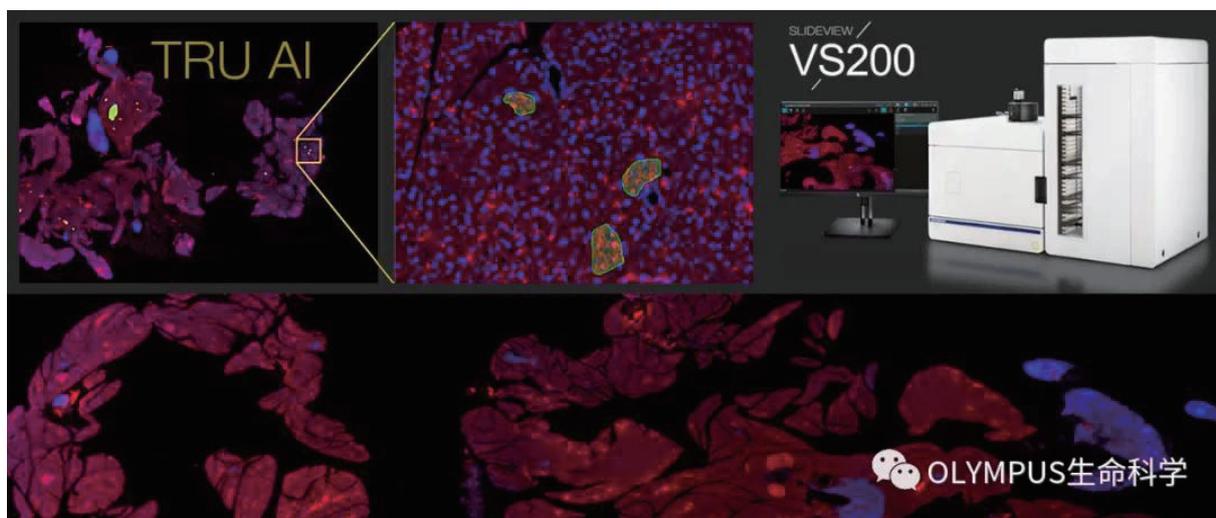


应用案例及操作手册

VS200 研究级全玻片扫描系统

科技前沿 | 真·人工智能替你搬砖

OLYMPUS 生命科学



在研究糖尿病和其他代谢性疾病时，研究人员希望能够分析这些含胰岛素 β 细胞的百分比和相对位置。若要获得研究相关的数据，大批量显微图像分析对于确定胰岛的形态和定量至关重要。这种分析既要定性又要定量，并且必须可靠且客观。

分割方法（如基于阈值的算法）无法专门用于检测胰岛。同时，在标记胰岛的 Alexa 594 通道中还检测到红细胞的自发荧光，因此很难自动将胰岛（绿色圆圈） β 细胞的标/记与充满红细胞的血管（蓝色圆圈）区分开。

生物学小常识：

胰腺具有两个主要功能：

分泌酶以分解食物中的蛋白质、脂质、碳水化合物和核酸（外分泌）。

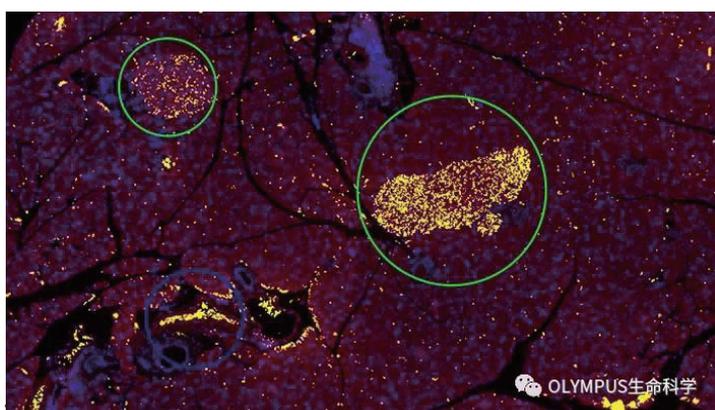
分泌控制血糖水平的胰岛素和胰高血糖素（内分泌）。这部分与糖尿病有关。

胰腺中的 β 细胞群（也称胰岛）在胰岛素分泌中起到关键作用。

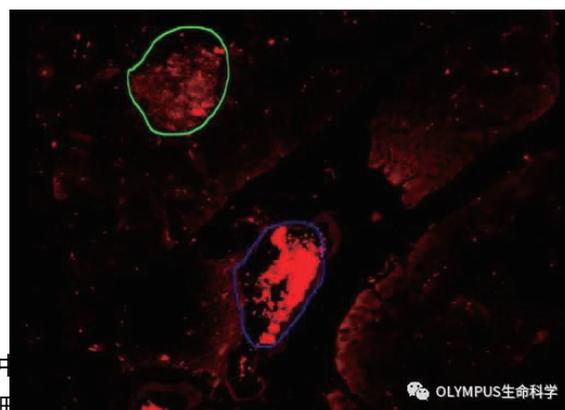
胰岛素通过刺激其他组织的细胞吸收能量，协助降低血液中的葡萄糖含量。

胰岛自动检测与分析的挑战

小鼠胰腺切片样品中的胰岛使用特定荧光抗体实现了可视化。但为了分析这些结构，研究人员通常需要以非常耗时的方式手动筛选胰岛。如下所示的传统自动分割方法（如基于阈值的算法）无法专门用于检测胰岛。同时，在标记胰岛的 Alexa 594 通道中还检测到红细胞的自发荧光，因此很难自动将胰岛（绿色圆圈） β 细胞的标记与充满红细胞的血管（蓝色圆圈）区分开。



10 倍图像，基于常规阈值方法的检测结果（绿色），该方法无法区分胰岛与红细胞（蓝色）。



胰岛（绿色圆圈）；红细胞（蓝色圆圈）

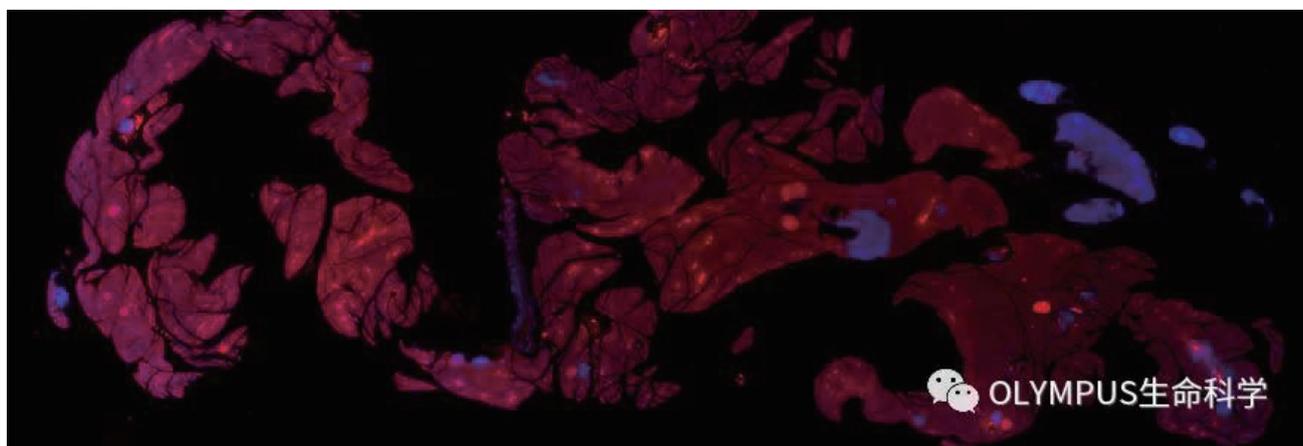
Olympus VS200 整体解决方案

为了提高这一过程的效率，奥林巴斯推出了“SLIDEVIEW VS200 研究级全玻片扫描系统+深度学习”这一解决方案。为了测试该解决方案，我们将其应用于胰岛图像的分割和分析中。



在测试中，我们研究了 CB57BL/6NTac 小鼠胰岛衰老过程中，胰岛的形态和功能变化。实验中使用了胰岛素抗体染色方案制备的小鼠胰腺切片。这种染色可以实现对胰岛内 β 细胞的识别。这些细胞的结构与外分泌部分不同，对应于胰腺的内分泌部分。

使用奥林巴斯 SLIDEVIEW VS200 研究级全玻片扫描系统以 10 倍倍率快速采集了小鼠胰腺样品的数字玻片图像。在最终获得 40 幅图像中，以人眼就可以轻松识别其中的胰岛。

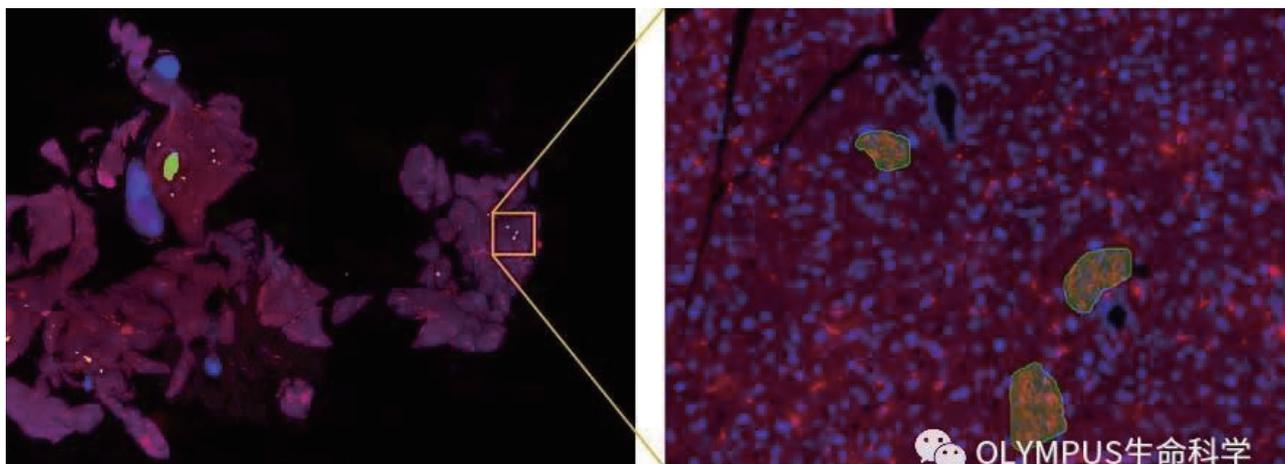


由奥林巴斯 VS200 玻片扫描系统扫描的胰腺切片示例。 红色：Alexa 594 染色第二抗体附着在生产胰岛素的 β 细胞第一抗体上，蓝色：DAPI 复染细胞核。（样品由德国罗斯托克大学医学部医学生物化学和分子生物学研究所的 Simone E. Baltrusch 教授和 Cindy Zehm 博士提供。）

VS200 研究级全玻片扫描系统提供了基于卷积神经网络进行深度学习的 TruAI 模块— 一款用于图像分析的 VS-Desktop 软件插件。它是一种自学习式的显微图像分析方法，可用于对象分割，是一种极其强大的技术。我们可以借助这项技术自动检测此实验中小鼠的胰岛。

利用 TruAI 深度学习解决方案自动对样品进行识别和分析

进行自动分析的第一步，是为软件提供带标注的样品图像（ground truth）数据。这里可通过手动标记十二个不同小鼠胰腺样品（下图中绿色圆圈）的胰岛来实现。



带有手工标记胰岛的荧光胰腺切片

手工标记胰岛的细节（绿色圆圈）

TruAI 使用小窍门：

- 标记的对象越多越好。
- 大量强度、颜色、大小和形状不同的对象可以让神经网络鲁棒性*更佳。
- 插件提供了方便进行手动标记的各种工具。

*鲁棒, Robust 的音译，所谓“鲁棒性”，也是指控制系统在一定（结构，大小）的参数摄动下，维持其它某些性能的特性。

生成标记数据的下一步是训练深度神经网络（Deep Neural Networks, DNN）。

在此阶段，神经网络会将 ground truth 数据与其自身计算数据进行比对，直至其达到较高概率值。计算得出的数据是一种人工智能（Artificial Intelligence, AI），它模仿人类大脑（所谓 DNN）学习、识别结构并做出智能判断。

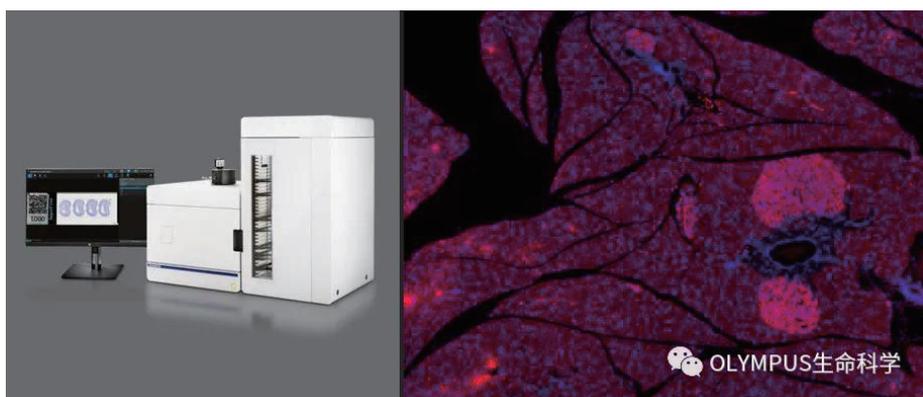
最后一步，将计算出的 DNN 应用于其余胰腺图像，即可实现胰岛的自动检测和分割。

经过训练的奥林巴斯 TruAI DNN 可以传送至任何 VS-Desktop 工作站及其它可兼容的奥林巴斯产品上使用。

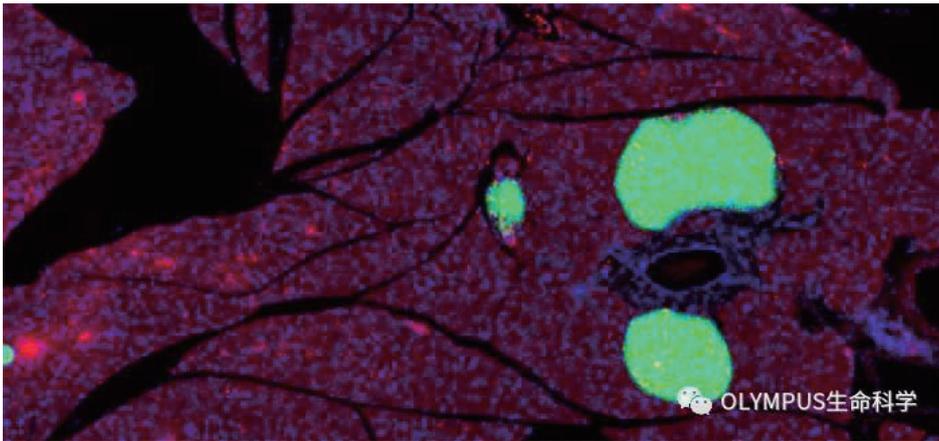
总结：胰岛分割和分析的自动化过程

三个简单步骤：

1. 使用 SLIDEVIEW VS200 研究级全玻片扫描系统扫描新图像。



2. 经过训练的 DNN 对胰岛进行检测和分割。



3. 检测到的胰岛在经过分割后，将被用于进一步的计数和测量分析。



使用配备 **TruAI 深度学习** 解决方案的 **SLIDEVIEW VS200** 研究级全玻片扫描系统，进行胰岛检测和分割的优势：

相比其他现有自动化方法，**TruAI 模块**能够以更高的可靠性和准确性对复杂图像中的胰岛轻松地进行检测和分割。此外，基于分割结果，还可以执行诸如计数和测量等进一步的分析。

SLIDEVIEW VS200 研究级全玻片扫描系统与 **TruAI 深度学习解决方案**相结合，可以应用到生物领域的各类图像，如明场、荧光细胞和组织样品等，提供从样品采集到精确的数据定量分析的完整工作流程。

精准的图像分析自动化，将科研人员从大量繁琐的手动操作工作中解放出来，提高了研究效率。

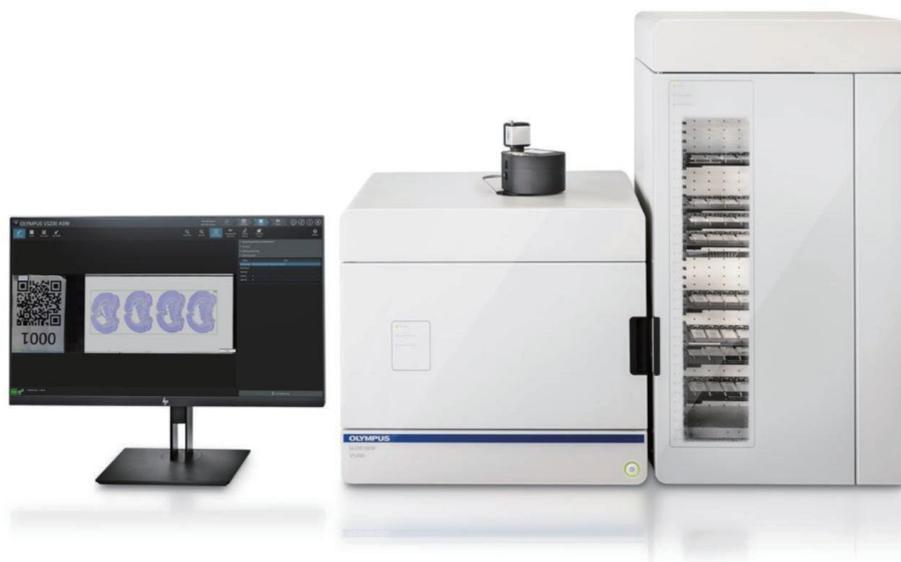


SLIDEVIEW VS200 研究级全玻片扫描系统

- 2 倍到 100 倍，出色的全玻片成像质量
- 兼容各种载玻片尺寸及观察方法
- 从明场到荧光多色标记，简单强大的工作流程
- 从手动明场扫描到 AI 识别和全自动扫描，独特的软硬件配置

高分论文中的奥林巴斯玻片扫描仪： 研究微型真涡虫的再生能力

OLYMPUS 生命科学



引言

在德国德累斯顿的马克斯·普朗克分子细胞生物学与遗传学研究所 (MPI-CBG)，研究人员正在使用奥林巴斯SLIDEVIEW VS200研究级全玻片扫描系统研究微型真涡虫*Schmidtea mediterranea*的再生能力。*S. mediterranea*是研究系统再生生物学最常使用的模型。

使用*S. mediterranea*的好处包括：

1. 能够以较低成本在实验室内保留和维持足够数量的生物样品
2. 近期完成了基因组全部测序
3. 这种模型是当前可以通过RNA干扰 (RNAi) 进行基因功能丧失研究的现有的工具和方法

了解*Schmidtea Mediterranea*的再生能力

MPI-CBG的研究人员正在利用*Schmidtea mediterranea*的非凡特质。即使切成小片，每一片也能够重新再生成为完整且成比例的微型真涡虫。成体干细胞在该过程中起着重要作用，而单个干细胞就可以复原完整的涡虫。

如今，很多研究人员正在致力于了解*S. mediterranea*究竟是如何再生的。向这一目标迈出的重要一步，是第一个高度连续的*S. mediterranea*基因组成功组装，该项研究由MPI-CBG的研究人员与海德堡理论研究所 (HITS) 合作在《自然》杂志上发表。*

该组揭示了存在一个包含新的巨型重复元素和新的扁虫特异性基因的基因组。但不存在被认为对于保持动物存活绝对必不可少的其他基因。这一发现在再生研究、干细胞生物学和生物信息学领域具有潜在的重要意义。

采集*Schmidtea Mediterranea*的高分辨率荧光图像

MPI-CBG的研究人员在研究中利用了玻片扫描系统的强大功能。他们使用VS200全玻片扫描系统采集高分辨率的荧光图像。

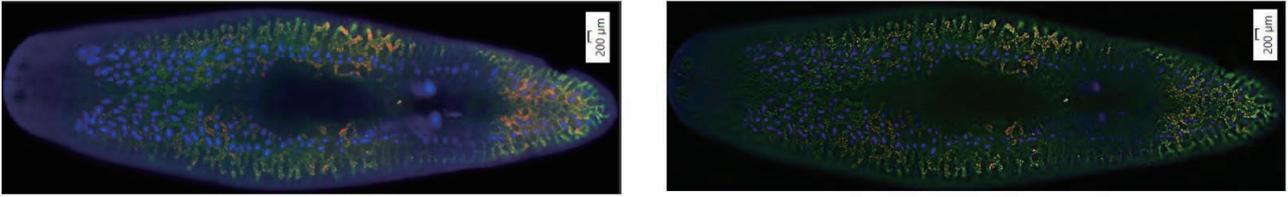
MPI-CBG的Tobias Boothe博士解释说：“奥林巴斯VS200扫描系统不仅让我们能够轻松获取高分辨率图像，而且还具备实时去模糊的功能—TruSight Live。

所制备的标本由于固定在玻片上之前没有进行切割，因此非常厚。该系统的TruSight Live或Z-stack功能对于厚度达到200–300 μ m的标本非常关键。

TruSight Live功能让研究人员能够减少来自焦平面上下区域的散射光。随后，使用特殊的2D反卷积算法再次计算图像数据。这样就可以让图像更加清晰和锐利。

在本研究中，他们将*S. mediterranea*固定在玻片上，并在性成熟个体内的两个卵黄腺标记物中，用原位杂交的方法进行双重荧光（红色和绿色）染色，之后在VS200玻片扫描系统上以10倍倍率进行扫描。另外还采集了使用DAPI的核复染色图像。两种标记物为铁蛋白和表面活性剂b，其均用于涡虫样品中，标记涡虫的卵黄。

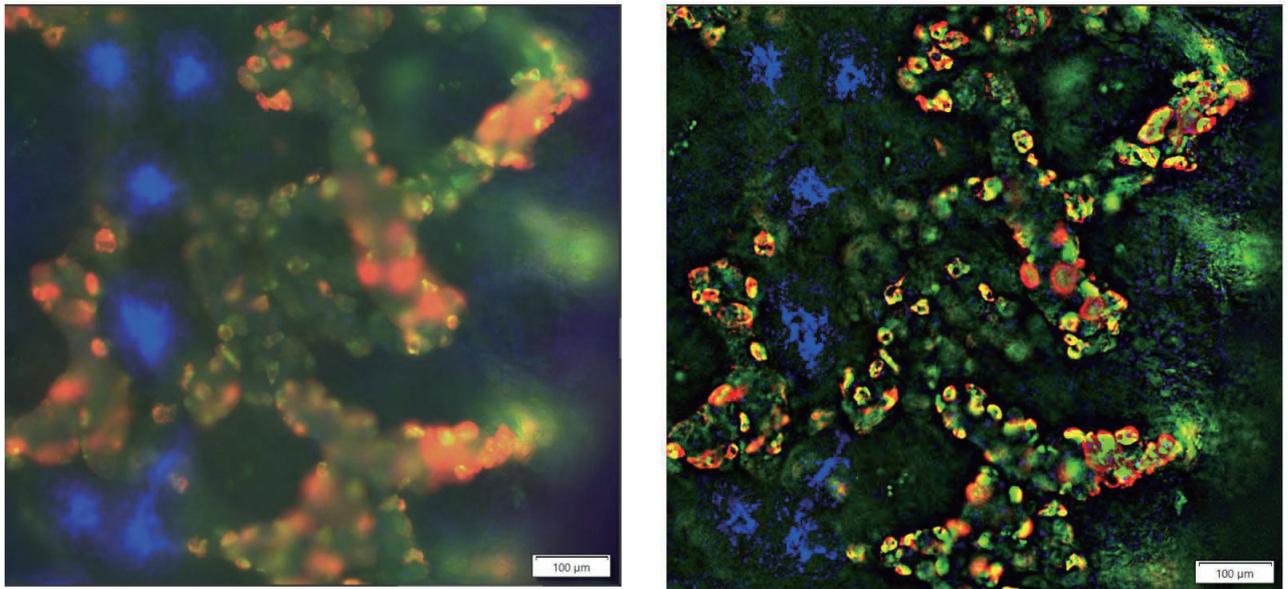
下面的左图为没有使用实时去模糊处理功能的扫描。在右图中，扫描期间对所有三个通道（DAPI、FITC和CY3）应用TruSight Live。



使用双重荧光（红色和绿色）原位杂交染色，并使用DAPI复染，以10X倍率扫描的*S. mediterranea*。左：没有进行在线去模糊处理。右：对所有三个通道（DAPI、FITC和CY3）均应用了在线去模糊处理。由于消除了每个信号周围的耀斑，因此右侧图像比左侧图像更为清晰。样品由MPI-CBG的Miquel Vila-Farré提供。

“对于正在进行的成年涡虫生殖组织丰度与动物再生能力之间关系的研究而言，我们现在所采集的图像和数据成为其重要的来源。为此，我需要诸如表面活性剂B和铁蛋白基因等多种标记物，就像图中所示。” MPI-CBG的Miquel Vila-Farré博士说。

作为TruSight Live功能的替代方案，您还可以获得一个最多包含31个平面的虚拟Z-stack，如下图所示。

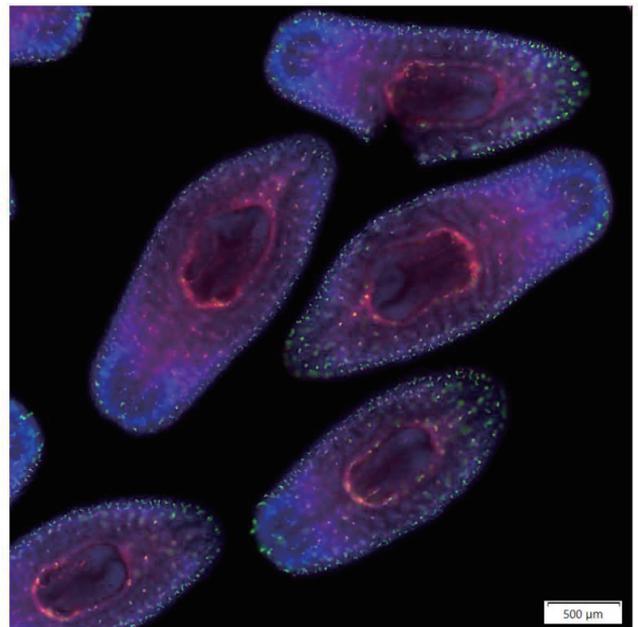


使用双重荧光（红色和绿色）原位杂交染色，并以10X倍率扫描的*S. mediterranea*。左：包含31个平面的虚拟Z-stack。右：一个平面的图像。样品由MPI-CBG的Miquel Vila-Farré提供。

采集图像之后，您就可以通过Z-stack进行平滑聚焦，查看整个样品厚度范围内的信号分布。

在下面的成像示例中，您可以看到在真涡虫*Schmidtea mediterranea*、*Smed-cubillin-1*（FITC，绿色）和一个新基因（*dd_2920*，CY3红色）中两个排泄系统标记物的双重荧光原位杂交。DAPI（蓝色）用于核染色。

“为了比较涡虫排泄系统和脊椎动物肾单位的结构组织，我们使用*Smed-cubillin-1*和*dd_2920*作为标记物分别观察涡虫排泄系统、近端肾小管细胞和过滤细胞的两种不同细胞类型”，来自MPI-CBG的Hanh Vu博士说。



微型真涡虫*S. mediterranea*两个排泄系统标记物的双重荧光（红色和绿色）原位杂交。

结论

奥林巴斯VS200研究级全玻片扫描系统能够采集诸如Schmidtea Mediterranea等特厚样品的高分辨率荧光图像。其TruSight Live和Z-stack功能成为帮助研究人员观察和分析此类较厚样品细节部分必不可少的功能。

致谢

本应用指南的编写获得德国萨克森州德累斯顿马克斯·普朗克分子细胞生物学与遗传学研究所的研究人员，以及德国明斯特奥林巴斯软成像解决方案应用专家Daniel Göttel博士的帮助：

- Tobias Boothe博士，马克斯·普朗克分子细胞生物学和遗传学研究所博士后，德国萨克森州德累斯顿
- Miquel Vila-Farré博士，马克斯·普朗克分子细胞生物学和遗传学研究所博士后，德国萨克森州德累斯顿
- Hanh Vu博士，马克斯·普朗克分子细胞生物学和遗传学研究所博士后，德国萨克森州德累斯顿
- Daniel Göttel博士，应用专家，奥林巴斯软成像解决方案有限公司德国明斯特

参考文献

*Nature; 2018年1月24日 (DOI: 10.1038/nature25473)。

Products used for this application

研究级全玻片扫描系统
VS200



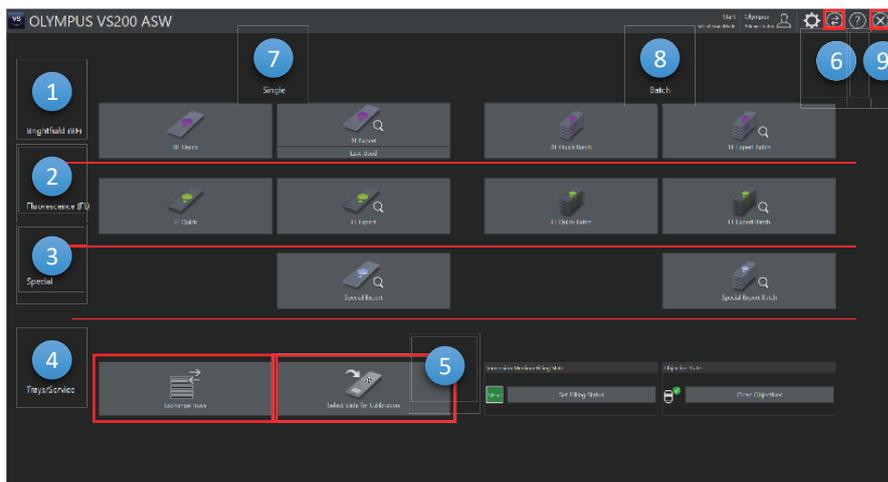
- 2倍到100倍全玻片成像的出色图像质量
- 具有载玻片尺寸和观察方法选择的全面灵活性
- 从明场到荧光多色标记简单强大的工作流程
- 从手动明场扫描到AI识别和全自动扫描均可在软件和硬件进行特别配置

Olympus SLIDEVIEW VS200 用户操作手册

VS200全玻片扫描系统，采用高速电动载物台，配置6片上样适配器或高通量自动上样（210片），高分辨率双相机，专利的阴影校正算法，能够快速实现大组织切片样品的图像扫描、拼接，适合HE、Masson、免疫组化、免疫荧光等多种染色样品的高分辨率大视野全景成像。

一、Home 扫描流程主页

- 1、明场扫描程序
- 2、荧光扫描程序
- 3、特殊观察模式扫描（除荧光）
- 4、装载/卸载载玻片
- 5、标准玻片校准流程
- 6、切换浏览试图
- 7、单张玻片扫描
- 8、批量多张切片扫描
- 9、退出



- Quick快速扫描模式，无法自定义扫描区域、自定义聚焦点，全靠自动识别，适合HE等染色颜色深，玻片清洁的样品； Expert 为专家扫描模式，自动识别样品区域后可人为确认并修改，适合所有样品。

二、简要图像扫描流程

• 装载/卸载样品

- 1、装载载玻片
- 2、装载载玻片，选择对应型号的托盘，注意标签的方向，载玻片靠右放置平整，盖玻片朝上
- 3、将托盘水平推入样品台，机身指示灯亮，点击软件确认

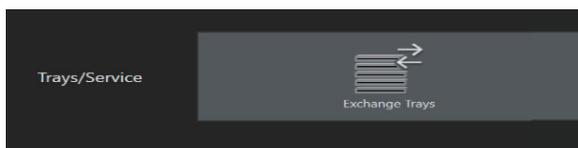


图 1



图 2

• 明场专家扫描模式

- 1、在扫描主页选择扫描模式
- 2、明场扫描，以单个载玻片 Expert模式为例
- 3、点击 BF expert 进入扫描流程（图3）

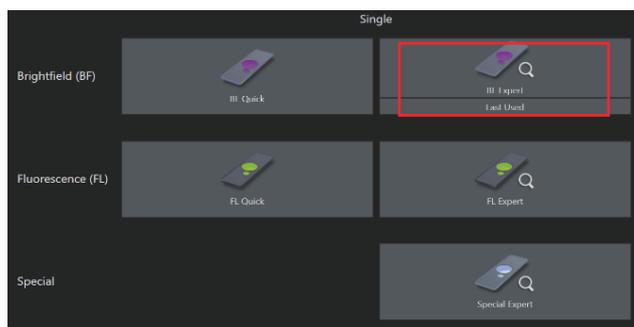


图 3

Olympus SLIDEVIEW VS200 用户操作手册

4、选择已有或常用的项目（参数后续步骤也都可以修改），点击右下角编辑预览图，进入下一步（图4）

5、选择需要扫描的载玻片位置（图5），右侧工具栏设置标签扫描、预览区域大小、自动保存文件夹位置（红框内可设置对放大图生成单个新文件），点击右下角扫描预览图（图5）

6、系统自动识别染色区域，右侧窗口Detail magnification，设置扫描倍数和Z轴模式（图6）

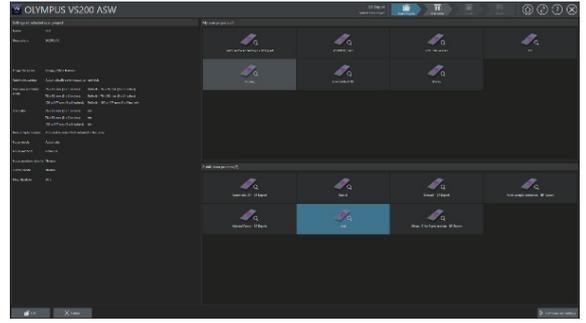


图 4

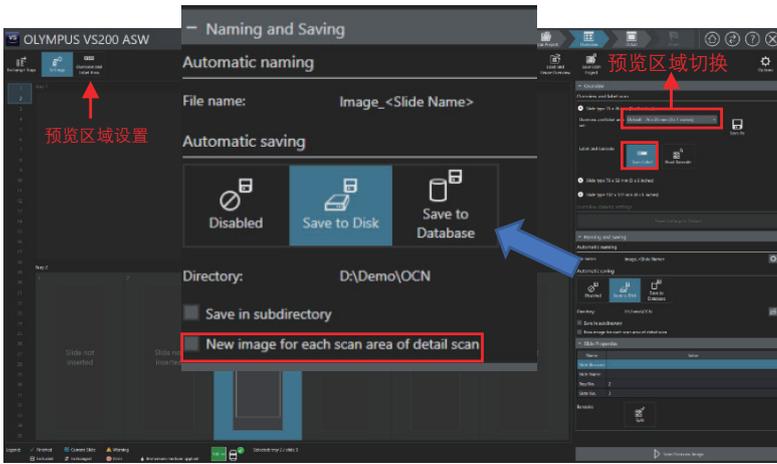


图 5

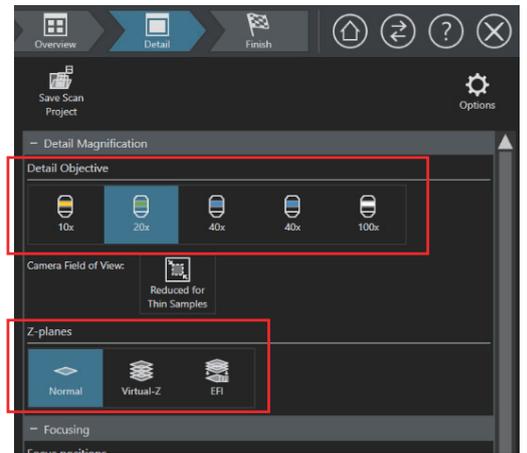


图 6

7、双击预览图或者点击Scan Areas进行扫描区域设置（图7）

8、Scan Area菜单栏：图（8），设置扫描区域大小、形状；Sample detection菜单栏：图(9)自动识别样品的灵敏度

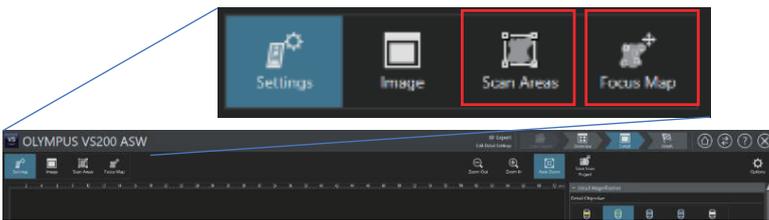


图 7

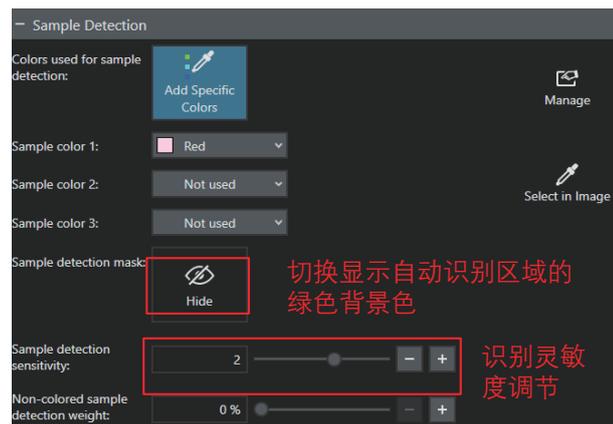
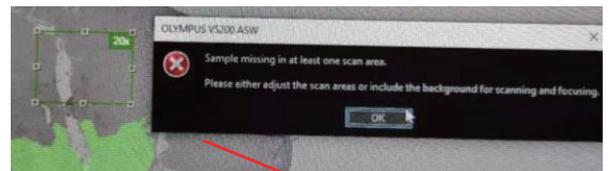


图9



图8

Olympus SLIDEVIEW VS200 用户操作手册

- 9、Focus Map设置聚焦模式、聚焦点密度，图像上点击增删聚焦点（图10）
- 10、设置完成，右下角下一步，手动调焦（Ctrl+滚轮）或自动对焦进行扫描
- 11、完成扫描，可以继续Add Scan或结束，如果后期还有类似扫描需求，Save Scan Project，保存扫描流程（图11）

图10

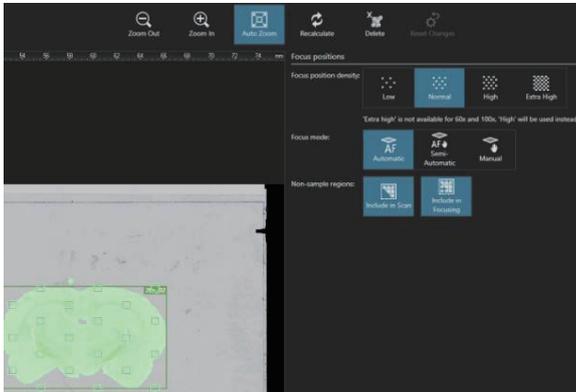
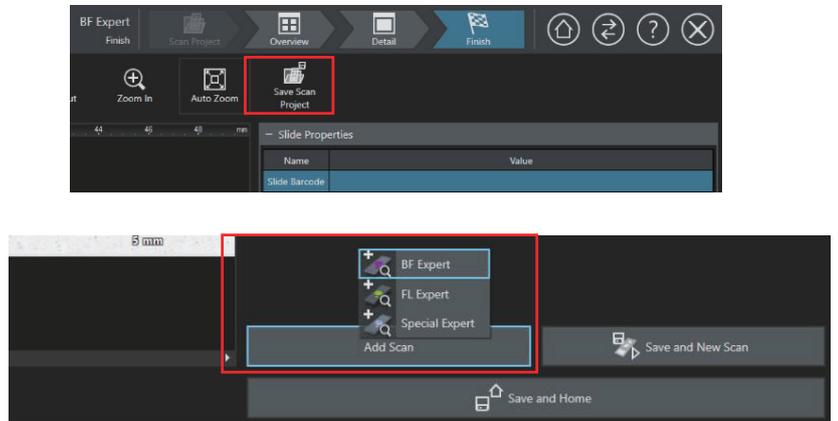


图11



◆ 荧光专家扫描模式

- 1、选择荧光专家模式，流程与明场类似
- 2、选择通用的扫描流程，点击右下角下一步，进入预览图设置界面，
- 3、选择扫描玻片位置，设置预览图扫描模式，一般明场、荧光（透明度高的样品）（图12），设置保存位置，右下角编辑预览图，开始扫描预览图

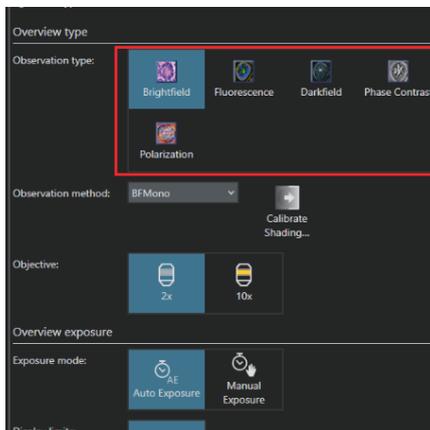


图 12



图 13

- 4、细节放大菜单栏，设置放大倍数，Z轴模式，通道选择
- 5、Manual Exposure，start live预览图像，点击左侧载物台导航，移动样品区，结合调节显示窗口，分别进行每个通道曝光时间的确定（图13）
- 6、双击预览图或Scan Areas进行扫描区域设置，Focus Map设置聚焦点
- 7、如手动聚焦则点击右下角开始聚焦，进行手动聚焦（Ctrl+鼠标滚轮），聚焦通道为第一个通道
- 8、完成扫描可继续Add Scan或结束，后期有类似扫描需求，Save Scan Project，保存扫描流程

◆ 批量扫描

1、分为quick和expert两种模式，

- Quick模式，根据所选的载玻片(1、2、3号...), 按照1号扫描预览图、细节放大图，再到2号预览图、细节放大图的顺序依次扫描，且一旦扫描开始，无法手动设定扫描区域、修改聚焦点位置。
- Expert模式，根据所选的载玻片(1、2、3号...), 第一步完成所有载玻片的预览图扫描，完成后，可手动设置每张载玻片的细节扫描区域的大小，聚焦点的位置，以及荧光的相关参数，第二步，根据手动确认结果，进行细节精细扫描。

2、批量扫描全程自动对焦，不允许手动对焦

3、定义需扫描的载玻片，如图



3-1、定义 define batch content，选择需要扫描的载玻片，右下角确认

3-2、应用同一参数，该按钮选中，状态，则所有玻片参数设置成一样。

3-3、独立设置参数，该状态选中，则只设定单一玻片参数

3-4、Transfer Setting，复制某个载玻片参数到其他

3-5、建议在Overview步骤，设置好相关参数，如物镜、Z模式、对于荧光扫描，建议用单张玻片，单片扫描的模式摸索荧光通道和曝光时间参数，保存扫描项目，再进入批量扫描调用扫描项目

4、后续扫描区域、对焦点的设置方式，如单片模式，参考前两页内容

Olympus SLIDEVIEW VS200 用户操作手册

三、图像批量转换与导出图层

- 批量导出、转换图像格式

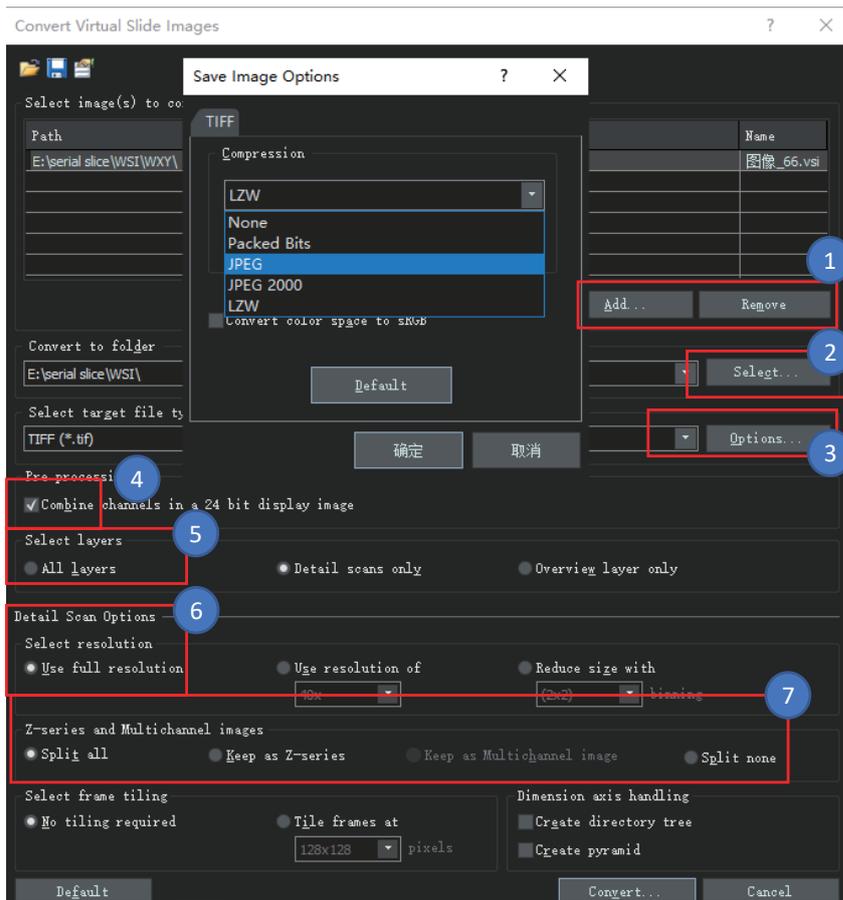
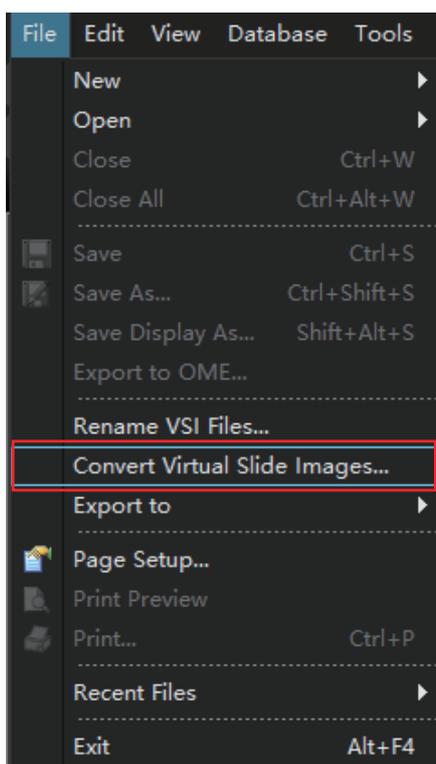
VS200-ASW + VS-convert插件
VS200-DESKTOP

- 1、添加、移除图像
- 2、导出保存路径
- 3、文件格式、压缩
- 4、合并成彩色图像
- 5、选择要导出的层
- 6、像素合并、压缩
- 7、拆分通道（与4无法同时使用）、拆分Z

虚拟载玻片图像一般尺寸很大，建议裁剪后、压缩导出，或存储为原始VSI格式或JPEG格式，否则易出现图像过大、无法保存、打开等情况

后期分析建议直接打开原始VSI格式

如Fiji等软件



注：JPEG最大：65535×65535 像素

Tiff最大：4G

Olympus SLIDEVIEW VS200 用户操作手册

四、VS200图像文件离线浏览与存储指南

说明:

- 1、VS200原文件后缀为vsi,且有一个与其同名(前后各下划线)的文件夹,拷贝、剪切,请同时移动,且名称要对应,如改名请同时修改vsi文件和文件夹,注意下划线,如图。
- 2、VS200-ASW为图像采集软件,包含少量分析处理功能,VS200-Desktop软件为专用分析软件,OlyVIA软件为离线图像浏览软件,支持Olympus所有系统的原始图像,软件浏览图像视图界面三个软件基本一致,以下皆可参考。



常用操作:

1、文件打开

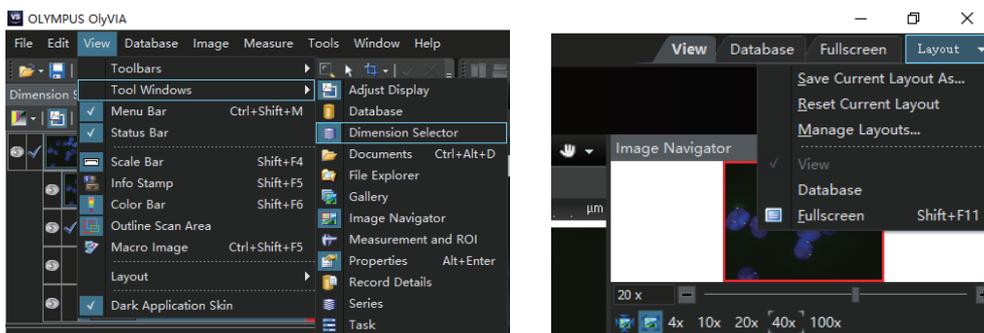
1.1 File-open, 或直接拖入软件浏览窗更快捷方便, 支持Olympus所有原始格式图像, 以及Tiff\jpg\png

1.2 File-recent files, 可以快速打开历史文件

2、窗口布局以及功能窗口

2.1 View-Tool window 可以找到并打开所有功能窗口, View-ToolBars 工具条类似

2.2 右上角Layout 能够自定义保存、调用、一键还原窗口布局和排列形式



3、图像缩放、移动、导航

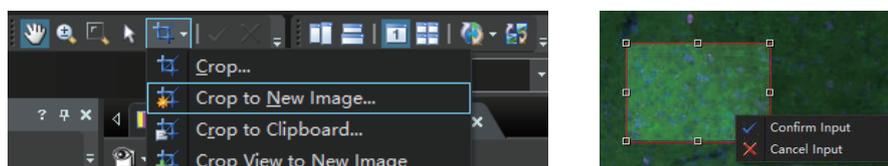
3.1 鼠标停留在图像上, 或image navigator窗口, 滚轮缩放, 或选择放大倍数

3.2 图像移动, view-toolbars-toolbox,打开toolbox工具条, 选中“手掌”图标

4、图像裁剪(用于vsi原始格式或无压缩Tiff的保存, 后期分析和细节展示)

4.1 Toolbox工具条, 裁剪-裁剪到新图像, 左击框选目标视野, 右击确认

4.2 Crop view to new image, 当前视图裁剪为新图像

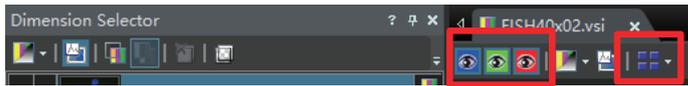


Olympus SLIDEVIEW VS200 用户操作手册

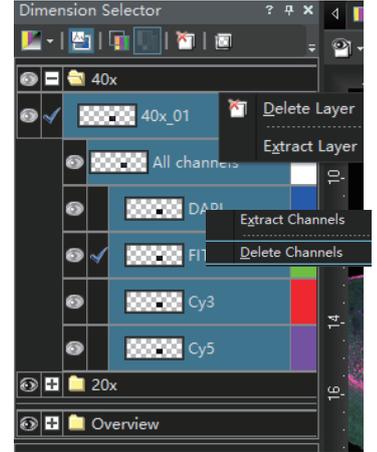
四、VS200图像文件离线浏览与存储指南

5、图层查看/抽取/伪彩色

- 5.1 Dimension Selector窗口，眼睛的图标，显示/隐藏图层
- 5.2 右击图层，如40X_01，Extract layer可单独抽取出该图层
- 5.3 右击通道，如DAPI，Extract Channel可单独抽出该通道
- 5.4 点击通道后颜色条，即可修改荧光通道伪彩色



通道隐藏切换 全通道平铺

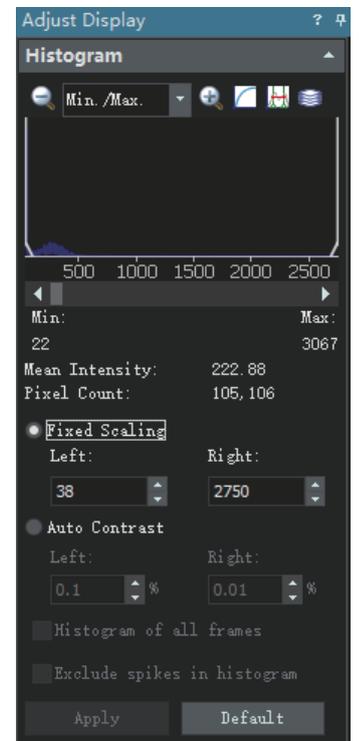


6、对比度调节

- 6.1 adjust display窗口，Fixed Scaling, Left, Right输入显示范围
- 6.2 window工具条，图层同步，同步调节单个文件中的所有层的对比度

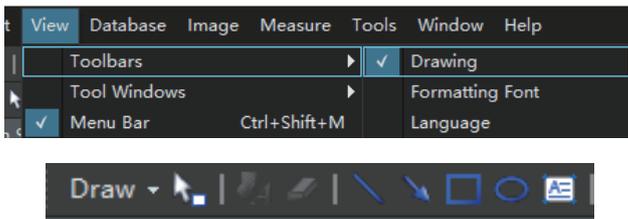


并排显示 单图显示 窗口同步 图层同步



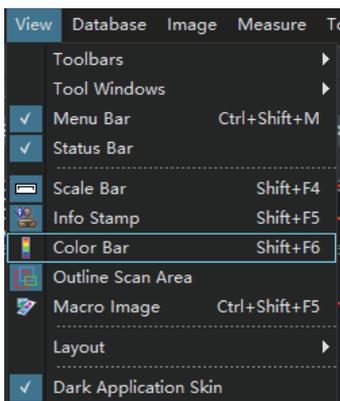
7、图像标注

- 7.1 View-toolbars-drawing，打开绘图工具条
- 7.2 绘图工具条中可进行箭头、区域、文字标注

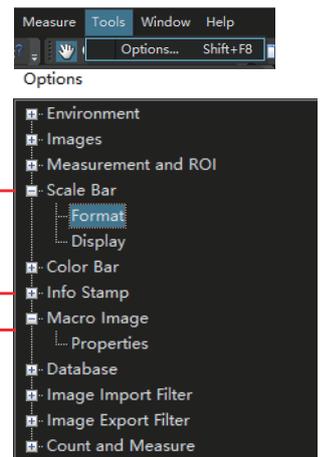


8、图像显示信息

- 8.1 显示标尺、物镜软件信息、预览缩略图等，如右图
- 8.2 修改显示效果，Tool-option窗口，修改标尺等显示效果



切换显示标尺
左小角图像采集信息
切换显示左上角缩略图



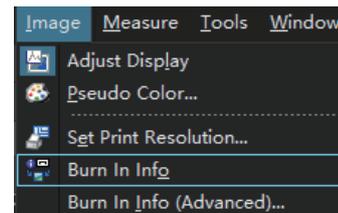
标尺格式
采集信息内容
缩略图效果

Olympus SLIDEVIEW VS200 用户操作手册

四、VS200图像文件离线浏览与存储指南

9、印入信息

9.1 Image-Burn in info 该步骤可将标尺，标注等图层印入原文件，生成单层的RGB彩图，保持原始分辨率



10、感兴趣区域保存

10.1 通过裁剪，保存， VSI\Tiff，适用于图像进一步分析

10.2 通过缩放、找到目标视野， File-Save display as，此操作是截屏，可存储为 Tiff/jpg/png等通用格式，数据量小，适于图像展示

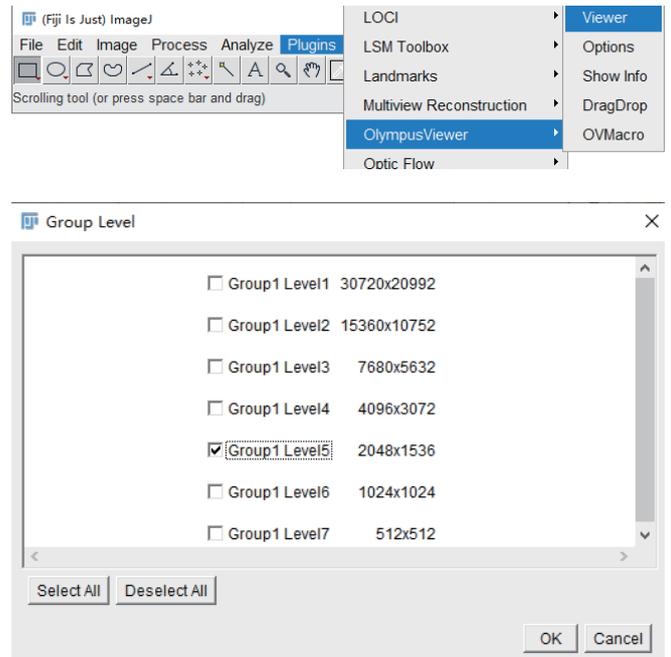
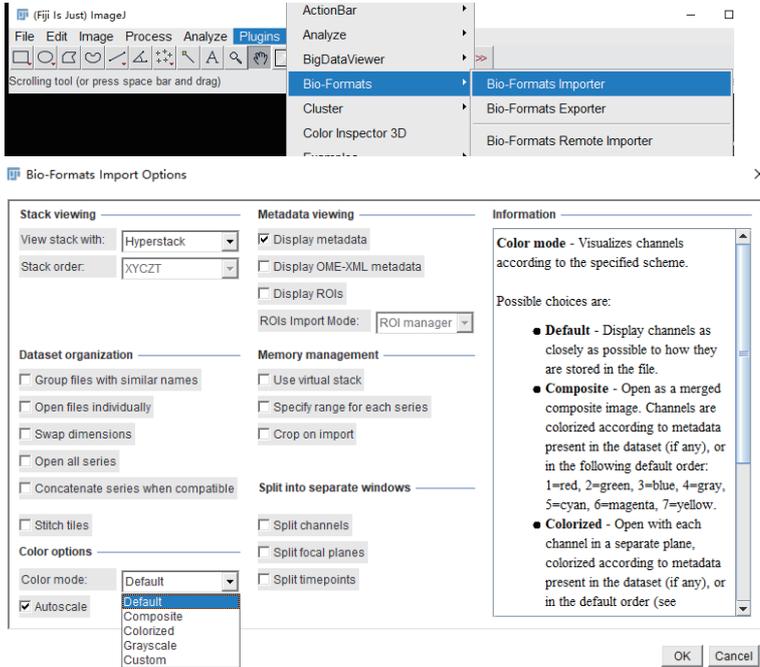
10.3 如果要求分辨率更高，目标视野，裁剪为新图像，印入信息后，文件-保存为TIFF

Olympus SLIDEVIEW VS200 用户操作手册

五、开源软件

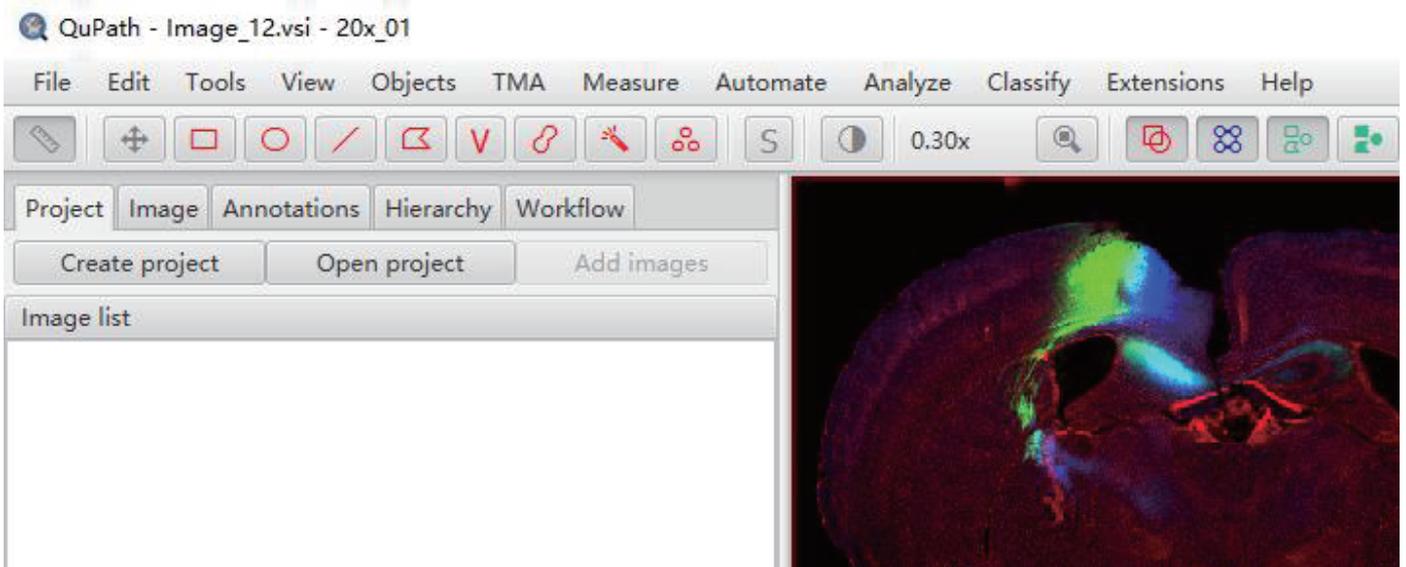
Fiji——更通用型软件

- 利用Bio-formats插件打开 vsi格式明场、荧光图像,
- Fiji 也可以安装OlympusViewer的读图插件, 打开vsi、oir等文件更加方便稳定
- 插件目录 <https://imagej.net/Category:Plugins>



QuPath——更专业面向全组织切片图像的软件

- 图像浏览与分析
- 参考<https://qupath.readthedocs.io/en/latest/docs/tutorials/index.html>



六、仪器操作注意事项

1. 硬件开机后再开软件，关机时，先处理好样品，关软件后，再关硬件
2. 样品需保持干燥、洁净，选择标准厚度载玻片和盖玻片，平稳放置在托盘上，否则易损坏物镜
3. 托盘为精密装置，请平稳安置于台面上进行上样等操作，如有撞击或摔落，极易损坏
4. 荧光扫描注意控制曝光时间，请手动设置，否则荧光样品易淬灭
5. 扫描时注意保持台面平稳，勿碰撞台面
6. 定期清洁物镜
7. 需要备份数据时，请使用已格式化的空U盘或移动硬盘，防止电脑中毒



关注江文科研仪器公众号

Contact

上海江文国际贸易有限公司
上海市徐汇区乐山路 33 号 1 号楼 512 室
电话：021-62822084
邮箱：jgu@jiangwenbio.cn
网址：www.jiangwenbio.cn