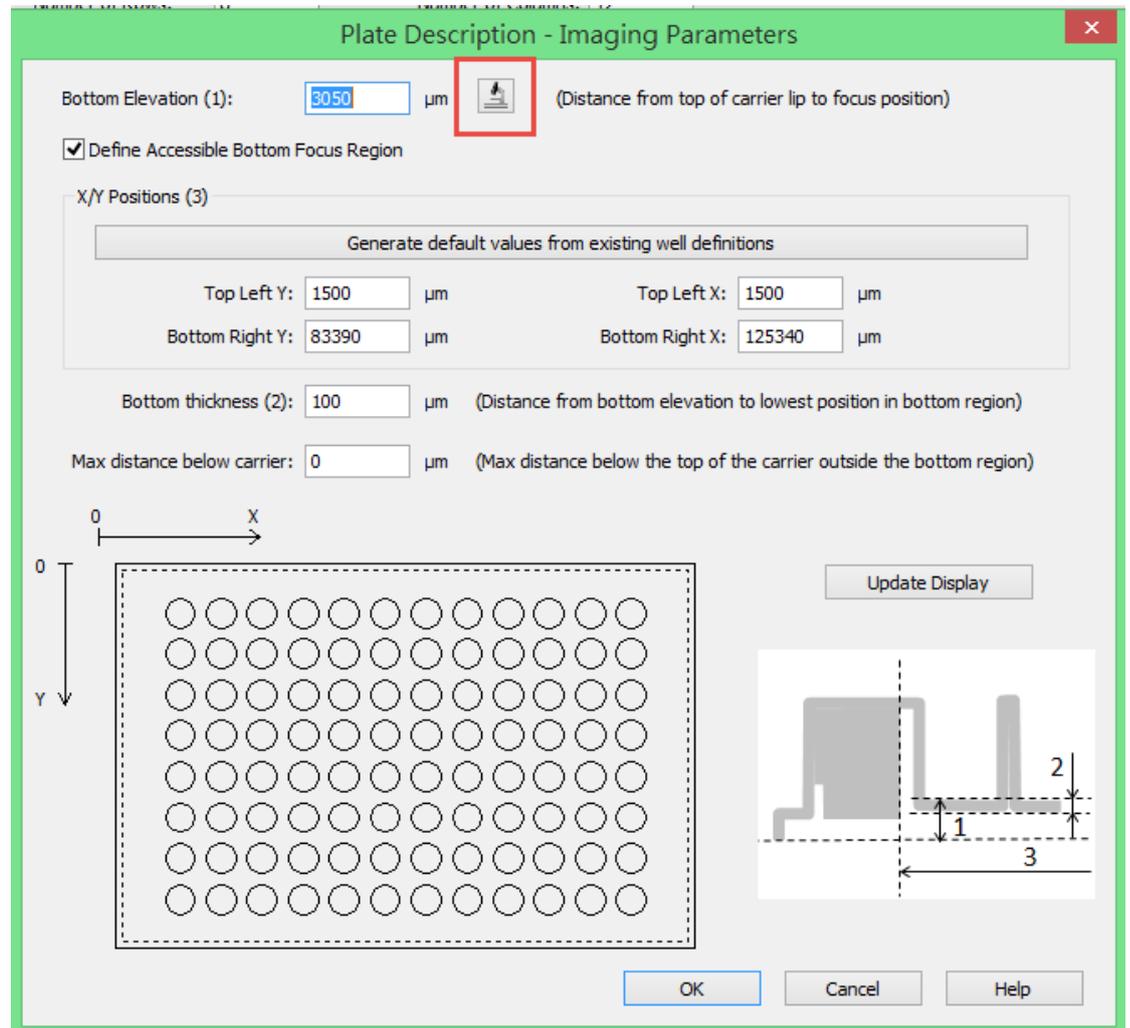
Well Diameter: μm

Slide Holder

Slide Width: μm Slide Length: μm

Buttons: OK, Cancel, Help, Lid Parameters..., Imaging Parameters..., Auto Map...

於Plate Description彈跳視窗中，點選  進行對焦。



待找到合適的對焦位子後，點選Save settings。設定即完成。

