

图1

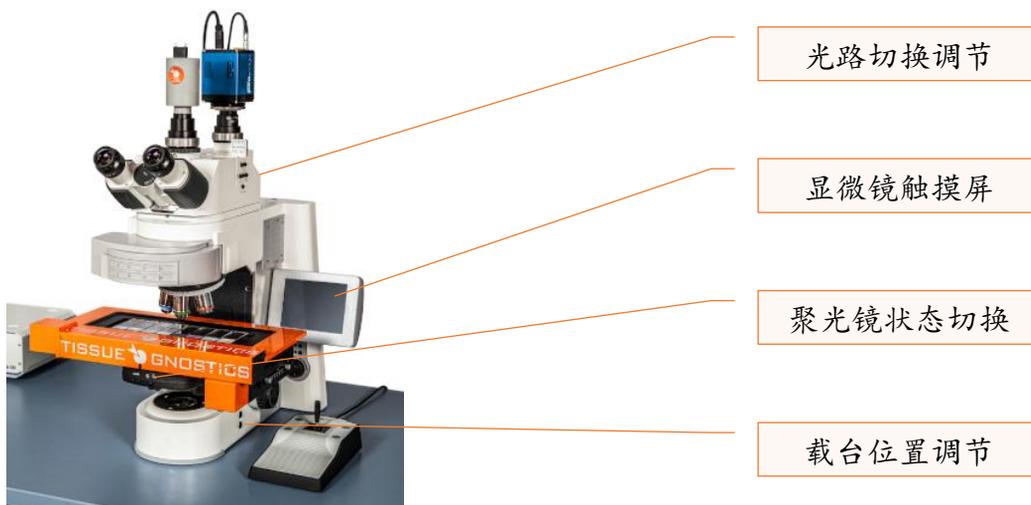


图2

一、开机

1. 按顺序开机：

1. 显微镜供电模块开关
2. 显微镜开关
3. 荧光相机开关（不使用荧光可以跳过）
4. 荧光光源开关（不使用荧光可以跳过）
5. PC服务器开关

2. 运行TissueFAXS软件

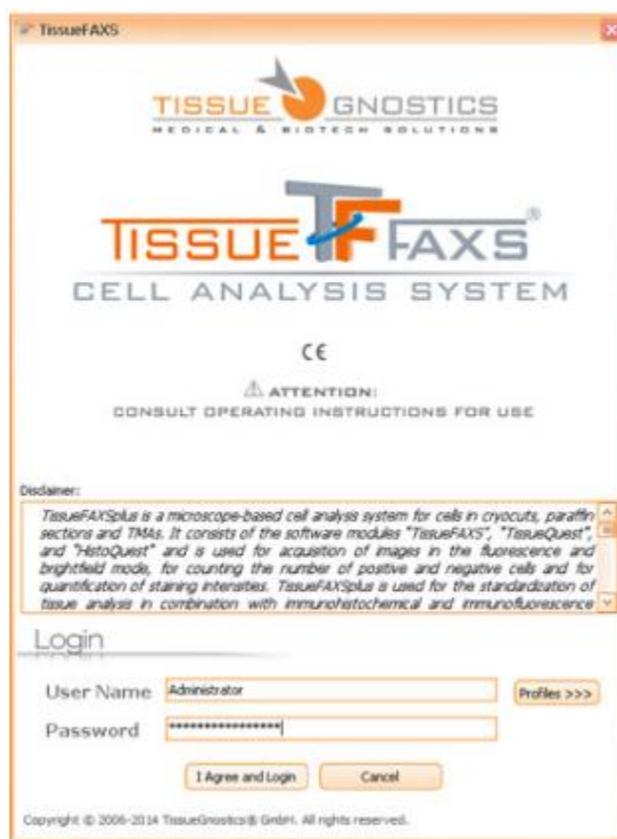


图3

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

• 3. 载台自检 (Stage Calibration)

- 1. 确认载台移动范围内无障碍物
- 2. 点击 Continue , 等待自检完成。

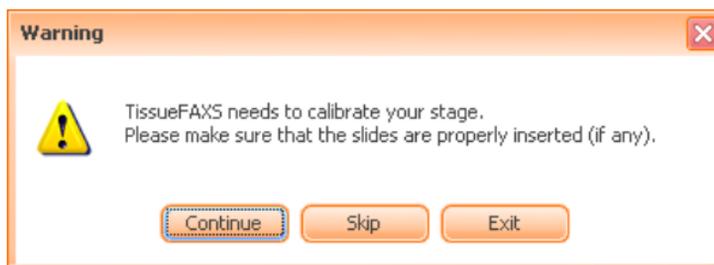
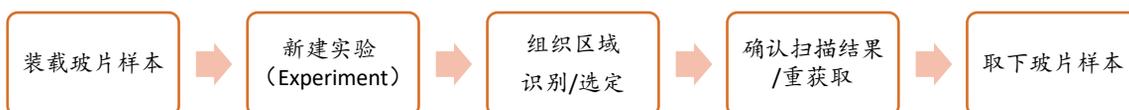


图4

• TissueFAXS拍摄流程:

• 明场:



• 荧光:



• 4. 装载及取下适配器 (Insert)

- 1. 点击右屏右上角load按钮，等待载台降低至load位置
- 2. 点击load按钮旁的下拉三角：advanced load按钮，，等待物镜旋转至空位，等待载台移出
- 3. 取下适配器Insert (注意勿撞到物镜)。

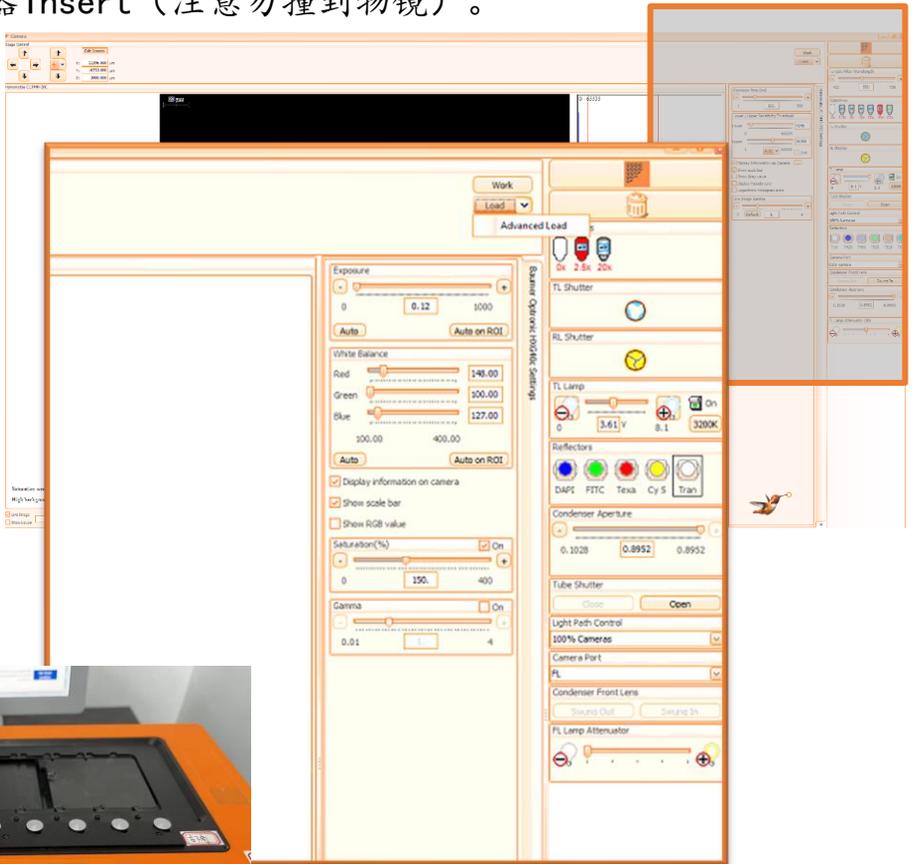
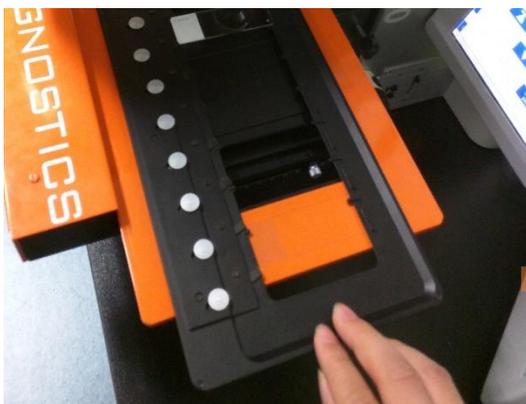


图5



载台移出位置 (如图5所示)
从右手侧托起适配器一边
缓慢抽出/插入

***注意！注意：这个过程中Insert不能抬太高，避免磕碰物镜！**



***注意：装载时银扣朝外侧（操作者方向）否则：
损坏镜头！损坏Insert！损坏载台！**

5. 装载及取下玻片样本

1. 如下图所示，把适配器放在干净平面上
2. 按1号箭头方向拉动卡簧
3. 放入玻片，确认每张玻片需要顶到卡槽左上角（箭头2、3所示）并松开卡簧
4. 玻片按压四角确认水平

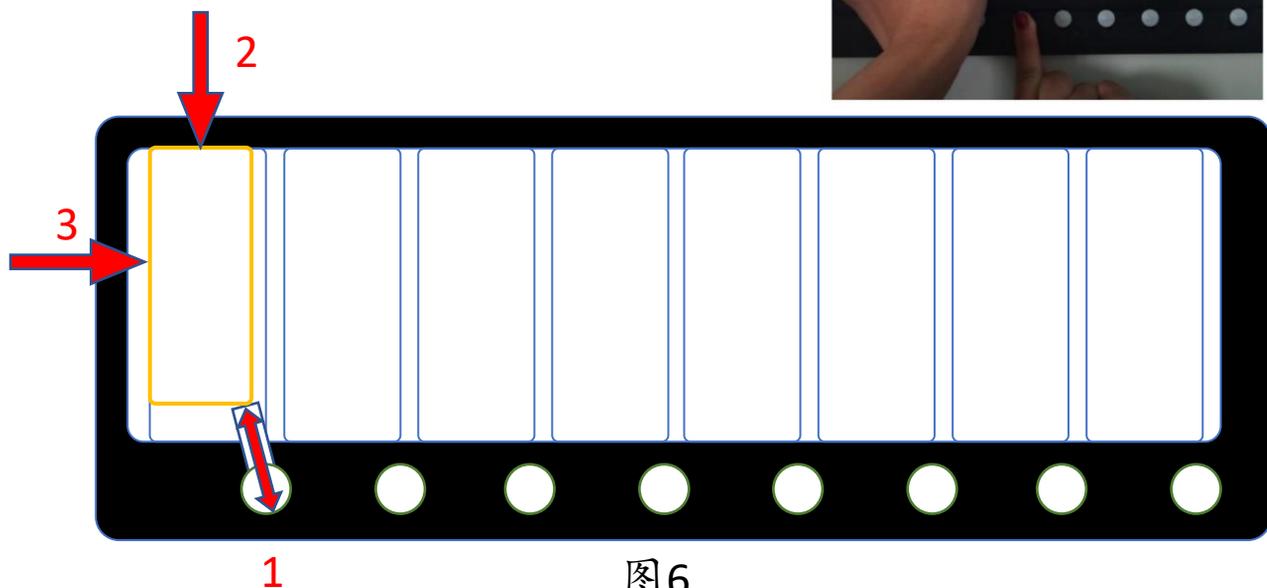


图6

6. 注意事项：

- 取下装载过程中，Insert不能抬太高，避免磕碰物镜！
- 装载时银扣朝外侧（操作者方向）否则：损坏镜头！损坏Insert！损坏载台！
- 将Insert一边放入卡槽并缓慢推入载台内，会听到2-3次撞击声音，代表适配器到达位置。
- 再次检查Insert位置及四角水平情况，确认是否放置稳固。
- 样品加载完毕后可以开始操作扫描软件，进行正式扫描

二、明场扫描及一键自动扫描方法

—————（参考Page3明场扫描流程）

- 新建实验（New experiment）
- 点击左屏左上角New…按钮新建实验。



图7

- 选择自定义明场扫描（Custom BF）

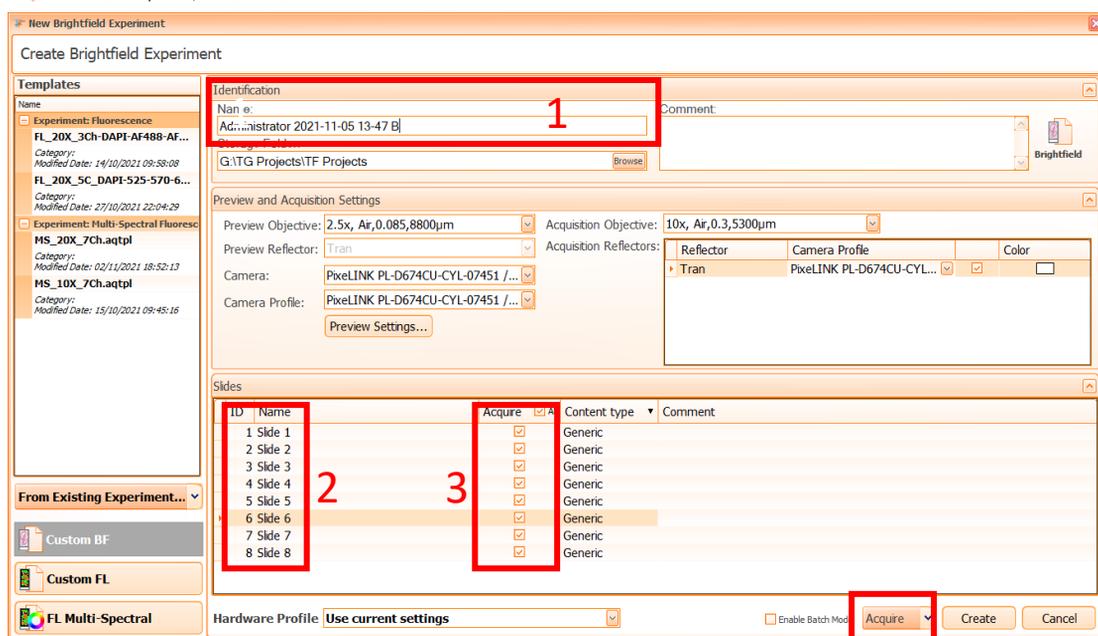


图8

4

1. 设置实验名称（Experiment）
2. 设置标签名称
3. 设置是否扫描
4. 点击开始扫描（Acquire）

在开始扫描按钮旁下拉三角
可选择使用：

- 1.手动确认组织区域识别
- 2.自动跳过组织区域识别

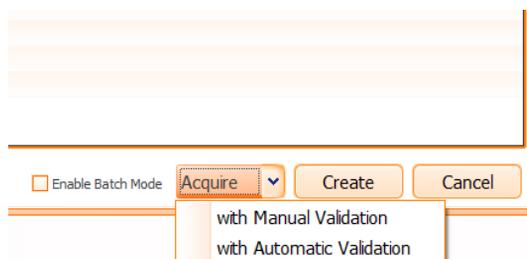


图9

预览后，自动弹出组织区域识别，自动模块弹出后显示默认参数识别结果，如不理想可手动调整：

1. 区域调整

- 点击Select，在玻片范围内按住鼠标左键，圈选识别区域，以排除其他区域非目标样本/杂质等误识别内容

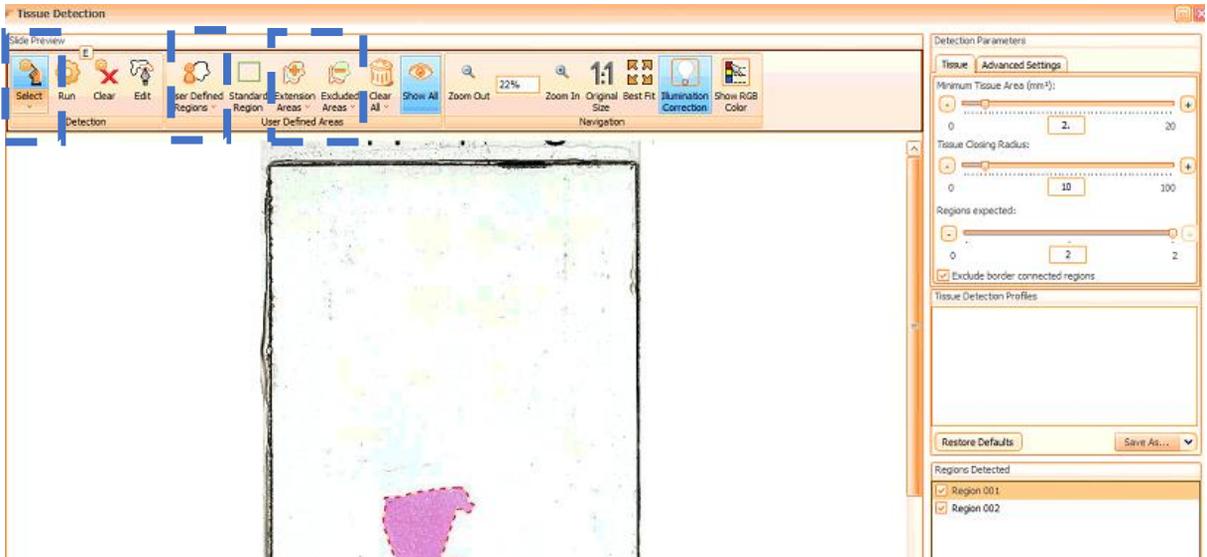


图 10

2. 使用User Defined Regions进行自定义区域或Extension Area/ Excluded Area 按钮，增加/排除组织区域

3. 点击右下角确认识别结果

4. 所有样本确认后，等待自动20X物镜全景扫描结束即可

注意：高级自动识别组织区域的参数调整方法，有需要请咨询客服或负责技术工程师

三、荧光扫描及手动扫描设置

—————（参考Page3荧光扫描流程）

- 新建实验（New experiment）
- 点击左屏左上角New…按钮新建实验。



图11

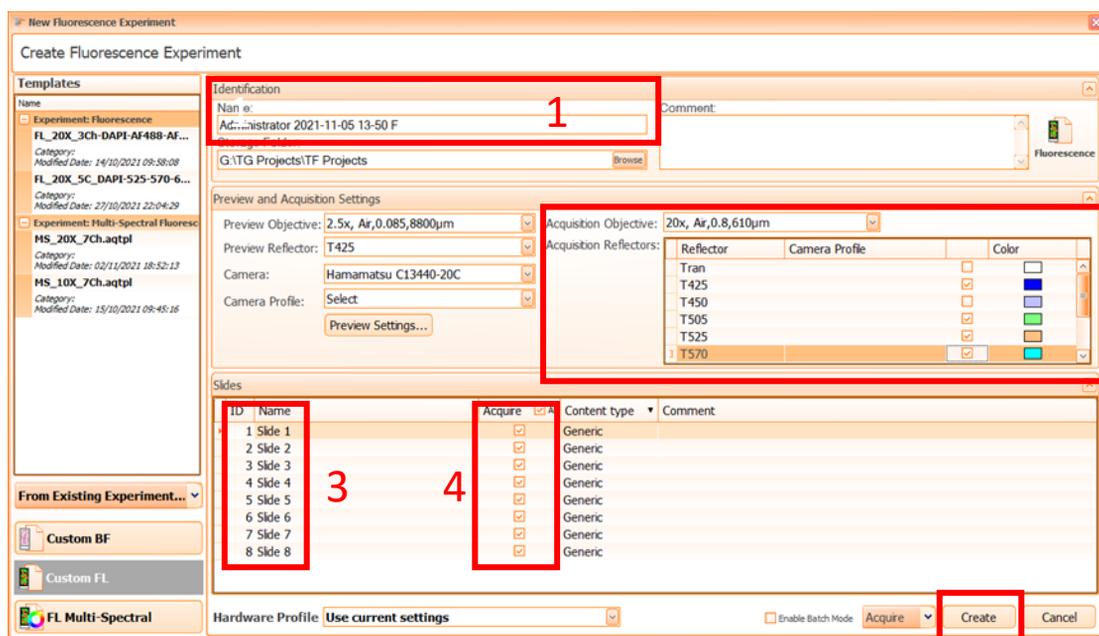


图12

1. 设置实验名称（Experiment）
2. 选择扫描物镜及设置颜色通道（Acquisition Reflectors）
3. 设置标签名称
4. 设置是否扫描
5. 点击开始创建实验（Creat）

注意：不论明场扫描/荧光扫描，都可以使用模板（Templates），点击Acquire，实现一键自动扫描。

注意：多光谱样本扫描需使用5X预览物镜（Preview Objective）

低倍预览物镜扫描参数调节

1. 进入TissueFAXS操作界面后，首先将物镜移到组织位置
2. 在preview面板中，点击view，调用2.5X物镜下DAPI通道

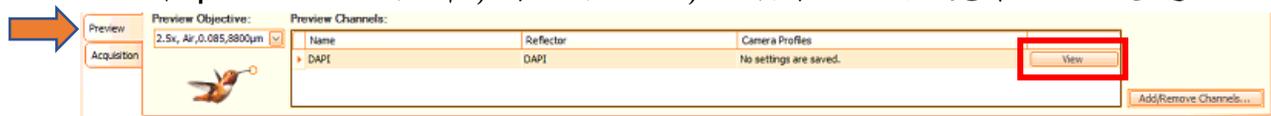


图13

3. 在右侧实时镜下窗口，点击Auto按钮自动设置亮度阈值 (Upper/Lower Sensitive Threshold)
4. 点击自动对焦按钮，找到组织焦面

*为了找到恰当对焦焦面，可能需要反复执行3-4步骤，以及升高/降低曝光时间 (5)，升高/降低光源亮度 (6)，或手动精细调节载台高度

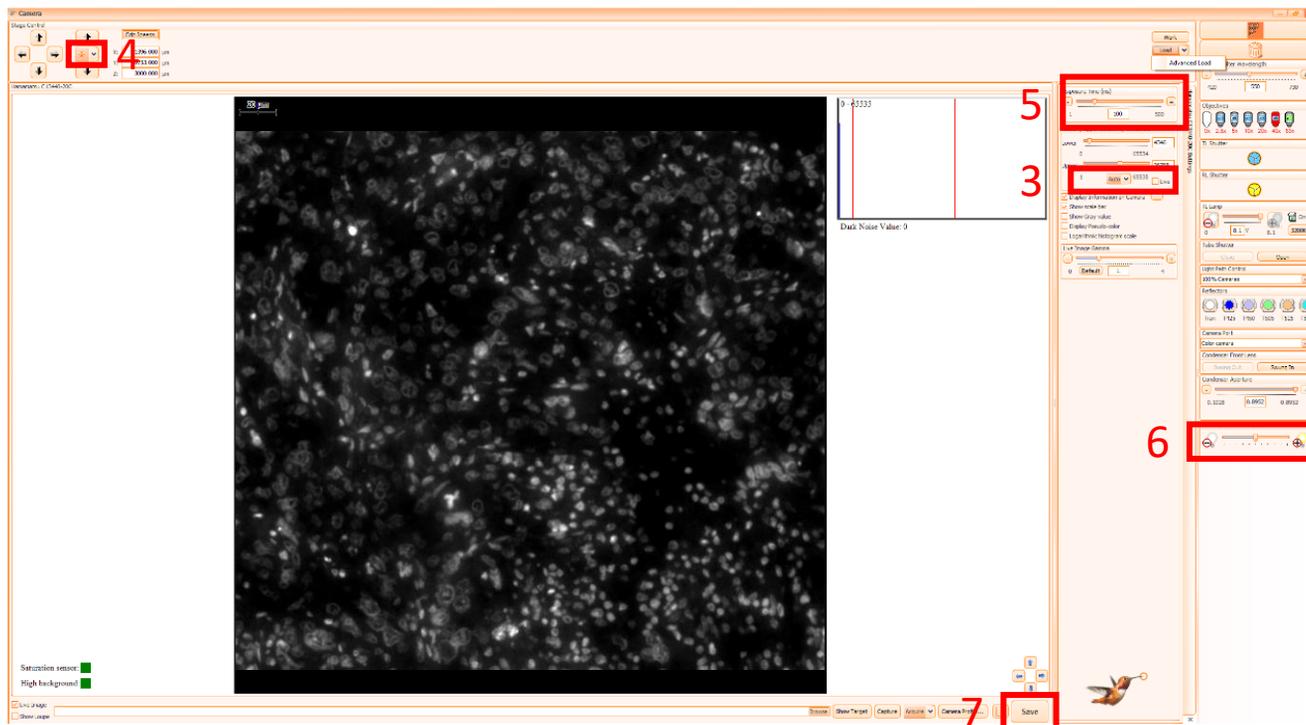


图14

- 5. 点击保存 (Save) 按钮保存设置 (7)
- 6. 点击左侧界面预览按钮，开始预览
- 或选择多张样本批量预览

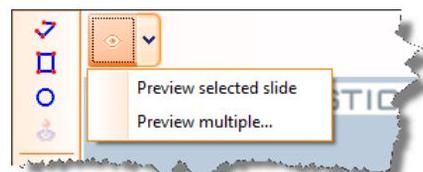


图15

- 组织区域选定/识别：参考（Page7）明场操作部分

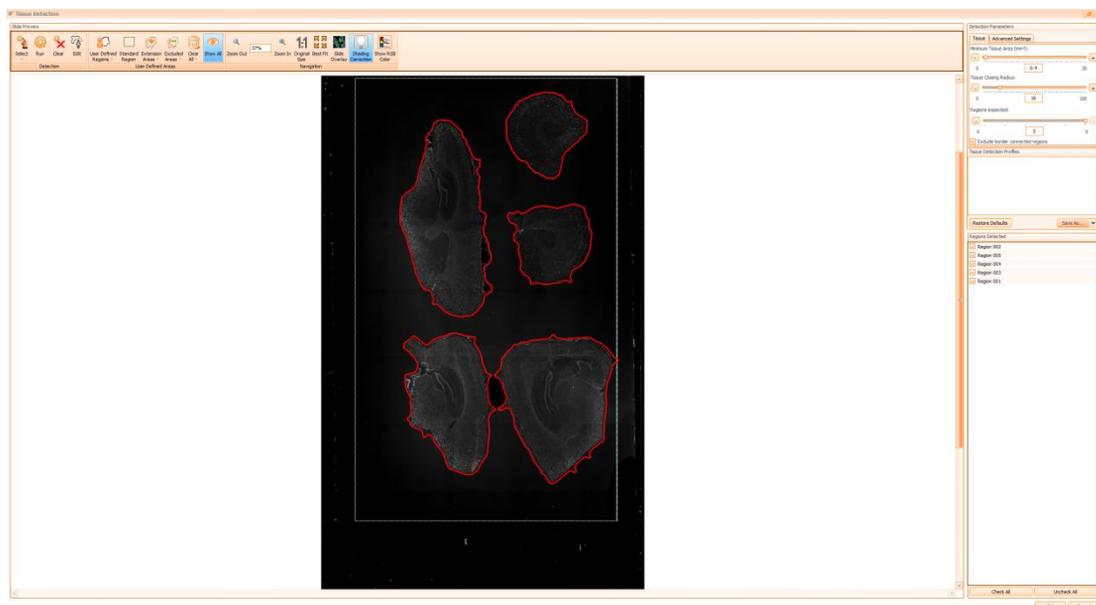


图16

高倍扫描物镜，每个通道参数调节

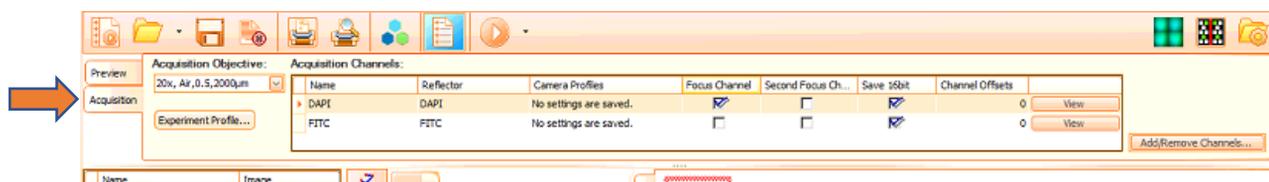


图17

标签切换至Acquisition，参考（Page9）低倍预览通道设置方法，在每个通道上执行**三步**：

View》Auto》Save

注意：

1. 除非各个通道亮度差异极端显著，否则不需要再次调节亮度/曝光时间，仅需要调节Upper/Lower Sensitive Threshold即可
2. 找到合适焦面后，切换通道不需要再次对焦

- 选择图像获取：
- 点击Acquire按钮，一键获取所有确认好的图像

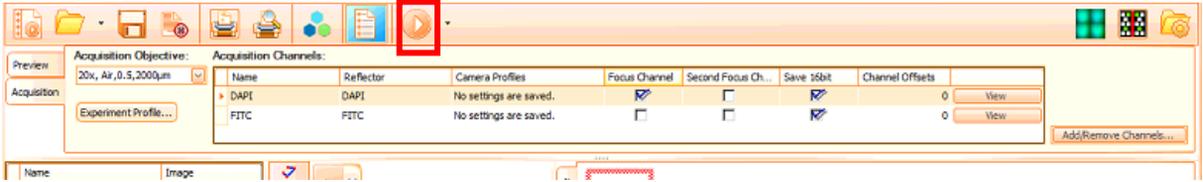


图18

四、看图软件操作培训

——此处功能在TissueFAXS扫描软件中亦可实现

• 图像浏览

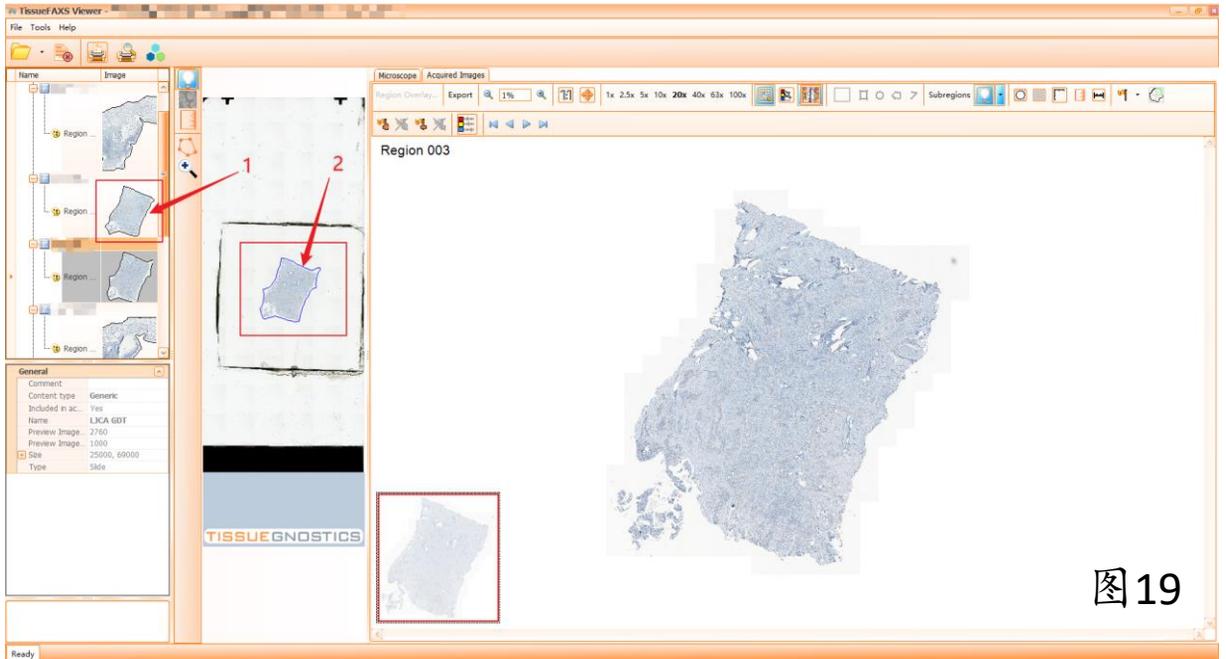


图19

鼠标左键双击1、2位置，均可打开图像全景细节浏览界面
在此界面上，使用鼠标滚轮进行缩放，或手动输入缩放倍率

• Post Processing 图像调整

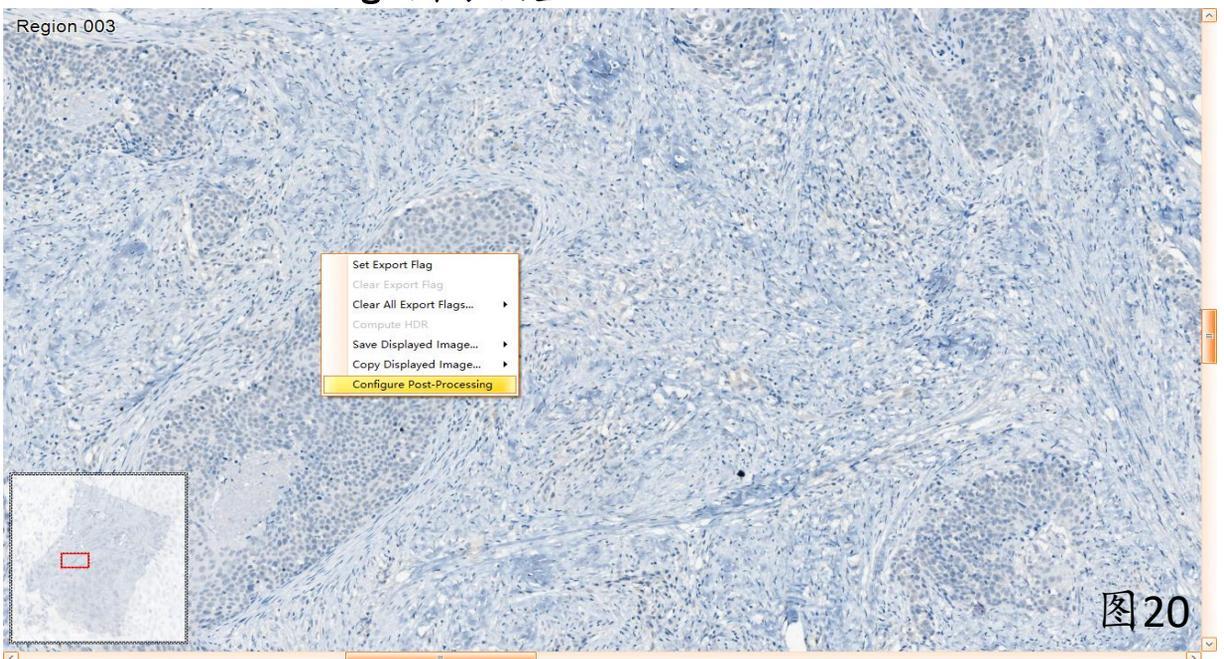


图20

- 注意：和其他系统不同，TissueFAXS系统默认展示原始扫描图像，以便于真实图像的浏览与分析；通过图像调整功能可以对图像进行调节，调节后的图像仅用于展示，不可用于数据分析！

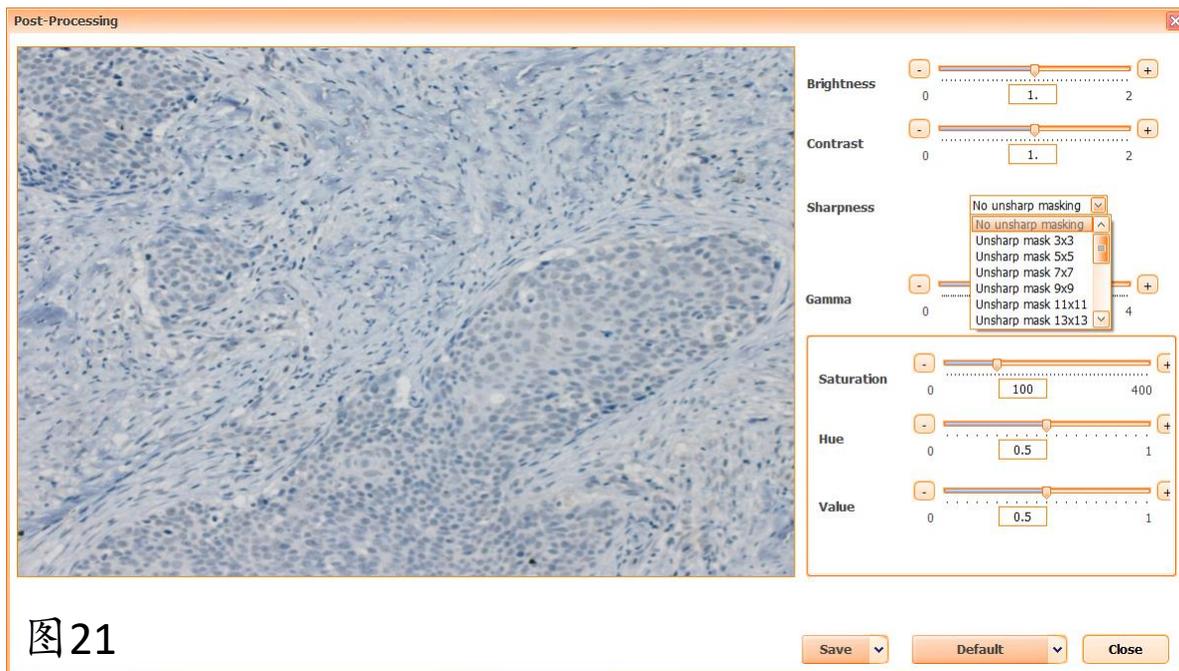


图 21

- **Sharpness:** 调整图像锐利程度，数值越大，锐利程度越大，效果如下图：

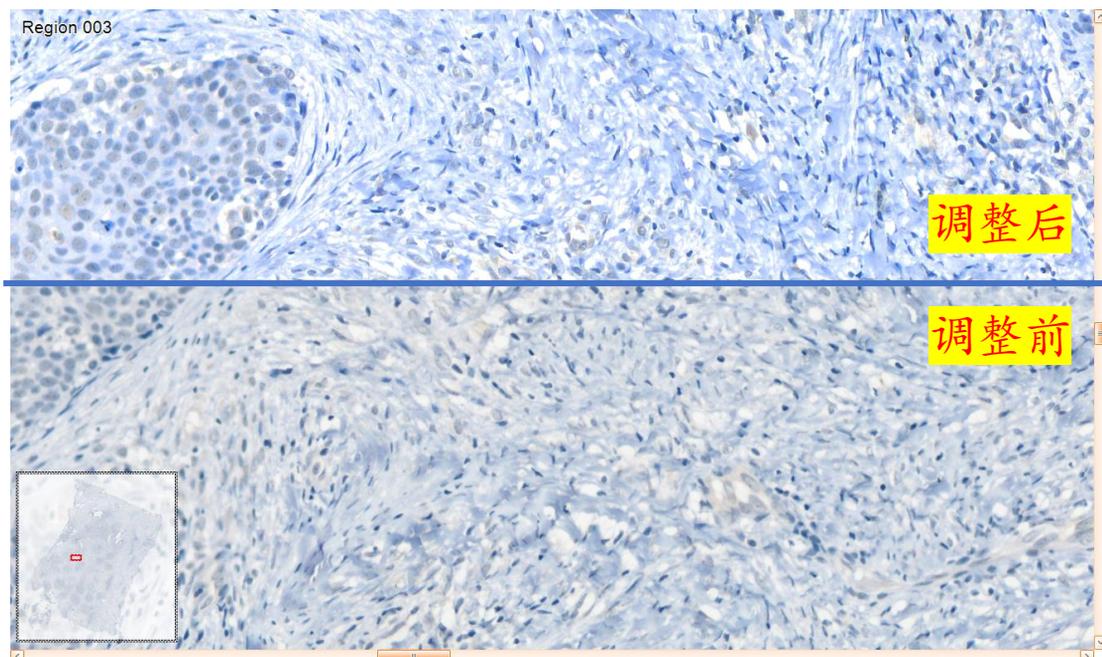


图 22

- Region Overview调节图像通道/亮度/背景

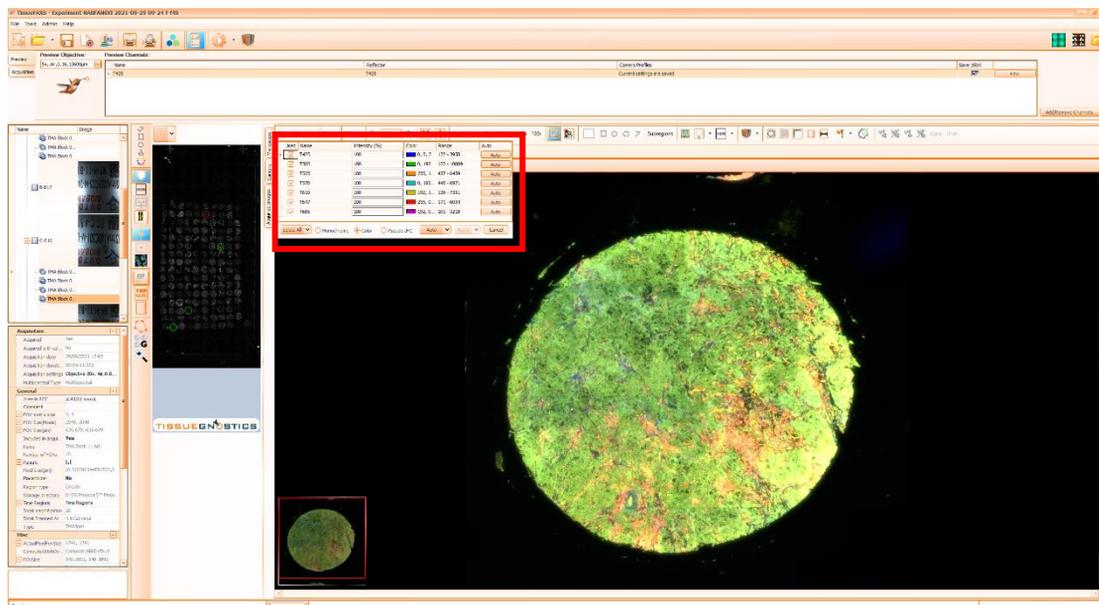


图23

- 注意:
- 调节Range的Lower数值=调节背景信号强弱
- 调节Range的Upper数值=调节整体亮度强弱
- 图像缩放除鼠标滚轮外，可以使用鼠标右键框选目标区域放大

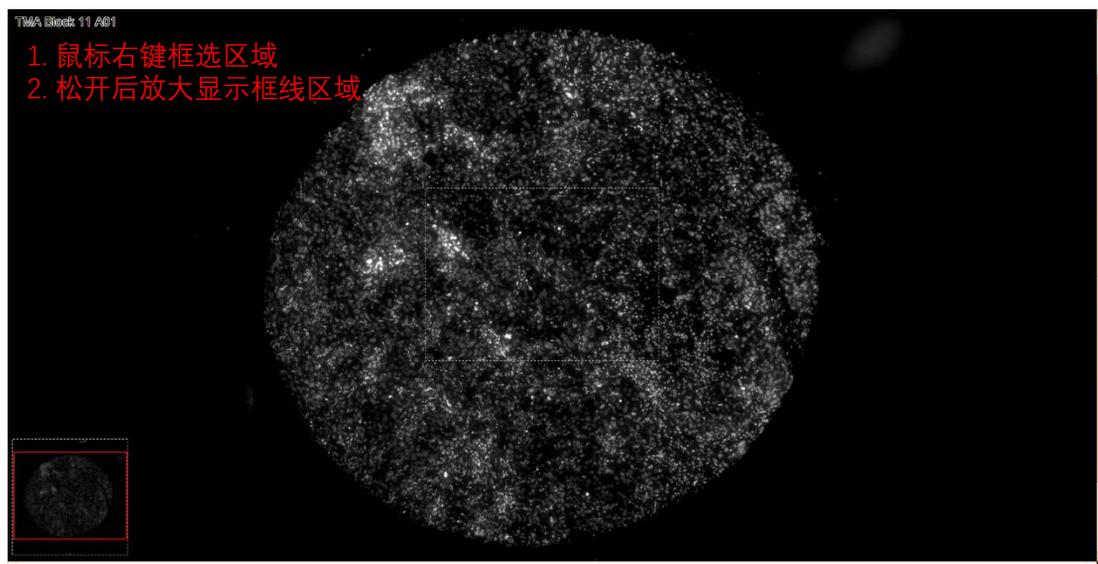


图24

- 图像导出
- 注意：TissueFAXS Viewer软件是永久免费的，针对全景超大图像的浏览进行了专业优化，如果选择导出通用格式（如Tiff），图像打开速度会受到操作系统性能的影响

图像导出方式一：鼠标右键》copy/save》所见即所得

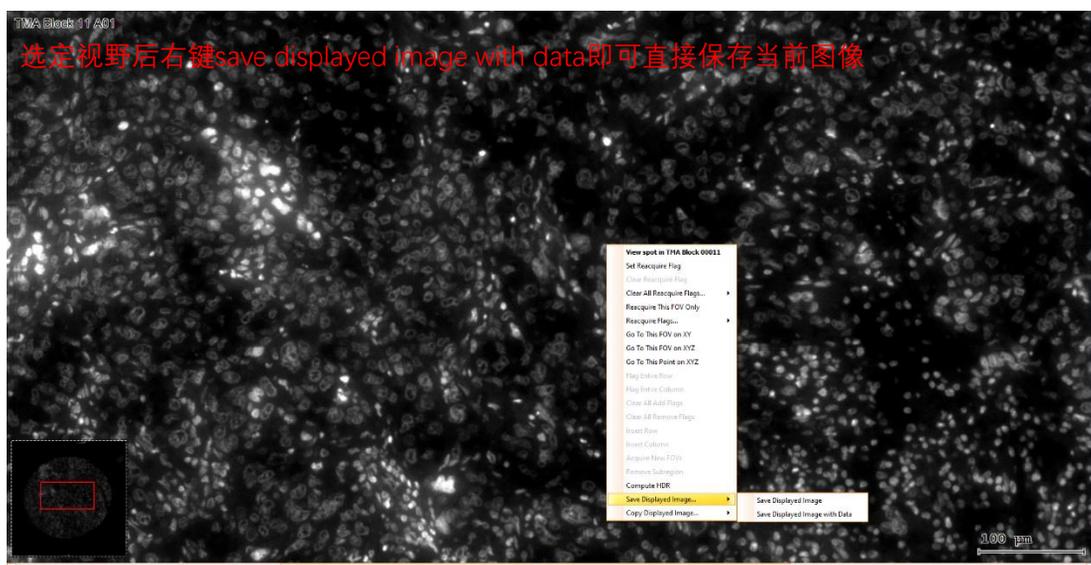


图 25

图像导出方式二：全景输出 Export》Reign Overview

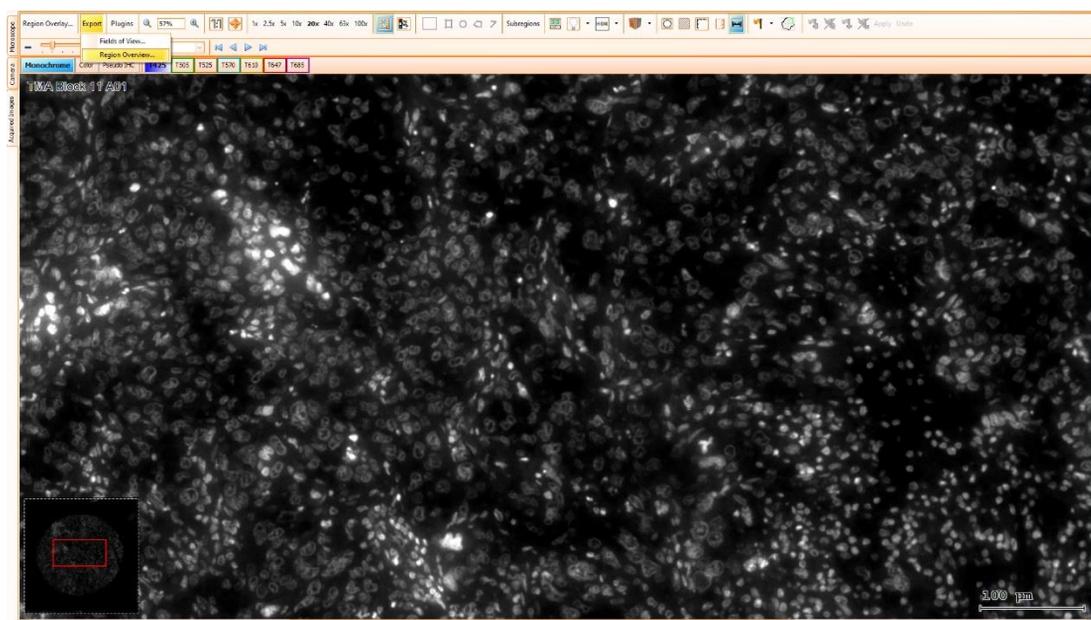


图 26

• 输出格式选择

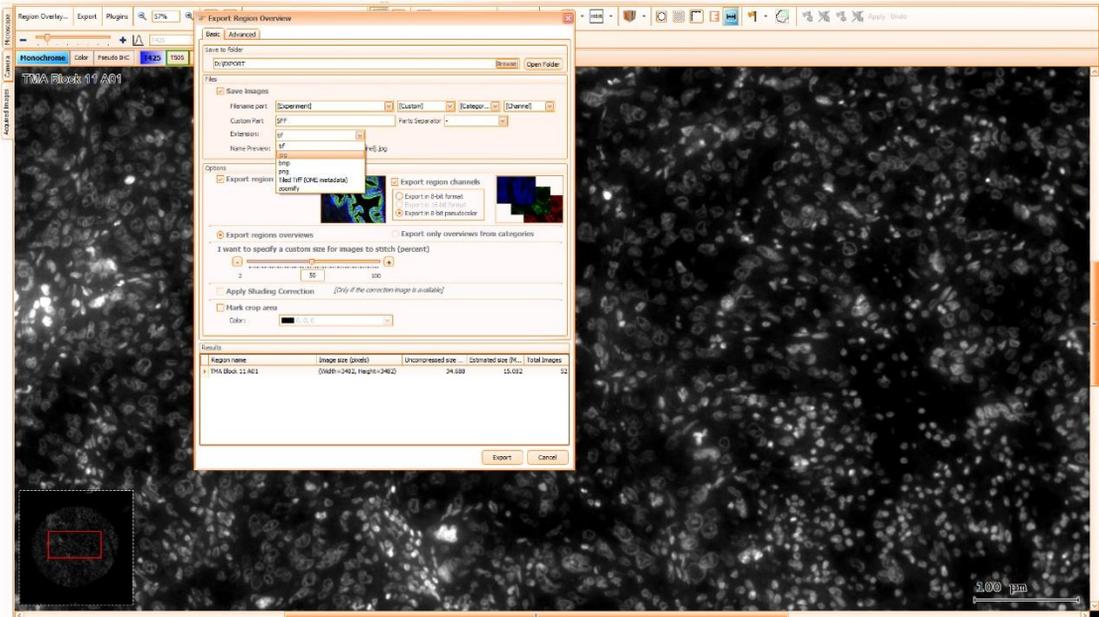


图 27

• 输出分辨率选择

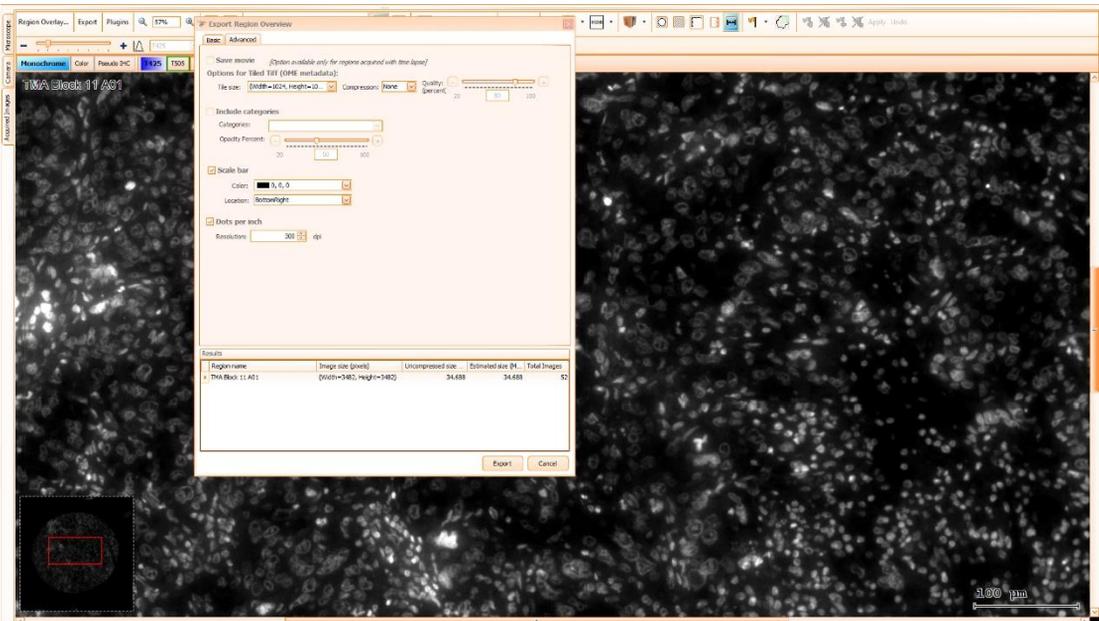


图 28

- 图像压缩比例调整



图 29

- 图像输出比例调整



图 30

- 图像输出内容选择:

- 全景叠加伪彩图/单通道8bit灰度图/单通道16bit灰度图/单通道16bit伪彩图

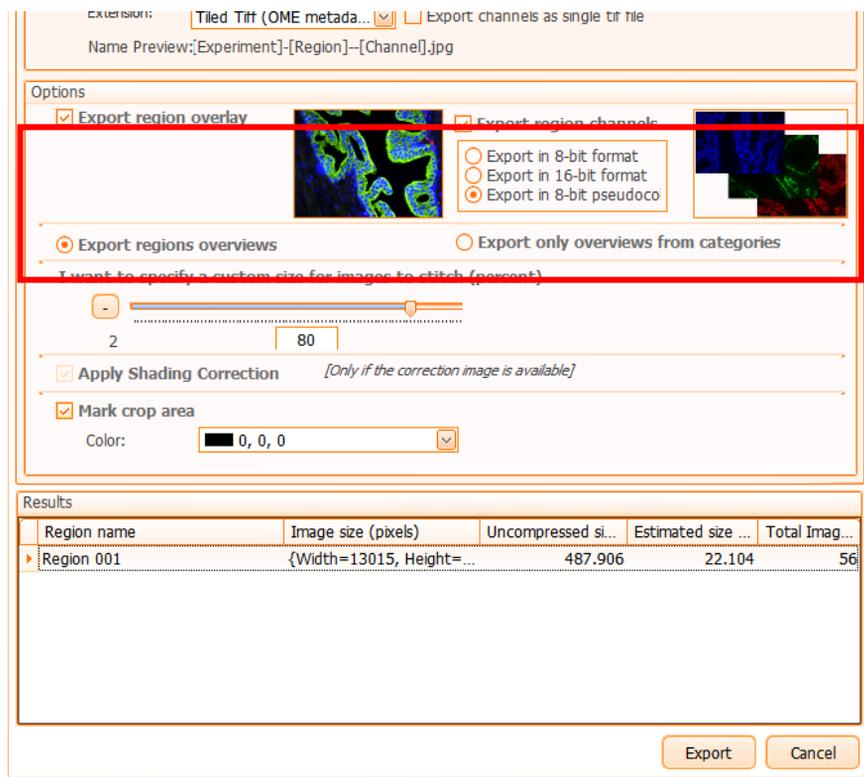


图 31

五、分析软件操作培训

——明场/荧光基本APP操作培训

明场IHC2使用培训：

1. 在登陆页面输入密码（若无，跳过），点击I Agree & Login，进入软件操作页面。



图 32

- 2. 选择明场或荧光的APP，APP框边红后，选择明场或荧光的扫描文件，建立APP的分析文件。（此处选择IHC2）

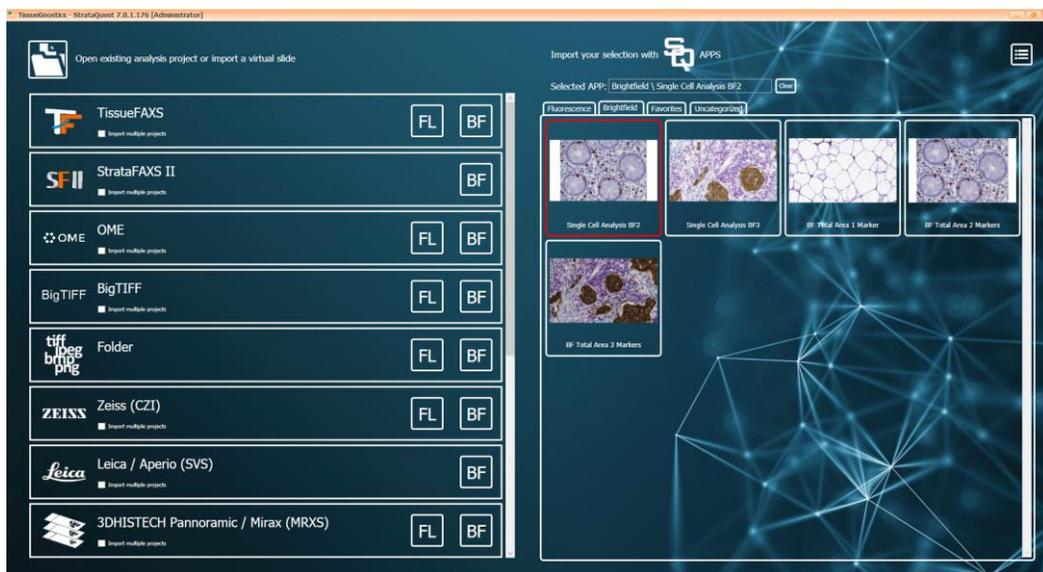


图 33

- 首次分析导入 TissueFAXS 图像文件，点击 ，弹出界面，选择文件路径，点击 ，打开 TissueFAXS 明场扫描文件（后缀 .aproj）。
- 3. 文件选择界面，导入文件参数设置：注意选择需要分析的图像，并选择所有Subregion后，多次点击Next即可建立分析界面

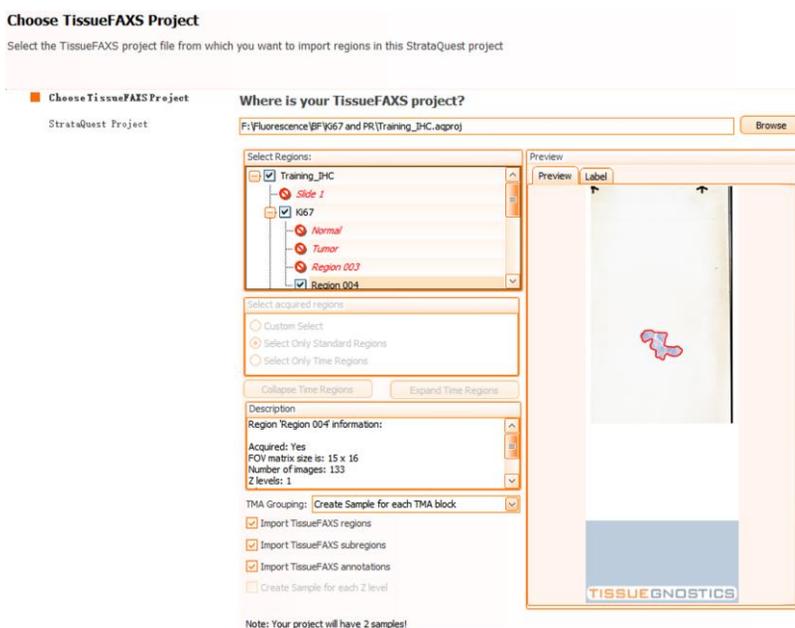


图 34

• 4. 数据储存界面

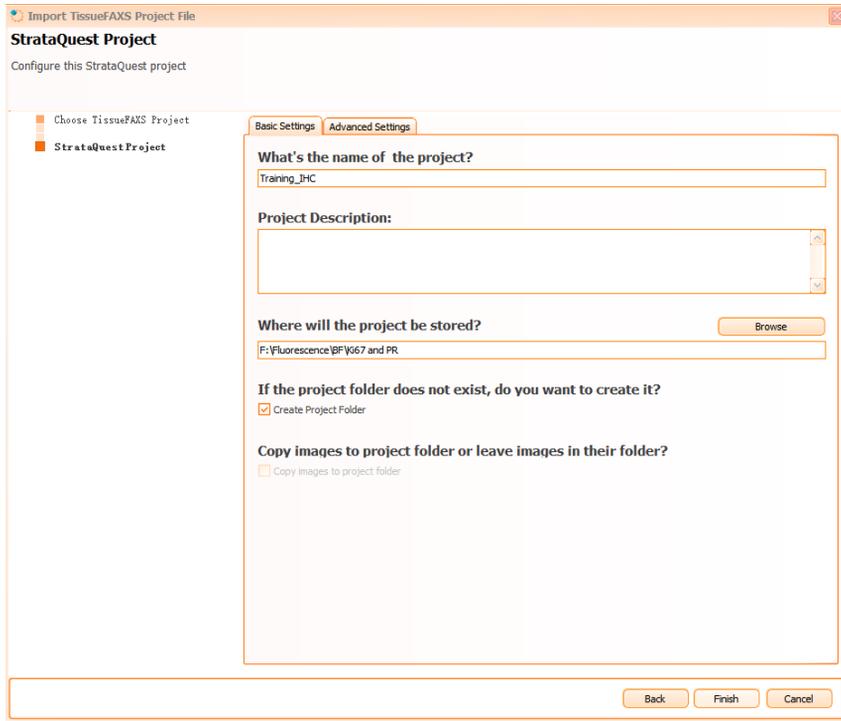


图35

• 5. 分析界面

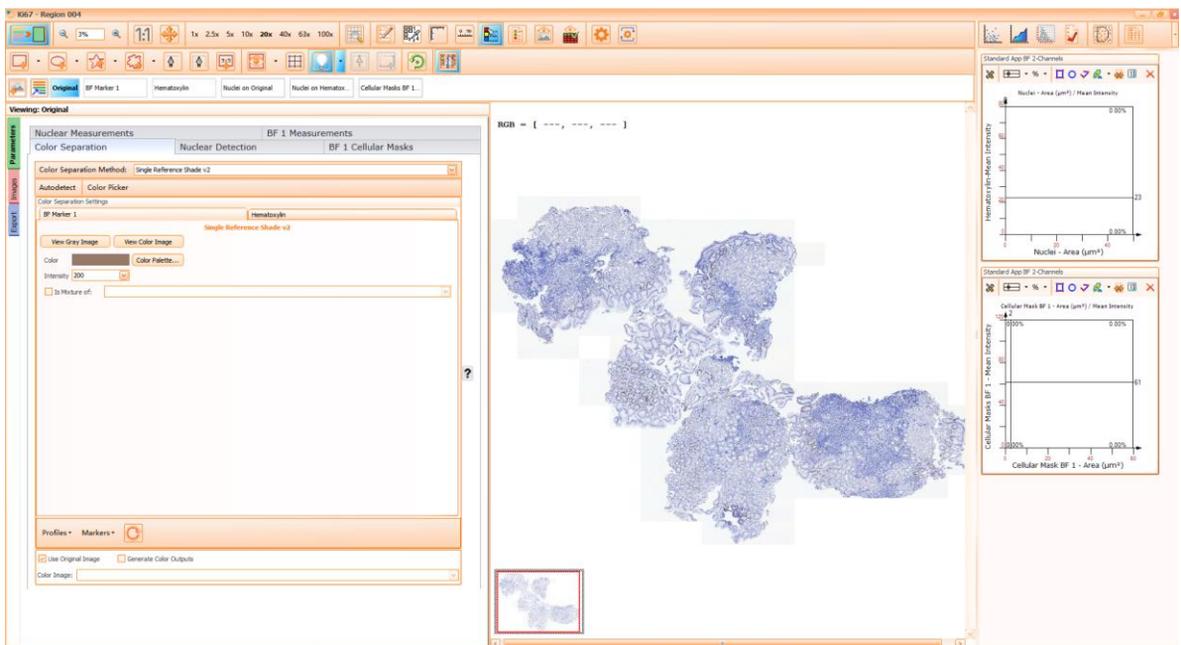


图36

- 6. 分析操作:
- 注意: 系统IHC2已经存在默认分析参数, 点击**齿轮 (分析按钮)**即可获得初步细胞核/细胞质的识别结果

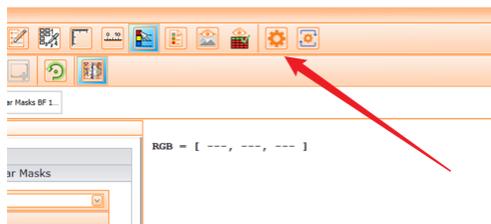


图37

- 在初步识别结果基础上通过正反向回溯功能, 在散点图中设定合适的Cutoff, 即可获得所需的基础核/质/膜定量分析数据

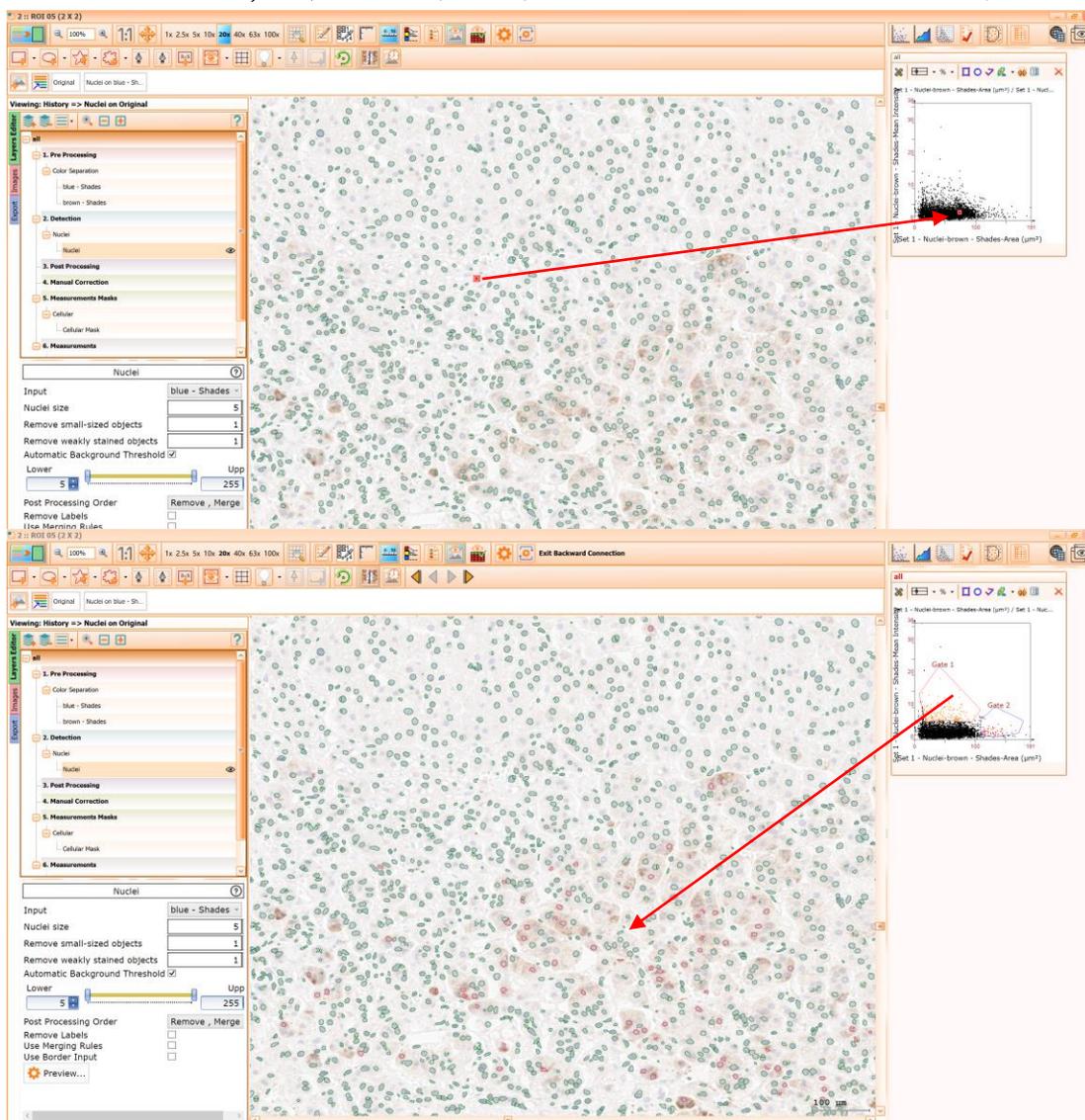


图38

如果需要重新设置分析参数，重点流程如下：

一键拆色》细胞核识别》细胞质识别》散点图正反向回溯确认阈值》数据报告输出

- 一键拆色

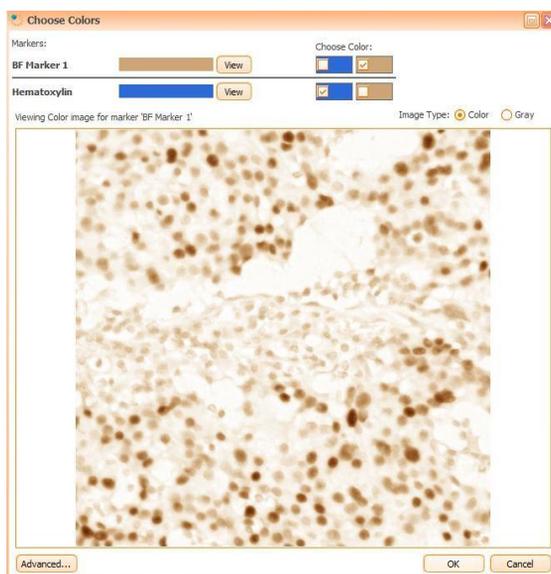
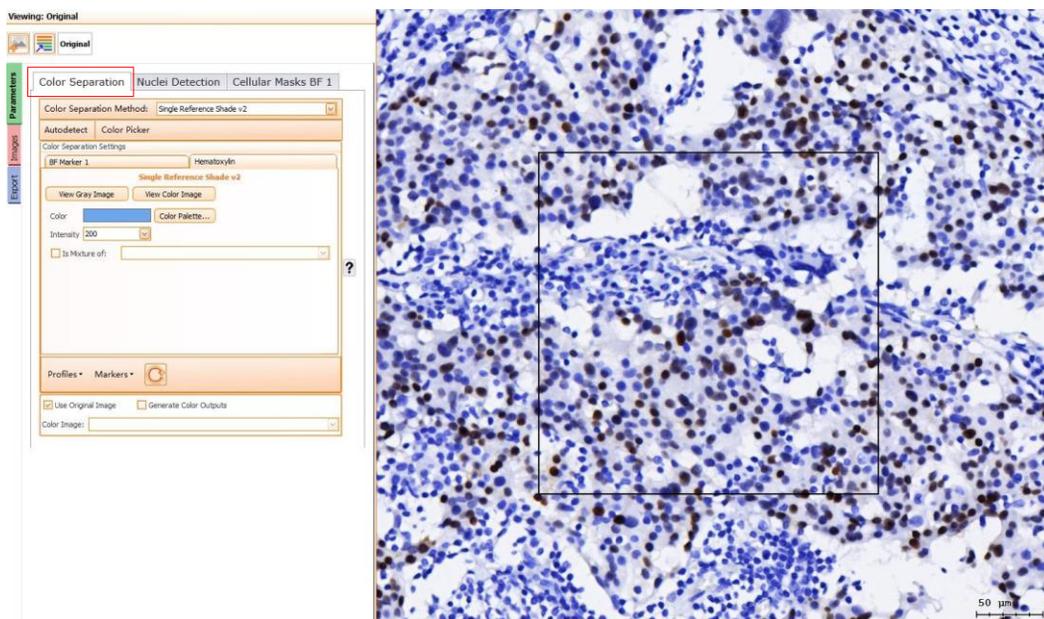


图39

• 细胞核/质或膜识别

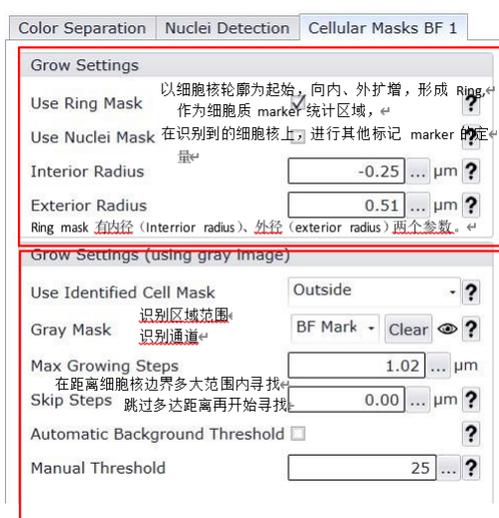
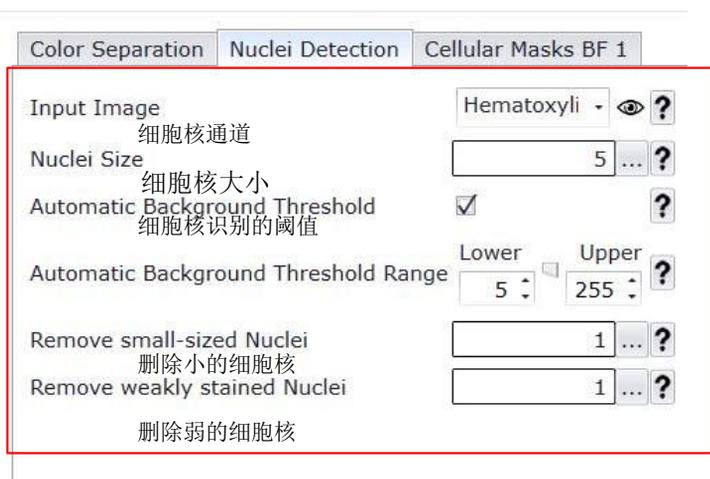
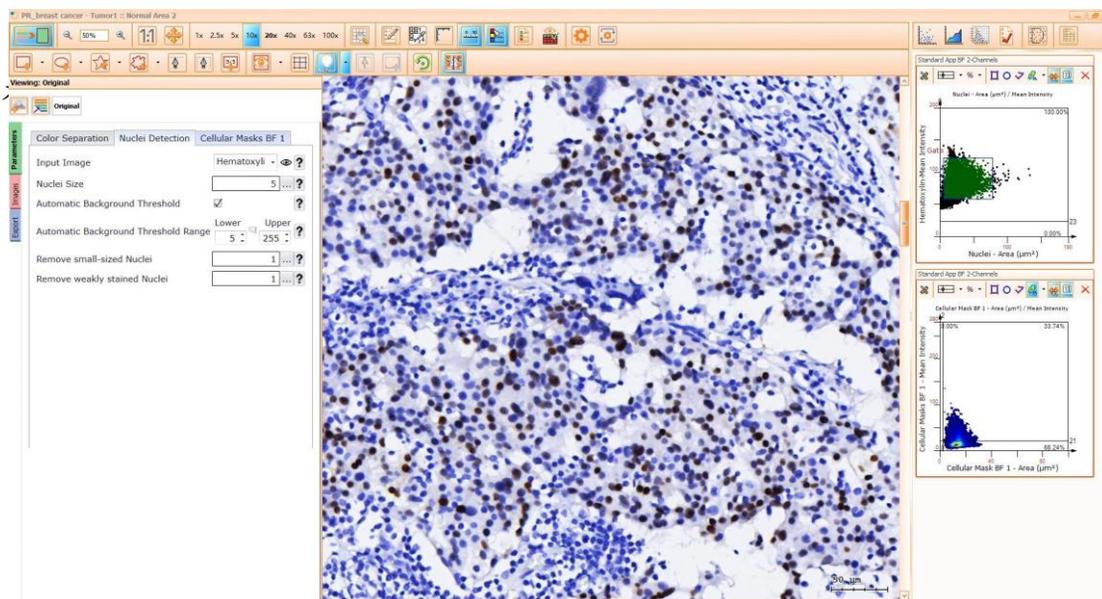


图40

- 散点图正反向回溯及Cutoff设定

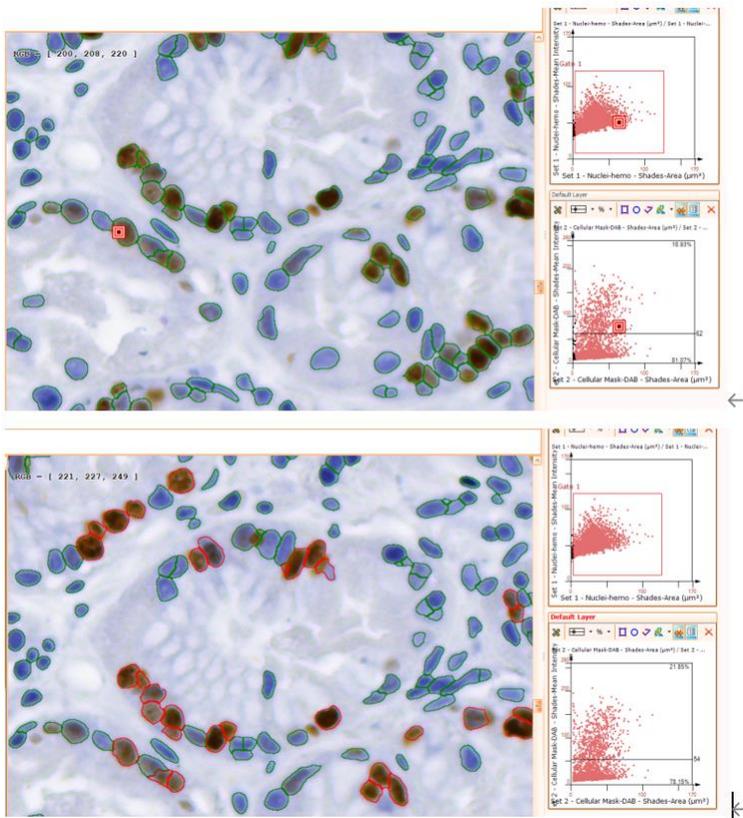


图41

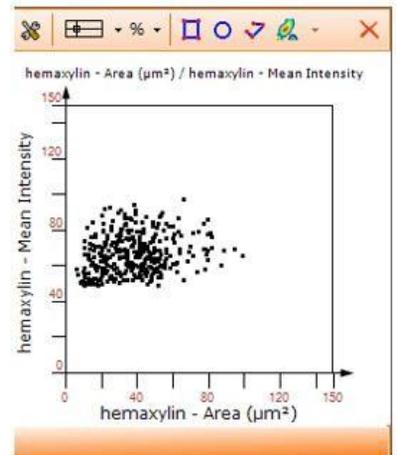
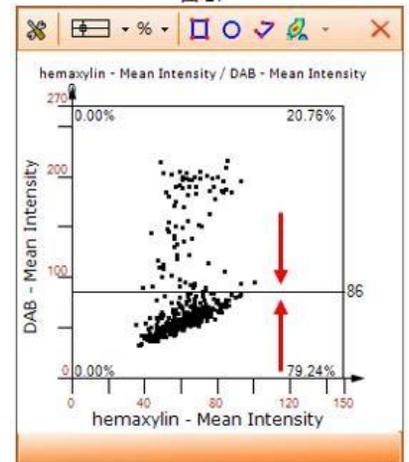


图17



- 注意：调节Cutoff与Gate，需打开编辑按钮

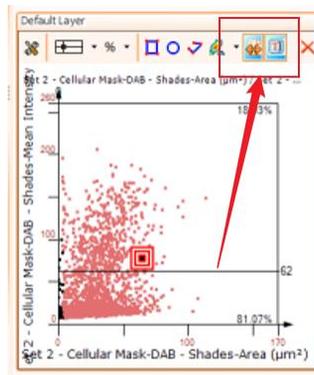


图42

- 多参数选择：通过选择不同通道/不同参数，对细胞核/质/膜的强度/形态特征/空间坐标等进行数据分析

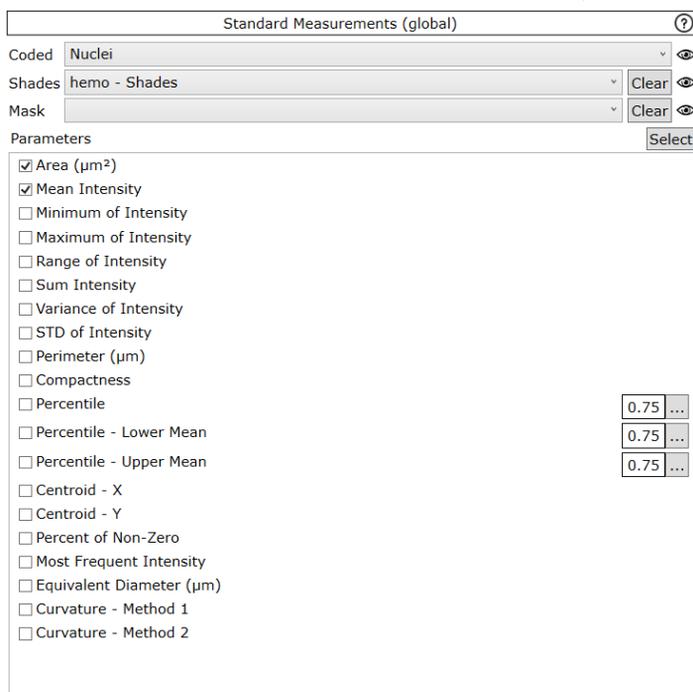


图43

- 数据输出：
- 生成报告Report Generator及统计报告Statistic Report

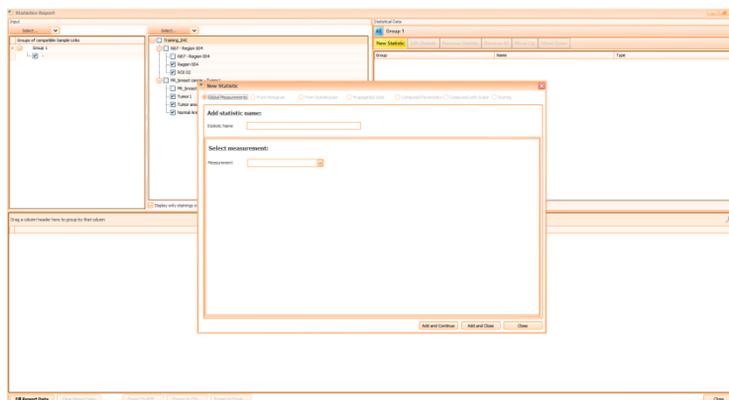
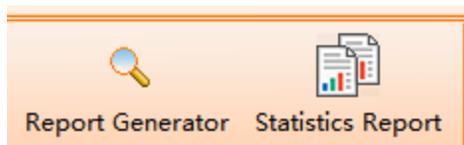


图44

荧光IF3分析操作：

注意，在单细胞核/质/膜分析操作中，明场及荧光参数设置一致。具体操作步骤参考软件附带的说明书。此处仅简单说明如何通过散点图对共表达数据进行分析。

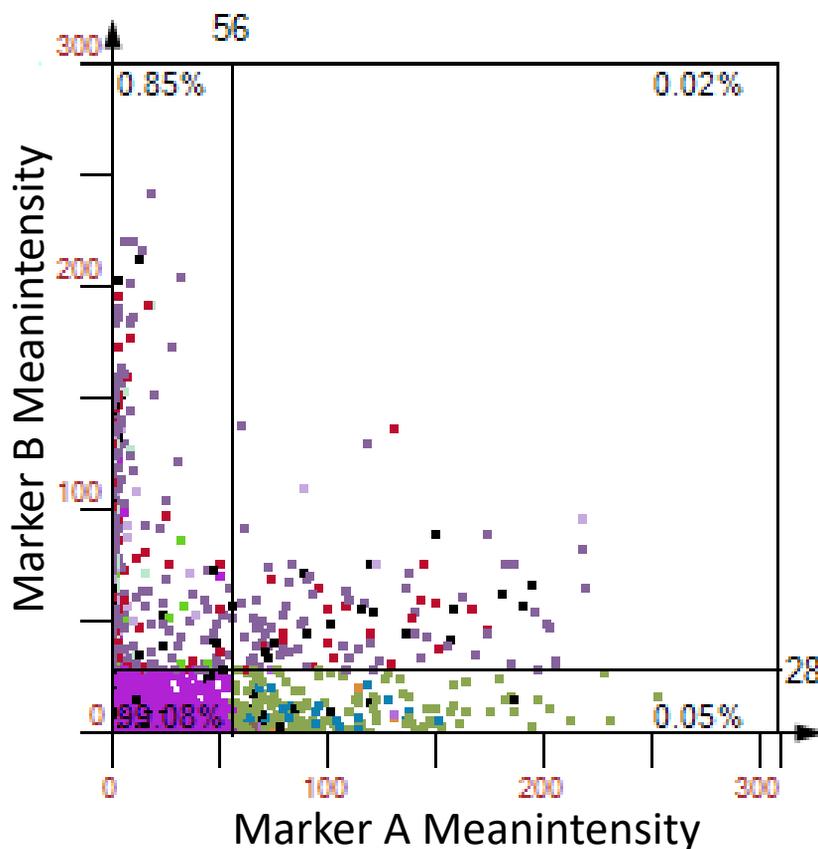


图45

在图45，散点图横坐标为Marker A的平均强度，纵坐标为Marker B的平均强度，每个点代表每个单细胞，所以四个坐标象限：

UR= Upper Right = A+B+共表达细胞的数据

UL= Upper Left = A-B+细胞的数据

LR= Low Right = A+B-细胞的数据

LL= Low Left= A-B-细胞的数据