



Agilent BioTek Cytation5

影像中文操作手册







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 • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
5.	設定孔盤底部高度





- 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。

				\times
Task Manager				
	<u>4</u>	Capture now		
Read Now		Open		
<u> </u>		Recent		
Imager Manual Mode				
le la				
Experiments				
Protocols				
Instrument Control		Create session from existing images		
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			Г	
			L	Close





- 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 ·

Histogram Histogram	_ [:]⊡ 1:1 Q ⁽ [] ∧ □ ○ A ^A ⊨ #
Autofocus	Imager Manual Mode - Load Vessel X
▲ ▲ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	Place the vessel on the carrier and select the vessel type and objective, if applicable. Objective AX PL FL
EXPOSURE Illumination On Off	Filter All
FOCUS	
STAGE MOVEMENT	Veccel hme
IMAGING MODE	96 WELL PLATE
COUNT AND CONFLUENCE	Use slower carrier speed
CONTROL Carrier out	Carrier Out OK Cancel

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 若要攝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。

A12 20X PL FL Phase



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。

htness & Contrast	Control
htness & Contrast	Control B&C Channel: DAPI 377,447 v Channel properties Brightness: - + Contrast: - + Auto Neutral Reset V Do for all channels
	L





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)。

+	Mouse XY:	154,528
COLOR CHANNE	LS	
	Brightness & Con	trast
GFP 469,525		1728
1		-
DAPI 377,447		3392
Texas Red 586	,647	1088
64		

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 Thres	<default> :: 377/647 377,647 hold ower value: 10000 Ipper value: 55000</default>	~				
Analyze entire image Plug						
	Data	Format	Color Effect	~		
	Mean	<decimal,0></decimal,0>	<blue scale=""></blue>			
	Min	<decimal,0></decimal,0>	<blue scale=""></blue>			
	Мах	<decimal,0></decimal,0>	<blue scale=""></blue>			
	Std Dev	<decimal,0></decimal,0>	<blue scale=""></blue>			
	cv	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Saturated Pixels Pct	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Focal Height	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	FM Ratio	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Total Intensity	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Total Area	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Confluence	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Width	<decimal,0></decimal,0>	<none></none>	~		
		OK	Cancel	Help		





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。

Image	Statistics					
	م ما مراجع الله م				Image Plug	
Label:	<derault></derault>				Plug shape:	Disc/Ellipsis ~
Data In	377/647 377,647	~			Shane size: Y:	452 Jum V: 452 Jum
Thres	hold				Shape size. A.	
	ower value: 10000				Position relative to the o	center of the image:
					×۰	0 um Y: 0 um
<u> </u>	Ipper value: 55000					pin ii pin
_			_		Invert plug	
Ana	lyze entire image	Plug				Mouse XY (µm): ?,?
Calast					[] 🔝 1:1 🔍	、 🖑 🔨 🕮 🇮
Select	the well-level results to show:					ttt Grid
	Data	Format	Color Effec			Show/Hide a grid
	Mean	<decimal,0></decimal,0>	<blue scale<="" td=""><td><u> </u></td><td></td><td></td></blue>	<u> </u>		
	May	<decimal 0=""></decimal>	<blue scale<="" td=""><td></td><td></td><td></td></blue>			
	Std Dev	<decimal 0=""></decimal>	<blue scale:<="" td=""><td></td><td></td><td></td></blue>			
	cv	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Saturated Pixels Pct	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			4
	Focal Height	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	FM Ratio	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Total Intensity	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Total Area	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			
	Confluence	<decimal,3></decimal,3>	<none></none>			300 µm
	Width	<decimal,0></decimal,0>	<none></none>	~		
		ОК	Cancel	Help	Load Test Image	OK Cancel Help

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			\times
Primary Mask and Count	Secondary Mask Calculated Metrics Subpopulation	n Analysis	
Channel: 377/6	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。

mary Mask and Count	Secondary Mask C	Calculated Metrics Subpo	pulation Analysis		
77/647 377,647					
In addition to the mea measurements with a	isurements done wit secondary mask app	th the Primary mask that olied to the detection cha	results from object de nnel,	tection, you can po	erform other
Measure within	a Secondary mask-	_			
Туре: 💿	0	$^{\circ}$			
Distance from Prin	nary mask:	μm	Ring width:	μm	
Distance from Prin	nary mask:	μm	Ring width:	μm	
Distance from Prin	nary mask:	μm 5000	Ring width:	μm	
Distance from Prin	value:	μm 5000 Less -	Ring width:	μm	
Distance from Prim	Value: Propagate ma	µm 5000 Less -	Ring width:	μm ore holes in the mask	ç.





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。

imary Mas	k and Co	ount Secondary Mask Calculated Metrics Su	bpopulation Analysis			
Select the	well-lev	el results to calculate:			All	None
Calculate	Show	Data	Name	Format	Colo	or Effect
		Cell Count	<cell count=""></cell>	<decimal,0></decimal,0>	<blue< td=""><td>e scale></td></blue<>	e scale>
		Object Size				
		Object Area				
		Object Sum Area				
		Object Mean[377/647 377,647]				
		Object Area_2[377/647 377,647]				
		Object Sum Area_2[377/647 377,647]				
		Object Mean_2[377/647 377,647]				
☐ Generat	e object	mask files	Sc	elect or create object	ct-level metrics	of interest

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。

Cell Category	Criteria		Add
Subpopulation 1	Size>100		Edit
			Delete





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,可利用影像右侧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

	X
Task Manager	
-	New
Read Now	Recent AdilentXO2.prt 20220620 - protocol.prt Protocol1 pt
	Take3 Application:
Protocols	Nucleic Acid Ouantification Protein A280
Instrument Control	
	Exit Gen5

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 ·

select steps	Plate Type:	96 WELL PLATE	✓ Use lid	
Actions		Favorite Labware	Name	Wells ^
Image	Select wells:	1	96 WELL PLATE	96
Read	Select Weils.	~	Take3_Default	96
Set Temperature	Description		24 WELL PLATE	24
Shako			48 WELL PLATE	48
Disesses			384 WELL PLATE	384
Dispense			72 WELL PLATE TERASAKI	12
Kinetic			60 WELL PLATE TERASAKI	60
Start Kinetic			96 WELL PLATE HELMA	96
Monitor Well			6 WELL PLATE	6
Append Reads			12 WELL PLATE	12
Pause			96 WELL PLATE METRIC	96
Delay			BIOTEK BIOCELL PLATE	96
Plate Out/In			1536 WELL PLATE	1536 🖉
Stop/Posumo				
Stop/ Resume				
Process Mode				
Well Mode				
Plate Mode				
Hit Pick				
Other				
Comment				





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。

Procedure - CytationC10 (Com1)				:
Select steps	Plate Type:	96 WELL PLATE		✓ Vse lid
Actions		Cuvette		
Image	Select wells:	Per step	◯ At runtime	
Read	Description			Commente
Set Temperature	Description			Comments
Shake				
Dispense				
Kinetic				
Start Kinetic				
Monitor Well				
Append Reads				
Pause				
Delay				
Plate Out/In				
Stop/Resume				
Process Mode				
Well Mode				
Plate Mode				
Hit Pick				
Other				
Comment				
Options				
	Validate		ОК	Cancel Help

 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)。

Imaging Step-Invert	ed imager				
Step Label:	<default></default>		_		
Magnification:	4X PL FL	~	Image: 3475 x 3475 µm	Full WFOV	\sim
Binning:	Autofocus binning		Capture binning (af	fects exposure)	





4.5 點擊右上角 Full Plate 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)。

Ch	annels						
		• 1	○ 2	○ 3	<u></u> 4	○5	6
	Fluorophore						
	Confocal Disk	Wide Field $$	_				
	Color	377/647 377,647 🗸					
	Exposure	Auto 🛓					
		Wells: ???					
		Focus options					





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。

Channels		
	• 1	
Fluorophore		
Confocal Disk	Wide Field	\sim
Color	377/647 377,647	\sim
Exposure	🗸 Auto 🛓	
	Wells: ???	
	Focus options	

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。

Channels		
	<u>O</u> 1	2
Fluorophore		
Color	377/647 377,647 🗸 🗸 🗸	GFP CY5 469,685 V
Exposure	Auto	Auto
	Wells: ???	Wells: ???
	Focus options	Focus options





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。

annel 1: 377/647 377,647		
Autofocus Attofocus Fixed focal height [bottom elevation (30 Focal height from beacon(s) [beacon ele Focal height from first channel (+ offset	00 μm) + offset] wation + offset])	
Perform illumination correction		
Autofocus Options		
Use default focus method Use default focus method settings	Focus method:	Autofocus with optional scan V
Auto Exposure Options		Vibration Detection Options
Prioritize speed over in	nage-quality 🗸	CV Threshold: 0.01
- Advanced options -		Images to average: 1
Use deradul integrado	or); 5	(1=disabled; >1=enabled)
Integration Unreshold (Ms	old: 24	
Gain thresh	0(). 24	
l arget exposure	%: /5	

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。

hannel 2: 377/647 377,647		×
Autofocus Fixed focal height [bottom elevation (3) Foral height from bearon(s) [bearon elevation Foral height from first channel (+ offsee Offset (µm): Perform illumination correction	000 μm) + offset] evation + offset] t)]	
Autofocus Options		
Use default focus method Use default focus method settings	Focus method:	Autofocus with optional scan $\qquad \qquad \lor$
Auto Exposure Options		Vibration Detection Options
Prioritize speed over in	mage-quality 🗸	
	and a descent in the second se	CV Threshold: 0.01
- Advanced options -		CV Threshold: 0.01 Images to average: 1
- Advanced options - Use default integrati	on threshold 🗸	CV Threshold: 0.01 Images to average: 1 (1=disabled; >1=enabled)
- Advanced options - Use default integrati Integration threshold (me	on threshold \checkmark sec): 5	CV Threshold: 0.01 Images to average: 1 (1=disabled; >1=enabled)
- Advanced options - Use default integrati Integration threshold (m: Gain thresh	on threshold 🗸 sec): 5 Iold: 24	CV Threshold: 0.01 Images to average: 1 (1=disabled; >1=enabled)
- Advanced options - Use default integrati Integration threshold (m: Gain thresh Target exposure	on threshold ✓ sec): 5 nold: 24 ≥ %: 75	CV Threshold: 0.01 Images to average: 1 (1=disabled; >1=enabled)





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。

Define beacons Horizc Ver	ontal offset from center of well: rtical offset from center of well:	Δ 0 μm 0 μm
Single Image		
Z-Stack		

- 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。

Procedure - CytationC10 (Com1)					×
Select steps	Plate Type:	96 WELL PLATE		∽ 🗸 Use lid	
Actions		Cuvette			
Image	Select wells:	• Per step	◯ At runtime		
Read	Description			Commente	
Set Temperature	■ Image (4x): Description	API 377,447		Comments	
Shake					
Dispense					
Kinetic					
Start Kinetic					
Monitor Well					
Append Reads					
Pause					
Delay					
Plate Out/In					
Stop/Resume					
Process Mode					
Well Mode					
Plate Mode					
Hit Pick					
Other					
Comment					
Options					
	Validate		ОК	Cancel Help	
	, and acc		0	- interp	





- 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。

Plate Description		×
Name: Manufacturer:	well black clear round bottom ULA- Copy Catal Corning 452	logue # OK
Display Filter:	Microplate ~	Help
Number of Rows: Plate Width:	8 Number of Columns: 12 85480 μm Plate Length: 127	760 μm
Plate Height: Plate Lid adds:	14400 μm Stacked Height: 126 2745 μm ✓ In	μm Lid Parameters
Wells Top Left Y:	11090 μm Top Left X: 1393	30 µm Imaging Parameters
Bottom Right Y: Welll Shape:	74340 µm Bottom Right X: 1134 Circle Rectangle Rectangle Rectangle Direction of the state of the s	408 μm Auto Map
Well Diameter:	6580 μm	
Slide Holder Slide Width:	0 µm Slide Length: 0	μm
\bigcirc	000000000	
\bigcirc	000000000000000000000000000000000000000	
		$\Theta \Theta \Theta$





Plate Description - Imaging Parameters	
Bottom Elevation (1): [1830] µm (Distance from top of carrier lip to focus position)	
X/Y Positions (3)	
Top Left Y: 11090 μm Top Left X: 7950 μm Bottom Right Y: 77280 μm Bottom Right X: 116498 μm	
Bottom thickness (2): 85	
0 ↓	
OK Cancel Help	

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。

Save settings	Help
	Close