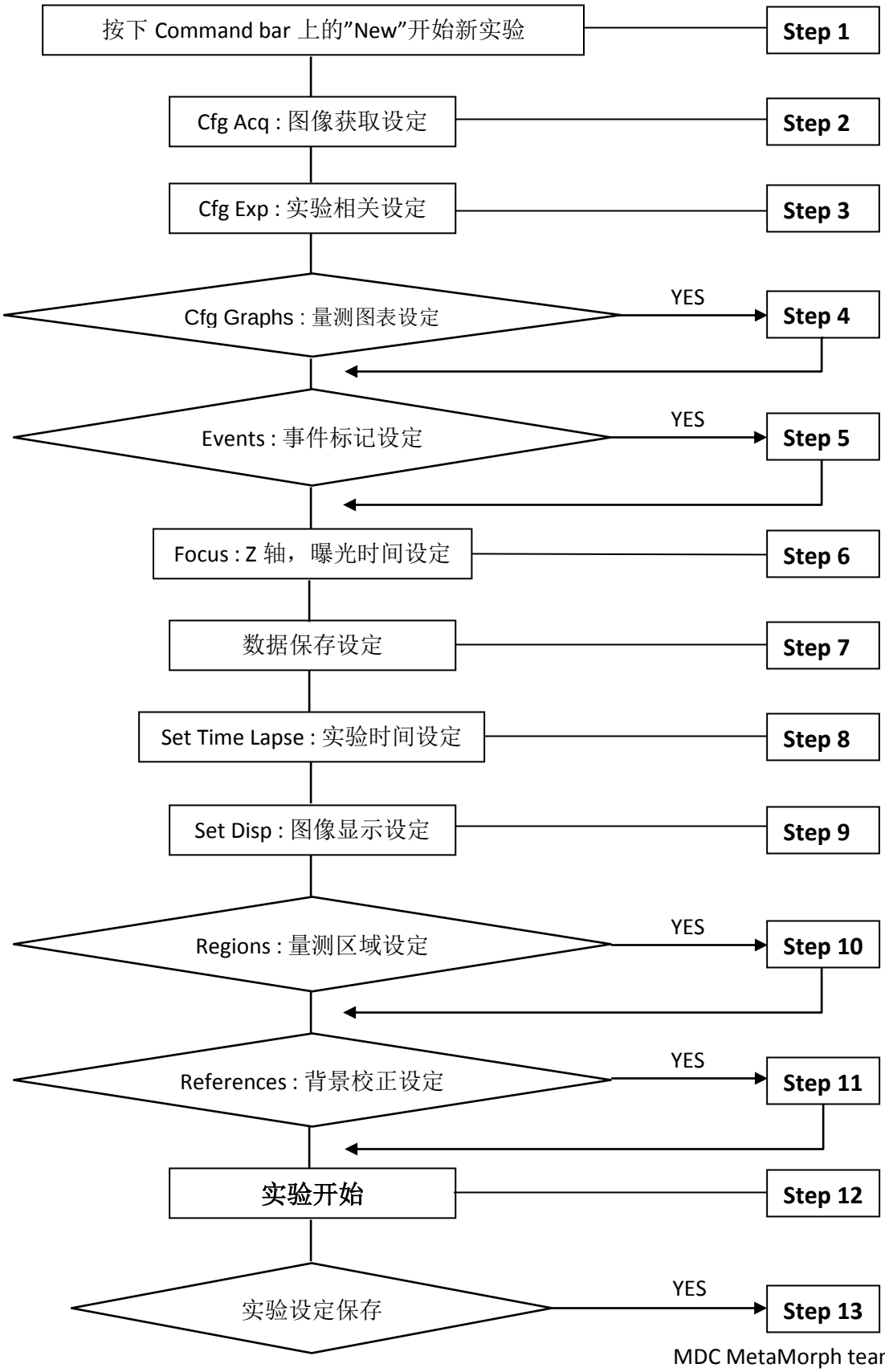
MetaFluor Work Flow

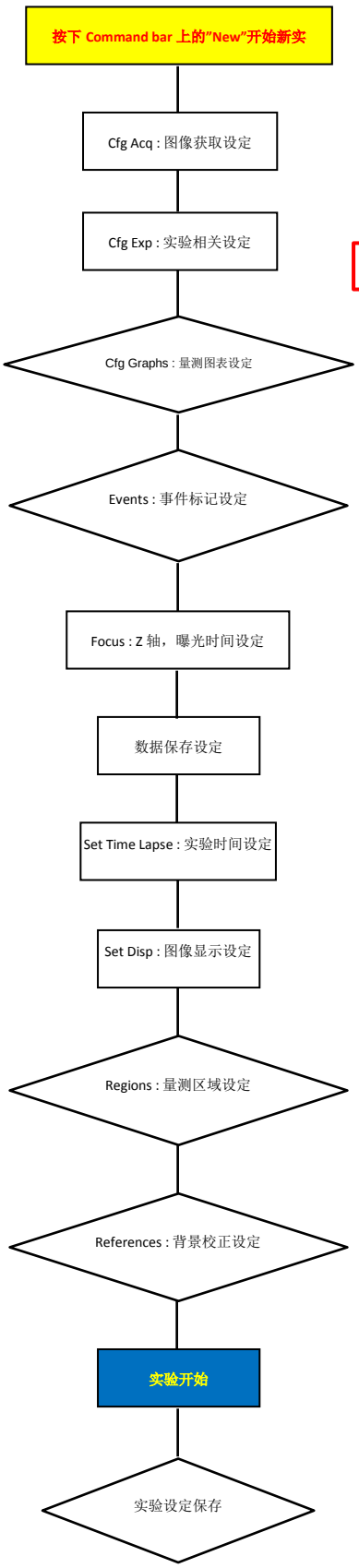
MetaFluor 图像获取实验操作流程



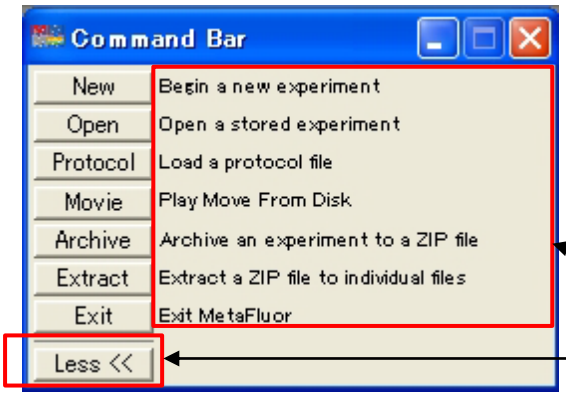
MDC MetaMorph team(1/15)

Molecular Devices

Step 1



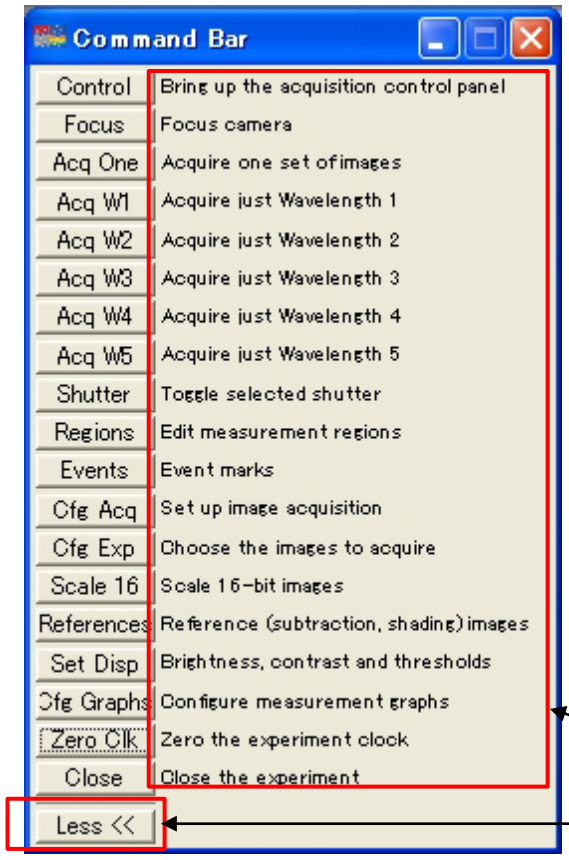
按下 Command bar 上的"New"开始新实验



各按钮功能说明，可使用 Command bar 下方 More/Less 按钮显示/隐藏说明

MetaFluor 启动后，会在画面左上方显示 Command Bar 选单，如果要进行新的实验，可按下 New 按钮，就会显示以下的选单。

如果想使用之前保存实验的设定条件（**参考 Step 13**），可按下 Protocol 按钮进行读取。



各按钮功能说明，可使用 Command bar 下方 More/Less 按钮显示/隐藏说明

接下来按照 Command Bar 中个按钮的操作顺序进行说明

Molecular Devices

Step 2

按下 Command bar 上的"New"开始新实验

Cfg Acq : 图像获取设定

Cfg Exp : 实验相关设定

Cfg Graphs : 量测图表设定

Events : 事件标记设定

Focus : Z 轴，曝光时间设定

数据保存设定

Set Time Lapse : 实验时间设定

Set Disp : 图像显示设定

Regions : 量测区域设定

References : 背景校正设定

实验开始

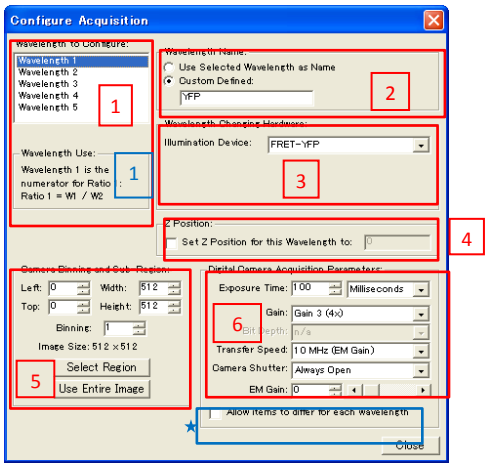
实验设定保存

Cfg Acq: 图像获取设定

Configure Acquisition 包含波长设定(Illumination Device),曝光时间(Exposure time),图像获取区域(Camera Binning and Sub-Region)设定。

按下 Command Bar 上的 Cfg Acq 按钮即可开始设定。

※Digital Camera Acquisition Parameters 中的内容会因使用相机不同而改变



1 目前选取 Wavelength1, 在对话框 1 的地方显示波长相关的 Ratio 计算式
Ratio1=Wavelength1/Wavelength2 (ex.W1:fura2 340nm/W2:fura2 380nm)
Ratio2= Wavelength4/Wavelength5 (ex.W4:FRET CFP/W5:FRET YFP)
Wavelength3 主要可以用来作 DIC 单一波长图像的获取作为对照。

2 可在 Custom Define 栏位中填入选取波长的自定义名称，在实验中该波长都会以此名称显示。

3 选择目前选取波长使用的 Illumination 设定。

4 设定目前波长的 Z 轴焦距，可针对不同波长设定相对应的参数，对于不同波长之间焦距不同的情形非常方便。
(MetaFluor 需包含 Z 轴控制驱动才能依照用户设定数值进行自动控制)

5 Binning 和图像获取区域(Sub-Region)的设定。按下 Select Region 后，系统会获取一张图像，让用户选取获取区域。
Use Entire Image 表示使用相机最大有效像素。

6 Exposure Time, Gain 值等相机参数设定。

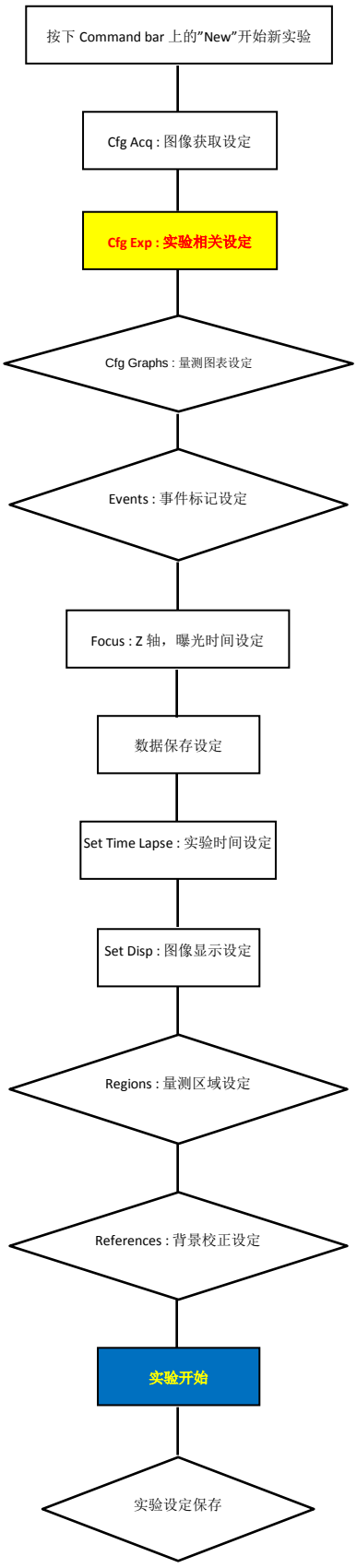
以上设定完成后，下一个波长也按照 2 3 4 顺序设定。

※如果勾选 Allow items to differ for each wavelength，可以针对不同波长更改 Digital Camera Acquisition Parameters 内的参数(曝光时间，Gain 值等)

在 Step 6 中，Focus 按钮对话框中也有变更波长相机参数的选项，如果此步骤已针对各波长设定好参数，进行 Step 6 时请不要再变更保存。

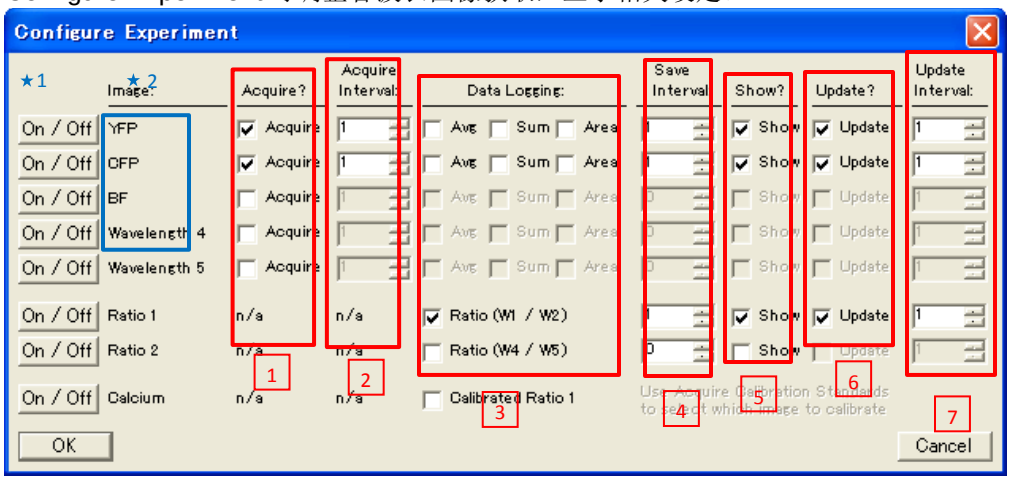
Molecular Devices

Step 3



Cfg Exp: 实验相关设定

Configure Experiment 可调整各波长图像获取，显示相关设定。



1 图像获取(勾选代表获取该波长图像)。

2 图像获取间隔。1 表示每次都获取，2 表示每两个时间点获取一张，以此类推。

3 Experiment Control Panel 中(Step 7)Log Data 要输出的数据，可选择输出图像中感兴趣区域的 Avg(平均光强度)，Sum(总光强度)，Area(面积)，以及 Ratio 值。
感兴趣区域可在 Regions(Step 9)中设定。

4 Experiment Control Panel 中 Save Image(Ratio1,2 为 Save Ratios),保存的时间间隔。

5 是否显示获取图像。

6 是否更新显示图像。

7 更新图像的时间间隔

★1 On/Off 可以快速开启/关闭各波长(Wavelength)设定。

上面例图的设定为 Wavelength 1(YFP),Wavelength 2(CFP)每时间点皆获取图像，保存图像。Wavelength 1(YFP),Wavelength 2(CFP)，Ratio 1(W1/W2)每时间点皆更新显示图像。只有输出(Log)Ratio 1(W1/W2)值

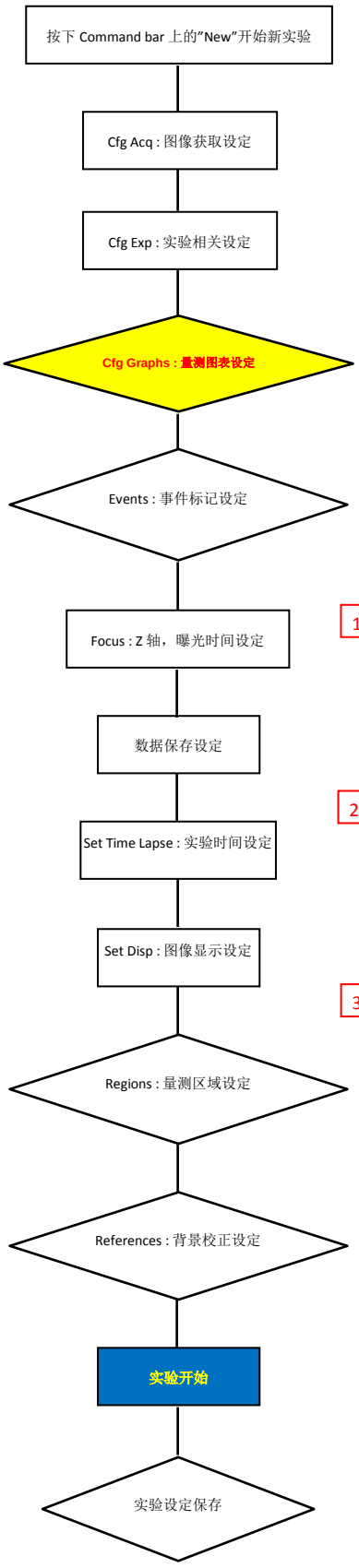
★2 MetaFluor 此处 Image：Wavelength 1, Wavelength 2, Wavelength 3 显示名称为 Step 2 中 2 的用户自定义名称。

参考

需要高速获取图像的实验，建议 5 不要勾选，可以达到较快的图像获取速度。
虽然图像没有显示在画面中，但图像数据还是会被保存在硬盘中。

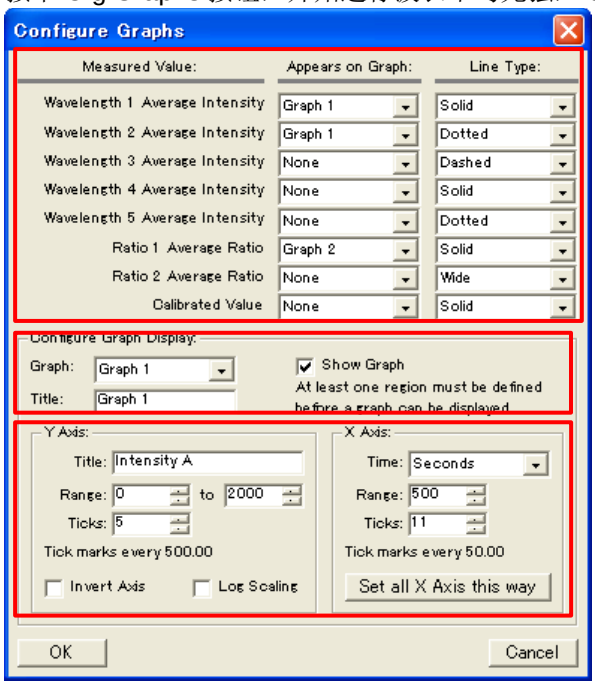
Molecular Devices

Step 4



Cfg Graphs: 量测图表设定

按下 Cfg Graphs 按钮，开始进行波长平均光强，ratio 值，校正值等图表显示设定



1

2

3

1 设定图像上感兴趣领域的平均光强度值，Ratio 值(Measure Value)，显示于哪张图表(Appears on Graph)，图表中曲线的表示类型(Line Type)

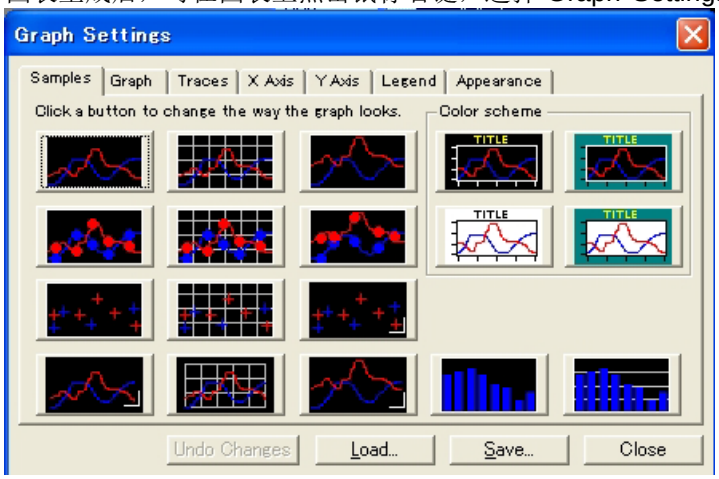
上方的设定为 Wavelength 1 平均光强度以实线(Solid)显示于 Graph 1，Wavelength 2 平均光强度以点状线(Dotted)显示于 Graph 1,Ratio 1 以实线(Solid)显示于 Graph 2。

2 Graph 1,2,3,4,5 的显示设定，可变更图表标题(Title)，以及勾选是否显示图表(Show Graph)。

请注意，若在 1 的 Appera on Graph 中选择了图表，但在此处没有勾选 Show Graph，则图表将不会显示于画面上。

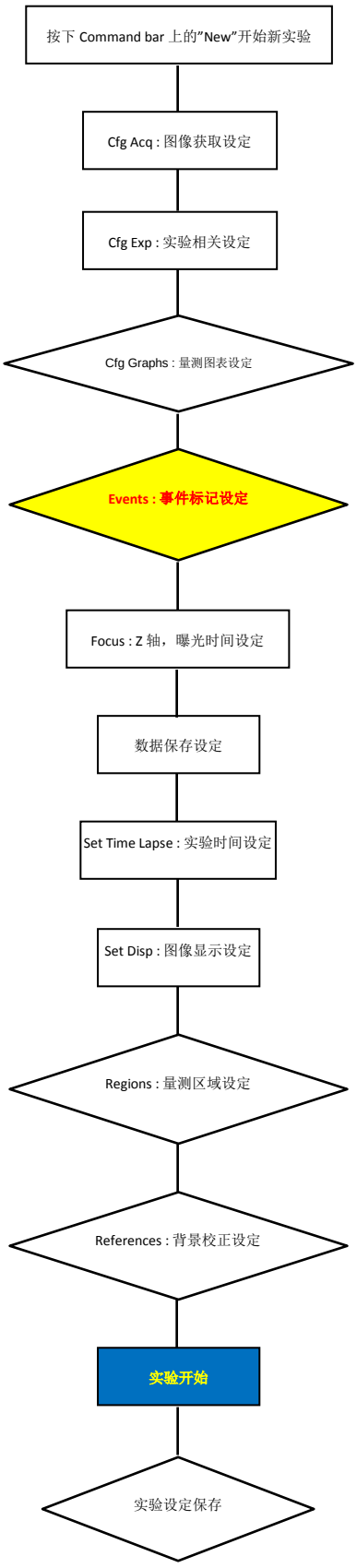
3 设定图表 X 轴，Y 轴参数，包含时间单位(X 轴)，标题(Y 轴)，数据范围等。

图表生成后，可在图表上点击鼠标右键，选择 Graph Settings 进行详细的图表内容设定。



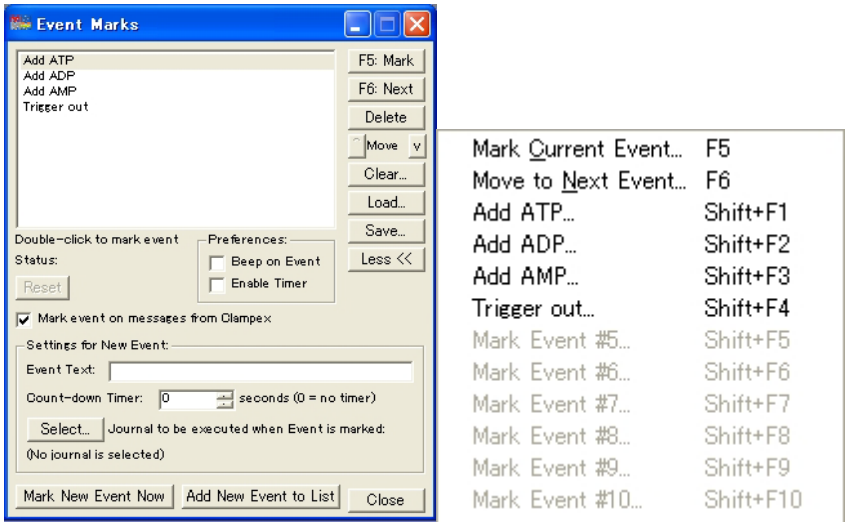
Molecular Devices

Step 5



Events: 事件标记设定

也可从 Run Experiments 菜单中的 Event Marks 执行设定。
在实验过程中如需要对样本进行药物添加，可使用此功能标记加药的时间点。

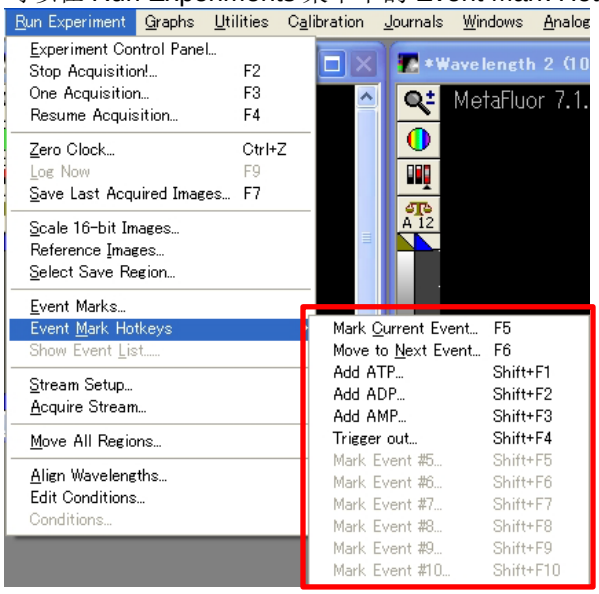


当用户点击 Event Marks 选单中的 Mark New Events Now，可在图表中留下一个事件标记。
事件标记也会被保存在 INF 档案中，在用户回看实验时，也可看到事件标记的重现。

如果实验中的事件超过一项，可以事先设定好事件名称，添加到列表内。
在 Setting for New Events 中的 Event Text 输入事件名称，点击 Add New Events to List 即可在列表中添加新事件。添加后，选取该事件，点击 F5: Mark(或快捷键 F5)，即可在实验中留下该事件标记。

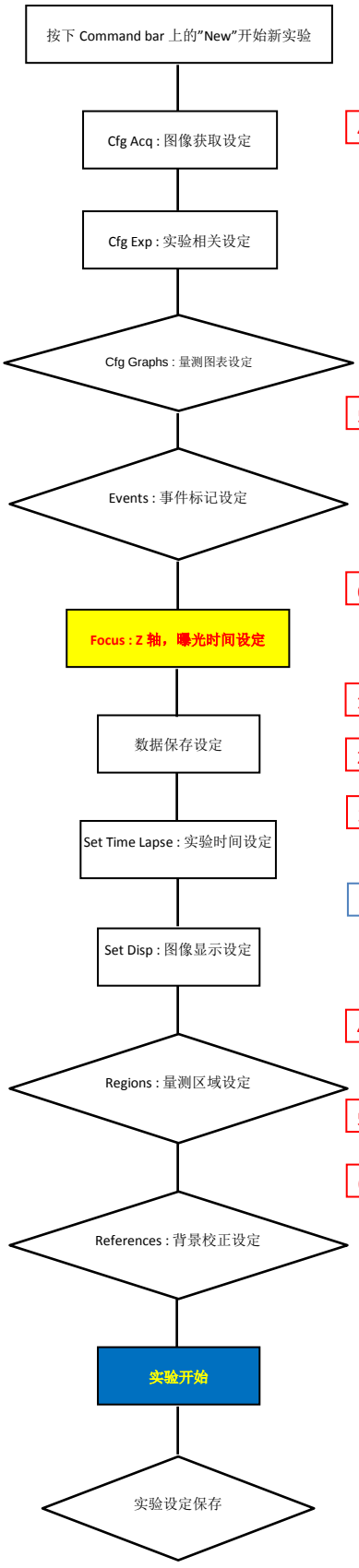
在 Count-down Timer 中可以输入事件延迟秒数，例如输入 5，则会在点击 F5: Mark(或快捷键 F5)后记录该事件。也可为事件设定 Journal，点击 F5: Mark(或快捷键 F5)后执行该 Journal。

可以在 Run Experiments 菜单中的 Event Mark Hotkeys 查看各事件对应的快捷键。



Molecular Devices

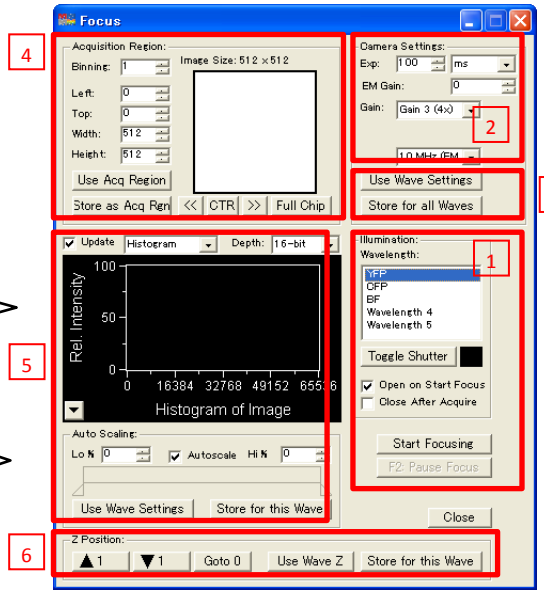
Step 6

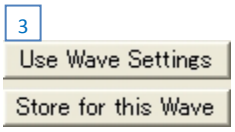


Focus: Z 轴，曝光时间设定

Focus 选单的目的是为了方便使用者设定显微镜焦距。放上样本，调整好 XY 位置后，打开 Focus 选单进行对焦设定。

可点击 Command Bar 中的 Focus，或 Experiment Control Panel 中的 Focus…按钮开启 Focus 选单。





1 选取要设定的波长，按下 Start Focusing 按钮显示 Live 图像。

2 根据 Live 图像以及 5 的 Histogram 图中的强度分布来调整曝光时间以及相机 Gain 值。

3 设定完成后按下 Store for all Waves，会直接覆盖 Configure Acquisition(Step 2)中的设定。按下 Use Wave Settings 则可以读取该波长在 Configure Acquisition 中的设定。

3 如果在 Configure Acquisition(Step 2)中勾选了 Allow items to differ for each Wavelength，3 的显示会由 Store for all Waves 变为 Store for this Wave。可以针对不同波长保存不同曝光时间和 Gain 值。

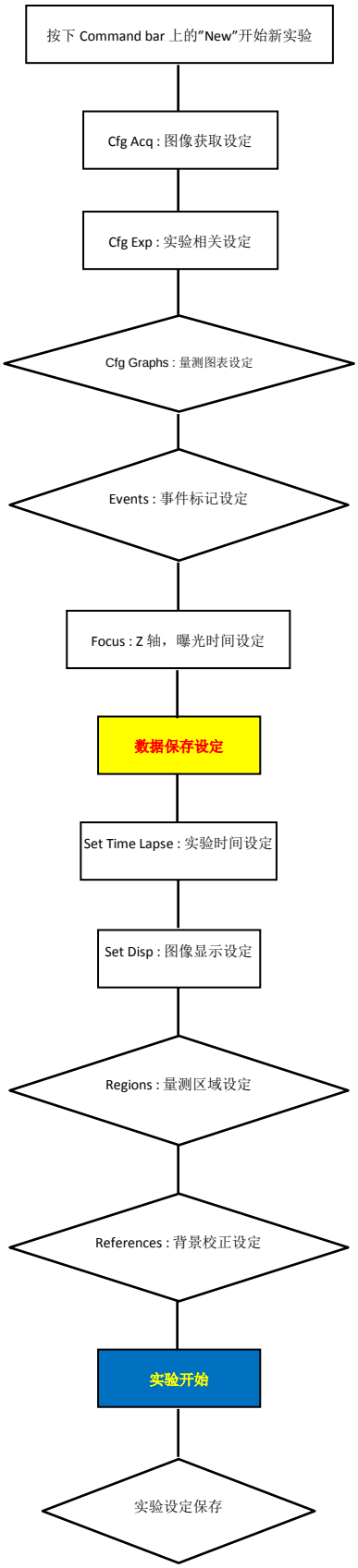
4 设定 Binning，图像获取区域。按下 Store as Acq Rgn 会将目前区域作为实验中的图像获取区域。

5 Live 图像的光强度分布图，可用来作为设置曝光时间的参考。

6 如果为 Z 轴电动显微镜，MetaFluor 中有包含 Z driver，可利用此处进行 Z 轴设定。显微镜 Z 轴位置的上下移动（▲▼），Z 轴归零(Goto 0)。可对不同波长设定相对应的 Z 轴位置，设定完成后按下 Store for this Wave 即可保存设定。按下 Use Wave Z 可读取在 Configure Acquisition(Step 2)中的设定值。

Molecular Devices

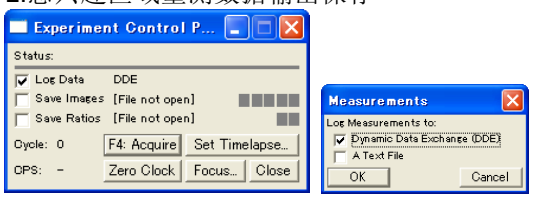
Step 7



数据保存设定

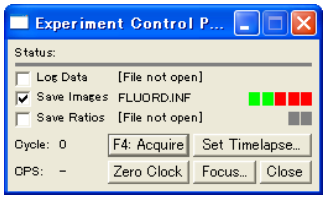
获取图像以及感兴趣区域的量测数据的输出(Log)，保存设定。

1.感兴趣区域量测数据输出保存



勾选 Experiment Control Panel 中的 Log Data，可将感兴趣区域的量测数据输出至 Excel 或文字档。输出数据内容是由 Configure Experiment (Cfg Exp:Step 3) 中的设定来设定(Ave,Sum,Area,Ratio)。
Measurements 中勾选 DDE 输出至 Excel，勾选 A Text File 输出至.log 文字档。

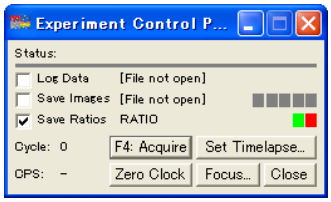
2. 图像获取保存设定



勾选 Save Images 保存获取的实验图像。建议每一新实验，图像都保存在一个新的文件夹中。绿色红色代表图像保存状态，左图状态表示 W1,W2 图像保存，W3,4,5 图像未保存。

＊MetaFluor 的实验图像保存数据管理是使用后缀名为.INF 的文件管理档案。各时间点的图像会以 001 开始的连续后缀名保存。因此实验图像保存的文件夹内含有各时间点获取，后缀名为数字的图像档以及一个.INF 数据管理档案。当使用者移动实验图像保存路径时，需确认.INF 数据管理档案也随图像档案一起移动。

3. Ratio 图像保存设定



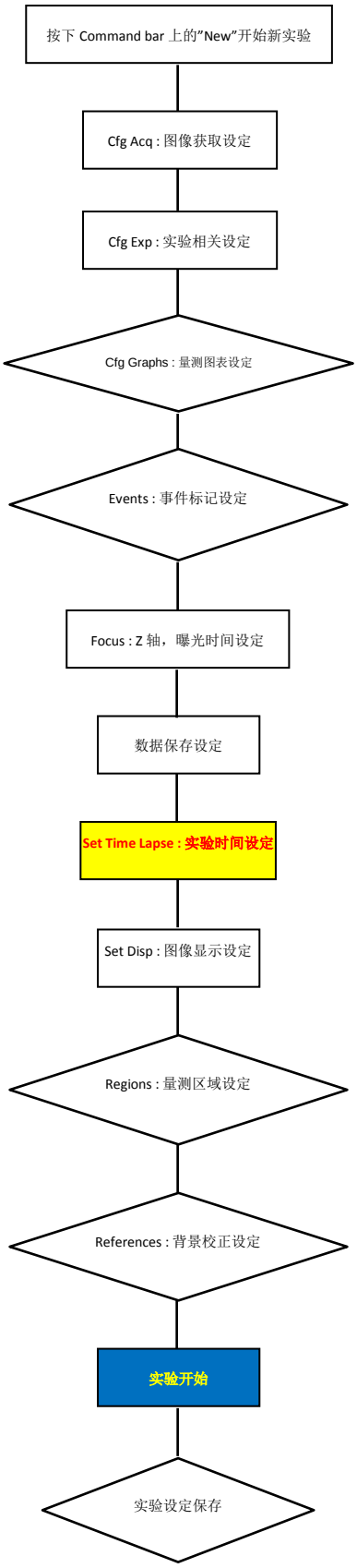
勾选 Save Images 保存 Ratio 图像。建议 Ratio 图像保存在与实验图像相同的文件夹中。绿色红色代表图像保存状态，左图状态表示 Ratio 1 图像保存，Ratio 2 图像未保存。

Ratio 的图像后缀名不是连续数字，而是以.TIF 保存。

＊此处需注意，若未勾选 Log Data 和 Save Ratios，可经由保存的实验图像后续处理得到这两个数据和图像。所以勾选 Save Images 是不可疏忽的步骤。

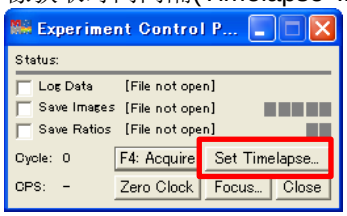
Molecular Devices

Step 8

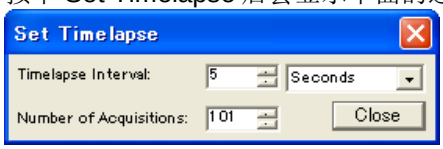


Set Time Lapse: 实验时间设定

按下 Experiment Control Panel 中的 Set Timelapse 按钮对实验的时间序列参数进行图像获取时间间隔(Timelapse Interval)，总获取图像张数(Number of Acquisitions)的设定。



按下 Set Timelapse 后会显示下面的选单。



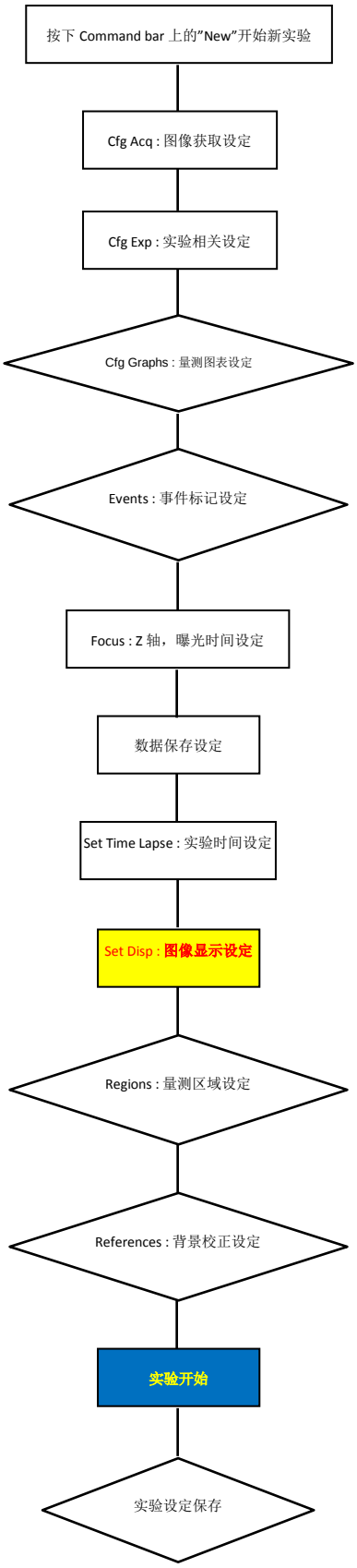
- **Timelapse Interval:** 各获取图像的时间间隔。
  如果设定为 0，会以最短时间间隔获取图像。

- **Number of Acquisitions:** 总获取图像张数。
  如果设定为 0，系统会持续获取图像直到使用者按下暂停(Pause)。

设定完成后按下 Close 即可。

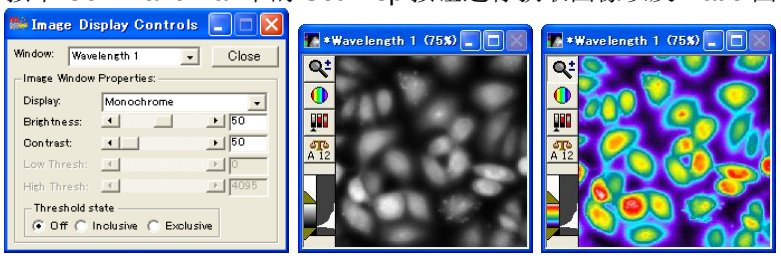
Molecular Devices

Step 9

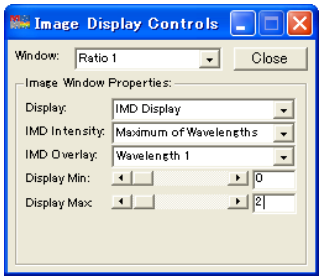


Set Disp: 图像显示设定

按下 Command Bar 中的 Set Disp 按钮进行获取图像以及 Ratio 图像的显示设定。

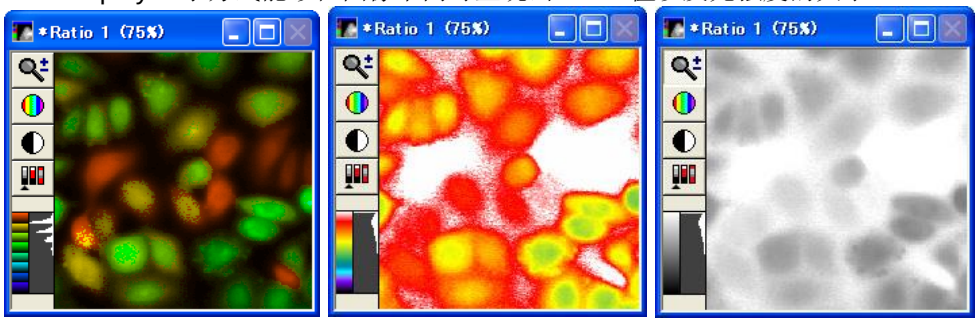


对于各波长获取图像，可以改变图像的显示方式(Display)，Monochrome 或 Pseudocolor， 调整图像的亮度(Brightness)，对比度(Contrast)。



对于 Ratio 图像，可以设定 Ratio 值的最小(Display Min)，最大(Display Max)值，以及改变图像的显示设定(IMD Display, Pseudocolor, Monochrome)。

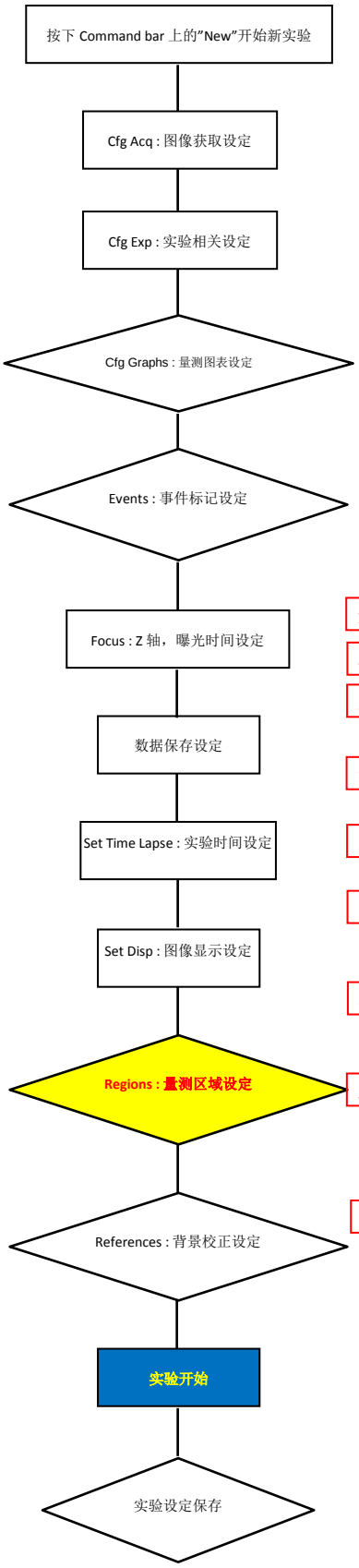
IMD Display 显示方式能够在图像中同时呈现出 Ratio 值以及光强度的大小。



IMD Display　　Pseudocolor　　Monochrome

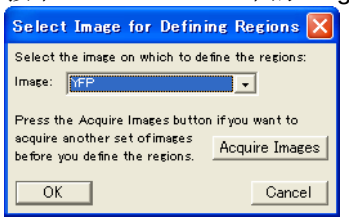
Molecular Devices

Step 10



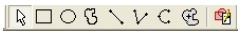
Regions: 量测区域设定

设定欲量测光强度的感兴趣区域(Region, ROI)
按下 Command Bar 中的 Region 按钮，会显示以下选单。

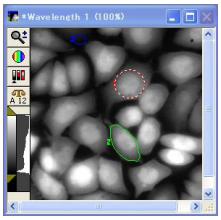


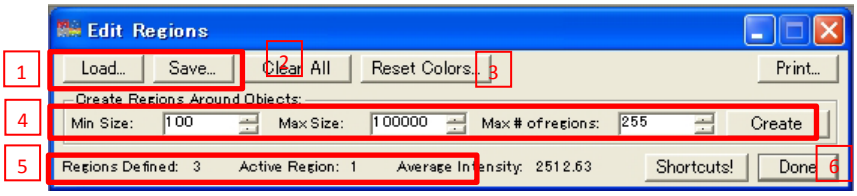
Select Image for Defining Regions 是指用来设定感兴趣区域的波长图像，选取波长后，按下 OK 开始进行设定。如果需要重新获取欲使用的波长图像，先按下 Acquire Images 按钮再按 OK。

按下 OK 后可以使用区域工具在图像上编辑感兴趣区域，可编辑多个区域。



Region Tools





1 感兴趣区域的保存及读取。对象为图像上所有区域。

2 清除图像上所有区域

3 区域是以红色开始，依照顺序产生不同颜色的区域，如按下 Reset Colors，下一个区域会回到开始红色。

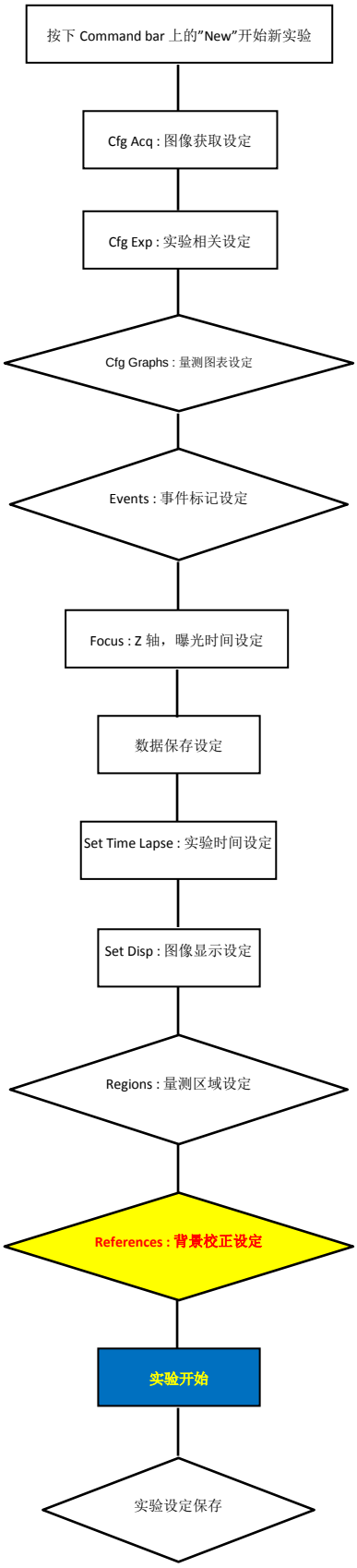
4 若在图像上利用阈值(Threshold)选出区域范围，可设定区域最小(Min Size)，最大(Max Size)面积，以及最多区域数量，按下 Creat 后即可根据阈值建立感兴趣区域。

5 Regions Defined: 图像上区域总数
Active Region: 目前选取区域的编号
Average Intensity: 目前选取区域内的平均光强度

6 区域设定完成后，按下 Done 结束编辑

Molecular Devices

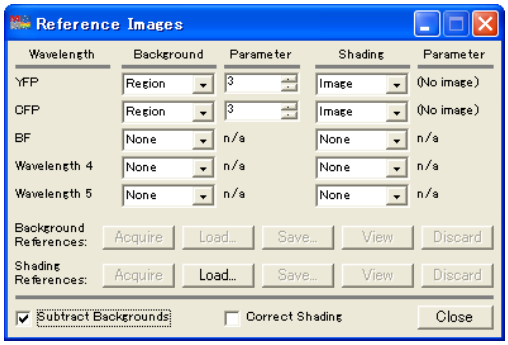
Step 11



References: 背景校正设定

图像背景校正(背景去除，平滑化)设定。在照明不均，样本自发荧光较强的情况下，可使用此功能进行校正处理。

按下 Command Bar 中的 References 进行设定。



各波长图像的 Background 以及 Shading 校正选择。

如果选择使用图像进行校正，可以按下 Load 读取之前获取的校正用图像，或是将标准样本放置于显微镜上，按下 Acquire 获取新图像。

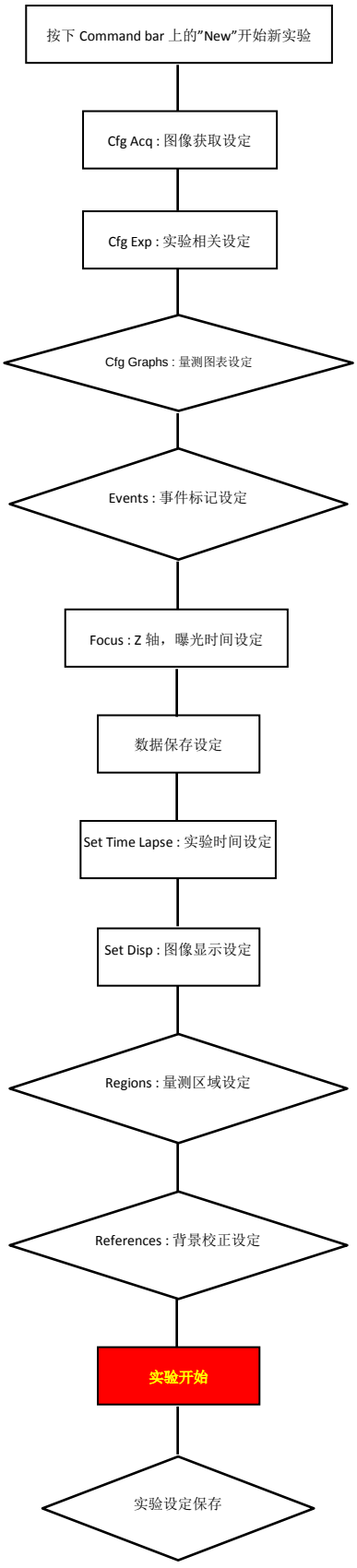
如果选择使用 Region，则 Parameter 内参数为用来作为背景校正的区域编号(从 Step 10 设定的区域中选择一个区域)。
校正方式为图像强度扣除选择区域的平均强度。

上述设定完成后，需勾选 Subtract Backgrounds 以及 Correct Shadings 才会在实验中进行校正。

＊通常在 Step 10 设定区域时，会设定一个背景区域，以供此处使用。上图表示 Wavelength1, 2 使用同一个背景区域(编号 3)进行校正。

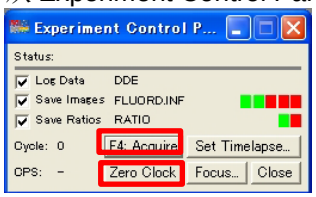
Molecular Devices

Step 12



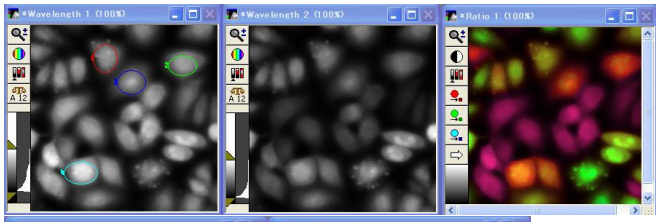
实验开始

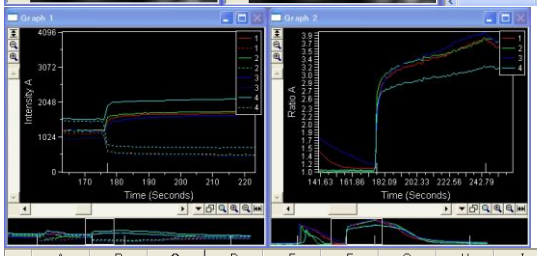
以上设定都完成之后，可以开始进行实验，获取图像。
从 Experiment Control Panel 开始实验。



按下"**F4: Acquire"**开始获取实验图像，"F2: Pause"(按下 F4: Acquire 后显示会改变)停止获取图像。

按下"**Zero Clock"**可以将经过的实验时间归零。同时清除图表(Graph)。此功能适合用来同步使用者实验中的数据采集仪器。



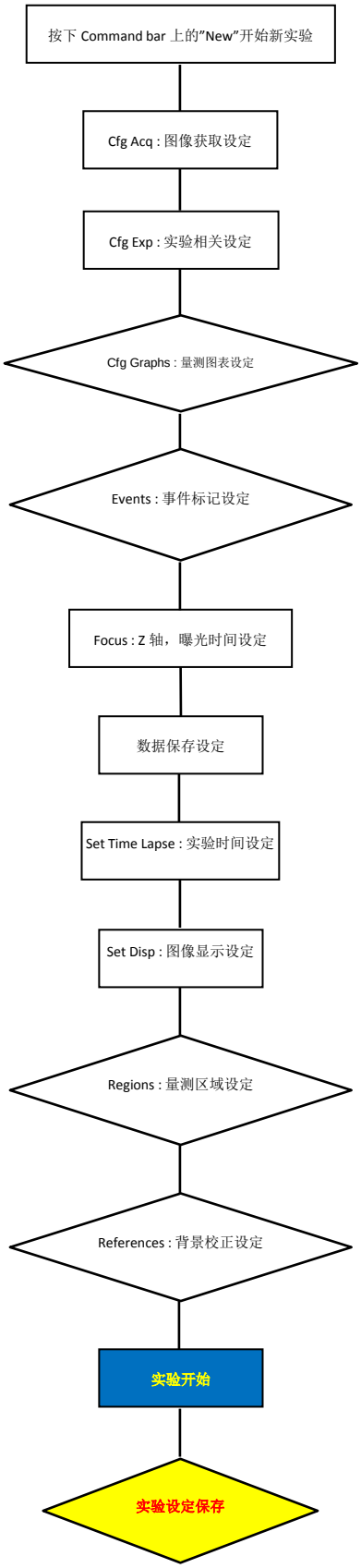


	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	File: DDELog(Excel:[Book1]Sheet11):.								
2	Date: Tue Jun 26 2007 16:27:57.796								
3		0	Wavelength Names:	Wavelength 1	Wavelength 2	Wavelength 3	Wavelength 4	Wavelength 5	
4	Time (sec)								
5		66.65							
6		119.27							
7		122.27							
8		125.27							
9		128.26							
10		131.26							
11	Region 1: [Location: (87, 29), Size: (38, 44), Area: 1292]								
12	Region 2: [Location: (183, 43), Size: (40, 30), Area: 940]								
13	Region 3: [Location: (153, 89), Size: (29, 25), Area: 561]								
14	Region 4: [Location: (68, 128), Size: (30, 33), Area: 770]								
15	Time (sec)	R1	R1	R2	R1	R3	R1	R4	R1
16		0	Clock reset to 0.0						
17		1.04	1.23	1.11	1.14	1.13			
18		4.38	1.23	1.11	1.15	1.13			
19		7.48	1.23	1.11	1.14	1.13			
20		10.48	1.24	1.12	1.15	1.13			
21		13.48	1.22	1.11	1.13	1.12			

开始获取图像后，各波长的图像，Ration 图像，光强度/Ration 图表即开始显示(如有设定显示的话)，并开始输出相关量测结果至 Excel 或.Log 文字档。

Molecular Devices

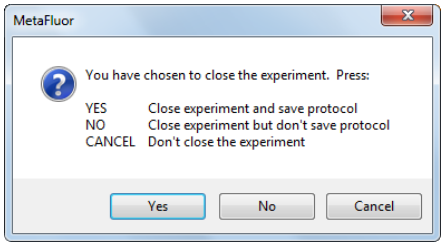
Step 13



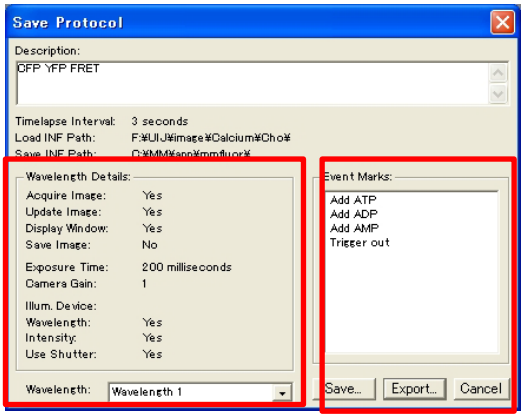
实验设定保存

实验结束后，按下 Command Bar 上的 Close 结束整个实验。
按下 Close 后，会显示下面的对话框，询问是否保存此次实验设定。

Protocol 是 MetaFluor 各项实验设定的总称。
如果有保存实验设定，下次想使用相同条件进行实验(曝光时间，各波长设定等)，可以直接读取已保存的实验设定档案，非常方便。



选择 Yes 后，将显示以下窗口



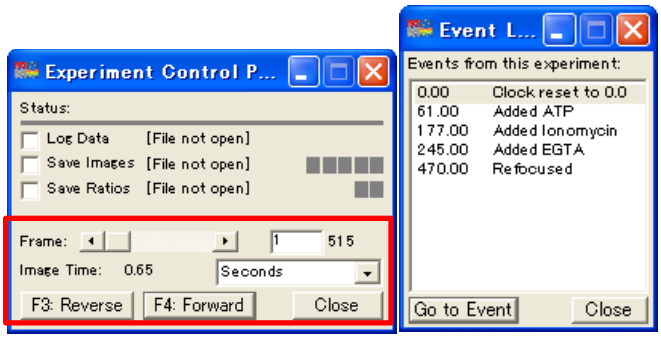
窗口中包含时间设定，保存路径，各波长设定，以及事件标记，可让使用者确认。
事件标记 Export 选项有保存为文字档，复制到剪贴板以及直接打印。

若之后想要读取保存的实验设定，在 MetaFluor 开启时按下 Command Bar 上的 Protocol 按钮即可选择欲读取的设定档。请参考 Step 1

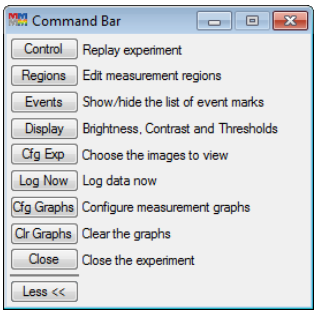
实验结束后，回看实验图像数据

开启 MetaFluor 后，按下 Command Bar 上的 Open 或 File 选单中的 Open Experiment 可读取回看保存的实验图像，图表。
按下 Open(或 Open Experiment)后选择.INF 实验数据管理档后再按下 Open，将完整实验图像读入 MetaFluor 中。

读取.INF 档案后会开启 Experiment Control Panel，如果实验中含有事件标记，也会显示 Event List。



Frame: 目前为第几张图像。
Image Time: 获取图像的时间。
”F4: Forward”, ”F3: Reverse”, ”F2: Pause”可以控制图像的播放。



因为原始图像被完整的保存，所以要事后进行编辑或量测都是可行的，包含进行感兴趣区域的再编辑，量测区域的数据并输出，也可调整图像的显示方式等。

在第一张图像设定好数据保存设定(Step 7)以及量测区域设定(Step 10)，之后按下 F4: Forward 即可开始产生结果。

如果想直接前往事件标记发生的时间点，只要在 Event List 选取事件，按下 Go to Event 即可立刻移动至事件标记发生的时间点。