

Agilent BioTek Cytation5

影像中文操作手冊



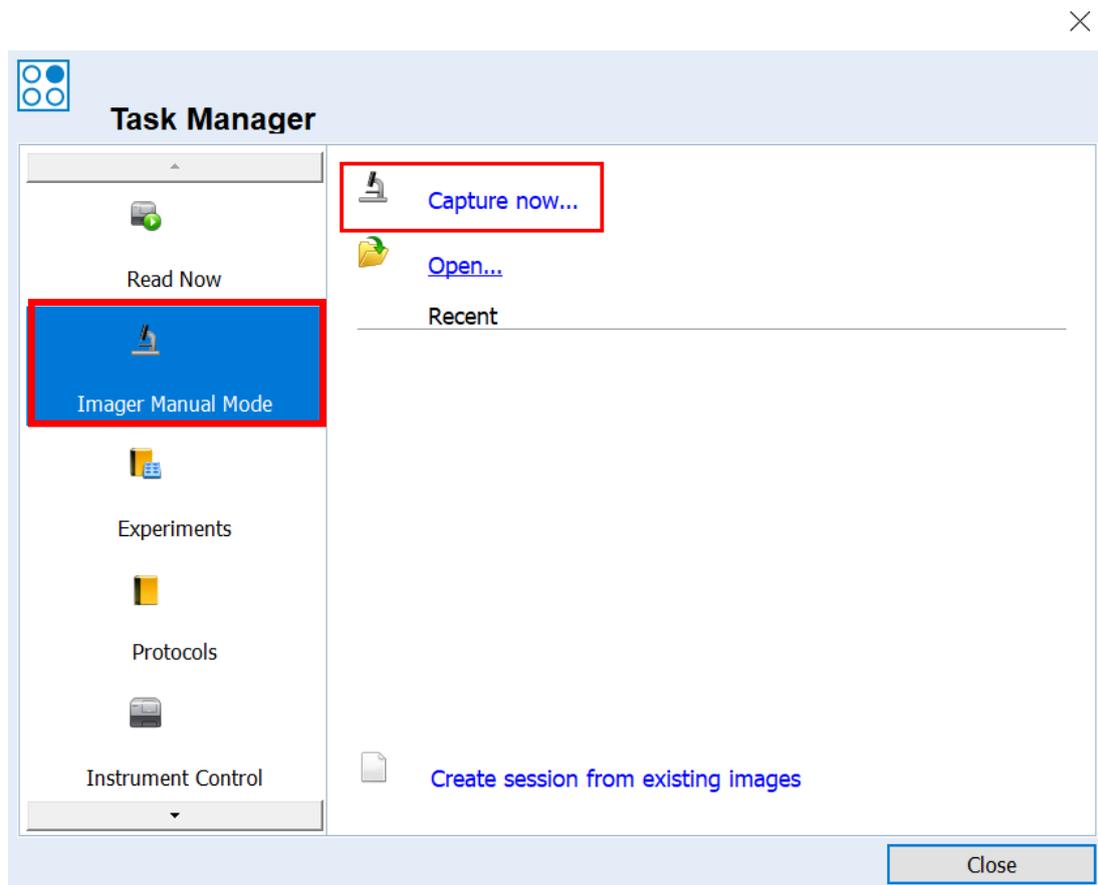
目錄

1. 進入手動模式.....	1
2. 以手動模式進行拍攝.....	2
3. 影像分析.....	7
4. 以自動模式進行影像拍攝	14
5. 設定孔盤底部高度.....	21

1. 進入手動模式

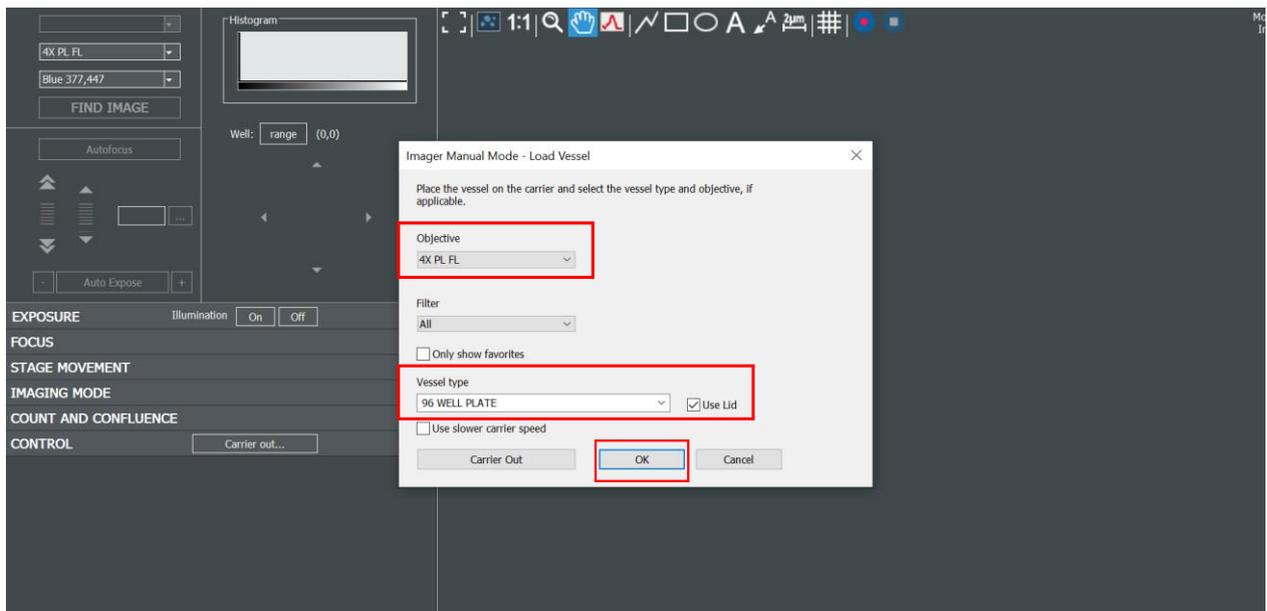
1.1 於桌面上雙擊點選Gen5  圖示，啟動Gen5軟體。

1.2 於彈出的 Task Manger 視窗中，點擊左側 Imager Manual Mode，點擊 Capture Now。

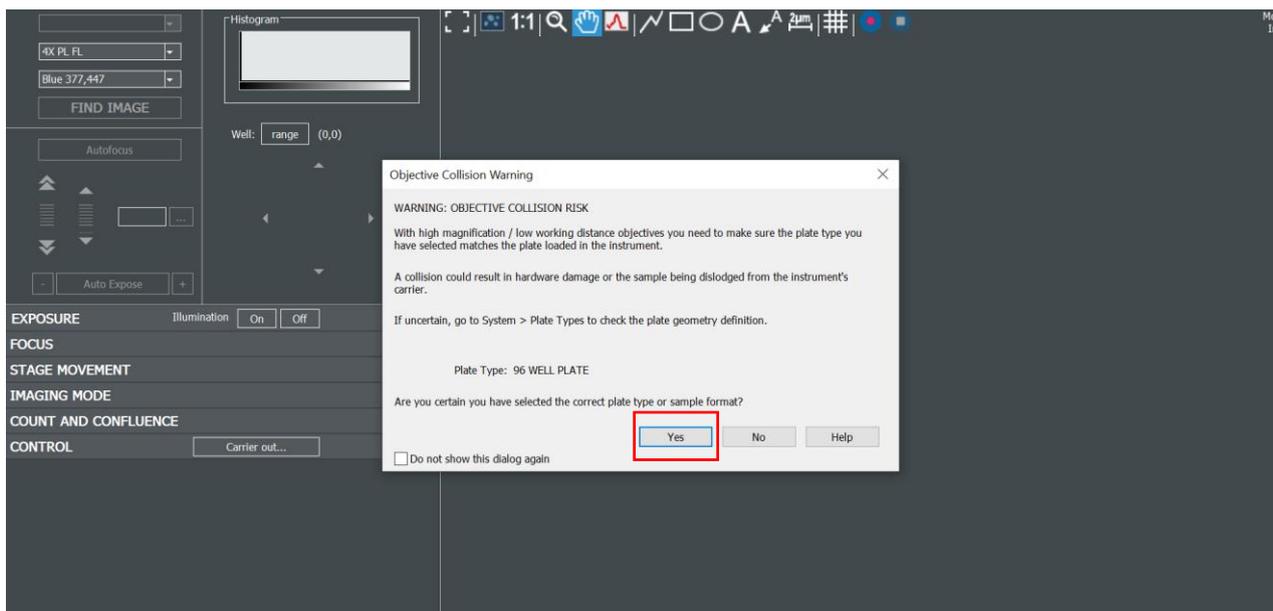


2. 以手動模式進行拍攝

- 2.1 於彈出的Load Vessel 視窗，Objective選擇欲使用之物鏡倍率，Vessel Type 下拉式選單中選取欲讀取的孔盤類型。若有使用蓋子，勾選右側Use Lid 前面的方格，確定後點擊OK。



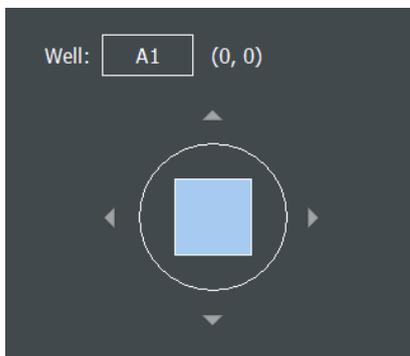
- 2.2 若彈出的 Objective Collision Warning 視窗，確認選擇盤型是否正確 (例如：96 WELL PLATE)，確定後點擊 Yes。



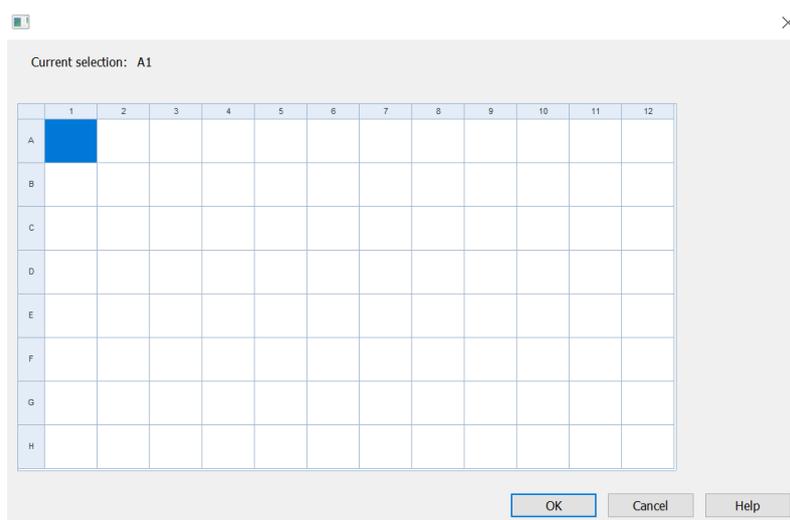
- 2.3 於彈出的 Capture 視窗，左上角 Objective 下拉式選單中，選取欲使用的物鏡倍率。選取欲使用的拍照模式或濾鏡顏色/波長 (例如：DAPI 377,447、明視野、彩色明視野、相位差)。



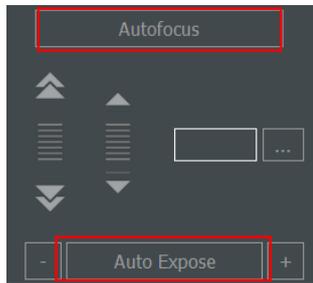
- 2.4 點擊A1，更改欲讀取的位置。預設為讀取A1，故若要讀取A1可跳過此步驟。



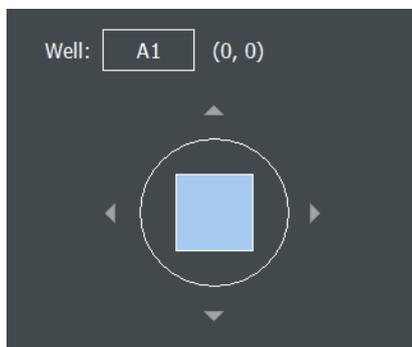
- 2.5 於孔盤中選取欲讀取的位置，所選位置為藍色，確定後點擊OK。



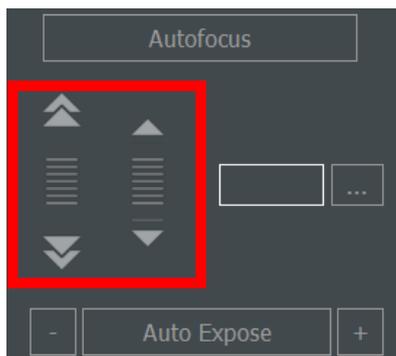
2.6 回到Capture 視窗，點選 Auto Expose 與 Autofocus進行自動曝光與自動對焦。



2.7 若要移動視野，進行X/Y方向的位移，勾選Joystick enabled，前後左右移動搖桿，進行XY軸移動。若無搖桿，可點選上下左右鍵移動視野，括號內的數值顯示相對應的位置。



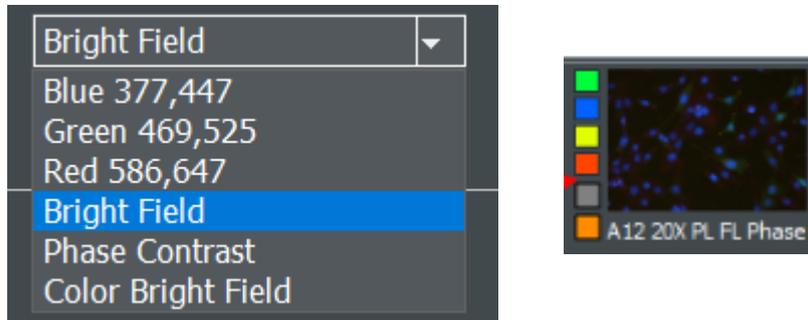
2.8 若要手動調整焦距，若有搖桿，可水平轉動搖桿，進行對焦。若無搖桿，可利用上下的箭頭(例如：< 和 >為細調節輪，<< 和 >>為粗調節輪)，右方的數值顯示目前的焦距位置。



2.9 若要擷取目前顯示的影像畫面，可點擊左下方的相機圖示進行拍攝。



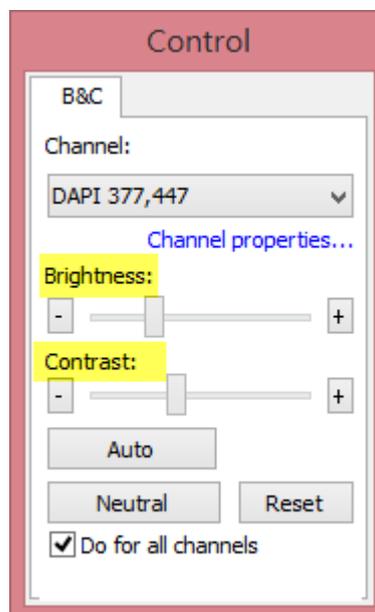
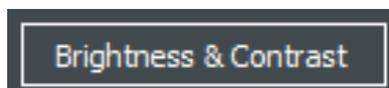
2.10 若要擷取其他螢光通道或其他模式的影像，可於下拉式選單中變更欲使用的濾鏡顏色/波長。並再次點擊下方的相機圖示。在同一個視野可拍攝最多6種不同通道的影像。



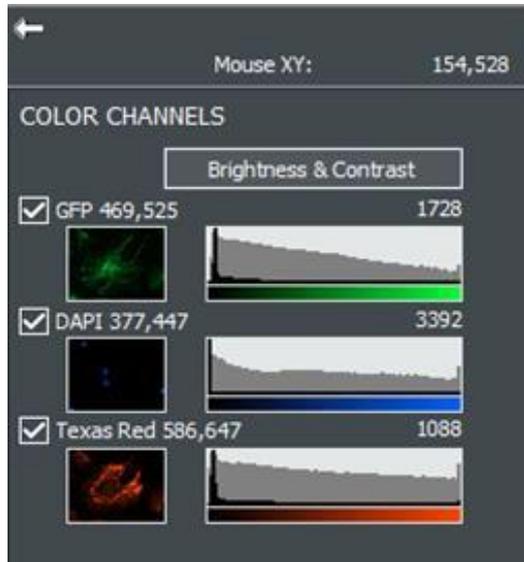
2.11 若要針對影像進行分析，可點擊左下方的 **Process / Analyze** 按鈕。



2.12 若要調整明亮和對比度，可點擊上方工具列 **Brightness & Contrast** 調整。在彈出的視窗中，可點擊 **Auto** 自動調整明亮對比或手動調整。



2.13 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)。

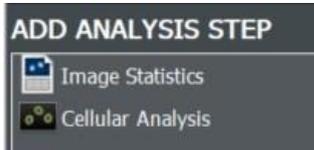


2.14 若要進行螢光強度和細胞分析，可於上方選擇ANALYZE



3. 影像分析

3.1 於左下選單中選取 Image Statistics (影像分析) 或 Cellular Analysis (細胞分析)。



3.2 若欲進行 Image Statistics (影像分析)，Data In 選取欲分析的螢光通道。點選下方 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。

Image Statistics

Label:

Data In:

Threshold

Lower value:

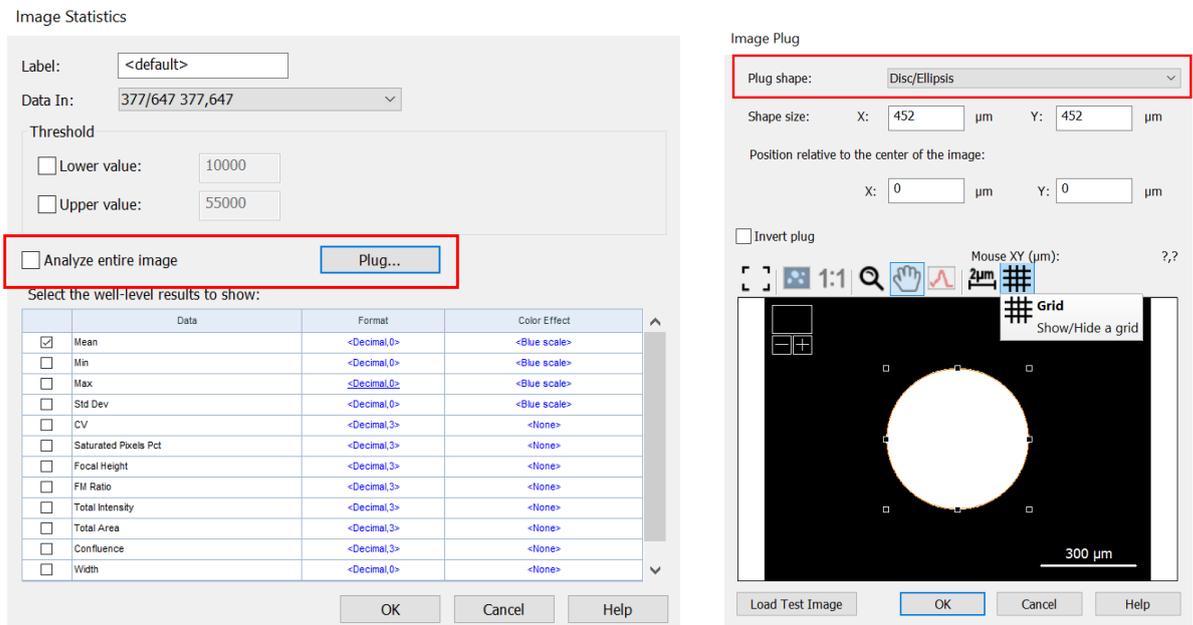
Upper value:

Analyze entire image

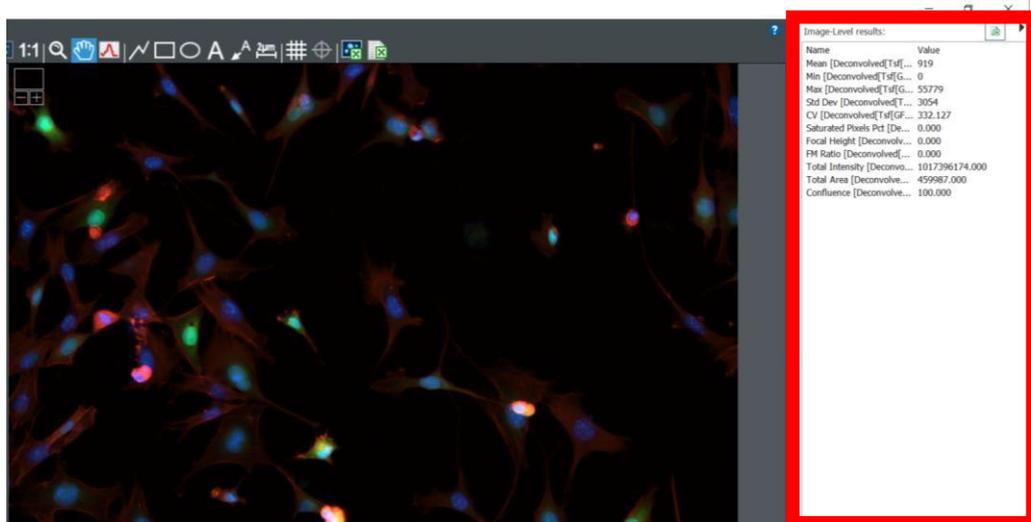
Select the well-level results to show:

	Data	Format	Color Effect
<input checked="" type="checkbox"/>	Mean	<Decimal,0>	<Blue scale>
<input type="checkbox"/>	Min	<Decimal,0>	<Blue scale>
<input type="checkbox"/>	Max	<Decimal,0>	<Blue scale>
<input type="checkbox"/>	Std Dev	<Decimal,0>	<Blue scale>
<input type="checkbox"/>	CV	<Decimal,3>	<None>
<input type="checkbox"/>	Saturated Pixels Pct	<Decimal,3>	<None>
<input type="checkbox"/>	Focal Height	<Decimal,3>	<None>
<input type="checkbox"/>	FM Ratio	<Decimal,3>	<None>
<input type="checkbox"/>	Total Intensity	<Decimal,3>	<None>
<input type="checkbox"/>	Total Area	<Decimal,3>	<None>
<input type="checkbox"/>	Confluence	<Decimal,3>	<None>
<input type="checkbox"/>	Width	<Decimal,0>	<None>

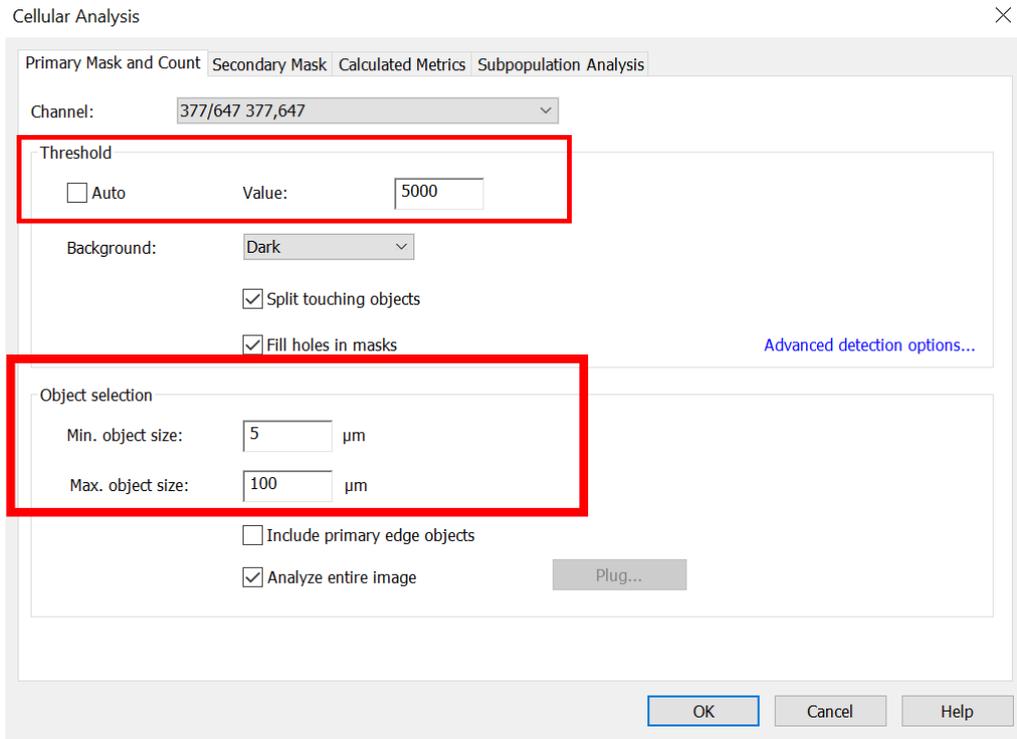
- 3.3 若欲分析部分範圍，而非全畫面，將Analyze entire image打勾取消，並點選右方Plug。Image Plug彈跳視窗中，可以選定分析範圍，分別有圓形、正方形與任意形狀。大小可由滑鼠移動決定。確認後ok，即可分析指定範圍。



- 3.4 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)。



- 3.5 分析方法若選擇 Cellular Analysis，Data In 選取欲分析的螢光通道。點選Options，可於彈跳視窗中進行設定。
- 3.6 Primary Mask and Count 分頁設定 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。



Cellular Analysis

Primary Mask and Count Secondary Mask Calculated Metrics Subpopulation Analysis

Channel: 377/647 377,647

Threshold

Auto Value: 5000

Background: Dark

Split touching objects

Fill holes in masks

[Advanced detection options...](#)

Object selection

Min. object size: 5 μm

Max. object size: 100 μm

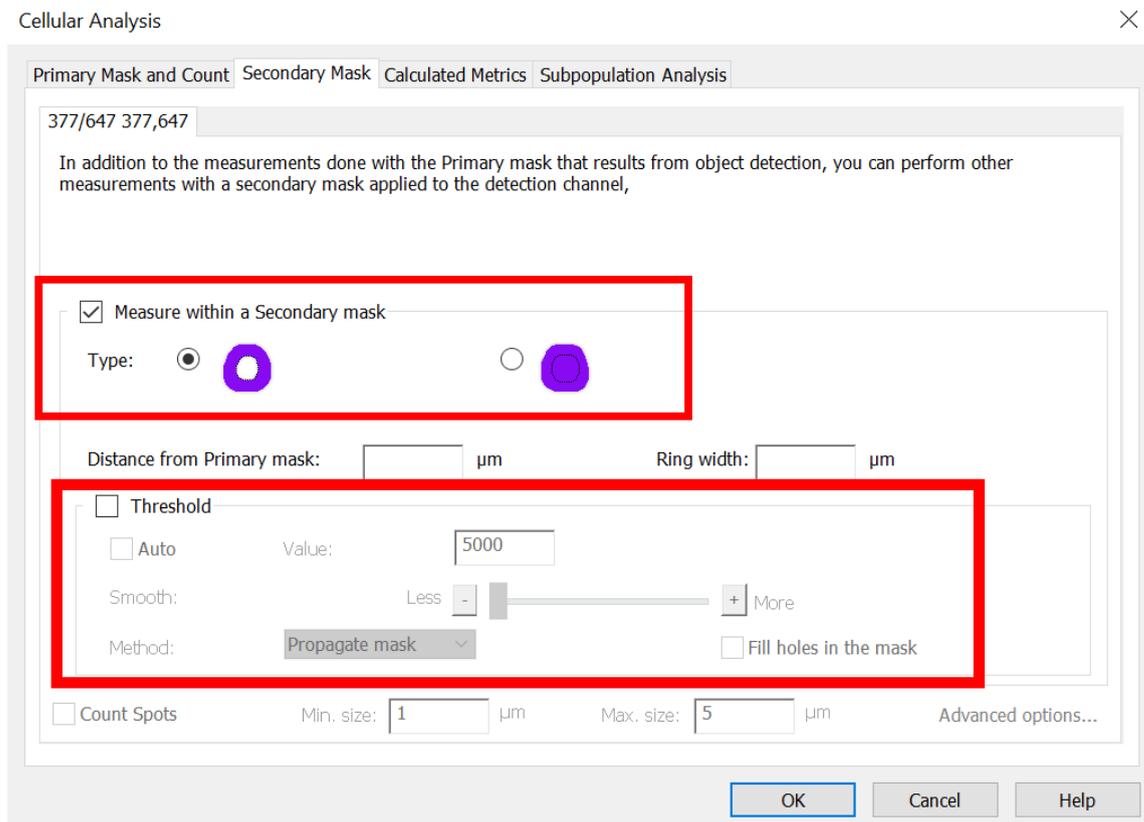
Include primary edge objects

Analyze entire image

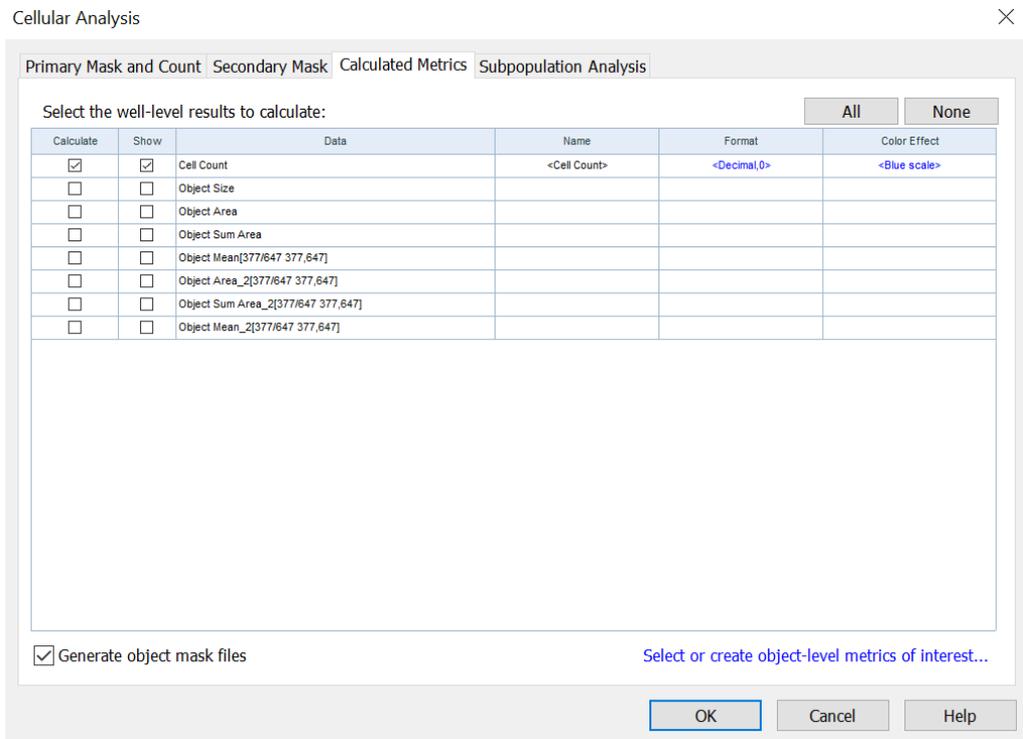
Plug...

OK Cancel Help

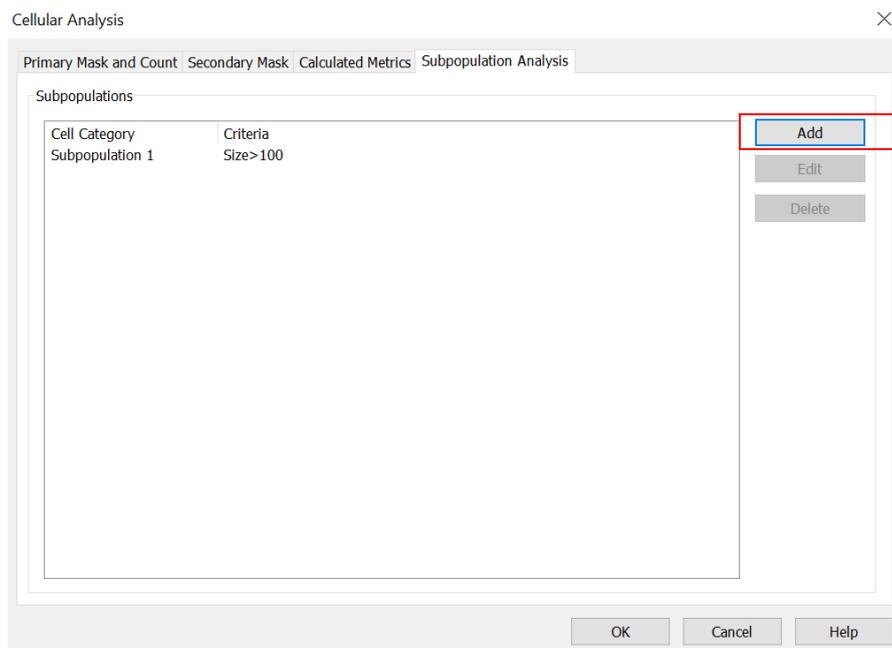
3.7 於Secondary Mask分頁，default 設定會直接勾選 Measure withing a Primary mask，即分析primary mask為基礎中所有的螢光數值。若欲分析其他範圍，可以點選Measure within a Secondary mask，並可選擇「分析核以外區域」或是「整顆細胞」。可點選Threshold>Auto，讓軟體自動計算閾值。確認條件之後點選Apply。



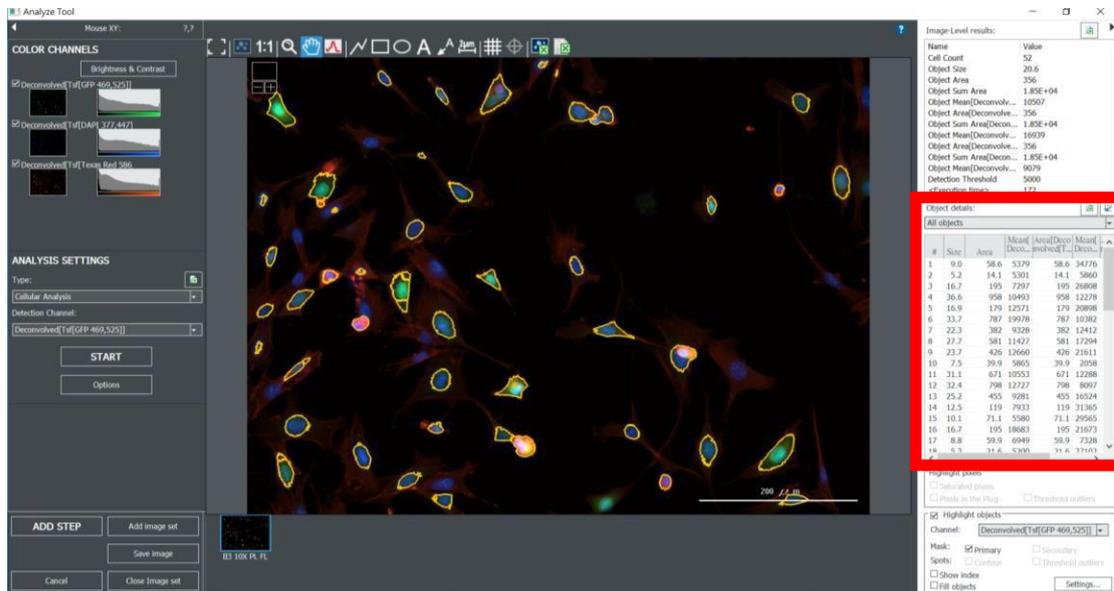
3.8 於Calculated Metrics欄位中，可看到欲觀察之數值。若有不想查看的數值，可將勾勾取消。確認後勾選Apply。



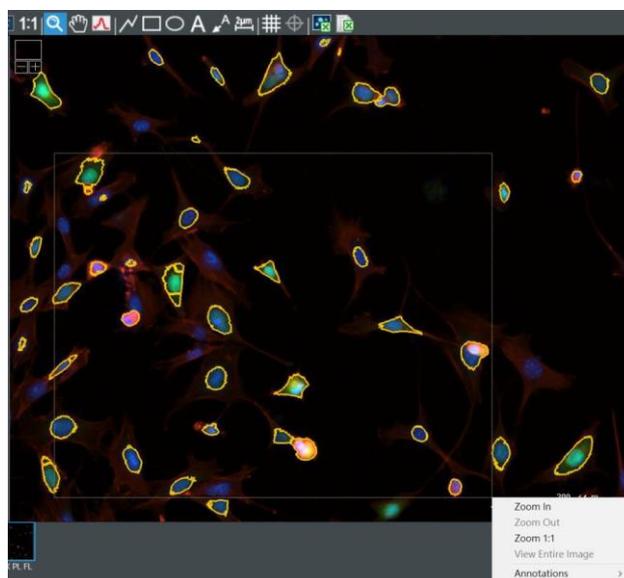
3.9 於Subpopulation Analysis欄位中，若欲以多種條件篩選細胞，可點選Add新增篩選條件，條件可以是總細胞數、細胞平均大小、面積、周長、圓形度、螢光強度、最大螢光強度、加總螢光強度等數值。確認好後點選Apply。



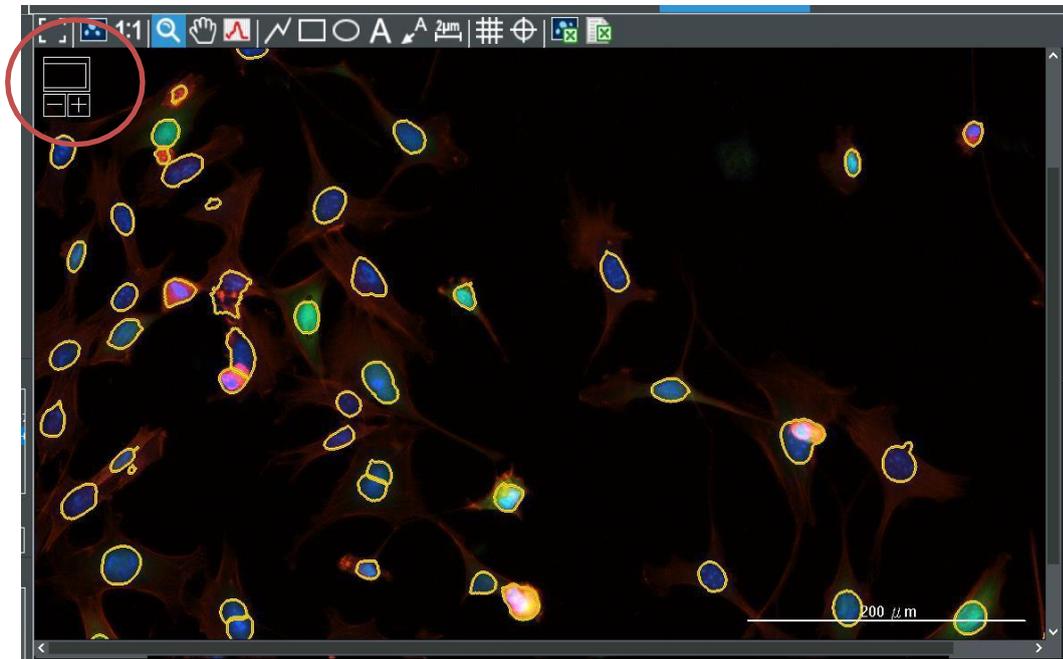
3.10 確認無誤後，於右方Results 欄位，可看到細胞分析數據。(例如：總細胞數、細胞平均大小、面積、周長、圓形度、螢光強度、最大螢光強度、加總螢光強度)。



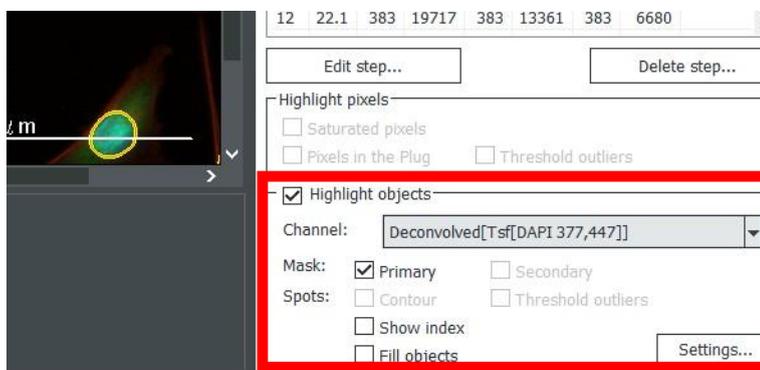
3.11 點選上方工具列的放大鏡圖示於影像中任意拖曳，點擊右鍵，選擇Zoom In，即可放大觀看。



3.12 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。



3.13 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。

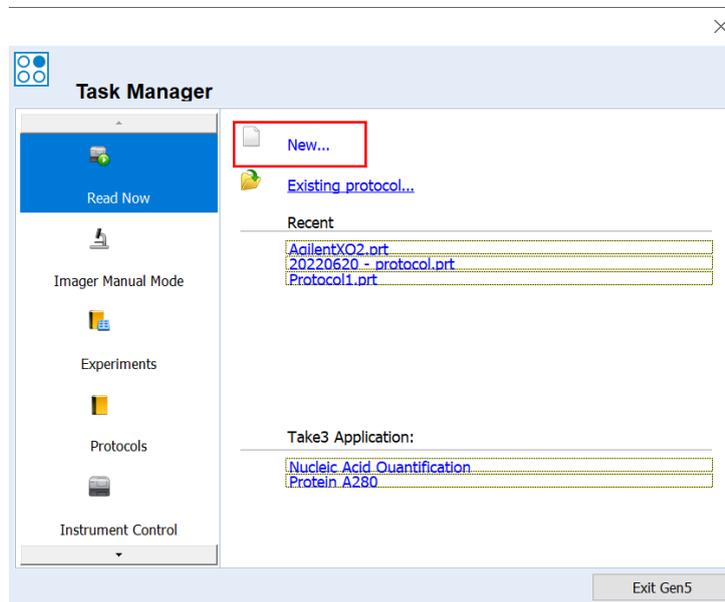


3.14 確認分析無誤，點選左下方Add step，即完成分析。

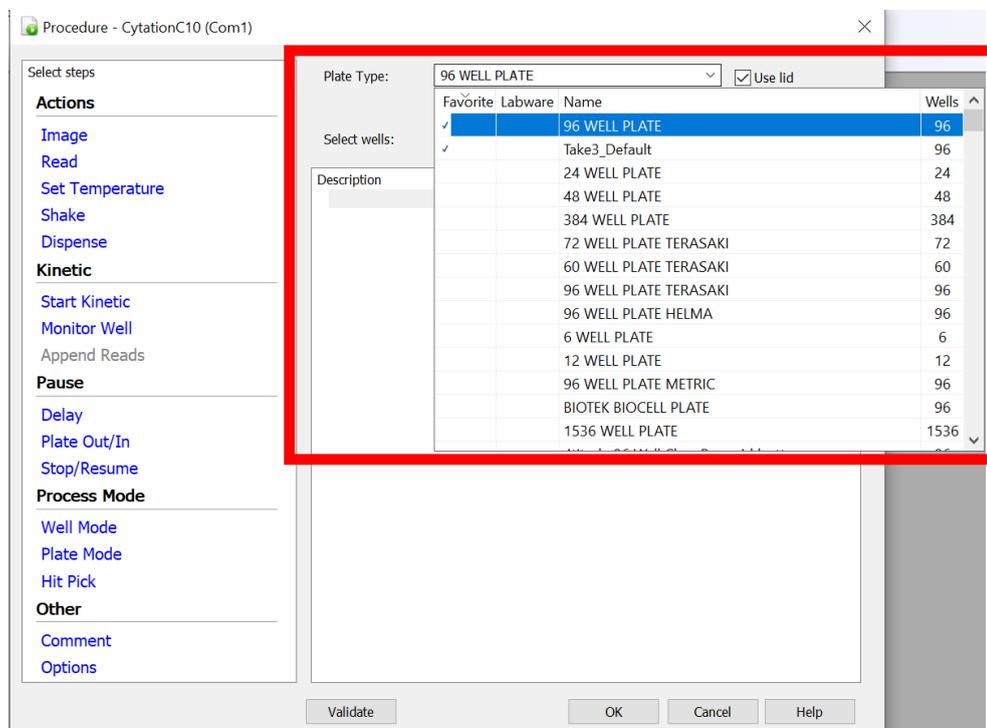


4 以自動模式進行影像拍攝

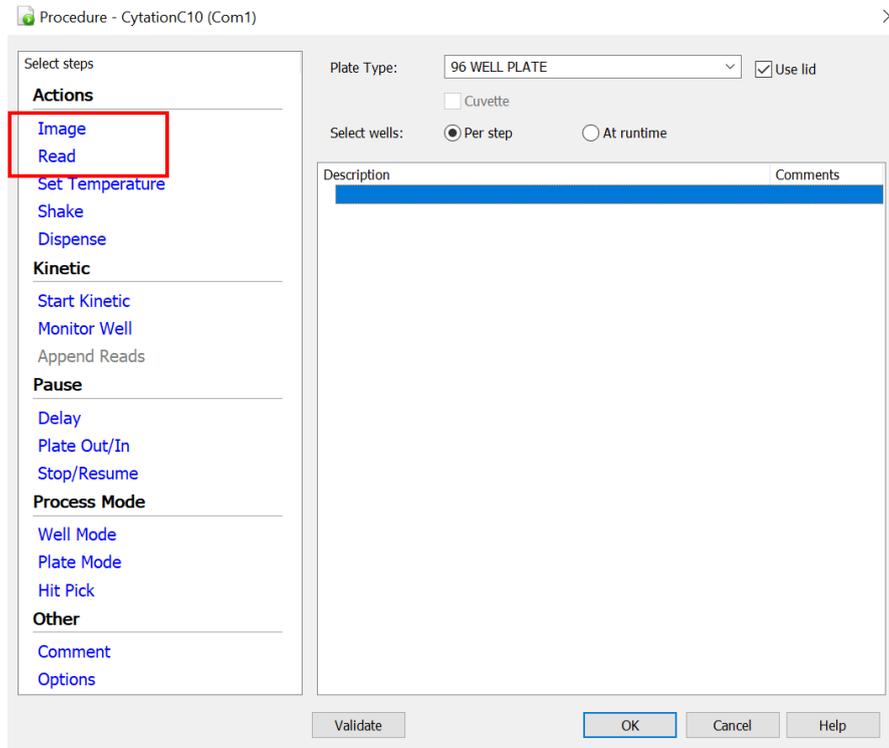
4.1 於彈出的 Task Manger視窗中，選擇左側Read Now，點擊 New 進入自動模式



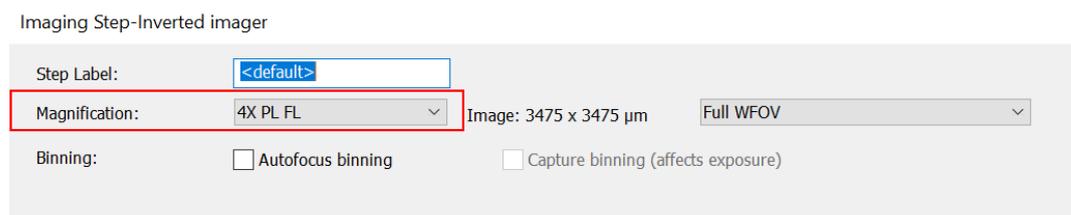
4.2 於彈出的Procedure視窗，Plate Type 下拉式選單中選取欲讀取的孔盤類型。若盤子有使用蓋子，於Use Lid前面的方格進行勾選。



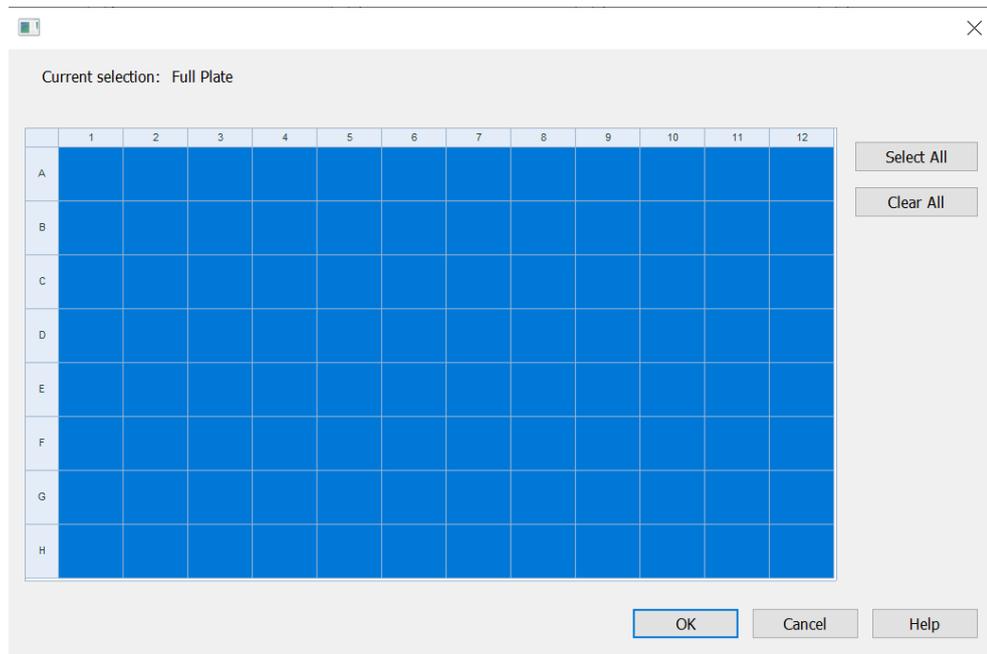
4.3 於左方 Select Steps的Actions欄位中，點擊 Image。或點擊 Read，於 Detection Method 欄位中選取Image，確定後點擊OK。



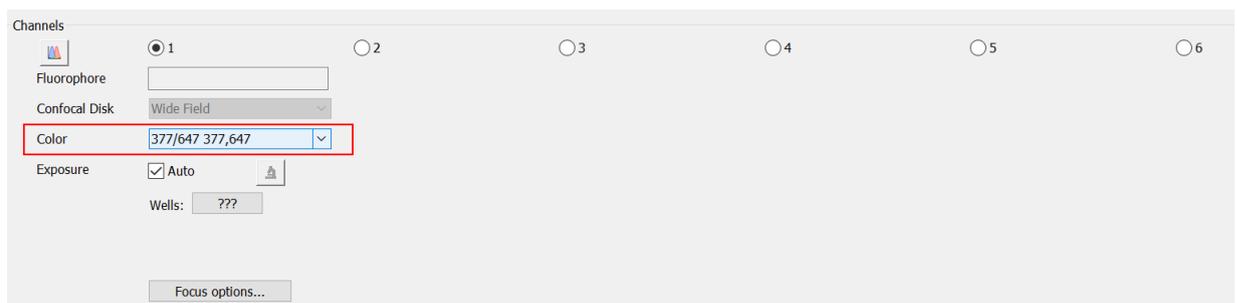
4.4 於彈出的Imaging Step 視窗，Magnification 下拉式選單中選取欲使用的物鏡倍率(例如：4x、20x)。



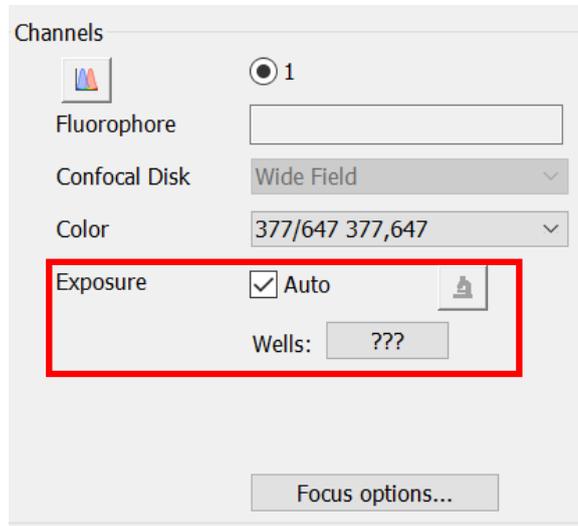
- 4.5 點擊右上角  按鈕，選擇欲讀取的位置。預設為全盤讀取，故若要全盤讀取則可跳過此步驟。於彈出的視窗內，點擊Clear all。拖曳選取欲讀取的位置，所選位置會反白呈現，確定後點擊OK。



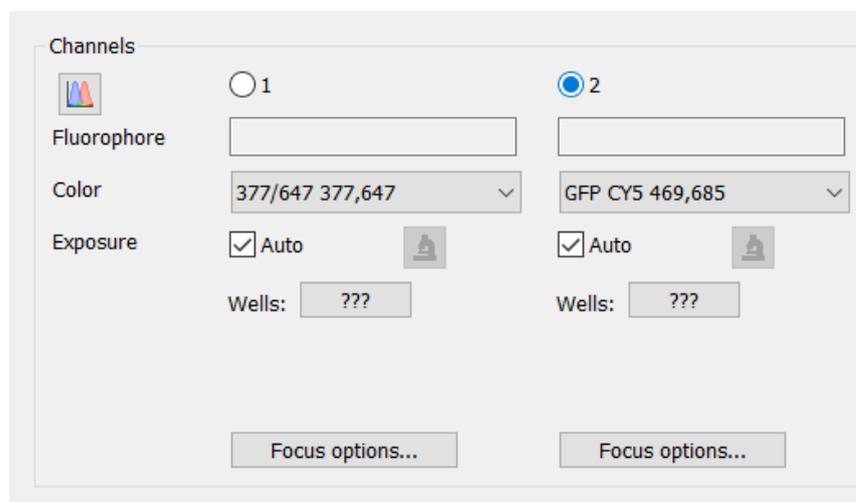
- 4.6 Color下拉式選單，選取欲使用的拍照模式或濾鏡顏色/波長 (例如：螢光DAPI 377,447、明視野、彩色明視野、相位差)。



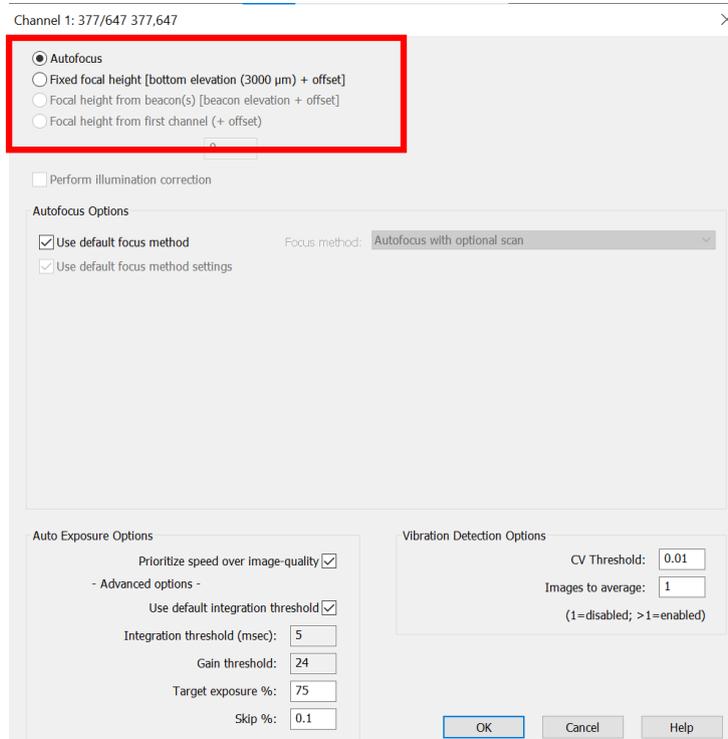
4.7 Exposure欄位，可勾選Auto進行自動曝光調整，並點選Wells的???, 選擇進行曝光調整的孔的位置。或可點選  進入手動模式進行曝光調整。



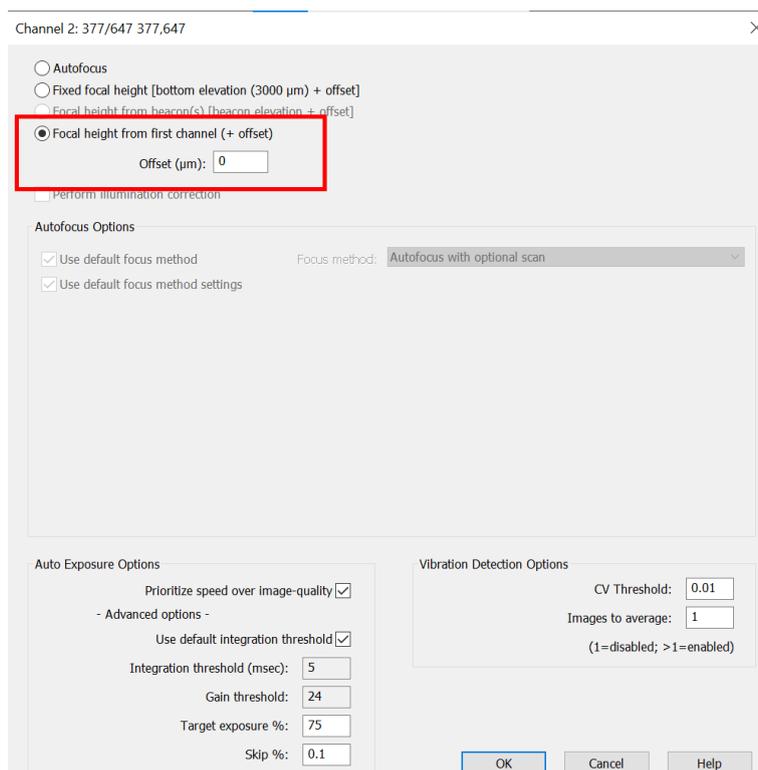
4.8 若欲擷取另一顏色的影像，則於數字2前面的圈圈內點擊一下。其餘設定步驟同上。



4.9 於Channel 1下方，點擊Focus Options 按鈕，更改自動對焦的條件，預設為使用”Autofocus with optional scan”，若不更改可跳過此步驟。

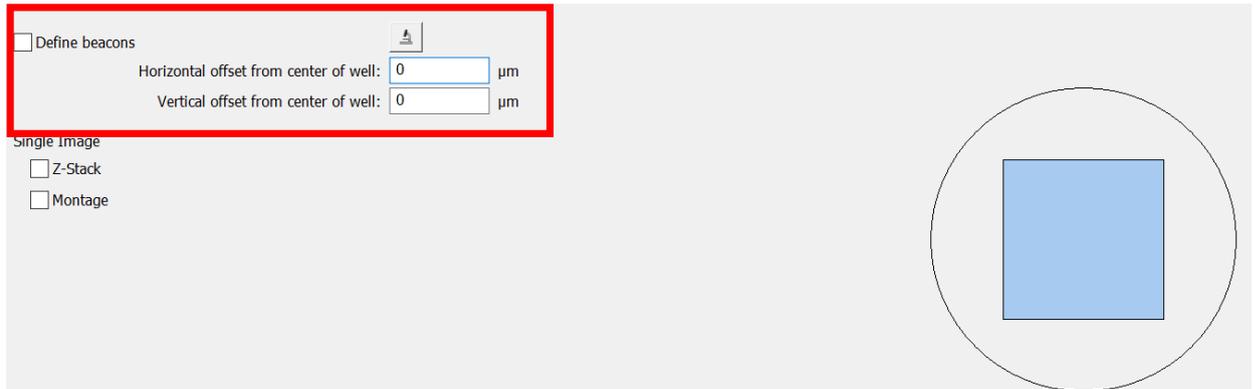


4.10 點選 Channel 2~4 的Focus options，可選擇 Autofocus (自動對焦)，確認後點擊OK。或點選 focal height from first channel，同第一個channel的對焦方法。



4.11 若每個孔的拍攝位置不同，可以勾選 **Define Beacon** 對每個孔各別設定拍攝位置，點選

 進入手動模式設定欲拍攝的位置。或可於 **Horizontal offset from center of well** 和 **Vertical offset from center of well** 輸入數值，可對X與Y方向的位移進行設定。



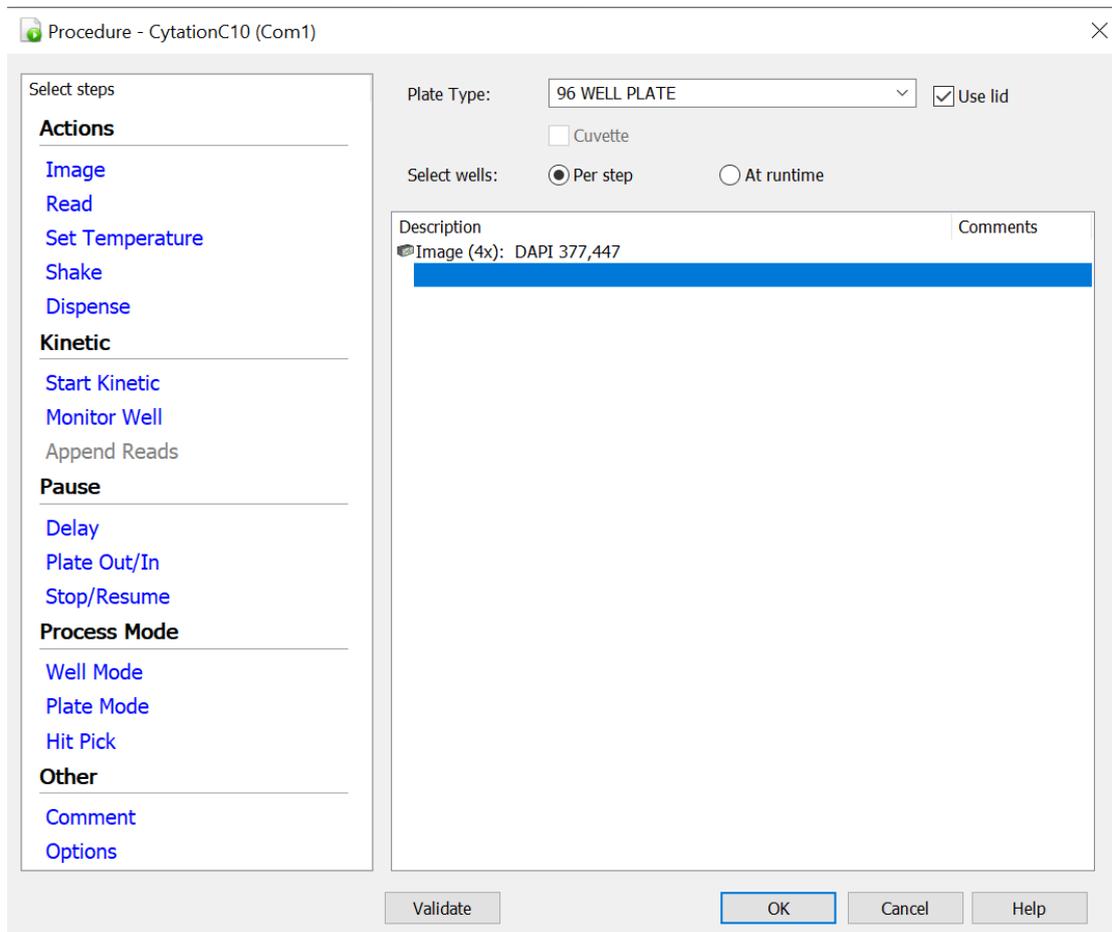
4.12 若欲拍攝大圖影像，勾選 **Montage**，若只需單點拍攝則可跳過此步驟。於 **Montage (rows x columns)** 後方輸入數值，前方方框為橫列數，後方方框為直欄數。

4.13 於 **Tile Overlap** 欄位中，預設為 **Auto for stitching**，若要縫圖則可跳過此步驟。

4.14 點擊 **Custom**，可更改單張影像間的距離，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)。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。

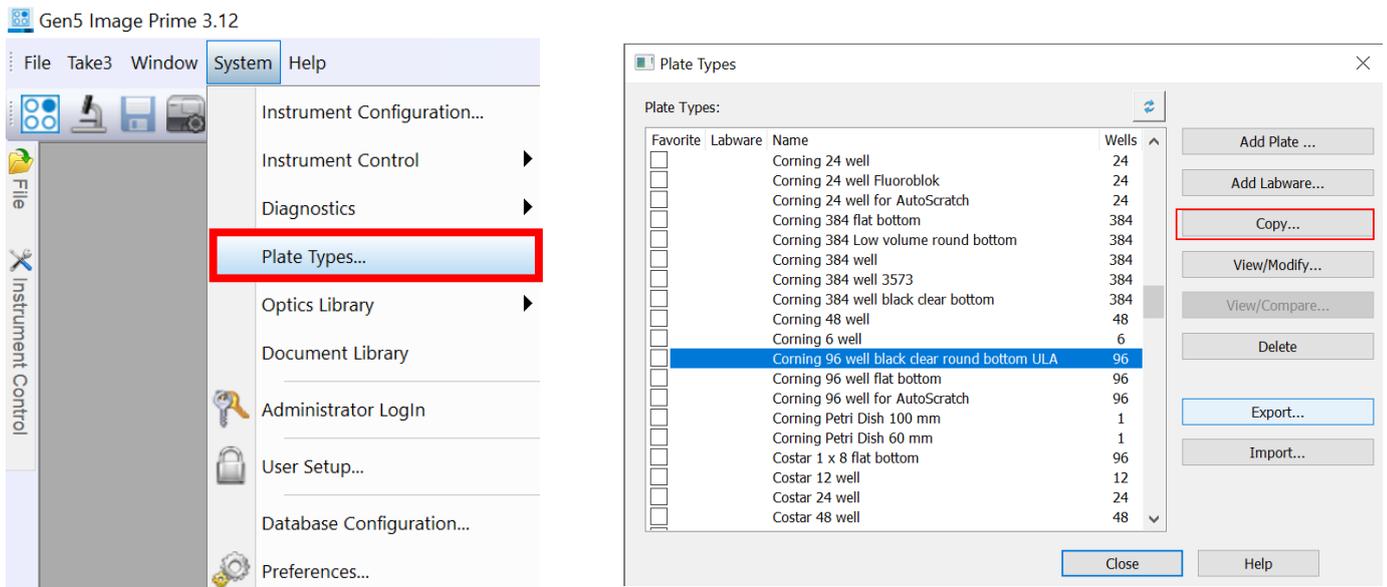


4.15 回到原本Procedure視窗，在Description 欄位中可看到已新增步驟，確認後點擊Ok。

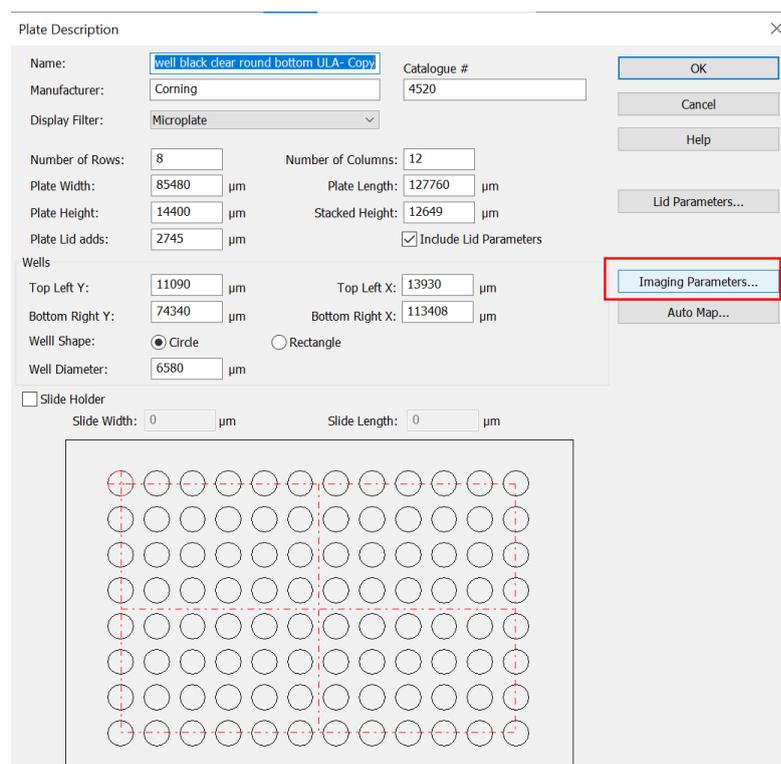


5 設定孔盤底部高度 (Bottom Elevation)

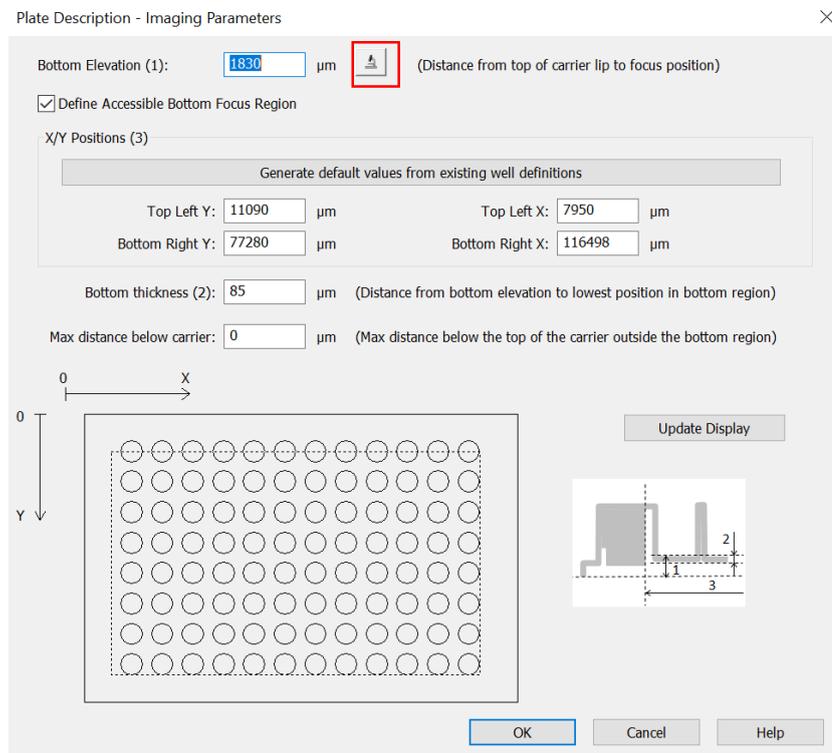
5.1 進行自動模式拍攝前需設定孔盤底部高度，點選工具列上方 **System>Plate Type**，點選正確的孔盤，點選右側 **Copy**。



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



5.3 Plate Description – Imaging Parameters視窗中，點選  進行對焦。



5.4 待找到合適的對焦位置後，點選左下角 **Save settings**，完成孔盤底部高度的設定。

