



LEICA DM6000B

MetaMorph

影像軟體中文操作手冊

MICROSYSTEMS



Major Instruments Co., Ltd.



軟體擷取影像與分析方法

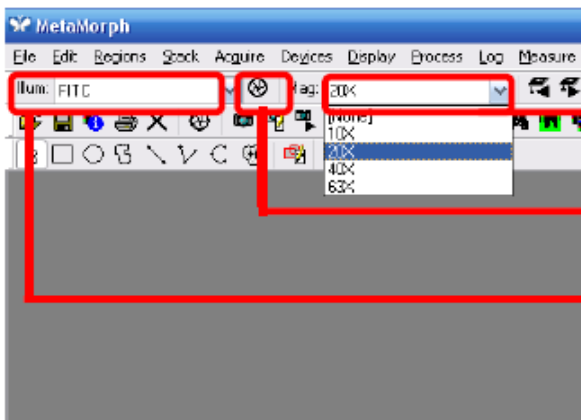
1. image acquisition 影像擷取
2. MultiDimensional acquisition 多維度影像擷取
3. Image bit Depth and Save 影像位元與存檔選取
4. Image Overlay 多色影像合併
5. Graphics 輸入文本
6. Calibrate Distance and Draw scale bar 刻度校正與影像刻度尺
7. Region measurement 測量圈選區域
8. Integrated Morphometry Analysis (IMA) 自動量測
9. Make Movie and Montage 影片製作與多張影像序列





image acquisition 影像擷取

1. 開啟MetaMorph程式
2. 在顯微鏡下找到目標後, 將光路切換至CCD
3. 切換光源及鏡頭

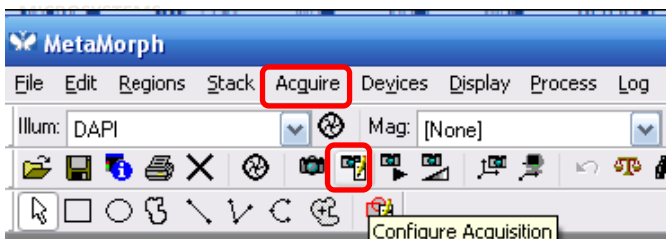


Mag : 點選此處下拉式選單, 以選取欲使用之物鏡倍率

滑鼠點選此處, 可控制螢光/穿透光快門開關

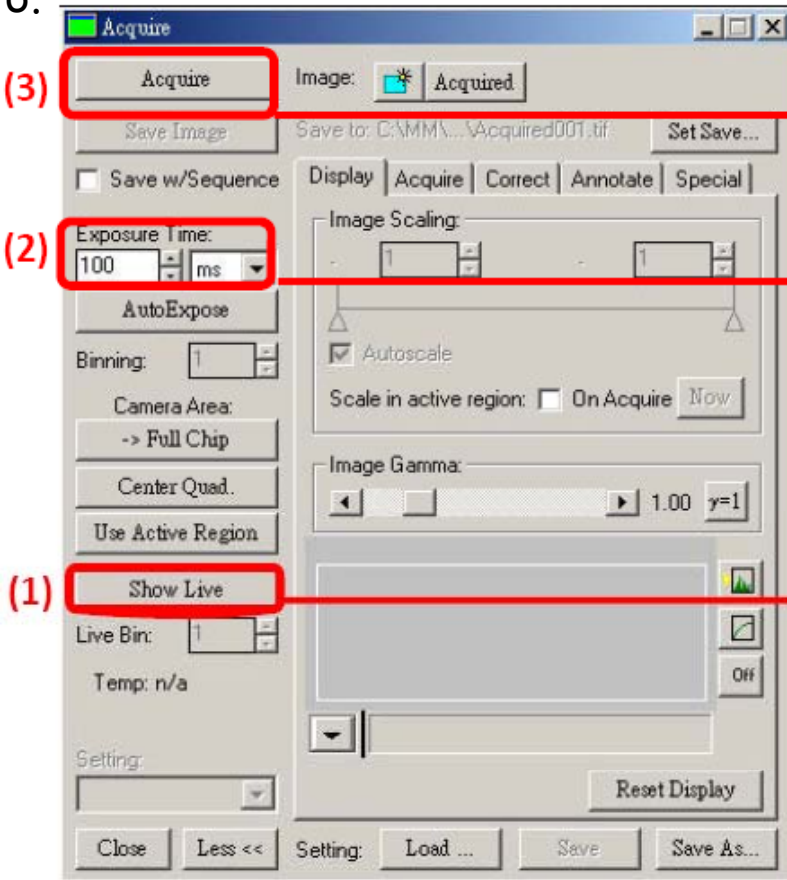
Illum : 點選此處以選擇欲使用之光源。
例如: **BF**- 穿透光, **FLUO**- 螢光專用

點選**Acquire**或**Configure Acquisition**快速鍵, 即可開始設定拍照參數





6.



(3) Acquire:

在Show Live 情況下,調整好曝光時間後,按下Acquire 則可將影像擷取下來

(2)

(2) Exposure Time:

設定CCD曝光時間,曝光時間越長,影像越亮,可直接輸入數字,或按上下箭頭調整

單位可為ms,s 或min

(1)

(1) Show Live:

即時預覽影像,若影像不清楚可再微調焦距

影像太亮或太暗時,調整曝光時間

Save Image 儲存影像

Save w/Sequence 自動依序儲存影像檔案

AutoExpose 自動曝光; 按此鍵CCD 會自動檢測最適當的曝光時間

Binning 可設定儲存影像之顯像方式, 通常為1. 數值愈大, 解析愈差.

Camera Area :

Full Chip 以整個CCD Chip 面積擷取影像

Center Quad. 以Chip 的中央四分之一面積擷取影像

Use Active Region 以自訂任意Chip 面積擷取影像

Show Live 顯示即時影像

Live Bin 當欲快速找到目標時使用. 通常設為2. 數值愈大, 速度愈快, 解析度愈差.

Image 顯示擷取影像所放位置

Set Save... 設定影像儲存

Display

Image Scaling: 調整影像對比情況, 通常明視野時設定為Autoscale; 螢光則建議取消Autoscale 並將箭頭移至左右最旁邊,再依影像情況,將背景調黑.

Image Gamma: 調整影像亮度分佈情況, 通常設定為1.00



Major Instruments Co., Ltd.



Multidimensional acquisition 多維度影像擷取

Apps → Multidimensional Acquisition

MICROSYSTEMS

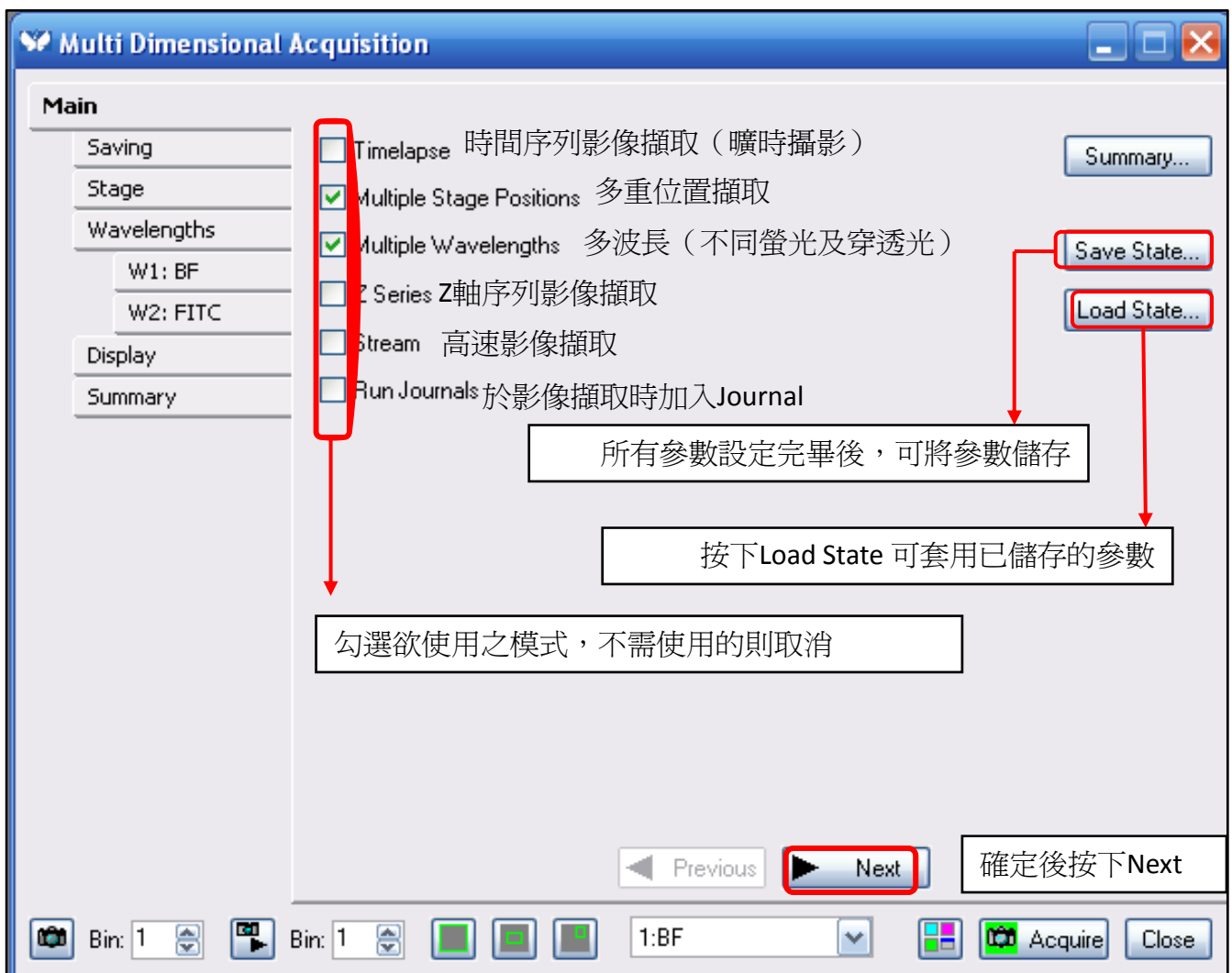
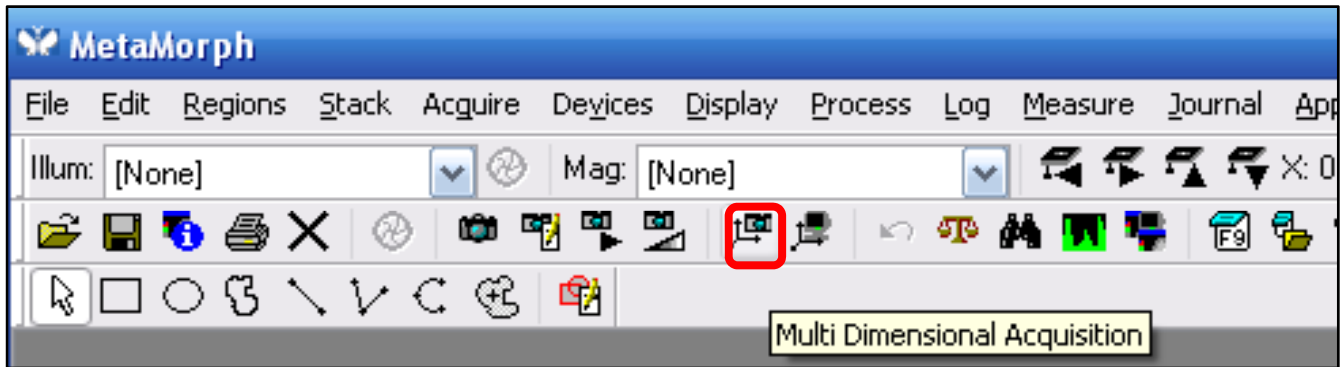


Major Instruments Co., Ltd.



Multi Dimensional Acquisition 多維影像擷取

- 點選快速鍵，或 Apps → Multi Dimensional Acquisition





Saving

Multi Dimensional Acquisition

Main

Saving

Stage

Wavelengths

W1: BF

W2: FITC

Display

Summary

Description: "Images automatically saved with base file"

Multi Dimensions Experiment

Select Directory.. D:\MM Test 0306

Increment base name if file exists

Base Name: Experiment14

選擇存檔位置

可自行決定檔名

勾選此處，則軟體於存檔時會自動累加
Ex：第一次擷取的影像為Experiment 01
下次擷取則自動存取為Experiment 02

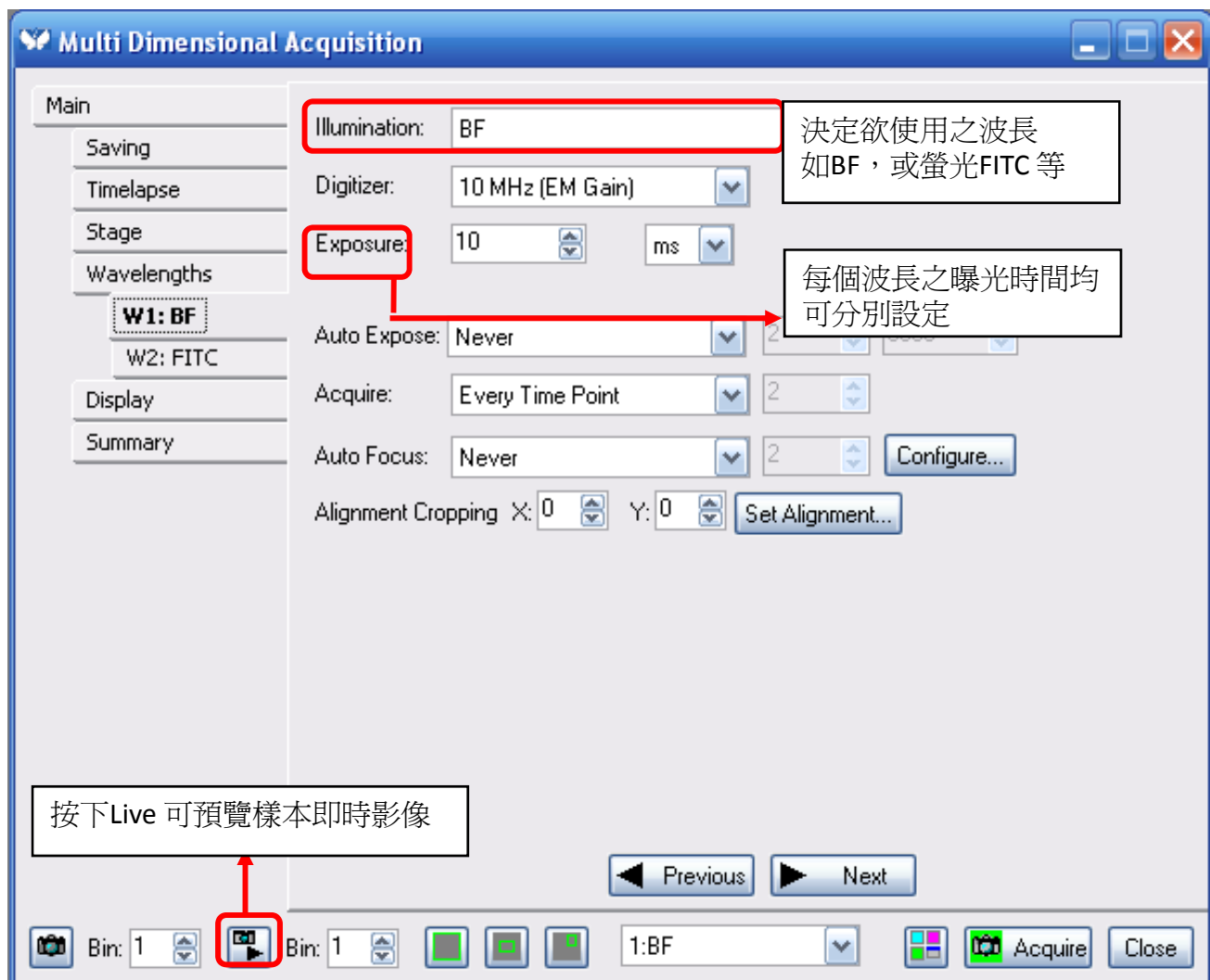
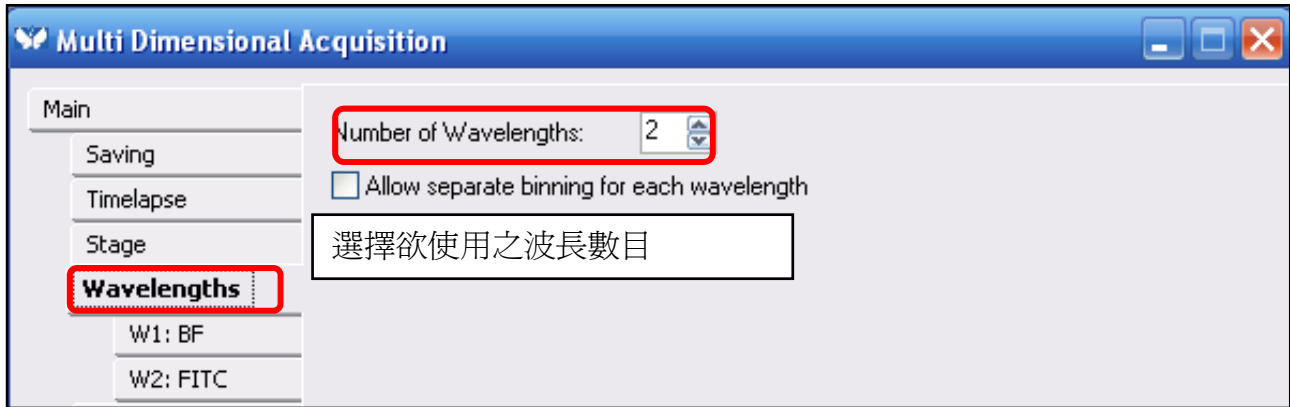
MICROSYSTEMS



Major Instruments Co., Ltd.



Wavelengths 多波長擷取





Z Series 多重Z 軸擷取

Multi Dimensional Acquisition

Main

- Saving
- Timelapse
- Stage
- Wavelengths
 - W1: 1. DAPI
 - W2: 2. FITC
- Z Series**
- Display
- Summary

Interactive settings

Current Position: 0 Steps Increment: 1

Settings for acquisition series

Loop order

- Acquire wavelength set at each Z
- Acquire Z series for one wavelength at a time

Keep shutter open between steps

Range: 10 Range Around Current

Top: 5 Bottom: -5

Step Size: 1

Number of Steps: 11

Recommended Step Size: 0.9 um

The Z of each stage position will be the center position for each Z Series.

Previous Next

Bin: 1 Bin: 1 2:2. FITC Acquire Close

決定z 軸和不同波長的順序

1. 同一個Z 平面。將不同波長擷取完成
2. 同一個波長的Z 平面先擷取完成，再進行下個波長

以目前的Z 軸位置為中心
擷取一段Z 軸範圍
EX：Range 10 即為以目前位置為中心，向上及向下共擷取10um的範圍

Z 軸間隔寬度

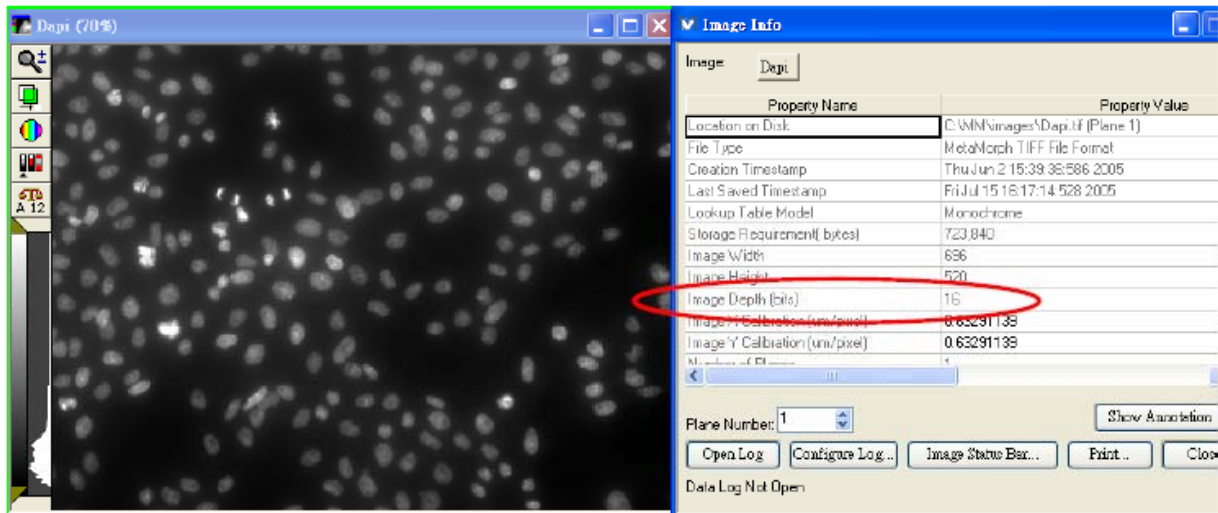
所有參數設定完成後
便可按下Acquire 開始擷取影像



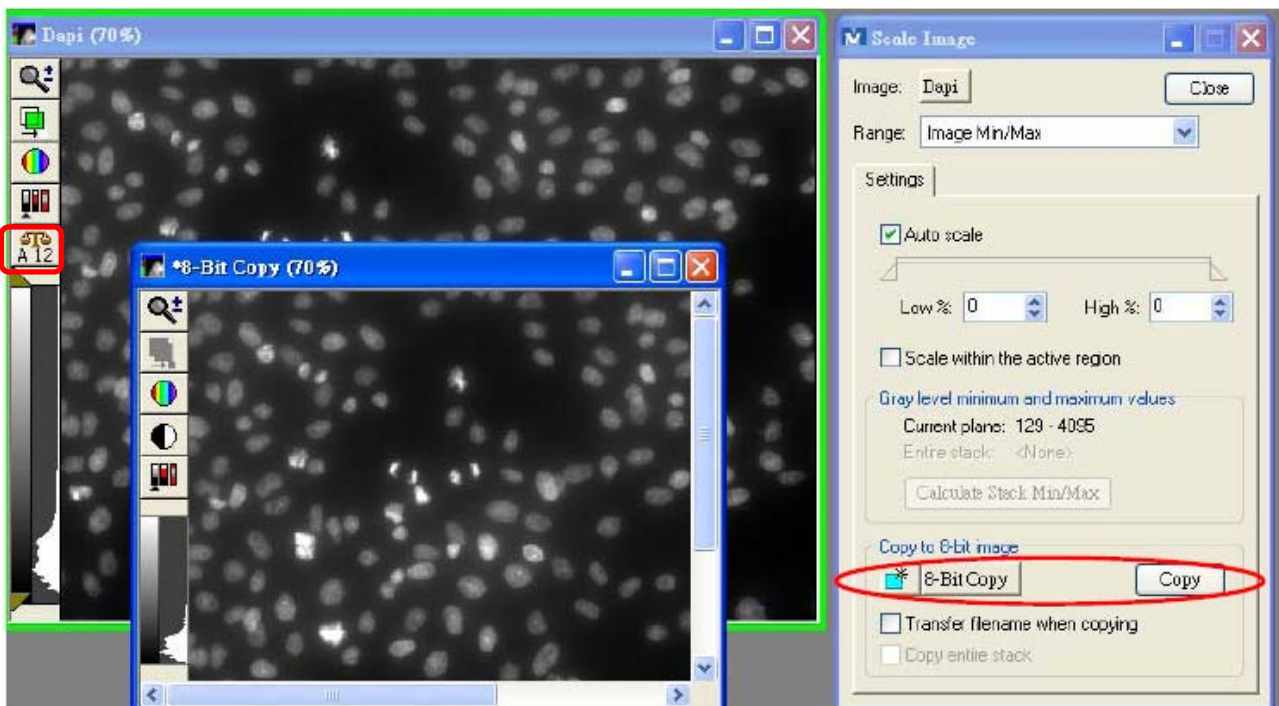


Image bit Depth and Save 影像位元與存檔

因為CCD所拍出的影像檔案位元的不同,在MetaMorph系統內設定為16位元的圖片,若是想轉為可在一般軟體開啟的檔案,8位元或是24位元,可用以下幾種方法:



1. 8位元轉檔 Display的地方選取Scale Image





2. 24位元轉檔 可將單色的圖檔先用LUT套色,Edit的地方選取 **Duplicate -> As Display**再轉成24位元的彩色圖檔
(在執行此動作之前要先將要轉檔的影像放大至100%,如此轉檔完的圖檔才會和原始檔案大小相同)

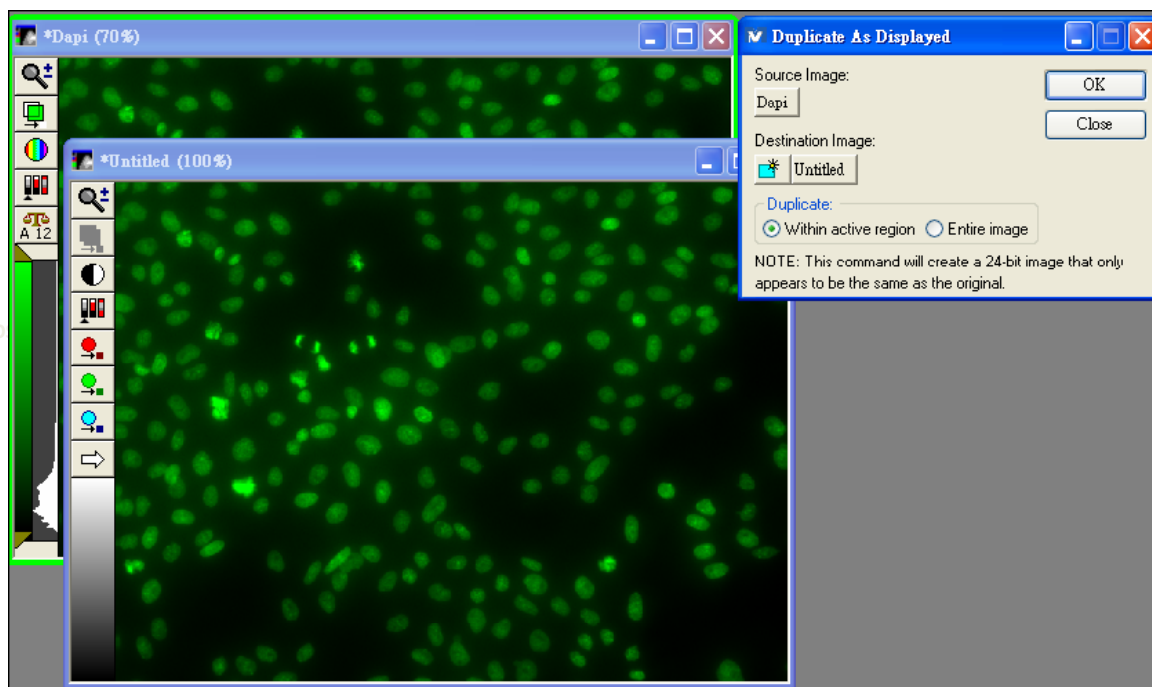
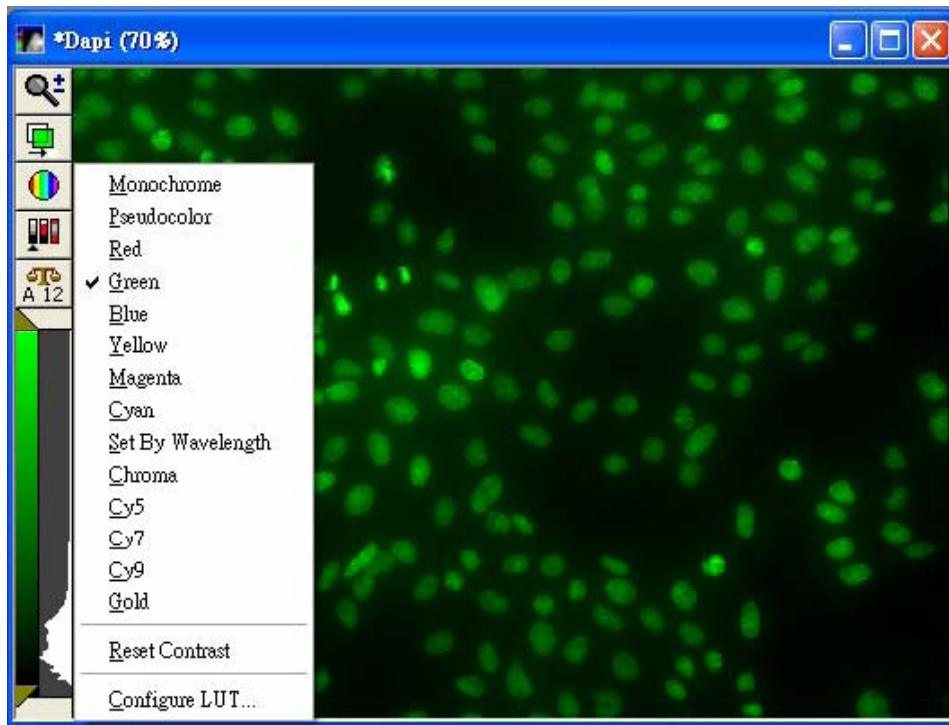
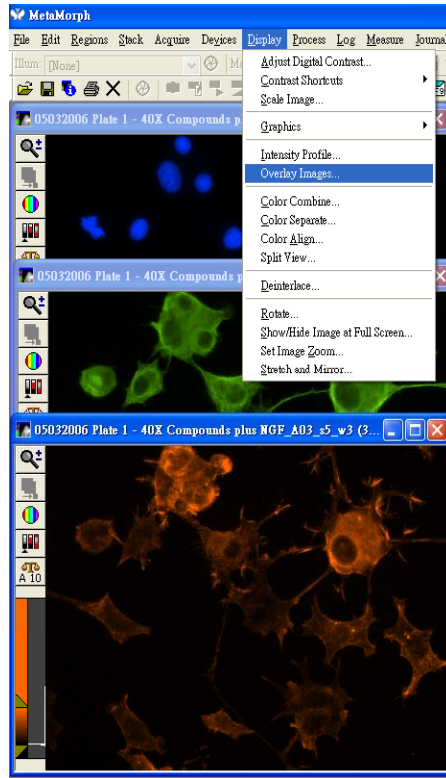




Image Overlay 多色影像合併

1. 開啟要重疊的所有影像後，選擇 Display → Overlay Image



2. Overlay Image 視窗開啟

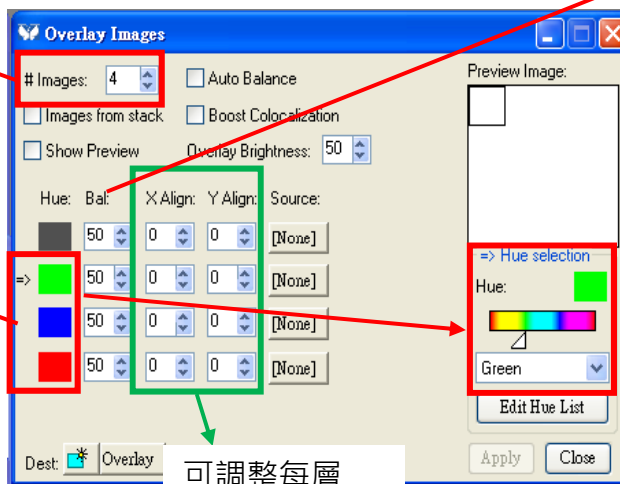
可調整每層顏色顯示的亮度

選擇疊圖層數 (幾種顏色)

PS: 穿透光為軟體預設值一定會存在，若沒有穿透光影像則在影像來源選項選None即可

MICROSYSTEMS

可在Hue selection 選擇要顯示的顏色



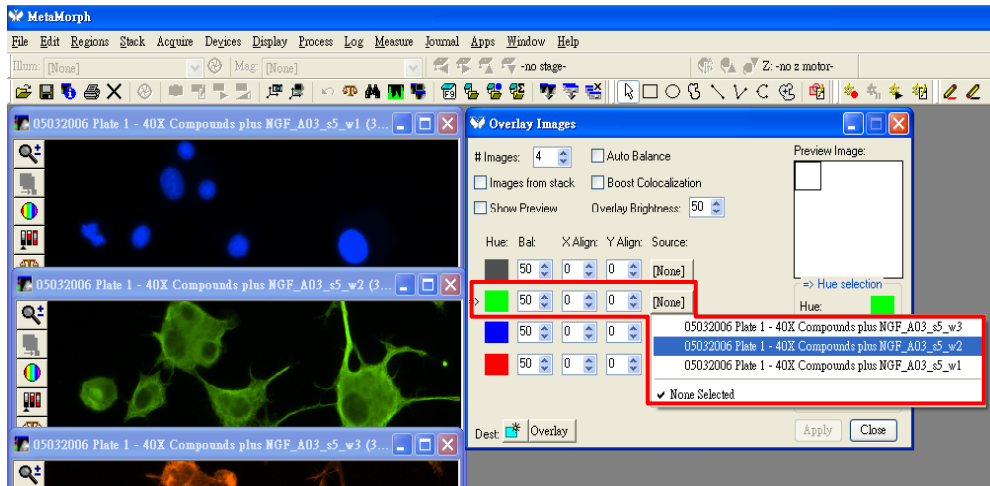
可調整每層 X,Y 的位置



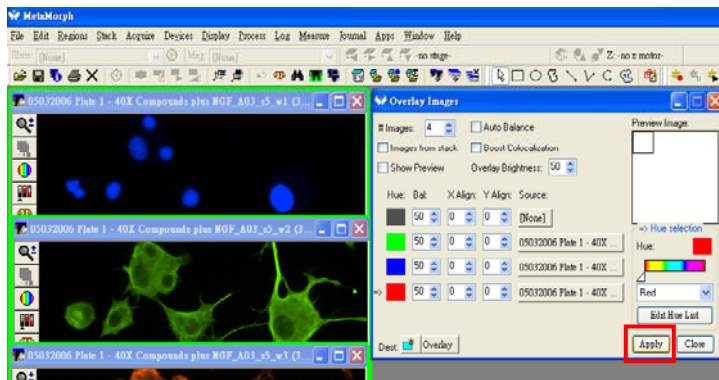
Major Instruments Co., Ltd.



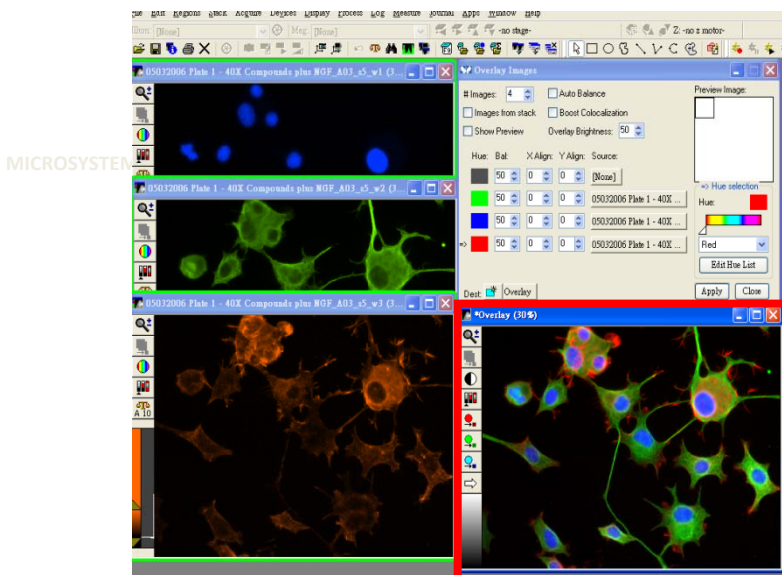
3. 在每層顏色選擇正確的影像來源



4. 選擇完後，按下Apply



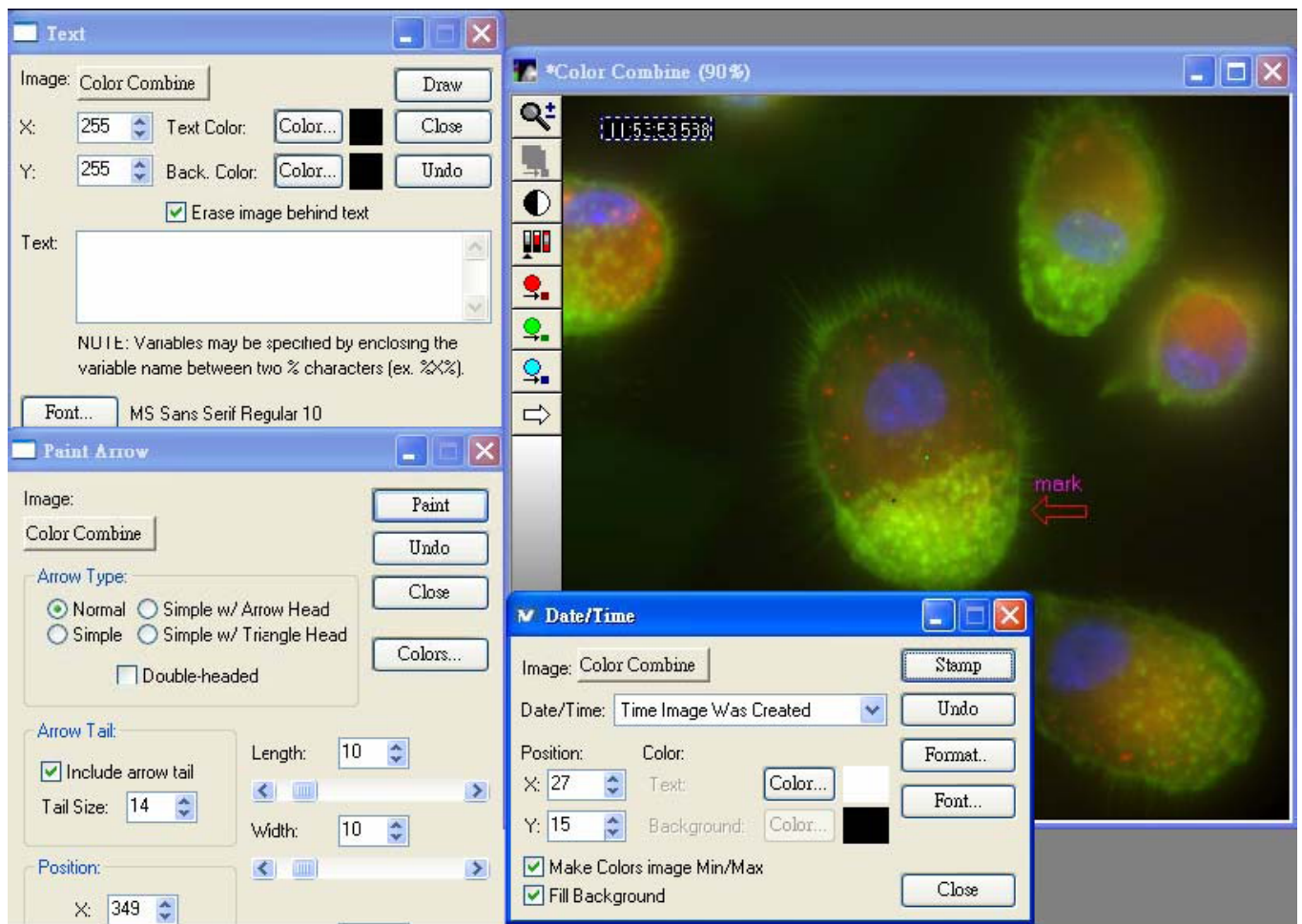
5. 則會出現影像檔名為Overlay重疊的圖





Graphics 輸入文本

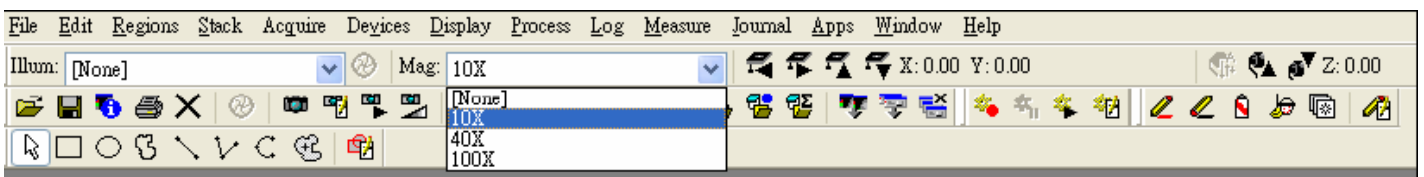
1. 輸入箭頭: Display的地方選取Graphics -> Paint Arrow
2. 輸入註解: Display的地方選取Graphics -> Text
3. 輸入日期時間: Display的地方選取Graphics -> Date / Time
點選Color處可以自選所要標訂的顏色



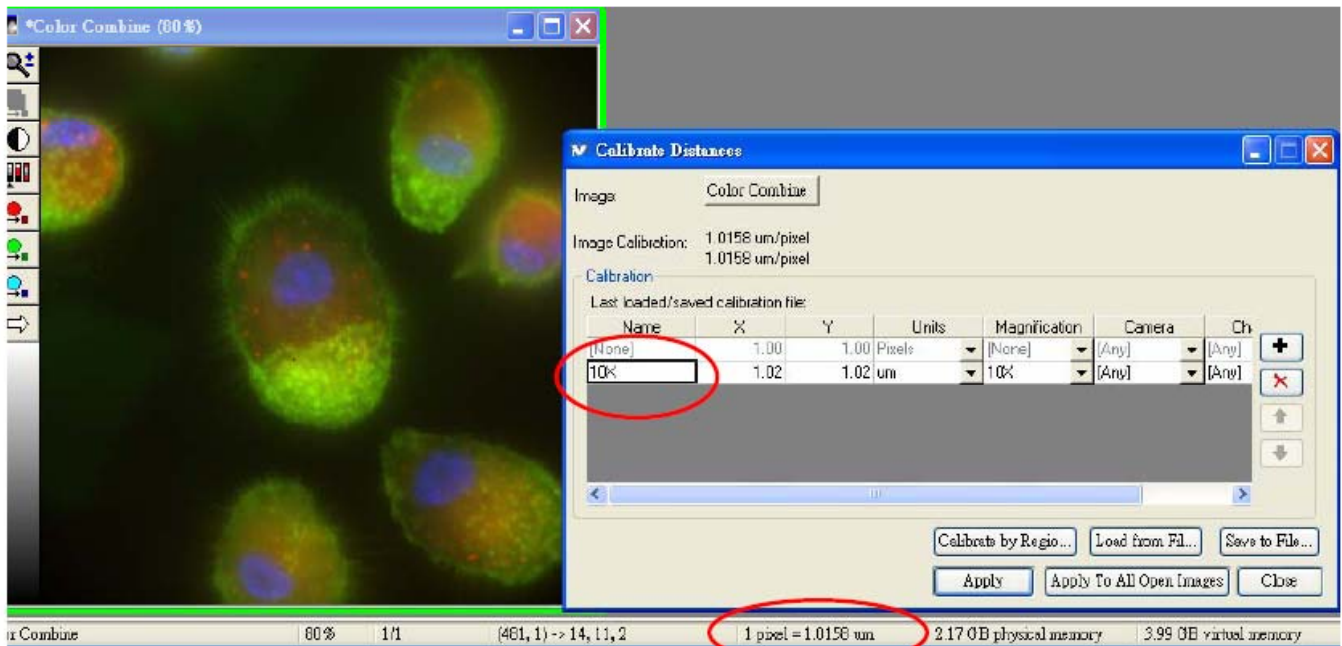


Calibrate Distance and Draw scale bar 刻度校正與影像刻度

1. 開啟MetaMorph軟體
2. 若是在拍圖的時候有選取對應的鏡頭，所擷取的影像圖就有做過刻度校正



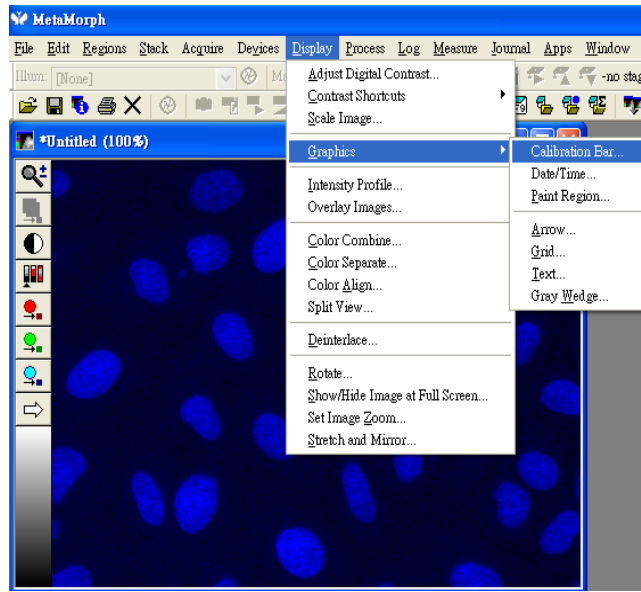
3. 若是無校正的圖，可選取Measure選項裡Calibrate Distance
4. 選取所用的鏡頭倍率，按下Apply
5. 圖片下方會出現正確的刻度





畫出Scale Bar

1. 開啟要加上Scale Bar 的影像後，選擇Display → Graphics → Calibration Bar



2. Calibration Bar 視窗開啟，設定所要顯示Calibration Bar的樣式

設定顯示的Bar的大小

設定顯示的Bar的厚度

Bar顯示方式: 水平或垂直

選擇Bar的外框顏色

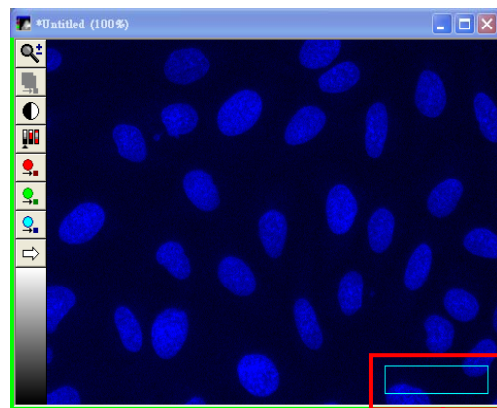
選擇Bar的內部填充顏色

選擇標示的文字的顏色

選擇文字背景的颜色

選擇文字字型

Image: Untitled
 Label: 50 um
 Bar size (um): 50
 Thickness (pixels): 7
 Bar Orientation:
 Horizontal X: 348
 Vertical Y: 309
 Bar border color: Color...
 Fill interior area of bar Color...
 Draw label onto image Color...
 Erase image behind label Color...
 Font... MS Sans Serif Regular 12

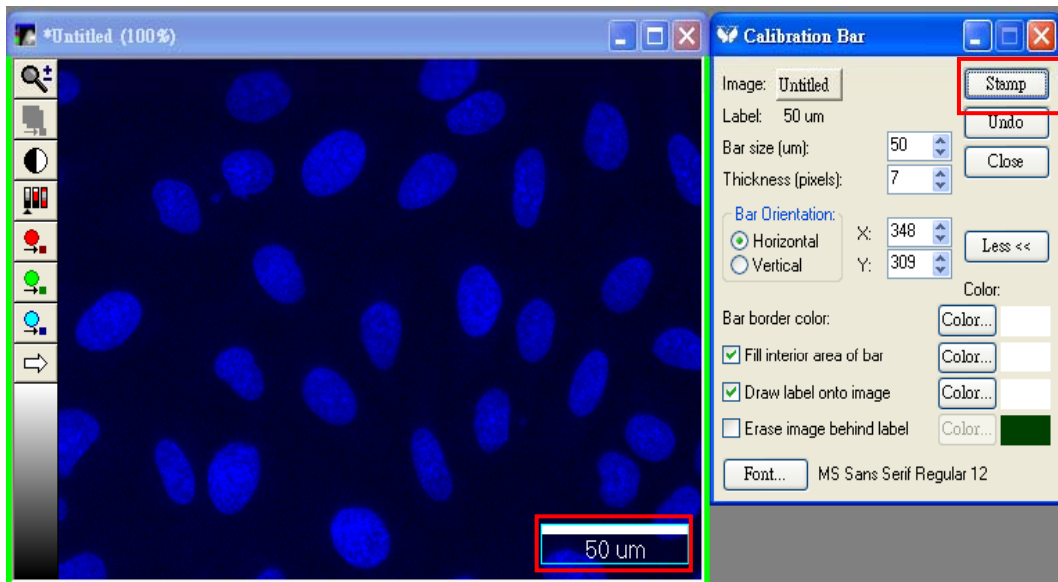


可移動此方框來決定Scale Bar要擺放的位置





3. 設定好所要顯示Calibration Bar的樣式，點選Stamp後Calibration Bar則會顯示在影像上



Scale Bar貼上後若要更改，一定要先點選Undo後再做更改
(因為軟體Undo只能回復到上一步，即只能回復一次)

若影像為24 bit 圖檔加上的Scale Bar 可為彩色的
若影像為8 bit或16 bit單色圖檔則Scale Bar只能呈現單色顏色



Region measurement 測量圈選區域

1. 進入MetaMorph
2. 打開欲測量的影像檔案
3. 選取區域工具
4. 在影像上圈選待測量的區域
5. Measure的地方選取Region Measurement
6. 若要將數據輸出，點選Open Log, 點選DDE會連結到Excel, 再按Log Data便將數據輸出

The screenshot displays the MetaMorph software interface. The main window shows a color-merged image of cells with several regions of interest (ROIs) outlined in different colors (green, yellow, red, blue). The 'Region Measurements' dialog box is open, showing a table of measurement data. The 'Open Log' button is circled in red. Below the table, the 'Open Data Log' dialog box is also visible, with the 'Dynamic Data Exchange (DDE)' option checked and circled in red.

Region Label	Image Plane	Area	Distance	Average Intensity	Intensity Standard Dev
1	1	17231	472.14	38.868	20.4211
2	1	24960	632	30.5978	24.857
3	1	2271	172.065	53.7591	20.3102
4	1	2177	168.152	53.0804	14.7308
5	1	4352	264	88.7353	22.8894
6	1	9408	392	34.4224	15.6438

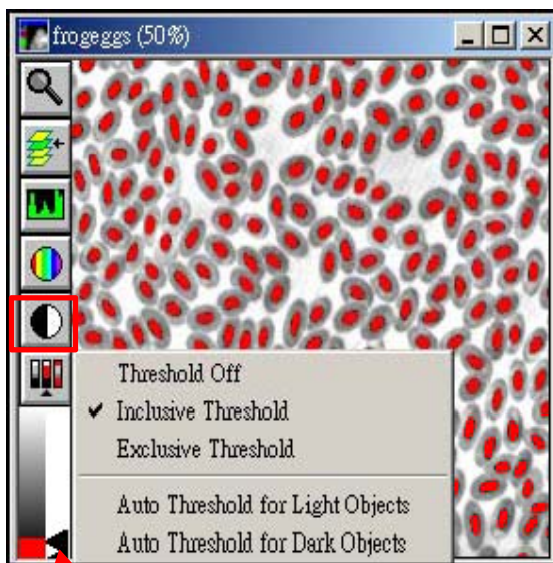




Integrated Morphometry Analysis (IMA) 自動量測

在使用IMA之前要分析的影像要先經過Threshold處理

1. 開啓要分析的影像, 點選要使用Threshold的方式
Thresholding 的步驟. 主要是依據灰階, 將欲量測部份先加上虛擬顏色, 再將加上顏色的部份拿去量測



可移動此鍵號來將所要分析的區域套上虛擬顏色

2. 點選 Measure → Integrated Morphometry Analysis, 按下 Measure 即可

Object Data: 可看每一個物件的分析結果

Object #	Total area	Average intensity	Intensity center X	Intensity center Y	Perimeter	Centroid X	Centroid Y
1	111.000	1.919	13.704	5.549	41.556	14.910	3.568
2	62.000	1.694	70.286	3.429	29.899	69.677	2.355
3	151.000	1.570	141.367	10.595	51.213	139.636	9.901
4	126.000	1.762	183.473	5.284	44.142	183.524	3.484
5	47.000	1.723	214.741	3.185	25.899	216.383	2.574
6	30.000	0.600	297.500	0.333	23.657	293.500	0.667
7	50.000	3.120	403.577	3.250	29.071	404.100	1.620
8	79.000	1.671	477.977	4.932	32.142	479.823	3.228
9	134.000	0.985	256.068	10.909	46.142	256.254	12.776
10	132.000	0.523	367.522	8.043	40.385	366.924	9.682
11	152.000	1.717	334.310	13.632	48.042	334.184	13.658
12	126.000	0.952	239.675	13.900	44.142	238.976	15.944
13	135.000	2.400	465.685	15.028	42.670	464.037	14.170
14	130.000	7.021	167.307	19.670	42.712	169.072	19.716

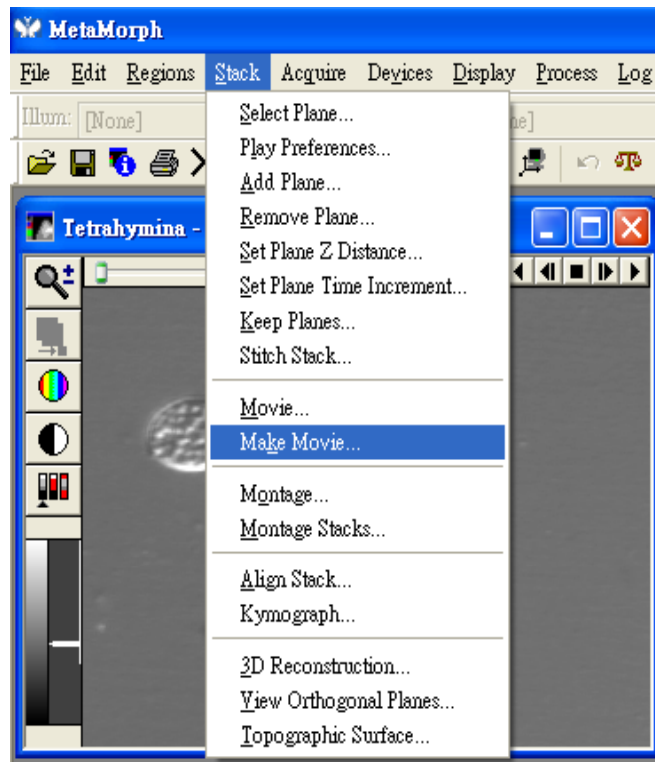
Summary: 可看總結結果

Summary	Area	Average	Total	Shape factor	Width	Height
Count	265	265	265	265	265	265
Average	127.679	1.624	203.004	0.875	12.660	14.170
Std. Dev.	25.845	0.591	74.256	0.084	2.762	3.228
Minimum	4.000	0.028	3.000	0.566	1.000	2.574
Maximum	169.000	5.250	402.000	1.000	19.000	20.000
Total	33835.000	430.283	53796.000	231.822	3355.000	3879.000

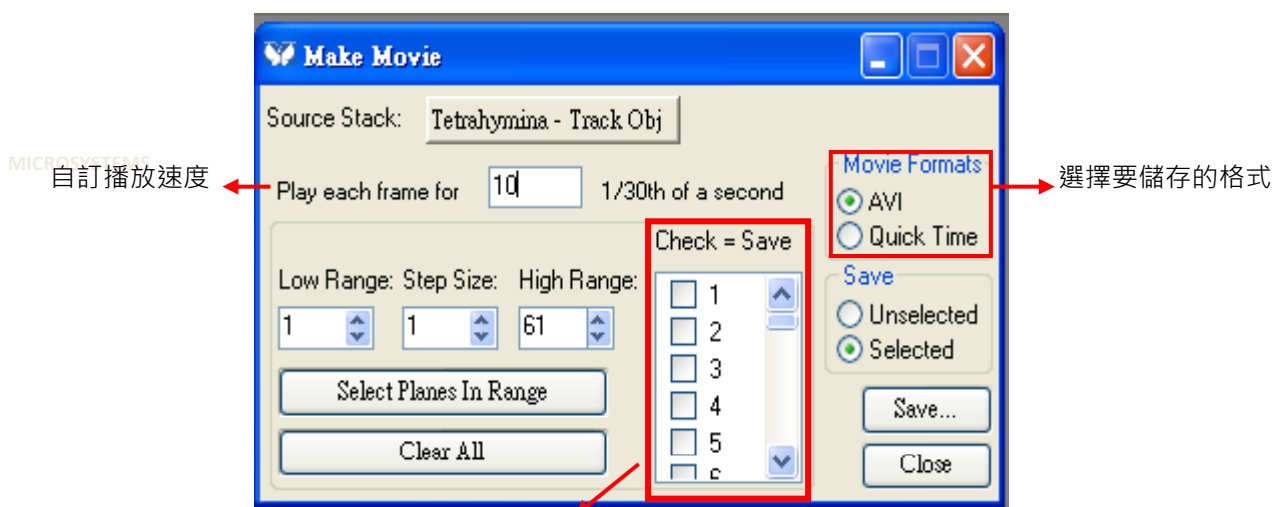


Make Movie and Montage 影片製作與多張影像序列

1. 開啟一個Stack 檔案後，點選Stack → Make Movie



2. Make Movie視窗開啟

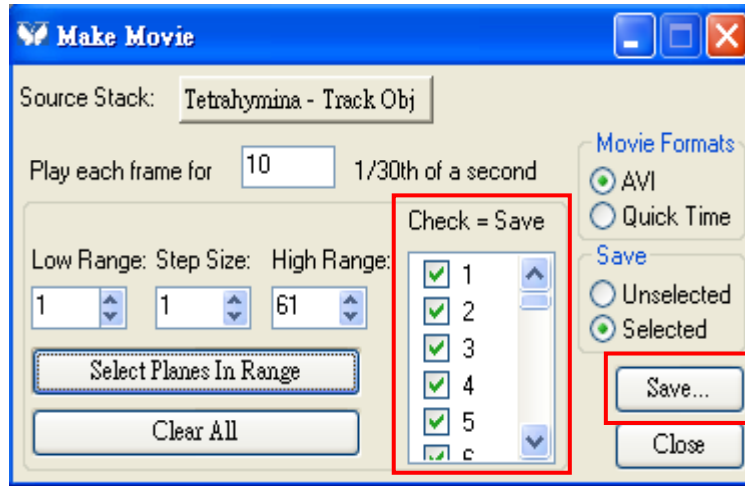


選擇要做成動畫檔的單張影像

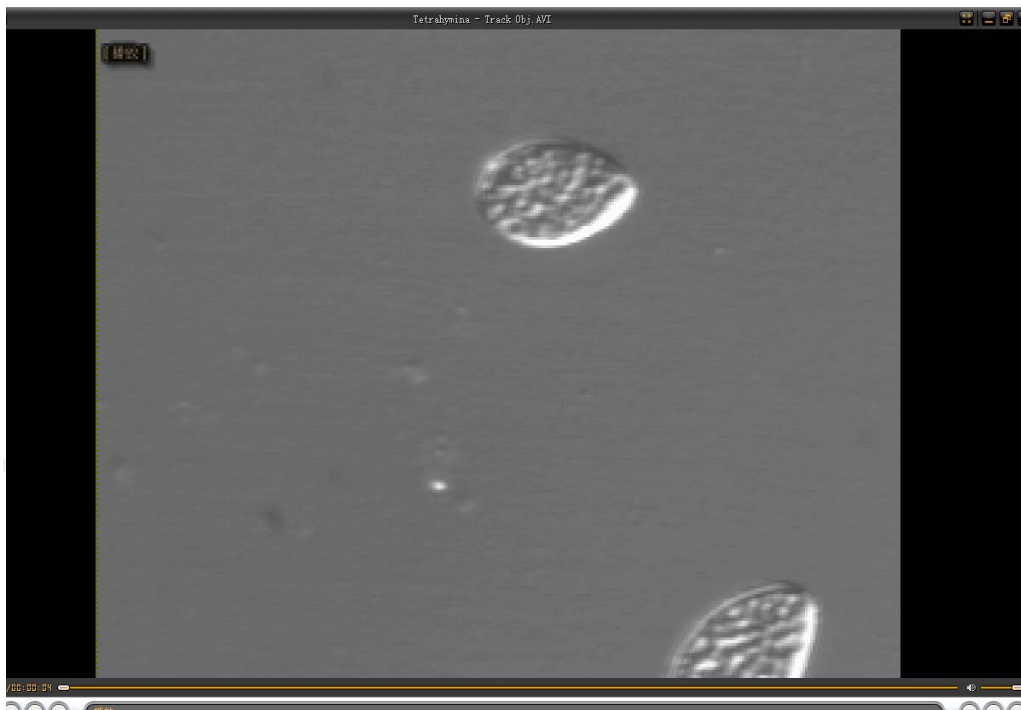




3. 選擇完要做成動畫檔的單張影像後，按下儲存



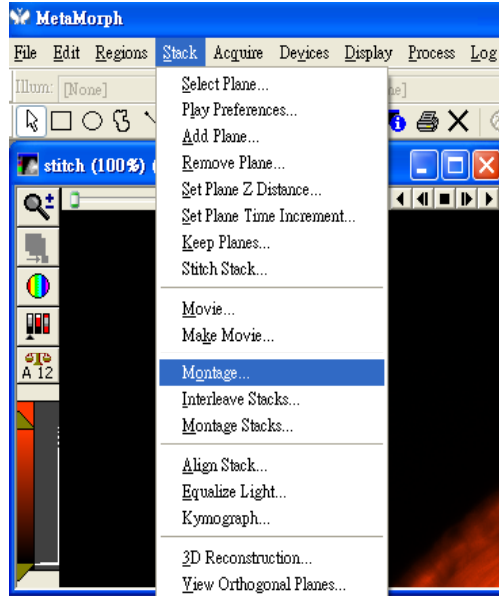
4. 則軟體自動會形成一個動畫檔



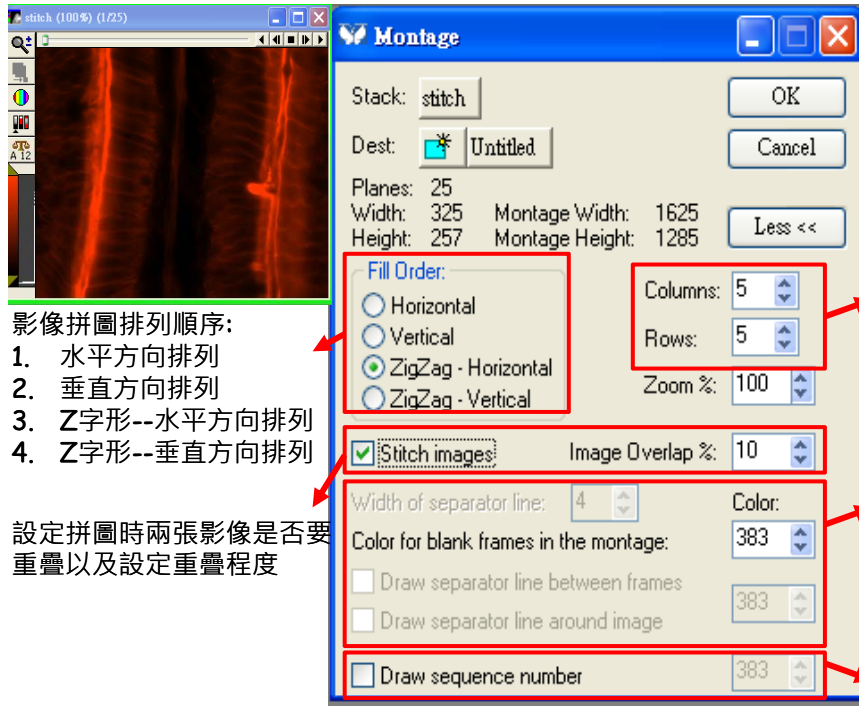


Stack檔案也可將影像做成序列圖

1. 開啟一個stack檔後，選擇 Stack → Montage



2. Montage視窗開啟



- 影像拼圖排列順序:
1. 水平方向排列
 2. 垂直方向排列
 3. Z字形--水平方向排列
 4. Z字形--垂直方向排列

設定拼圖時兩張影像是否要重疊以及設定重疊程度

設定拼圖行數及列數

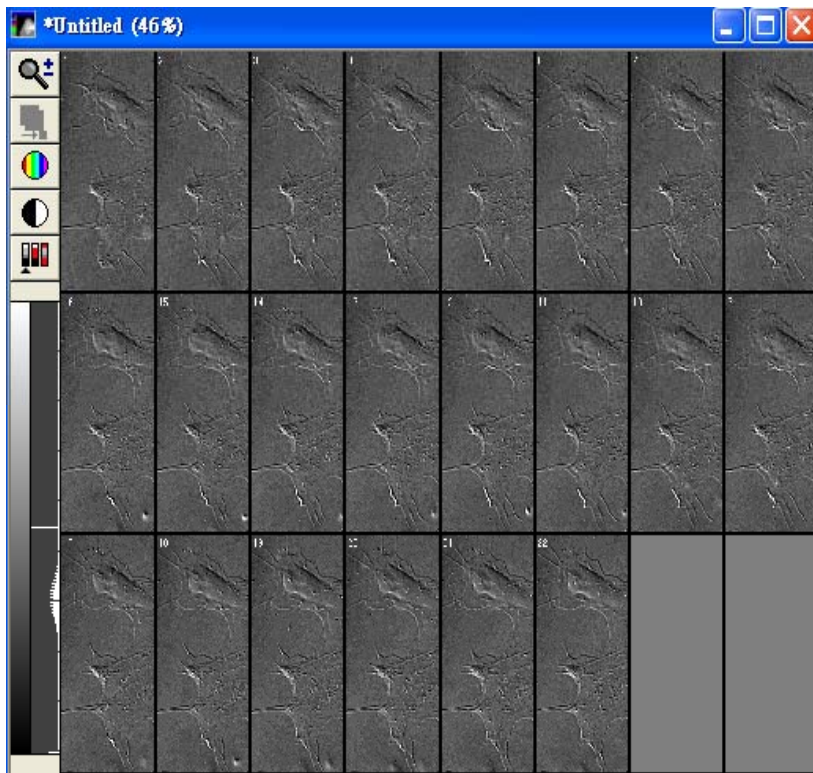
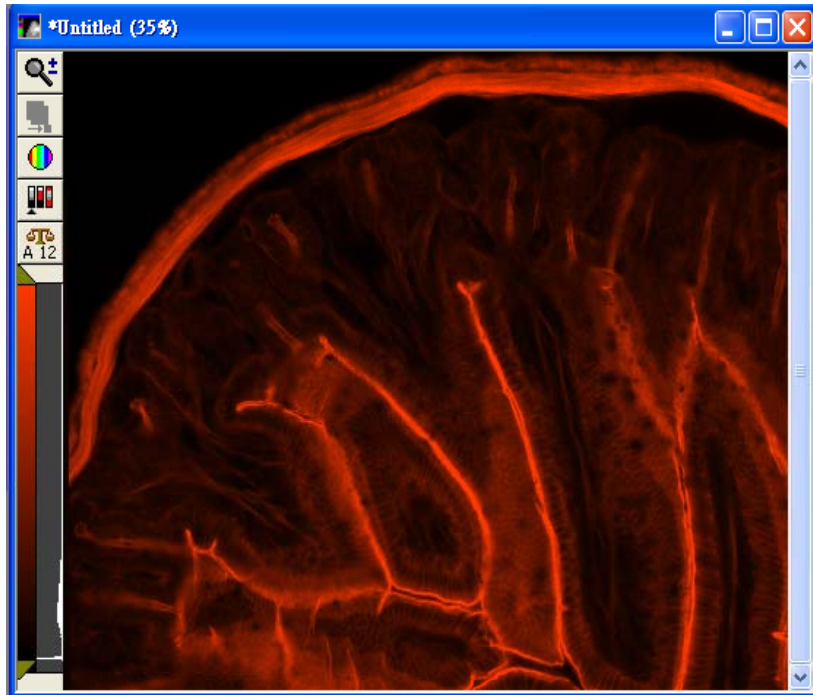
設定每張影像間是否需要分隔線

設定是否要顯示影像數字順序





3. 設定好後按下OK則軟體會自動進行拼圖動作



MICROSYSTEMS



Major Instruments Co., Ltd.