

TISSUEFAXS PLUS 明场图像采集步骤

一. 使用入门

1	开启软件、自动校准。	2
2	玻片放置	3
3	新建实验 (NEW EXPERIMENT)	4
4	组织预览	5
5	组织区域识别/选定	6
6	图像获取	9
7	获取图像浏览	11
8	图像输出	12

二. 使用进阶

1	预览区域过大, 如何调小?	16
2	玻片较多时, 如何使用相同参数扫描?	16
3	如何实现自动化扫描?	19
4	机器无法自动聚焦到组织?	20
5	图像呈网格状, 如何调整?	21
6	少量视野图像不清楚, 如何重新获取?	23
7	组织平整度较差, 如何实现 Z 轴叠加扫描?	24
8	拍摄图像出现较多过渡的失焦现象, 如何优化?	24
9	如何拍摄 TMA 芯片?	24

一.使用入门

1 开启软件、自动校准。

1.1 打开“TissueFAXS”软件。

在登陆页面，输入密码(若无，跳过)，点击 **I Agree and Login** 机器后台自检完成后，弹出软件操作页面。



图 1

1.2 载台自检(Stage Calibration)。

进入软件操作界面，图 2 窗口自动弹出，**确认载台周围无障碍物后**，点击 **Continue**，等待自检完成。

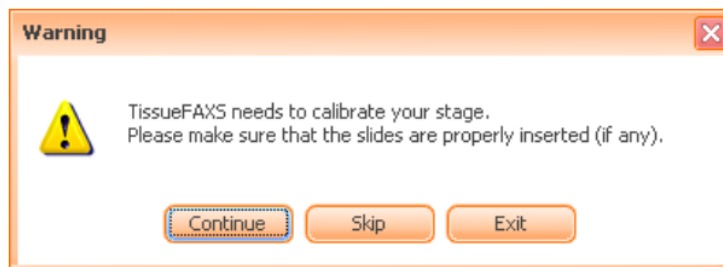


图 2

TissueFAXS 拍摄流程包括：



2 玻片放置

点击右屏右上角 **load** 按钮（图 3），待载台下降后，取下玻片架（注意勿撞到物镜）。按住、回拉银色按钮、放入玻片。保证图 4 所示红色玻片两边紧贴玻片槽，使玻片稳固。（注：玻片请擦拭干净）

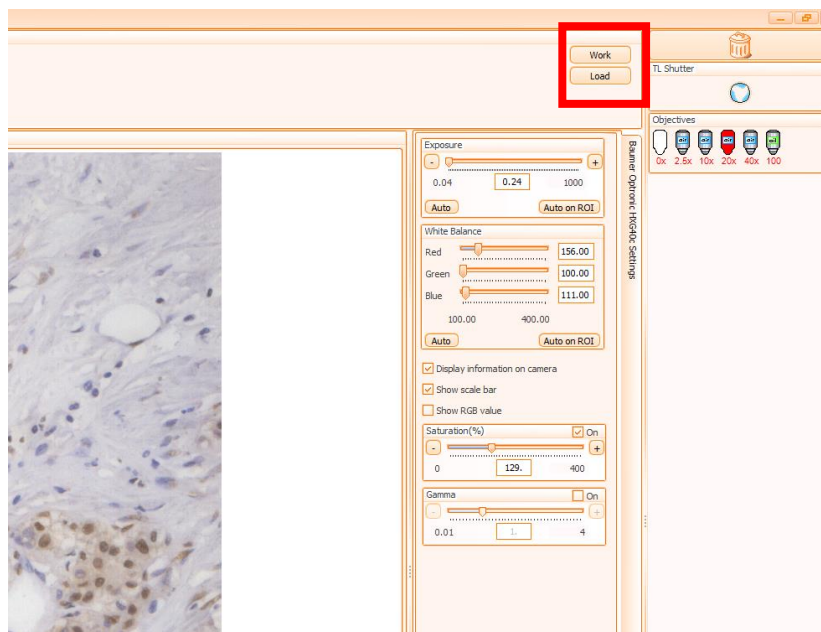


图 3



图 4

按图 5 所示方位，将玻片架推入载台内，最后会听到“咔、咔”两声，再次检查玻片架四角，确认玻片架是否放置稳固。

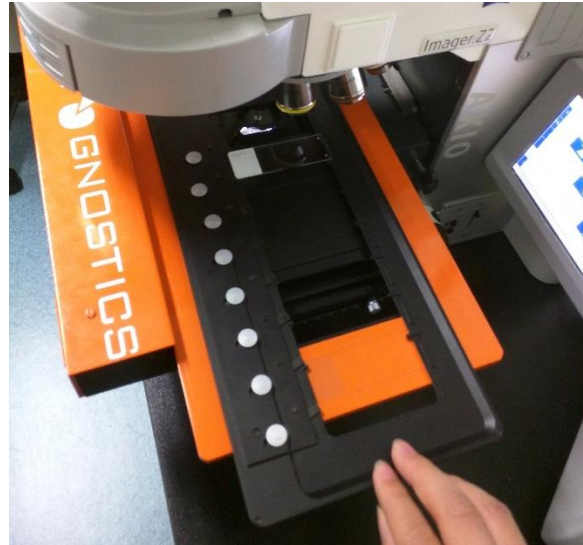


图 5

3 新建实验 (New experiment)

点击左屏右上角(图 6)New...按钮新建实验。



图 6

图 7 页面弹出后, 选择新建实验类型:

新建试验有三种方式:

1. **Templates:** 模板 (TissueFAXS 允许用户将拍摄参数保存成模板进行大批量的拍摄), 使用模板自动化程度最高, 节省大量操作。具体使用方法在讲解。
2. **From Existing Experiment:** 直接调用已拍摄的实验参数, 进行新的扫描。
3. **Custom BF/Custom FL:** 用户设定参数进行拍摄。

在此我们先介绍第 3 种方式。

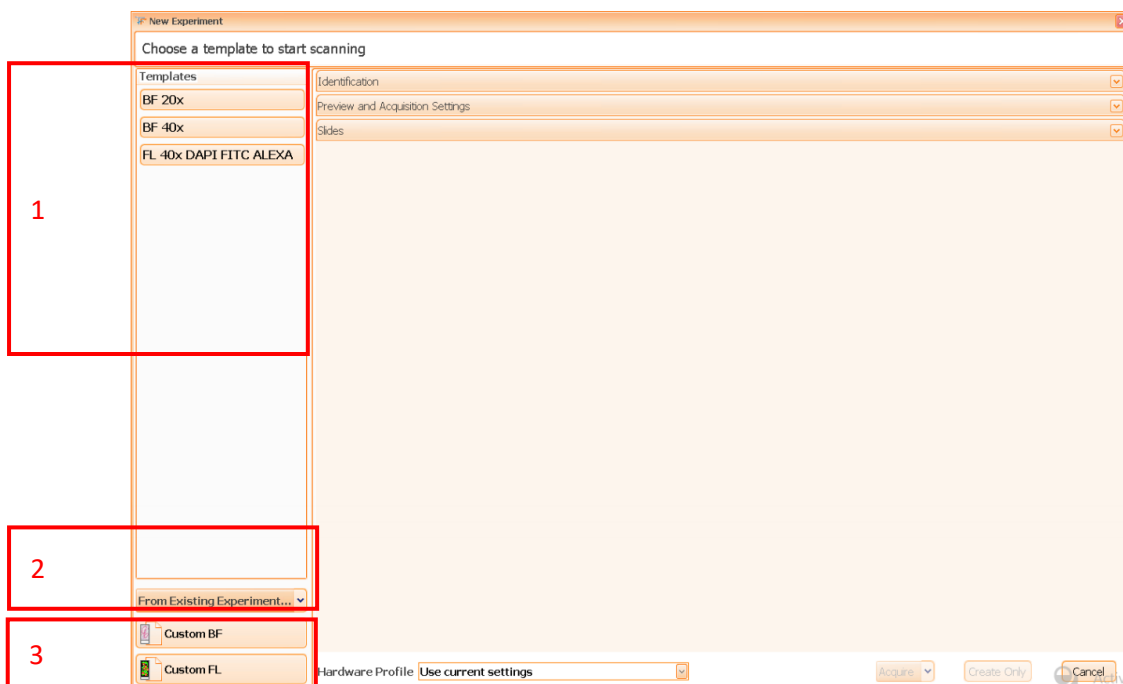


图 7

- **Custom BF**(建立新的明场图像扫描实验, 重新调整设置, 图 9)

新建后进行参数设置, 包括:

1. **Name**(实验名称)
2. **Storage Folder**(数据存储位置)
3. **Preview Objective**(预览时物镜), **Acquire Objective**(获取图像时物镜)
4. **Slide: Name** (玻片名称), **Content type**(玻片类型, **Generic**(普通)或 **TMA**(组织芯片))。

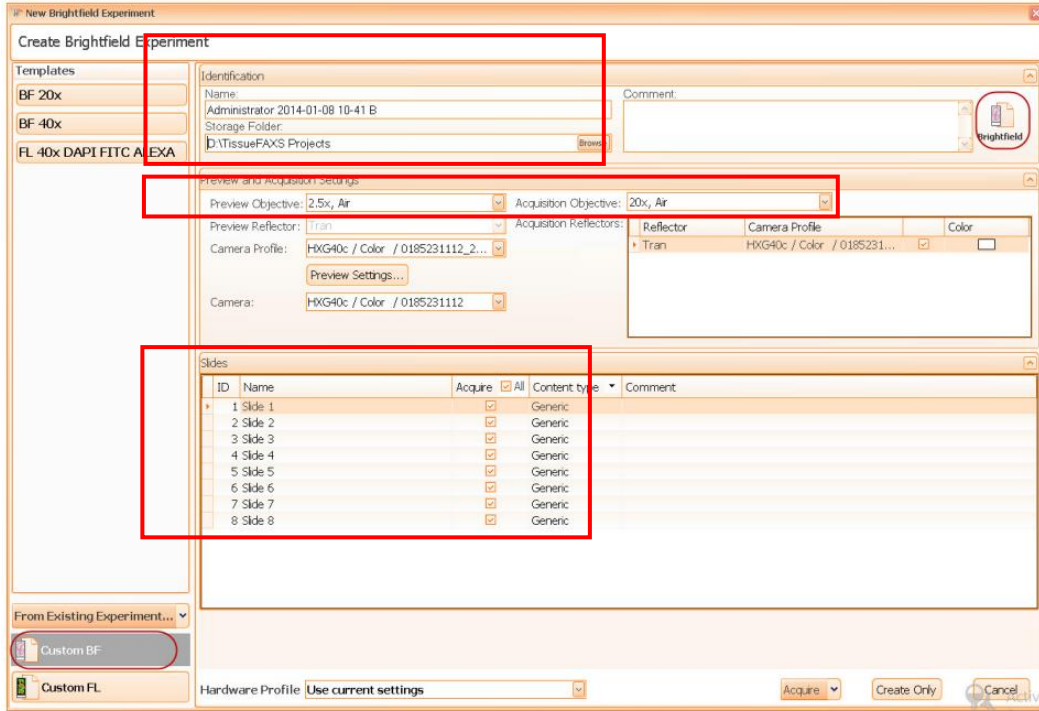




图 9

4 组织预览

点击  按钮进行预览选中玻片 (红色虚线圈中的玻片)。也点击下拉按钮  , 选择 **Preview multiple...** (图 14)。图 15 跳出后, 勾选需要预览的玻片, 点击 OK, 预览多张玻片。

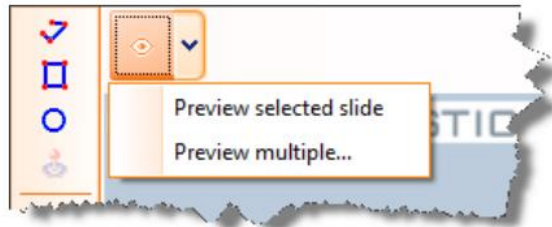


图 14



图 15

5 组织区域识别/选定

玻片预览完成后，选定拍摄区域，方法有两种：1 组织区域自动识别；2：手动选定。

5.1 自动识别

选中需要进行识别的玻片，点击 **Tissue Detection**（组织识别）按钮 ，图 16 窗口弹出。

显示默认参数识别结果。如不理想可进行调整。

1. 区域调整。

软件将其他区域杂质或盖玻片轮廓识别为组织区域，可调整识别区域，排除干扰。

按住鼠标左键，拖动生成框（图，篮框）。点击左下角 **Run selection**。软件仅在选定区域内识别组织。

2. 参数调整（右侧 **Detection Parameters**）

● **Tissue**

- **Minimum Tissue Area:** 当组织较小，未被识别到时，可调小该值；识别小杂质时，可调大改值进行屏蔽。
- **Tissue Closing Radius:** 增大该值，距离较近（不接触）的两块组织会被识别为一个 region,减小该值，可使距离较近（不接触）的两块组织识别为不同的 regions。
- **Exclude border connected regions:** 勾选后，接触到边界的组织不会被识别。

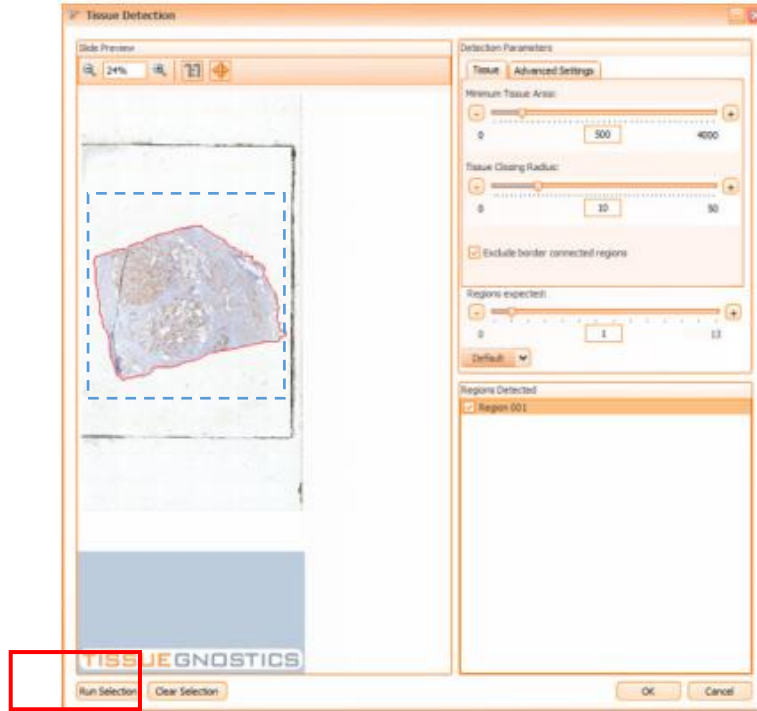


图 16

● **Advanced Settings** (图 17)

■ **Thresholds**

- **Automatic:** 自动设定 RGB 的阈值进行组织识别。
- **Apply same value for all channels:** 勾选后, RGB 采用相同的阈值。调整 Red 后, Green, Blue 一起变化。
- **Red, Green, Blue:** 分别调整 RGB 阈值用于组织识别。

■ **Point Generation**(图 18) (软件进行组织识别时, 会先根据组织边界形成多个虚拟点, 而后连接相邻虚拟点, 形成轮廓)

- **Distance:** 调整轮廓离组织边缘距离, 数值越大, 距离越大。
- **Max Step:** 调整软件识别过程中虚拟点间的间距, 距离越小, 轮廓精确度越高。

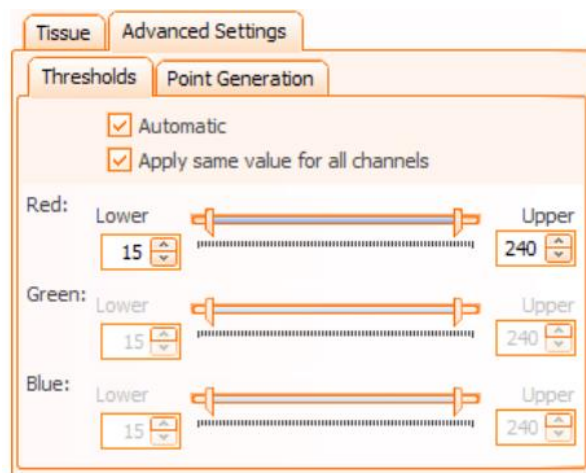


图 17

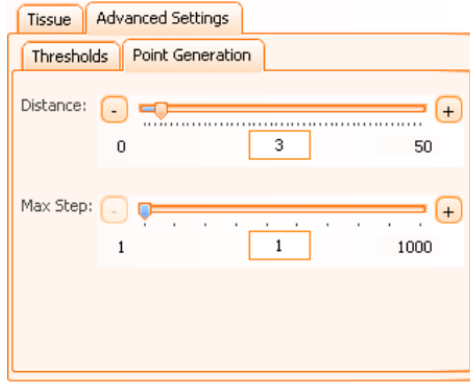


图 18

- **Region expected:**
期望识别到的组织数目。

5.2 手动选择

如想直接手动选择获取区域，可用图 20 红圈内工具。三个分别工具分别为自由划定折线图，矩形，椭圆形。

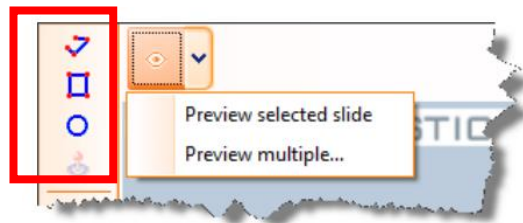


图 20

软件识别或者自己圈定的 Region 会列在每个玻片之下。

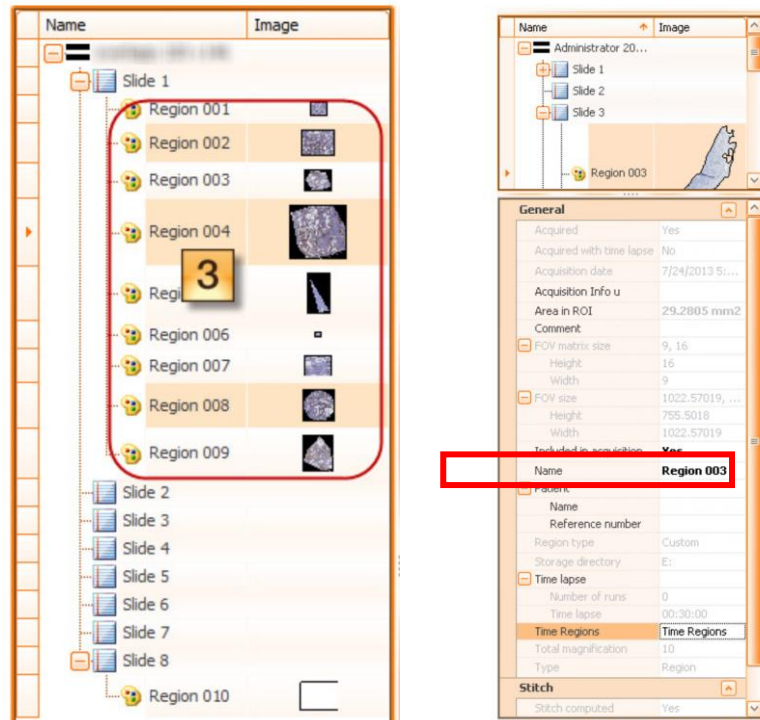
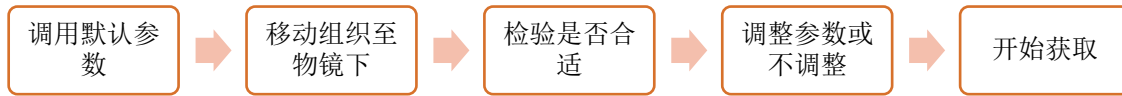


图 21

如需对每个 Region 名称进行重命名，可在 Name 处进行更改（图 21 右侧，注意：图像获取后，无法进行重命名，2.5X 预览后可重命名）。

6 图像获取

图像获取流程：



6.1 调用默认参数

图像获取涉及到光照强度、曝光时间、白平衡等参数设定。TissueFAXS 会自动加载默认参数，即 Camera Profile 文件（红圈内文件）。

可以先看一下默认参数是否适用于自己的样本。点击 Acquisition----物镜(最开始选定)----点击 View 键。显微镜自动切换至高倍物镜，并加载参数。

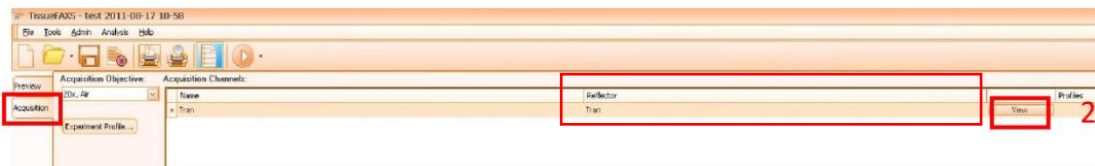


图 23

6.2 移动组织至物镜下

可利用手柄移动或直接在组织上点击右键，选择 Go To This Point.

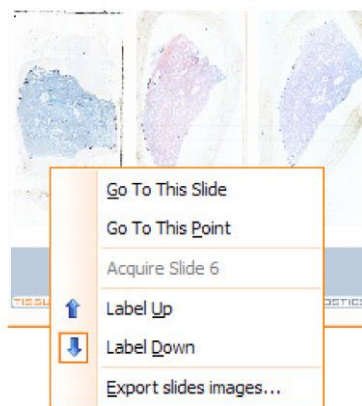


图 24

6.3 自动聚焦，参数调整

点击左上角 4 红框内按钮进行自动聚焦。如可聚焦并且图像质量满足要求（曝光时间、白平衡等合适），可不进行下列参数调节，直接进行 6.4。

一般情况下仅曝光时间因组织厚度差异可能需要调整外，其他均不用调整。

Exposure time 曝光时间：点击右上角 5 红框内 Auto 按钮进行自动曝光，也可手动滑动、输入曝光时间。右下角 sensor saturation 色块对曝光情况给出参考，红色表明过曝。绿色表明未过曝。根据自身需求设定合适曝光时间。

White balance 白平衡：通过在空白区域进行自动白平衡（Auto），或选定区域 ROI 白平衡(Auto on ROI)，或手动调节，（默认参数下显示真实的背景色）。

Saturation 色彩饱和度：调节色彩饱和度。

Gamma：调整图像对比度。

调节合适后，切记点击 **8** 红框内 **Save** 按钮对调解后参数进行保存。

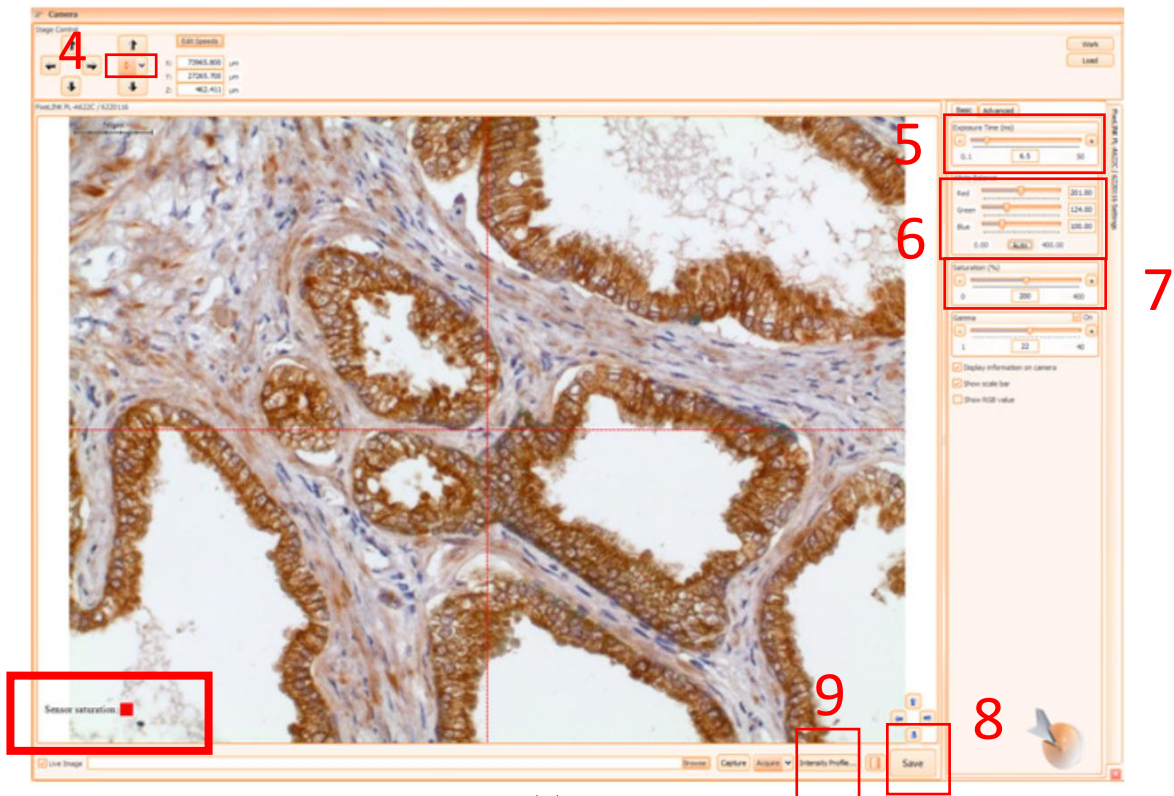


图 25

6.4 直接点击 **Acquire** 按钮（图 28），进行所有 Regions 图像扫描。

或者点击下拉框，选择：

Finish Acquisition: 扫描未扫描过的 Region.

Acquire All...: 扫描所有 Regions.

Select Items to Acquire...: 选择要扫描的 Regions.

Preview & Acquire: 点击后机器自动预览全玻片并高倍镜获取全玻片图像。

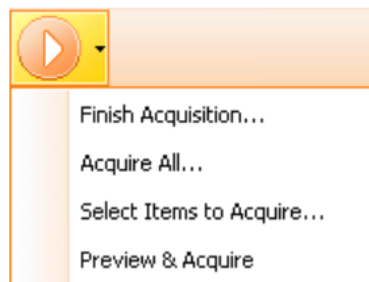


图 28

软件弹出图像获取信息窗口（图 29）。

Beep after Finish: 扫描完成后，蜂鸣提示。

Acquire correction Image:（如采用默认参数进行拍摄无需勾选。如果重新保存参数，勾选）。
点击 **Acquire**。软件自动进行图像获取。

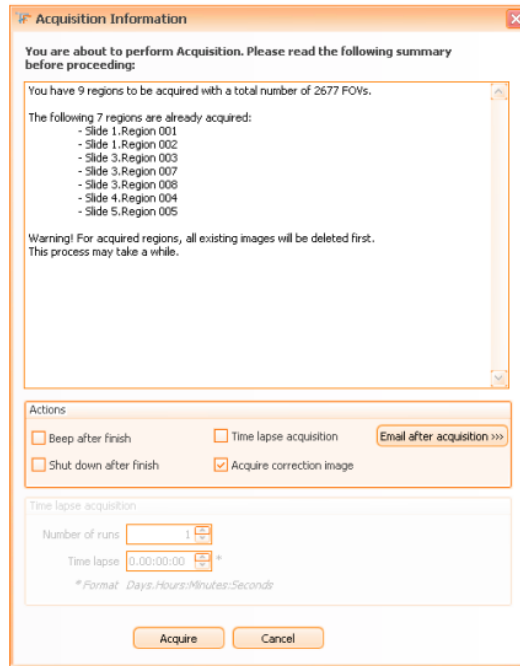
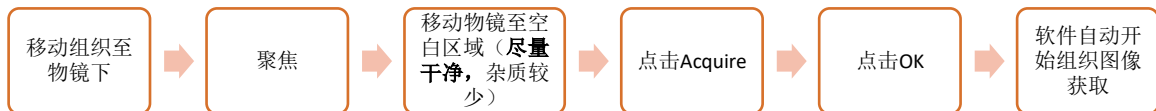


图 29

如勾选了 **Acquire correction Image**，会弹出获取 Correction Image 窗口，进行 Correction Image 获取：



所有区域获取完成后，图像已进行自动保存，无需其他操作。

拍摄过程中可点击  停止拍摄。

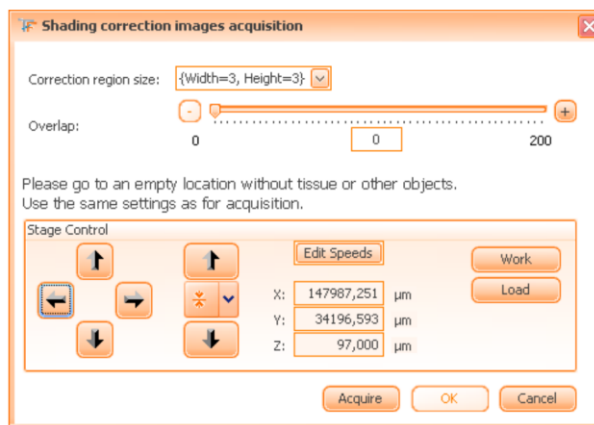


图 27

7 获取图像浏览

可在左侧 region 列表上，双击任意 region，查看其获取图像，双击后弹出图 4。

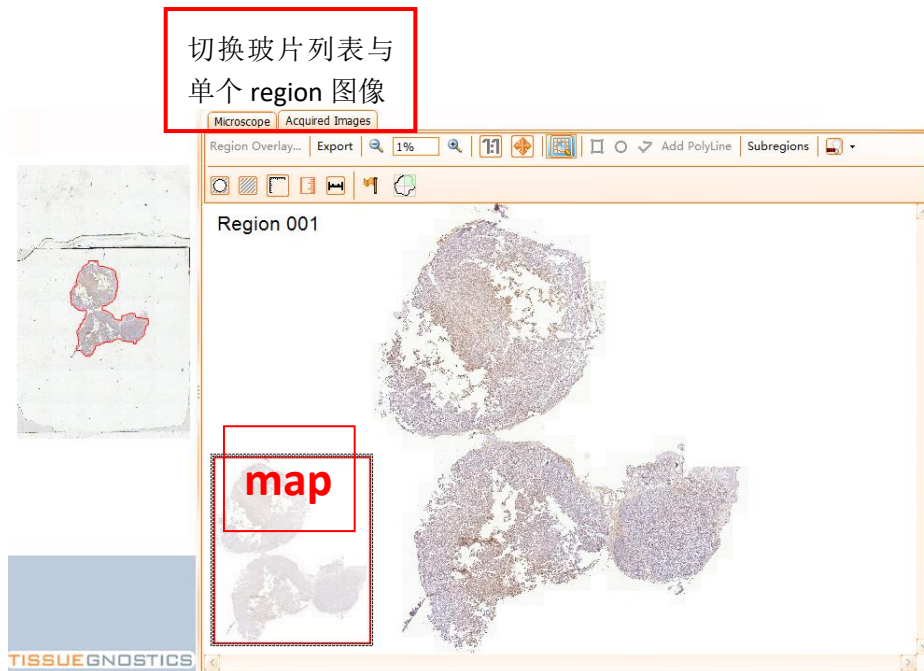


图 4

可利用鼠标滚轮任意放大或缩小查看。

也可按住鼠标右键圈出想放大查看的区域。

或者点击左下角 map 中想要查看的位置，自动跳转至该位置。

8 图像输出

如需将图片保存为图片格式（tif、jpg 等）作为其他用途时，可进行图像输出。

输出图像存在多种输出选择：

1. 输出该 region 的完整全图。
2. 选定部分区域输出图像。

8.1 选择输出区域

点击 Subregions，选择 manage categories，弹出窗口（图 9）中输入新建 category 名字(如 Tumor)，可更改该 Category 标记颜色，设置完成点击 OK。再次点击 Subregions，点击新建的 Category (如 Tumor) 后，即可利用圈选工具（红框内三个）进行圈选（图 38），圈中区域会自动命名，如 Tumor 1, Tumor2...

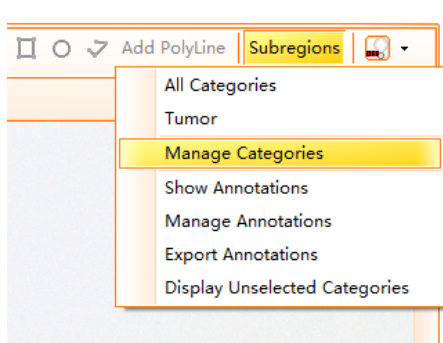


图 8

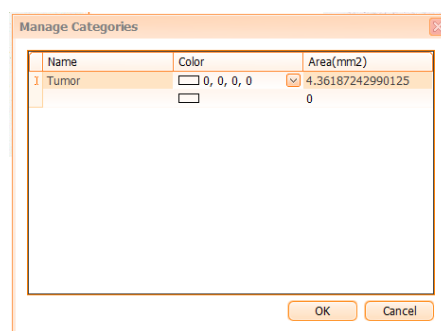


图 9

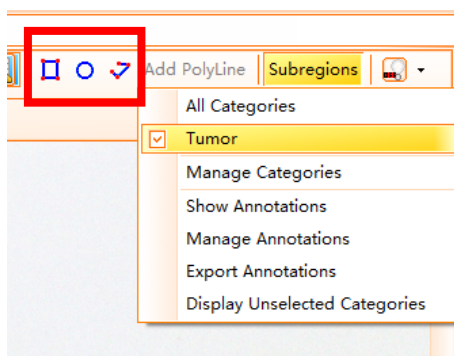


图 10

8.2 输出图像

点击 Export 输出

Field of view: 每个 FOV 以独立图像保存（不常用）。

Region Overview: 输出全局图像（包括整个 region 或圈选区域输出）：

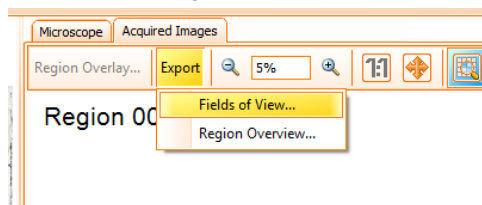


图 11

Region Overview:

点击 **Region Overview**，弹出窗口（图 12）

- **Save to folder:** 点击 Browse 选择图像保存位置。
- **Export only overviews from categories:** 输出在步骤 8.1 里圈定的区域。
Export Region Overview: 输出整个 region 图像。
二者根据需要选择。
- **I want to stitch thumbnails:** 输出图像分辨率较低
- **I want to specify a custom size for images to stitch:** 选定图像压缩比输出。如：100%：不压缩；50%：压缩 50%。
- **Include Categories:** 选择要输出的 category（即 subregion）。
Opacity: 输出 category 名字透明度。
- **Mark Crop Area:** 输出图像添加边界，不需边界不勾选，可自定义边界颜色。
- **Scale bar:** 添加比例尺
- **Apply Illumination Correction:** 输出图像应用光源校正。

设置完成后点击 Export，输出图像。

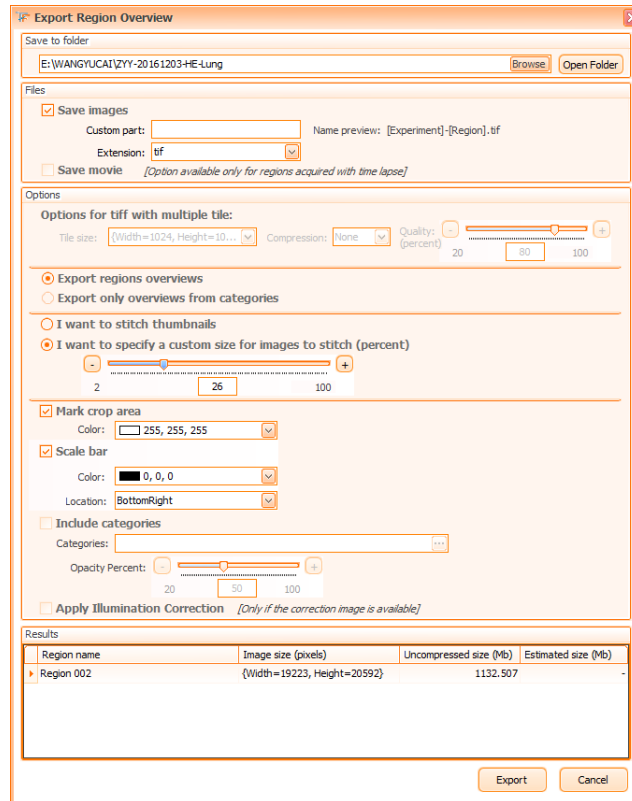


图 12

如有需要可选 **Field of view**（每个视野以独立图像保存）：

如想保存所用 FOV 直接进行以下操作：

点击 **Field of view**，弹出窗口（图 13）。

➤ **Save to folder:** 点击 Browse 选择输出位置。

Save image: 默认勾选。

Use stitch: 勾选每个 FOV 输出图像不包含重叠区域；不勾选每个 FOV 输出图像包含重叠区域。

File name convention: 输出文件命名规则。

➤ **Image Format:** 选择输出图像格式。

Please select what image will be saved:

All: 输出所有 FOV；

Flags Only: 输出插旗 FOVs；

Flags With Neighbc: 输出插旗 FOV 及相邻 FOVs。

Invert Selector: 输出插旗 FOV 以外所有 FOVs（反向选择）。

Export only FOVs belonging to categories: 勾选后仅属于 categories 内的 FOVs 被输出。

如仅想保存部分 FOV 图像，可先利用 Flag 工具标记后，再进行以下操作。

➤ **Mark Crop Area:** 输出图像添加边界，不需边界不勾选，可自定义边界颜色。

➤ **Scale bar:** 添加比例尺

➤ **Apply Illumination Correction:** 输出图像应用光源校正，一定要勾选。

设置完成后点击 Save，输出图像。

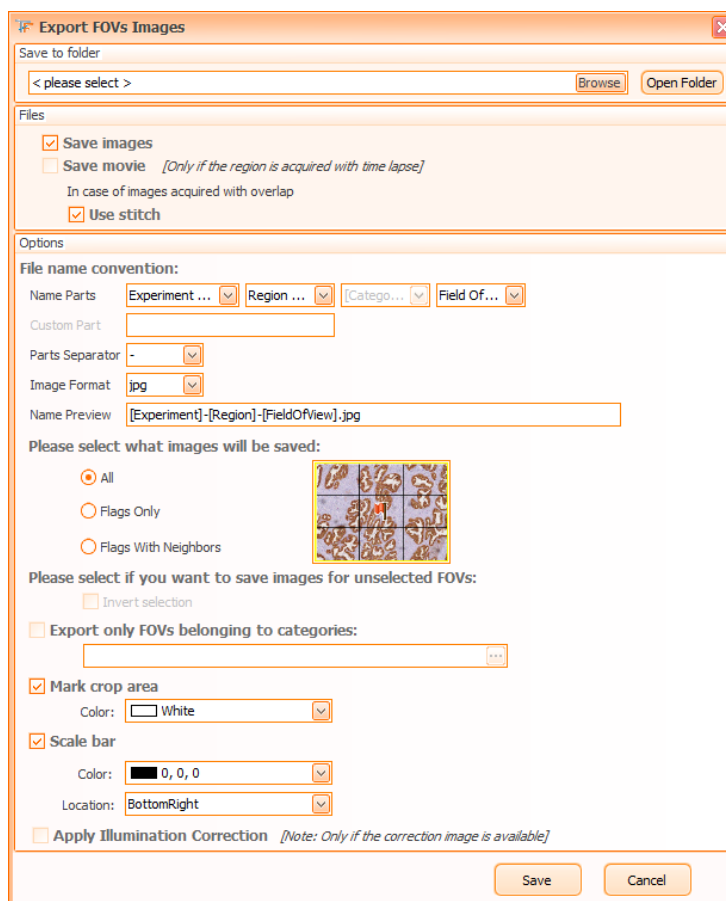


图 13

8.3 批量输出

如想同时输出整个试验中**所有玻片**图像或者某个玻片中所有 Regions，如图中点击鼠标右键选择相应选项。后续操作同 8.2.

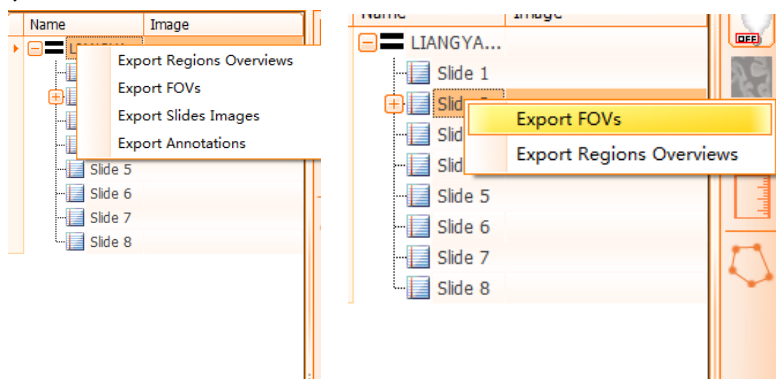


图 14

其中 Export Slide Image 为输出 2.5x 拍摄的图像。也可在玻片预览区域点击鼠标右键，选择 Export Slide Image.

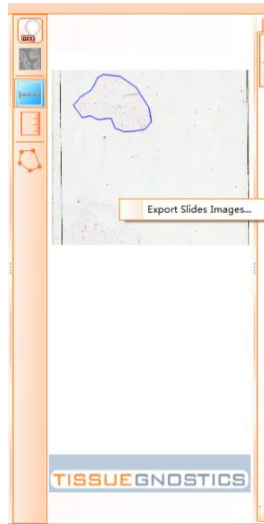
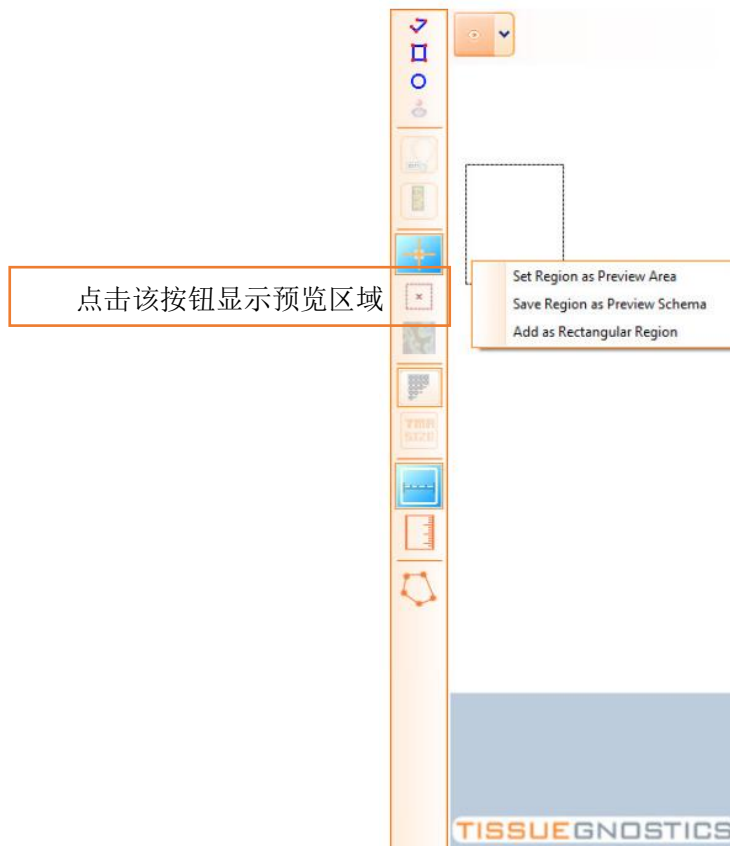


图 15

二. 使用进阶

1 预览区域过大，如何调小？

如需调整**预览区域**，按住鼠标左键，拖动鼠标选出预览区域，点击右键选择“**Set Region as Preview Area**”，完成预览区域调整（图 13）。



2 玻片较多时，如何使用相同参数扫描？

方法有三种：

- 1.1 使用自己的 Camera profile
- 1.2 新建实验时，选择 Existing Experiment...
- 1.3 新建实验时，选择 Templates

2.1 Camera profile

使用 Camera Profile 拍摄流程：



2.1.1 Camera profile 保存

默认 Camera profile 参数不合适，如果玻片量较多，可将保存参数文件，用于玻片扫描。

保存步骤如下：

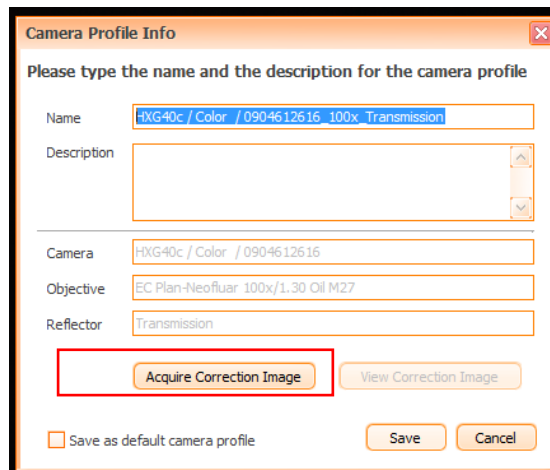
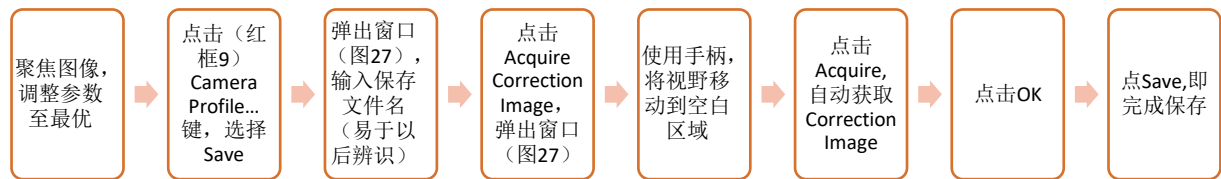


图 26

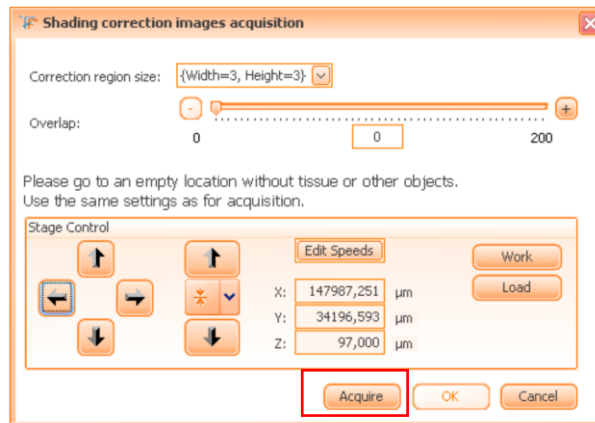


图 27

2.1.2 调用 Camera Profile

新建实验，组织预览，组织识别后，点击 **Acquire**，点击下拉箭头，选中想调用的 **Camera Profile**。即可开始拍摄。

2.2 Existing Experiment...

直接调用旧实验的参数进行新的扫描，图 11

点击 **Existing Experiment...** 键或下拉箭头，选中想要调用的实验参数。

右侧更改一下内容：

Name(实验名称)，

Storage folder（数据存储位置），

slide 下拉框内玻片名称、类型（普通或 TMA）进行更改。

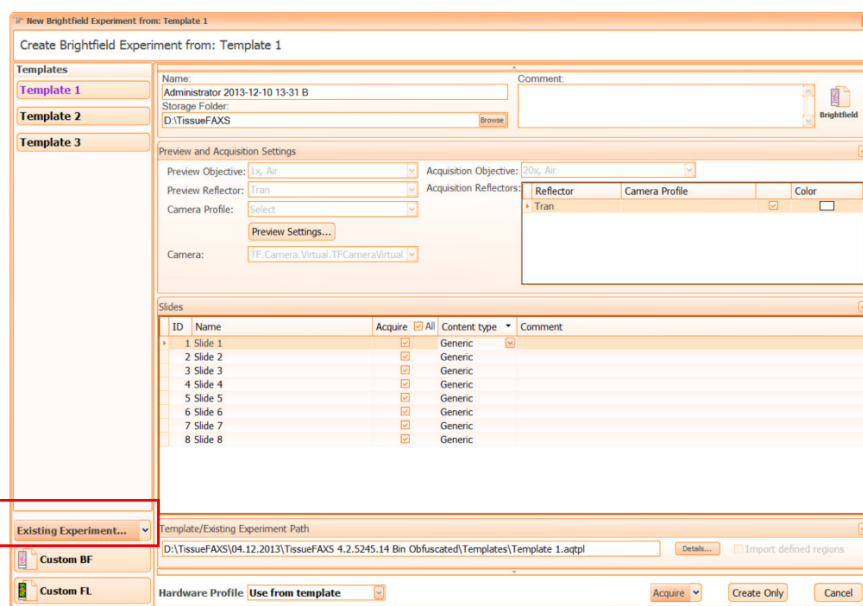
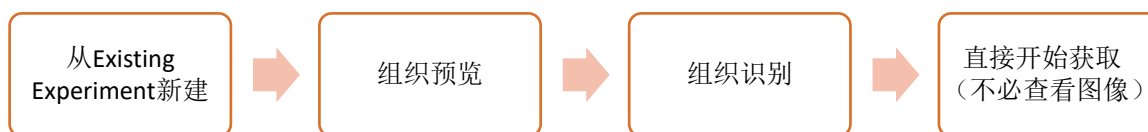


图 11

参数设定完毕后，点击 **Create Only**，完成新建实验步骤，进入图像获取界面。

拍摄流程：



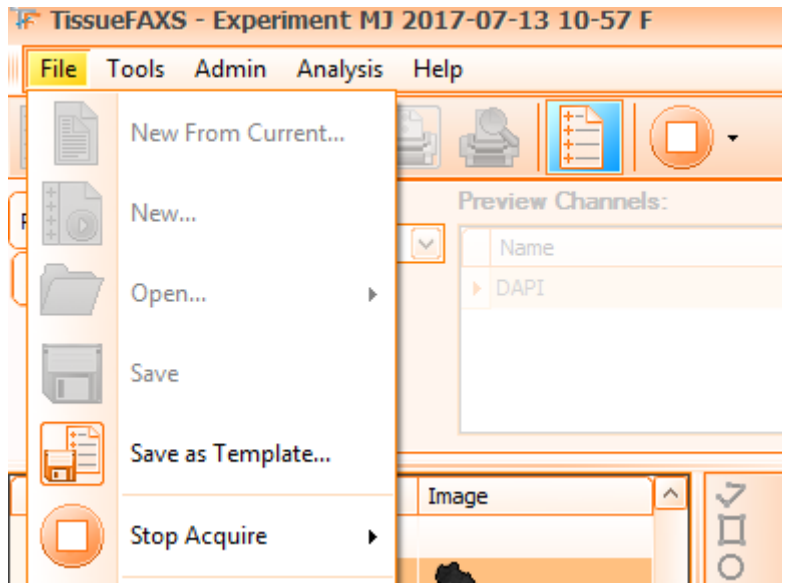
2.3 Templates

2.3.1 Template 保存

用户可以将自己的扫描设定保存成模板 **Template**，用于直接调用拍摄。**Template** 内包含预览区域范围、组织识别参数、扫描参数设置等文件，均设定合适后再保存。

保存方式：

File>>>Save as Template...，保存在默认弹出位置，不要更改。



2.3.2 从 Template 新建实验

点击想要使用的 Template,

右侧更改一下内容:

Name(实验名称),

Storage folder (数据存储位置),

slide 下拉框内玻片名称、类型 (普通或 TMA) 进行更改。

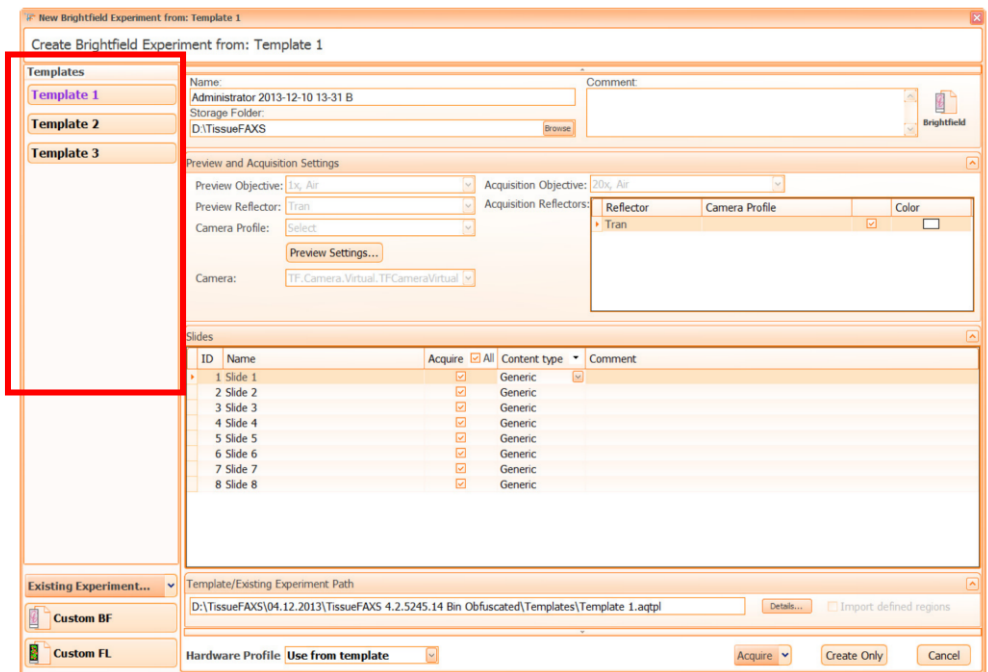


图 10

参数设定完毕后, 点击 **Create Only**, 完成新建实验步骤, 进入图像获取界面。



3 如何实现自动化扫描?

对于系统熟悉一段时间后，可使用自动扫描方式，减少操作步骤。

但有两点需要注意：

1. 熟悉 Tissue Detection 组织识别参数如何调整。
2. 需采用已有参数拍摄。

自动过程中不需要点击预览、组织识别、开始拍摄按钮。

3.1 新建实验

实验建立方法可以选择

1. Template
2. Existing experiment
3. Custom BF（采用该方式建立，软件采用默认设置进行拍摄）

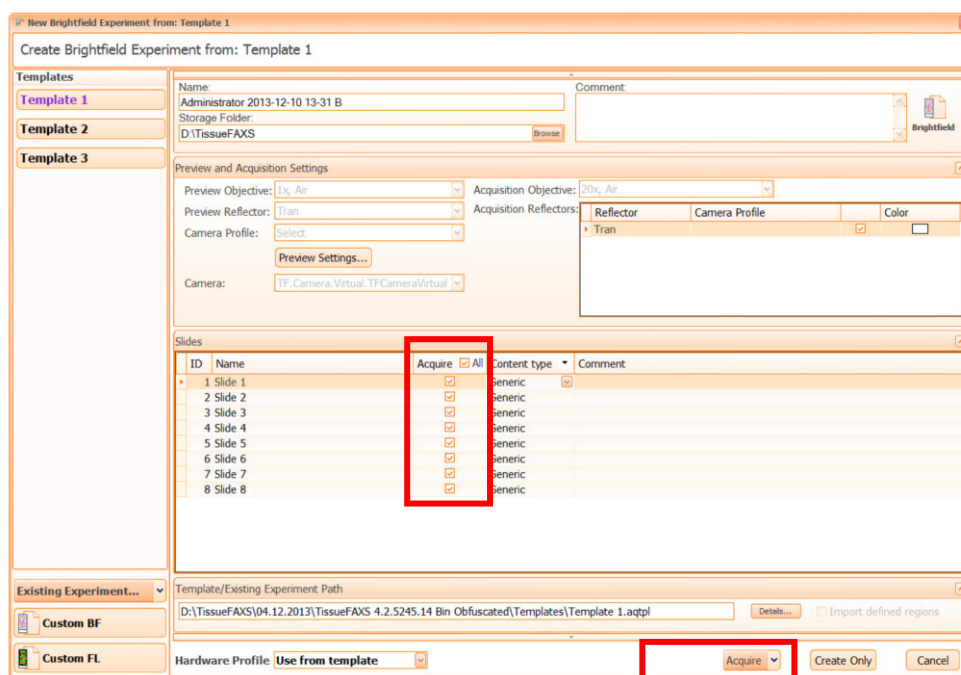
采用任一方式，设定完实验、玻片名称后，**仅把有玻片的位置勾选上**。点击 Acquire 或下拉箭头选择 Acquire with manual correction。

Acquire:自动开始勾选玻片预览、组织识别、扫描（注意：可能把杂质、气泡等误识别为组织并拍摄，延长扫描时间）。



如果想删除误识别的区域，点击 STOP 按钮后，删除即可。

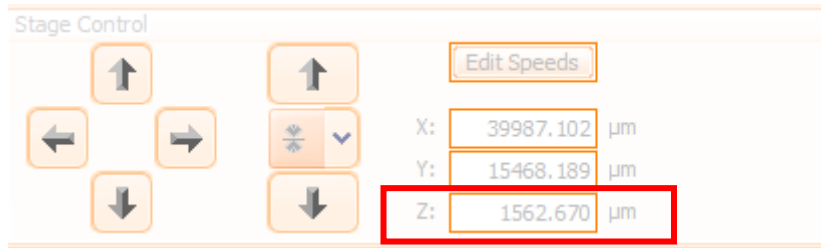
Acquire with manual correction:自动开始预览并弹出组织识别（tissue detection）窗口后会停留一定时间，允许用户优化识别结果，调整完成点 OK,自动弹出下一个样本组织识别窗口。识别完成后。自动开始拍摄。



4 机器无法自动聚焦到组织？

可能原因有：

- 4.1 玻片上沾有较多脏东西被软件误聚焦到。解决方法：取下玻片擦拭干净。
- 4.2 玻片未放置到位。解决方法：检查玻片架四角有没有翘起、是否完全落入槽内。或者检查玻片是否放置到位，重新放置。
- 4.3 玻片厚度与常规玻片差异较大，软件设置有自动聚焦范围，如果玻片厚度超过聚焦范围即会造成无法聚焦。解决方法：手动调至组织聚焦，记住 Z 轴数值。



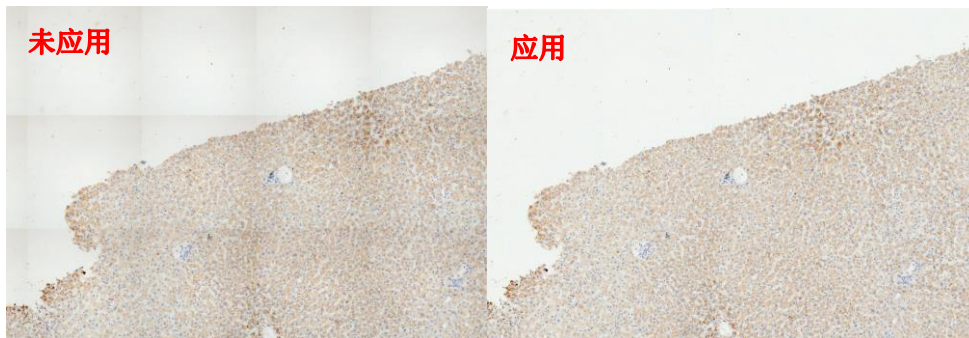
点击 Tools>>>Options, 弹出窗口, 选择 Focus. 查看上述 Z 轴数值是否在区间范围内, 记下这两个数值。如果不在该范围内, 点击 Set focus interval around this point. 点击 **Save& Exist** 退出。即可进行拍摄。

记住: 拍摄完成后, 恢复原值, 避免影响其他人拍摄。

调回方法: 手动调节调焦螺旋至 Z 轴值位于原有数值中间 (如: 1700um,2100um,调至 1900 附近, 大约即可, 点击 Set focus interval around this point)。

5 图像呈网格状, 如何调整?

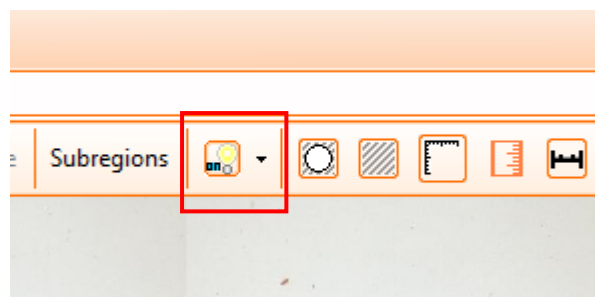
如图所示:



原因: 未应用光源校正 (Illumination correction) 或者不合适。

解决方法:

查看 Illumination correction 按钮:



 : 显示未应用光源校正。  : 虽应用但不合适。

操作:

如果状态为 。点击该按钮弹出窗口:

Compute:软件运算进行虚拟校正。

Acquire:获取 correction Image 进行校正, 点击后软件弹出图, 按照步骤 6.4 中方法获取。

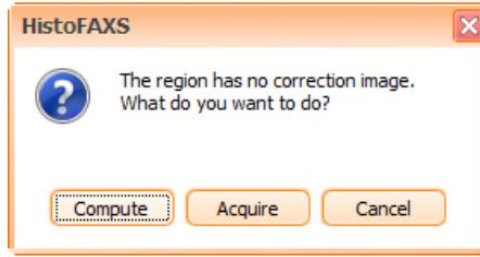


图 30

如果状态为 , 点击该按钮下拉箭头, 选择 **Reacquire correction image**: 重新获取 correction image。方法同上。



其他选项作用:

Select correction image: 点击后弹出以下菜单, 选取其他 Region 的 Correction Image 作为校正图像。

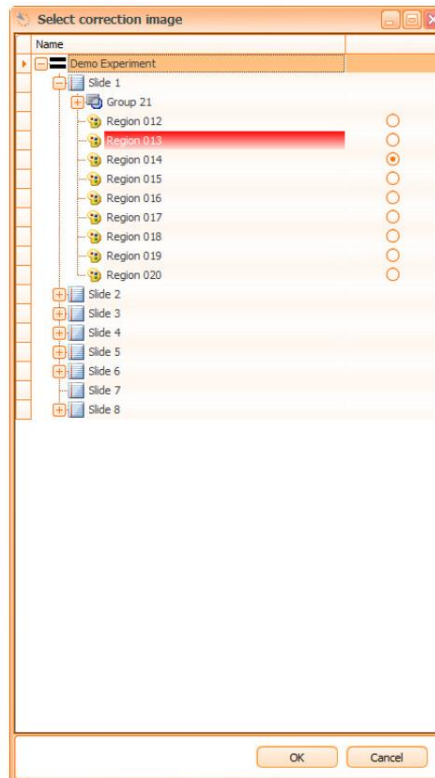


图 31

Apply this correction image to the entire experiment:将当前区域的 correction image 应用于整个实验。

6 少量视野图像不清楚，如何重新获取？

6.1 单个 FOV 图像重获取：

鼠标移至该 FOV，右击鼠标弹出以下菜单，选择 **Require This FOV Only**（图 32），

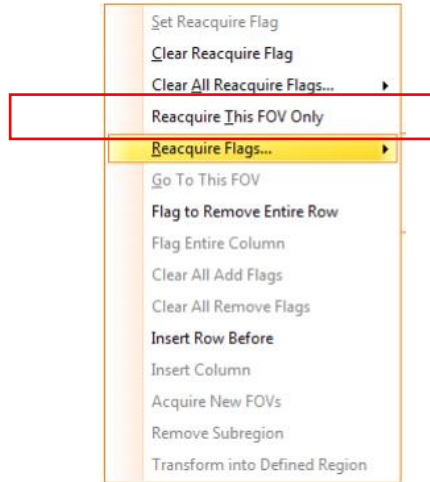


图 32

软件弹出窗口（图 33），选择对焦方式。

Autofocus: 自动对焦

Manual focus: 手动调节显微镜聚焦

Current position: 以当前焦面拍摄（右屏 camera 窗口实时焦面）。

根据需要，选中后，点击 OK 进行图像再获取。

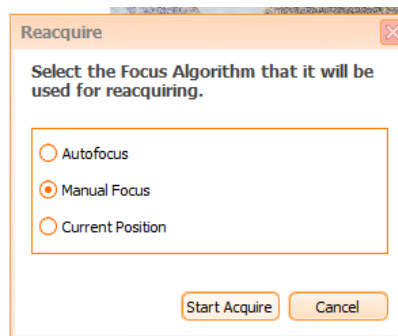


图 33

其中选择 Manual focus，会弹出窗口（图 34），手动旋转准焦螺旋至图像清晰，点击 OK。

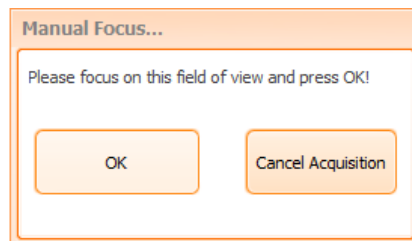



图 34

6.2 多 FOVs 视野图像重获取：

左屏点击  按钮，点击需要重新获取图像的 FOVs，软件会标记 FOVs，单击已插旗的 FOV 可取消插旗。鼠标右击弹出菜单，选择 **Require Flags...**

For current region: 仅重新获取该 Region 插旗 FOVs。

For whole slide: 当前玻片上所有插旗标记 Regions 均重新获取。

For entire experiment: 该实验中插旗标记所有 slides 均重新获取。

弹出窗口，操作同 7.1。

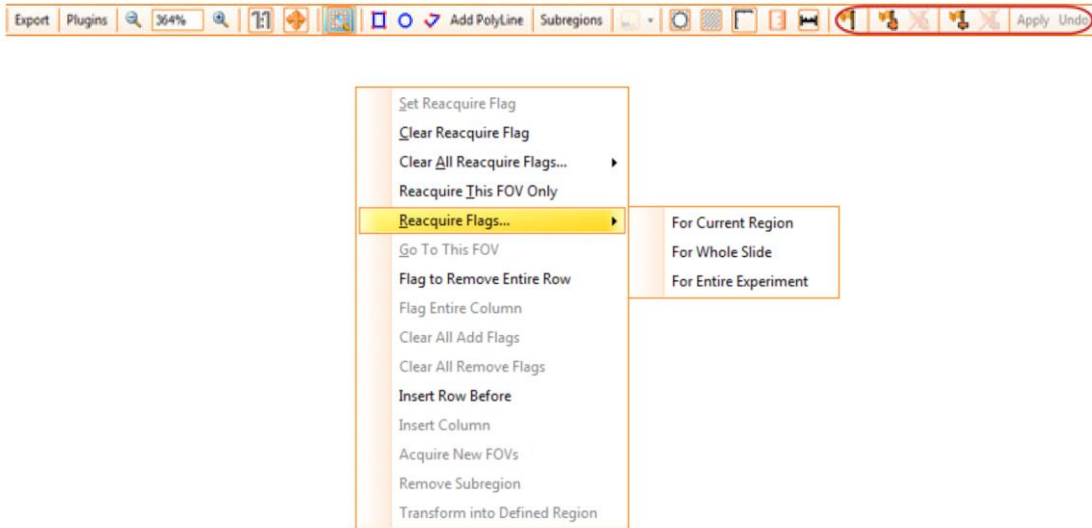


图 35

7 组织平整度较差，如何实现 Z 轴叠加扫描？

手动调节调焦螺旋，检查组织聚焦时的 Z 轴范围。

Tools>>>Options>>>Extended Focus.

勾选，根据实际情况设定扫描层数和步径。

注意：拍完后一定把 Use extended focus 去勾选!!!

8 拍摄图像出现较多失焦现象，如何优化？

可能因组织平整度较差造成，可增多聚焦点优化。

方法：Tools>>>Options>>> Focus.

9 如何拍摄 TMA 芯片？