

基于成像的全自动 细胞筛选和分离

CellSelector
成像与图像分析

明场、荧光、扫描和图像处理

- 明场、相差、荧光和光照强度
- 孔扫描、自动对焦和曝光时间
- 阈值、多参数检测、图像圈描和形态滤光片
- 在线和扫描阴影校正、图像叠加和测量、颗粒检测、高感光度模式

CellCelector 明场和荧光

CellCelector Flex 的光学单元由一个倒置的荧光显微镜、一个制冷 CCD 相机和一个电动定位载物台组成。该载物台的灵活性高，能够确保即使是最复杂的细胞结构，也能在明场、相差或荧光成像下进行观察，另外，提供的标准和定制化滤光片几乎适用于任何一种市售荧光染料。

显微镜相机

CellCelector 使用数码显微镜相机是帕尔贴（Peltier）冷却 CCD 相机，分辨率和感光度更高，具体性能如下：

- 1376 × 1032 像素分辨率
- A 6.45 μm 螺距传感器
- 14 位动态范围
- 全分辨率下每秒 28 帧
- 曝光时间为 100 μs-160 s 不等
- 有 2×2、4×4 和 8×8 三种像素组合模式

CellCelector 提供两种显微镜相机：一种为标准的荧光显微镜，另一种则涵盖完整的荧光染料光谱范围，包括发射光在近红外区域的荧光染料。

明场和相差成像

可使用明场成像轻松识别细胞结构，然后将其叠加在彩色荧光图像上，使颗粒结构更为明显。当样品为透明、无色或具有非常精细的细节时，首选相差成像，效果优于明场成像。

荧光成像

光线通过 3 mm 的液芯光导管从荧光灯源传入显微镜，并向样品上方转移。有两种不同的荧光光源供选择：

- 6 个带激发滤光片的 LED，以生成所需激发波长的光
- 单一的白光光源能够产生一致的白光光谱

滤光片选择

根据荧光光源的不同，有三种发射光滤光片套件可供选择：

- 单荧光通道：独立的发射滤光片套件
- 1 个单一的多波段发射光滤光片，以更快的速度进行荧光切换和检测
- 带有 8 个单波段发射光滤光片位置的滤光轮，用于自动选择特定的发射波长，最大限度减少荧光染料之间的潜在交叉

荧光染料选择

因此，根据仪器的配置，最多可以同时使用 5 个荧光通道（表 1），总共可以串联使用 14 种不同的荧光染料。软件中预先储存有各类市售的常规染料，设置实验室可直接选用，其他的荧光染料可以手动输入或批量导入软件中。设置好染料类型后，对应的激发和发射滤光片会自动进行匹配；如果是手动添加的荧光染料，只需简单从软件中添加对应的滤光片即可。

光照强度

荧光激发光强度可以根据源材料的荧光特性而更改，以便对暗淡的荧光对象进行调节，如果是光敏染料存在光漂白风险，建议降低光强度。光照强度以最大强度值的百分比表示。

物镜

有不同的荧光和非荧光物镜可供选择，范围为 1.25x 至 40x（表 2）。选择正确的物镜时，有两个主要考虑因素：

- 焦距：物镜与细胞之间的距离。具有大焦距的物镜可以在滤膜或高于板底的更大距离处观察细胞。
- 焦深：物镜的放大倍率越高，图像的焦深就越低（即物镜成像越清晰、聚焦的图像面积就越小）

光照通道	激发 (nm)	发射(nm)	荧光染料示例
明场			
相差			
蓝色	395 25	434 32	DAPI, Hoechst, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405
绿色	475 28	519 26	GFP, Alexa Fluor 488, FITC, Cy2
红色	555 28	595 33	Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, TRITC, Cy3, PE, mKO, mOrange, TR, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, mCherry, Cy3.5
远红光	635 22	680 40	Alexa Fluor 647, APC, Cy5
近红外光谱 (NIR)	730 40	810 90	Alexa Fluor 750, Cy7

表 1. 不同荧光和非荧光通道概览，适用于 5 个荧光通道的选项，并罗列了部分可用的荧光染料。

	物镜	光照	数值孔径 (NA)	焦距 (WD)(mm)	分辨率/像素	应用示例
荧光	1.25 ×	BF 和 FL	0.04	5.0	8 μm	低倍率细胞概况扫描
	2 ×	BF 和 FL	0.08	6.2	5 μm	大型类器官或集落
	4 ×	BF, PhC 和 FL	0.13	17	2.5 μm	干细胞、克隆挑取、细胞球、类器官
	10 ×	BF, PhC 和 FL	0.30	10	1 μm	细胞株开发或单细胞克隆
	20 ×	BF, PhC 和 FL	0.45	6.6 – 7.8	0.5 μm	细胞内部观察
	40 ×	BF 和 FL	0.60	2.7 – 4.0	0.25 μm	细胞内部观察
无荧光	1.25 ×	BF 和 FL	0.04	5.0	8 μm	低倍率细胞概览
	2 ×	BF	0.06	5.8	5 μm	大型类器官或集落
	4 ×	BF 和 PhC	0.13	16.4	2.5 μm	干细胞、克隆挑取、细胞球和类器官
	10 ×	BF 和 PhC	0.25	8.8	1 μm	细胞株开发或单细胞克隆
	20 ×	BF 和 PhC	0.40	3.2	0.5 μm	细胞内部观察
	40 ×	BF 和 PhC	0.55	2.2	0.25 μm	细胞内部观察

表 2. 不同荧光和非荧光物镜及相应的数值孔径和焦距规格概览。BF：明场，FL：荧光，PhC：相差。

显微镜载物台

显微镜载物台包含两个用于沿 X 和 Y 轴移动的马达，可根据软件的设置自动移动。此外，该载物台还可以使用操纵杆手动定位，以快速识别感兴趣的单个细胞或集落。

载物台延迟

在扫描过程中，源板内的液体会随着显微镜载物台位置的变化而移动，移动程度也要视其他变量而定，如孔的大小、深度和培养基体积。为了在相差下获得均一的孔扫描，需要使整个孔内的培养基保持均匀的厚度。可以在载物台移动和随后的图像记录之间设置一个延迟，使孔内液面平稳且一致时进行成像，从而生成最佳的图像。

显微镜载物台（源板）适配器

CellSelector 的一个主要特点是兼容所有类型的实验室细胞培养容器，以便后续挑取。不需要独特或昂贵的耗材。因此，我们开发出了多种显微镜载物台适配器，以确保最大的灵活性（表 3）。

至少需要一个适配器, 以方便进行扫描。适配器包括：

- 培养皿适配器
- 标准微孔板适配器
- 纳米孔板适配器
- 载玻片适配器

所有的适配器均可通过弹簧夹精确且稳固地嵌入载物台，其结构经过专业的设计，可安全地固定所有尺寸的微孔板和培养皿，防止目标器皿在载物台上意外移动，并有利于进行准确成像和目标对象转移。

适配器类型	尺寸规格	适配器能够固定
培养皿	35 mm	两个直径在 32-40 mm 之间的培养皿
	50 mm	一个直径在 48-50 mm 之间的培养皿
	60 mm	一个直径在 52-55 mm 之间的培养皿
	89 mm	一个直径在 82-88.5 mm 之间的培养皿
	90 mm	一个直径在 87-88.5 mm 之间的培养皿
	93 mm	一个直径在 86-92.5 mm 之间的培养皿
	100 mm	一个直径在 97-100.5 mm 之间的培养皿
微孔板	1、6、12、24、48、96 或 384 孔板	一个标准的微孔板
纳米微孔板	6、12 和 24 孔板	一个纳米微孔板
载玻片	标准载玻片	标准微孔板载物台适配器上最多可容纳 4 片标准载玻片
MagnetPick 载玻片	Magnetic 载玻片	用于将一个 MagnetPick 载玻片置于标准微孔板载物台适配器中的适配器
定制	可以根据用户的需求定制适配器	

表3. CellSelector 显微镜载物台（源板）适配器概览，可灵活兼容各类培养容器。

CellSelector 成像和成像分析

选择并定义新的微孔板

各种市售或定制的源板均可在 CellSelector 上使用，无需购买昂贵的仪器相关耗材。可以在软件内预先定义好的孔板库中选择，或由用户创建新的孔板（对称或非对称）。可在软件中轻松进行孔板校准，以确保达到最大的挑取精度。

孔扫描

大多数情况下我们需要将捕获到的多个图像拼接组合以提供完整的孔扫描图片。以水平或垂直的梳状或 Z 字顺序扫描孔，连续的图象之间默认有 20 μm 的重叠，从而确保孔内没有潜在的盲点。当然，根据用户需求，可以将重叠减少至 0 μm 以达到不重不漏。然后按照拍摄的顺序依次处理图像，生成全孔图像，确保孔到孔的分辨率尽可能高，以便更加准确地识别和转移细胞。另外，不同的 mask、阈值或滤光片设置既可以应用于单张图像，又可以应用于所有孔图像。

自动对焦

自动对焦是一个强大的工具，可通过分析样品周围一系列不同的焦平面来实现，从而确定每张图像的最佳焦点（图 1）。

在扫描放大倍数较高的样本时，以及在扫描底面不平整的孔板或孔时（如滤膜），建议始终使用自动对焦。在软件内可以选择不同的自动对焦选项，包括：

- 3 点对焦：在孔内的 3 个位置确定最佳焦点。
- 焦点矩阵：根据预先设置的焦点定位数量在孔内确定最佳焦点
- 孔中心自动对焦：只在孔中心确定一个焦点，这对底部均匀的小孔更适用。

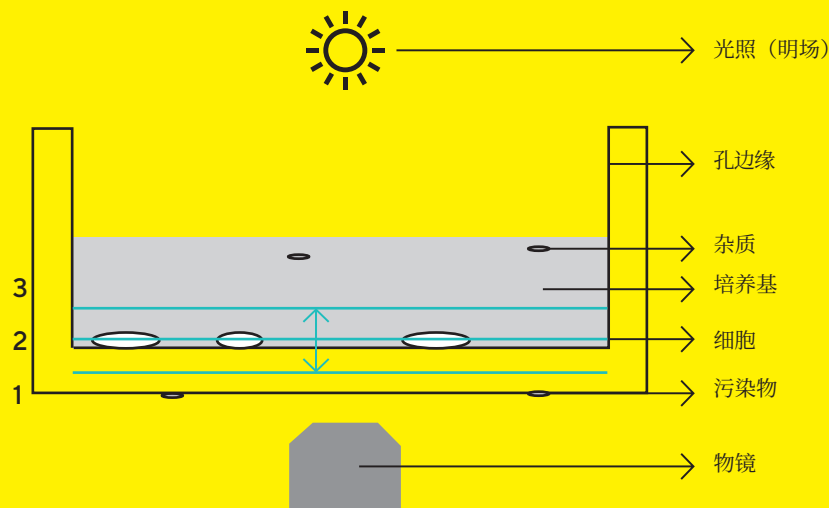


图1.自动对焦功能的可视化视图。图中描绘了以下焦平面：（1）孔的底部外平面（2）含有细胞的孔内部平面以及（3）培养基表面。系统会自动在聚焦范围（蓝线之间）搜索一个最佳焦点。

图像生成——实时图像和快照

当启用像机时，可以直接观察到实时图像，并自动进行图像捕获。然后可以使用荧光或相差拍摄快照，并叠加在一起，生成最终的概览图。图片管理列表中会列出扫描捕获的所有可用图像，便于快速浏览多个孔板、孔或感兴趣的特定区域。

根据实时图像，可以自动设置曝光时间，以便在当前载物台位置捕获最优的实验结果。

曝光时间

曝光时间指的是相机快门打开进行图像记录的时间长度。随着曝光时间的延长，更多的光线将会射入，以使图像更加明亮，从而增强信号和背景。而对于微弱的信号，增加曝光时间可以增加信号亮度，因为真实的信号会被捕获，而微弱的信号未被强化，这样图像噪声就不会额外增加。

自动增益显示

自动优化图像的对比度，增强实时图像中弱信号的凸显。

图像清晰度

在实时图像记录过程中，可以控制并优化特定感兴趣区域或对比度不佳区域的图像清晰度，并可使用滑动条轻松控制清晰度，从而确保挑取目标对象更加准确和明确。

阈值

可设置阈值，以自动检测超过规定强度阈值的目标对象（图2）。创建包含目标对象的参考图像，其会突出显示所有超过阈值的对象，如果检测到的对象过多或过少，也可以随时调整阈值。根据具体的研究要求，可轻松设置每个通道的下限和上限阈值。然后再加工图像，仅突出显示满足所有规定标准的细胞和对象。

测量值和范围

在分析阶段，可根据颗粒信息设置其他门控。常见的参数包括面积、直径、伸长率、形状参数、球度、边界距离、灰度平均值和最近的细胞的邻近距离等变量。有 140 多个不同的参数可供选择，并且软件内有对每个参数做简短的描述。

图像圈描和形态滤光片

可以创建并优化图像圈描，以排除对目标对象检测的干扰。此外，还可应用 30 多种不同的形态过滤选项或处理选项以增强图像处理。每个过滤项都会检查单像素邻近区域并分析对象的形状，然后再修改、完善或删除图像点、平滑处理不规则的地方，或删除单个噪声信号。因此，可以对图像进行处理，以便根据需要提供更多或更少的细节（图 3 和 4）。



图2. (A) CellSelector软件中简单直观的阈值设置步骤，(B) 阈值设置正确，只检测到细胞，(C) 阈值设置过高，也检测到了背景。

在线阴影校正

阴影校正功能可对图像背景中的不均匀处或差异进行校正。如果由于环境光斜向入射或系统中存在杂质而无法获得均匀的图像照度，则建议始终使用阴影校正。虽然该功能对明场和相差图像非常有帮助，但在荧光图像中，该功能通常不被使用，因为启用阴影校正时，校正图像与当前图像相抵消，因而只能获得均匀的图像背景。

扫描阴影校正

与在线阴影校正相反，扫描阴影校正是一个图像处理步骤，在图像扫描后和保存前应用。如上述信息，在线阴影校正一般在荧光检测中停用，但建议使用扫描阴影校正，特别是背景信号高的弱荧光图像。使用扫描阴影校正可帮助改善分析和检测。

颗粒检测选项

精确检测目标对象对于实现最佳的挑取结果至关重要。因此，可以使用多种颗粒检测参数。在细胞密度增加的区域，可对对象进行逐个像素的分析，以识别单细胞。自动分析最外层的像素，以确定是共用相邻边界或是对角线点衔接（图 5），同时可以纳入、排除或截断扫描边缘的颗粒，也可以填充强度不均匀的对象，以确保尽可能准确地挑取。

高感光度模式

高感光度模式通常用于弱荧光信号的增益，或用于显示轻微漂白的样本，只需要低强度光照。激活这个功能会对所有接收到信号的数字增益，可以增加 2 倍、4 倍或 8 倍。

图像叠加和测量

可以将额外的信息添加到图像中，如注释、测量值或形状（图 6）。添加叠加并不会改变图像，并可以随时删除或隐藏。

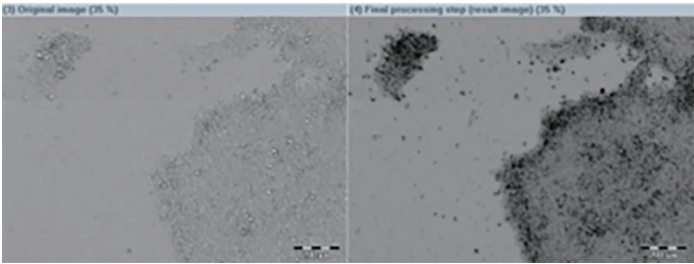


图 3. 在干细胞集落上使用腐蚀过滤进行调节。

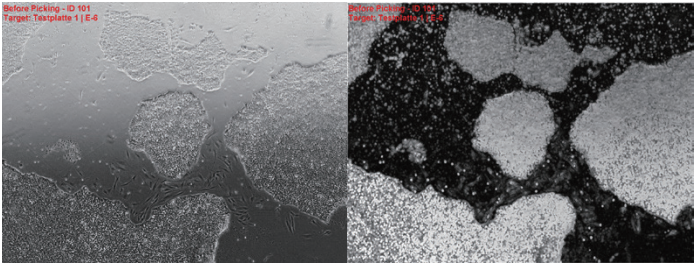


图 4. 在无饲养层培养的人类干细胞群上使用梯度过滤进行调节。

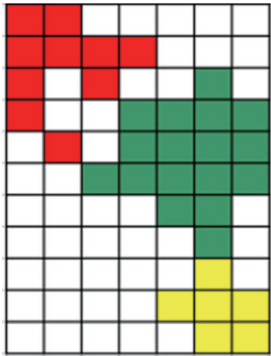


图 5. 邻近边界的标准设置意味着只有具有共同边界的颗粒才会被视为一个粒子。右边的图片显示绿色和黄色的区域，由于具有共同的边界而被视为一个单一对象，而红色颗粒被视为不同的颗粒。如果选择了“包括对角线”选项，则会将红色、绿色和黄色区域的组合视为一个单一对象。

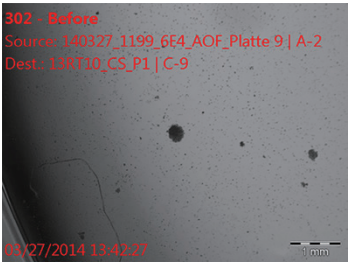


图 6. 图像叠加了原容器、孔板和孔数量、细胞类型、目标孔板、日期和时间等信息的注释。

销售与服务 联系方式

更多联系信息，请访问

www.sartorius.com.cn

赛多利斯（上海）贸易有限公司

邮箱 leadscn@sartorius.com

服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889

上海

上海市浦东新区盛荣路 388

弄百佳通产业园 3 号楼

7-11 层, 200120

电话 +86 21 6066 6100

北京

北京市顺义区安祥街 12 号

环普国际科技园 4 号楼

6 层, 101318

电话 +86 10 8042 6300

广州

广州市越秀区水荫路 117 号

1105 单元, 510075

电话 +86 20 3761 7284

苏州

苏州市虎丘区科技城锦峰路

158 号 101park-28 幢 201,

215163

电话 +86 512 6616 0490

成都

成都市上东大街 246 号新良

大厦 2618 室, 610012

电话 +86 28 8666 6877

西安

西安市和平路 118 号和平银

座 1107 室, 710001

电话 +86 29 8751 2305

