Agilent

Trusted Answers

用于光学显微镜的组织学和玻片扫描

应用文集

目录

前言 3

组织学最佳实践 4

样品前处理 4

检测 6

仪器 8

彩色明场和荧光成像在组织学、组织微阵列芯片和玻片扫描中的应用 9

苏木素和伊红染色的组织 9

组织的自动化彩色成像 15

自动化组织微阵列芯片 (TMA) 成像结果证明，应用自动化系统可提高显微成像的通量 22

参考文献 30

前言

当前，组织学和显微解剖学研究不仅在致病模型的靶向设计、层切能力和染色选择性方面不断进步，在样品采集和分析的自动化和计算方法方面也同样如此。组织制备和染色方法的多样性和灵活性使研究人员能够优化其方案，并根据现有的仪器和成像资源对这些方案进行调整。这些染色技术利用固定样品的比色、显色或荧光标记，各自提供对组织成分和生化过程的独特见解。

研究人员通常会遵循组织学的一般实践，但许多人也会修改技术和方案，使其适应目标组织。在整个方案中，必须采取一致的步骤尽可能降低样品间的差异性，以确保重现性。如果观察到染色样品之间存在差异，原因很可能是整个组织学工作流程的处理不够规则。此外，手动评估样品之间的染色差异往往过程繁琐、不准确或在无意中引入偏差。相反，自动成像和确定的参数可以提供准确的比较，从而获得一致的结果和分析。

从固定组织学标本到对其进行染色，以用于光学显微镜检查的方法多种多样，不过，最成功的研究人员会了解哪些方法能提供一致的结果，从而进行可重现的免疫组化分析。此外，图像采集和定量分析技术可以针对高内涵显微镜进行优化。Agilent BioTek 成像系统包括 Agilent BioTek Lionheart 全自动智能成像分析系统和 Agilent BioTek Cytation 细胞成像微孔板检测系统系列，能够轻松实现切片采集的自动化，并创建具有重现性分析程序的保存方案。

本应用文集旨在介绍各种成像分析方法，利用 Agilent BioTek 高内涵成像仪和图像分析软件表征组织学切片和样品的染色表达。

本文集还深入介绍了优化的组织学工作流程，通过推荐从切片到染色，再到成像和分析的最佳实践，降低不同样品间的检测差异。在指定的放大倍率下，使用蒙太奇收集方块，创建单个合成图像，为大型组织成像提供便利，从而有效地比较不同的组织样品。Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件可进行自动化成像分析，从而提供一系列数据参数。Gen5 可以报告一系列读数（如大小、面积和形状），并测量组织切片区域内的信号（像素强度），以测量样品间的表达。

组织学最佳实践

样品前处理

处理组织学样品首先要采集供体或研究动物的新鲜样品。为了保存用于研究的样品，通常用化学固定剂处理标本，通过不可逆交联蛋白维持细胞结构，使组织硬化。固定剂由各种醛类配方组成，如常用的甲醛溶液福尔马林。实验动物的常用固定方法包括：在放血和生理盐水处理后灌注固定剂，使整个器官迅速固定；或在解剖后浸入溶液中，使固定剂扩散[1]。根据组织的厚度，可能需要浸泡更长时间，固定剂才能完全渗透。至关重要的是，既要有足够的固定时间，又要防止样品过度固定，以便在组织学工作流程中进行可行的下游组织处理。样品完成这一过程后，组织可被分为较小的切片，大小与几厘米的小型包埋盒匹配，暴露器官内的目标区域以提高切片效率。

根据样品和免疫染色应用的目标，组织学组织的处理有两种方式。对于可以在较高温度下缓慢处理的组织，石蜡包埋是理想之选，被称为福尔马林固定石蜡包埋样品或 FFPE[2]。如果组织样品具有时间敏感性，并且目的是检查非蛋白成分，或存在酶检测，则可以快速冷冻，而不是在较高温度下进行包埋。

FFPE 标本必须经过脱水过程，使石蜡浸润组织，代替水用于切片。通常情况下，在脱水过程中会使用一系列浓度为 70%–100% 的不同等级乙醇，然后使用二甲苯等溶剂进行几轮脱水，使包埋剂渗透组织样品。免疫组织化学 (IHC) 级石蜡是包埋过程中最常用的石蜡，但如果样品易碎或硬度不够，则有几种替代选择。此外，如果需要进行抗体标记，树脂也会有所帮助。组织样品最好朝向有利的位置，以便在切片时尽量减少组织块在切片机上的调整。

人体样品一旦提取，通常会冷冻，这种情况常见于组织病理学受试者的组织。研究动物的组织和器官也可制备用于冷冻包埋。虽然用于冷冻切片的组织不经过脱水过程，但在包埋前要经过一系列的蔗糖/甘油浓缩处理。在这一低温过程中，固定的组织通常会被修剪至几毫米深，然后嵌入塑料模具内的凝胶状物质中。OCT 包埋剂是由聚乙二醇和聚乙烯醇组成的方便介质，通常用于包埋冷冻样品。在室温下呈凝胶状，便于通过真空去除 OCT 样品介质中的气泡，从而尽可能减少撕裂和下游的切片不良情况。一旦 OCT 复合物暴露在低于 −20 °C 的温度下，介质就会凝固，将嵌入的组织包裹其中。

在制备用于切片的 FFPE 或冷冻标本时，需要在切片块固定在切片机或冷冻切片机前后进行一些调整。对于冷冻样品，将切片机安装在冷冻仓内，为低温切片保持恒温环境。以 90 度角仔细修剪嵌入的组织块，并从组织块表面到包埋盒固定器形成类似于金字塔的斜坡，使组织块的边缘与刀片的长边平行。对切片机或冷冻切片机的样品支架进行微调，确保组织块的表面和刀片对齐，对于石蜡切片，刀片将以带状的形式产生连续切片。然后将组织切成所需的微米级厚度切片（一般为 3–8 微米），并固定在玻片上。在对样品进行染色和检测之前，通常需要去除组织切片的包埋剂。

检测

将样品切片并固定在玻片上后，进行生物组分或过程染色。检测方法有很多，具体取决于研究目的、组织和可用试剂。

比色染色是最古老的科学方法之一，也是常用的组织学分析方法。不同的染色剂和染料具有不同的组织和细胞特异性，用于增加目标特征和细胞的对比度。苏木素和伊红 (H&E) 染色是组织学最常用的标记之一，其中细胞核被苏木素染成蓝色，显示出细胞的位置，而其他细胞和组织结构则被伊红染成粉红色（图 1A）[3]。在本文集末尾的应用简报《苏木素和伊红染色组织》中对 H&E 染色进行了详细说明。

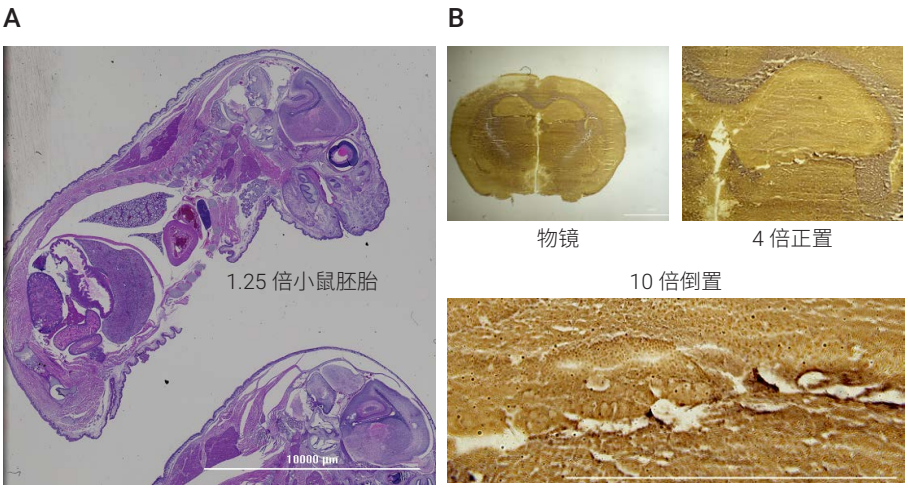


图 1. 比色染色组织。(A) 1.25 倍彩色明场下的小鼠胚胎 H&E 染色 (NIH Bethesda, MD)。(B) 使用 4 倍正置物镜和 10 倍倒置物镜对小鼠脑切片进行 DAB 染色（BioTek，现已加入安捷伦）

有几种荧光染料可选择性地与组织和细胞位置结合，并提供清晰的可定量信号。固定组织最常用的荧光核染色剂是 DAPI，而活细胞常用的是 Hoechst 染色剂。这些染色剂不仅可用于识别细胞数量，还可用于定量分析其 DNA 含量，从而确定细胞周期阶段。细胞核染色也可用于解决细胞活力问题。碘化丙啶 (PI) 不能穿过活细胞的细胞膜，但当活力丧失时，细胞膜变得可渗透，核酸便被标记并发出荧光。溴化乙锭 (EB) 是另一种染色剂，仅在细胞死亡过程中细胞膜变得可渗透时标记细胞核。吖啶橙 (AO) 可对活细胞的核酸进行染色，并与 EB 联合用于评估存活细胞的百分比。荧光染料（如荧光素、罗丹明等）可用于对组织结构进行差异化标记。

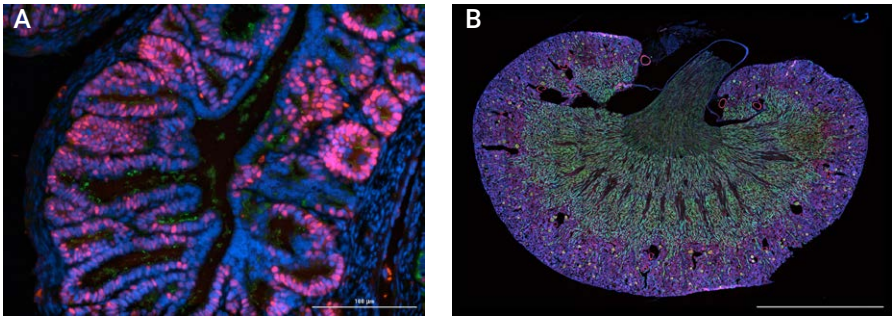


图 2. 荧光染色组织。(A) 卵巢癌模型小鼠生殖输卵管的荧光染色，上皮细胞表达 T-抗原（红色），用 GFP 标记纤毛上皮细胞（绿色），用 DAPI 染色细胞核（蓝色）；使用 Agilent BioTek Lionheart FX 全自动智能成像分析系统进行成像 (Fox Chase Cancer Center Philadelphia, PA)。(B) 小鼠肾脏-FluoCells 制备玻片 #3（用 Alexa Fluor 488 WGA、Alexa Fluor 568 鬼笔环肽和 DAPI 染色的小鼠肾脏切片，Thermo Fisher Scientific），使用 Agilent BioTek Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统以蒙太奇图像采集模式进行 4 倍成像

为了更精确地检测组织、细胞结构和生化过程，使用特异性抗体进行免疫组织化学和免疫荧光检测。追踪标记可以连接到一抗或二抗上，以增加信号。

免疫组织化学使用与酶（如辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AP) 或 β-半乳糖苷酶 (BGAL)）结合的抗体，将显色报告基因的活性定位到目标物上。使用 HRP 等偶联抗体与适当的底物系统（如 DAB）反应，在存在过氧化氢的情况下，DAB 会氧化生成棕色沉淀，从而识别目标物（图 1B）。使用生物素化的二抗可放大蛋白质信号，其中生物素可结合多达四种与 HRP 偶联的阿维丁或链霉亲和素蛋白。传统上，苏木素通常与 DAB 染色一起用作细胞核检测的复染剂。经固定和处理的 IHC 切片性质稳定，可以无限期地保持其染色效果。更多详情，请参阅下面的应用简报《组织的自动化彩色成像》。

免疫荧光利用与荧光团（如 FITC 或 Alexa Fluor）偶联的二抗，创建定位于靶蛋白的荧光信号（图 2B）。荧光标记的二抗具有出色的灵活性和宽范围，配合理想的成像滤光片，荧光信号可提供更大的可定量动态范围并且能够识别蛋白质的表达；但是，荧光信号的长期稳定性往往较差。自动化荧光玻片扫描的示例见应用简报《应用自动化系统提高显微成像的通量》，如 TMA 原型应用中的自动化组织微阵列芯片 (TMA) 成像所示。

本应用文集使用 Agilent BioTek Cytation 和 Lionheart 成像系统介绍了荧光和彩色明场组织切片分析的几个示例。具体分析方法、图像和定量的精确描述见下面的应用简报。

仪器

制备样品并将其封固在玻片上后，使用光学显微镜检查结果。由于组织学玻片通常在盖玻片下固定，因此正置 (Cytation 7) 和倒置（Cytation 5、7 或 Lionheart）显微镜均适用。不过，倒置显微镜的工作距离更短，通常能使更高倍率物镜产生更高的分辨率。Agilent BioTek 全自动智能活细胞成像分析系统具有多种成像模式，可确保使用适当的工具对样品进行成像。

Agilent BioTek Cytation 细胞成像多功能微孔板检测系统

Agilent BioTek Cytation 5 和 Agilent BioTek Cytation 7 将全自动数字显微成像系统与传统的多功能微孔板检测系统整合到一个模块化的可升级平台中，可用于自动化操作。倒置显微成像模块提供放大倍率高达 60 倍的荧光、明场、高对比度明场和彩色明场成像。Cytation 5 还可进行相差成像，而 Cytation 7 正置相机则可提供反射光和透射光，在较低放大倍率下进行彩色成像，并可针对玻片扫描进行优化。此外，Cytation 7 正置成像彩色相机允许选择目标区域和采集速度，可以从生成的合成图像中检查每个单独的 RGB 通道。

Agilent BioTek Lionheart FX 全自动智能成像分析系统

Agilent BioTek Lionheart FX 全自动智能成像分析系统是一款结构小巧的显微成像系统，其开放式载物台可用于荧光、明场、彩色明场和相差成像模式，从而大大扩展应用范围。物镜提供 1.25–60 倍的空气镜放大倍率，以及 60 倍和 100 倍的油镜放大倍率，可对各种成像工作流程进行成像。

Agilent BioTek BioStack 微孔板储板器

Agilent BioTek BioStack 微孔板储板器是一款结构小巧应用灵活的储板器，它可以和 Agilent BioTek 洗板机、移液分液系统、微孔板检测系统以及成像系统相互整合。一旦在 Agilent BioTek Gen5 软件中建立了自动成像和采集方案，即可轻松升级至高通量设置。BioTek 以其稳定且易于使用的自动化系统而闻名，它可以将微孔板和适配器送入 Agilent BioTek Cytation 系列显微成像系统。Agilent BioStack 的快速孔板和适配器更换功能提高了通量和分析效率，适配器可容纳多张玻片。这使得许多玻片都能通过图像采集进行扫描，以便在 Gen5 软件中进行自动分析。

彩色明场和荧光成像在组织学、组织微阵列芯片和玻片扫描中的应用

苏木素和伊红染色的组织

试验简介

近一个世纪以来，显色染色组织一直是病理学和癌症研究的标志。通常将固定的组织样品包埋在石蜡中，作为一种长期数据存储方法。从石蜡块切下组织薄片，固定在玻片上，然后通常用苏木素和伊红进行染色，并用盖玻片密封。检查组织学玻片需要使用多物镜显微镜进行观察。检查后，将切片连同石蜡包埋组织进行常规存档。如果需要重新检查，可以取回玻片或重新处理石蜡组织块，生成新的玻片进行观察（图 3）。随着数字成像和数据存储技术的进步，彩色图像变得越来越常用。

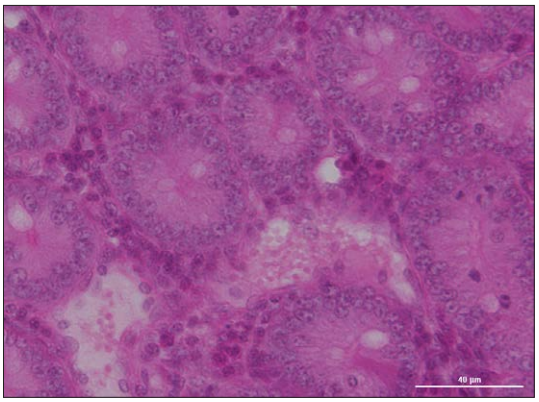


图 3. 苏木素和伊红染色的正常人小肠组织

苏木素（更准确地说是其氧化形式血色素）与媒染剂（通常为 Al^{3+}）结合，可对细胞中的 DNA 进行染色。它被认为与组成 DNA 骨架的带负电荷的磷酸基团结合，然后进行复杂的配位或偶联，成为细胞核的永久染色剂。该染料与其 Al^{3+} 媒染剂一起，在中性至碱性条件下产生蓝色（图 4）。

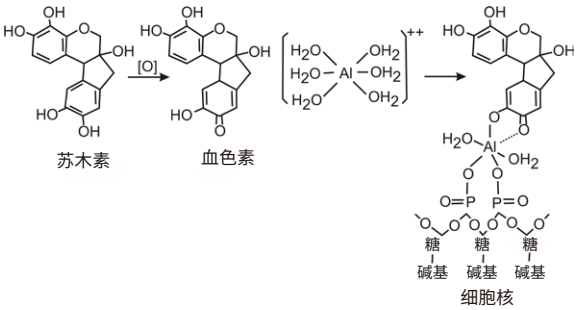


图 4. 苏木素（血色素）与细胞核中的 DNA 结合

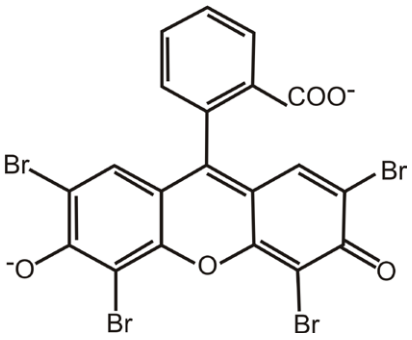


图 5. 用于 H&E 染色的二阶阴离子伊红 Y 的结构

相反，阴离子伊红 Y 会与蛋白质上带正电荷的基团（如氨基）结合。例如，赖氨酸残基和 ε-氨基的 pKa 值约为 10，因此它们在整个染色过程中都会保持正离子状态（图 5）。

虽然已经开发了用于细胞和组织切片染色的其他染色剂和方案，但近 140 年前开发的原始方法仍保持相对不变。苏木素非人工合成，而是从苏木树提取而来。即便如此，H&E 染色仍然是组织学应用中最常见的染色方案。

本应用简报展示了新型自动数字显微镜在 H&E 染色的组织切片成像中的实用性。通过软件控制显微镜物镜的选择（放大倍率范围为 2.5–60 倍），可实现从低到高的切片放大倍率。对焦和曝光设置均自动进行，操作简单。在计算机显示器上查看实时图像，所需的图像可保存并下载为多种不同的数据文件，包括 TIF 和 PNG，从而简化了数据共享。

材料与方法

市售的正常人肠道和肾脏以及患有慢性肾炎的人肾脏的固定和染色组织切片均购自 Konus。使用 Cytation 5 细胞成像微孔板检测系统对玻片进行成像。

蒙太奇阵列是 Gen5 的一项功能，可采集多视场 (FOV) 或比单视场图像帧更大的区域。在将图像彼此分离时，可使用阵列从玻片的不同区域获取单个方块，并对每个方块进行单独检查和分析。或者，在稍有重叠的情况下，可以组合离散的图像，创建更大的连续合成图像。随着放大倍率的增加，即使在一个更小的区域内，也能获得更多的信息。检查的玻片面积取决于所使用的放大倍率。将蒙太奇间距重叠设置为 Gen5 软件中的拼接默认值。为彩色明场蒙太奇 (12 × 8) 采集的单个图像方块通过线性混合沿每个方块的重叠部分拼接在一起。选择用于拼接的配准通道应用于红色通道，并将生成的文件缩小到最大尺寸的 25%。

结果与讨论

图 6 展示了 Cytation 5 对固定和 H&E 染色组织切片进行彩色明场成像的能力，图中对正常肾脏和患病肾脏进行了比较。使用 60 倍物镜蒙太奇采集、记录切片图像，并将单个图像方块拼接成每张切片的单个连续图像文件。通过明显的苏木素蓝染色识别间质中明显的淋巴细胞浸润。鲍曼氏囊内无定形的粉红色伊红染色显示肾小球的透明化。正常肾组织的肾小球显示鲍曼间隙开放，无炎症细胞。

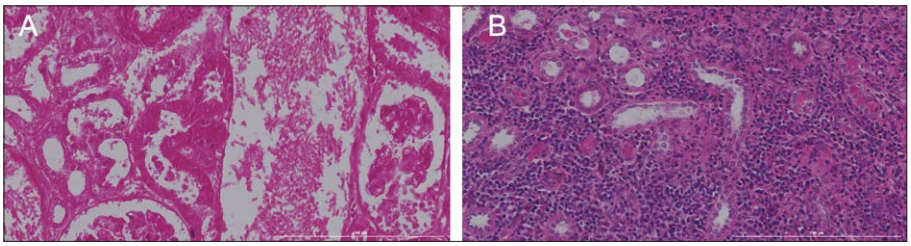


图 6. 正常和患病人体肾脏的比较。经苏木素和伊红染色的 (A) 正常肾脏和 (B) 慢性肾炎肾脏组织。图像为使用 60 倍物镜拍摄的 12 × 8 拼接蒙太奇图像。比例尺表示 200 µm

图 7 显示了 Cytation 5 对玻片区域的放大程度，图中使用 2.5 倍和 60 倍物镜对人体肠壁组织切片进行了蒙太奇成像。2.5 倍物镜蒙太奇将整个组织切片描绘成整体图像的一小部分。圆形盖玻片的边缘也清晰可见。在 Gen5 软件的示意图中，玻片上的成像 FOV 显示为十字。60 倍物镜蒙太奇图像是 2.5 倍图像中的一小部分。该图像在整个组织切片上的位置，以及玻片上更小的区域都已标明。

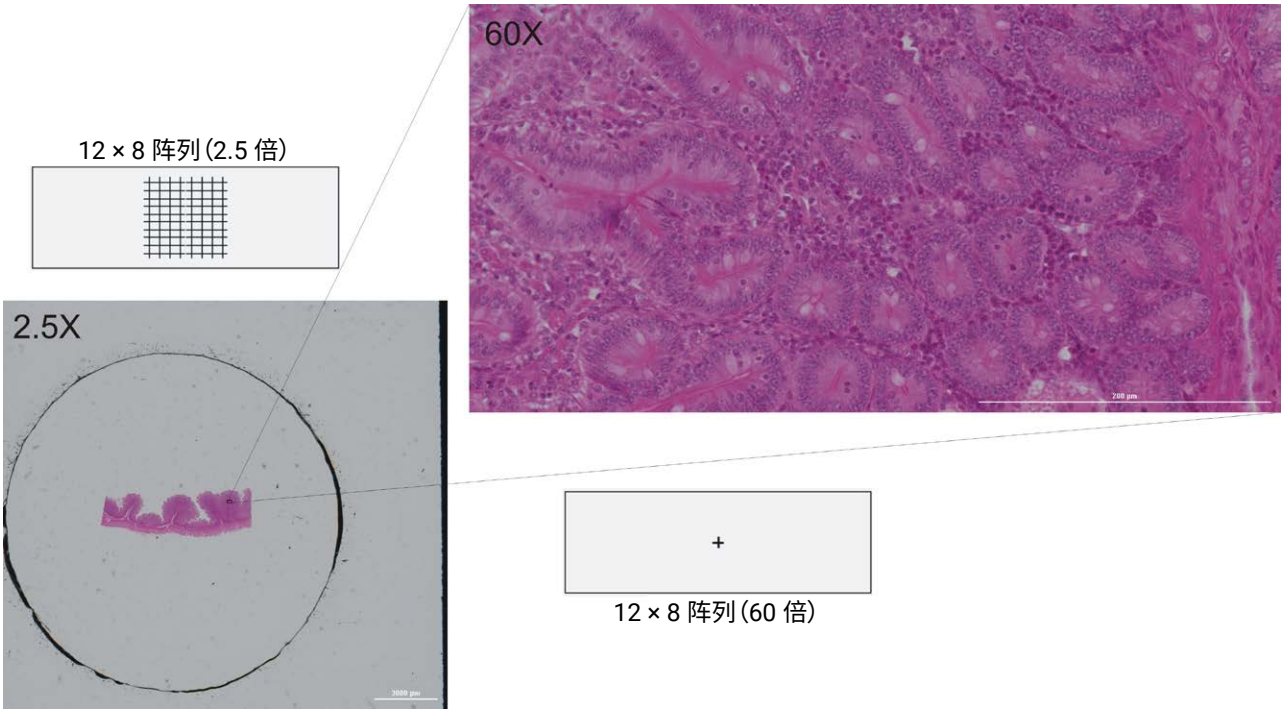


图 7. 使用 Agilent BioTek Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统的最大放大倍率。使用 2.5 倍和 60 倍物镜对固定在 1 × 3 英寸玻片上的固定和染色人体肠壁组织切片进行成像，生成 12 × 8 蒙太奇图像。图中标出了用 60 倍物镜放大的 2.5 倍图像中的组织区域，以及每张蒙太奇图像的玻片区域，并附有玻片示意图

Cytation 5 的多物镜转盘系统的便利性如图 8 所示。使用彩色明场蒙太奇 (12 × 8)，以六种不同的放大倍率（2.5–60 倍）对病变人体肾脏组织的同一组织切片进行成像，无需干预。每张图像都标明了增加放大倍率进行成像的区域。由于 Cytation 5 使用的是 6 位转盘系统，因此可为玻片区域设置不同的放大步骤，以便自动定位、对焦和成像，无需任何用户干预。如图 7 所示，可以在较低的放大倍率下采集整个组织切片的图像。随着放大倍率的增加，显微成像细节的分辨率也会提高。在查看拼接图像后，可为后续分析选择理想的放大倍率。

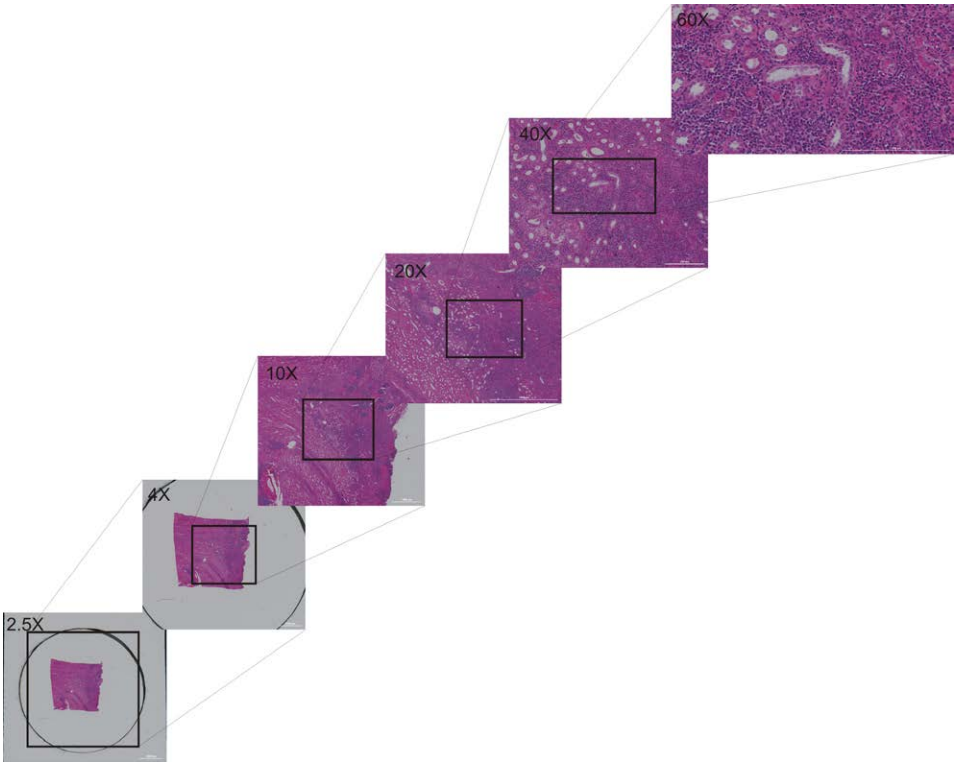


图 8. 人体慢性肾炎肾组织的宏观和微观结构。记录并拼接同一组织切片的一系列放大倍率递增的蒙太奇 (12 × 8) 图像。方框区域代表下一张高放大倍率图像中的成像区域。每张蒙太奇图像都标有物镜放大倍率和比例尺

结果与讨论

Cytation 细胞成像微孔板检测系统结合 Gen5 软件，具有几个功能，可辅助进行染色组织切片的手动和自动成像。手动成像允许研究人员使用 Gen5 软件控制或外部操纵杆完全控制载物台在微孔板检测系统内的 x、y 位置。一旦确定成像区域，则可以在 Gen5 手动模式会话中采集、拼接和分析单个或蒙太奇彩色明场图像。或者，也可以使用自动程序对玻片进行成像。玻片位置、放大物镜和蒙太奇阵列（最多为 15 × 15 矩阵）均可在成像前进行编程。此外，使用 Gen5 3.08 或更高版本，还可通过设置 beacon 或自定义 ROI 轮廓，在同一实验中利用不同物镜和/或玻片的特定区域实施多个成像步骤。

彩色明场的一个重要属性是白平衡。白平衡是去除不良偏色的过程，使白色物体在图像中呈现白色。正确的平衡需要考虑光源的色“温”或相对冷暖。人眼比数字传感器更擅长在各种光线条件下判断白色，因此在拍摄过程中必须自动平衡，以实现正确的色彩还原。通过测量和调整独立于实际样品的三个颜色明场通道的输出来实现颜色平衡，以确保它们等效。这一过程由 Gen5 对拍摄的每一组三色图像自动完成。执行白平衡后，在读取步骤中照明水平将固定不变。

低倍率物镜（如 2.5 倍和 4 倍）的景深较长。当使用这些物镜进行彩色明场蒙太奇成像时，Cytation 5 只会在第一张图像之前使用自动对焦，从而为大型蒙太奇成像节省大量时间。高倍率物镜的景深要短得多，因此每张图像都需要自动对焦，因为玻片平整度或标本厚度的微小偏差都会导致图像失焦。在对标本进行手动成像时，用户每次操作成像仪时都会自然地调整焦距。相反，在无人值守运行中，仪器需要能够在不干预的情况下调整焦距，以便获得进一步分析所需的良好图像。荧光显微镜和彩色明场显微镜的自动对焦过程有所不同。

基于荧光的自动对焦采用基于图像的统计算法，通过测量相邻像素之间的标准偏差和/或相关性来评估对比度，从而确定理想焦距[4]。当仪器接近焦点时，真实图像和背景像素之间的信号差异显著增加，因此所有像素的标准偏差也会增加。像素标准偏差与 Z 轴高度的关系图会在焦点处形成一个尖峰[5]。使用标准偏差等统计算法的优势在于特征的宽度。图像的对比度会在远离焦点的地方开始增加，产生更宽的搜索范围，从而成功找到理想的峰对比度[5,6]。

荧光成像的背景和图像之间的差异非常明显，而彩色明场自动对焦则给自动对焦带来了独特的挑战。明场成像的整体对比度相当低，目标边缘也不那么清晰，而且反射、新月效应和厚样品会产生多个焦平面。在彩色明场成像中，当样品厚度超过景深时，标准偏差与 Z 轴物镜高度的对比扫描会显示双峰，这在 10 倍或更高放大倍率物镜中非常常见。为确保图像的一致性，需要选择相同的峰。Cytation 5 采用“双峰”算法，选择 Z 轴右侧峰值较高的焦平面。简而言之，扫描时使用对比度或边缘检测。计算扫描的导数，选择对应于两个峰之间波谷的过零点。现在，该算法会寻找过零点右侧的“边缘检测”峰值。然后在边缘检测计算的较高 Z 轴最大值处拍摄图像。这一程序可确保在后续图像中始终使用相同的焦点，使焦点清晰且可重现。

组织的自动化彩色成像

检测原理

自发明光学显微镜以来，色素染色样品（通常为组织）一直是用于显微技术研究的主要物质。为了提高对比度，人们开发了分色剂，用于在测定前对样品进行处理。随着时间的推移，明场显微镜所获图像的记录技术已经从手绘发展到摄影材料，最近又发展到数字图像。在所有这些技术中，最初的记录为黑白两色（即灰度图），后来随着技术的发展，变成了彩色。正如黑色水墨画被五颜六色的墨水所取代一样，以银还原为基础的黑白胶片也被多层次的彩色处理所取代，从而真实地再现了拍摄对象。数码显微技术也是如此，在彩色显微镜玻片的检查和数据记录方面，数字灰度明场图像已被彩色明场图像所取代。

明场显微镜使用标本的白光吸收作为形成对比度的主要机制。虽然一些样品含有大量的显色剂（如植物），但动物细胞大部分是透明的，不能为显微镜辅助的人眼观察精细的细胞结构提供足够的对比度。因此，人们开发了用于细胞物质可视化的染色剂。最常用的染色剂之一是苏木素和伊红（H&E 染色）。其主要用途是识别组织形态[3]。苏木素需要氧化并与媒染剂络合才能作为有效的细胞染色剂。经适当处理后，该染料可将核酸染成深蓝紫色，而伊红则呈粉红色，非特异性地染色蛋白质。在典型的组织中，细胞核被染成蓝色，而细胞质和细胞外基质则被染成不同程度的粉红色。组织内的特异性蛋白质也可通过免疫组化来识别，其中使用针对抗原（主要是蛋白质表位）的特异性抗体。抗体-抗原相互作用的可视化可通过多种方式完成，最常见的是使用抗体-酶偶联物。其中涉及的酶通常是辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶，与适当的化学底物孵育后可催化生色反应。目标表位可直接用偶联的一抗标记，更常见的是用针对一抗的二抗偶联物标记。

为了对明场图像进行成像和数字记录，主要开发了两种不同类型的数字摄像机：彩色和灰度。在数字灰度摄像机中，无论波长如何，传感器上的每个像素都能捕获撞击它的光强信息。每个像素记录从 0（即黑色）到其最大值（即白色）的数值，中间的数字代表两个极端之间的灰度范围或等级。彩色数字摄像机使用相同的像素集，但每个像素前面都有一个红色、绿色或蓝色滤光片，因此仅记录特定波长的强度测量值（图 9）。滤光片（红色、绿色和蓝色）仅允许特定波长的光通过传感器阵列像素，从而测量单独像素上原色的强度。

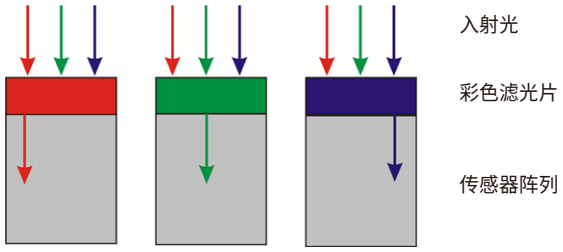


图 9. 数字彩色传感器各个像素的横截面示意图。特定的彩色滤光片仅允许特定波长的光强通过传感器阵列

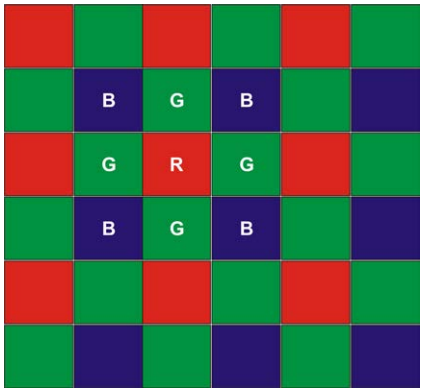


图 10. 灰度传感器上按像素排列的拜耳彩色滤光片阵列。每个像素都是单一的原色，其他两种颜色根据相邻四个像素的平均值计算得出。在此示例中，红色像素 (R) 的绿色值为 4 个绿色像素 (G) 的平均值，而同一红色像素的蓝色值则为相邻蓝色像素 (B) 的平均值

最常见的阵列排列方式是拜尔阵列（图 10），绿色像素的数量是蓝色或红色像素的两倍，以此来补偿眼睛对绿色的高敏感度。采用这种排列方式后，像素数量与灰度摄像机相同，但每种颜色都从总数中分离出来。为了重建与原始摄像机分辨率相同的输出图像，需要使用一种称为去马赛克的处理方法。本质上，这个过程通过查看该颜色的相邻像素值，插入每个像素缺失的两个颜色值。有许多不同的插值算法，最简单的算法之一是双线性插值。在这种方法中，相邻像素用于插入 CFA 滤除的光强。以图 10 中标有 R 的红色像素为例。在该像素下，CFA 仅允许红色波长的光传输到灰度摄像机。R 像素位置的蓝色强度根据 R 像素四角相邻 4 个 B 像素的平均强度计算得出。同样，R 像素的绿色强度根据 R 像素边 4 个相邻 G 像素的平均强度计算得出。

这两种技术的主要区别在于空间分辨率和颜色分辨率，灰度技术在提供空间分辨率方面更胜一筹，而彩色数字摄像机则能提供更出色的颜色分辨率。Cytation 5 结合使用这两种技术，无需进行去马赛克处理，即可提供具有全空间分辨率的彩色明场成像。Cytation 5 并非使用 CFA 将彩色光暴露限制在数字摄像机的每个像素，而是使用由原色（红色、绿色和蓝色）组成的三种不同光源快速连续地照射样品和摄像机传感器，分别生成每种颜色的全分辨率图像。然后将三幅图像叠加，得到一幅彩色明场合成图像（图 11）。

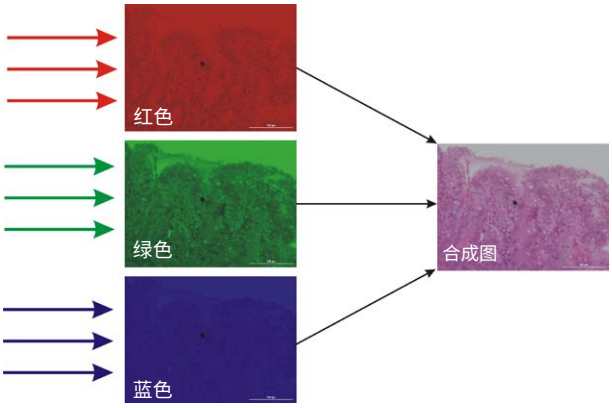


图 11. 三幅单独的 RGB 滤波明场图像的合成叠加图像。使用不同颜色（红色、绿色和蓝色）的 LED 光源快速连续地照射整个数字传感器阵列。然后将三幅图像组合生成一幅彩色明场合成图像

在成像读数步骤界面上使用颜色下拉菜单选择彩色明场读数（图 12）。选择彩色明场可激活 Cytation 5 中的红色、绿色和蓝色发光 LED，在读数过程中提供光照。

图 12. Gen5 读数步骤识别彩色明场成像。使用 4 倍物镜采集图像，并选择彩色明场作为成像颜色

选择彩色明场作为成像颜色，可以查看“选项”按钮下的一系列默认功能。作为亮度校正的一部分，彩色明场成像自动启用白色平衡，并且无法在选项界面中取消选择（图 13）。此外，还会自动选择用于自动对焦的双峰法作为默认值（图 13）。

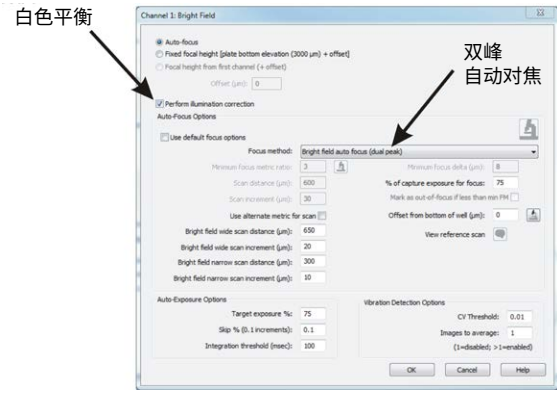


图 13. 使用彩色明场的 Gen5 成像选项字段。白色平衡和双峰自动聚焦默认值的识别

通过彩色明场显微成像系统检查的样品通常会超出物镜的视野范围，在高放大倍率下尤其如此。为了对整个区域进行成像，需要拍摄一系列包含整个样品的图像或蒙太奇进行拼接。例如，典型的固定和染色组织切片的面积明显大于 4 倍物镜下的单张图像。然而，几张叠加图像的蒙太奇将包含整个切片。此外，组织切片的总体和微观结构最好使用不同放大倍率的蒙太奇系列图像进行评估，以捕捉组织和细胞结构。蒙太奇由一系列图像或方块以蛇形方式生成，以满足创建全图所需的行和列的数量，然后使用 Gen5 软件将其拼接在一起。

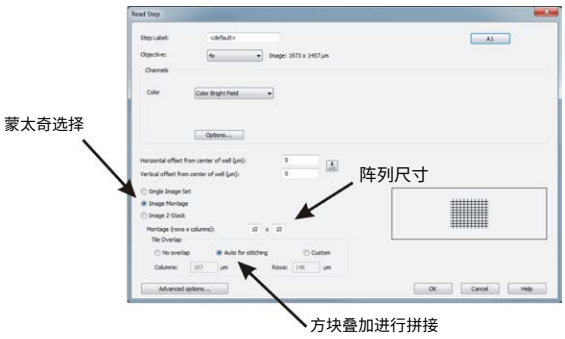


图 14. Gen5 读数步骤识别蒙太奇成像。使用 4 倍物镜采集彩色明场图像，并选择图像蒙太奇和 10 × 10 阵列，将方块叠加设置为自动拼接

蒙太奇成像可在 Gen 5 的“Read Step”（读数步骤）界面上选择。选择颜色和玻片位置后，选择“Image Montage”（图像蒙太奇）径向按钮。这将激活有关图像阵列行数和列数以及方块叠加的蒙太奇参数（图 14）。如果对拼接蒙太奇图像不感兴趣，选择“No overlap”（无叠加）将产生一系列图像，涵盖最大的图像区域，图像方块紧挨在一起，所有图像方块都将被单独分析。但是，如果希望将图像拼接成单个蒙太奇文件，以便作为单个图像文件进行分析或保存，则需要与每幅数

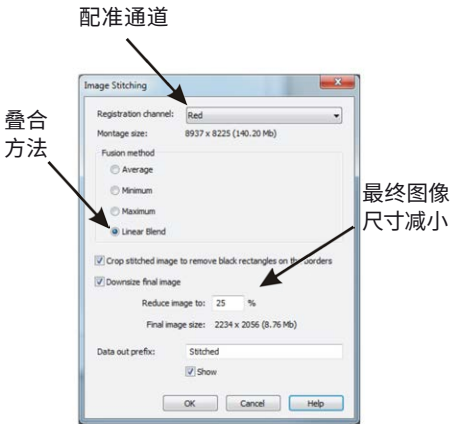


图 15. Gen5 图像拼接数据缩减步骤。选择配准通道（红色、绿色或蓝色）以及要采用的叠合方法。最终图像尺寸可以减小，以节省磁盘存储空间

字图像都进行一些叠加，以便正确配准并叠合在一起（图 14）。除非图像有异常特征，否则建议使用默认叠加。可以选择自定义叠加，允许用户增加或减少图像方块叠加的数量。需要选择拼接叠合方法，线性混合通常是最佳选择（图 15）。最好选择最复杂的通道，利用配准通道实现理想图像叠合。图像复杂性引起的粒度增加使拼接过程中图像方块更容易对齐。由于文件可能非常大，Gen5 软件允许用户将最终文件压缩到更易于管理的大小。希望进行详细分析的用户可以保持完整的图像大小和分辨率，而希望获得较小合成图像的用户则可以选择大幅降低图像分辨率。如果只生成一个文件，则可以使用默认名称“拼接”，但也可以输入具有更精确意义的其他名称（图 15）。

忠实的色彩还原是彩色明场成像的关键要素。目前尚无正式的色彩标准来“校准”数字摄像机的颜色输出。因此，忠实呈现多种色彩的能力至关重要。Cytation 5 使用白色平衡程序作为自动启用的亮度校正的一部分。虽然许多组织切片都用苏木素和伊红（H&E 染色）进行染色，因为它能识别细胞核和蛋白质，但其他染色剂或样品的自然颜色也能通过显微成像观察到。如图 16 所示，植物叶片中的叶绿素或生长植物根系横截面的脉管系统的鲜绿色也可以成像。

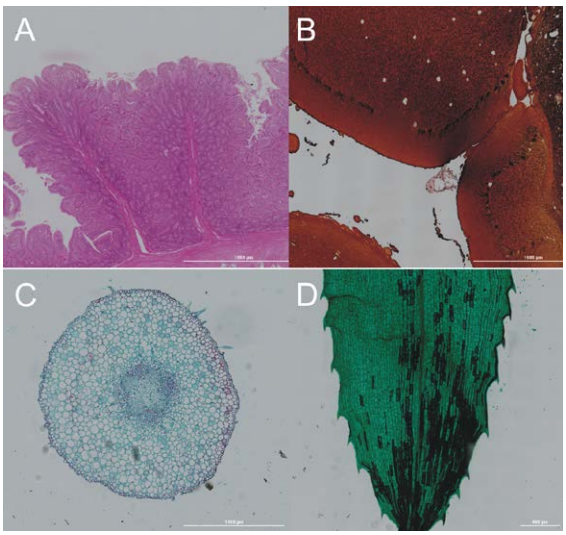


图 16. 不同组织的彩色明场图像系列。(A) 使用 20 倍显微镜物镜拍摄的 H&E 染色人肠壁图像；(B) 使用 20 倍显微镜物镜拍摄的人小脑组织图像；(C) 使用 20 倍显微镜物镜拍摄的嫩豆根横截面图像；(D) 使用 20 倍显微镜物镜拍摄的黑藻水生植物叶片图像。所有图像均为拼接蒙太奇合成图像

组织切片可采用多种不同的方法进行染色，以提高对比度或识别特定的细胞蛋白质。基于抗体的方法通常采用与反应酶（如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）偶联的特异性抗体。这些酶与提供的底物反应生成显色化合物，对结合抗体的组织进行染色，从而获得抗原的空间和表达水平信息。辣根过氧化物酶结合物将底物 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 转化为黑色至棕色产物，而碱性磷酸酶则将 3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC) 转化为粉红色阴影产物。图 17 显示了使用 HRP 偶联抗体染色并与 DAB 底物反应的小鼠肺组织，最终肺实质被染成棕色。同样，碱性磷酸酶偶联抗体产生粉红色染色。 图中还显示了与常见的 H&E 染色的比较。

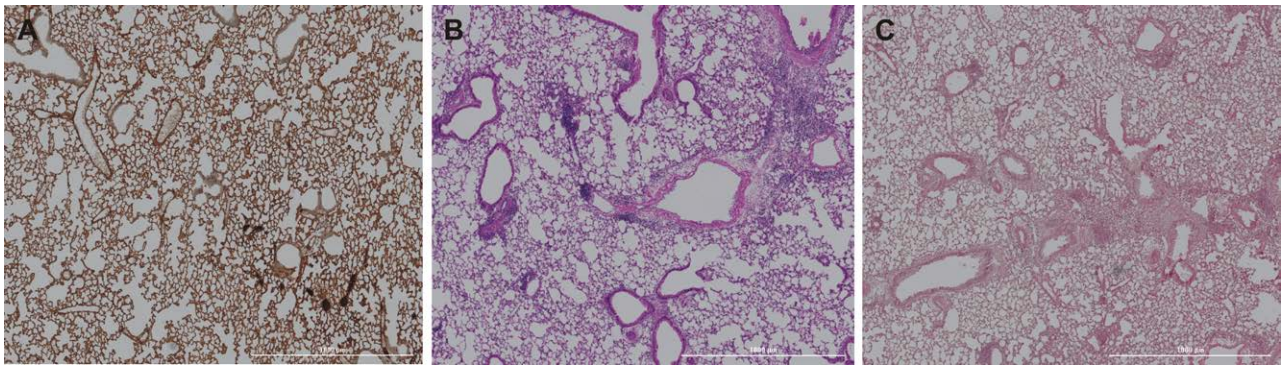


图 17. 采用不同方法染色的小鼠肺组织。使用以下方法对肺组织进行染色：(A) HRP 抗体偶联物与 DAB 反应生成棕色报告基因；(B) H&E 染料；(C) 碱性磷酸酶偶联物与 AEC 反应生成粉红色产物

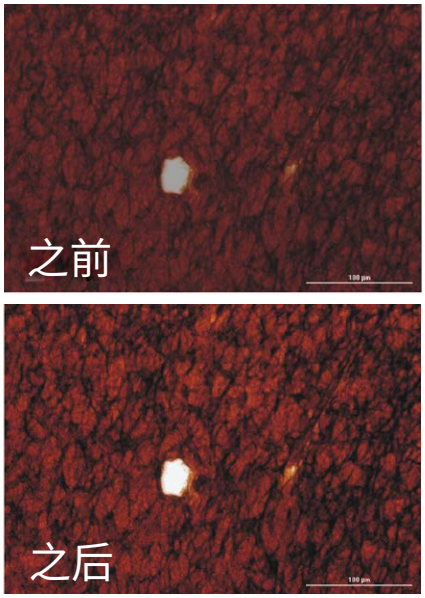


图 18. 使用色彩对比度和亮度调整来提高图像质量。对比度和亮度调整前后的人脑组织彩色明场图像（20 倍）。所示图像为红色、绿色和蓝色图像的叠加图

通常可以通过改变每种颜色的亮度和对比度来改善单个图像。由于人眼的感知能力与数字摄像机传感器存在差异，对于绿色尤其如此，因此对图像的亮度和/或对比度稍作调整可获得更清晰的图像。放大倍率越高，效果越明显。如图 18 所示，增加绿色对比度可使图像更清晰。

结果与讨论

Cytation 5 是一款细胞成像多功能微孔板检测系统，用于执行光学显微成像和基于 PMT 的荧光检测。显微成像组件以数字技术为基础，包括用于照明的 LED、滤光片模块、显微镜物镜（1.25–60 倍）和灰度 CCD 摄像头。大多数显微成像组件位于 Cytation 5 的下半部分，但相差照明除外，它与常规微孔板检测仪基于 PMT 的光学元件位于相同的上部空间。Cytation 5 采用模块化设计，可根据需要选择显微镜和/或微孔板检测光学系统。显微镜模块可使用各种样品容器，包括显微镜玻片、各种密度的微孔板（6–384 孔）、培养皿（35、60 和 100 mm）和组织培养瓶 (T-25 cm^2)。

Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测仪与 Gen5 软件交互，根据选择的读数模式提供理想结果。对于彩色明场成像，Cytation 5 内的多色 LED 照明可提供高性能灰度数字摄像机传感器的分辨率，并具有通常使用彩色数字摄像机观察的彩色功能。选择彩色明场时，软件会自动启用对正确色彩还原至关重要的正确色彩调整，而无需用户干预。蒙太奇彩色明场成像利用复杂的自动对焦软件算法优化图像焦点。自动对焦程序会在所有物镜开始蒙太奇成像时自动执行，并在高放大倍率物镜（10–60 倍）的每幅图像中重复执行。低放大倍率物镜（2.5 倍和 4 倍）具有更大的景深，在蒙太奇读数期间不需要反复重新对焦，仅在图像步骤开始时进行自动聚焦，从而节省蒙太奇成像的时间。

图像采集、处理和分析由 Cytation 5 随附的 Gen5 软件执行。该软件是与 Cytation 5 硬件结合使用的关键组件，可生成清晰、有用的图像。最常见的情况是，玻片的成像区域大于单次采集的范围。在这些情况下，需要拍摄多张包含待检查区域的蒙太奇图像。为了忠实地对一系列图像进行对齐或分析，需要通过一种称为拼接的过程将它们合并成单个连续图像。由于数字图像处于最基本的水平（数值阵列），因此可采用数学算法合并单独的文件。用户可选择多种不同的方法：线性、平均值、最小值和最大值，在叠加区域叠合单独的方块或图像。线性混合方法通常可提供最佳结果。它是一种计算平均值的方法，每个点按其与最近边界的距离进行加权。这种方法通常能最平滑地从一个图像方块过渡到另一个图像方块。其他方法，顾名思义，使用叠加区域的平均、最小或最大强度值作为输出。

致谢

感谢佛蒙特大学医学院病理学系的 Yvonne Janssen-Heninger 博士和 Doug Taatjes 博士善意捐赠染色组织切片。

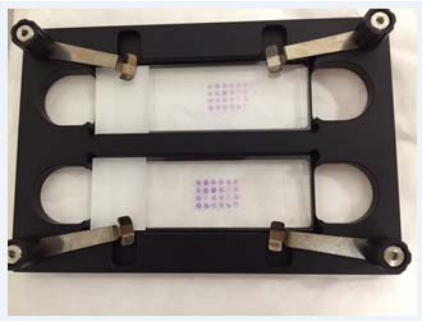
自动化组织微阵列芯片 (TMA) 成像结果证明，应用自动化系统可提高显微成像的通量

试验简介

过去，显微成像一直是一种手动操作方法，这限制了样品处理中更高通量的选择。最近，随着自动数字显微镜的引入，以及显微成像玻片技术在微孔板或其他高通量形式成像中的应用，显微成像样品处理的选择范围不断扩大。组织微阵列芯片 (TMA) 就是其中的一个例子，这种技术可将数百个直径小至 0.6 mm、厚度为 2–5 µm 的单个组织芯按阵列排布在一张显微成像玻片上，从而提高一系列常见组织学程序的通量。研究结果表明，TMA（图 19）在许多应用中都非常有用，例如活检和其他组织样品的生物制库和存档；疾病状态检查、分类和分级；质量控制；分析开发过程中的抗体和染色优化[7]。

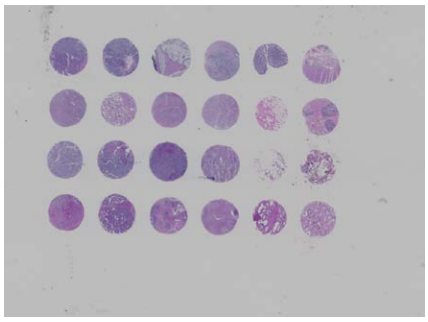
为了展示旨在克服高通量自动化 TMA 挑战的理想图像采集设置，将一组 2 张 H&E 染色 1.5 mm 72 芯 TMA 玻片和 6 张 H&E 染色 1.5 mm 24 芯 TMA 玻片装入 4 个 Agilent BioTek 显微成像玻片适配器（图 19A），并垂直堆叠在 BioStack 4 供样塔中（图 19B）。对 Gen5 软件进行编程，将每个玻片适配器从 BioStack 依次装入 Cytation 5 成像仪，并在每次成像后将玻片适配器返回到 BioStack 接收塔中。在 2.5 倍、4 倍、10 倍、20 倍和 40 倍彩色明场下对 TMA 和单个组织芯进行成像，以确定每个物镜的理想对焦高度、x,y 偏移值、蒙太奇大小和拼接叠加设置（图 19C 中显示了一组）。出于比较目的，图中还包括一个地区组织学实验室捐赠的 DAPI 染色废弃原型 TMA 的图像，以说明同一仪器独立获得的 TMA 荧光成像。

A



B

C



D

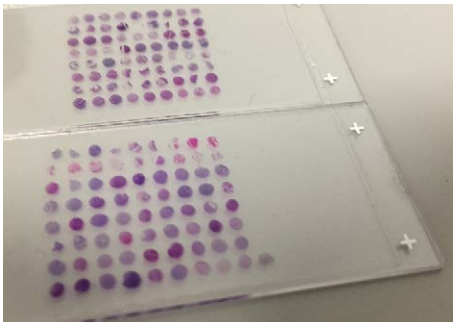


图 19. 微阵列芯片玻片。(A) 将两张 TMA 玻片放置在与多功能微孔板检测仪所连接的自动化系统兼容的玻片适配器中；(B) 对软件进行预编程，按顺序将每个玻片适配器从自动化系统装载到成像仪上，然后使用自动蒙太奇和拼接功能捕捉每张玻片的 15 × 15 图像，以显示最终阵列；(C) 4 倍放大倍率下的其中一张 TMA 图像；(D) 两个 9 × 8 组织微阵列芯片 (TMA)，显示显微成像玻片上不同的偏移位置。底部玻片上有一个标记芯，通常作为对照嵌入阵列中，帮助识别芯片位置，也可用于阵列间的不对称定位。Agilent BioTek Gen5 软件中提供的定制 x,y 偏移以及蒙太奇和拼接选项可用于 Agilent BioTek Cytation 5 成像时补偿这些几何异常，从而使混合尺寸的 TMA 可以通过 Agilent BioTek BioStack 4 微孔板储板器以更高的通量一起运行

TMA 因其独特的几何排列和制备技术，被选择作为演示高通量蒙太奇和拼接图像优化的模型。切片机切片后，将 TMA 石蜡切片置于水中，将显微镜玻片浸入切片下，然后从水浴中提起，以捕捉阵列。虽然有一个时间窗口可以将 TMA 重新置于玻片上，但这种技术的结果是，即使是相同数量和大小的组织芯也可能不会以相同的中心偏移固定在显微镜玻片上（图 19D）。此外，有些 TMA 可能有也可能没有偏离其余组织芯的标记芯。此外，尽管 Agilent BioTek 显微镜玻片适配器设计用于标准的 25 × 75 × 1 mm 显微镜玻片，但在校准成像的 x,y 偏移时应包含一定的冗余，以补偿自动化系统转移和/或图像定位过程中玻片可能发生的移动。

材料与方法

材料

- 1 套 FDA 人体正常器官组织，US Biomax, Inc.（部件号 DA802，H&E 染色，微阵列芯片）和组织芯规格表：www.biomax.us/tissue-arrays/Multiple_Organ/FDA802
- 6 份 4 大类癌症测试组织，US Biomax, Inc.（部件号 TP242，H&E 染色，微阵列芯片），如图 25 所示，组织芯规格表：www.biomax.us/tissue-arrays/Multiple_Organ/TP242
- 地区组织学实验室捐赠的废弃原型 DAPI 染色 TMA 玻片（甲状腺癌和腺瘤组织阵列，US Biomax, Inc.，部件号 TH641，未染色）
- Agilent BioTek 玻片适配器（部件号 1220548）
- 用于 Cytation 5 - BioStack 4 连接的 Agilent BioTek 集成工具包（部件号 7310053）

方法

使用 H&E 染色的 72 芯 TMA 确定 TMA 自动化成像的理想图像采集设置。将 TMA 置于玻片适配器中，然后在 Gen5 软件的方案定义界面内使用手动模式在 4 倍放大倍率彩色明场下建立 x,y 偏移和蒙太奇参数。将第二个 72 芯 TMA 置于适配器上，然后按照定义的参数对两张玻片进行成像。成像后，其中一个 TMA 略微偏移，另一个居中。在第二张玻片上进行 x,y 偏移优化（图 20）。然后在方案中对两个读数步骤进行编程，使所有 TMA 都具有两种不同的几何配置。将 6 张 H&E 染色 1.5 mm 24 芯 TMA 玻片装入另外 3 个 Agilent BioTek 显微成像玻片适配器，并垂直堆叠在 BioStack 4 供样塔中。对 Gen5 软件进行编程，将每个玻片适配器从自动化系统依次载入 Cytation 5 成像仪，并在每次成像后将玻片适配器返回到储板器接收塔中。使用规定的方案对 TMA 和单个组织芯进行成像。运行后，在红色通道上使用线性混合

蒙太奇方法对图像进行处理，并将图像尺寸缩小到 7.35%。通过相同的流程在 20 倍和 40 倍放大倍率下对三个 TMA 的选定组织芯进行成像。出于比较目的，还使用相同的程序在荧光成像通道中以 4 倍放大倍率对一个地区组织学实验室捐赠的 DAPI 染色废弃原型 TMA 进行了优化，以说明 TMA 的荧光成像。在这种情况下，仍然使用 BioStack 4，但只是在同一台 Cytation 5 成像仪上进行单张玻片转移，从而实现无人值守成像。

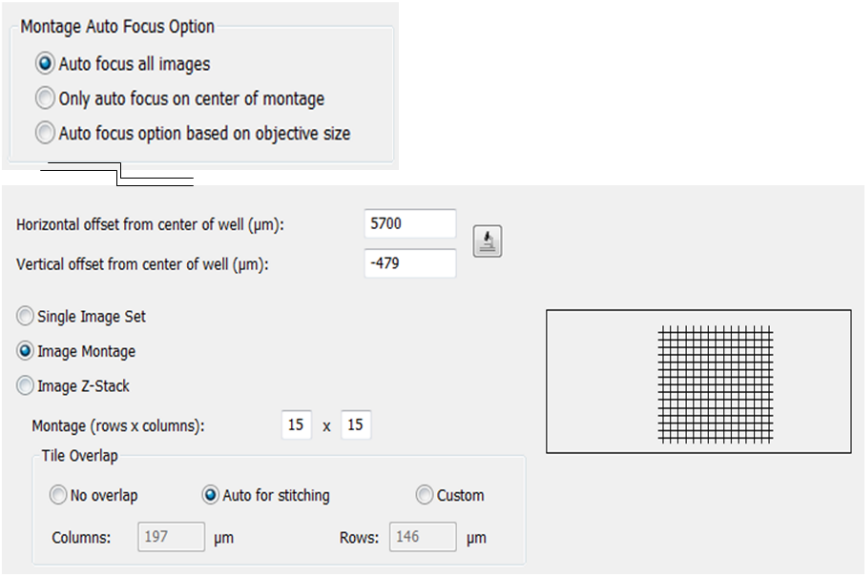


图 20. Agilent BioTek Gen5 捕捉程序参数。x,y 偏移、对焦设置以及蒙太奇和拼接选项的示例，这些选项用于在 Agilent BioTek Cytation 5 上以 4 倍放大倍率彩色明场对两个不同尺寸的八个 TMA 进行连续成像。使用 Agilent BioStack 4 将玻片来回转移至成像仪

结果与讨论

Cytation 5 对 H&E 染色 TMA 进行成像的能力在以下一系列图中得到了证实。Cytation 5 显微镜模块使用倒置显微镜配置，因此必须通过 TMA 的底部对 TMA 进行成像，以确保正确识别 TMA 芯片中的组织芯。因此，玻片在适配器上的方向为标签朝上。图 21 显示了 24 芯样品 TMA，而图 22 则显示了使用 4 倍物镜的低分辨率显微镜对 72 芯样品 TMA 进行成像的能力。

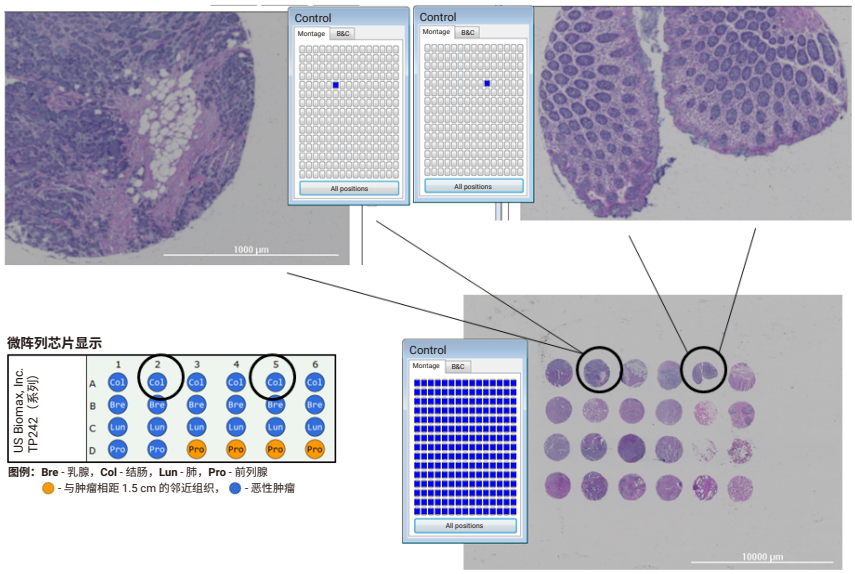


图 21. 24 芯组织微阵列芯片。使用 Agilent BioTek Gen5 软件中提供的蒙太奇和拼接选项，通过 Agilent BioTek Cytation 5 在 4 倍放大倍率下进行成像。使用 Agilent BioTek BioStack 4，在 8 个混合尺寸 TMA 的批次中运行该玻片。右下图所示为使用蒙太奇界面选项查看所有方块（所有位置模式）时显示的整个阵列。上图为单个方块视图中所示阵列的两个不同组织芯。左侧病例诊断为恶性结肠黏液腺癌 III 级，患者是一名 81 岁的女性；右侧病例为恶性癌旁结肠组织，患者是一名 35 岁的男性。由于 Cytation 5 从底部成像，因此将玻片按正确方向置于玻片适配器上有助于组织识别，使最终图像与 TMA 芯片（左下图）相匹配。在这种情况下，玻片在适配器上的方向为标签朝上

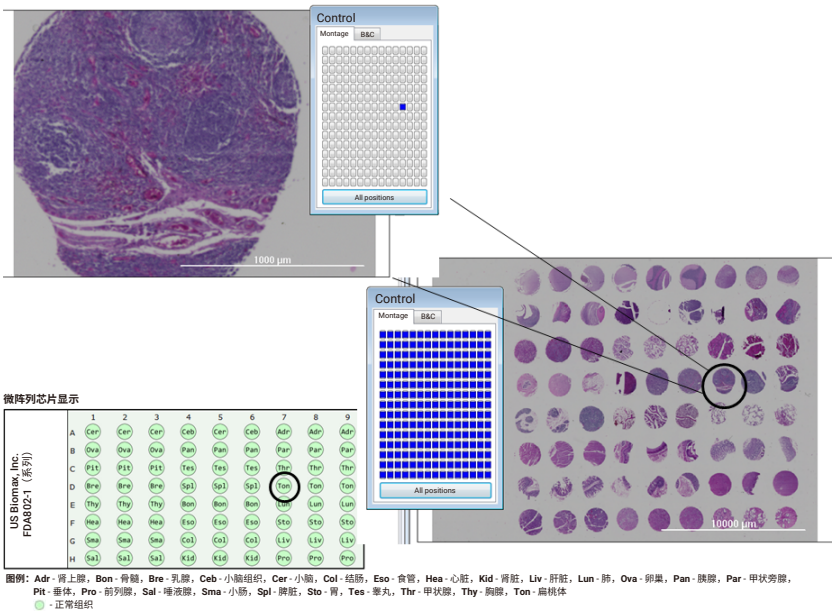


图 22. 人类正常器官组织的 72 芯组织微阵列芯片。使用 Agilent BioTek Gen5 软件中提供的蒙太奇和拼接选项，通过 Agilent BioTek Cytation 5 在 4 倍放大倍率下进行成像。使用相同的设置，在与图 21 中阵列相同的 8 个混合尺寸 TMA 批次中运行该玻片。在上图中，使用蒙太奇全位置视图显示整个阵列。正常扁桃体组织芯显示在单个方块视图中，可通过单击蒙太奇控制面板中的单个方块或直接在蒙太奇图像上双击进行选择

使用 Cytation 5 成像仪对多个 TMA 示例进行了成像，证明其具有执行更高分辨率显微镜组织检查的能力。利用图像采集前选择的默认或自定义叠加设置，可修改优化的拼接参数，以提供用于分析的最终图像（图 23）。

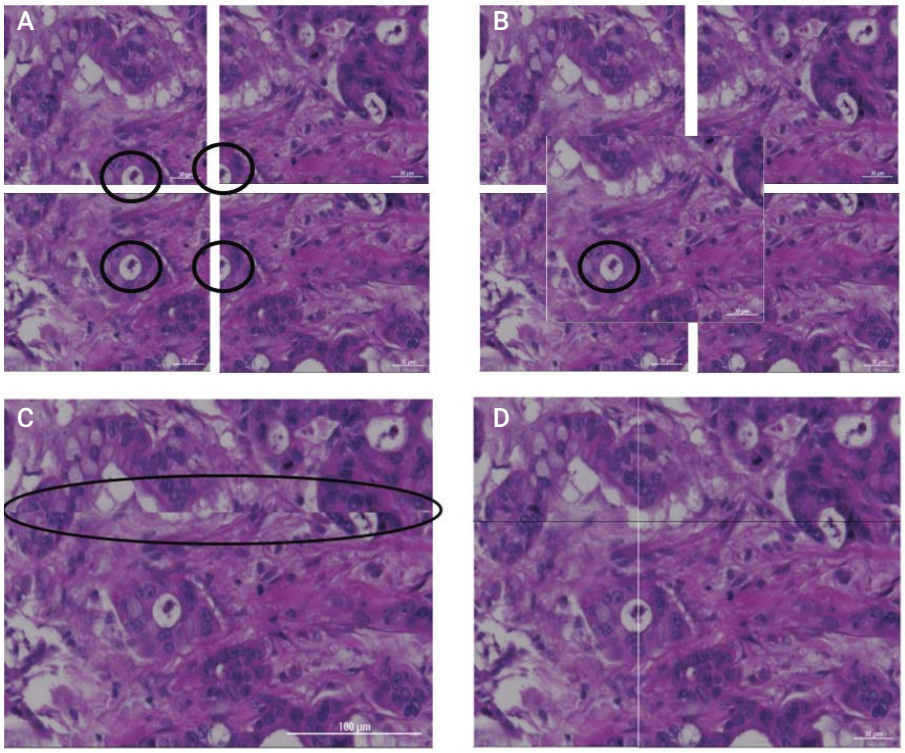


图 23. (A) 在 40 倍下拍摄 TMA 芯获得的单个 2 × 2 蒙太奇方块图像。圆圈显示了使用组织上的可识别标记对每个方块进行成像的相对位置。(B) 使用与蒙太奇图像相同的中心偏移，在 40 倍放大倍率下拍摄的单张图像叠加在左侧所示的四个方块上。该图像以左下图方块（画圈处）中的标记为中心，以说明在相同的放大倍率下，使用蒙太奇成像可从 4 个单独的方块图像中获得更大的总表面积。(C) 默认的拼接叠加设置沿水平行（画圈处）不对称。可自定义方块叠加值，以帮助纠正此问题。垂直（列）偏移对齐良好。(D) 在 40 倍放大倍率下拼接时的理想 2 × 2 蒙太奇方块叠加示意图

最后，图 24 是研究人员在比较正常组织与病变组织时进行解析的 TMA 示例，而图 25 则显示了使用 Cytation 5 对 TMA 进行荧光显微成像的能力。

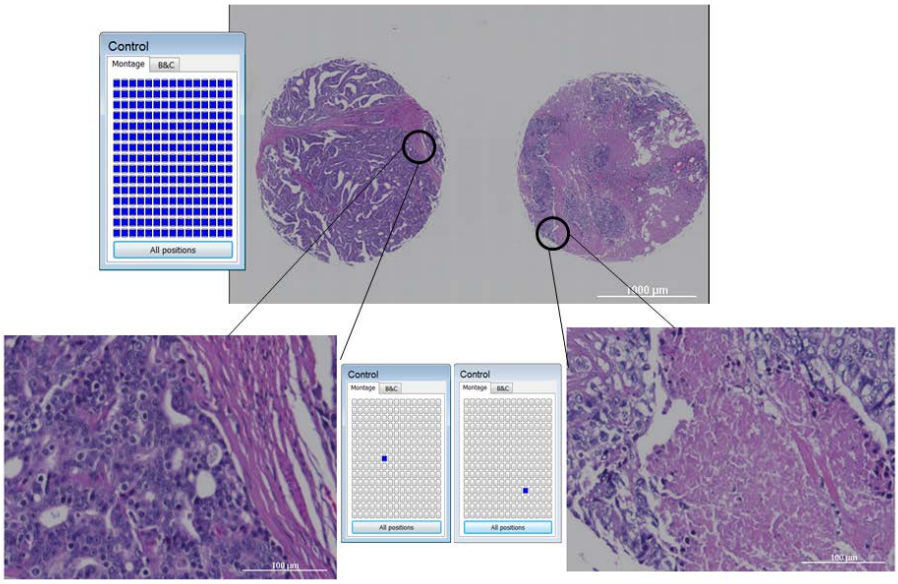


图 24. 前列腺组织。20 倍蒙太奇（上方中心）显示单个方块的详细区域。左下图组织为恶性前列腺肿瘤；右下图为距离肿瘤 1.5 cm 的前列腺邻近组织。这些组织芯来自两个不同的病例

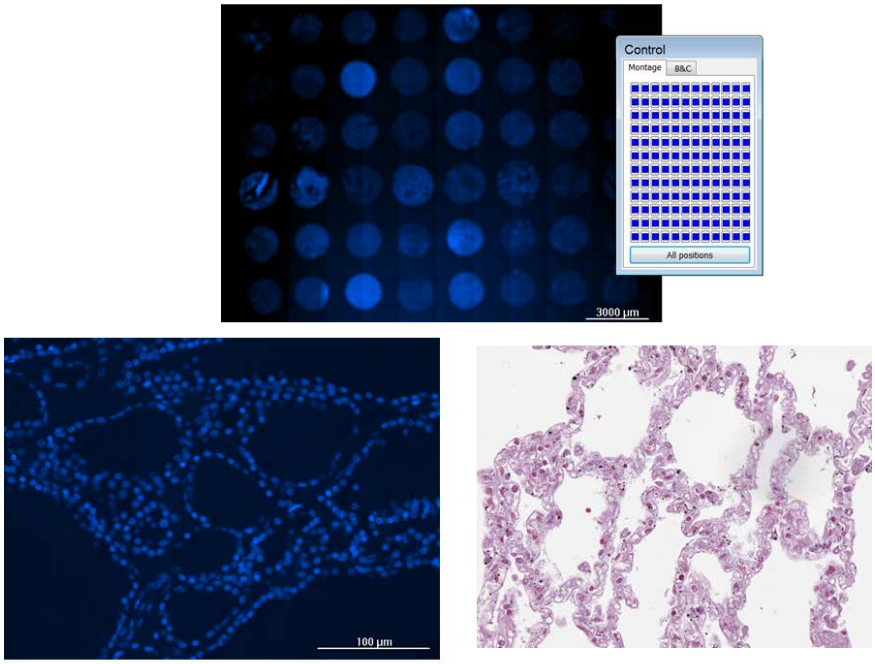


图 25. 废弃原型 TMA。由一个地区组织学实验室捐赠，用 DAPI 染色，并使用 Agilent BioTek Gen5 软件中的蒙太奇和拼接功能，通过 Agilent BioTek Cytation 5 在 4 倍放大倍率下进行成像（上图）。背景混浊可能是由于脱蜡不完全。左下图是同一阵列的单张 20 倍图像，右下图是同一阵列另一个切片的 20 倍 H&E 染色正常肺组织图像，通过独立光源在另一个显微镜上成像以进行比较（US Biomax，部件号 TH641）

结论

本应用简报证明了 Agilent BioTek Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统和 Agilent BioTek BioStack 4 微孔板储板器在高通量组织学应用的 H&E 染色 TMA 成像工作流程自动化方面的能力。有几个关键参数可以优化，以实现理想的图像分析和解析。对于 TMA 分析，关键是要记住 Cytation 5 从玻片底部成像，因此为了便于组织识别，玻片在适配器中的方向应为标签朝上，玻片在适配器中朝上的一面应与微阵列芯片的 ID 排列相匹配。

Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件内置的拼接和蒙太奇算法非常适合在彩色明场和荧光模式下以任何通量对组织微阵列芯片进行成像。通过优化蒙太奇尺寸、方块叠加尺寸、x,y 偏移和对焦选项，增强定制图像采集，有助于在单个批次中运行相同或不同尺寸的阵列。蒙太奇控制面板允许查看整个拼接图像或蒙太奇中每个方块的特写，以便对染色组织芯进行更详细的检查。在蒙太奇“所有位置”视图中直接双击目标区域，也可以显示单个方块。

需要时，在单个方案中包含多个读数步骤的能力允许在多个放大倍率或几何配置下“并行运行蒙太奇成像”，克服了以更高的通量对不同尺寸或具有不同 x,y 偏移的成像阵列的挑战，特别是当需要在更高的放大倍率下获得更大表面积的图像时。使用 15 × 15 蒙太奇网格进行 4 倍成像，每张图像自动对焦，并根据最大阵列配置自定义 x,y 偏移，发现这对捕捉 72 和 24 个 1.5 mm TMA 的所有组织芯最有利。更高密度的阵列可能需要 2.5 倍的放大倍率才能在单张拼接蒙太奇图像中捕捉到所有组织芯。结果表明，在 20 倍放大倍率下，15 × 15 的蒙太奇图像最适合对 1.5 mm 组织芯对进行成像，通过更大的视野范围提供更多详细信息，适用于对恶性组织芯以及与肿瘤相距 1.5 cm 的邻近组织芯进行并排成像等应用。在 40 倍的高放大倍率下，2 × 2 蒙太奇提供了四个方块，在 1.5 mm 组织芯样品的一部分上，它们一起覆盖了比相同放大倍率的单个图像更大的视野。如果希望从 40 倍蒙太奇图像中获得最终的拼接图像，可能需要自定义方块偏移，以优化方块叠加对齐。

通过 Cytation 5 提供的任何多功能成像选项（包括明场、彩色明场、相差、数字相差和荧光），这里显示的技术用于固定的人或动物细胞系、单个组织切片、部分或整个标本架或细菌和酵母弥散条带（例如）的各种显微镜玻片应用。

组织切片通常用 H&E 染色，以进行结构鉴定。使用 BioTek 显微镜对组织学和组织切片应用进行彩色明场成像的最新出版物包括：

1. Becker, W., Nagarkatti, M., and Nagarkatti P.S., miR-466a Targeting of TGF-β2 Contributes to FoxP3+ Regulatory T Cell Differentiation in a Murine Model of Allogeneic Transplantation. *Front.Immunol.9, 688,* **2018.** https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00688
2. Randolph,G.J., Bala, S., Rahier, J-F., Johnson, M.W., Wang,P.L., Nalbantoglu,I, Dubuquoy,L., Chau, A., Pariente, B., Kartheuser, A., Zinselmeyer,B.H., and Colombel, J-F., Lymphoid Aggregates Remodel Lymphatic Collecting Vessels that Serve Mesenteric Lymph Nodes in Crohn Disease. *American J Path. 186, 12; 3066-3073,* **2016**. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.026

所有 Agilent BioTek 成像仪都拥有荧光显微成像系统功能，可以采集和定量荧光染色和免疫荧光制备的玻片。此外，凭借 20 多种不同的预设滤光片和优化的 LED 耦合选择，以及定制滤光片组的能力，可根据成像需要选择各种荧光团。每个读数步骤均可采集四通道图像，以便与各种荧光团和免疫荧光标记进行复用。使用 Agilent BioTek 倒置显微镜进行荧光检测的出版物包括：

1. Antes, T.J., Middleton, R.C., Luther, K.M., Ijichi, T., Peck, K.A., Liu, W.J., Valle, J., Echavez, A.K., and Marbán, E., Targeting extracellular vesicles to injured tissue using membrane cloaking and surface display. *J. Nanobiotechnol. 16:61,* **2018**. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0388-4
2. Randolph,G.J., Bala, S., Rahier, J-F., Johnson, M.W., Wang,P.L., Nalbantoglu,I, Dubuquoy,L., Chau, A., Pariente, B., Kartheuser, A., Zinselmeyer,B.H., and Colombel, J-F., Lymphoid Aggregates Remodel Lymphatic Collecting Vessels that Serve Mesenteric Lymph Nodes in Crohn Disease. *American J Path. 186, 12; 3066-3073*, **2016**. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.026

参考文献

1. Gage, G.J., Kipke, D.R., Shain, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp. (65), e3564*
2. Shi S., Shi Y., Taylor C.R., Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Review and Future Prospects in Research and Diagnosis over Two Decades. *J. Histo & Chem. 59(1),* **2011**
3. Fischer A. H., Jacobson K.A., Rose J., Zeller R. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harb Protoc.,* **2014**
4. Sun ,Y., Duthaler, S. Nelson, B.J., Autofocusing in Computer Microscopy: Selecting the Optimal Focus Algorithm. *Microsc. Res. Tech. 65, 139-149,* **2004**
5. Groen, F. Young, I.T. & Lignart, G., A Comparison of Different Focus Functions for Use in Autofocus Algorithms, *Cytometry 6, 81-91*, **1985**
6. Yeo, T., Jayasooriah, R., Autofocusing for Tissue Microscopy. *Image Vis. Comput. 11, 629-639,* **1993**
7. www.biomax.us

了解更多信息：

www.agilent.com/lifesciences/biotek

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源，请访问：

community.agilent.com

安捷伦客户服务中心：

免费专线：**800-820-3278**

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。
RA44207.5998148148

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 2 月 1 日，中国出版
5994-3068ZHCN
AG020321_01

Agilent

Trusted Answers