

时空组学
STOmics

Stereo-seq 空间多组学技术 成像指南



说明书版本号：A

目录

第一章 概况	2
第二章 成像系统要求和建议	3
第三章 显微镜成像指南	6
3.1. 成像前准备	7
3.2. 显微镜成像操作流程	8
3.2.1. 流程介绍	8
3.2.2. 操作注意事项	8
3.3. 图像格式要求和大小注意事项	10
第四章 显微镜图像评估	11
4.1. 图像质量要求	12
4.2. StereoMap 软件评估图像	12
4.2.1 软件评估操作流程	12
4.2.2 图像 QC 评分说明	13
4.3. 图片示例	15



关键步骤：特别注意这些步骤，以避免实验失败或不好的结果。



提示：额外的操作提示和指导。

时空组学
STOmics

第一章 概况

STOmics 时空组学技术具有超大视场和亚细胞分辨率两大特色，用户可在单细胞尺度上分析完整的组织切片。一般情况下，我们会用高倍显微镜获取高分辨率的组织细胞图像，并在后续的分析中，将基因表达数据映射回高分辨率图像上，联合做组织和单细胞维度的数据挖掘和分析。本手册提供了显微镜成像系统建议、一般的成像指南、图像初步评估和分析等内容，旨在指导用户对显微镜的硬件参数及成像效果进行评估，以辅助确认其是否可以用于 STOmics 时空组学实验的拍照环节。此外，本手册还介绍了华大自研的图像评估和图像处理软件——StereoMap，以及适合使用 SAW 进行图像自动化分析的图像示例。

本手册的适用范围：

Stereo-seq 时空转录组 FF&FFPE 技术 (含 ssDNA、H&E 两种染色方法)

Stereo-seq 时空转录组与多重免疫荧光 (mIF) 共检测技术

时空蛋白转录组 Stereo-CITE 技术

个别结果可能会因特定成像系统和 / 或样品特性而异。

根据实际的应用和需求，选择对应的 STOmics 技术，参考技术说明书，若有成像需求，建议参考此手册，对显微镜硬件参数和功能进行初步评估。初步评估通过后，在进行 Stereo-seq 芯片载体成像时，首先通过显微镜本地软件判断成像效果是否满足需求，同时借助 StereoMap 软件的“Tools”模块对 Track 线等成像情况进行评估。Track 线等评估通过后，可自动化进行后续的配准、分割等分析。当评估不通过时，也可以通过 StereoMap 进行手动配准等图像处理分析，并接入 SAW 进行后续的分析。

第二章 成像系统要求和建议

在将基因表达数据可视化与组织图像联合分析时，须确保组织图像的分辨率与 Stereo-seq 技术的分辨率（500 nm）相匹配。图像分辨率取决于三个主要参数：物镜分辨率（由数值孔径（NA）决定）、物镜放大倍率和相机像素大小。最佳图像分辨率会根据目标（组织 / 细胞 / 其他标记物）的大小、染色特征的对比度以及所需的细节水平而有所不同。为了获得最佳分辨率，建议遵循显微镜厂商推荐的成像设置。

相比其他技术，Stereo-seq 技术可达到亚细胞分辨率。因此，如果有空间单细胞分辨率分析的需求，不仅需要组织细胞成像清晰，还需要确保芯片上标记物（Track 线）成像也清晰。基于此需求，STOmics 通常建议图像的像素大小在 0.3–0.75 μm 之间。

表 1 中以 STOmics 测试过的成像系统展示了符合时空实验要求的物镜相关参数和可获得的图像情况。以上分辨率建议范围内的图像是理想情况，但如果 Stereo-seq 数据的下游解析对细节要求较低，低分辨率图像也可以通过 SAW 和 StereoMap 软件来辅助分析。除表 1 中提供的示例成像系统外，任何等效的成像系统都可以根据用户需求和应用场景作为替代方案。

表 1. 物镜参数及目标获得的图像分辨率和文件大小推荐示例

染色类型	物镜放大倍数 / NA	物镜分辨率 (μm)	图像像素大小 (μm)	可分辨的特征	存图位深	文件大小 (1*1 cm ² 区域)	兼容的文件格式
ssDNA/ DAPI	10X/0.3	1.1	0.345	单个细胞 / 细胞核 (5 μm); Track 线 (1.5 μm)	8 bit	1GB/3GB/3GB (单通道)	TIFF
IF	10X/0.3	1.1	0.345	单个细胞 / 细胞核 (5 μm); Track 线 (1.5 μm)	N*8 bit	NGB (单通道, N<=6)	TIFF
H&E	10X/0.3	1.1	0.345	单个细胞 / 细胞核 (5 μm); Track 线 (1.5 μm)	3*8 bit	3GB	TIFF

注：以上参数均以 STOmics 已经深入测试后的显微镜参数为例。相机像素大小为 3.45 μm 。

对于 STOmics 实验中的拍照场景，建议使用放大倍率为 10 倍且数值孔径为 0.3 的空气物镜进行图像采集。如果使用高放大倍率物镜（20 倍或更高）或高数值孔径（1.0 或更高），请考虑以下事项：

- 焦深 (DF) 将变小。焦深是在一个图像平面内焦点出现的样本厚度。目标 NA 越高，DF 越低。这将导致存在一定厚度的样本对焦难度增加，成像不清晰。
- FOV 将变小，要获取包含整个组织切片的图像，需要采集和缝合更多的 FOV。这增加了拼接错误的可能性，从而导致相应基因表达数据的配准错误。
- 生成的图像将很大，文件大小通常 > 3 GB，并且可能达到 100 GB（大芯片等）。处理这些图像需要一台具有适当内存资源和专用软件的计算机来上传、可视化图像并将图像导出为 TIFF。处理大文件所需的时间可能很长，以分钟来计。

其中需要注意的是，目前 STOmics 配套的软件仅兼容 10X 镜下产出的图像，如果需要对其他倍数物镜产出的图像进行自动化配套分析，请将图像转为对应 10X 镜下的图像分辨率。（假设 10X 是满足情况的，比如 40X，则将图像缩小 4 倍再输入到软件中）

以上是对成像系统各关键参数做了详细的描述和建议，实际情况下，最终的成像效果是否满足需求取决于成像系统的整体设计。以下列出一般情况下的成像系统需求。

表 2. 成像系统需求概述

成像系统和参数指标	
指标 / 参数	描述
电动载物台	X、Y、Z 轴方向均支持电动控制
显微镜 XY 轴运动范围 (行程)	扫面区域范围覆盖至少 10*10 mm 区域 以上以 STOmics 1 cm*1 cm 芯片尺寸为例, 如需使用更大尺寸芯片, 请提前确认显微镜扫描范围
拍摄目标	Stereo-seq 芯片载体
对焦方式评估	预对焦地图或实时自动对焦(光电检焦或地图选点)
观察方式	落射荧光、落射明场
扫描功能	自动化扫描 将采集的 FOV 自动拼接成大图像
荧光通道	DAPI、FITC、TRITC、CY5
物镜	4X, 10X (NA ≥ 0.3, 空气物镜, 全复或半复消色差物镜)
分辨率	相机分辨率匹配物镜理论分辨率, 建议咨询显微镜供应商
相机和存图位深	荧光: 单色相机, 8/16 bit 明场: 彩色相机, 3*8 bit/3*16 bit
图像采集	<ul style="list-style-type: none"> 根据制造商说明校准显微镜和相机(运动稳定性、畸变校正、背景平衡、白平衡) 调整成像设置(光源功率、相机增益和曝光)以获得明亮清晰的图像
图像格式	可查看和导出拼接大图 / FOV 原图, 8/16 bit、TIFF 格式
软件	显微镜扫描软件、看图软件和图像处理软件(e.g. Scanner、StereoMap、Qu-Path、FIJI/ImageJ)
计算机配置需求	Win10 x64 系统, 16 GB RAM

☺ 注: 具有所列功能的任何等效系统都可用于成像

以下是满足时空实验要求的显微镜列表(表 3), 包括厂家、型号描述等信息。

表 3. 时空实验已测试显微镜列表

厂家	描述	成像类型	软件
MGI	STOmics Microscope Go Optical	ssDNA/DAPI/IF/H&E	Scanner 用于获取 .tiff 图像或 Tiff Browser 导出 .tiff
Leica	Leica DM6-M	ssDNA/DAPI/IF/H&E	LAS 获取 .tiff
Zeiss	Zeiss Axio Scan Z1 Zeiss Axio Scan 7	ssDNA/DAPI/IF/H&E	ZEN 获取 .czi 图像并导出为 .tif
Motic	Motic PA53FS6	ssDNA/DAPI/IF/H&E	Motic DSA 用于获取 .tif 图像

☺ 注: 成像类型是指使用 / 测试过该类型的 Stereo-seq 技术下的显微镜图像, 是可支持的。

📖 提示: 以上成像系统要求和建议相对专业, 参考和评估时请咨询显微镜厂商确认, 并完成校准调试等。若已使用显微镜评估芯片 T 拍照完成并 QC 通过后, 请确认各项参数信息, 在正式实验之前请勿随意改动。

第三章 显微镜成像指南

3.1 成像前准备

材料

- Stereo-seq 芯片载体 (Stereo-seq 显微镜评估芯片载体 , Cat. No. 201CT113)
- OCT/FFPE 组织包埋块 1 个
- 显微镜成像系统 (具体要求见第 2 章节)
- 实验操作说明书 (详见表 4)
- 软件操作说明书 (详见 StereoMap 用户手册)

所需物料清单及实验操作步骤可根据具体实验对象选用不同的操作流程, 文档资源库可见: [时空组学产品资源](#)

表 4 STOmics 成像场景以及对应生化实验操作说明书

成像类型	图像类型	OCT 包埋组织块	FFPE 包埋组织块	需求点	应用功能点
Epi-FL (落射荧光)	ssDNA (single-stranded DNA, FITC 通道)	Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 (载体版) 使用说明书	Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 使用说明书	Track 线 组织 细胞	细胞级别配 准, 组织和 细胞形态等 信息
	DAPI (4',6-diamidino-2- phenylindole)	时空转录组与多重免疫荧光 (mIF) 共检测技术操作指南 Stereo-CITE 蛋白转录组试剂 套装使用说明书	Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 使用说明书	Track 线 组织 细胞	细胞级别配 准, 组织和 细胞形态等 信息
	TRITC (Tetramethyl- rhodamineiso- thiocyanate)	Stereo-seq 透化试剂套装 V1.1(载体版) 使用说明书 时空转录组与多重免疫荧光 (mIF) 共检测技术操作指南	-	荧光亮度 组织 细胞	透化条件摸 索实验, 组 织和细胞形 态等信息
	CY5(Cyanine 5)	时空转录组与多重免疫荧光 (mIF) 共检测技术操作指南	-	组织 细胞	组织和细胞 形态等信息
Epi-BF (落射明场)	H&E (Hematoxylin- Eosin)	Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 (载体版) 使用说明书	Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 使用说明书	Track 线 组织 细胞	细胞级别配 准, 组织和 细胞形态等 信息

3.2 显微镜成像操作流程

本章节适用于基于 STOmics 时空组学技术的多种产品解决方案对应的显微镜成像操作流程，请根据实际需求选择相应流程。以 Stereo-seq 芯片 T 载体为例（与正式芯片载体一致）介绍整个成像操作流程。

3.2.1 流程介绍

组织制备流程与时空转录组各个解决方案的实验流程保持一致，实验流程到荧光或明场成像截止，具体使用哪个流程根据所选包埋组织情况与通道情况选择相应的生化实验 SOP（SOP 选取参考 3.1 章节的表 4，请注意从时空官网获取最新版本：<https://www.stomics.tech/resources/Documents>）。

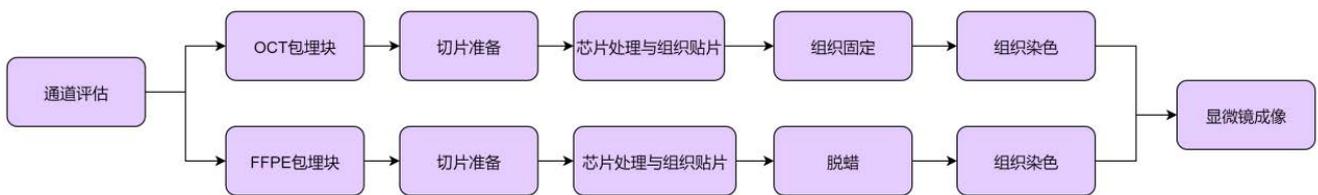


图 1. 显微镜成像生化实验工作流程

3.2.2 操作注意事项

1. 载体版芯片说明

载体版芯片组装与拆卸等使用详情可参考《[Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书](#)》。

2. 组织贴片说明

组织贴片方式根据组织包埋方式选取，有冷冻切片与石蜡切片两种，冷冻切片切片厚度多为 10 μm ，石蜡切片普通组织 5 μm ，脂肪含量高的组织（如乳腺癌）建议 4 μm 。

3. 拍照注意事项

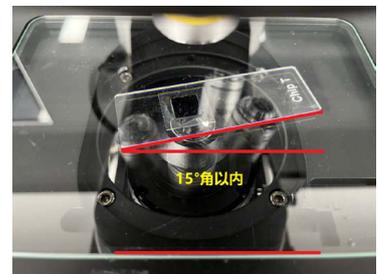
a. 将芯片轻放在载物台上。芯片放置方向正确（芯片背面的 SN 号在上面），尽量与载物台平行（要求芯片边缘水平角度小于 15°，手柄始在右侧（载体版）/ 芯片背面二维码在下（裸芯片））图像的成像结果需与当前目测的结果保持一致。



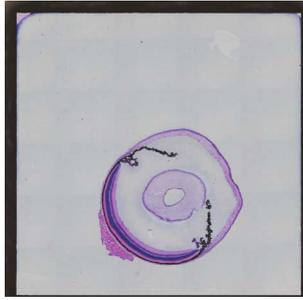
芯片放置图（背面）：芯片号在上，二维码在下



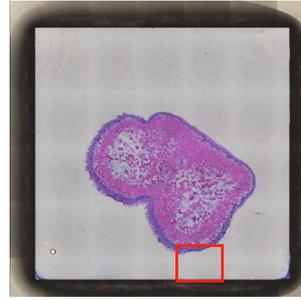
芯片放置图（正图）：手柄在右侧



b. 拍摄过程中芯片边缘要在拍摄范围内（芯片四个角要清晰可见），芯片边缘距离图像边缘，尽量不超过半个 FOV 宽度。如下图所示，都为正确图例，芯片边缘均在图像视野范围内，左图芯片边缘已接近图像边缘（下边），右图为留白更多，芯片边缘在半个 FOV 左右。



正确图例(贴边)

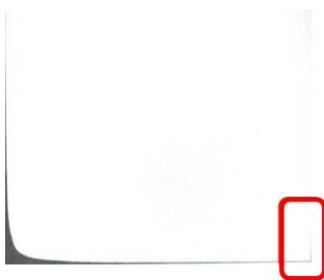


正确图例(半个 FOV 以内)

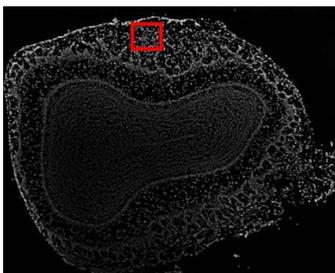
- c. 拍照时，请合理调整对焦和曝光等参数，确保 Track 线和组织区域同时清晰成像。Track 线和组织的焦距存在差异，荧光亮度也存在较大的差异，请参考实验操作说明书进行成像。
- d. 如使用手动对焦，请在芯片四角（非组织区域）和组织内分别选择建模点并定焦，以此同时获得清晰的 Track 线和组织染色图像；请谨慎使用自动对焦模式，大部分显微镜的自动对焦策略无法对 Track 线精确定焦，容易造成 QC 失败；
- e. 显微镜扫片时请勿触碰显微镜所在平面，周边不能有包括行走的震源；
- f. 如果在封片过程中，存在较大区域（超过 4 个视野大小）未被封片剂浸润，则需要对此区域增加建模点；
- g. 压缩或者缩放的图像会影响图像的 QC 和拼接效果，请确保显微镜导出的 TIFF 图片未被压缩或者缩放（10X 情况下），避免图像失真影响后续流程的分析结果。检查方法为肉眼确认；
- h. 拍照完成后，请立即使用 StereoMap 软件进行图片 QC，如果 QC 不通过，请及时重新拍照；
- i. 如果组织贴片区域超过 85%，Track 线区域过少，通过 Track 线自动配准的可能性将降低，可采用手动配准方式。

以上是通用流程的注意事项，根据不同的需求和应用，具体的拍照操作流程请参考对应的实验操作说明书（请见 3.1 章节表 4）。对于需要手动设置调整、验证的显微镜，请注意以下内容：

1. 当进行单细胞水平分析时，图像需要达到与之匹配的分辨率，以小鼠脑为例，需确保拼接误差 $<5 \mu\text{m}$ ；如不符合，通常是载物台运动偏差较大导致，请联系显微镜制造商的工程师进行调试；也可导出 FOV 图像，使用第三方软件重新拼接（如 Fiji、ImageJ）；
2. 拼接后的图像在每个 FOV 交界处可能出现亮度不均（拼接痕迹）的情况，荧光成像下，可以从样本荧光信号弱、样本本身自发荧光较强或载物台平坦度差等方面排查原因；
3. 除透化时间摸索成像外，2) 中情况可通过显微镜的背景平衡功能进行改善；可在空白区域执行背景平衡操作，但需注意，背景区域通常存在 Track 线，不可在视野中看到 Track 线（可稍微离焦），否则可能导致最终成像出现双 Track 线情况，将影响后续分析；这个是 Stereo-seq 硅片成像需要特别注意的，建议采用固定模板做背景平衡校正；
4. 对于明场成像，需要注意选择空白区域执行白平衡来调整相机的色彩平衡，若发现色彩与预期有明显差距，请联系显微镜制造商的工程师进行调试；
5. 当需要对样本进行多种荧光染色时，需要核实不同荧光通道之间是否存在窜色，否则可能会影响单细胞的识别，请联系显微镜制造商的工程师协助调试。单通道多次拍照的情况下，需要确认多通道图像间是否存在偏移，若存在异常，可使用第三方软件（如 Fiji、ImageJ 等）进行校准；
6. 荧光成像时，尽量避免过曝，可通过图像像素统计情况（如：直方图）来判断，刚好不过曝情况为：直方图速率适中不贴边，即直方图横坐标最大值处仅有微小突起（如下图）；明场成像时，亮度参数建议 30 左右（0-255），增益调至最低，曝光适当调整。



7. 荧光成像时，手动定焦成像过程中会有参数的调整，先对Track线进行对焦，可以拉高增益(Gain)和灯光强度。Track线选点之后，对组织对焦时，将增益降到最低，选择图像上占据较大面积，又较亮的区域（如下图红色框内区域），调节曝光时间（不超过500 ms）和灯光强度（在500 ms曝光不能满足需求时增大光强）使该区域刚好不过曝。最后以组织区域的曝光参数为准进行成像；



8. 荧光成像时，从封片到拍照，时长控制在30 min，并在拍照过程中请勿将贴有组织的芯片长时间照射荧光，非拍照时间关闭激光，避免长时间照射同一位置，以免光照导致局部荧光淬灭。

3.3 图像格式及大小的要求

SAW 8.0 和 StereoMap 4.0 以及更高版本，兼容 TIFF (.tif、.tiff) 图像格式。建议预安装最新版本的 StereoMap 软件，以支持组织染色图像的手动配准、组织区域选择和细胞分割等手动图像处理操作。

来自荧光标记样品的各个通道图像可以单独打开或处理，最多可包含来自同一组织切片的六个文件。需要确保每张单色图像均以相同的放大倍数获取，具有相同的位深度、尺寸、方向和文件格式。若是单通道单独成像，需要确保通道之间的偏移满足分析需求。

当采集软件无法选择以其中一种兼容的格式类型保存或转换图像时，请使用第三方软件进行转换，例如 Fiji/ImageJ。另外，StereoMap 还支持了部分显微镜原始小图的输入，具体信息可参见下表。

表 5 StereoMap 支持显微镜原始小图目录和格式列表

图像文件格式	显微镜型号	显微镜采集软件版本信息
.tiff 格式的小图文件	STOmic Microscope Go Optical	Scanner Version 1.2.2
.tif 格式的小图文件	Motic PA53FS6	PA53Scanner 1.0.0.14
.tif 格式的小图文件	Leica DM6 B	LAS X 3.7.4.23463
.czi 格式	ZEISS Axio Scan.Z1 ZEISS Axioscan 7	ZEN Version 3.1.0.0000 ZEN Version 3.5.093.00009

⊙ 注意：由于显微镜图像文件目录结构和文件格式更新无法及时同步，如有问题，请及时导出拼接大图进行后续分析。

第四章 图像质量评估

根据不同的应用需求，对产出的图像进行即时的评估，可帮助拍图人员进行决策是否重新拍图，如果无法通过拍图优化获得更好的图像质量，也可对图像情况进行初步判断，以提前预判后续的分析方案。STOmics 组学技术应用场景多样，对图像要求也不尽相同，因此大部分情况下是以用户人工评估为主，从而调整拍图方案获得满足需求的图像，或者调整分析方案以达到应用需求。

为提升产品体验，STOmics 提供了 StereoMap 软件来辅助用户进行图像质量的评估，其中最重要的是对芯片标记线（track 线）的评估，此为后续自动化配准的硬性需求，将作为后续质控结果的评判标准之一。

4.1. 图像质量要求

通常情况下，高质量的图片一般满足如下特点：

1. 拍摄的组织 and 细胞清晰，且在聚焦范围内；
2. 拍摄的芯片 Track 线清晰；
3. 无拼接错误；
4. 避免淬灭，组织亮度整体均匀，芯片区域内干净无杂质；
5. 组织覆盖面积不超过芯片总面积的 80%，芯片边缘在图像视野范围内。

如下图为 QC 通过的高质量图像示例：

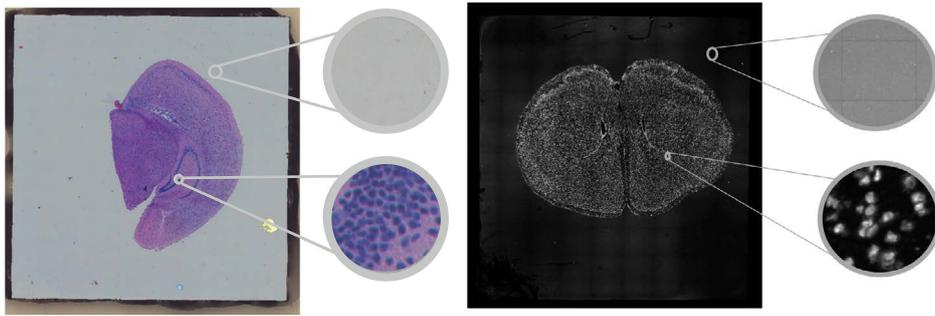


图 2 高质量图像示例（组织，细胞，Track 线）

成像过程中，请参考成像指南成像，成像完成后，请使用显微镜本地阅片软件对图像进行整体查看，首先确保感兴趣区域组织和细胞肉眼清晰可见，再通过调整对比度参数等，检查 Track 线是否清晰可见，同时是否存在严重的拼接错误等。若想使用 SAW 软件进行自动化的 CellBin 分析，请确保 Track 线 QC 通过，并且组织和细胞肉眼清晰可见，不存在较大的拼接错位（均为单细胞精度）。若 QC 不通过或评估不过时，可评估是否重新拍照，或者采用手动图像处理的方式。

4.2. StereoMap 软件评估图像

StereoMap 是时空组学线下图像处理软件，主要涉及图像处理小工具、图像手动调整模块（配准、组织分割和细胞分割等）和交互式可视化展示。其中小工具中的图像评估主要从图像上 Track 线和组织细胞形态两个信息的清晰情况对显微镜拍摄的图像进行初步评估，以辅助判断如何使用 StereoMap 和 SAW 进行后续数据分析和信息挖掘。

4.2.1. 软件评估操作流程

1. 下载并安装最新版本的 StereoMap 软件。有关下载链接和安装指南等，[请参阅 StereoMap 用户手册 -> 下载](#)。
2. 通过“StereoMap->Tools->imageQC”模块执行图像 QC。具体使用请参见 StereoMap 用户手册。

4.2.2 图像 QC 评分说明

4.2.2.1 Track 线评分说明 (ssDNA、DAPI、H&E)

采用 Track 线特征进行配准需要考虑以下几点：

- 1) 至少可以清晰看到一个 Track cross 在内的五个邻近点，此为极端情况，一般情况需在此基础上至少达到 10 个点；
- 2) 为保证整张芯片区域配准精度，需要组织的最大外接矩形的至少 3 个方位角均存在 1) 描述的情况；
- 3) Track 点能检测的越多且准确越好，并在芯片上以 1) 为最小单位分布均匀。

基于以上情况，设定 Track 线打分规则：

在通过 Track 点检测，筛选，计算出 scale 和 rotation 参数后，给出由图像 Track 点推导出来的 Track 点模板，与标准模板计算误差 ($< 5\text{pixel}$)，求出满足需求的点数占理论芯片点数的比例，以及由满足点围绕的最大外接图形面积占芯片理论面积的比例，构成如下两个指标：

TemplateValidArea：误差在 5 pixels 以内的推导模板点数，所能构成的包围面积占整体图像面积的比例。如图 3 中，黄色区域包围的像素面积与整张芯片的像素面积的比值： $460718882\text{ pixels}/604856088\text{ pixels}=0.76$

TemplateRecall：误差在 5 pixels 以内的推导模板点数占理论上芯片对应图像所拥有的模板点数的比例。如图 3 中，黄色点阵中的 Track 点数与整张芯片的模板点数的比值： $2636/4760=0.55$

取两个比值中的最大值，并将最大值线性映射为百分制分数。Track 线 QC 状态为成功，即说明算法可以通过图像 Track 点正确推导出模板，预配准成功。

表 6 Track 线评分说明

说明	Track 线分数	Track 线 QC 状态	染色类型
$(\text{TemplateValidArea}, \text{TemplateRecall}) < 0.1$	< 60 分	失败	ssDNA/DAPI
$(\text{TemplateValidArea}, \text{TemplateRecall}) \geq 0.1$	≥ 60 分	成功	ssDNA/DAPI
$(\text{TemplateValidArea}, \text{TemplateRecall}) = 1$	= 100 分	成功	ssDNA/DAPI
$(\text{TemplateValidArea}, \text{TemplateRecall}) < 0.01$	< 60 分	失败	H&E
$(\text{TemplateValidArea}, \text{TemplateRecall}) \geq 0.01$	≥ 60 分	成功	H&E
$(\text{TemplateValidArea}, \text{TemplateRecall}) = 1$	= 100 分	成功	H&E

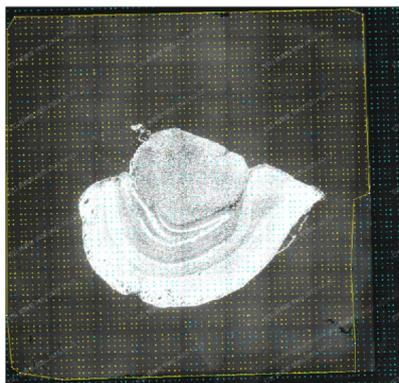


图 3. Track 线清晰度评分计算过程示意图

4.2.2.2 显微镜稳定性评估评分说明 (DAPI&mIF)

将每个视场小图 (FOV) 拼接成大图，一般情况下可以直接采用显微镜记录的 FOV 位置完成，但是由于显微镜成像台的运动稳定性限制，会导致位置信息的偏差，拼接大图缝合区域出现错位现象。因此，在显微镜经过硬件校准等操作后仍无法达到精度要求（如，细胞级别）情况下，会根据相邻 FOV 的重叠区域信息进行拼接修正，将重叠区域缝合并去除，达到更高精度的拼接效果。为达到高精度（单细胞，~10um）的拼接效果，需要硬件和软件的相互配合，在硬件相对稳定的基础上（一般偏移，<10um，~50pixel），利用 overlap 信息进行拼接评估和修正。

显微镜拼接评估得分：运用基于重叠区域相似度的算法对 FOV 进行分类，分为算法可检测的重叠区域特征清晰的 FOV 和总的 FOV 两种类型，根据算法可检测到的重叠区域特征清晰的 FOV 占整个 FOV 的比值以及每个 FOV 与相邻 FOV 的平均偏移得分两个指标，最终计算每个 FOV 的拼接得分。该评分主要评估显微镜的拼接稳定性，得分越高，显微镜内嵌拼接精度越高。（目前仅在 DAPI&mIF 场景下打开）。

◆ 重叠区域特征情况打分：分数阈值为 5%，表示特征较为相似且清晰，算法可计算偏移量，通过的 FOV 数量为 a。通过后计算偏移量，相似度（置信度）为 c，偏移量为 d（可记作 x, y）；

◆ 总 FOV 数：b 代表整个芯片 FOV 的总数。

◆ 因此，最终评估指标定义公式如下：

$$\frac{\sum_{k=0}^a \frac{1}{1 + e^{d_k - 7}}}{b}$$

■ 其中 d_k 为 $\sqrt{x^2 + y^2}$ ，7 表示定义最大误差 5pixel 下，其 x, y 均偏差 5pixel，即 $5\sqrt{2}$ 约为 7pixel。

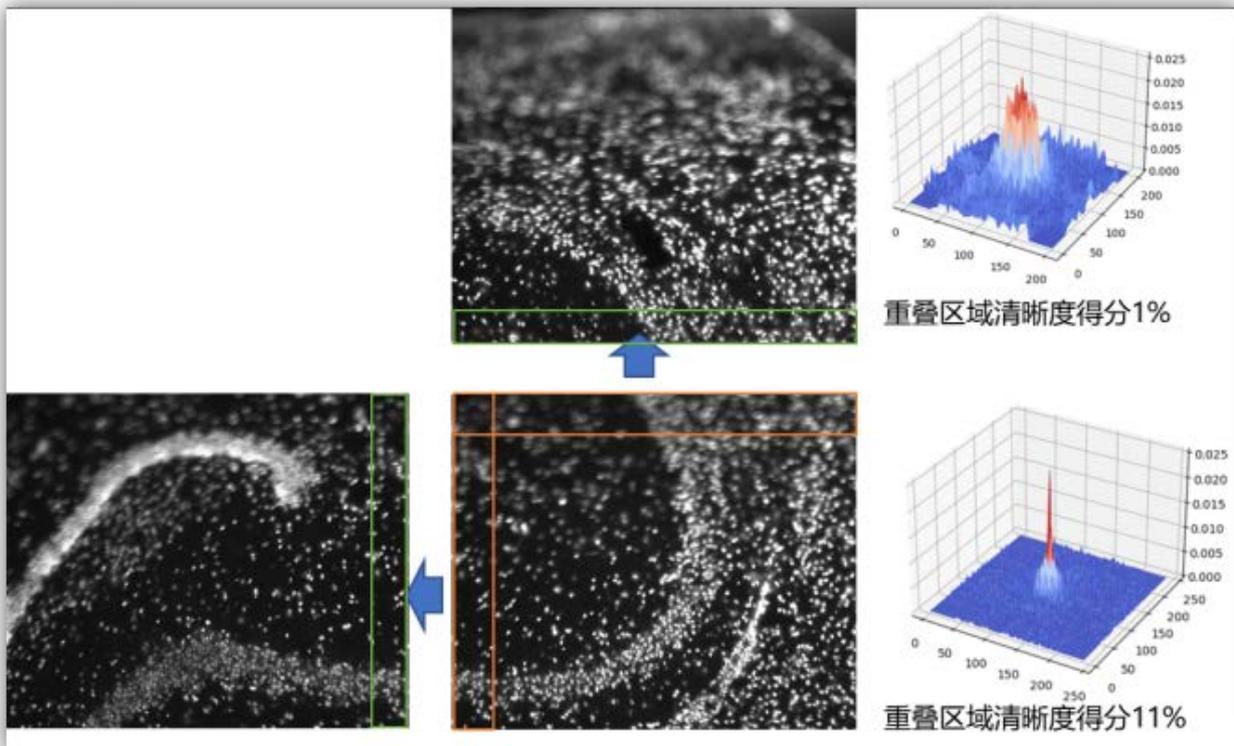


图 4 重叠区域清晰度得分示例

ⓘ 注意：得分 >5%，则表示重叠区域的特征清晰

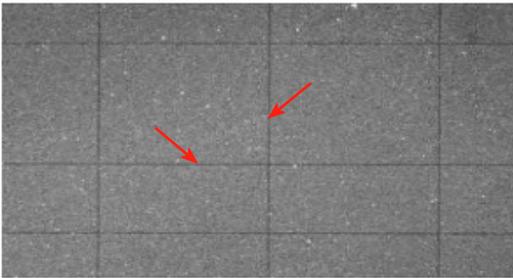
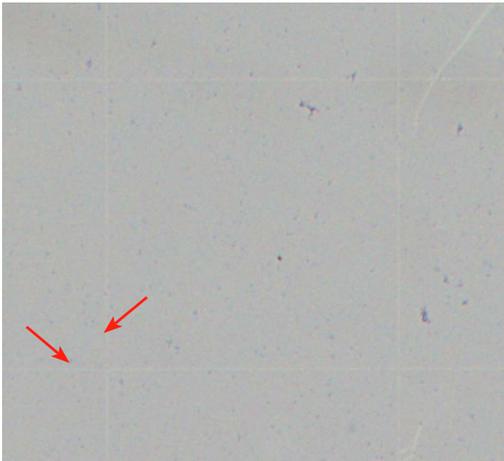
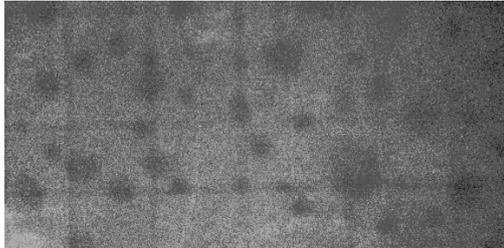
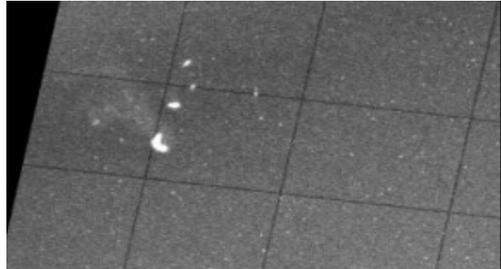
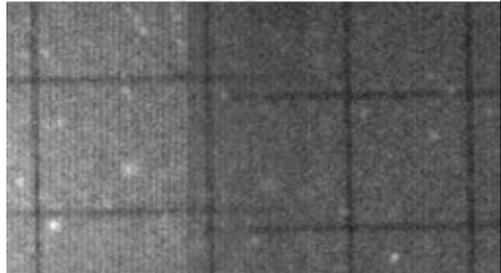
4.2.2.3 校准评估说明

在荧光染色成像过程中，如果使用的是单通道多次成像方式，不同荧光图像间将存在偏移。运用相似性校准算法评估多通道荧光图像整体偏移量，通过的标准为最大偏移量不能超过 20 pixels 且图像的相似度大于 1%。（目前仅在 DAPI&mIF 场景下打开）

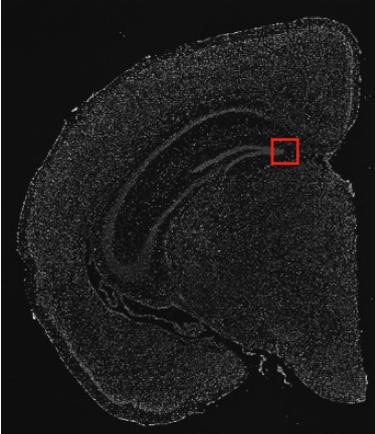
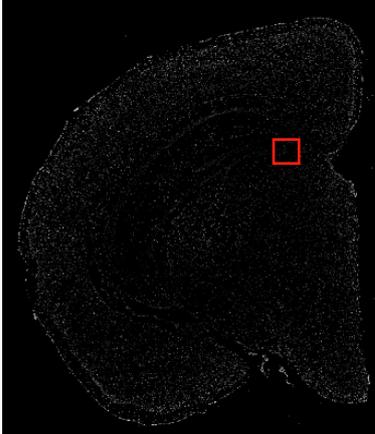
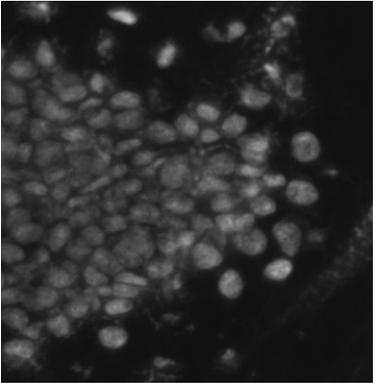
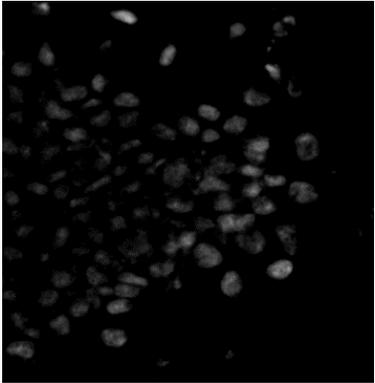
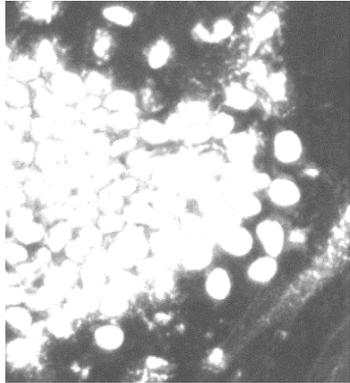
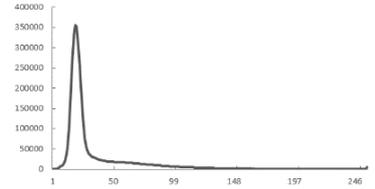
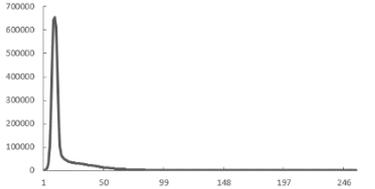
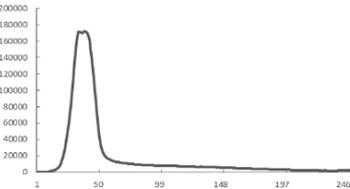
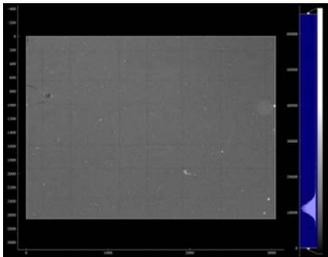
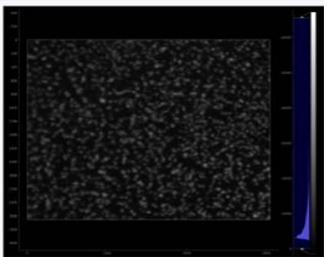
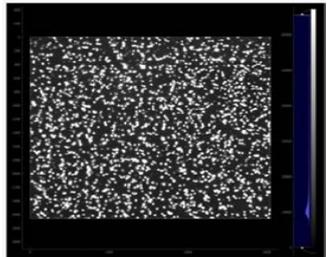
⊙ 注意：校准评估只是针对单通道多次单独成像模式，多通道同时成像默认偏移量为 0。

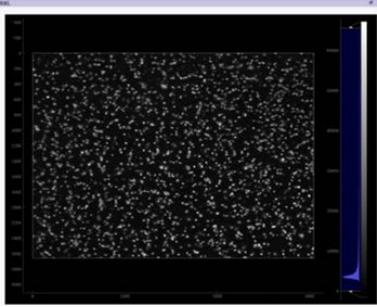
4.3 图像示例

以下成像异常可能会导致图像分辨率低、显微镜图像与基因表达图的配准失败、图像分析失败或者数据解释困难。在开始 Stereo-seq 技术正式实验之前，请确保显微镜满足时空实验成像要求，达到最佳成像设置。下面的例子来自代表性的组织切片，请参阅对应的试剂盒说明文档以了解兼容的物种和组织类型。

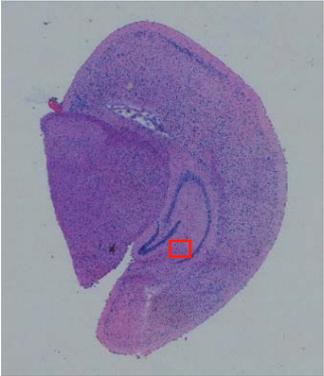
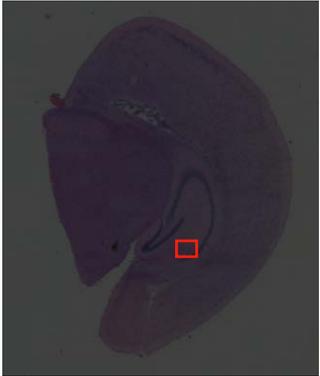
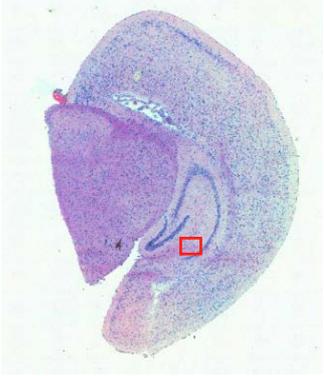
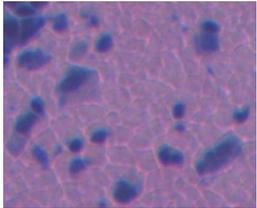
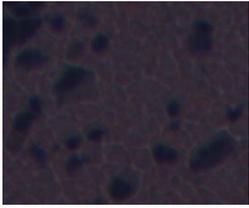
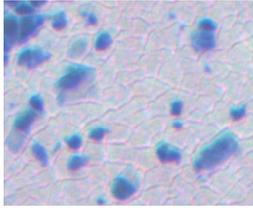
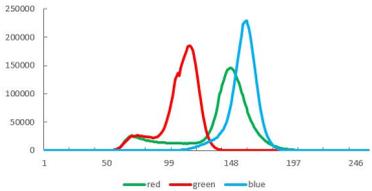
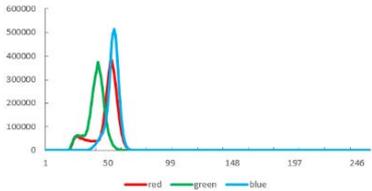
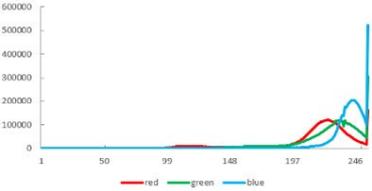
Track 线	
合格图像	不合格图像
 <p>荧光图像</p>  <p>H&E</p>	 <p>Track 线虚焦</p>  <p>Track 线倾斜</p>  <p>拼接错位</p>
<p>Track 线大部分情况在非组织区域调节对比度才可以观察到。在荧光图像上，Track 线亮度较低表现为暗线。在明场情况下，Track 线为白色线。</p>	<p>Track 线是排布在芯片上的直线，且一般与芯片边缘平行。对焦不清晰会导致 Track 无法检测成功。芯片放置倾斜也会导致检测准确性降低。若出现拼接错误，Track 也可看到清晰错位。</p>

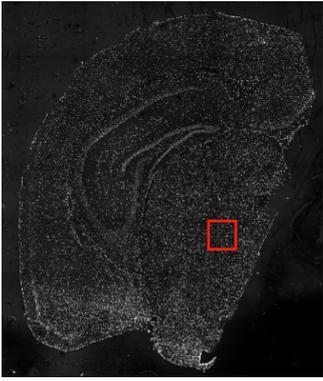
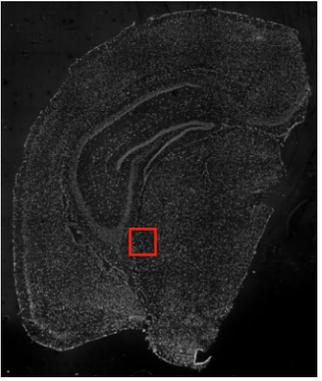
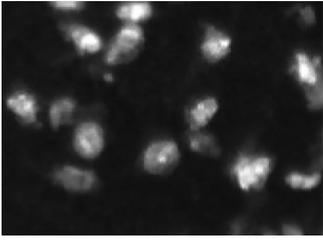
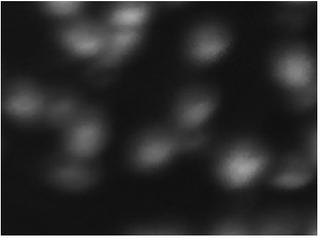
图像曝光 (荧光)

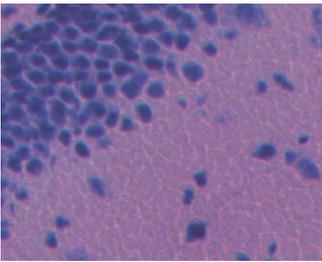
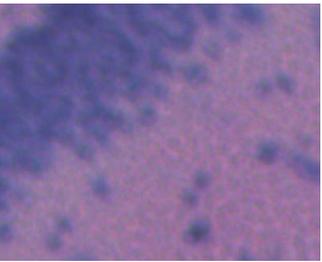
合格图像	不合格图像	
		
		
		
<p>适当的曝光可以提供良好的亮度和对比度。图像像素值范围 (0-255, 8 bit) 且整体亮度值分布合理, 高段值仅有小突起。</p>	<p>曝光不足的图像具有低亮度(低像素值)和低对比度(低图像动态范围), 这会导致细节丢失和分辨率受损。像素强度直方图跨越整个相机范围的下四分之一 (0-60)。</p>	<p>曝光过度的图像表现部分区域具有高亮度、饱和像素和低对比度, 导致数据丢失和分辨率受损。像素强度直方图在高值段 (255) 被截断, 表明部分像素已饱和。</p>
<p>曝光参数会直接影响成像质量, 直方图一般会在显微镜软件上呈现, 可供参考 (下图展示)。由于参数设置不合适导致的图像异常是不可修复的, 且 Track 线和组织所需的参数有差异, 请参考成像指南进行操作。</p>		
 <p>组织外</p>	 <p>组织内曝光不足</p>	 <p>组织外过度曝光</p>

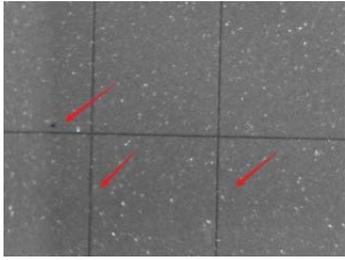
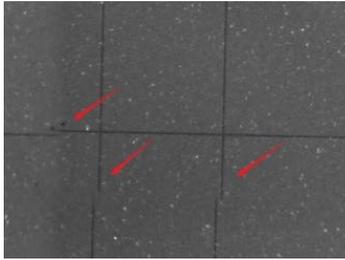
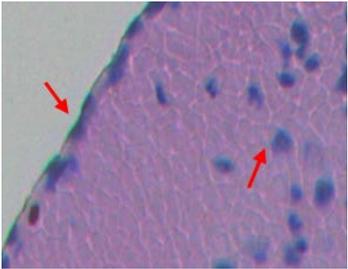
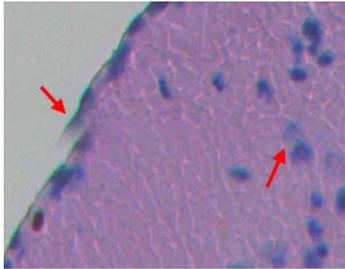
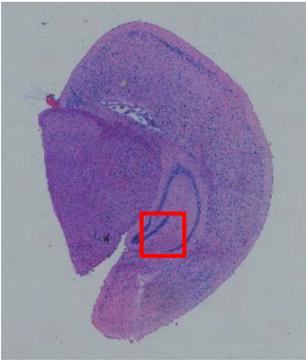
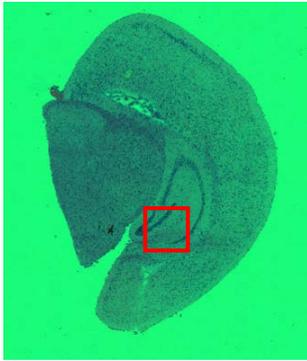
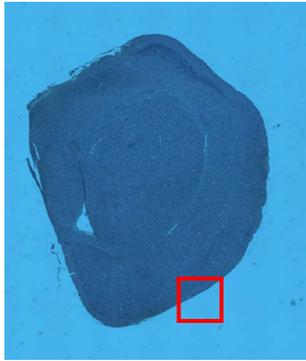
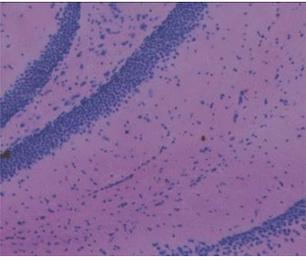
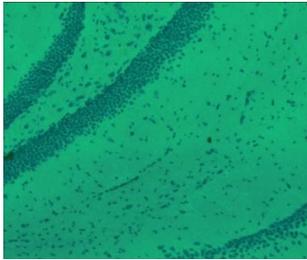
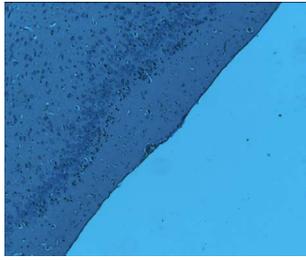
 <p>组织内</p>		
<p>背景(上图)和组织内(下图)选取的一个对焦点视野窗口截图,背景应保证 Track 线清晰分明,组织内应保证核染色图像清晰不过曝。</p>	<p>组织内选取的一个对焦点视野窗口截图,欠曝时图像及像素统计状态(图右侧)。</p>	<p>组织内选取的一个对焦点视野窗口截图,过曝时图像及像素统计状态(图右侧)。</p>

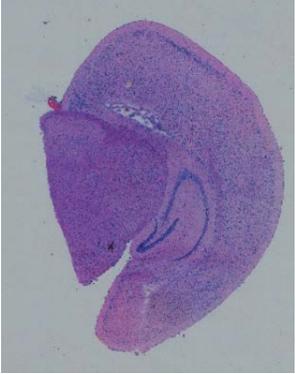
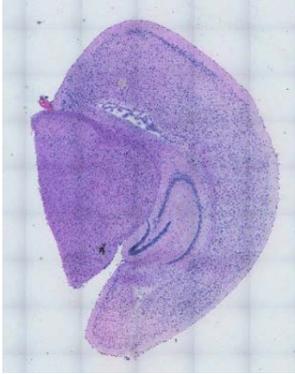
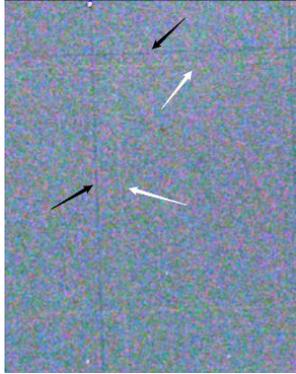
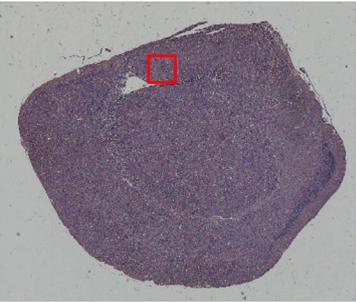
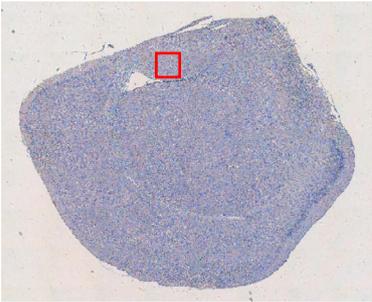
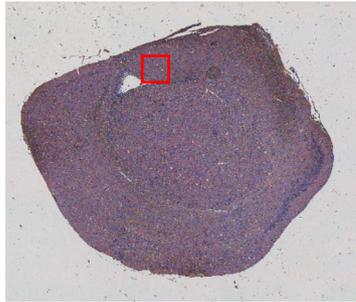
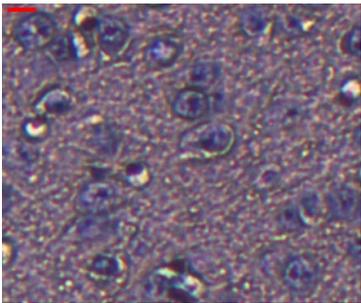
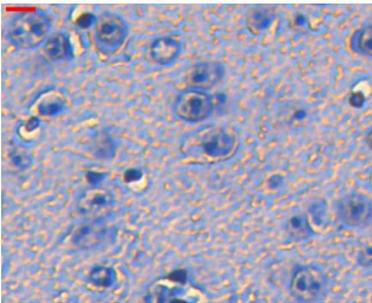
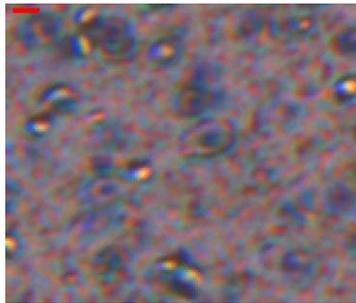
图像曝光 (明场)

合格图像	不合格图像	
		
		
		
<p>适当的曝光可以提供良好的亮度和对比度。图像像素值范围 (0-255, 8bit) 且整体亮度值分布位于中间位置。</p>	<p>曝光不足的图像具有低亮度(像素值)和低对比度(范围),这会导致颜色不准确、细节丢失和分辨率受损。像素值分布跨越整个相机范围的下三分之一 (0-90)。</p> <p>曝光过度的图像具有高亮度、饱和像素(白色)和低对比度,导致颜色不准确、信息丢失和分辨率受损。像素值直方图在高值段被截断,表明很大一部分像素已饱和,并且跨越了相机范围的上半部分 (90-255)。</p>	

图像对焦 (荧光)	
合格图像	不合格图像
	
	
对焦较好的情况下,可以较为清晰的辨认细胞核,以及其他形态细节等信息。	图像失焦,会导致细胞核模糊,形态细节不清晰。

图像对焦 (明场)	
合格图像	不合格图像
	
	
对焦较好的情况下,可以较为清晰的辨认细胞核,以及其他形态细节等信息。	图像失焦,会导致细胞核模糊,形态细节不清晰。

图像拼接		
合格图像	不合格图像	
		
		
<p>将多个 FOV 拼接成大图像时，需要通过后续的特征配准来纠正由于载物台运动偏移导致的相邻 FOV 之间的拼接错误。拼接正常的效果如上图所示，Track 线无错位，细胞无错位无重影（红色箭头区域比较）。</p>	<p>当仅靠载物台坐标而不进行特征配准（或特征不明显）将多个 FOV 拼接成大图像时，相邻 FOV 之间的边界（红色箭头）可能出现组织 / 细胞错位。</p>	
图像白平衡		
合格图像	不合格图像	
		
		
<p>明场情况下，在空白区域执行白平衡，获得具有良好色调和对比度的图像，可以准确反映染色样本情况。</p>	<p>当不执行白平衡时，图像将出现错误颜色。未矫正的颜色和对比度将对组织结构识别和注释产生误导。</p>	

背景平衡 (明场)		
合格图像	不合格图像	
		
<p>将多个 FOV 拼接成大图像时应用背景平衡可以校正由于视场不均匀而导致的伪影。正确对准和设置照明路径也可以减少阴影伪影。左侧图像具有相同的视场并进行了适当的背景平衡。</p>	<p>当视场不均匀时, 在未进行校正的情况下拼接多个视场时, 可能会出现阴影伪影 (拼接痕迹)。</p>	<p>背景平衡的模板不应该存在 Track 线, 建议使用固定的校正模板。当模板出现 Track 线时, 获取的图像会出现双 Track 线, 如上图所示, 原图调节对比度后, 白色线为真实 Track 线 (如图白色箭头所示), 黑色线为假 Track 线 (如图黑色箭头所示), 图像信息异常, 同时后续分析也无法进行。</p>
图像分辨率 (明场)		
10x/0.30NA	10x/0.45NA	4x/0.13NA (不推荐)
<p>图像分辨率: 1.12 μm 图像像素大小: 0.345 μm</p>	<p>图像分辨率: 0.75 μm 图像像素大小: 0.345 μm</p>	<p>图像分辨率: 2.58 μm 图像像素大小: 0.86 μm</p>
		
		

相机像素大小 3.45 μm , 标尺为 10 μm (红色)。

联系我们

深圳华大三箭齐发科技有限责任公司

网址：<https://www.stomics.tech>

邮箱：services@stomics.tech