

# AxioVision 用户指南

4.X 版

手册序号: B 48-0038 e 10.2003

发布日期: 10.2003

Carl Zeiss Vision敬请用户注意，由于Carl Zeiss Vision产品的不断发展,本文档所含信息和参考文献可能会作一定的技术修改。所附文档不包含任何Carl Zeiss Vision关于本文档所描述的技术流程或产品特性的保证书。此外，除非能证明Carl Zeiss Vision已经知道这些错误或者是由于Carl Zeiss Vision的故意忽视造成，否则Carl Zeiss Vision不对本文档中任何印刷错误或其它不确之处负责。Carl Zeiss Vision再次提请用户注意，

本手册仅包含相关信息和技术流程的一般描述，并不适用于所有情形下。如有疑问，建议咨询Carl Zeiss Vision。本手册受版权保护。Carl Zeiss Vision保留对本手册的所有权利。禁止复制、部分复制或把本手册翻译成其它任何语言。根据产品的技术改进和补充，本手册所含信息将定期更新。本手册仅反映了印刷当时Carl Zeiss Vision的工艺情况。

© Copyright 2003 by Carl Zeiss Vision GmbH

对本手册的重印发、复制和摘录都必须经过Carl Zeiss Vision GmbH的明确允许。

Carl Zeiss Vision GmbH

Zeppelinstraße 4

85399 München-Hallbergmoos

<http://www.zeiss.de>

Germany

[czv\\_support@zeiss.de](mailto:czv_support@zeiss.de)

## 安全警告



在安装或使用软件之前请先仔细阅读所有设备（如显微镜外设、照相机、计算机及附件等）手册中的安全注意事项和说明。

# 目 录

1 导言	1-1
1.1 概念	1-1
图像获取	1-1
显微镜控制	1-1
图像处理和注解	1-1
图像分析	1-2
存档	1-2
配置	1-2
1.2 模块	1-3
图像获取模块	1-3
图像处理模块	1-4
图像分析模块	1-5
存档模块	1-6
配置模块	1-6
1.3 AxioVision 和 Windows	1-6
1.4 用户手册和在线帮助	1-7
1.5 复制备份	1-7
2 AxioVision 第四版新特性	2-1
2.1 图像获取	2-1
2.2 视图	2-1

---

2.3 显微镜控制	2-2
2.4 图像处理和注解	2-2
2.5 图像分析	2-3
2.6 文档管理	2-3
2.7 处理/配置	2-4
工作区 (Workarea)	2-4
工作流 (Workflow)	2-4
调整用户界面/配置	2-4
2.8 AxioVision 模块	2-5
3 概览与操作	3-1
3.1 概览	3-1
3.2 工作区	3-2
3.3 工作流程	3-4
3.4 自定义工具栏和对话	3-5
3.5 快捷菜单	3-7
3.6 属性 (Properties) 窗口	3-8
4 图像获取	4-1
4.1 概述	4-1
4.2 初始步骤	4-2
4.3 条件	4-2
标准工作流程	4-3
获取图像的快速指南	4-4

4.4 AxioVision 具体注意事项 .....	4-8
实时图像速度 .....	4-9
最佳色彩重现 .....	4-10
5 显微镜控制 .....	5-1
5.1 概述 .....	5-1
5.2 显微镜对话框 .....	5-2
一般属性页 .....	5-2
透射光属性页 .....	5-6
反射光属性页 .....	5-11
镜台属性页 .....	5-16
外部设备属性页 .....	5-17
5.3 设定编辑器 .....	5-18
如何生成硬件设定 .....	5-18
6 图像处理 .....	6-1
6.1 概述 .....	6-1
处理图像的不同途径 .....	6-1
图像格式 .....	6-2
6.2 注解 .....	6-3
6.3 运用图像处理功能 .....	6-4
概述 .....	6-4
平滑图像（基本） .....	6-5
阴影校正（基本） .....	6-8

---

校正多通道图像 XY 象素位移 .....	6-10
校正多通道 z-层叠图像的 z 象素位移 .....	6-13
6.4 增强显示器上的图像显示 .....	6-16
6.5 添加和格式化注解 .....	6-17
6.6 指定注解的标准设定 .....	6-18
7 图像分析 .....	7-1
7.1 概述 .....	7-1
执行测量的可能方式 .....	7-1
测量条件 .....	7-1
保存数据 .....	7-2
7.2 TIC 测量 .....	7-2
自动 TIC 测量 .....	7-3
互动 TIC 测量 .....	7-8
互动测量中出错原因 .....	7-9
TIC 标尺 .....	7-10
7.3 “Measurement” 工作流 .....	7-14
Measure 工作流：概览 .....	7-15
运行互动测量向导 .....	7-15
显示和输出测量数据 .....	7-17
8 文档管理 .....	8-1
8.1 概述 .....	8-1
8.2 AxioVision ZVI：用于数字显微镜的图像格式 .....	8-1

8.3 保存和输出图像 .....	8-2
保存图像 .....	8-2
输出图像 .....	8-2
图像的批处理转换 (batch conversion) .....	8-3
8.4 用图像文件浏览器 (Image File Browser) 管理图像 .....	8-5
图像文件浏览器窗口 .....	8-6
图像文件浏览器工具栏的功能 .....	8-7
改变数据编目表 .....	8-8
生成, 打印和输出报告 .....	8-9
表格和报告的模板 .....	8-12
编辑模板设定 .....	8-13
8.5 多通道图像编辑器 .....	8-19
9 配置 .....	9-1
9.1 概述 .....	9-1
9.2 用户和数据管理 .....	9-1
Windows 用户管理 .....	9-1
Windows 下的数据管理 .....	9-2
9.3 标尺 .....	9-5
概述 .....	9-5
生成标尺 .....	9-6
9.4 调整用户界面 .....	9-9
创建工具栏 .....	9-9



---

给功能定义组合键 .....	9-12
创建自定义对话框 .....	9-13
定义工作流程 .....	9-17
9.5 一般设定 .....	9-20
9.6 输出和导入用户配置 .....	9-20
概述 .....	9-20
输出 .....	9-21
导入 .....	9-22
10 图像获取模块 .....	10-1
10.1 ApoTome .....	10-1
概述 .....	10-1
条带投影成像原理 .....	10-2
硬件配置 .....	10-5
相位校准 .....	10-8
光栅焦点校准 .....	10-14
用 ApoTome 获取图像 .....	10-18
用 ApoTome 进行多维取图 .....	10-21
物镜 – 光栅匹配表 .....	10-23
10.2 自动调焦 (Autofocus) .....	10-24
概述 .....	10-24
校准自动调焦 .....	10-25
使用自动调焦 .....	10-26

---

10.3 多维取图.....	10-29
多通道荧光模块.....	10-32
Z-Stack 模块.....	10-42
时序模块.....	10-45
高级成像：标记与查找（Mark&Find）.....	10-47
10.4 扩展聚焦（Extended Focus）.....	10-53
概述.....	10-53
获取扩展聚焦的图像.....	10-53
在扩展聚焦中使用 z-stack 图像.....	10-55
10.5 标记与查找.....	10-57
概述.....	10-57
如何创建一个标记与查找列表?.....	10-58
11 图像处理模块.....	11-1
11.1 高级成像（Imaging Plus）.....	11-1
概述.....	11-1
图像增强.....	11-1
灰度形态（Gray morphology）.....	11-2
图像运算（Image arithmetics）.....	11-2
傅利叶变换（Fourier transformation）.....	11-2
颜色空间切换（Color space transformation）.....	11-3
使用图像处理功能.....	11-3
11.2 Inside4D.....	11-27

---

概述 .....	11-27
设置 Inside4D .....	11-27
激活二维图像 (Ctrl+1) .....	11-27
激活三维图像 (Ctrl+2) .....	11-27
图像底部的三维视图 .....	11-28
选择视图.....	11-28
窗口中的控制元件 .....	11-29
Inside4D 属性页 .....	11-31
阴影模式.....	11-32
透明模式.....	11-36
表面模式.....	11-39
最大模式.....	11-43
生成图像系列.....	11-45
11.3 3D 去卷积.....	11-48
要求 .....	11-48
去卷积属性页 .....	11-50
点扩展函数 (Point Spread Function) .....	11-52
如何使用正则反相滤镜去卷积? .....	11-54
12 图像分析模块.....	12-1
12.1 互动测量.....	12-1
概述 .....	12-1
测量程序向导.....	12-1

---

12.2 自动测量 (AutoMeasure)	12-5
概述	12-5
自动测量模块概念	12-8
自动测量程序向导	12-9
执行测量程序	12-16
12.3 高级自动测量 (AutoMeasure Plus)	12-18
概述	12-18
高级自动测量模块概念	12-18
使用分割功能	12-19
进行二进制图像处理	12-28
使用自动测量功能	12-42
13 存档模块	13-1
13.1 AxioVision Cumulus 单用户	13-1
14 配置模块	13-1
14.1 VBA	14-1
概述	14-1
AxioVision 对象模式	14-1
管理和运行宏	14-2
通过 workflow、工具栏和快捷键来运行宏	14-2
VBA 在线帮助	14-3
Visual Basic 文档	14-3
Visual Basic 用户界面的使用帮助	14-4

---

Visual Basic 概念.....	14-4
Visual Basic 操作帮助.....	14-4
Visual Basic 语言目录.....	14-4
Visual Basic 附加模式.....	14-4
Microsoft Forms 参考.....	14-4

# 1 导言

## 1.1 概念

AxioVision是一个现代显微术的模块化图像处理和系统。可以通过整合特定功能的额外模块来扩展系统的图像获取、显微镜控制、图像处理和注解、图像分析、存档和配置等基本功能（见1.2节“模块”）。

基础版包括以下模块：

### 图像获取

AxioVision可使用多种不同的摄像头，包括从简单的TV摄像头到清晰高灵敏摄像头。Carl Zeiss AxioCam家族的摄像头可保证最佳整合效果。由于摄像头和AxioVision软件完美的整合，用户可以轻松生成复杂的图像和图像序列

### 显微镜控制

利用AxioVision可以全自动地和互动地控制任何电动的Carl Zeiss显微镜，当然你也可以使用手动的标准显微镜。软件控制可以提供以下优势：显微镜的参数设定可以按要求保存，以供将来重用；自动检测放大倍数；复杂操作更快，并且易于重现。

### 图像处理和注解

获得的图像立即显示在显示器上，并可以利用多种技术进行优化：

- n 对比度、亮度和色彩调节
- n 去噪，平滑和轮廓增强
- n 增强锐度/强调细节
- n 校正光照影响和白平衡

AxioVision可以按要求给图像添加任何注解。所有元素，从比例尺和色彩标记到文本和图示，都是整合在程序中的。

## 图像分析

AxioVision第四版的一个新特点就是用户可以在基础程序里进行简单的互动检测。测得的值（例如长度、面积和角度）显示在一个工作表里面，并可用扩展的工作表程序如Microsoft Excel进行处理，为了避免检测中的错误，所有步骤都有向导。当然，各种功能都可以通过菜单或工具栏随意执行

## 存档

除了图像本身，AxioVision图像格式ZVI还保存其它相关数据，如图像序号、取图日期、显微镜设置、曝光值、尺寸和标尺、对比程序等等。注解和测量值也和图像一起保存。注解是加在独立的面上而不是“刻”在图像上，因此不会挡住图像，而且随时可以修改。基于保存的参数，即使在若干年后，图像也可以在同样条件下再生。图像文件浏览器（Image File Browser）支持对大数据库的内容进行管理。通过这个浏览器，用户可以快速进行文件操作，并且能清楚地显示图像相关的所有关键数据。AxioVision提供预先设置好的报告模板，可以方便地生成报告。所有这些都可以在单独地随时进行修改或者完全再现。

## 配置

AxioVision第四版在个人工作环境配置方面给用户了极大的自由。为了加快操作速度，用户可以自由定义组合键来执行任何命令。每个用户都可以定义自己的工具栏、菜单栏和功能群。一个全新的功能就是把摄像头或显微镜控制相关的一组控制元件以独立对话框的形式组合起来，而这只需要几次鼠标点击即可完成。以前版本已有的 workflow 又有了新发展，现在完整的操作必须通过 workflow 来完成，这样就在很大程度上消除了操作失误的可能。

## 1.2 模块

可在基本系统的基础上扩展下列模块:

### 图像获取模块

#### ApoTome

ApoTome系统允许用户在投影原理的基础上生成穿过荧光样品的光学切片。处于焦平面以外的部分被除去，因此可以增强图像的锐度、信噪比和轴向分辨率。

#### 自动聚焦 (AutoFocus)

该模块可以让电动显微镜自动计算出最佳聚焦位置。该功能在反射光、透射光、明场、暗场和荧光实验中均可使用，并适用于所有AxioVision直接控制的摄像头。

#### 扩展聚焦 (Extended Focus)

尖锐的图像是进行精确分析的关键。显微镜的场深取决于物镜和设置，常常不足以生成单一的具有足够锐度的全面图像。AxioVision扩展聚焦模块解决了这个问题。在不同焦平面上获取大量图像，然后再把各个图像的细节组合成一幅完整的清晰锐利的图像。

#### 标记与查找 (Mark&Find)

该模块用于利用电动的镜台来记录和自动重定位载玻片上或者培养皿、多孔板内不同位置。

#### 多通道荧光 (Multichannel Fluorescence)

该模块允许用户获取多通道荧光图像，可与Z-Stack、时序和标记与查找模块合用。



### 时序 (Time Lapse)

该模块允许用户获取时序图像，可与Z-Stack、多通道荧光和标记与查找模块合用。

### Z轴向层叠 (Z-Stack)

该模块允许用户获取Z轴向层叠图像，可与多通道荧光、时序和标记与查找模块合用。

## 图像处理模块

### Imaging Plus

Imaging Plus模块提供所有主要的数字图像处理技术。该模块包括图像增强、灰度形态学、图像算法和色彩空间转换等功能。功能对话框的设计使得用户可以在可任意定义的图像框内测试任意功能。这样显著加快了处理速度，尤其是对于复杂的计算。

### 3D去卷积 (3D Deconvolution)

该模块使用户能够用去卷积算法来提高Z层叠荧光图像的质量。利用点扩展技术 (Point Spread Function, PSF)，该3D去卷积技术把所有Z平面焦点外的光线投影回其来源

可使用三种方式：

- n 最近相邻法用于快速对比增强结果
- n 正则化反相滤镜用于获取真正的3D滤光。
- n 最大可能迭代算法—获取最大光透射和增强分辨率的高端方法。

### Inside4D

Inside4D模块使用户可以非常方便地以三维方式显示Z层叠图像。三维结构也可以作为动画来观察，并以AVI或QuickTime格式输出数字动画

有四种方法可用：阴影、透明、表面和最大投影。用户也可以调节各种图像处理选项。例如可以随意选择放大倍数。

## 图像分析模块

### 互动测量 (Interactive Measurement)

该模块可以对多种参数进行互动测量，如大小、周长、数目等。一个新特性是只要在几个轮廓点上单击就可以进行周线测量。测得的数据和图像仪器保存，可供将来进一步评价。AxioVision第四版的另一个新特性是所有测量活动都有向导。第一个向导提供对测量中所有参数的存取，而第二个向导提供定义复杂测量过程的各种选项。

### 自动测量 (AutoMeasure)

利用AutoMeasure模块，可以在向导的帮助下轻易快速地生成测量程序。一个图像分析过程所需的所有功能被一个接一个地调用，设定每个任务的功能参数，最后保存为一个测量程序。一旦测量程序定义好了，用户可以用它测量任意数目的图像。

### 高级自动测量 (AutoMeasure Plus)

AutoMeasure Plus模块扩展了AutoMeasure模块的功能，包括多种分节和二进制图像处理的附加功能。在此这些功能不再是在向导中执行，而是以菜单功能的形式单独出现。他们可以自由组合，允许用户创建自己的测量程序。外挂的分节和二进制图像处理保证了实际上可以解决任何测量任务。

### TIC 测量

TIC模块 (Total Interference Contrast, 仅与Carl Zeiss的TIC滑块联用) 可以在几纳米到几微米的范围内简便精确地测定目标结构的高度和厚度而不接触样品。与常规的薄层厚度测量仪器 (表面光度仪、原子力显

微镜等)相比, TIC方法的优点在于能在较短的测量和分析时间内得到高精度。循环偏振光的使用使得测量与方位无关,因此不需要旋转镜台。这种方法还可以分析具有较大表面积样品。

## 存档模块

### AxioVision Cumulus单用户

AxioVision Cumulus是用户拥有可随意处理的强大的数据库。AxioVision Cumulus以“Assets”方式管理图像、文本和图解。它允许用户对数据分类,给每个类分配目录/关键词以及注解和评论,并可以调整、显示、输出和处理任何来自文件的数据。用户也可以以幻灯片的形式显示Assets,并加入语音注解和教学材料。

## 配置模块

### VBA

或许会有用户发现AxioVision提供的大量功能还不足以满足他们的要求,那么他们可以进一步增加可用的选项并按要求调整程序。该技术基于VBA (Visual Basic for Applications),提供了程序员所熟悉的完全整合的开发环境。由于VBA已经直接整合到AxioVision中,它提供了快速互动开发程序的解决方案而不需要额外的程序。

## 1.3 AxioVision和Windows

AxioVision完全支持现有的Windows标准:

文件全部按照Windows规则存储在特定的文件夹中 (“My Documents”, “Documents and Settings”),所以用户可以轻易找到所需文件。

在多用户环境中,不需要为AxioVision建立独立的设定来分别保持单个用户的设定和数据防止非授权存取。用户管理也完全基于

Windows中的设置。

配置输出输入的特殊功能使几个或所有用户可以方便快速地使用已创建的设置和所有重要的用户文件。

## 1.4 用户手册和在线帮助

AxioVision用户手册和在线帮助是相辅相成的，联合使用它们可以及时地为用户提供全面的信息。

用户手册包含所有程序模块的介绍，以及所有基本功能的详细操作指南，并描述了常见的一些情况。在每一章的前言都有程序相关部分或章节的详细背景介绍，可能是相关的概念信息或者是理论细节的描述。由于AxioVision提供的功能范围太广，所以不可能详细描述每一个可能的操作情况。然而，只要掌握了手册中所描述的操作步骤，用户应该能自由运用这些操作来解决特定的任务。

在线帮助提供了每一个功能的参数和设定选项的所有细节，是用户手册的完美补充。如果对特定的参数有疑问，可以按下F1键来获得关于它的进一步信息。但在线帮助不包括在用户手册中已经描述过的步骤。

强烈建议用户在开始使用AxioVision进行独立实验前熟悉本手册中描述的程序实例。只要熟悉了常规的操作步骤，其它信息都可以在在线帮助中找到。

## 1.5 复制备份

强烈建议所有用户定期备份创建的数据，例如图像、测量数据、存档、报告、表格和文档，否则有可能由于操作失误或硬件故障导致数据丢失。

Carl Zeiss和Carl Zeiss Vision不对数据保护不周带来的任何损失负责。

## 2 AxioVision 第四版新特性

与第三版相比，AxioVision第四版具有许多全新特性，在此仅描述其中最重要的改进，其它细节可以在相关章节和在线帮助中找到。

### 2.1 图像获取

所有摄像头控制和图像获取功能都有自己的菜单，这些菜单是用户可以以独立的对话形式调用任一控制参数，例如曝光时间设定。

或者，也可以象以前版本一样在单个对话框中处理所有控制选项。该新特性简化了操作，因为它只显示你所需要的参数。

摄像头和显微镜控制的各个控制参数可以以对话形式进行组合。具体参见2.6节“处理/配置”。

如果打开实时窗口，属性（**Properties**）对话窗口即显示相关摄像头的控制参数，这样简化了摄像头控制操作。在实时窗口中还添加了一个额外的工具栏，提供对常用功能的快速调用（如显示特性曲线调节等）。

### 2.2 视图

播放器（**Player**）控制在多维图像操作（通道选择和时序或者Z平面选择）方面得到了显著的扩展。选择通道的按钮现在以通道颜色显示。色彩分配可以在列表中选择改变，时间/Z向幻灯片可以通过快捷键控制。

剖视图（Cut View）功能是一种分析Z-层叠图像的新功能。该功能可用于创建通过Z层叠的正交切面。

## 2.3 显微镜控制

和图像获取功能一样，显微镜控制功能也有自己的菜单。用户可以调用包括所有控制参数的对话框，或者通过个别的对话框来控制。个别的对话框可以与相应的摄像头控制对话框结合来创建独立的对话框，以节约空间和提供简便高效的操作方式。

可以通过设置编辑器（Settings Editor）来方便地生成保存摄像头和显微镜控制参数的设置文件。这样做的优点是涉及的配置不一定要处于激活状态，所以不需要使样品（特别是荧光样品）处于光照下。

## 2.4 图像处理和注解

图像处理的方式得到了显著的扩展。除校正亮度和对比度的标准功能外，用户还可以在RGB和HLS色彩空间中调节色彩平衡。同样也可以对已经获取的图像进行光照不均平衡调节（阴影校正）。当用户通过AxioVision菜单调用各种功能时，图像处理功能可提供实时预览，并允许用户设定放大率和选定图像范围。图像处理产生的结果自动显示为新的图像。

所有图像处理功能都适用于多维图像。对于这类图像，可以选择性地对个别图像（如通道、Z平面、时间点）应用图像处理功能，而不是把它作为整体来处理。对于多通道荧光图像，用户可以分别为每

个通道设定参数。

注解的运用也有所改进。当拖入一个元素后，即自动回到所谓的记号模式（通常鼠标/指针模式）。该元素可以被单独选定、删除、移动或修改。

对于每种工具（比例尺、文本、线条等），其标准设定，如线条粗细、色彩、文本属性等，都可以分别定义。

重要的信息，例如取图日期、曝光时间等直接以独立注解方式可用，而不必以域值形式来定义。

## 2.5 图像分析

在基本的AxioVision程序中即可进行测量。简单的测量，如长度、轮廓线、周长、角度或者事件计数等，可按常规方式通过菜单执行，或者在向导的下一步一步地执行。

## 2.6 文档管理

AxioVision第四版有一个图像浏览器（Image File Browser），可以浏览系统的文件夹结构。它也可以以多种视图显示图像（图库、表格或列表），或者连续放映所有图像或选定图像。利用批量转换（Batch convert）功能，可以一次性把任意数目的ZVI格式图像输出成外部图像格式如BMP、TIF、JPG等的图像。对于多通道荧光图像，除了保存单个通道图像外，AxioVision也以彩色图像格式输出所有通道的合成图像。

另一个全新的特性是图像编辑器（**Image Editor**）。它可以删除多维图像中多余的单个图像只保存相关图像，从而大幅度降低多维图像存储所需空间。

## 2.7 处理/配置

### 工作区（**Workarea**）

所有在工作区内的属性页（特别是控制显微镜和摄像头的参数）都可以以对话形式使用。这样用户可以隐藏工作区，特别是仅使用 workflow 来操作 AxioVision 时。

### 工作流（**Workflow**）

工作流不再是以简单的工具栏形式出现，而是有它们独立的窗口。来自工作区和整个 AxioVision 菜单（以自定义对话的形式）现在都可以在工作流中使用。这意味着用户可以完全使用工作流来操作 AxioVision 而不需要任何额外的元件如工作区或菜单。

### 调整用户界面/配置

用户界面可以根据用户要求任意调整。

利用模块管理器（**Module Manager**），个别用户不需要的功能可以关闭，仅显示用户需要的程序选项，降低造成混乱的可能。

不必再特地去创建用户自定义配置（**User specific configurations**），当个人用户登录系统时，AxioVision 自动调用该用



户上次使用的配置。

只要几次鼠标点击即可创建用户自己的对话，而不需要进行编程。用户可以创建一个对话，其中只包括实际所需的功能，而不显示无关元件。在“固定模式“下可以把几个控制窗口（例如控制设备）结合在一起，从而同时打开或关闭它们，以避免界面变得混乱拥挤。

所有可用功能都可以通过组合键（key combination）来执行，这样用户可以快速执行常用功能而不必通过菜单。

配置可以被输出或输入，以使其他用户可以使用已创建的配置。这意味着所有 workflow、工具栏等和用户定义文件如模板和标尺都可以轻易地转给其他用户（详见9.2节“用户和文件管理“）

## 2.8 AxioVision 模块

新版AxioVision的关键特性之一就是大量的新模块，之前版本中已有的模块也得到了优化，某些模块甚至完全重写了。

特别请注意用于多维图像获取的模块：多通道荧光、Z-层叠、时序和标记&查找。某些情况下，模块的性能得到了极大的扩展，而操作得到了显著的简化。详细情况参见10.3节“多维获取”

剖面图（Cut View）功能（正交切片）可用于显示3D图像。用户可以显示切片的单个平面或整个区域的“最大强度投影”，该功能可以通过图像窗口的工具栏直接激活。

还有以下新模块：

**n ApoTome:** 根据条带投影原理获取光学切面

- n **Imaging Plus:** 图像增强, 灰度形态学和色彩空间转换
- n **Interactive Measurement:** 增强的互动测量程序
- n **AutoMeasure:** 利用向导方便地生成测量程序
- n **AutoMeasure Plus:** 用于分节、二进制图像处理和自动测量的高级自动程序
- n **TIC Measurement:** 可以在几纳米到几微米的范围内简便精确地测定目标结构的高度和厚度而不接触样品
- n **3D Deconvolution:** 利用去卷积算法提高z层叠荧光图像质量
- n **AxioVision Cumulus Single User:** 图像分类编目存档
- n **VBA:** 编程环境

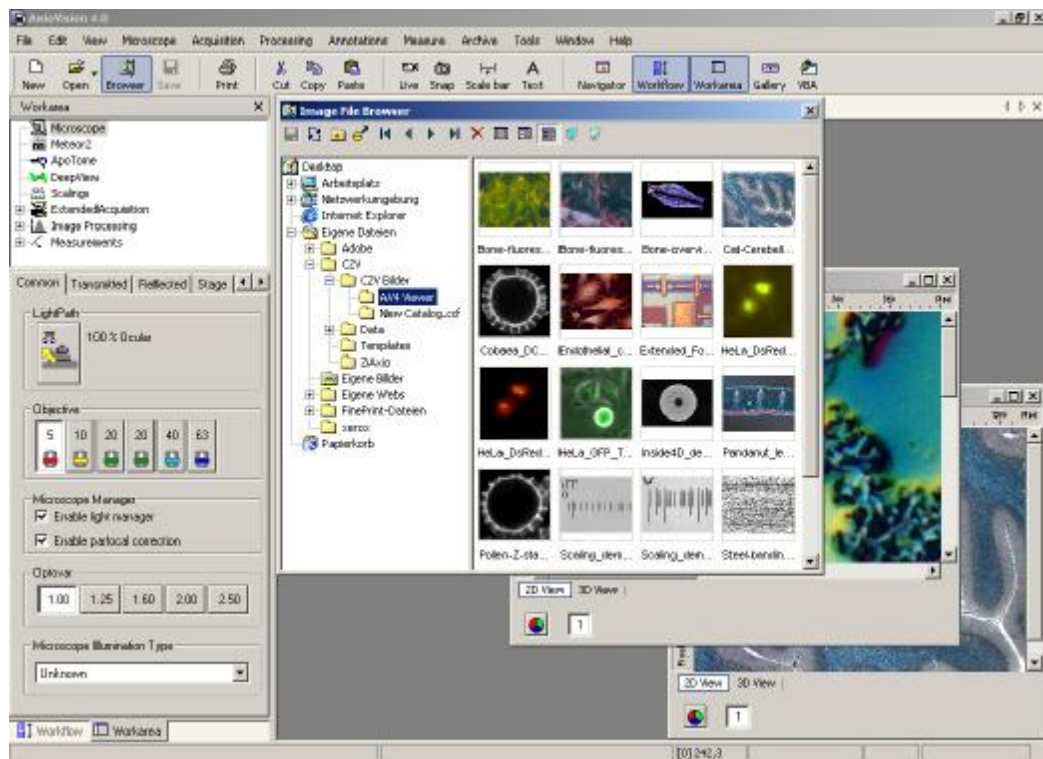
详情参见1.2节模块简介和本手册中相关章节。AxioVision 3中已有的其它模块的功能在本手册相关章节中也有描述。

## 3 概览与操作

### 3.1 概览

AxioVision的主窗口分为两个主要部分：左侧的工作区（Workarea）和 workflows（Workflow），右侧的文档区。

工作区和 workflows 用于选择和运行图像处理功能以及控制摄像头和显微镜的功能。在文档区显示和编辑所有文档（图像、存档、报告等）。主窗口还包括窗口本身的控制元件，如主菜单、工具栏和状态栏等。



*AxioVision*的主窗口

## 3.2 工作区

工作区内的元素（见下图）可用于

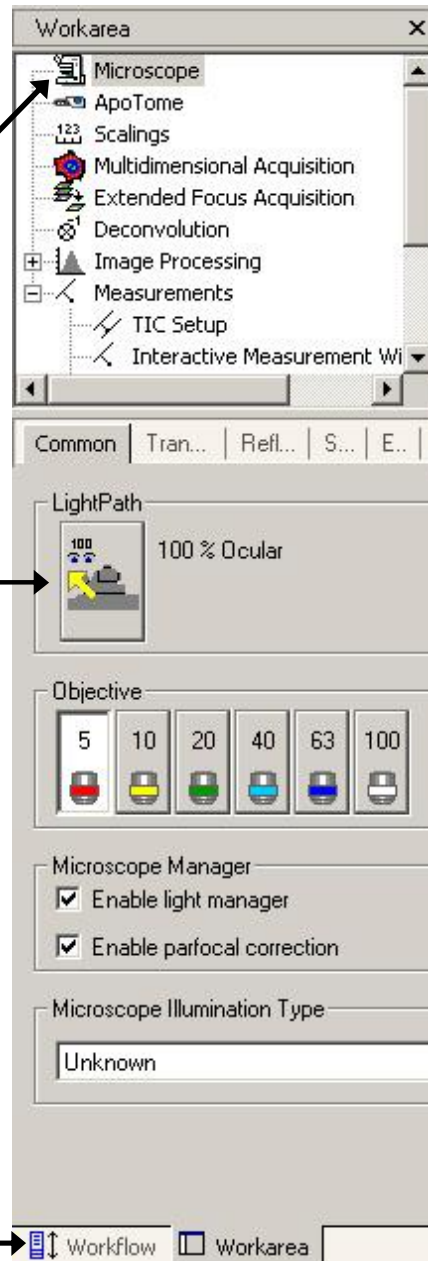
- ∅ 选择工作表上的处理功能，
- ∅ 设定属性页上处理功能的参数。

用户可以通过拖放标题栏  
来分开工作区和工作流程，或把  
一个放到另一个上面。

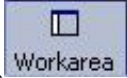
激活显微镜属性页

功能参数设定

在 workflow 和工作区  
之间切换的标签

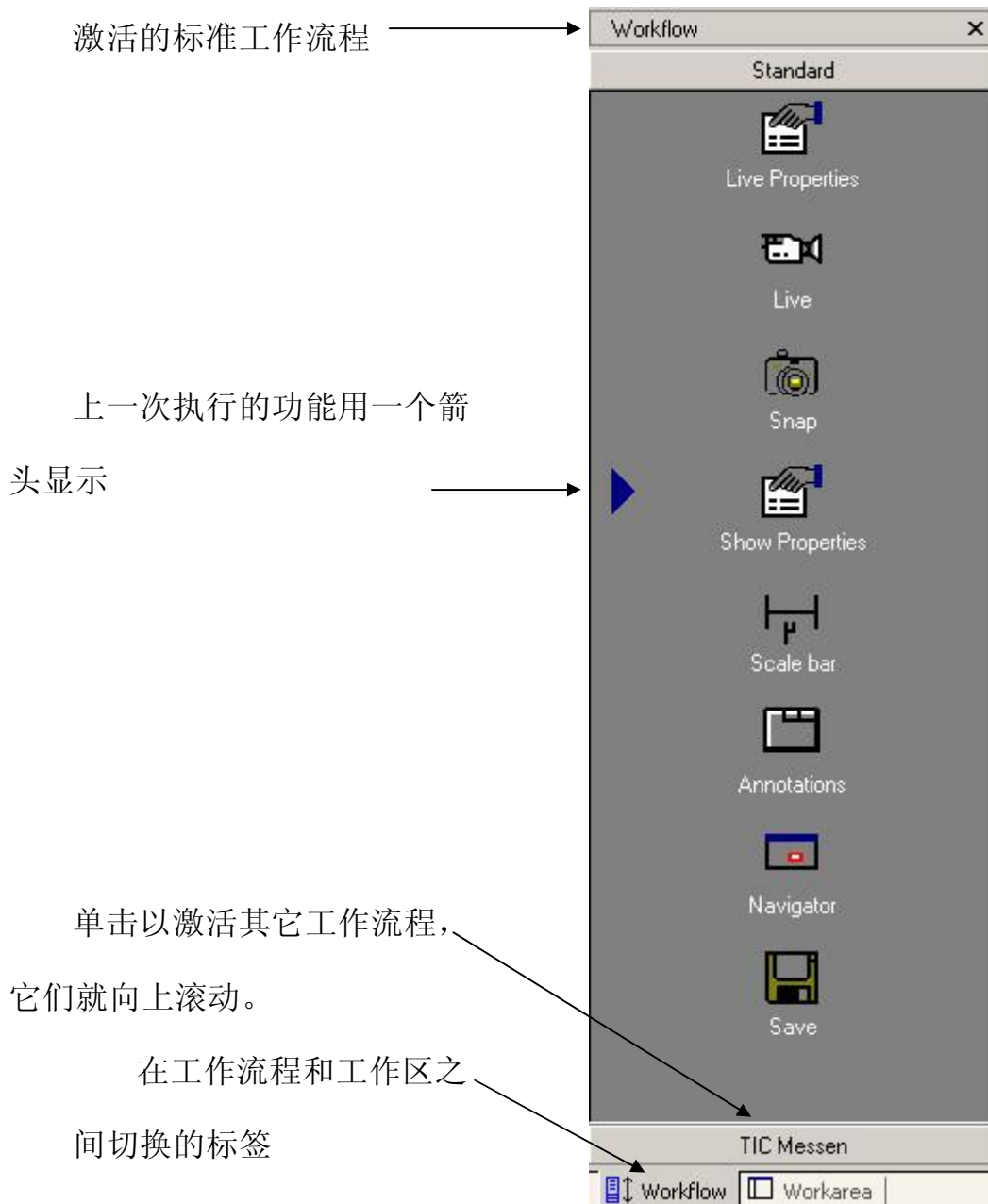


注意:

- Ø 工作区的所有功能都可以在AxioVision主菜单上找到
- Ø 默认情况下工作区和工作流程一个显示在另一个上面，单击底部的标签来进行切换
- Ø 如果工作流程被隐藏，再次显示时它显示在工作区旁边，用户可以通过拖放标题栏来把它放回工作区，以获取更大空间显示文档
- Ø 可以有两种方式显示或隐藏工作区：通过菜单命令View → Toolbars → Workarea或者通过标准工具栏上的按钮。该按钮是一个带有小方框图标的灰色矩形，下方标有“Workarea”字样。
- Ø 如果标准工具栏被隐藏了，选择菜单命令View → Toolbars → Standard。

### 3.3 工作流程

执行那些需要多次执行的常规操作最简便的方法就是通过工作流程。只要一个一个地单击工作流程上的功能，就可以迅速方便地得到想要的结果。隐藏了所有不必要的元件如工作区和工具栏有助于用户集中精力于实验本身。



**注意:**

- n 所有AxioVision中可用的功能都可用于工作流程中（参见第九章“配置”）。
- n 默认情况下工作区和工作流程一个显示在另一个上面，单击底部的标签来进行切换。
- n 如果工作流程被隐藏，再次显示时它显示在工作区旁边，用户可以通过拖放标题栏来把它放回工作区，以获取更大空间显示文档
- n 有两种方式显示或隐藏工作区：通过菜单命令View →

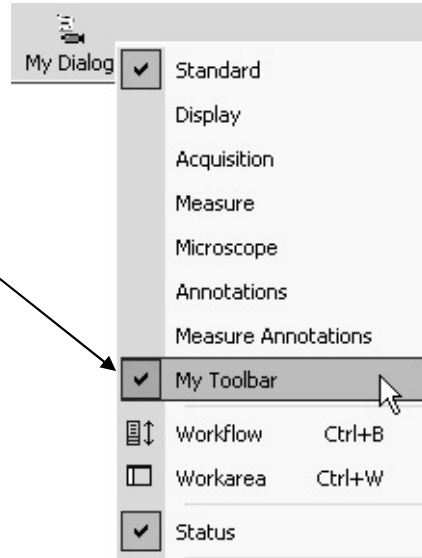
Toolbars → Workarea或通过标准工具栏上的按钮  Workflow。

- n 如果标准工具栏被隐藏了，选择菜单命令View →Toolbars → Standard。

### 3.4 自定义工具栏和对话

用户可以按照自己的要求生成自定义工具栏和对话。如果对话框中的设置选项过于复杂，那么用户可以轻松生成只含有所需控制参数的对话框，该对话框可以放在自动生成的工具栏上，而其它所有默认元件都可以隐去。这样用户就有了适合自己需求的系统。

可以通过“我的工具栏（My  
Toolbar）”调用“我的对话框（My  
Dialog）”功能

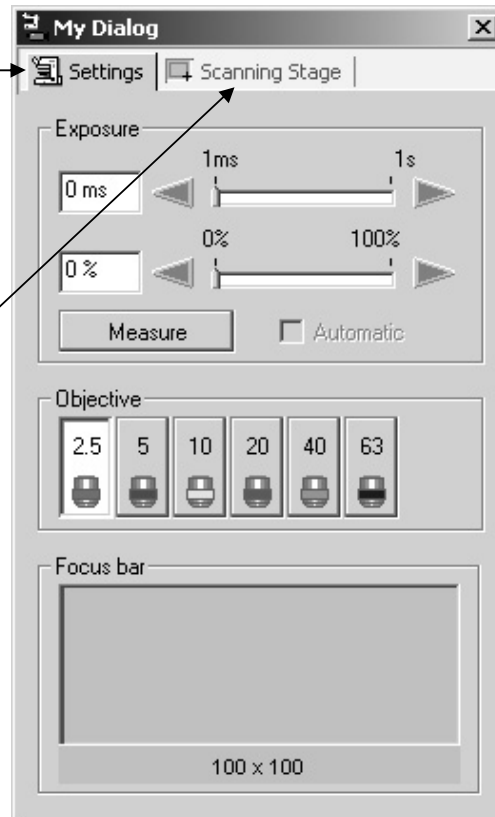


注意:

- n 可以生成任意数目的个人工具栏。
- n 用户自定义对话框也可以用作默认工具栏。

我的对话框（My Dialog）窗  
口包含设定（Setting）曝光时间  
和改变物镜的选项。

控制扫描镜台的功能在“扫  
描镜台(Scanning Stage)”页上。

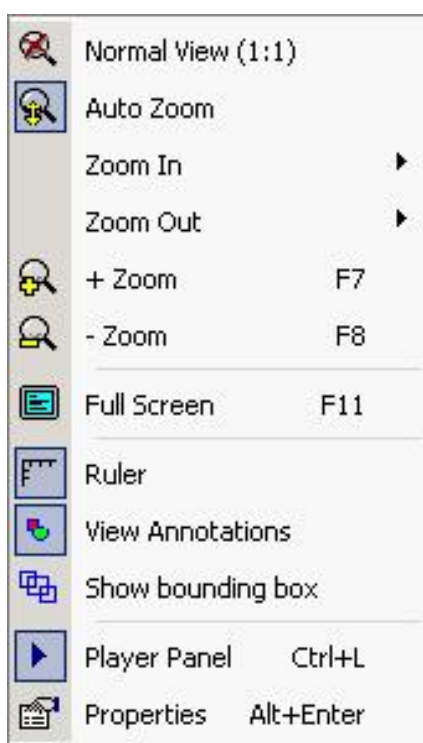




### 3.5 快捷菜单

快捷菜单包括经常用于链结文档（如图像）和AxioVision界面上特定元件的功能。这是调用这些功能最快捷的方式。

用户见面上的每一个元件都有快捷菜单，可以在任何时候通过右击相应元件激活。

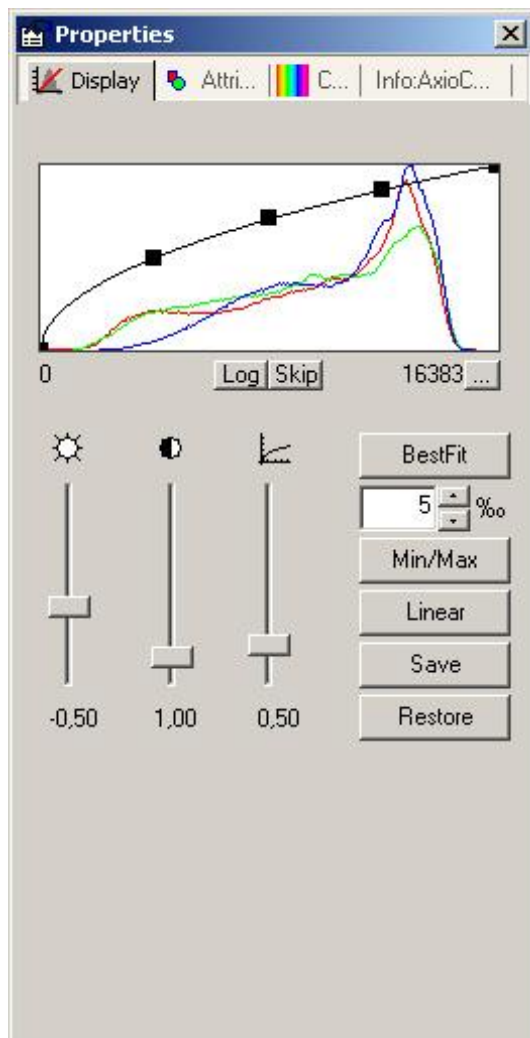


一个图像的快捷菜单

### 3.6 属性（Properties）窗口

改变文档（如图像）或AxioVision界面上任一特定元件的外观、行为或特定额外信息都需要利用属性窗口。

在属性窗口的标签页（显示Display、属性Attributes、色彩Color等等）后面，都有相关信息的列表和/或给出特定元件的选项或可输入/修改的属性，可以是保存日期和图像文件保存位置等等，也可以是文本或线条的格式。



一个图像的属性菜单

---

属性窗口在AxioVision操作中的具有中心地位，它可以通过多种方式打开：

- Ø 通过快捷菜单中的属性功能（见上节）。
- Ø 通过视图（View）菜单中的属性功能。
- Ø 通过组合键Alt+Enter。

## 4 图像获取

### 4.1 概述

在用计算机处理图像之前先要获取数字图像。电子摄像机从显微镜获取图像信息，并转换成电子信号，这些信号经过数字处理后显示在计算机上。与模拟摄像技术相比，现代数字摄像机在信号质量和分辨率方面具有优势，数据直接在摄像机里进行数字化。

为了把数据传送到计算机，还需要帧采集器、接口转换器或标准数字接口，它们通过专门的软件（称为驱动程序）进行操作。这些设备驱动程序都是整合在AxioVision系统里的。

在安装帧采集器、接口转换器等时请使用Carl Zeiss或相应制造商提供的相应驱动程序和手册。

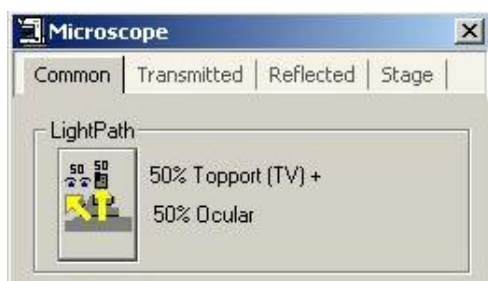
下面的内容均假定帧采集器或接口转换器及相应驱动已经正确安装。

关于AxioVision支持的摄像机/帧采集器的详细信息参见AxioVision在线帮助、AxioCam HR/MR/MRc5安装和参考手册以及产品光盘。

## 4.2 初始步骤

刚开始使用本系统时最好用相对简单的样品以便于用户判断结果好坏。

把样品放在显微镜下，调节显微镜以使通过目镜可以看到清晰的图像。把显微镜光路切换到TV适配器，例如50%摄像机，50%目镜。



注意：

- n 如果对摄像机不熟悉，请随时参阅相关手册。
- n 本文介绍图像获取的主要步骤。

关于AxioVision所支持的摄像机功能解释和设定请参阅相关手册。*Carl Zeiss AxioCam*系列产品在本文中作为所有支持的摄像机的一个例子。

## 4.3 条件

下面将介绍如何仅仅用几次鼠标点击来利用AxioVision获取图像（以AxioCam HR为例）。

利用标准工作流程是控制图像获取最容易的方法。如果没有显示工作流程窗口，从视图（View）菜单选择窗口（Windows）功能，再选择工作流程（Workflow）命令。

注意:

- n 工作流程窗口可能已经打开，只是被工作区窗口遮住了。这时单击工作区底部的Workflow标签



## 标准工作流程

**Live Properties**打开和关闭一个对话框，在这里用户可以调节显示特征曲线和控制摄像机（曝光时间，白平衡等）的设定。

**Live**于启动和关闭实时窗口。

**Snap**使用活动的摄像机获取图像。

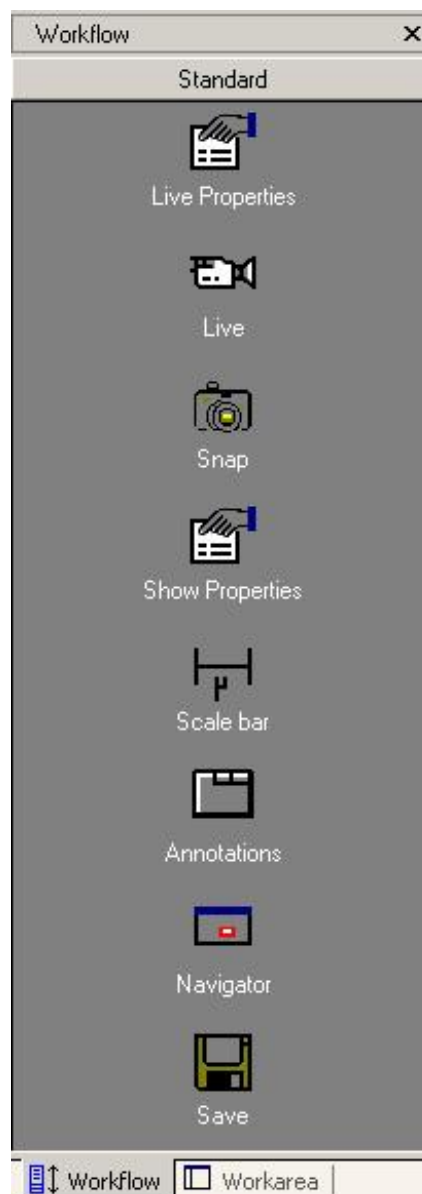
**Show Properties**打开图像属性（如显示、属性、色彩等）对话框。

**Scale bar**插入比例尺。

**Annotations**打开注解窗口。这里用户可以在已取得的图像中插入注解。

**Navigator**打开导航窗口。

**Save**保存图像。



由于图标在所有的菜单上都是一样的，下列各项描述对通过工具栏和 workflow 进行操作都适用。

### 获取图像的快速指南

Ø 选择使用的摄像机（如果只安装了一个摄像机，则不需要这一步）。



Ø 将光路设定到摄像机，然后点击实时图像图标打开实时窗口，显示摄像机图像。该功能也可以通过 Acquisition → Live 菜单调用。



Ø 现在调整摄像机焦距并选择用户要获取的图像。

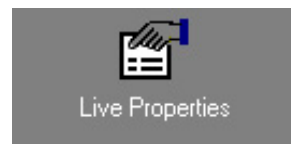


Ø 从可用比例列表中选择合适的比例。

Ø 单击实时图像底部的 gamma 图标以获得最佳色彩重现。

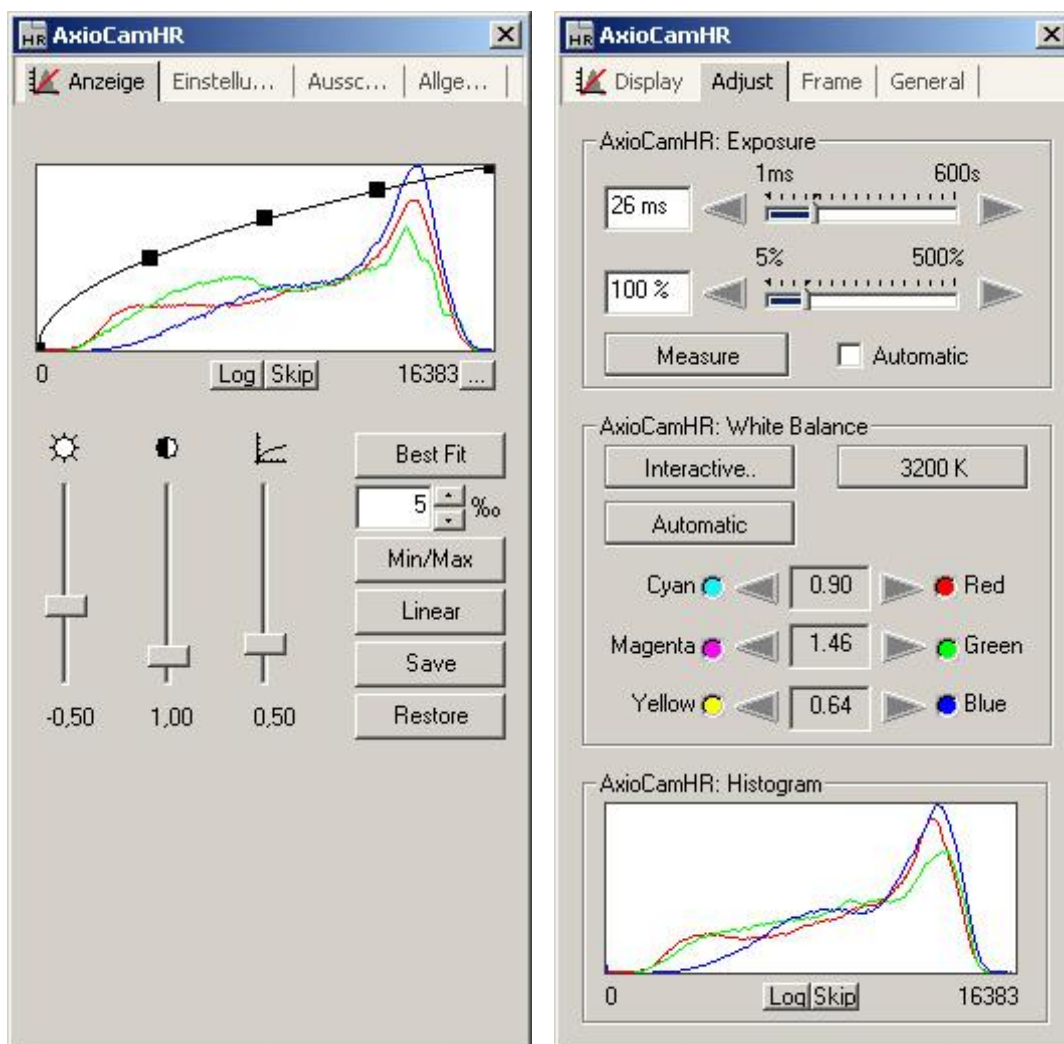


Ø 单击 Live Properties 图标以打开实时属性。



这里用户可以看见图像显示设置如亮度，对比度和 Gamma。设定

将应用于已获取的图像。



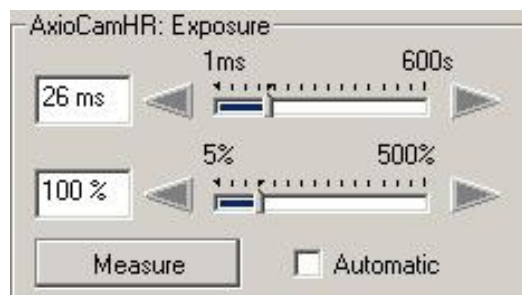
注意:

- n 这里仅改变显示设置而摄像机设定保持不变。



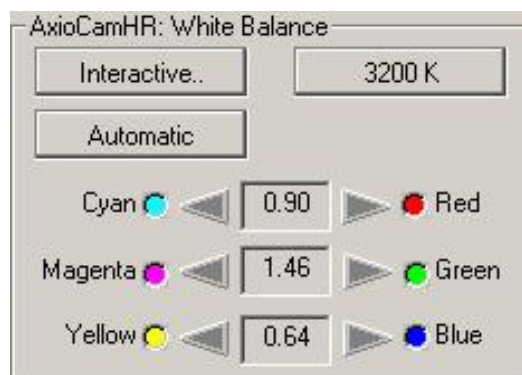
改变摄像机的以下控制设置：

Ø 中心设置是数字摄像机的曝光时间。使用**Measure**按钮可以确定一个最佳曝光时间。这时需要检查曝光时间对实时图像质量的影响。

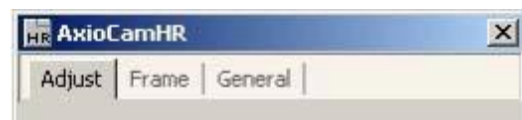


Ø 可使用箭头按钮和滑块来精细调节曝光时间。

Ø 如果使用彩色摄像机，需要对图像进行白平衡。如果选择自动平衡（**Automatic**按钮），摄像机将试图自己测定一个最佳值。



Ø 在**Adjust**、**Frame**和**General**属性页输入选定摄像机的进一步设置。



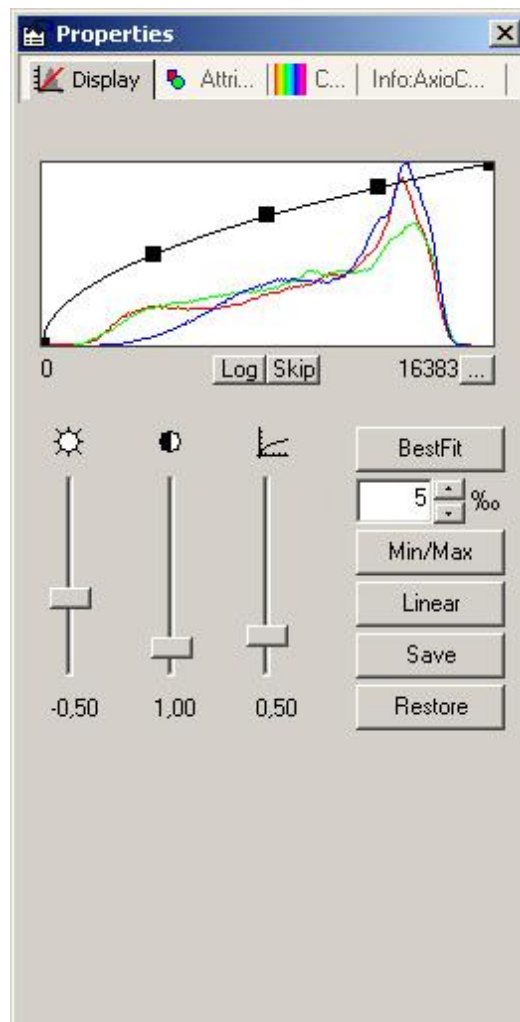
Ø 单击摄像机图标以获取图像，或者在**Acquisition**菜单单击**Snap**。



Ø 单击**Show Properties**图标以激活显示属性页。用户所作的任何改变都实时地显示在图像窗口里。



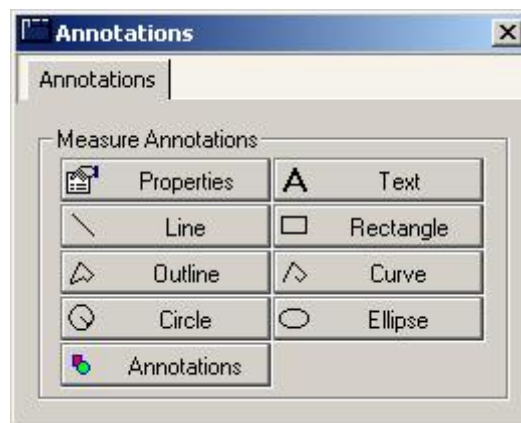
- Ø 上下移动滑块以调节图像的Gamma、对比度或亮度。
- Ø Gamma值大约为0.45时色彩可以在显示器上得到较好重现。
- Ø 单击Min/Max 以寻找对比度和亮度的最佳设置。
- Ø 单击Linear以撤消用户所作的所改变。



- Ø 用户可以用这个图标来给图像插入比例尺。必须预先生成和选择适当的比例。
- Ø 这个图标用于打开生成注解的窗口。
- Ø 利用Navigator可以调整在概览窗口中显示的图像大小和位置。



- Ø 利用注解（Annotation）窗口可以插入图注和标记。



- Ø 单击这个图标以保存用户生成的图像到计算机的硬盘上。




注意：

- n 一旦找到了一个好的摄像机设置，用户可以通过Tools菜单中的设定编辑器来保存和并在将来重新调用它。这样用户可以在不同时间以同样条件来获取特定样品的图像。
- Ø 要在获取实时图像时选择正确的比例，用户需要预先建立合适的比例。如果使用电动的或编码的显微镜，则可以自动分配比例。更多详细信息参见本手册第九章“配置”。

#### 4.4 AxioVision 具体注意事项

下面是几个关于实时图像速度、色彩调节、曝光时间、荧光图像和可调节工具栏的具体注意事项。

## 实时图像速度

对于AxioCam HR的实时图像有三种可用的速度模式。如果单击实时图像底部的图标，则会弹出一个设置选项菜单。当前设置显示在实时图像底部。

每一模式都有自己的特定的缺点。

模式	说明
Fast	分辨率大幅度降低，快帧频
Medium	中等分辨率，中等帧频
Slow	高分辨率，慢帧频

可以通过关闭其它AxioVision功能来进一步增加帧频：

- Ø 关闭聚焦条。
- Ø 关闭实时图像比例调节（1: 1显示图像）。
- Ø 在一般属性页设定图像原始方向不变（没有旋转）。

### 注意：

- n 上述只对短曝光时间有效，对于长时间曝光，获取速度主要取决于曝光时间。
- n 对于长时间曝光，如果自动放大是活动的则实时图像会出现颗粒，但是这不会影响最终的图像质量。

## 最佳色彩重现


下面详细描述了如何设置AxioVision以利用AxioCam HR达到最佳色彩重现。

**注意：**

- n 首先利用合适的图像来调好显示器，这样才能得到最佳色彩重现。

调节AxioVision的显示特征曲线：

为了使AxioCam HRc的数据在显示器上达到图像的最佳色彩重现，必须用显示特征曲线来设定gamma补偿。优点使只有显示受到影响而实际数据保持不变。下面会描述进一步的细节。可以如下设置：


- Ø 用鼠标单击实时图像底部图标 ，可以自动调节显示特征曲线以得到显示器的最佳色彩重现（ $\gamma = 0.45$ ）。

或在已获取的图像中：

- Ø 在属性（Properties）对话框调节显示（Display）属性页中的gamma特征曲线直方图。

**注意：**

- n 该操作也会影响色彩饱和度。
- Ø 对于荧光图像，可以通过移动特征曲线设定来进行背景校正。

- Ø 单击图标  回到数据原来的显示。

## 5 显微镜控制

### 5.1 概述

AxioVision特别为支持Zeiss的电动显微镜而设计。可以通过在工作区点击Microscope条目来激活显微镜属性页或通过从Microscope菜单选择Microscope。用户也可以从五个控制功能中进行选择：一般（General），透射光（Transmitted Light），反射光（Reflected Light），镜台（Stage）和外设（Extra）。

在AxioVision发布时可支持下列Carl Zeiss显微镜：

Axioplan 2	Axiovert 200 MAT
Axioplan 2 imaging	Axiovert 100 M
Axioplan 2 imaging e	Axioskop 2 mot plus
Axiophot 2	Axioskop 2 mot
Axiovert 200 M	Axioskop 2 MAT

用户的显微镜类型和相应附件可通过独立的显微镜配置程序选择。这个配置程序在Windows桌面上。



这里用户可以定义用户的显微镜类型和组件。显微镜属性页分为五个属性页。

## 5.2 显微镜对话框

该窗口包含下列属性页：

- Ø 一般（General） 用于查看光束和放大倍数
- Ø 透射光（Transmitted Light） 用于调节透射光照射和聚光器
- Ø 反射光（Reflected Light） 用于调节反射光照射和荧光滤镜
- Ø 镜台（Stage） 用于调节焦距和控制x/y镜台
- Ø 外设（Extra）（可选模块）

注意：

- n 本手册或在线帮助（F1 键）所描述的组件均假定基于最大配置。

但是只有那些预先在显微镜配置程序中定义显微镜组件是可用的。

### 一般属性页

该属性页包含可查看光束和选择放大的操作控制。

### 光路控制（可选）

**R**Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2（可选编码的或电动的）

**R**Axiovert 200 M（电动的）

**R**Axiovert 200 MAT

**R**Axioskop 2 mot plus（附件）

**R**Axioskop 2 MAT

光路控制由两个镜台组成：

- Ø 第一个镜台在目镜、摄像机接口间切换或按50%分光。
- Ø 第二个镜台在前部和尾部摄像机接口间切换。

光路（Light Path）控制区中的按钮显示了最常用的组合，代表当前设置的按钮处于按下状态，单击即可进行切换。

物镜旋座

**R**Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2（可选编码或电动的）

**R**Axiovert 200 M（电动的）

**R**Axiovert 200 MAT

**R**Axiovert 100 M（电动的）

**R**Axioskop 2 mot plus（只有编码的）

**R**Axioskop 2 MAT（只有编码的）

**R**Axioskop 2 mot（只有编码的）

在物镜（Objective）控制区的按钮代表物镜旋座的位置。代表当前设置的按钮处于按下状态。如果用户的物镜旋座是自动的，单击相应按钮即可切换物镜。

Carl Zeiss 物镜的色彩编码

按钮上物镜图标的颜色对应于物镜的色彩标志：

- Ø 标志色彩对应于放大倍数
- Ø 把鼠标指向物镜图标，即可显示对物镜的详细描述。



注意:

- n 为了保证物镜图标正确显示，必须在显微镜配置（Microscope Configuration）中正确设置相应的物镜描述。

Parfocality 校正

**R**Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2

**R**Axiovert 200 M

**R**Axiovert 200 MAT

**R**Axiovert 100 M

**R**Axioskop 2 mot plus

**R**Axioskop 2 MAT

**R**Axioskop 2 mot

当物镜改变时，显微镜内建的Parfocal校正能调节z驱动的位置，以对应于用户用底座上“Set”键定义的设置。选中Parfocal校正多选框以打开该功能。

光管理器

**R**Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2

**R**Axiovert 200 M

**R**Axiovert 200 MAT

**R**Axioskop 2 mot plus

**RAxioskop 2 mot****RAxioskop 2 MAT**

当物镜改变时，显微镜内建的光管理器自动调节光照组件以对应于用户用底座上“Set”键定义的设置。选中显微镜管理器中的光管理器多选框以打开该功能。

**Optovar（可选）****RAxioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2（可选编码的或电动的）****RAxiovert 200 M（电动的）****RAxiovert 200 MAT**

Optovar控制区的显示依赖于用户使用的optovar类型。

**Ø Optovar旋座**

按钮代表放大倍数。代表当前设置的按钮处于按下状态。如果用户的optovar旋座是自动化的，单击相应按钮即可改变放大倍数。

**Ø 缩放Optovar**

使用缩放optovar用户可以在1.0x 和2.5x间任意设定放大比例。滑块位置显示当前设置。如果用户的缩放optovar是自动化的，用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节放大比例。

**显微镜光照类型**

这里用户可按要求选择光照类型。该信息具有重要意义，例如对于Autofocus模块。

## 透射光属性页

该属性页和灯控制（Lamp control）区包含可控制透射光照和聚光器的设置。

### 注意：

- n 可见的操作控制和可用的选项依赖于特定的显微镜。如果显示和用户使用的实际设备不匹配，请检查显微镜配置。

## 聚光器前镜头（可选）

**R**带0.5 mot聚光器的Axioplan 2 imaging / Axiophot 2

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 mot plus

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 mot

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 MAT

在聚光器区的两个按钮分别代表前镜头处于旋入和旋出位置。代表当前设置的按钮处于按下状态。单击相应按钮即可旋入旋出。

### 注意：

- n 对于放大倍数为10x及以上的物镜用户应始终保持前镜头旋入以使用户可以按照Köhler方法设定光照。对于10x以下放大倍数用户必须旋出前镜头以保证视场完全照射。用户可以激活光管理器以保证前镜头在改变物镜时自动切换。
- Ø 当前镜头处于旋出位置时光照是关键问题，这时聚光器光圈挡板必须保持完全打开。但用户仍然可以调节视场挡板以优化对比度。

Ø 对于荧光光照用户不应使用前镜头，以避免漫反射光影响对比度。

聚光器旋座（可选）

**R**带0.8 H/D/Ph mot聚光器的Axioplan 2 imaging/Axioplan 2/Axiophot 2

**R**带0.55 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axiovert 200 M

**R**Axiovert 200 MAT 带0.55 H/D/Ph/DIC mot聚光器的

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 mot plus

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 mot

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 MAT

聚光器对比度控制区的按钮代表聚光器旋座的位置。代表当前设置的按钮处于按下状态。单击相应按钮即可转换对比度。

聚光器光圈挡板（可选）

**R**带电动聚光器的Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiovert 200 M

**R**带0.55 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axiovert 200 M

**R**带0.55 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axiovert 200 MAT

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 mot plus

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 mot

**R**带0.9 H/D/Ph/DIC mot聚光器的Axioskop 2 MAT

聚光器光圈控制区中的滑块位置显示了当前光圈设置。用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节光圈挡板。

注意:

n 为了达到最佳对比度用户应始终设定聚光器光圈挡板稍小于物镜光圈，以保证减小光圈时亮度能明显下降。用户可以激活光管理器以保证光圈挡板在改变物镜时自动调节。

Ø 当Axioplan 2 imaging / Axiophot 2的聚光器旋座设为暗场或相差时，光圈挡板始终自动完全打开，并且不可调节。

透射光滤镜仓（可选）

**R**Axioplan 2 imaging / Axiophot 2 （可选）

自动化的透射光滤镜仓由两个滤镜轮组成，一个位于另一个后面，每一个有四个位置，可均匀改变透射光照。AxioVision自动操作这两个滤镜轮，允许用户100%，50%，25%，12%，6%等等级调节。单击Transmission Filter控制区的两个按钮以增加或降低亮度。

注意:

n 对于滤镜轮2（6%，4%），使用彩色转换滤镜以在较低灯电压下达到3200K色温，从而延长卤素灯的寿命。因此只有当HAL Lamp控制区内3200K模式打开时，显示的6%及以下才是有效的。

如果用户用外部激发滤镜轮来操作Axioplan 2 imaging / Axiophot 2，在遥控滤镜仓时只有滤镜轮1（从100%到12%）可用。

## 视场挡板（可选）

### **R**Axioplan 2 imaging / Axiophot 2（可选）

挡板光圈控制区中的滑块位置显示了当前光圈设置。数值指示相对打开程度（从0到1）。用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节视场挡板。

#### 注意：

- n 为了达到最佳对比度用户应只在必要时打开视场挡板。用户可以激活光管理器以保证视场挡板在改变物镜时自动调节。

## 灯镜（可选）

### **R**Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2（附件）

### **R**Axiovert 200 M（附件）

### **R**Axiovert 200 MAT

### **R**Axiovert 100 M（附件）

### **R**Axioskop 2 mot plus（附件）

### **R**Axioskop 2 mot（附件）

### **R**Axioskop 2 MAT（附件）

灯镜控制区的两个按钮代表左灯和右灯。代表当前设置的按钮处于按下状态。单击相应按钮即可转换光源。

## 卤素灯

手动：灯电压由显微镜的可调变压器决定。

### 注意：

- n 对于Axioskop 2 mot plus, Axioskop 2 MOT, Axioskop 2 MAT, Axioplan 2 imaging e 和Axiovert 200 M该按钮不可用。

PC：灯电压由AxioVision决定，在Lamp Voltage/V区用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节灯电压。

### 注意：

- n 对于Axioskop 2 mot plus, Axioskop 2 MOT, Axioplan 2 imaging e 和Axiovert 200 M该按钮不可用。

手动/ PC：在该操作模式下用户在PC上设定的灯电压始终对应于在显微镜的可调变压器上设定的灯电压。在Lamp Voltage/V区用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节灯电压。

### 注意：

- n 该按钮只对Axioskop 2 mot plus, Axioskop 2 MOT, Axioskop 2 MAT, Axioplan 2 imaging e 和Axiovert 200 M可用。

3200 K：在该模式下灯电压设定为固定值，以维持照片的色温确实为3200K。对于Axioplan 2 / Axiophot 2灯电压自动调节到与透射光滤镜仓中的转换滤镜相匹配。

Standby：该模式下灯电压降低到较低值以保护卤素灯。选择任一其它模式即可再次打开灯。如果用户拖动灯电压/V滑块，

AxioVision将自动切换到PC模式。

## 荧光灯

**Level 1 / Level 2:** 点击 **Level 1**或**Level 2**按钮以激活预设的灯强度。灯切换到选定level的预设强度。改变强度只影响活动的level。

**改变灯强度:** 在**Lamp intensity [%]**区用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节灯电压。灯强度只影响选定的Level。

## 校准

### **R**Axioplan 2 / Axiophot 2

### **R**Axiovert 100 M

AxioVision允许用户校准灯电压。如果灯电压无法用滑块准确调节（误差0.2V），则建议进行校准。

## 反射光属性页

该属性页包含控制反射光照和荧光滤镜的操作以及普通灯控制区。

### 注意:

- n 可见的操作控制和可用的选项依赖于特定的显微镜。如果显示和用户使用的实际设备不匹配，请检查显微镜配置。

## 反射器旋座

### **R**Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2（可选编码或电动



的)

**R**Axiovert 200 M (电动的)

**R**Axiovert 200 MAT (电动的)

**R**Axiovert 100 M (电动的)

**R**Axioskop 2 mot plus (可选编码或电动的)

**R**Axioskop 2 mot (只有编码的)

**R**Axioskop 2 MAT (编码或电动的)

在反射器控制区的按钮代表反射器旋座的位置。代表当前设置的按钮处于按下状态。如果用户的反射器旋座是自动的，单击相应按钮即可改变反射器。

注意:

n 用户可以在显微镜配置中选择反射器位置的描述。

激发滤镜轮 (可选)

**R**Axioplan 2 imaging / AxioPLAN 2 / AxioPHOT 2

**R**Axiovert 200 M

**R**Axiovert 200 MAT

**R**Axiovert 100 M

**R**Axioskop 2 mot plus

**R**Axioskop 2 mot

**R**Axioskop 2 MAT

激发滤镜控制区的按钮代表外部滤镜轮的位置 (PINKEL滤镜轮)。

代表当前设置的按钮处于按下状态。单击相应按钮即可转换滤镜轮。

注意:

n 用户可以在显微镜配置中输入激发滤镜的描述。

反射光快门（可选）

**R**Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2

**R**Axiovert 200 M

**R**Axiovert 200 MAT

**R**Axioskop 2 MAT

**R**Axioskop 2 mot plus

快门控制区的按钮代表快门处于打开或关闭位置。代表当前设置的按钮处于按下状态。单击相应按钮以打开或关闭反射光照。

卤素灯

用户可以通过点击相应按钮从多种不同的模式中选择对卤素灯的操作。

手动：灯电压由显微镜的可调变压器决定。

注意:

n 对于Axioskop 2 mot plus, Axioskop 2 MOT, Axioskop 2 MAT,

Axioplan 2 imaging e 和Axiovert 200 M该按钮不可用。

PC：灯电压由AxioVision决定，在Lamp Voltage/V区用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节灯电压。

注意:

n 对于Axioskop 2 mot plus, Axioskop 2 MOT, Axioplan 2 imaging e 和Axiovert 200 M该按钮不可用。

手动/PC: 在该操作模式下用户在PC上设定的灯电压始终对应于在显微镜的可调变压器上设定的灯电压。在Lamp Voltage/V区用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节灯电压。

注意:

n 该按钮只对Axioskop 2 mot plus, Axioskop 2 MOT, Axioskop 2 MAT, Axioplan 2 imaging e 和Axiovert 200 M可用。

3200 K: 在该模式下灯电压设定为固定值, 以维持照片的色温确实为3200K。对于Axioplan 2 / AxioPhot 2灯电压自动调节到与透射光滤镜仓中的转换滤镜相匹配。

Standby: 该模式下灯电压降低到较低值以保护卤素灯。选择任一其它模式即可再次打开灯。如果用户拖动灯电压/V滑块, AxioVision将自动切换到PC模式。

荧光灯

Level 1 / Level 2: 点击 Level 1或Level 2按钮以激活预设的灯强度。灯切换到选定level的预设强度。改变强度只影响活动的level。

改变灯强度: 在Lamp intensity [%]区用鼠标拖动滑块或单击滑动条两端的按钮可以连续调节灯电压。灯强度只影响选定的Level。

## 校准

**R**Axioplan 2 / Axiophot 2

**R**Axiovert 100 M

AxioVision 允许用户校准灯电压。如果灯电压无法用滑块准确调节（误差 0.2V），则建议进行校准。

## 换灯器（可选）

**R**Axioplan 2 imaging / Axioplan 2 / Axiophot 2 （附件）

**R**Axiovert 200 M （附件）

**R**Axiovert 200 MAT

**R**Axiovert 100 M （附件）

**R**Axioskop 2 mot plus （附件）

**R**Axioskop 2 mot （附件）

**R**Axioskop 2 MAT （附件）

灯镜控制区的两个按钮对应于左灯和右灯。代表当前设置的按钮处于按下状态。单击相应按钮即可转换光源。

## 镜台属性页

该属性页包含控制聚焦和x/y镜台的操作。



**危险!**当用户从PC进行遥控操作时始终确认没有人把手指放在危险区。

### 注意:

- n 相应的操作控制只有当用户的显微镜装备有自动聚焦和/或用户连接了x/y镜台控制才是可用的。如果显示和用户使用的实际设备不匹配，请检查显微镜配置。

## 镜台

利用该控制元件用户可以控制和校准电动镜台，并可以执行互动距离测量。详细的介绍请参见AxioVision在线帮助（F1 键）。

### 注意:

- n 为了定义和保存电动镜台的位置，请使用Mark&Find模块。

## 聚焦

利用该控制元件用户可以校准和使用显微镜的电动聚焦驱动。这里用户也可以执行互动高度测量。详细的介绍请参见AxioVision在线帮助（F1 键）。

### 注意:

- n 请注意，聚焦驱动的最小步进取决于显微镜类型。请参阅显微镜

附带的技术手册。

## 外部设备属性页

该属性页上的元件可用于控制多达四个外部滤镜轮和六个外部快门的位置。

下拉列表Extra Filter 1 和Extra Filter 4用于确定用户希望相关滤镜轮调节到的位置。当前设置被显示出来。

**注意：**

n 用户可以在显微镜配置中选择反射器位置的描述。

从Extra Shutter 1到Extra Shutter 6按钮可打开或关闭相应快门。

**注意：**

n 只显示在显微镜配置设定的相应滤镜轮和快门按钮。

### 5.3 设定编辑器

在Tools菜单下用户可以打开设定编辑器对话（组合键Alt-S）。在本对话中用户可以生成、保存和重新调用用户的当前硬件设置，即显微镜、摄像机或其它外部组件如滤镜轮或快门。用户也可以应用这些设置到硬件上。

这些设置的目的是使用户更容易操作显微镜，也用于在复杂的实验中控制显微镜，例如在多通道荧光或Z-层叠模块中。设置以(\*.zvhs)文档保存在用户的个人目录中。

#### 如何生成硬件设定

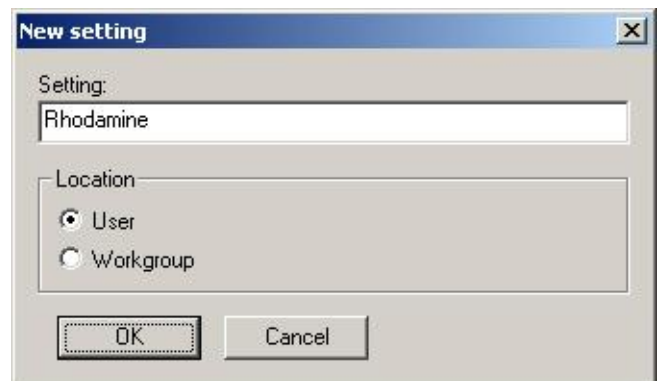
下面一步一步地解释如何生成和修改硬件设置文档以及如何把它应用于显微镜。在本例中，反射器旋座切换到Rhodamine位置，并打开荧光快门以使光照到样品。设置以"Rhodamine.zvhs"文件名保存。

- Ø 在Tools菜单中打开设定编辑器。

也可以用组合键Alt+S打开。




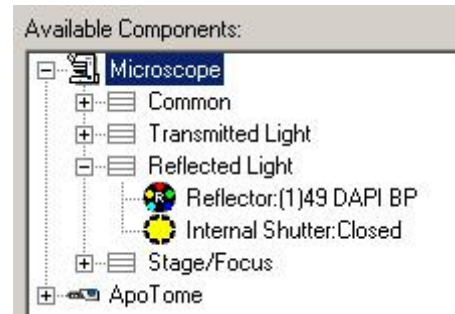
- Ø 在打开的窗口中单击New，在对话窗口中输入一个合适的名字，例如”Rhodamine”，并单击OK。用户可以决定使只有用户本人还是其它人也可以使用设置文件。




Ø 现在从Available Components列表中选择并把硬件设置添加到空文档中。

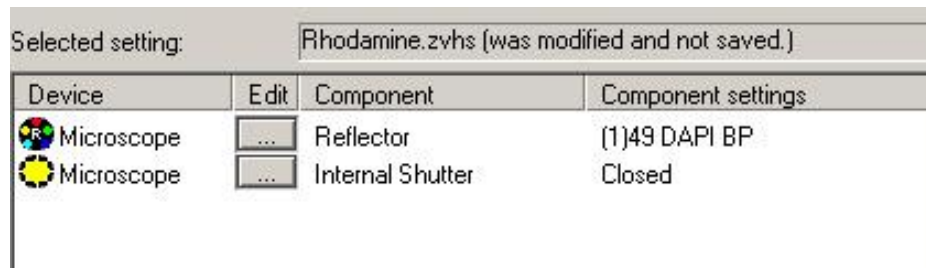


Ø 单击  打开显微镜目录，然后打开反射光组件群。现在应显示如下：




选择组件反射器（Reflector），并单击  把它添加到Rhodamine设置中。对内部快门重复该步骤。用户也可以通过拖放来添加该组件。

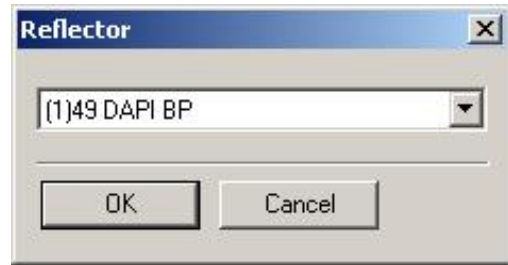
用户现在应该能看见这两个组件在设置窗口中列出：



两个组件都包含有特定设置。在本例中，组件反射器（Reflector）设定为滤镜组“[5]31 Cy 3.5”，同时内部快门打开。这些参数对应于显微镜的当前设置状态，不同情况下的显示可能和本例不同。




- ∅ 选择组件反射器并单击按钮 。这个选择对话框被打开：




- ∅ 从下拉列表中选择Rhodamine的反射器位置（本例中为位置3的15 Ex.546/12），并单击OK。



- ∅ 现在选择组件内部快门，单击按钮 ，然后单击Open对话框中的OK。

- ∅ 点击  保存用户的设置。

通过点击  来测试用户的新硬件设置。反射器模块现在应旋到位置3，同时荧光灯快门应打开。

硬件设置“Rhodamine.zvhs”现在已经保存，并可以为之分配一个功能键（更多信息请参见第九章“配置”）。

## 6 图像处理

### 6.1 概述

图像处理的任務主要由两部分组成：已获取的图像数据的校正和优化。

许多情况下数字图像处理是用于弥补可用设备的技术限制。然而，应该指出在许多情况下需要图像处理功能来补偿图像获取时的不小心。

重要的是，用户应在获取图像之前和期间充分利用仪器的技术能力。只有足够的原始信息才能保证好的图像质量。样品制备也非常重要，不好的样品只能产生不好的图像。

不管图像处理功能的目的是什么，确保任何时候原始数据不被覆盖。用户应始终能返回到原始图像以确认所作操作是否提高了图像质量，还是损坏了相关图像信息。

#### 处理图像的不同途径

在AxioVision中有两种不同的图像处理方式，各有不同的特征，为不同的应用而设计。一方面所有功能可以通过Processing菜单或工作区执行；另外，通过Properties窗口，用户可以用特征曲线优化图像显示质量（亮度，对比度和gamma值）。

两种情况下AxioVision均保证用户的原始数据不被修改：

- n 如果用户是通过Processing菜单使用功能，则默认结果显示在新图像文档中，这样用户可以决定是否要在新文档中保存结果或覆盖已存在的文件。
- n 如果用户是通过Properties窗口工作，用户图像的亮度和色彩信息不被修改，而只调节在显示器上显示的数值。由于用户保存的图像是AxioVision“ZVI”格式，在原始数据之外只有Properties窗口中的设置被保存在该文件中。
- n 当用户打开文件，最初的优化显示仍然是可用的。用户在任何时间通过Properties窗口恢复原始显示。如果用户以不同的格式输出图像，Export功能的设置可用来制定是保存原始数据还是在输出前应用修改后的设置。对于后者，灰度或色彩值已经改变，用户不能再恢复原始数据。

注意：

- n 建议用户始终以ZVI格式保存图像，如果要修改也只在以外部格式输出时进行。

## 图像格式

在本节中图像格式不是指文件格式（ZVI、BMP、TIF等），而是在一幅图像显示亮度和色彩的途径。

传统的TV摄像机可以区分256阶灰度。用这种灰阶可以显示从白到黑的全部光谱。在PC上区分256灰阶要求8位数据。

这些图像被称做8位图像。

为了显示彩色图像，需要有三个这种灰阶图像—一个红色，一个蓝色，一个绿色。这些图像本质上仍然是灰阶图像，即一幅彩色图像是由三幅灰阶图像组成，也称做24位图像，这种图像可以区分16.8M种色彩。

现代的数字摄像机不仅能区分256阶，实际上还可以区分多达65536阶，这时8位就不足以保存数据，而要求16位。

然而，16位图像本质上也只有灰阶，如果一幅彩色图像是三幅这种图像组成，那么就称做48位图像s。

注意：

- n 某些文件格式不能以16和/或48-bit图像保存。因此建议用户始终以ZVI格式保存图像，如果要修改也只在以外部格式输出时进行。

## 6.2 注解

注解是可以添加到图像中的一些附加元素（比例尺，图注，箭头等）。注意这里是添加到图像之上，而不是图像里。也就是说，注解是添加在图像信息之外的另一个面上，保证原始信息不被覆盖。

如果用户以AxioVision“ZVI”格式保存图像，则该面的信息可以保留。注解实际上是和图像信息分别保存的。当用户打开文件，显示的任何注解都可以修改、删除或隐藏，也可以添加新注解。

只有AxioVision ZVI格式支持这种技术。因此，如果用户以不同的格式保存图像，在Exportt功能设置中用户必须指定是否要添加注

解。用户有下列选项：

- Ø 如果用户把信息添加到图像中，位于注解下面的象素则被覆盖，用户不能再恢复。
- Ø 如果用户决定不添加注解到图像中，则注解丢失。
- Ø 另外，用户可以保存两个图像（一幅原始的和一幅带注解的）。

注意：

- n 由于以外部格式保存图像有诸多限制，因此建议用户始终以ZVI格式保存图像，修改只在以外部格式输出时进行。

## 6.3 运用图像处理功能

### 概述

本节列出运用图像处理功能的基本方法。对于所有功能所述步骤是相同的。各个功能的操作和具体参数参见在线帮助的Processing菜单条目。

下列例子中的各个步骤可以用提供的原始图像进行练习。样品图像保存在AxioVision文件夹中。默认情况下该文件夹位于”C:\Program Files\Carl Zeiss Vision\AxioVision 4\0009\Templates\图像”。如果找不到某一图像，请从AxioVision Viewer CD中加载。

## 平滑图像（基本）

图像常常包含噪声或亮度不均匀的区域，影响了要测量的目标（分割）。以达到满意的分割，这些图像需要用smoothing滤镜进行处理。

所有滤镜的功能通过滤镜矩阵运行，其大小可以用KernelSize参数设定。在进行滤镜处理是，矩阵的中心象素和矩阵内的灰度值相加，产生一个新值。

选择什么样的smoothing滤镜最合适取决于图像中的结构。用户应试用多个滤镜。如果用户希望消除不均匀的亮度而不影响结构的条带，则可以使用Sigma功能，从而保护精细结构。要压制噪声，可以使用Gauss功能，它减小图像的动态范围，并平滑整个图像，包括结构条带。

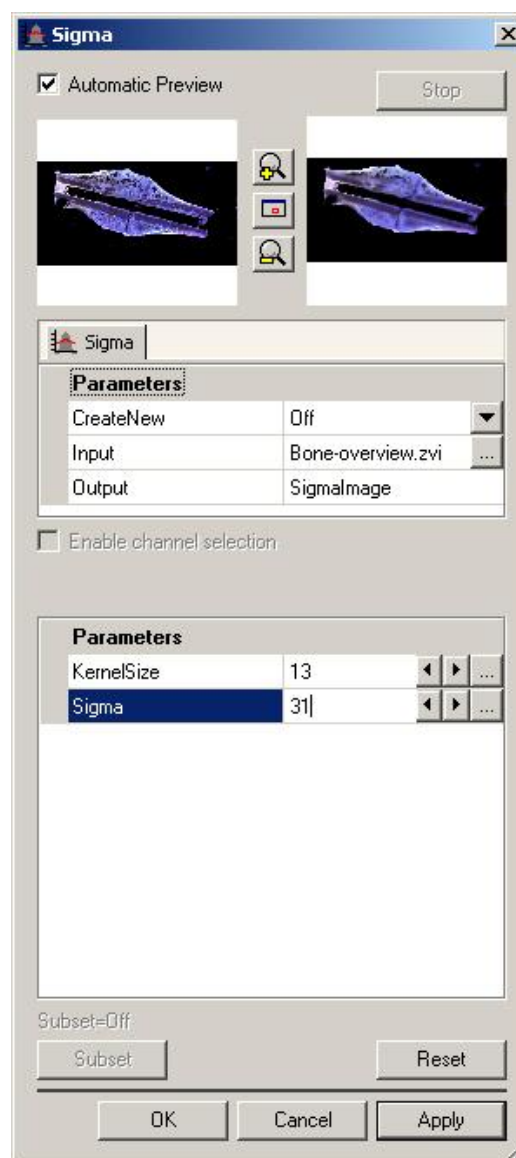
下列例子解释如何用两种不同的滤镜功能来平滑图像。

- Ø 通过功能File → Open Image  
加载图像"Boneoverview.zvi",  
或用摄像机获取一幅图像。
- Ø 图像显示在AxioVision的图像  
窗口中。



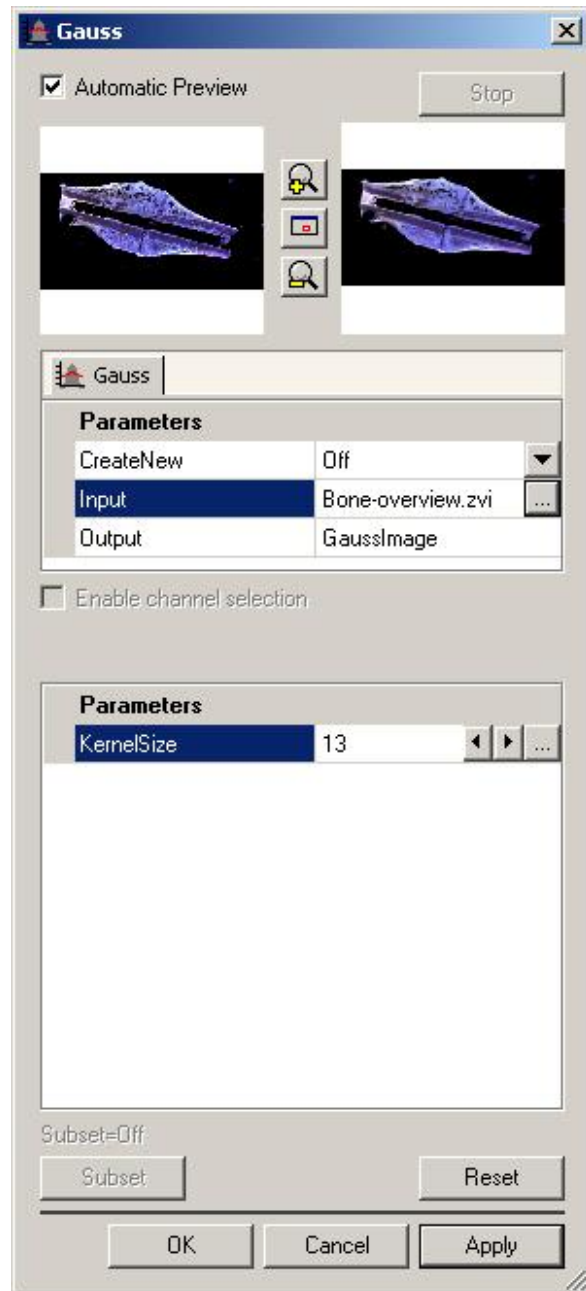
从Processing菜单中选择Smooth功能群，然后选择Sigma功能。

- Ø 用户应该看见Sigma功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 关闭CreateNew功能，以使不同的滤镜功能可以在同样的图像上执行。
- Ø 通过点击箭头或直接输入设定KernelSize值为13，Sigma值为31。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。



从Processing菜单中选择Smooth功能群，然后选择Gauss功能。

- Ø 用户应该看见Gauss功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 如果用户单击输入区的按钮，则出现图像图库。点击以选择原始图像。
- Ø 通过点击箭头或直接输入设定KernelSize值为13。
- Ø 单击自动预览（Automatic Preview）以预览结果
- Ø 单击OK关闭对话。

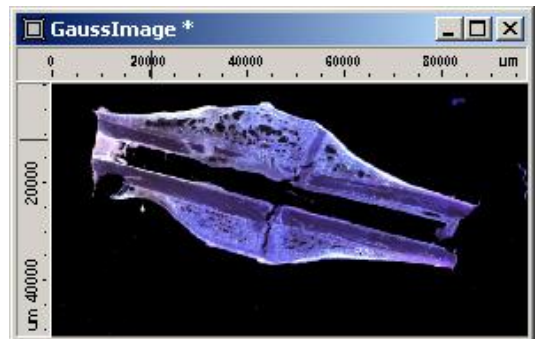




- ∅ 比较两个结果图像。
- ∅ 用Sigma滤镜可以达到强平滑效果而不会导致边缘模糊。



- ∅ 用Gauss滤镜，用同样的KernelSize可以进行较弱的平滑。目标的边缘也被平滑。



注意:

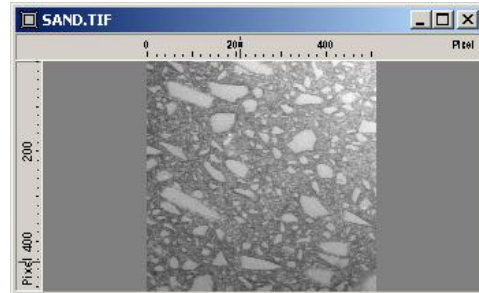
- n 必要时调节产生的图像的显示特征曲线。

### 阴影校正（基本）

不均匀光照，光学系统的色晕或摄像机传感器灵敏度不均有时会在图像上导致阴影，即图像亮度不均匀，它大大的削弱了图像效果和检测能力。要消除这种干扰，必须用一幅参照图像进行阴影校正。参照图像通常是一幅没有任何结构的空白图像，也可以利用已获取的图像中的空白区域。有时也可以使用伪阴影（pseudo-shading）参照图像，这种图像可以通过对原始图像进行非常强的平滑来得到（例如用一个强的Lowpass滤镜）。

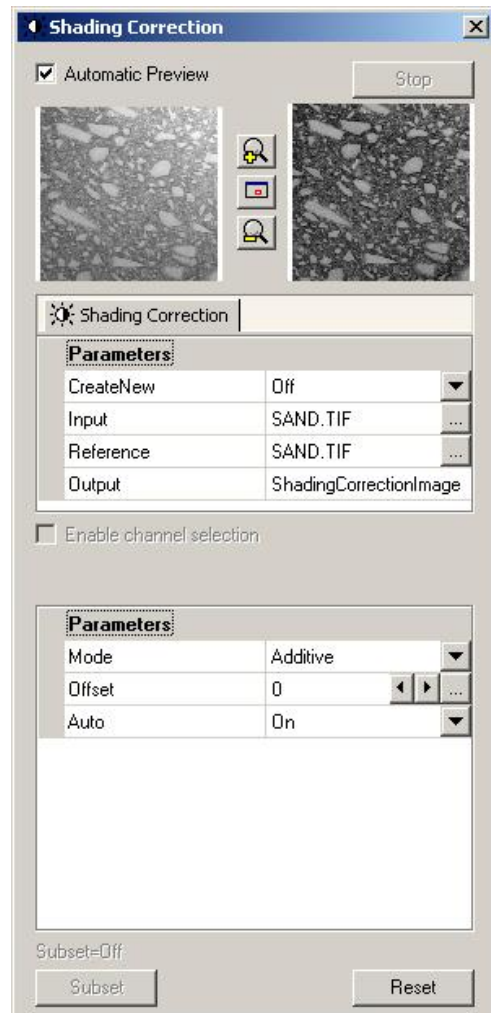
下面解释如何执行阴影校正。

- Ø 通过功能File Open Image加载图像“SAND.TIF”，或用摄像机获取一幅图像。
- Ø 图像显示在AxioVision的图像窗口中。

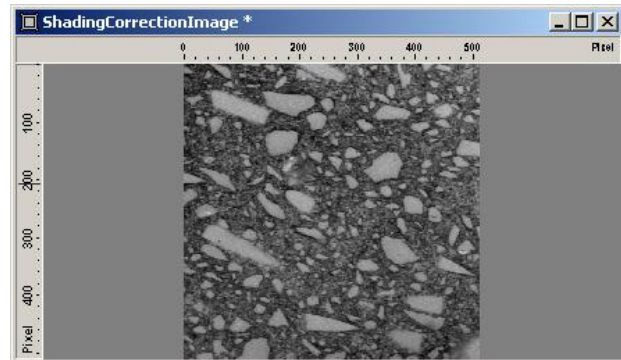


从Processing菜单中选择Adjust功能群，然后选择阴影校正功能。

- Ø 用户可看见阴影校正对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 关闭Create New功能，以便随意选择图像。
- Ø 选择加载的图像作为Input和Reference。
- Ø 设定Auto参数为On。这样可以自动生成一幅伪阴影参照图像并和原始图像相加。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。



Ø 生成的图像具有均匀光照。



注意:

n 必要时调节产生的图像的显示特征曲线。

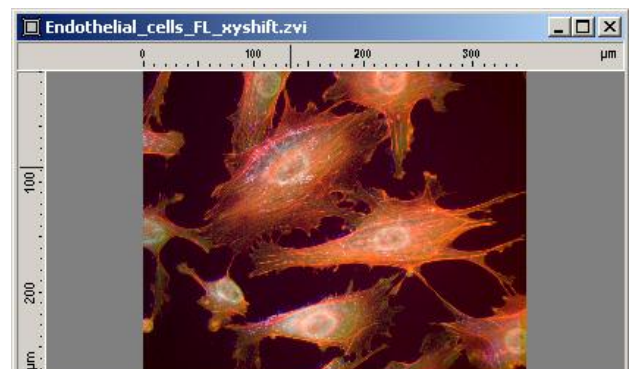
### 校正多通道图像 XY 象素位移

在用手动显微镜获取多通道图像时，用户通过移动荧光滑块来手动切换荧光滤镜。该操作可能在已获取的图像中造成不同通道间若干像素的XY位移。

个别荧光通道以伪彩显示，因此必须精确校正XY象素位移以保证各个通道严格重合。下面解释如何进行XY象素位移校正。

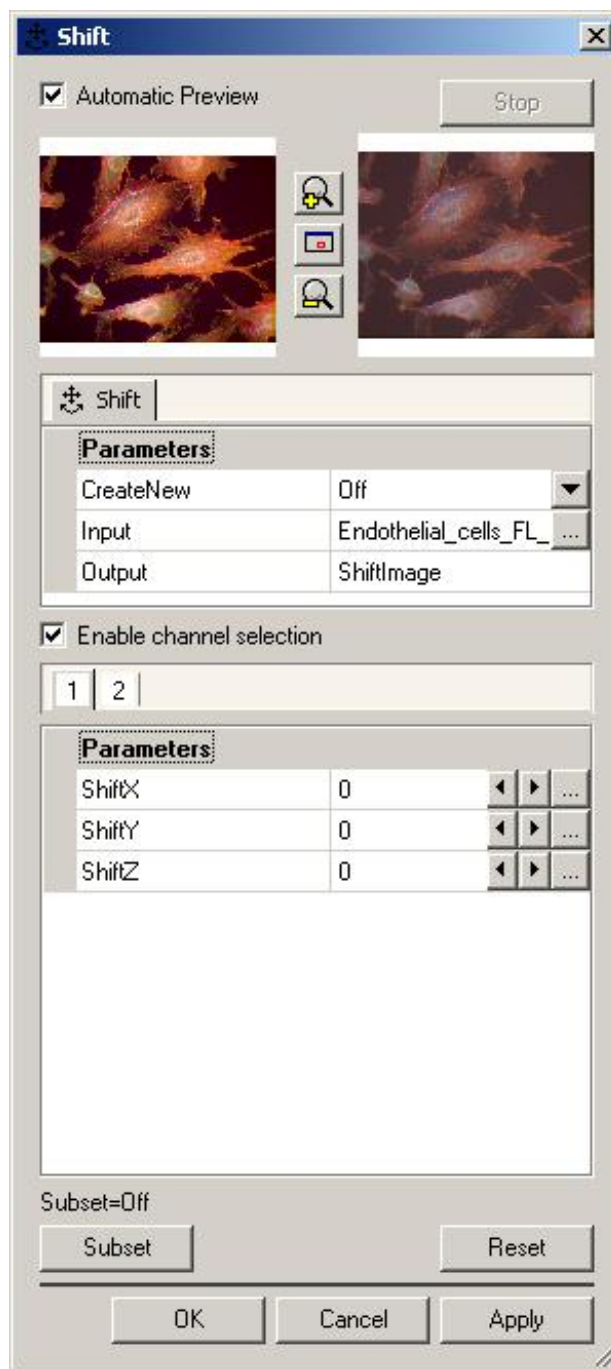
Ø 通过功能File → Open Image加载图像“Endothelial\_cells\_FL\_shifxy.zvi”，或用摄像机获取一幅图像。

Ø 图像显示在AxioVision的图像窗口中。

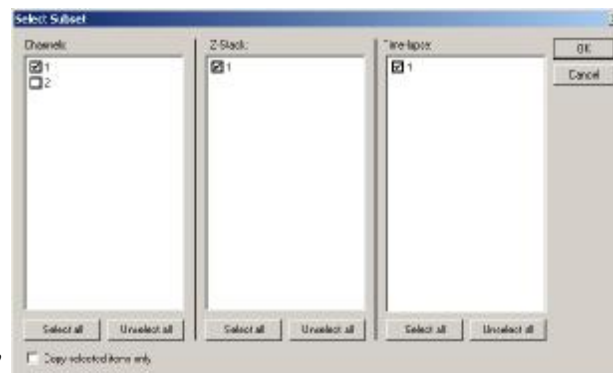


从Processing菜单中选择Geometric功能群，然后选择Shift功能。

- Ø 用户应该看见Shift功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览 (Automatic Preview) 多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 激活Enable Channel Selection，这样用户可以对各个通道输入XY位移。
- Ø 单击Subset。



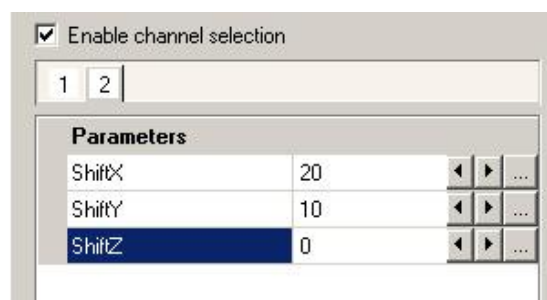
Ø 只激活用户希望校正的通道  
（本例中为通道 1）。



Ø 关闭Copy Selected items only,  
这样所有通道都显示在生成  
的图像中(包括没有校正的),  
然后点击OK。

Ø 在对话框中, 激活要校正  
的通道(本例中为通道 2)。

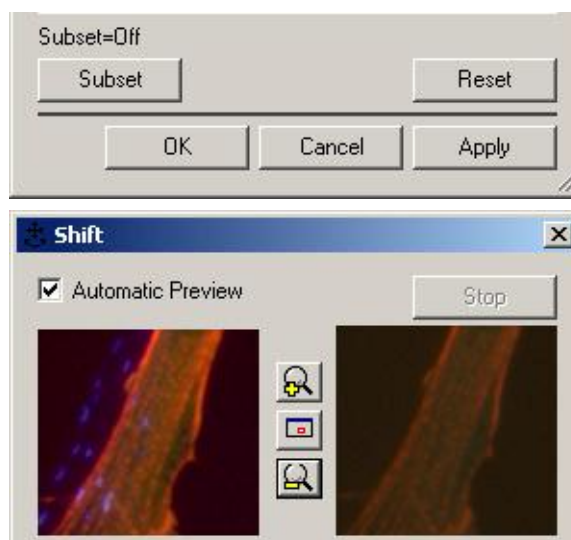
Ø 通过点击箭头键或直接输入  
值设定ShiftX和ShiftY位移。



注意:

n ShiftX和/或ShiftY的值和用户希望移动的象素数目相关。

Ø 单击Apply, 然后单击Zoom  
up, 以检查各个放大区域的校  
正效果。



注意:

n 必要时调节产生的图像的显示特征曲线。

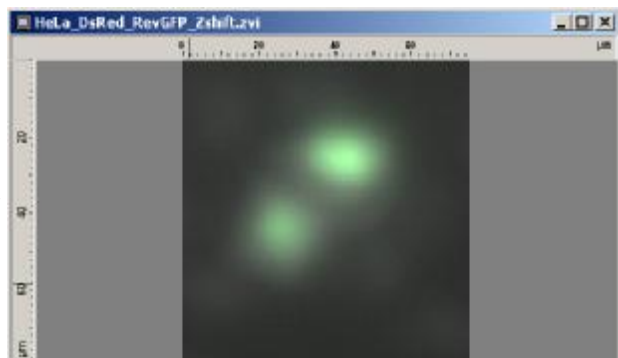
## 校正多通道 z-层叠图像的 z 像素位移

在定义多通道z-层叠图像时，一般只对一个通道设定焦平面，也就是说始终以同样的焦平面获取不同荧光通道。当用户从一个荧光滤镜切换到另一个时，激发和发射波长的改变也会影响焦平面。如果物镜不对这种色差进行校正，已获取的图像不同荧光通道的焦平面就不能保持一致。

不同荧光通道以不同的伪彩显示。当用户在不同通道之间切换时在Z轴向有一个小的可见的位移。可以校正这种位移以保证不同荧光通道的伪彩图像能在Z轴向精确叠合。

下面介绍如何进行Z位移校正。

- Ø 通过File → Open Image加载图像“Hela\_DsRed\_RevGFP\_Zshift.zvi”，或用摄像机获取一幅图像。
- Ø 图像显示在AxioVision的图像窗口中。



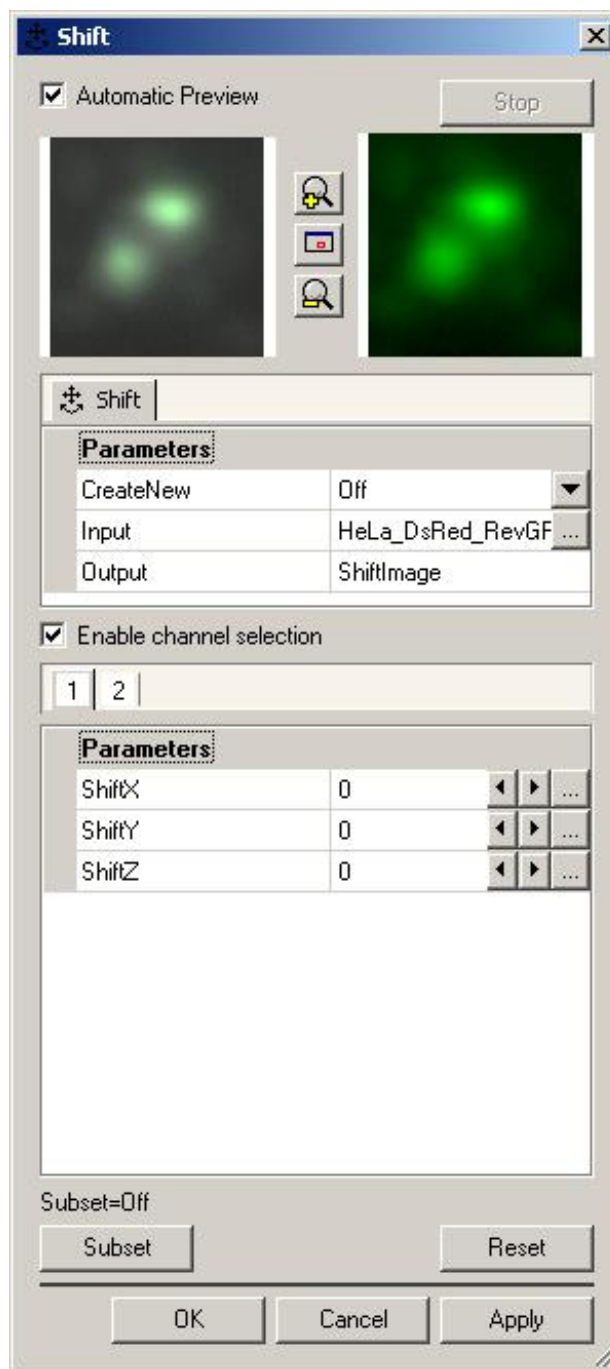
从Processing菜单中选择Geometric功能群，然后选择Shift功能。

Ø 用户应该看见Shift功能对话框。

Ø 如果激活了自动预览  
(Automatic Preview) 多选框，用户可以看见缩小的图像。

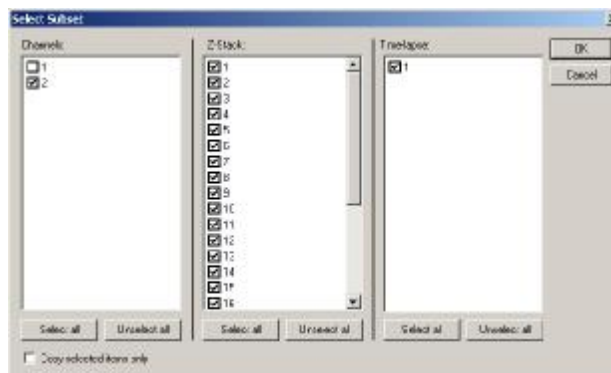
Ø 激活Enable Channel Selection，这样用户可以对各个通道输入XY位移。

Ø 单击Subset窗口。

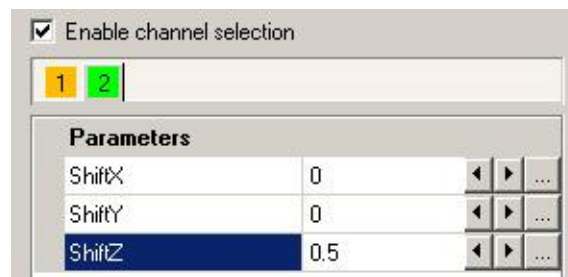




- Ø 只激活用户希望校正的通道  
(本例中为通道 2)。
- Ø 关闭Copy Selected items only，  
这样所有通道都显示在生成的  
图像中(包括没有校正的)，  
然后点击OK。



- Ø 在Shift对话框中，激活要校  
正的通道(本例中为通道 2)。
- Ø 通过点击箭头键或直接输入  
值设定ShiftZ位移。

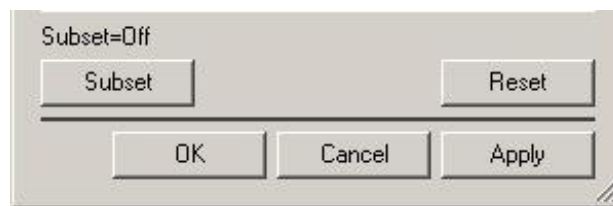


注意:

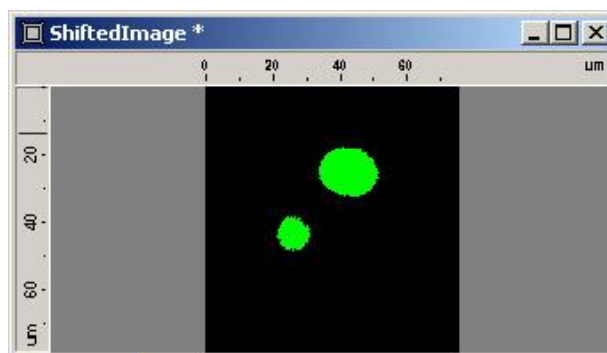
- n ShiftZ的值和用户希望移动的象素数目相关。
- n 例: 如果ShiftZ值设定为5, 则生成的图像从第六个切面开始, 前5个切面为空, 而原始图像的最后5个切面被忽略。如果设定为-5 is, 则原始图像前5个切面被忽略, 生成的图像的第一个切面是原始图像的第六个, 而最后5个切面为空。
- n 也可以对一个切面的一部分(例如0.3)进行位移。可以从各个切面间距离来计算出要输入的值。



Ø 单击Apply，然后单击Zoom up，以检查各个放大区域的校正效果。



Ø 得到校正后的图像。



注意：

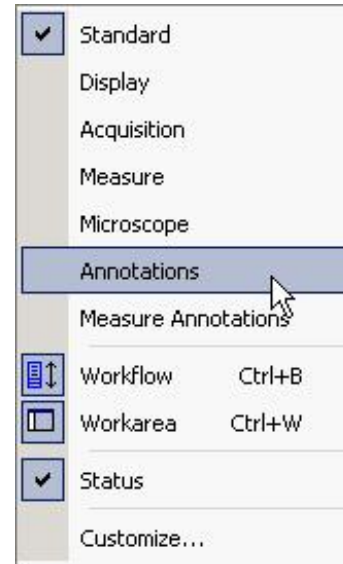
n 必要时调节产生的图像的显示特征曲线。

## 6.4 增强显示器上的图像显示

使用标准工作流程是显示优化图像最快最简便的方法。关于该工作流程（包括所有图像获取步骤）的描述参见第四章“图像获取”。

## 6.5 添加和格式化注解

- Ø 确认注解工具栏可见：右击主菜单或任何工具栏，激活 **Annotations** 工具栏。

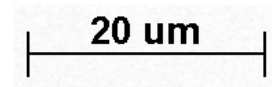


- Ø 单击图像本身或文档区顶部以激活需要添加注解的图像。

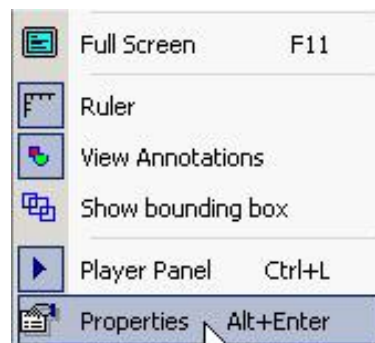
- Ø 从注解工具栏选择要用的工具，例如比例尺。



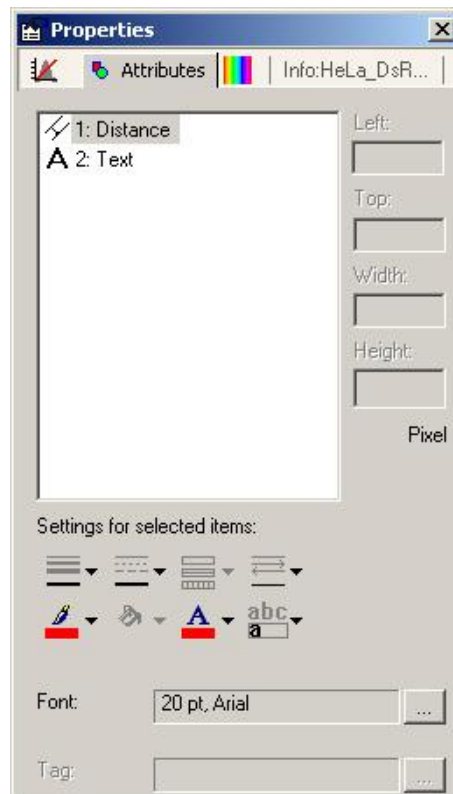
- Ø 添加比例尺：单击启动点，拖动出想要的长度后再单击终点。



- Ø 格式化注解（改变线条色彩、字体等）：右击图像并选择 **Properties**。



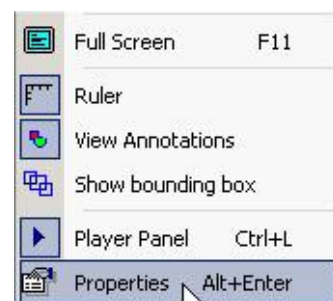
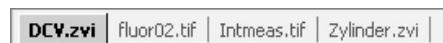
- Ø 在Properties窗口中激活Attributes标签。
- Ø 从列表选择一个元件。
- Ø 改变选定项目的设定：
  - 1: 线条宽度
  - 2: 线条风格
  - 3: 填充模式
  - 4: 线条类型
  - 5: 线条色彩
  - 6: 填充色彩
  - 7: 文本色彩
  - 8: 文本对齐
  - 9: 字体



该设置只应用于选定的元素。关于指定标准设置请阅读下一节。

## 6.6 指定注解的标准设定

- Ø 单击图像本身或文档区顶部以激活要指定标准设置的图像。
- Ø 右击图像并选择Properties以输入设置（线条色彩，字体等）。



Ø 在Properties窗口中激活

Attributes标签。

Ø 确认没有选定注解列表和显示

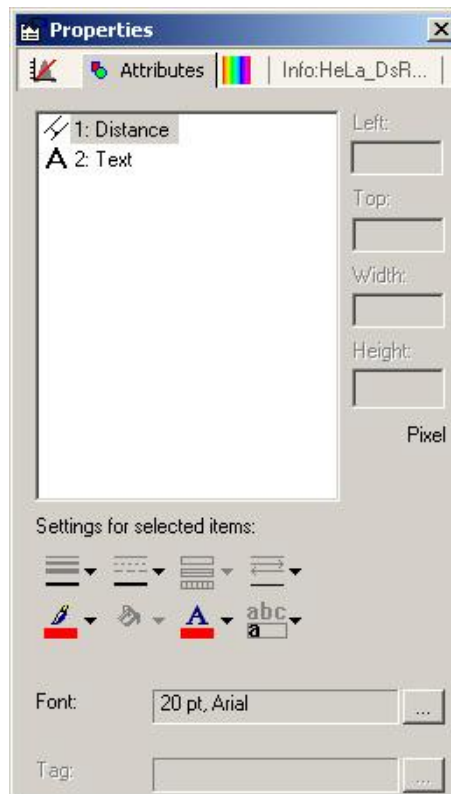
在默认设置格式选项中的任何元素。

Ø 改变选定项目的设定：

- 1: 线条宽度
- 2: 线条风格
- 3: 填充模式
- 4: 线条类型
- 5: 线条色彩
- 6: 填充色彩
- 7: 文本色彩
- 8: 文本对齐
- 9: 字体

注意：

- n 这之后添加的所有元素都将应用指定设置。如果用户以ZVI格式保存图像，设置和图像一起保存。



## 7 图像分析

### 7.1 概述

利用AxioVision第四版用户可以在基本程序中执行互动测量。

#### 执行测量的可能方式

测量可以通过两种方式进行：

- n 个别的测量工具，例如线条，圆周等，可以通过Measure菜单和/或工具栏执行。用这种方法可以迅速测定个别值。
- n 通过互动测量向导。该向导整合在Measure工具栏里。它引导进行整个测量过程，从图像获取到图像保存，到测量和评价。

#### 测量条件

#### 标尺确定

要获得真实单位的测量值，用户必须给要测量的图像分配正确的标尺，这通常在图像获取时进行（参见第四章“图像获取”）。

#### 如果选定图像没有标尺

如果没有给选定的图像分配合适的标尺，用户可自己确定一个：

- Ø 确认图像被选定（单击图像即可）。
- Ø 从Measure菜单，选择Scalings功能。

Ø 从Scalings Control列表中选择相应的标尺。

Ø 单击Apply Selection To Image按钮。

保存数据

保存测量数据

保存数据最简单最方便的途径是以AxioVision ZVI格式保存用户的图像，因为该格式把测量数据和图像一起保存，这样所有数据（像素数据，测量数据，注解等）都是保存在图像文件里，而不需要执行附加的保存过程。

以其它文件格式输出

如果用户要以外部格式（BMP，JPEG等）保存图像文件，则需要独立的文件中保存测量数据。如果用户使用互动测量向导，则它将自动引导用户保存测量数据。否则从Measure菜单选择Show Measurement数据功能，在打开的对话框中用户可以保存数据或把数据复制到剪贴板。

## 7.2 TIC 测量

TIC（Total Interference Contrast）是利用光学干涉来测量薄层高度的一种新方法。

除AxioVision TIC测量模块以外，用户还需要有具有C-DIC反射器和TIC滑块的反射光显微镜以执行TIC测量。Axioskop 2 MAT mot

显微镜的操作指南里包含TIC方法的详细描述。

## 自动 TIC 测量

Scaling为TIC测量提供校准。

Live打开和关闭实时窗口。


Snap用活动摄像机获取图像。

Navigator打开缩放窗口。

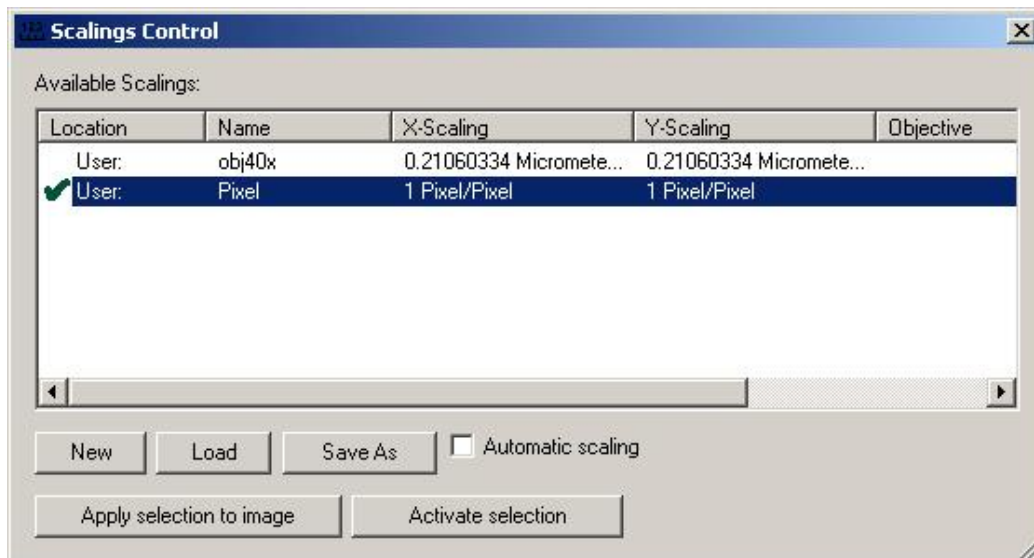
TIC Measurement启动TIC 测量。

Add to Archive在存档中保存测量的图像。



Ø 单击 。


Ø 激活对应于选定的物镜和摄像机分辨率TIC标尺。



请注意TIC测量要求TIC校准而不是通常的几何校准。在7.2节的最后“TIC标尺”中有如何生成标尺的详细描述。

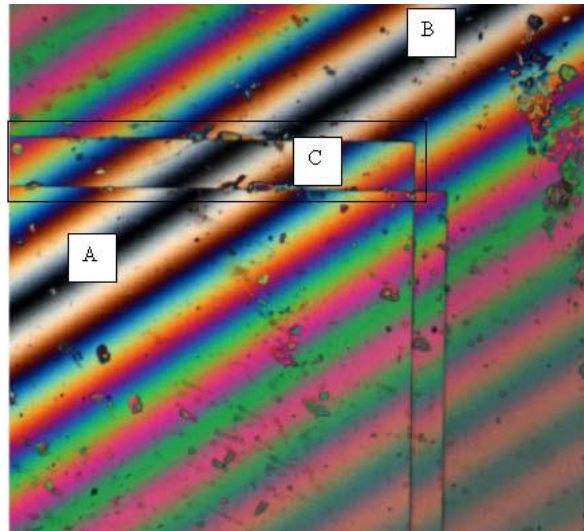
如果不想改变选定显微镜和摄像机设置，可以关闭校准窗口。



- Ø 单击 。设定光照和对比度以使图像得到最好的光照。
- Ø 检查摄像机分辨率。它必须与用户加载的标尺相对应。
- Ø 设定要测量的样品图像区和干涉条带的方向。



图像应看起来和下面的样品图像差不多：



该薄层样品包含三个区域：

**A：** 结构的左上角，包括用户要测量的高度

**B：** 之下的表面

**C：** 干涉条带位移的区域

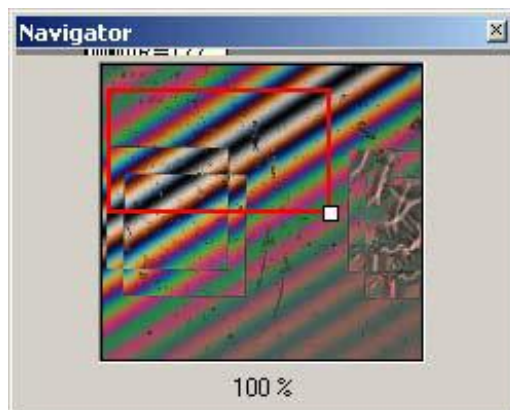
条带位移是因为待测结构表面（图像左下）和之下的表面（图像右上）高度不同而造成的。

测定重叠区域的零级干涉条带位移，即 A、B之间的距离（重叠区域外）和C（重叠区域内）。

请注意条带的色彩在零级干涉条带附近对称改变。可以轻松地看到零级干涉条带的黑边。

Ø 单击摄像机图标  以获取图像。

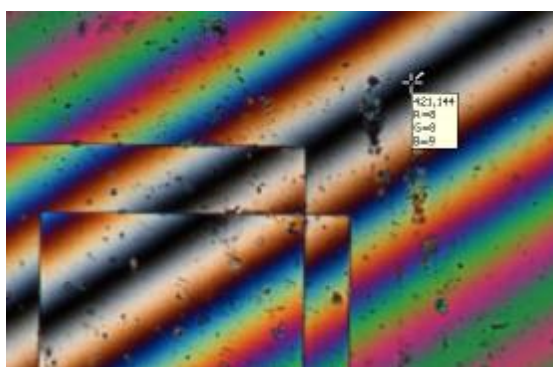
- Ø 单击Navigator和Zoom以改变用户要测量的区域:



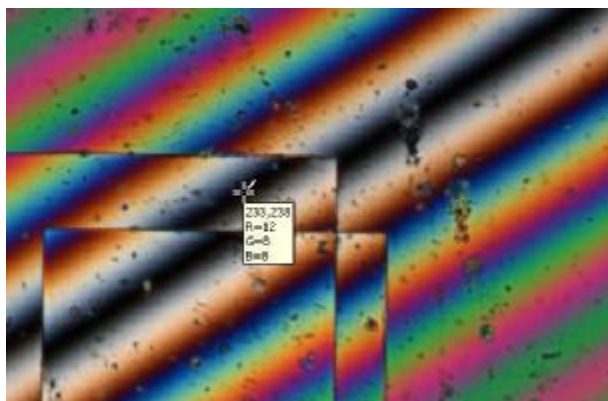
- Ø 单击 TIC Measurement。
- Ø 如果用户把鼠标移动到图像内，光标符号自动改变（从箭头变成十字）并显示x/y坐标和象素色彩值:



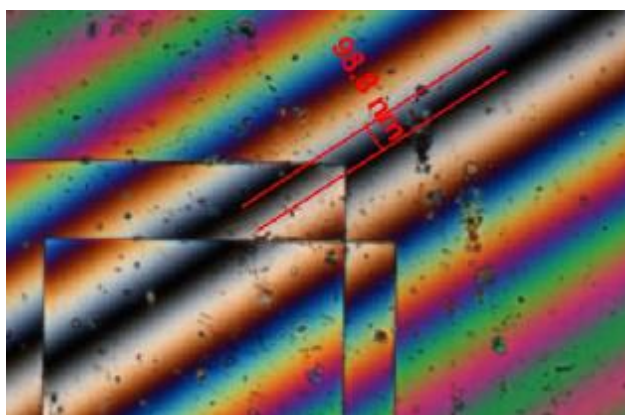
- Ø 移动鼠标到样品下层表面的零级干涉条带中心并单击。



- Ø 移动鼠标到重叠区域（包含位移干扰条带）并再次单击零级干涉条带中心。



- Ø 显示测量值:



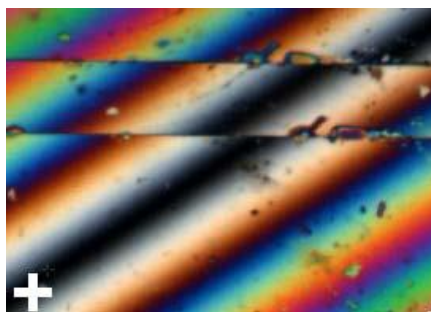
单击 **Add to Archive** 以保存生成的图像和测量值。

## 互动 TIC 测量

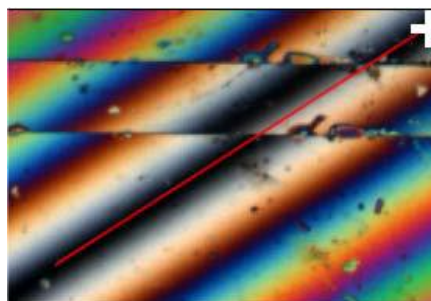
- Ø 在Measure菜单上单击Distance功能，或单击菜单工具栏上的



- Ø 移动光标(这里显示为一个十字)到线条的起点，单击。

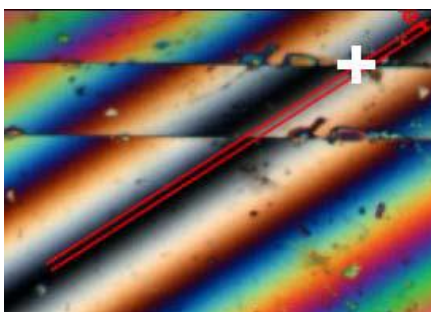


- Ø 移动光标到线条的终点，单击。可以看见图像中的第一条线条。

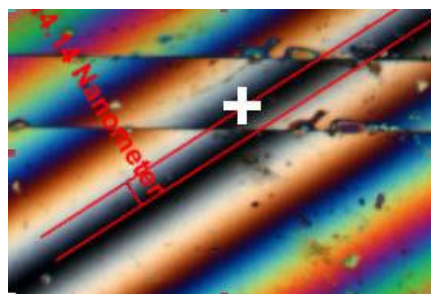


- Ø 确认所画线条对应于条带的中心。

- Ø 如果移动光标，可以看见第二条线条和当前测量结果随着光标移动而改变。



- Ø 移动光标使第二条线条对应于零级干涉条带。单击进行测量。

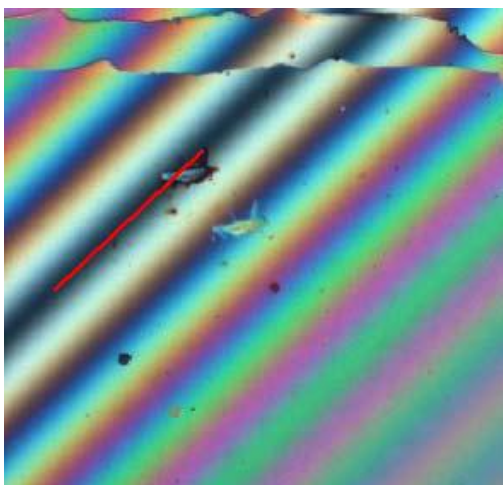




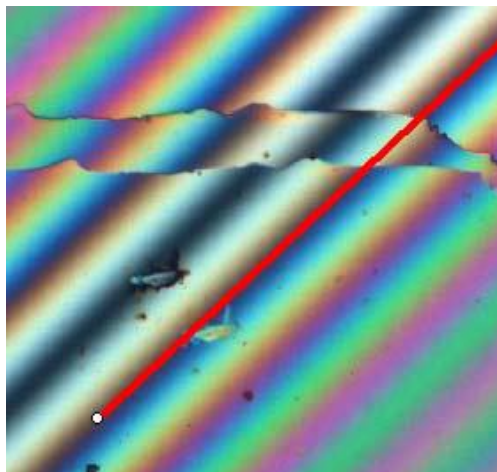
## 互动测量中出错原因

线条越长，测量也越精确。把线条起点定在零级干涉条带中心，而把终点定得尽可能远。

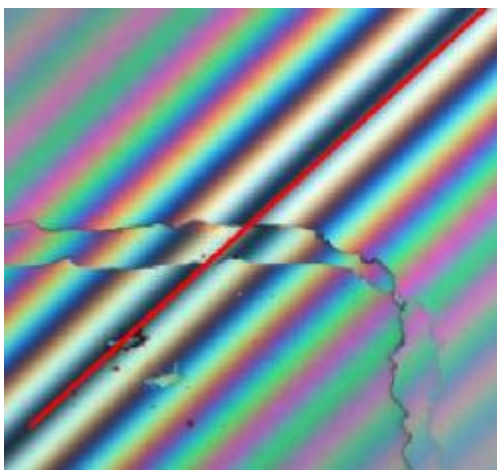
下面是画线时可能出现的几种错误。



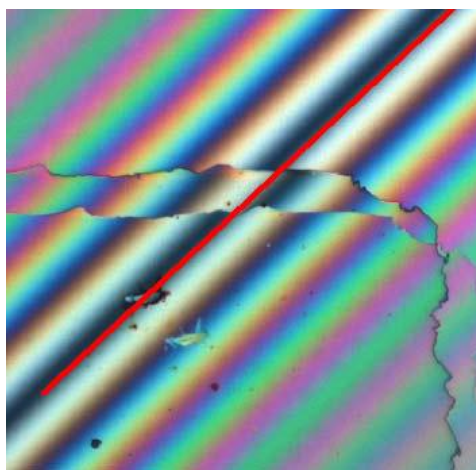
线条太短。



没有选定零级干涉条带。

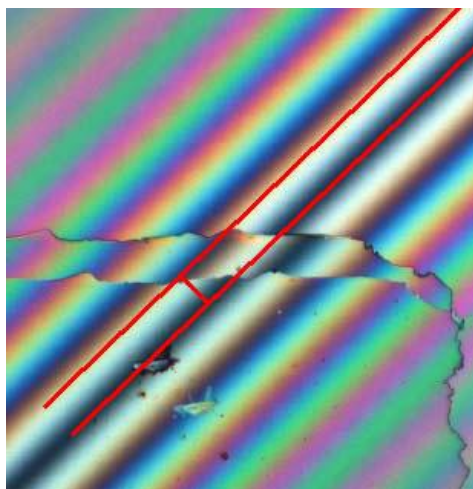


线条和零级干涉条带不平行。

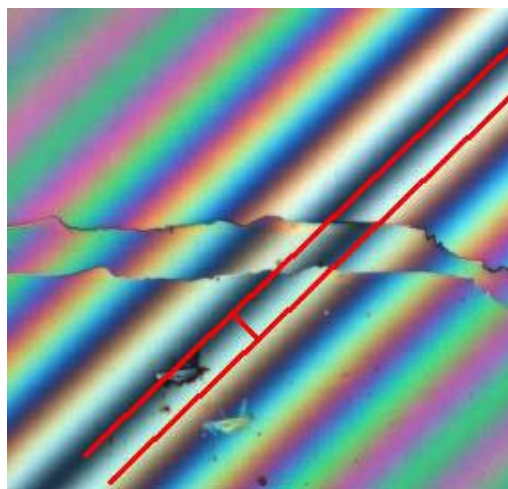


线条不在零级干涉条带中心。

下面确定零级干涉条带时可能出现的几种错误。



选定了一级干涉条带。



线条不在一级干涉条带中心。

## TIC 标尺

为了执行TIC测量，用户需要对每一种放大倍数和摄像机组合设定TIC标尺。

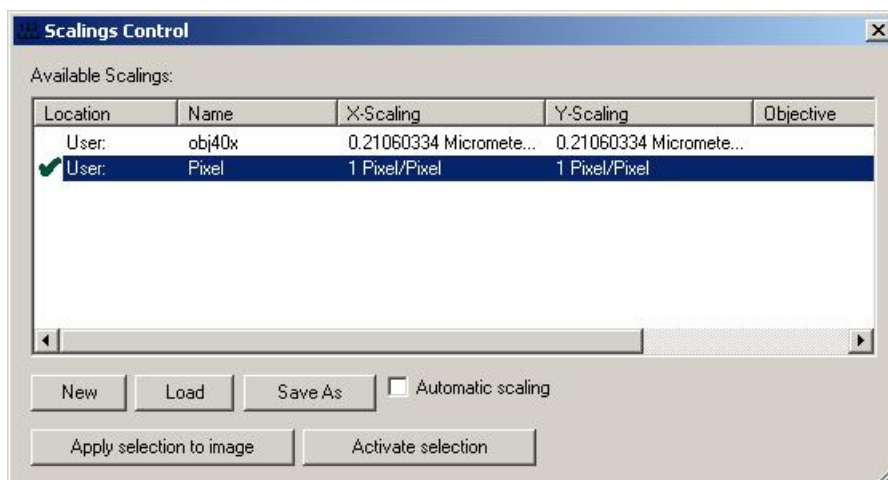
从最常用的组合开始，例如10x物镜和标准分辨率的AxioCam。

和其它标定过程一样，TIC要求一个参照物。任何反射表面都适



用于TIC。聚焦在表面上，优化曝光时间并点击  以获取图像。

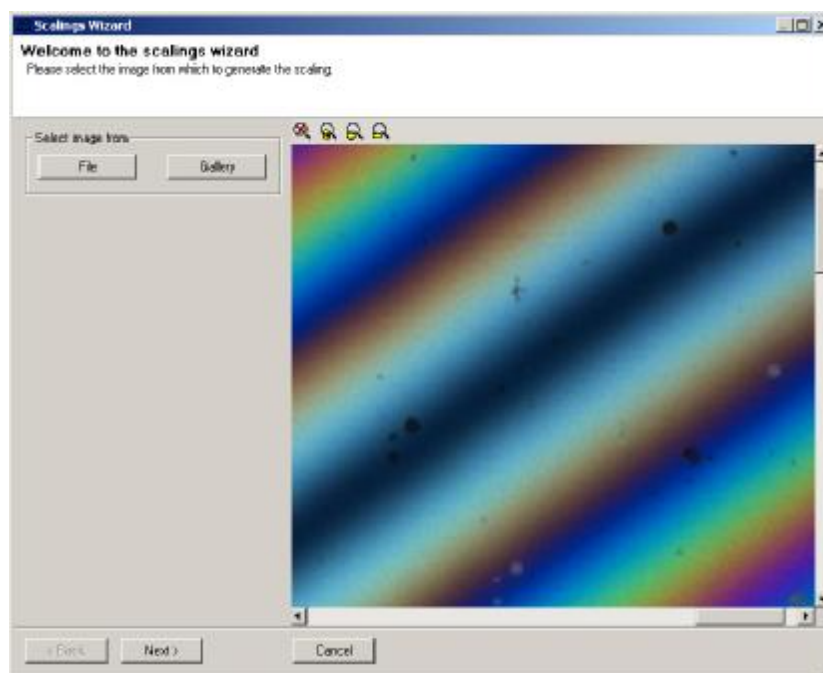
Ø 从Measure菜单选择Scalings功能。

Ø 在Scalings控制窗口单击New。

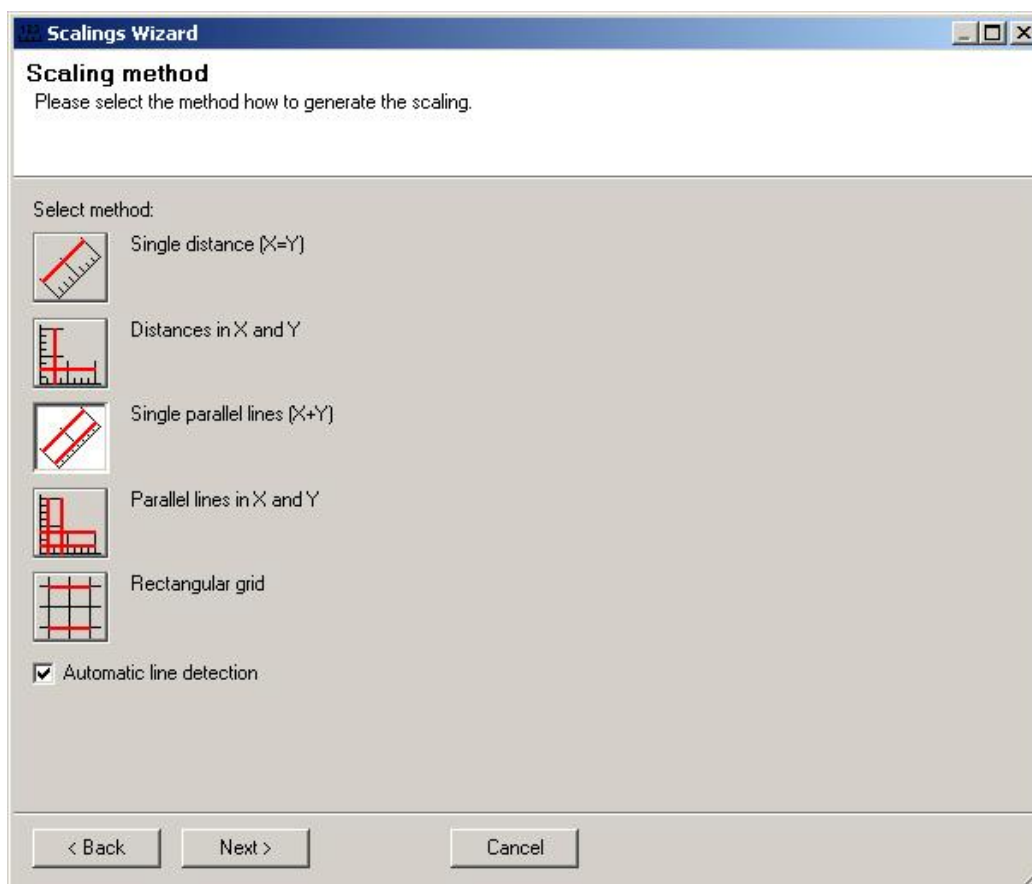


标尺向导启动。

- Ø 右击图像显示图像的快捷菜单。选择正常视图（1：1）。
- Ø 点击以放大窗口。
- Ø 移动图像底部和右边的滚动条以设定想要的帧。



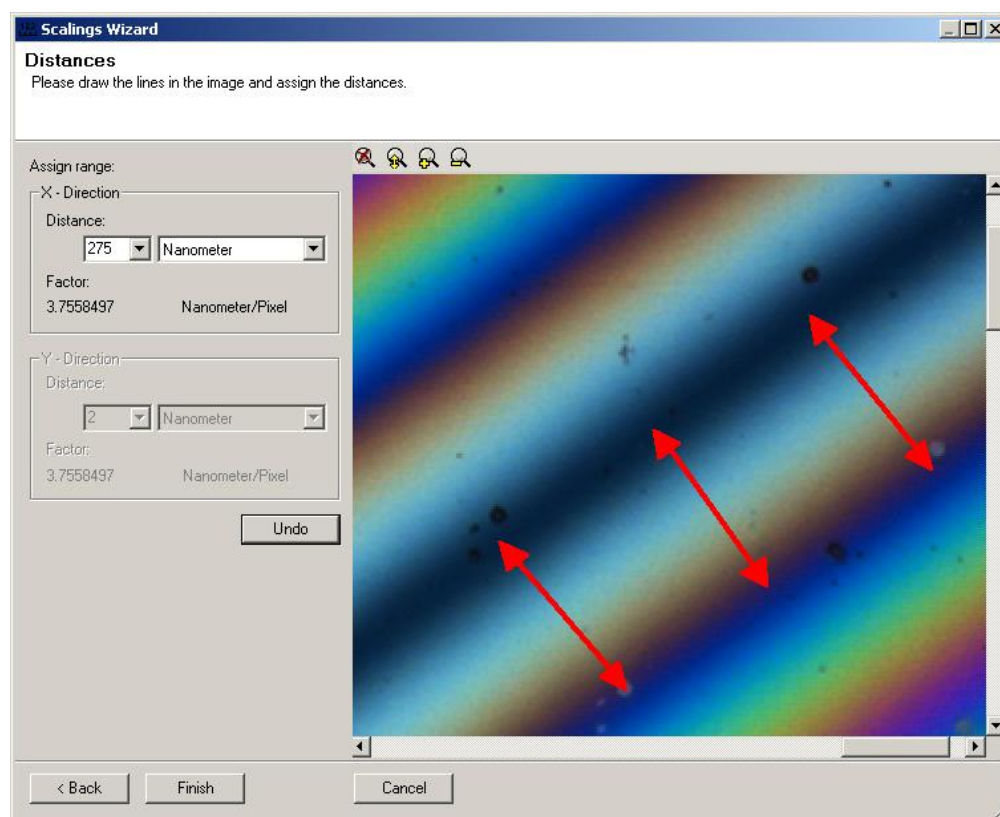
- Ø 单击Next。
- Ø 激活Automatic line-detection。
- Ø 选择Single parallel lines方法（X+Y）。



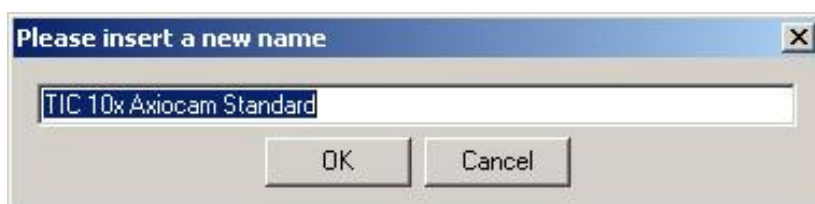
- Ø 单击Next。
- Ø 在Distance文本区输入275，并选择单位Nanometer（275 nm 对应于可见光波长的一半）。
- Ø 在干涉条带的中心单击起点和终点，在两个黑边之间画线以测定两个干涉条带之间的距离。



- Ø 距离由红色线条标记。正确的测定值自动显示为用户所画的两条线之间的第三条线。

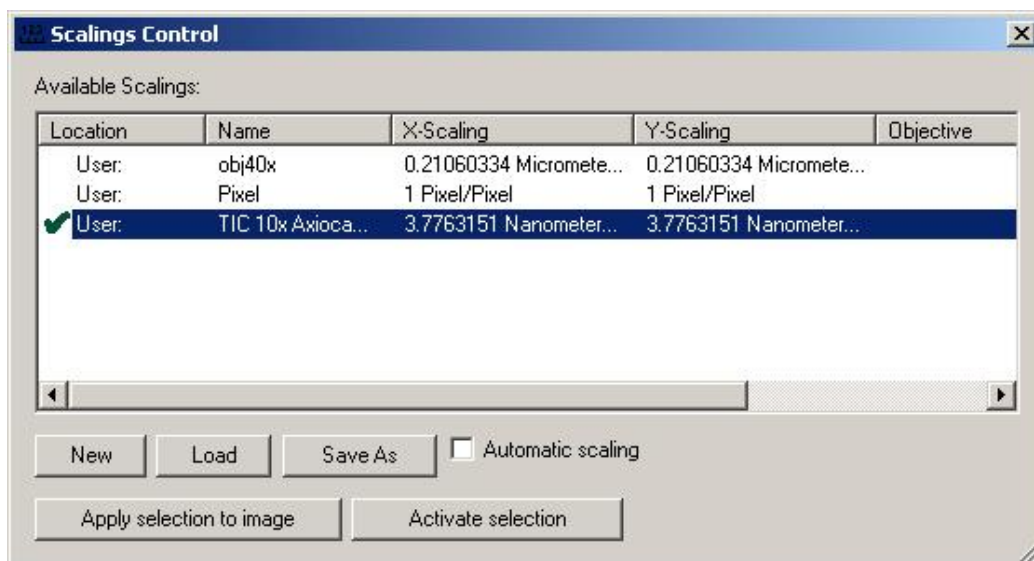


- Ø 单击Finish。
- Ø 为标尺输入一个名字并单击OK。



为了避免和其它标尺混淆，用户应使用TIC作为前缀。

新的标尺出现在标尺控制窗口并自动激活，随后获取的图像都将使用它。



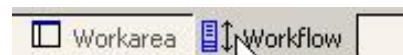
### 7.3 “Measurement” workflow

执行互动测量最容易的方法时使用**Measure** workflow。如果 workflow 没有被显示，在**View**菜单选择**Windows**列表，并选择**Workflow**命令。

**注意：**

- n** **Workflow**可能实际上已经打开但是被**Workarea**遮住。这时单

击**Workarea**底部的**Workflow**标签：



## Measure workflow: 概览

Live打开和关闭实时窗口。

Snap用活动摄像机获取图像。

Show Properties打开图像属性对话框和

Display、Attributes、Color等属性页

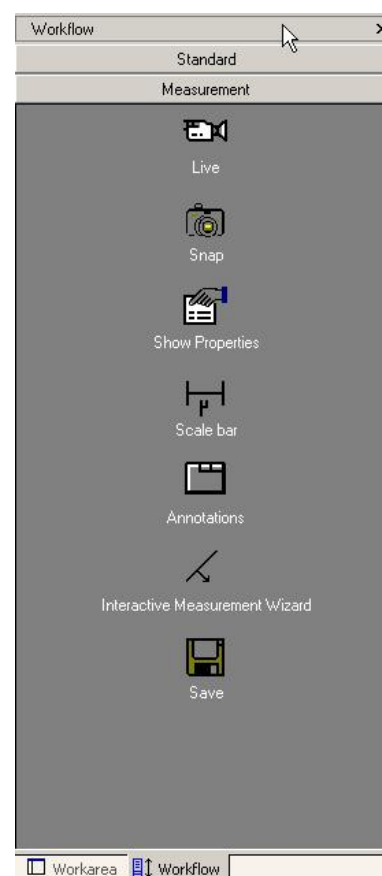
Scale bar插入比例尺。

Annotations打开注解窗口。

这里用户可以给已获取的图像插入注解。

启动互动测量向导。

Save保存图像。



## 运行互动测量向导

工具栏功能概览:

- n 获取或从硬盘加载图像。
- n 调节显示器的显示。
- n 需要时插入比例尺。
- n 需要时添加注解。

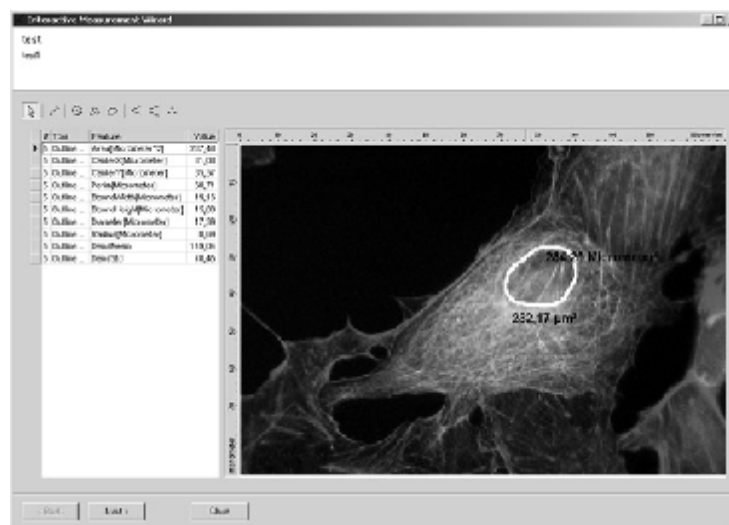
下面启动向导用来执行互动测量（互动测量向导）。

Ø 启动互动测量向导。互动测量向导对话框打开。



Ø 通过从工具栏选择测量工具来进行测量。

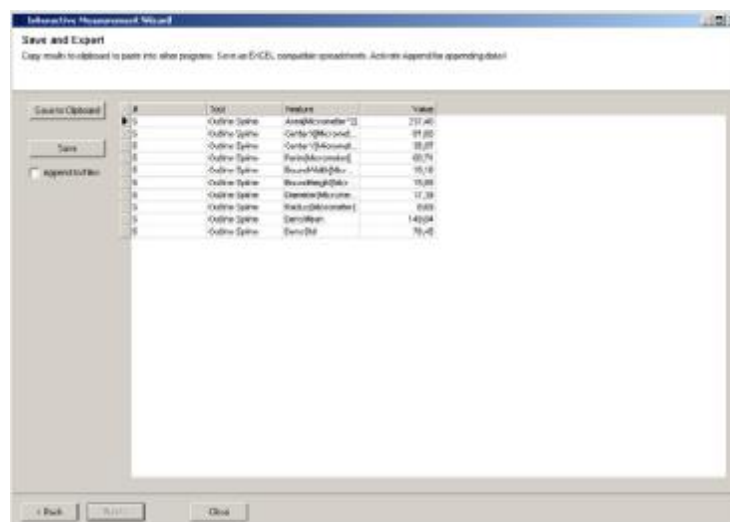
- 1: 距离
- 2: 圆周
- 3: 曲线
- 4: 任意曲线
- 5: 角度3
- 6: 角度4
- 7: 计数



Ø 测量直接在图像中进行。

Ø 单击Next。

Ø 最终的步骤显示测量列表。



Ø 如果用户不想以ZVI格式保存图像，点击Save来保存测量数据。

Ø 单击Close退出向导。

- Ø 通过Measure工作流程保存图像和测量结果（只对ZVI格式有效!）。

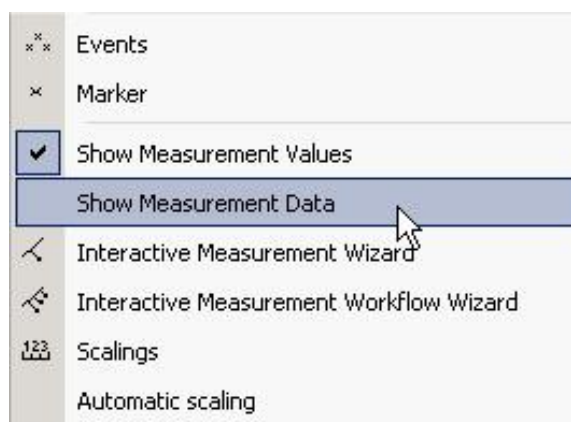


显示和输出测量数据

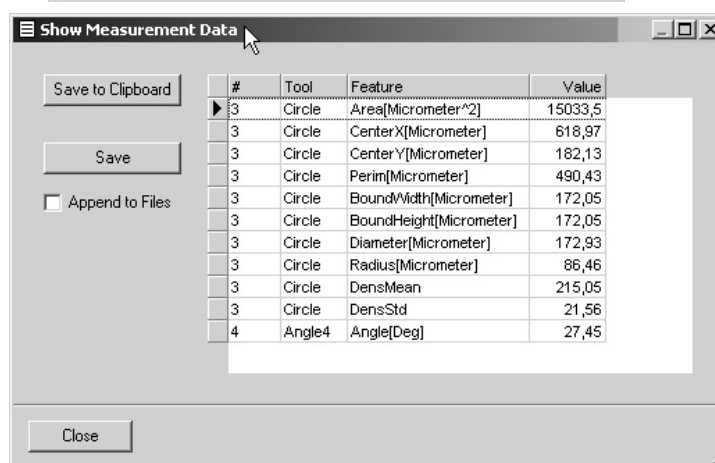
图像的测量数据可以

- Ø 以列表形式显示；
- Ø 以Excel兼容的文本格式输出；或
- Ø 结合来自其它图像的测量数据以进行全面评价。

- Ø 从Measure菜单，选择 Show Measurement Data 功能。



- Ø 如果用户不想以ZVI格式保存图像，点击Save以输出测量数据。



- Ø 单击Close退出向导。

## 8 文档管理

### 8.1 概述

文档管理可能是用户最重要的一部分工作。该术语经常用来概括多种不同的过程：

某些情况下它可能仅仅指以一个确定的名字保存图像文件；另一些情况下它还包括保存图像的附加信息，以便跟踪图象获取条件和重新创建图象，或者便于用该附加信息快速查找某一图象。

即使是AxioVision的基本版本中，图像浏览器也提供了大量选项，使用户可以有效地管理包含大量内容的数据库。

通过AxioVision Cumulus模块，用户可以编档保存极大量的数据。

**注意：**

**n** 关于“保存”的重要信息参见第9.2节“用户和文件管理”。

### 8.2 AxioVision ZVI: 用于数字显微镜的图像格式

AxioVision ZVI图像文件格式是AxioVision文档管理的中心。与其它外部格式如BMP、JPG、TIF等相比，ZVI格式具有很多优点：

- n** 不损失图像质量。
- n** 整合的附加数据(如显微镜和摄像机配置、注释、样品信息等)。
- n** 图像和注解分别保存。
- n** 测量数据整合到图像文件中。

n 在单个文件中管理所有数据。

上述特点都是ZVI格式所独有的。与其它格式不同，ZVI格式是专门开发用于数字显微镜的。

## 8.3 保存和输出图像

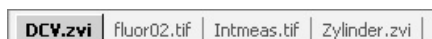
### 保存图像

一般说来，AxioVision能识别ZVI图像格式和其它图像格式。ZVI格式是默认格式；通常的Windows操作如File → Save 或Save As以该格式保存文件。输出功能可用于输出所有其它格式。

### 输出图像

AxioVision允许用户输出简单的2D图像，也允许用户从复杂图像（z-层叠、时间序列图像等）生成动画。

Ø 通过单击图像或通过文档区的表



格选择图像来激活要输出图像。

Ø 从File菜单选择Export功能。在这



里选择Setting标签。

Ø 在Format selection中选择文件格

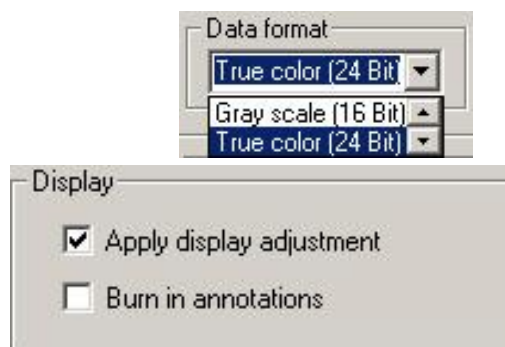


式（BMP, JPG, TIF, J2K等）。

Ø

Ø 在Data Format中选择是否要生成色彩或灰阶图像。

Ø 在Display选择图像是否按显示的保存，和在哪里添加注解（如果有的话）。



注意：

n 相关细节参见第六章“图像处理”。图像保存为新文件后不能再撤消操作。

Ø 在Target中Base Name文本区给文件输入一个名字。



Ø 必要时选择不同的文件夹。

Ø 单击Apply启动输出。单击Close退出。

注意：

n 这时输出对话不会关闭，用户可以接着选择和输出其它图像。

## 图像的批处理转换（batch conversion）

如果用户要同时把几幅图像转成不同的格式，使用输出功能会相当耗时和不方便。对于这种特定的任务用户应使用文件菜单中的Batch convert功能。默认条件下，batch conversion功能把输出的文件保存在文件夹“My Documents\Carl Zeiss\Exported image”中。用户也可以根据需要改变保存路径。



注意:

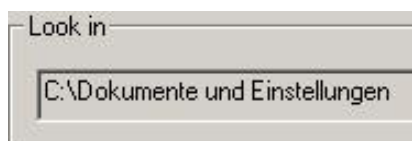
**n** Batch convert功能需参照Export功能。建议用户先阅读前一节。

Ø 从File菜单选择Batch convert功能。

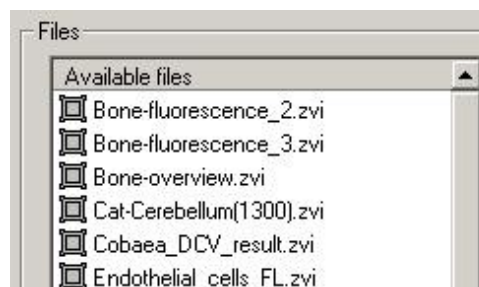
Ø 在Look in对话框中输入包含要转换的图像的文件夹。也可以点击



选择不同的文件夹。



Ø 接着在Files → Available Files列表中显示该文件夹中所有可用的ZVI格式图像。



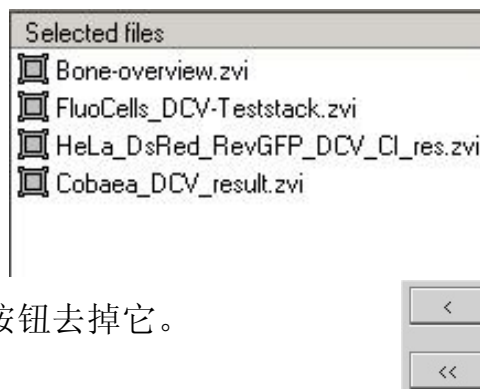
Ø 如果根据文件名用户还不能确认是否是要转换的图像，单击它即可在Image Preview/Information区域显示缩略图




Ø 接着用右箭头按钮选取要转换的图像（单个或所有图像一起）。




- Ø 选定的图像显示在Selected Files列表里。



- Ø 如果用户错选了图像,用左箭头按钮去掉它。

- Ø 单击  按钮打开Batch convert选项对话框,检查当前设置是否正确。

- Ø 设置和输出功能中的那些相对应。

- Ø 单击  开始转换。所有图像一个接一个地自动转换,已转换的图像会从Available Files列表中去掉。

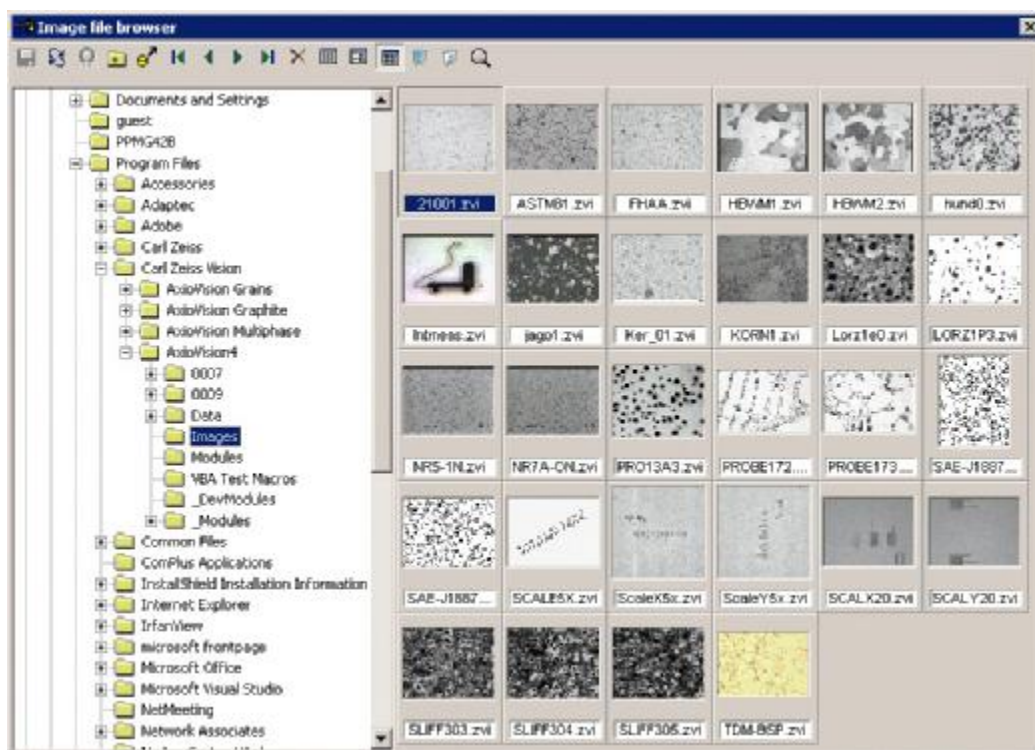
- Ø 用按钮  退出转换。

## 8.4 用图像文件浏览器 (Image File Browser) 管理图像

图像文件浏览器可以以图库或列表形式显示所有驱动器上各个文件夹中的所有图像,并可以输入附加数据;用户可以搜索、加载并放映查看图像。图像浏览器是帮助用户管理图像的便利工具。

选择File → Image File Browser来打开图像浏览器。

## 图像文件浏览器窗口



左边以Windows资源管理器格式显示用户的系统文件夹结构。

可以完全用工具栏上的功能来操作图像文件浏览器。如果用户选择一个特定的文件夹，其中包含的所有图像文件都自动以选定模式显示（这里是图库模式）。

## 图像文件浏览器工具栏的功能



刷新图像图库。



创建一个新文件夹。



加载当前选定的图像。



选择图库中的第一个图像。



选择图库中的前一个图像。



选择图库中的下一个图像。



选择图库中的最后一个图像。



删除选定的图像。



切换到列表视图。



切换到表格视图。



切换到图库视图。



开始以幻灯放映方式显示图库中所有图像。



开始以幻灯放映方式显示选定的图像。

要停止幻灯显示，按Esc键或右击图像并取消幻灯显示。

## 改变数据编目表

AxioVision用一个表格在显示器上输入数据和显示信息。

使用“Archive.zvf”表格以在表格视图中显示图像信息和输入附加信息：


Title	All		
Subject			
Date	28.02.2001 18:01:47		
Image Format			
Scaling			/ Pixel
File	C:\Programme\Carl Zeiss Vision\AxioVision		
Size (Bytes)			
Author			
Comment			
Keywords			
Sample ID			
Objective			
Immersion			
Optovar			
Stage Position	X		Y
Exposure Time	Milliseconds		
Filterwheel 1			
Filterwheel 2			
Reflector Position			
Excitation Filter			
Emission Filter			
Preparation			
Staining			
User field 1			

刚刚安装的“Archive.zvf”表格。

该表格必须位于用户定义数据文件夹的“Form”子文件夹中。

AxioVision默认的文件夹是“My Documents\Carl Zeiss\Data”。

要在图像浏览器中使用不同的表格视图，在安装模板的基础上生成一个新表格，并保存在上述文件夹中。

- Ø 从File菜单选择New然后点击Form标签。
- Ø 选择一个模板并单击OK。单击Apply以显示模板的预览。
- Ø 从File菜单选择Save As功能到数据目录中（默认为“My Documents\Carl Zeiss\Data”）。打开表格文件夹，如果没有的话创建一个，并以名字“Archive.zvf”保存模板。
- Ø 打开图像浏览器，刷新图像图库。如果不是处于表格视图，单击图像浏览器的工具栏上的按钮 。

## 生成，打印和输出报告

报告用于显示和打印已保存的图像和相关的附加信息（标题，作者，注释，关键词等）。每一报告都基于报告模板。模板指定了报告布局和格式及其个别元素（图像，数据等）。

用户可以自己修改报告模板，或生成新的模板。请阅读本节后面的“表格和报告模板”。模板文件保存在“My Documents\Carl Zeiss\Data\ Templates”文件夹中。

可以利用输出选项来使报告可以整合到其它文档中（例如Word文件）。AxioVision可以以WMF格式输出。该格式允许用户把报告整合到任何Windows程序中。多数情况下报告各个部分都可以修改。



## 打印报告

- Ø 激活要打印的报告。
- Ø 从File菜单选择Print功能，显示标准打印文档对话框。
- Ø 输入想要的设置并单击OK打印报告。



## 输出报告

- Ø 激活要输出的报告。



- Ø 右击报告并选择以WMF输出。





- Ø 显示保存文件的标准对话框。选择目标文件夹并输入文件名。
- Ø 最后单击OK以保存报告。

## 表格和报告的模板

报告主要用于打印已保存的图像和相关的附加信息（标题，作者，注释，关键词等）。

表格用于在屏幕上显示和输入信息。

报告和表格都是基于所谓的模板。模板指定了报告布局和格式及其个别元素（图像，数据等）。

用户可以自己修改报告模板，或生成新的模板。请阅读本节后面的“表格和报告模板”。模板文件保存在“My Documents\Carl Zeiss\Data\ Templates”文件夹中。

AxioVision附带有大量不同的模板。也就是说用户不必要自己生成模板。但是常常需要修改模板以符合公司或项目特定要求。

根据模板的复杂性，生成新模板可能非常耗时。建议用户尽量使用已有的模板。

### 注意:

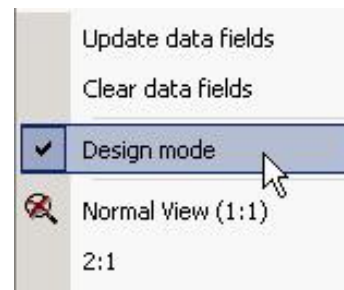
- n** 下面用一个报告作为例子，介绍编辑一个模板的所有步骤。这些步骤也适用于表格模板。



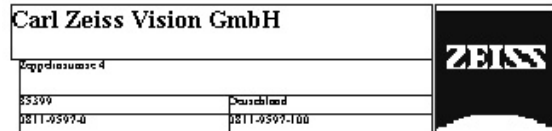
注意:

- n 报告头的细节（标志，公司名字等）不需要定义成单独区域，而可以通过对话直接输入。选择Tools → Options → ID。在这里输入相应数据。这些数据会自动显示在报告头里。
- n 如果用户没有输入该信息，则该区域为空。

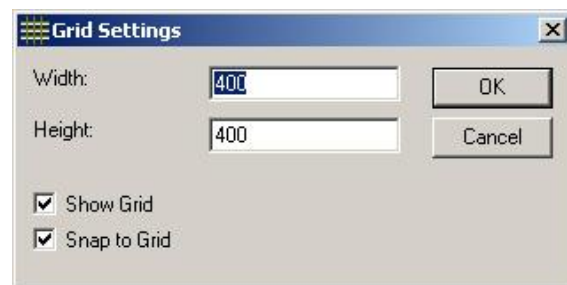
- ∅ 用户需要切换到设计模式以修改模板。
- ∅ 右击模板并从快捷菜单激活设计模式命令。
- ∅ 如果在设计模式命令左边有勾则处于草稿模式。



- ∅ 要显示所有元素的位置和大小，从快捷菜单激活Show bounding box选项，则所有区域显示在一个蓝色框里。



- ∅ 为了更容易定位，用户可以激活网格，通过它所有元素可以自动对齐。



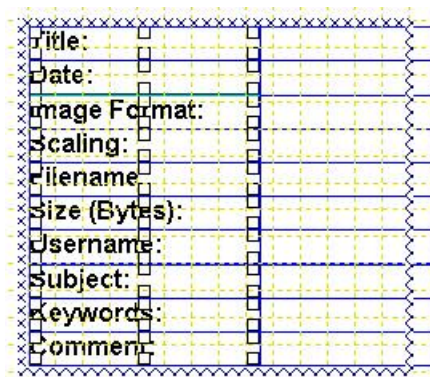
- ∅ 从快捷菜单选择Grid设置功能。
- ∅ 激活Show Grid和Snap to Grid选项，单击OK。



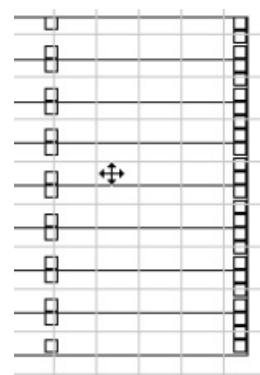
- ∅ 在模板上会显示黄色的网格。

## 移动和删除域

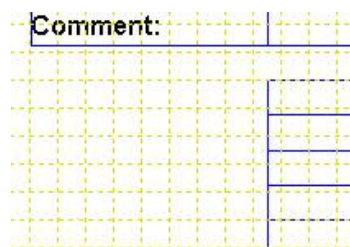
- Ø 要移动一个或更多个域,用户需要通过单击或圈选选定相应的域。
- Ø 如果按下Shift键再点击,也可以选择多个不同的域。



- Ø 点击选定区,按下鼠标左键并拖动该域。
- Ø 域自动和网格对齐。

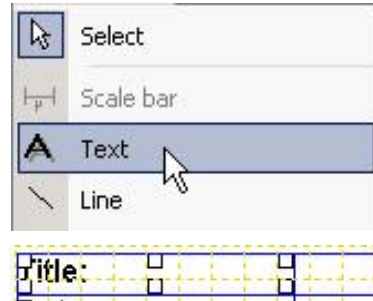


- Ø 选定要删除的域,用键盘上的Del键删除。
- Ø 删除的域可以通过菜单Edit → Undo来恢复,前提是用户还没有保存模板。



## 插入新域和改变域值

- Ø 如果要插入一个新域，用户可以从 **Annotations** 菜单选择 **Text** 工具，然后把它放在需要的位置。
- Ø 最简单的方法是复制一个已经存在的域。域的所有属性（大小，色彩，字体等）都被采用。
- Ø 单击一个域或圈选几个域。
- Ø 如果按下 **Shift** 键再点击，也可以选择多个不同的域。



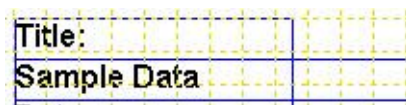
- Ø 按住 **Shift** 键并拖动选定域到所需位置，则可以同时复制并移动该域。



- Ø 要改变一个域的名字，双击该域以切换到编辑模式。




- Ø 用户可以输入一个新名字：



Ø 现在用户只改变了域的名字。

用户还需要在标志符右边输入指定的相关信息。

Ø 右击域名右边的空当，打开 Properties 窗口。激活 Item 标签。

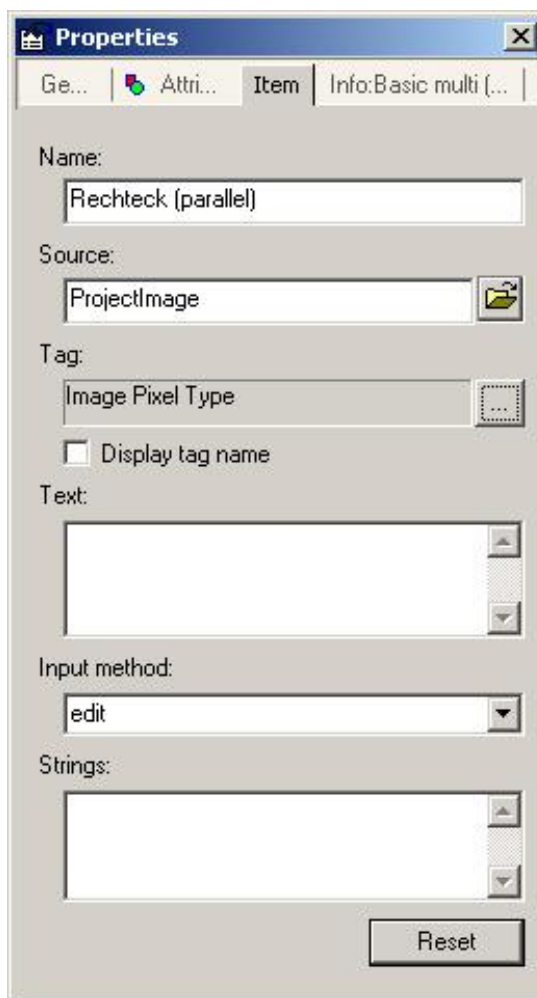
Ø 这里特别重要的元件是 Tag 参数，它显示 AxioVision 图像中可用的信息。单击按钮  选定。

Ø 接着根据用户要求完成其它参数。进一步的信息参见在线帮助（F1 键）。

Ø 对用户要用于模板的所有域执行这些步骤。

Ø 然后把模板保存在“My Documents\Carl Zeiss\ Data\ Templates”文件夹中。

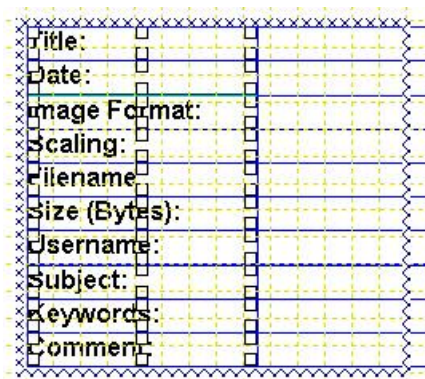
Ø 新模板将出现在 Files → New 对话框里可用的模板列表中。



## 改变域属性

改变域属性意思是修改域的外观（色彩，线条宽度，文本类型，大小等）。

- Ø 要改变一个或几个域的属性，用户首先要选择需要修改的域。
- Ø 如果按下Shift键再点击，也可以选择多个不同的域。



- Ø 然后右击报告并从快捷菜单中选择Properties命令。

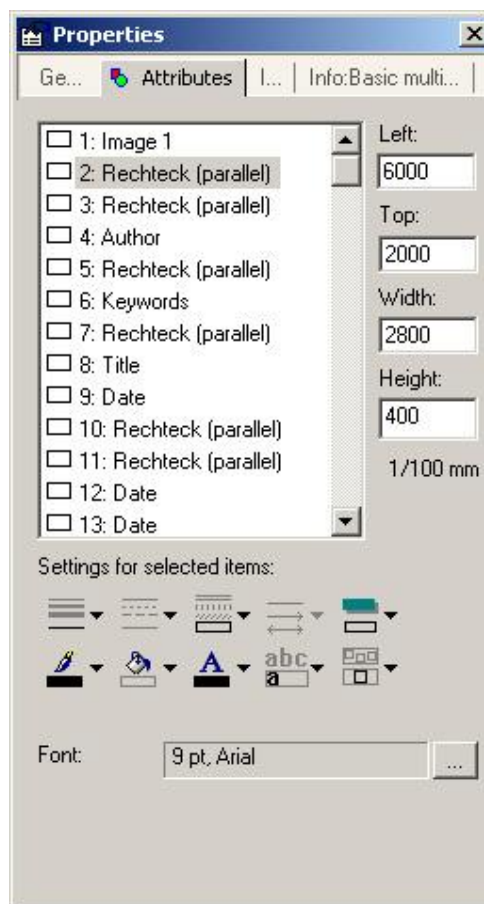
- Ø 在Properties对话框中激活Attributes标签。

- Ø 接着用Settings For Selected items下面的工具改变属性。

- Ø 必要时选择不同的字体。

- Ø 进一步的信息参见在线帮助（F1键）。

- Ø 把模板保存在“My Documents\Carl Zeiss\ Data\ Templates”文件夹中。



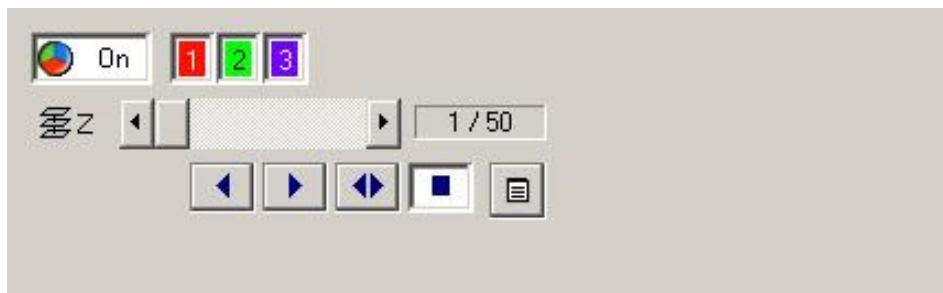
## 8.5 多通道图像编辑器

用图像编辑器可以从大而复杂的ZVI图像生成指定路径的大量图像s。结果产生新的没有保存的图像。可以影响下列维度：

- n x/y像素分辨率
- n 通道
- n 曝光时间
- n z-层叠位置

当用户在Edit菜单上选择图像编辑器功能时会打开一个向导。当用户使用图像编辑器时，不能执行AxioVision的任何其它功能。向导中只显示图像相关页面。

- Ø 打开一幅复杂图像。本例中将修改一幅3-通道的z-层叠荧光图像。通道1和z-平面 #1-6将要从图像去掉，同时x/y分辨率降低2倍。
- Ø 从Edit菜单选择图像编辑器功能，打开一个对话框。其中显示了前景图像。所有操作图像需要的控制元素都在图像底部（Player）。





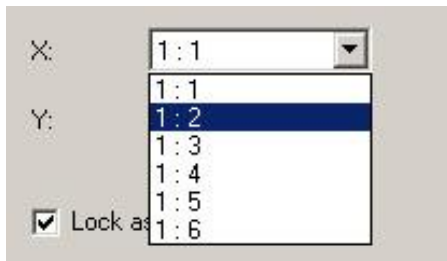
Ø 首先激活Remove selected images，单击Next。



Ø 接着选择通道1（它将被去掉），单击Next。



Ø 从下拉列表框中选择想要降低的分辨率倍数（1：2）。



Ø 该设置意味着在x和y向每两个象素就去掉一个。这样图像分辨率减小 到四分之一。单击Next进行下一步。

Ø 接着定义要从图像中去掉的z平面范围。

Ø 移动z滑块到位置1





- Ø 单击起点Get player Position按钮，



然后移动滑块到z

位置# 6，并单击终点Get player Position按钮。



- Ø 单击  按钮以检查结果。将创建一个缩小的图像预览。如果对结果满意则单击 。向导将被关闭，而相对简单的新图像被生成。以一个新名字保存该图像。

## 9 配置

### 9.1 概述

AxioVision第四版最显著的新特征之一就是它允许用户按自己的要求定义几乎所有操作界面和途径。为此AxioVision非常注意保证不同用户的配置可以分别管理。程序为每个用户单独保存用户数据，如工具栏配置，自定义对话框和 workflow，一般系统设置以及个人数据。完全使用了Windows用户管理系统。

### 9.2 用户和数据管理

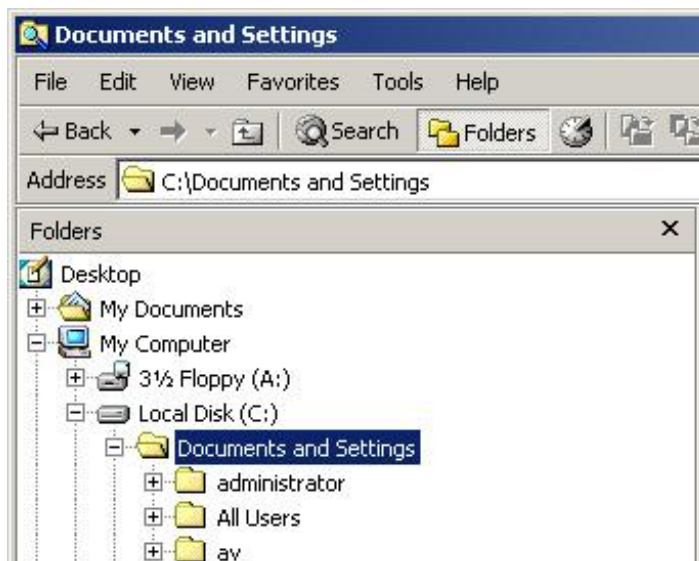
#### Windows 用户管理

#### 不同用户的帐号

在Windows下每个用户都有一个个人帐号。当系统管理员创建新用户时Windows自动生成新用户的个人帐号。

正常情况下一般用户不能接触到其它用户的个人设置和数据，如果用户试图接触别人的数据时Windows将显示警告信息。

各个用户帐号位于文件夹“C: \Documents and Settings\”下面。里面有一个以用户帐号命名的文件夹，在这里Windows保存所有用户特定的数据和设置：



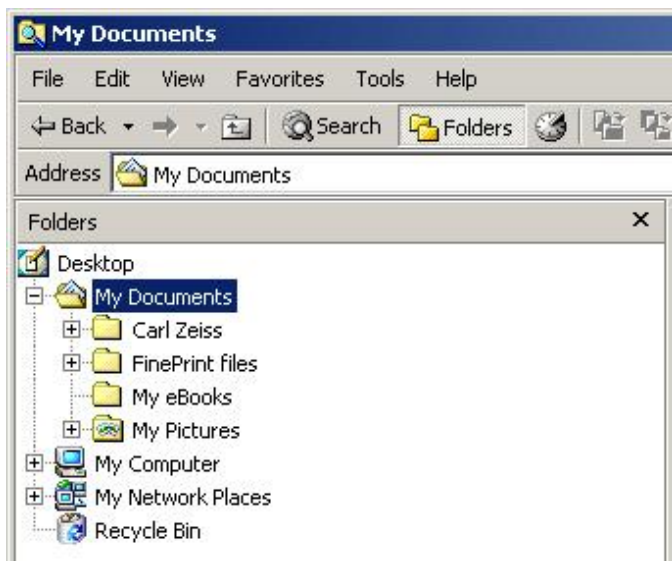
## 共享帐号“**All Users**”

Windows会创建一个名为默认**All Users**的用户帐号。保存在这里的文件可以被系统的所有用户使用。该共享帐号可用于保存所有用户都要用到的文件（例如标尺和测量程序），而不需要把这些文件复制到每个人用户文件夹。

## Windows 下的数据管理

### “**My Documents**”文件夹

用户自己的应用数据保存在**My Documents**文件夹中。该文件夹位于Windows桌面上或位于资源管理器列表的顶端：

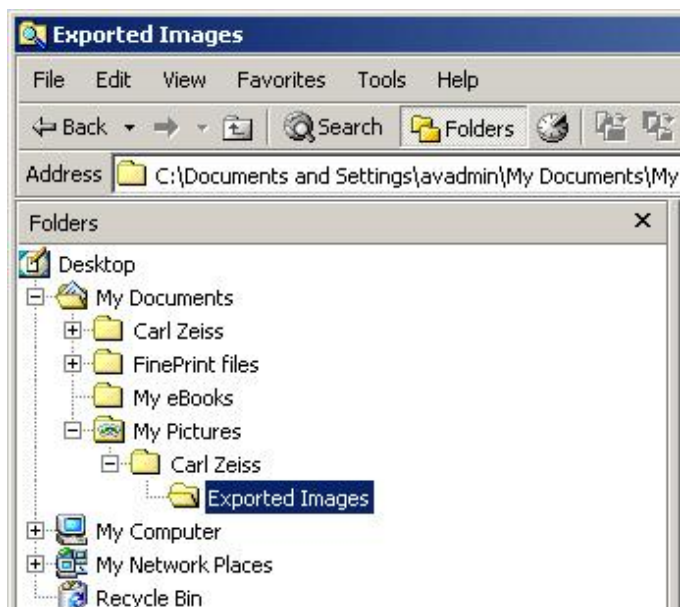


注意:

- n My Documents文件夹实际上只是一个链结，真正的用户文件夹位于C:\Documents and Settings\\My Documents

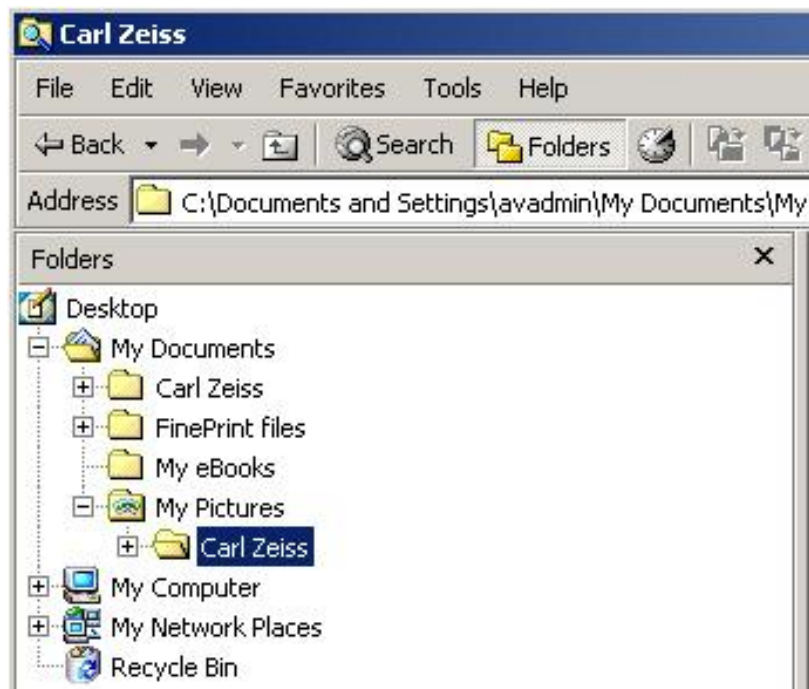
## AxioVision 图像

在My Documents文件夹中还有一个Windows默认文件夹My Pictures，AxioVision建议把用户的图像保存在那里。



## AxioVision 数据文件

当用户第一次启动AxioVision时，会在My Documents文件夹里创建一个名为Carl Zeiss的子文件夹。用户生成的所有文件，如标尺，报告，测量数据等，都默认保存在该文件夹中。



## AxioVision 配置文件

该文件对于AxioVision正常工作很重要（设备等的INI文件），它保存在用户帐号下Application Data\Carl Zeiss\AxioVs40文件夹中。该子文件夹底部对一般用户显示，只有系统管理员可以操作它。

## 9.3 标尺

### 概述

标尺是用户以真实单位而不是象素值来显示比例尺和测量值所必需的。它需要对每一种物镜、optovar和摄像机分辨率的组合分别配置。如果用户使用AxioCam系列摄像机，请注意以下事项！

#### 注意：

- n 对于AxioCam系列摄像机只有基础分辨率需要校准。所有其它衍生的分辨率自动以基础分辨率进行校准。

校准通常用一个镜台测微器进行。镜台测微器上的刻度允许用户简便精确地指定已知长度。

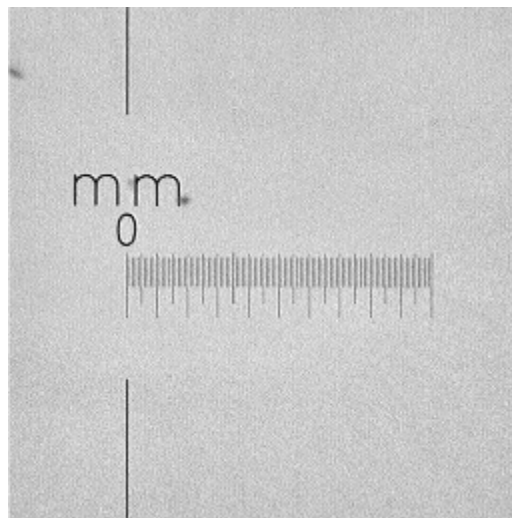
标尺保存在扩展名为ZVSC的文件中。这些文件保存在My Documents \ Carl Zeiss\Data\Scaling文件夹中各个用户自己的文件夹里。

#### 注意：

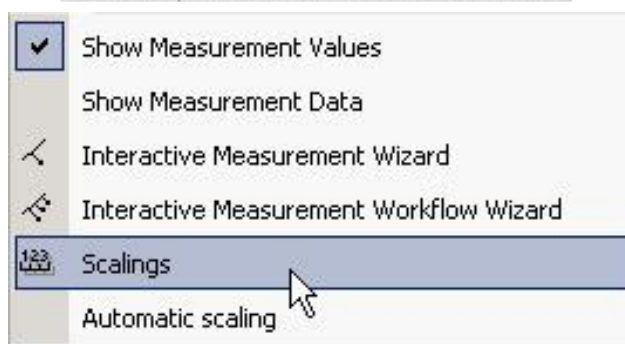
- n 用户也可以使用来自AxioVision第三版的标尺，只要把它复制到该文件夹即可。
- n 由于其它用户可能也需要使用标尺，这时可以把标尺保存在共享文件夹All Users中（参见9.6节“输出和导入用户配置”）。

## 生成标尺

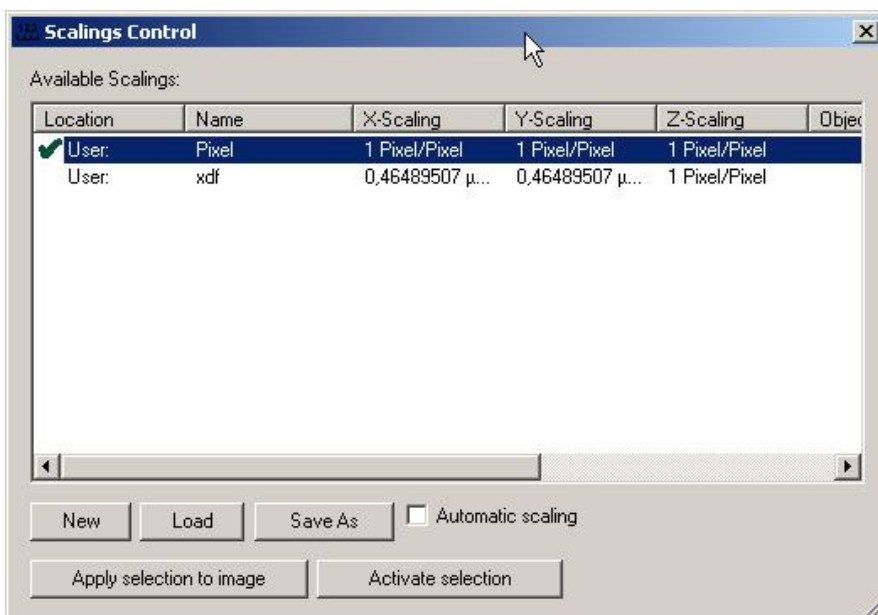
- Ø 获取一幅镜台测微器的图像。
- Ø 尽可能把刻度摄入图像。



- Ø 从Measure菜单中选择Scalings功能。

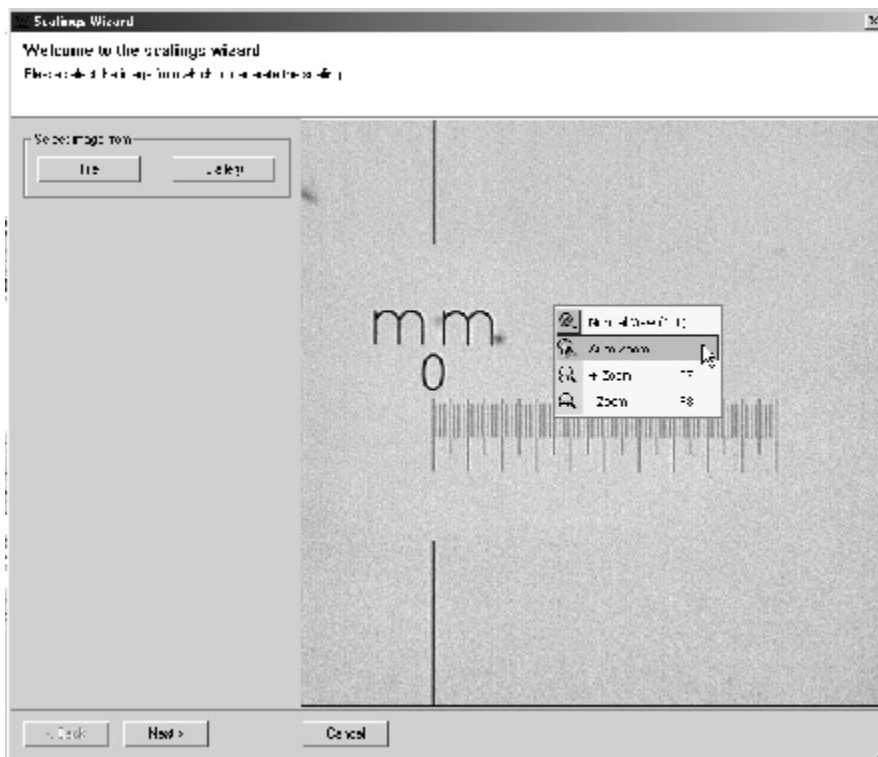


- Ø 在Scaling Control窗口单击New。
- Ø 标尺向导启动。

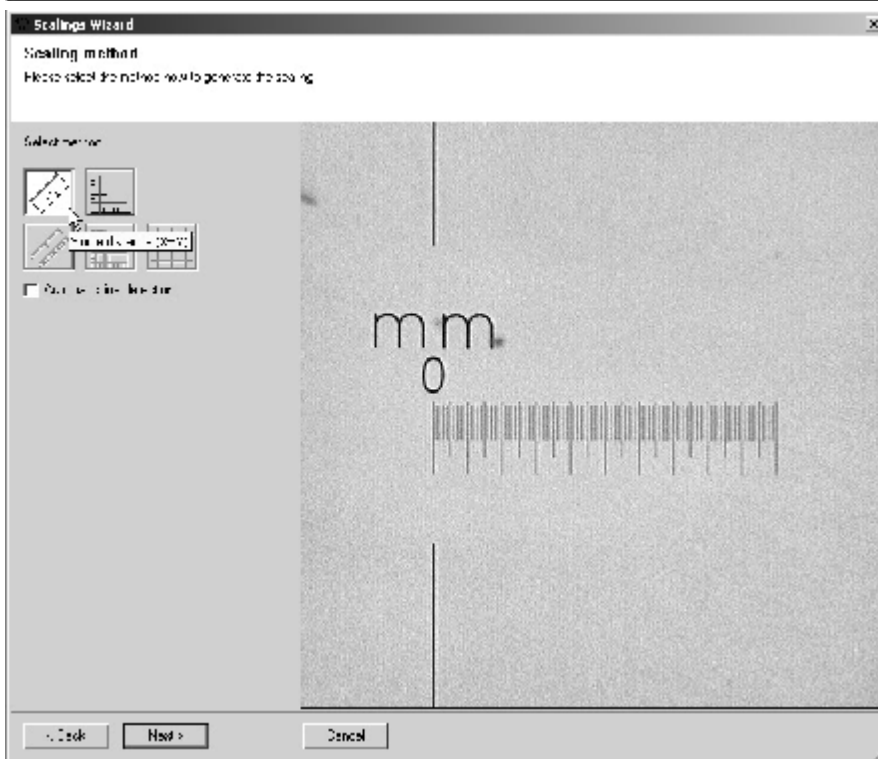




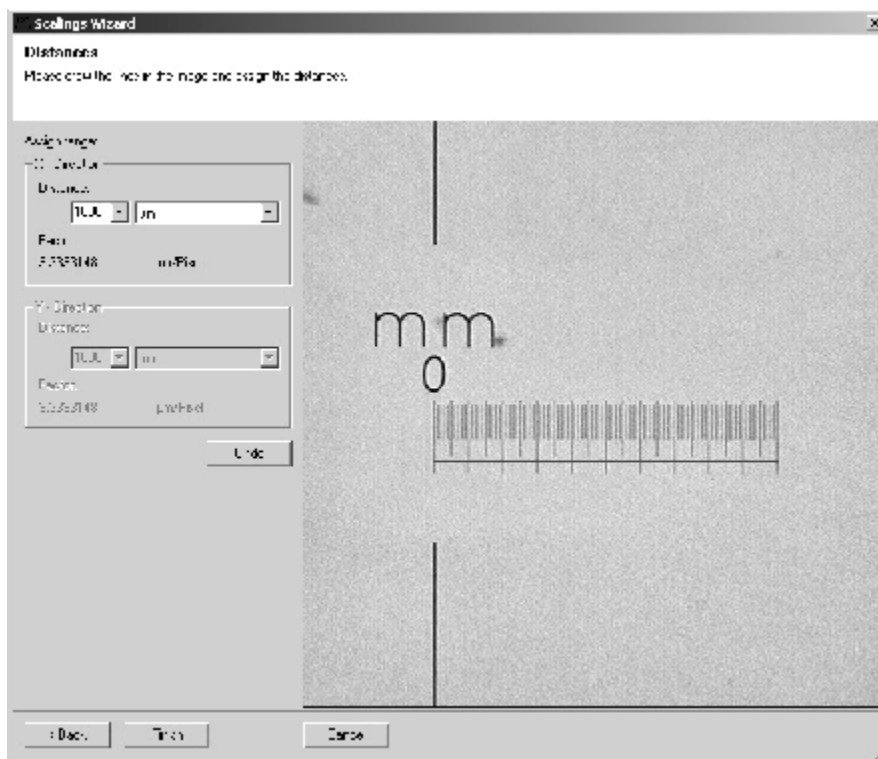
- Ø 右击图像并选择 Auto Zoom以查看整个图像。
- Ø 必要时放大窗口。
- Ø 单击Next。



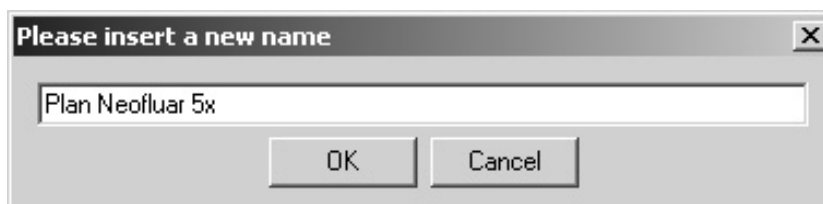
- Ø 选择模式Single Distance (X=Y)。
- Ø 单击Next。



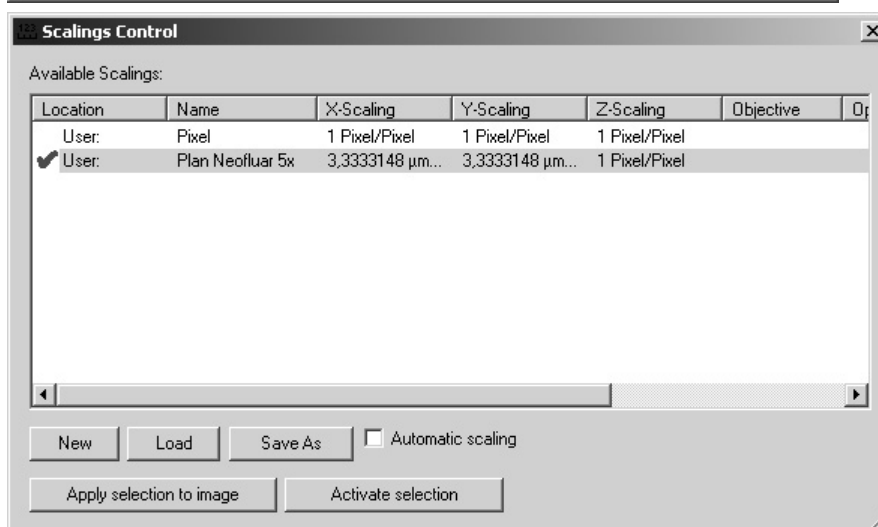
- Ø 在图像中单击刻度的起点和终点。
- Ø 在Distance区输入距离并选定单位（Unit）。
- Ø 单击Finish。



- Ø 给标尺输入名字然后单击OK。



- Ø 新标尺出现在标尺控制窗口中,并自动激活。
- Ø 该标尺默认用于后续的图像获取过程s。



注意:

- n 由于其它用户可能也需要使用标尺,这时可以把标尺保存在共享

文件夹All Users中（参见9.6节“输出和导入用户配置”）。

- n Save As按钮可用于把标尺保存到整个工作组中。

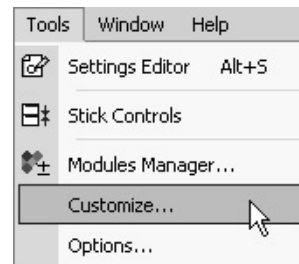
## 9.4 调整用户界面

在Tools菜单中的Customize功能允许用户自定义用户界面。用户可以设计“自己”的AxioVision，只显示那些实际需要的功能。在Customize对话框中作的任何改变都立即显示在AxioVision界面中。该对话框不包含“传统的”按钮，例如OK或Cancel。用户进行所需改变后直接关闭对话框即可。

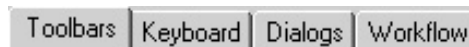
### 创建工具栏

如何创建一个工具栏以快速运行图像处理功能

- Ø 从Tools菜单选择Customize功能。

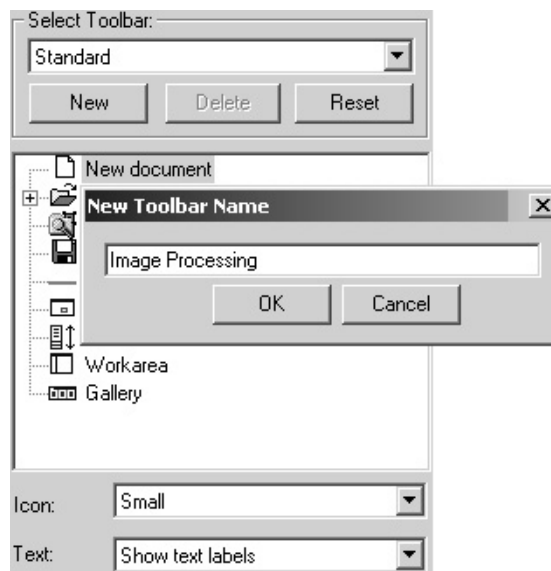


- Ø 确认在Customize对话框中激活Toolbar属性页。

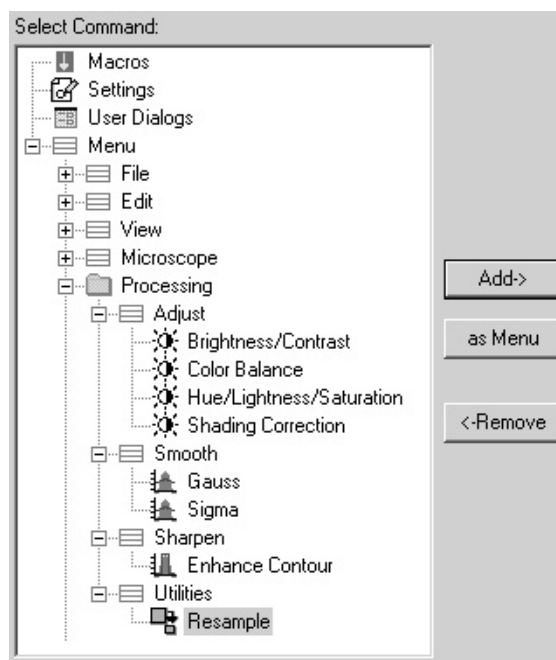


## Ø 创建新工具栏:

- u 单击New。
- u 给新工具栏指定一个名字。
- u 单击OK。
- u 定义图标大小和指定是否要给按钮分配标签。



- Ø 在Select Command区选择用户要添加到工具栏的命令。
- Ø 选择命令Processing Adjust Brightness/Contrast
- Ø 然后单击Add应用到工具栏。
- Ø 通过同样的途径从Processing菜单添加所有需要的功能。



- Ø 工具栏将显示包含的命令。
- Ø 单击OK以创建工具栏。

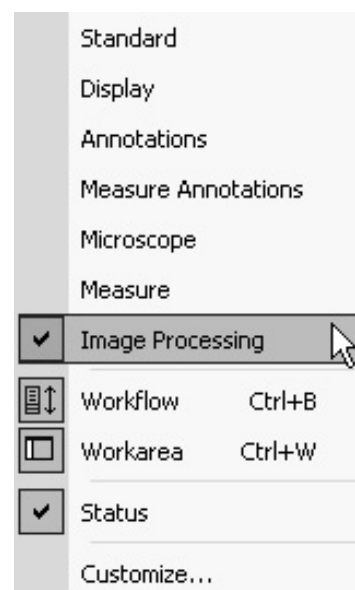


- Ø Processing工具栏将显示在AxioVision窗口顶部。



注意:

- n 右击主菜单或其它工具栏也可以在工具栏列表中显示工具栏。
- n 该过程也可用于修改已有的工具栏。



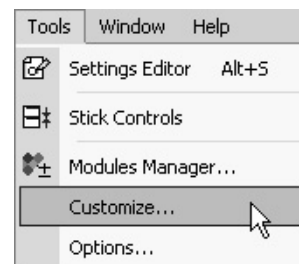
- Ø 在Select Toolbar下拉列表中选择已有的工具栏然后同上处理。



## 给功能定义组合键

用户可以通过快捷键执行AxioVision中任何可用的命令。这样用户可以快速调用命令，尤其是那些需要多次执行的命令如图像获取或激活摄像机或显微镜设置（要求电动显微镜）。

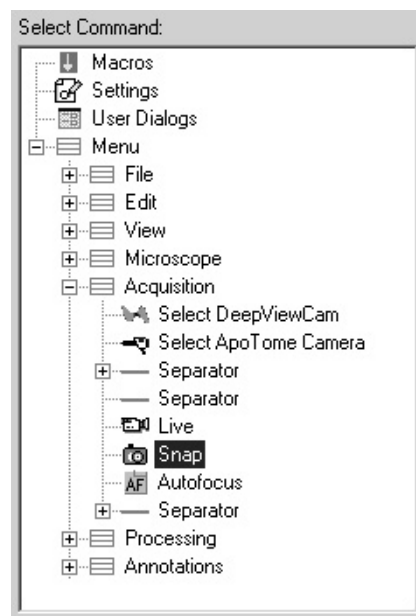
- Ø 从Tools菜单选择Customize功能。



- Ø 确认在Customize对话框中键盘属性页被激活。



- Ø 在Select Command区选择用户要添加到工具栏的命令。
- Ø 选定一个命令如Acquisition → Snap。



- Ø 用鼠标点击**Press Shortcut Key**。
- Ø 然后在键盘上按下想要分配给该命令的快捷键。（快捷键不能重复。）
- Ø 单击**Assign**。
- Ø 单击**OK**关闭对话。如果要接着分配快捷键，单击**Apply**。

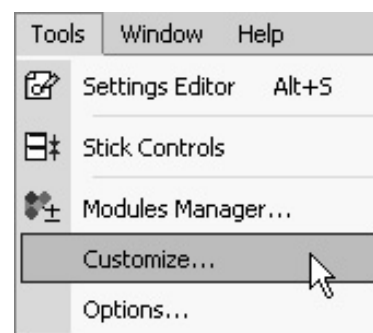


## 创建自定义对话框

用户自定义对话框允许用户创建控制显微镜和摄像机等等，并选出操作所需的元件的对话框，这样可以简化操作。

创建一个对话以使用户可以控制电动的显微镜的物镜旋座和灯电压以及设定摄像机的曝光时间。

- Ø 从**Tools**菜单选择**Customize**功能。



- Ø 确认在**Customize**对话框中**Dialogs**属性页被激活。



Ø 单击New以创建一个新对话。



Ø 输入下列数据：

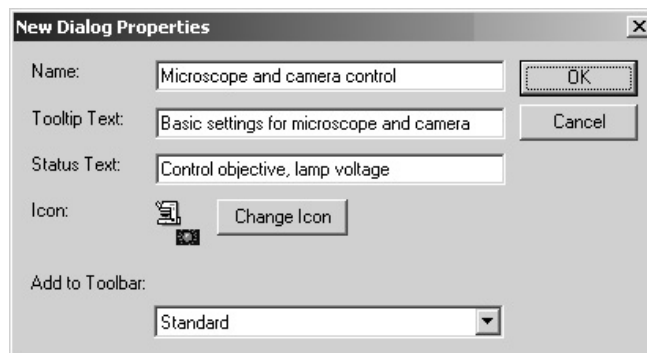
Name（对话+按钮）

提示文本

Status文本（状态线）按钮符号

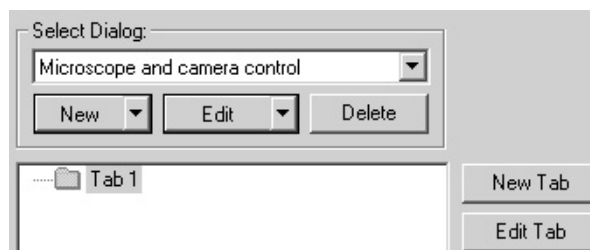
Tool Bar，在上面应创建按钮以打开对话。

Ø 单击OK以创建对话。



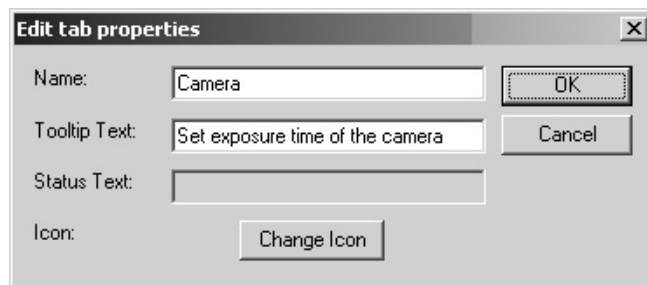
Ø 接着选择进入Tab 1。

Ø 单击Edit Tab以改变名字。



Ø 指定一个名字和提示文本。

Ø 然后单击OK。



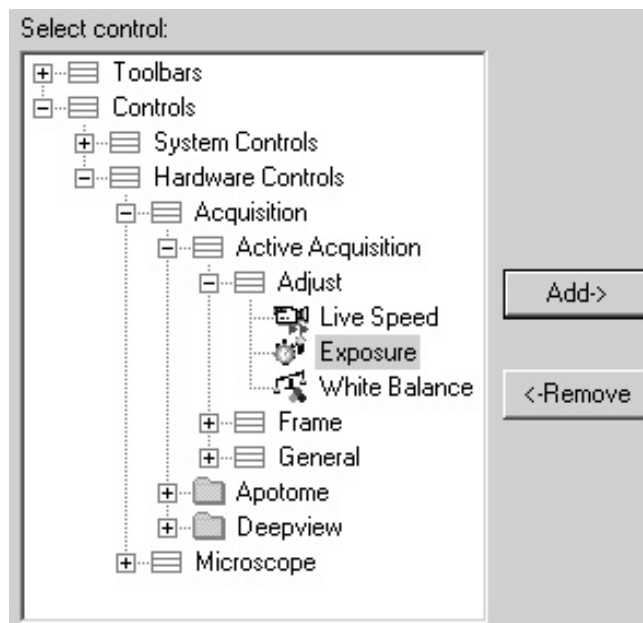


∅ 在Select Control区选择Exposure。

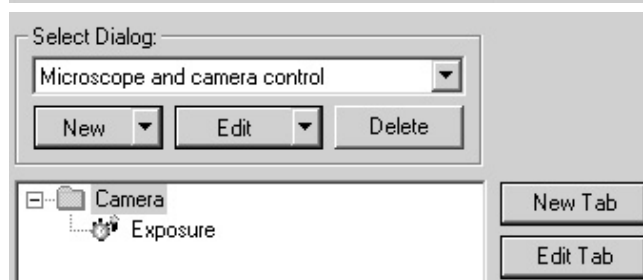
∅ 单击Add以插入到对话框中。

注意:

- n 控制元件取决于用户的系统配置，可能与这里显示的不同。

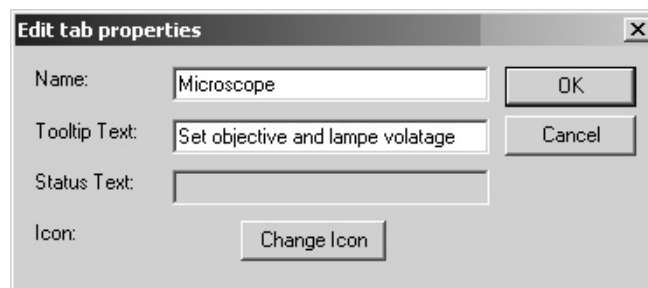


∅ 单击New Tab以创建用户对话框的下一个属性页。



∅ 指定名字和提示文本。

∅ 单击OK以创建属性页。

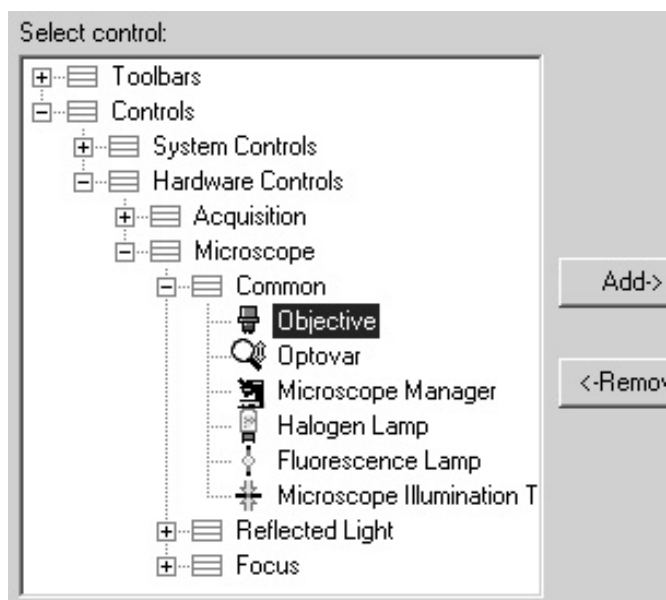


Ø 在控制元件区选择物镜和卤素灯。

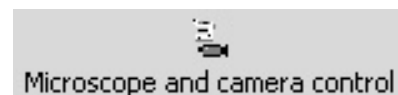
Ø 单击Add。

注意：

- n 控制元件取决于用户的系统配置，可能与这里显示的不同。



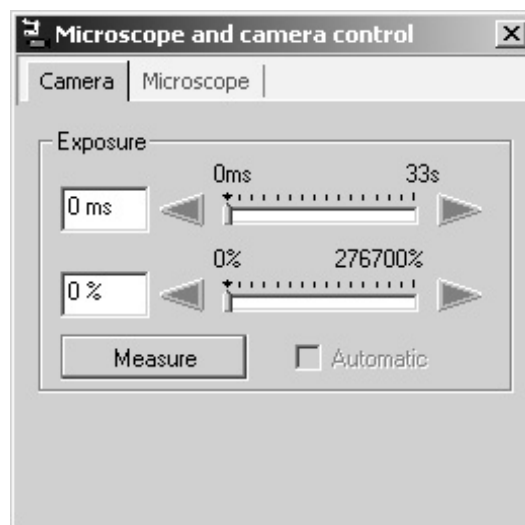
Ø 单击OK以创建对话框。



Ø 按钮将显示在用户选定的工具栏上。结果应如下：

Ø 该对话框包含两个属性页：摄像机和显微镜。

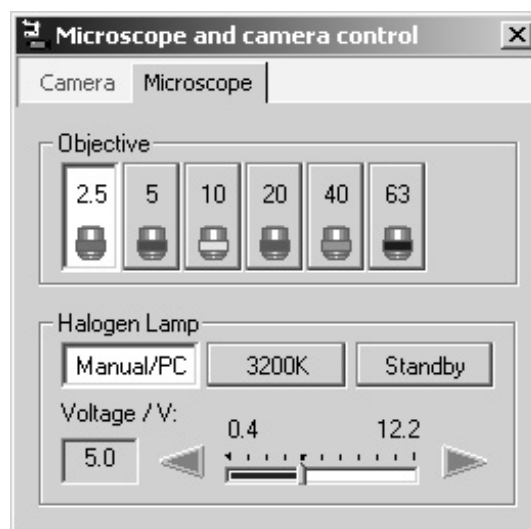
Ø 摄像机属性页包含控制曝光时间的元件。



- Ø 显微镜属性页包含控制物镜和控制灯电压的元件。

注意：

- n 检查提示文本和状态栏文本。

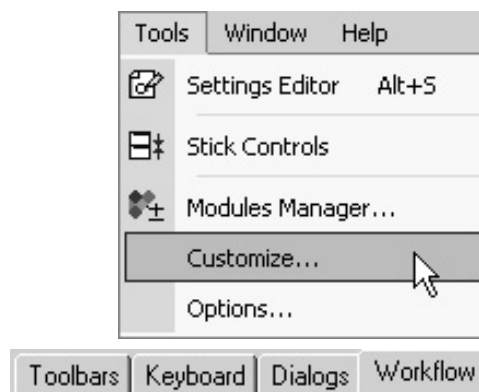


## 定义工作流程

工作流程是操作AxioVision最有效的途径。它们是执行特定任务的“中心元件”。用户只需要一个接一个地单击其中包含的按钮即可快速正确地得到结果。用户可以因此所有不需要的控制元件，从而完全集中精力于具体实验。

注意：

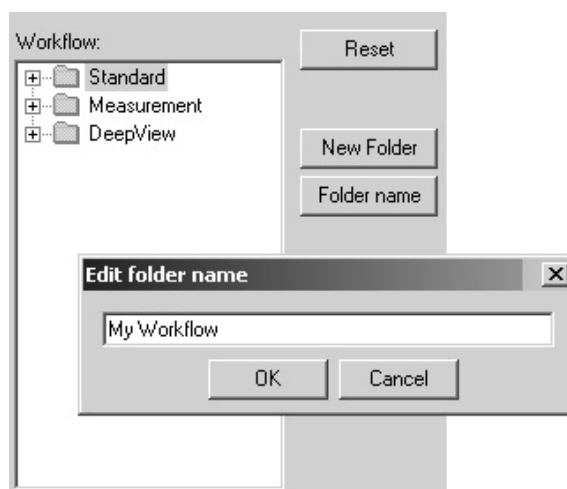
- n 用户也可以把自己创建的对话框和所有工具栏放在工作流程中。
- Ø 从Tools菜单选择Customize功能。



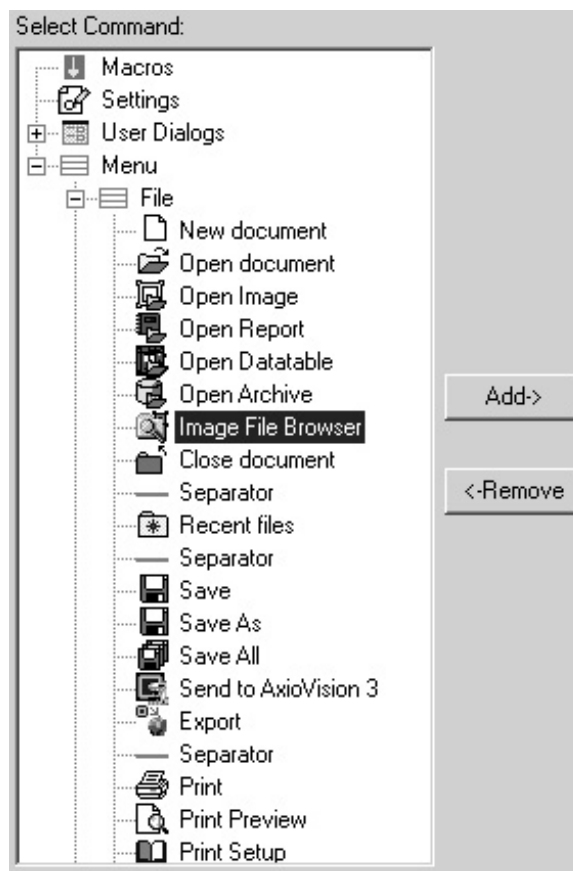
- Ø 确认在Customize对话框中 Workflows属性页被激活。

创建一个工作流程：

- Ø 单击New Folder然后单击Folder Name。
- Ø 给新工作流程指定一个名字。
- Ø 单击OK。

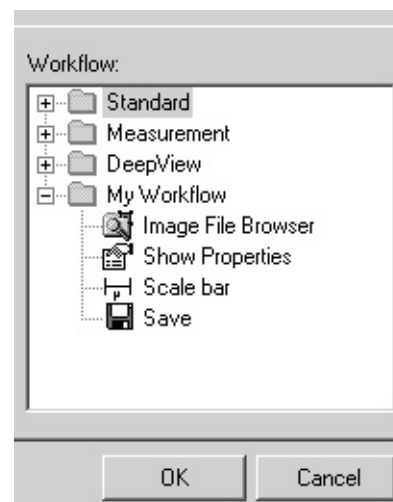


- Ø 在Select Command区选择用户要添加到工具栏的命令。
- Ø 例如，选定菜单命令File Image File Browser。
- Ø 然后单击Add添加到工作流程中。
- Ø 同样把菜单命令View → Display Properties、Anntations → Scale bar、File → Save添加到工作流程中。

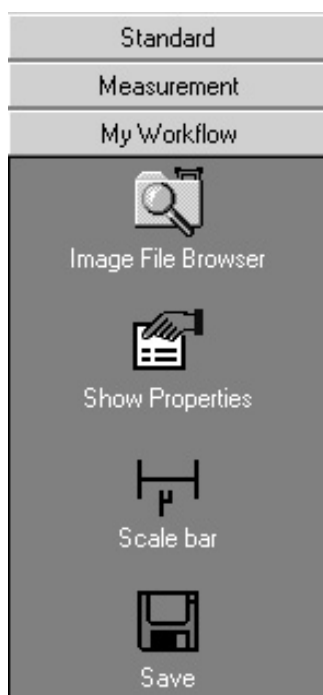


工作流程将显示这些命令。

Ø 单击OK以创建工作流程。



Ø 工作流程将位于My Workflow条下面。



## 9.5 一般设定

在该对话框中用户可以输入AxioVision配置设置。设置按属性页主题分类。

设置包括：

- n AxioVision的启动性能。
- n 语言选择。
- n 指定AxioVision文档的用户路径。
- n 图像显示。
- n 图像获取后的自动保存。
- n 用户信息条目。
- n 更多。

从Tools菜单选择Options功能。打开包括General, Layout, Folders, Image, Display和ID属性页的Options窗口。

这些设置的细节和对系统的影响参见在线帮助。

## 9.6 输出和导入用户配置

### 概述

用户配置指用户按自己要求所调整后的所有设置。

导入/输出配置功能方便备份用户的个人工作环境，这样用户可以在系统出问题后方便快速地恢复配置。在多用户系统中，通过共享

帐号,可以快速简便地把设置提供给所有用户(例如比例,工具栏等)。  
参见9.2节“用户和数据管理”以及“导入用户文件”。

可以输出下列AxioVision元件:

- n** 在Tools菜单Customize对话中所作的设置。即用户生成的所有工具栏,快捷键,工作流程和对话框。(参见9.4节“定义用户界面”。)
- n** 在Tools菜单Option对话框中的所有设置。(参见9.5节“一般设置”。)
- n** 用户也可以保存关于哪些模块曾经被激活的记录。见Tools菜单Modules Manager功能。

如果需要使用户个人文件对其它用户可用,可以把文件夹C:\My Documents\Carl Zeiss\压缩到一个ZIP文件中,这样可以保留Carl Zeiss数据文件夹的文件夹结构。

## 输出

- Ø 从Tools菜单选择Import/Export Configuration功能,启动向导。该向导引导用户进行输出处理。
- Ø 选择要输出的元件,和目标文件夹及文件名。

这时会在目标文件夹中产生两个文件。一个是avconf文件,该文件包含用户的所有配置元件。第二个文件是zip文件,包括所有用户文件。

注意:

- n 如果希望用户的输出配置可用于其它用户, 确认文件是保存在共享文件夹中, 例如C: \Documents and Settings/All Users。

导入

导入配置文件

要导入其它用户的配置, 从Tools菜单选择Import/Export Configuration功能, 启动向导。该向导引导用户进行导入处理。最后所有来自其它用户的元件都可用。

注意:

- n 一个配置只能被相关用户导入。

导入用户文件

用户数据不能通过导入功能进行复制。必须通过解压缩Zip文件来单独进行, 这样可以避免创建的文件被用户自己不小心覆盖。

- Ø 启动Window资源管理器, 进入包含所需Zip文件的文件夹。
- Ø 双击ZIP文件以解压缩该文件。
- Ø 再选择My Documents文件夹作为目标文件夹。用户文件将自动以正确文件夹结构复制到目标文件夹。如果在用户的My Documents文件夹中没有Carl Zeiss子文件夹, 将自动创建一个。



注意:

- n** 用户需要适当的软件以打开ZIP文件s。Windows XP Professional自帶了打开Zip文件的程序。在Windows 2000 Professional操作系统中用户需要安装相应软件如WinZIP。
- n** 如果希望这些文件对所有用户可用，则选择共享帐号All Users作为解压缩的目标文件夹。该文件夹位于C: \Documents and Settings\All Users\Documents。

## 10 图像获取模块

### 10.1 ApoTome

#### 概述

ApoTome软件模块控制着ApoTome硬件（控制盒和滑块），并协调利用数字摄像头如AxioCam MRm进行图像获取。ApoTome系统可以生成通过荧光样品的光学切面。图像中位于焦点以外的信息被除去，从而增加：

- n 图像锐度
- n 信噪比（对比度）
- n 和轴向分辨率。

ApoTome图像工作站需要下列组成部分：

1. 显微镜：AxioPlan 2 imaging e或者Axiovert 200
2. 防震系统
3. 具有至少10位动态范围的数字摄像头
4. ApoTome控制盒和滑块
5. 带显示器的个人计算机
6. AxioVision基本软件包和可选的ApoTome软件模块

关于硬件如显微镜和ApoTome控制盒和滑块的安装和使用细节请参见相应的手册。

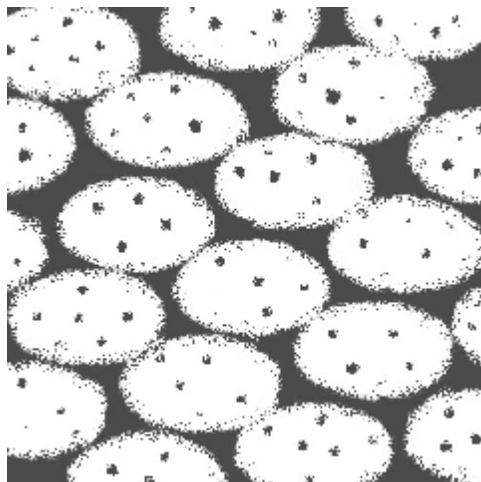
注意：

- n 在使用ApoTome前请先了解AxioVision软件的基本功能，尤其是摄像头和显微镜组件的操作。

## 条带投影成像原理

显微镜的光学系统是针对非常薄的样品进行优化的。对于盖玻片校正的物镜，所有光学计算都是针对直接位于盖玻片下的非常薄的样品。Carl Zeiss的所有盖玻片校正的物镜都是针对该特定用途进行优化的，并在相应物镜规定的波长下具有最佳的点扩展功能（Point Spread Function, PSF）。

然而，在生物应用中，大多数样品都不满足这些最佳条件。有时要用到较厚的组织切片，例如在利用特定的荧光探针分析组织中的细胞时。在这种情况下，在显微分析时，设定的焦平面会被来自实际焦平面上方或下方的部分所掩盖，这样图像就好像“褪色”了，对比度降低，背景变亮。极端情况下重要的结构和图像细节甚至可能被完全掩盖。



上面是显示这种效果的组织中细胞核显微图像。

有许多方法可以避免或者逆转这种效果，如共聚焦激光扫描显微镜或3D去卷积。

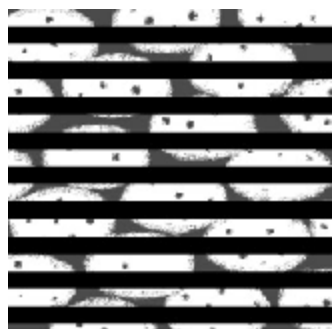
ApoTome运用了“条带投影（fringe projection）”的原理。该技术在反射光路的视场光阑面里面加上一个具有一定宽度的网格线的光栅。由于视场光阑面是和焦平面相匹配的，因此该光栅将显示在显微镜上。从目镜可以看到光栅叠加在实际的样品上面。



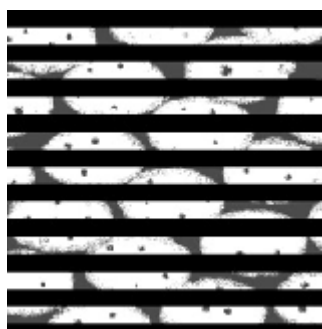
上图为光栅图像的图示。实际上网格线要细得多。

ApoTome滑块运用扫描机制来在样品平面内三个确定的位置间移动光栅。光栅的移动非常迅速（少于5 ms），在每个位置都取一幅数字图像。

光栅的移动图示如下：



光栅位置1



光栅位置2



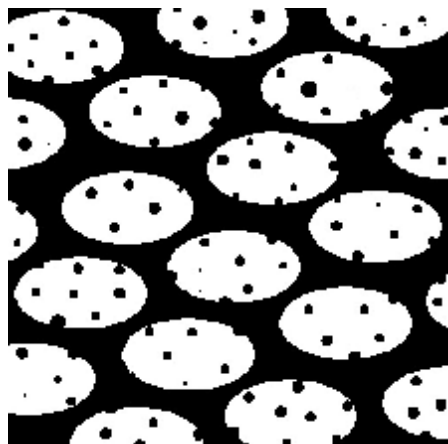
光栅位置3

所得的三幅原始图像在计算机上在线合并为一幅图像，处理图像所需时间取决于图像大小：

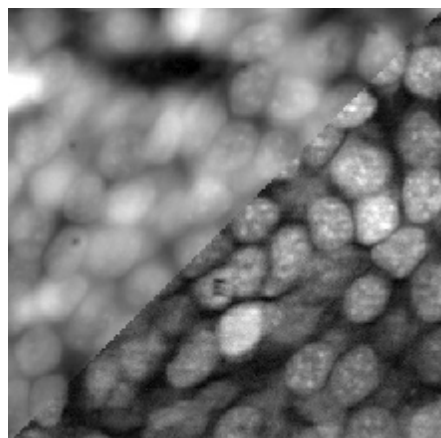
- n 512 x 512: 大约 30 ms
- n 1300 x 1000: 大约100 s

处理产生的图像是一个穿过样品的光学切面，具有以下特点：

- n 原始图像中的光栅已经去掉。
- n 图像位于焦平面以外的部分不再可见。
- n 图像的锐度和对比度得到了增强。
- n 图像的轴向分辨率得到了提高。



产生的相应图像图示如上。



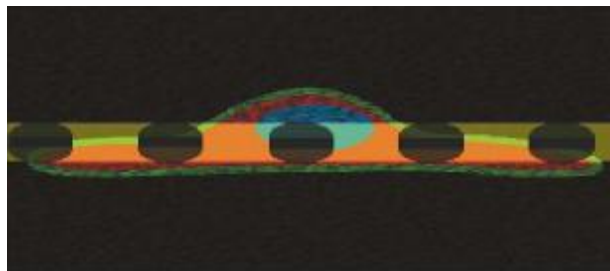
上图是细胞核（蝌蚪大脑切片）的黑白图像。

n 上左：常规荧光

n 下右：光学切面

为什么产生的是光学切面？

一个可能的方法是用样品中光栅的图像来解释：



光栅的图像提供了设定的焦平面上各个结构之间距离的必要信息（见上图）。一些样品结构在焦平面上，而另一些或上或下，但是进入了设定的焦平面。

光栅投影技术利用在实际焦平面以外的光栅图像是模糊的这个事实，并记录下样品的模糊区域。除去这些模糊区域和光栅之后，焦平面的亮度差异（对比度）得到了显著提高。在焦平面以外该技术只产生很小的差异，因为样品和光栅的图像实际上是同样的模糊。亮度差异由用来合并三幅原始图像的算法来检测，同时也除去焦平面外的图像部分。


## 硬件配置

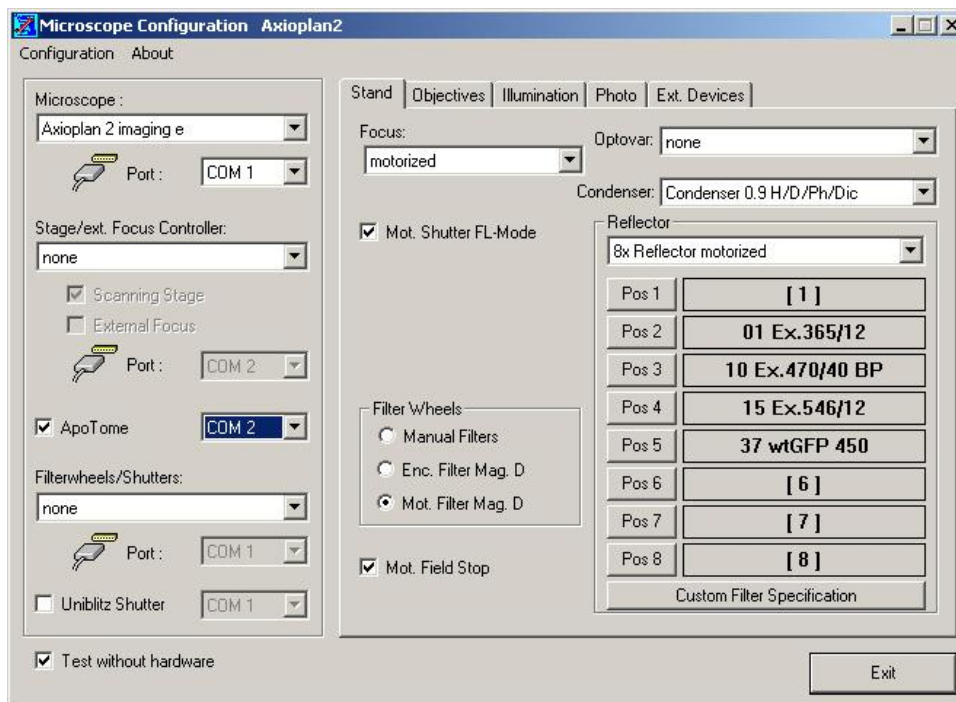
关于设备设定的详细情况请参见相关设备的手册。


Ø 首先打开显微镜，然后是荧光电源，随后再打开ApoTome控制盒和摄像头。

Ø 打开计算机。



Ø 双击  打开Windows桌面上的Microscope Configuration程序。



Ø  配置显微镜。必须激活ApoTome复选框才能使用ApoTome。

如果ApoTome控制盒已经通过RS 232串行电缆直接连接到计算机的空COM端口，则在列表中选择相应的COM端口。

如果ApoTome控制盒已经通过CAN总线电缆直接连接到显微镜，则在列表中选择与在Microscope中一样的COM端口。

Ø 单击Exit，关闭Microscope Configuration，并在随后的对话框中单击Save & Exit确认所作的改动。



Ø 双击Windows桌面上的 AxioVision 图标，启动AxioVision软件。

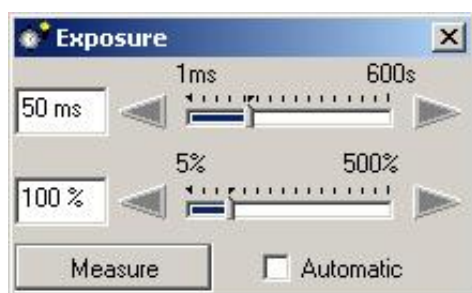
对于随后的步骤，最好能够方便地操作各个控制元件。请记住随着设备的不同，某些控制元件可能没有，或者看起来不一样：



切换荧光波长的反射器旋座。



内部快门。



摄像头曝光时间。





可切换的光路，例如Axiovert 200。

用户也可以创建一个包含所有所需控制元件，包括ApoTome控制功能，的用户自定义对话框。创建对话框的详细情况请参见第九章“配置”

## 相位校准

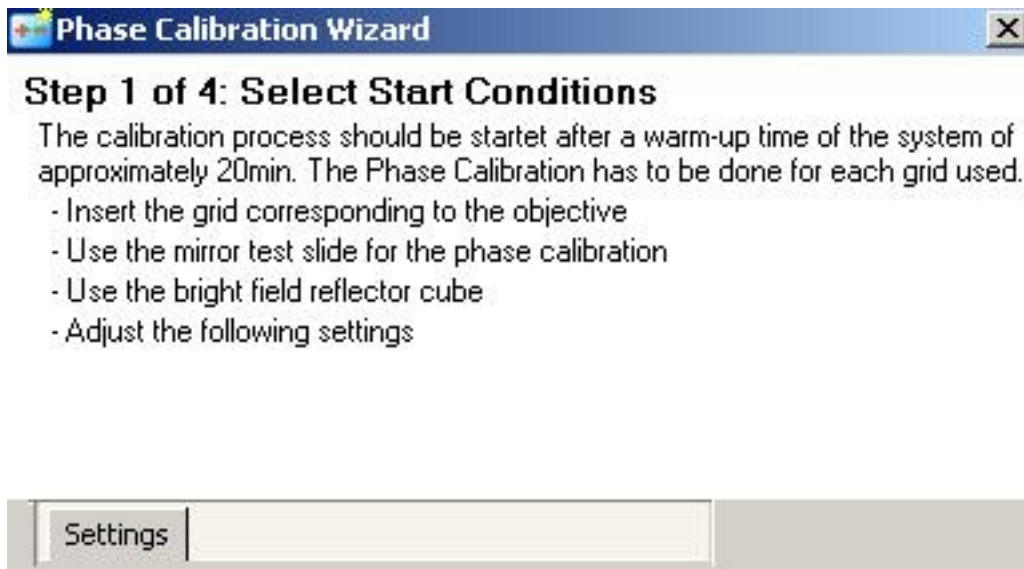
为了给ApoTome的扫描单元设定最佳的偏转角，用户需要根据系统结构对扫描仪进行精细校准。随着ApoTome一起提供的样品镜和特定的光反射器就是用于这个目的的。把滤光器插入到一个反射器旋座空位上，并在Microscope Configuration中为该滤光器设定一个名字，如Refl. BF。对所提供的两个光栅都必须进行校准。

建议用20x物镜来校准低放大倍数的光栅（标记有“L”），而用40x干镜（例如Plan-Neofluar 40x/0.75）来校准高放大倍数的光栅（标记有“H”）。

校准过程可以由向导引导进行。该向导通过从Acquisition菜单选择ApoTome功能，然后选择Phase Calibration。

该软件向导引导用户进行校准的四格步骤。重要的说明都显示在向导的文本区里。

## Step 1: 选择初始条件

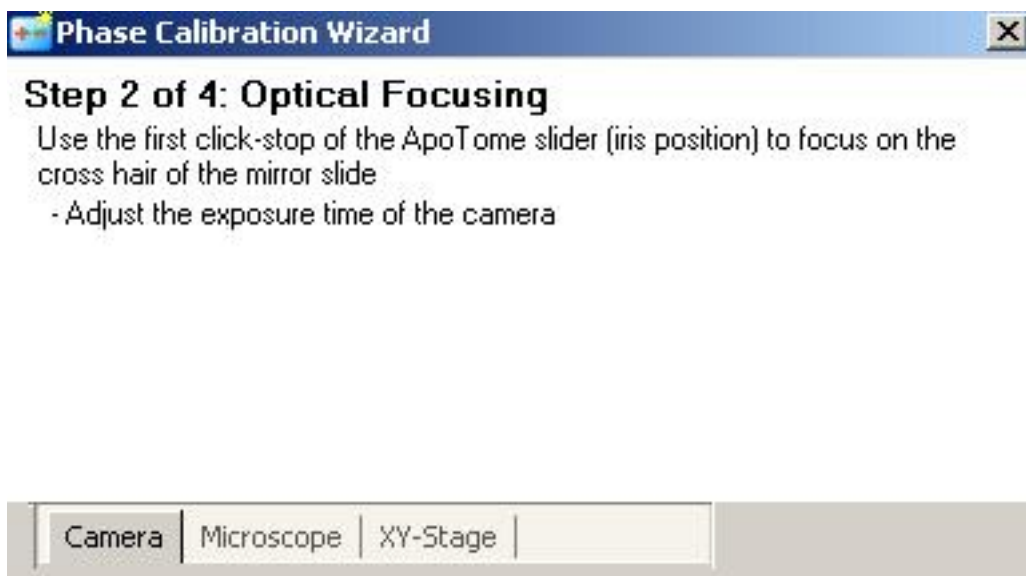



- Ø 移动ApoTome滑块到光圈位置（单击停留位置1）。
- Ø 使用有ApoTome明场反射器的反射器位置。
- Ø 把提供的样品镜放在显微镜下，打开反射光快门，并在显微镜上直接聚焦到样品镜中间的十字线上。
- Ø 切换到在计算机上软件操作。
- Ø 在向导中选择光栅（Grid），反射器（Reflector），染料（Dye）和物镜(Objective)的设定。特别注意选择正确的光栅。

注意：

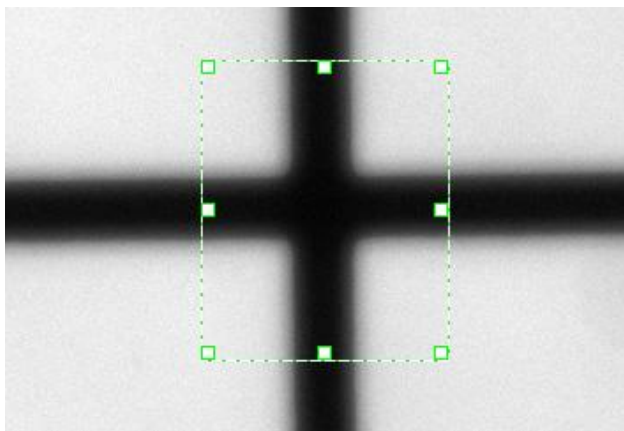
- n Reflector和Dye的下拉菜单是连在一起的。如果选择一个反射器和的染料组合（例如“Refl. BF”和“Bright field”），那么以后每次该反射器移动到相应位置时该染料都被自动选定。
- Ø 单击Next，实时图像自动打开。

## Step 2: 光学聚焦



Ø 单击  以设定最佳曝光时间。

Ø 使实时图像中的十字线尽可能的清晰。实时图像中的绿色聚焦矩形有助于寻找最佳聚焦位置。把聚焦矩形置于十字线的中心。

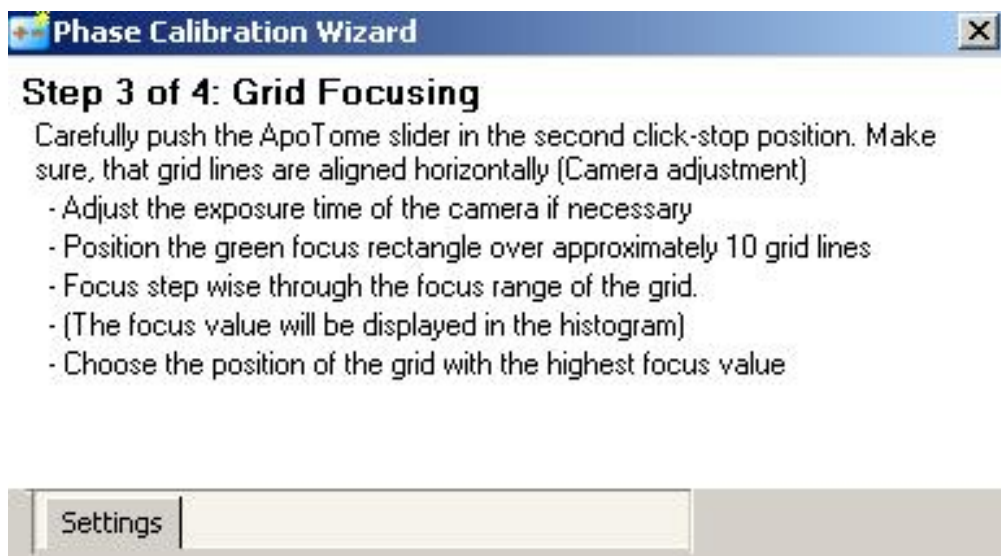


注意:

n 可以在Microscope属性页输入显微镜的常规设定。

Ø 单击Next进行下一步。

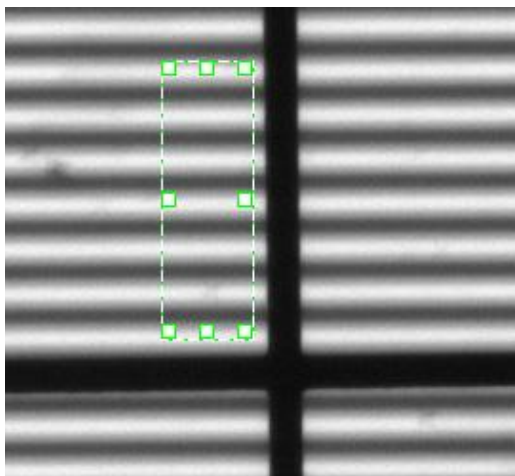
### Step 3: 光栅聚焦








Ø 把ApoTome滑块移动到第二个停留位置(ApoTome模式)。

Ø 单击  把光栅移动到起始位置。

Ø 在实时窗口中把聚焦矩形移动到没有十字线的位置。

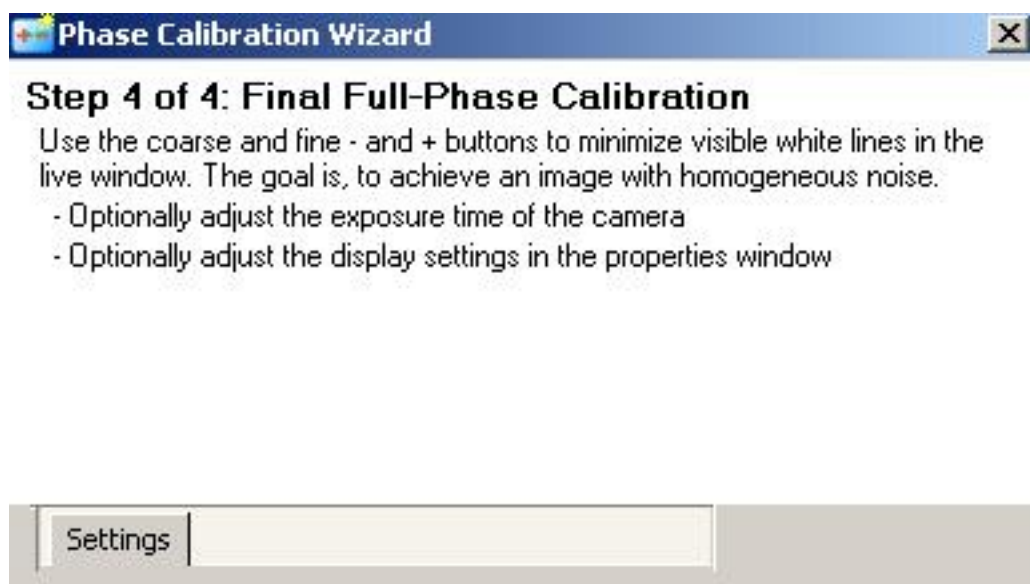


Ø 反复单击  以逐步聚焦光栅。一个绿条标记当前光栅位置。目的是平衡物镜焦点（由十字线的清晰度来定义）和光栅焦点：十字线和光栅必须同时清晰呈现。

对于光栅的每一个焦点位置都显示一个清晰度值。用户可以通过单击各个按钮光栅聚焦键（粗调：  和 ；细调：  和 ；）来移动到最好的光栅聚焦位置。或者可以直接在直方图上单击相应位置。一个绿条标记当前光栅位置。







Ø 单击Next进行下一步。

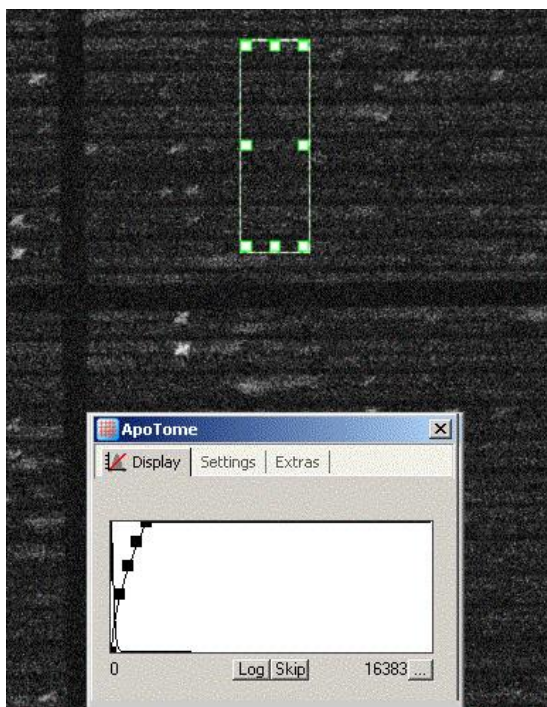
#### Step 4: 最后的全相位校准



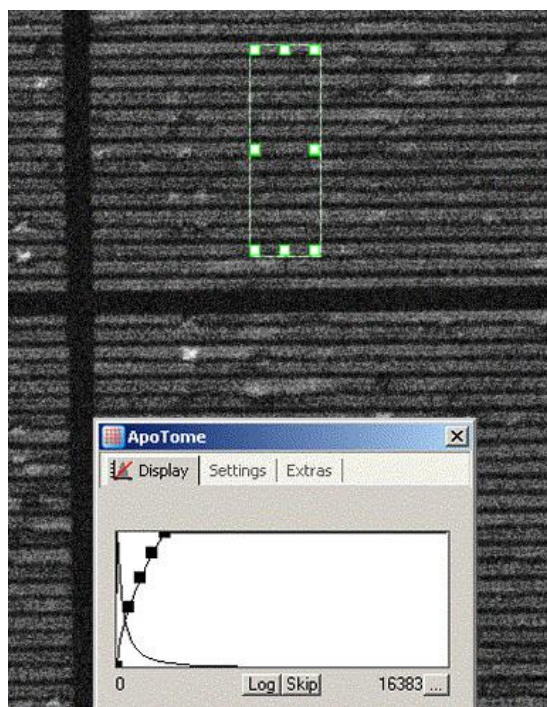
这一步用于扫描仪校准的实际设定。每次取两张图，而光栅被第一张和第二张之间的一条精确等宽的线代替。显示的图像是两张图相减之后的结果。如果系统完全校准了，则这两张图像互相抵消，从而得到一张只剩下噪音的黑色图像。

如果扫描仪没有对准，那么图像将会产生一条可见的亮线。可按以下步骤调整：

Ø 首先单击 ，并观察实时图像的变化。如果图像上残留的线条更加严重，则用  反向调节扫描仪。通过不断地正向和反向调节，用户可以找到残留线条的一个临界点。在临界点上用  和  或者  和  来进行细调。单击Reset键则相位值恢复到初始值（默认状态）。下面的两张图像分别显示了校准的好和坏：



好



坏



注意：

n 慢慢单击这些键来调整扫描仪，每次单击后都及时检查实时图像中的效果。由于这种模式下噪声被大大增强，不可能产生完全黑的图像，而只能找到一个使图像中线条最小的设定。

Ø 单击Close键结束校准。

Ø 必要时重复以上步骤校准第二个光栅的相位差。

注意：

n 尽管进行校准后设定就不再改变，还是应该不时检查系统是否保持完美校准，特别是在拆卸和重装系统之后。

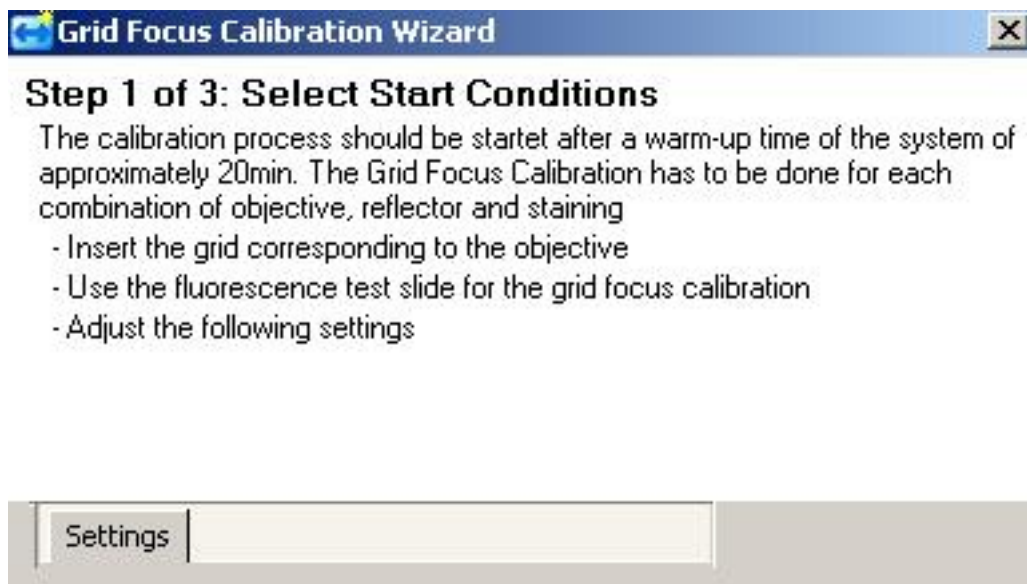
## 光栅焦点校准

为了ApoTome能发挥最佳功能，光栅必须精确地显示在物镜设定的焦点上。光栅的焦点取决于物镜和荧光的激发和发射波长。也就是说，对于每种荧光染料（如Dapi, FITC, Rhodamine等）都需要校准光栅焦点。最好使用用户自己的荧光样品来进行校准，当然也可以使用附带的荧光样品进行校准。

对于光栅焦点校准也有一个向导，它可以引导用户通过三个步骤进行校准。通过从Acquisition菜单选择ApoTome功能，然后选择Grid Focus Calibration。

重要的说明都显示在向导的文本区里。

## Step 1: 选择初始条件



- Ø 移动ApoTome滑块到光圈位置（单击停留位置1）。
- Ø 使用一个具有荧光滤镜的反射器位置（例如10 Ex. 470/40）。
- Ø 把荧光样品放在显微镜下，打开反射光快门。
- Ø 在显微镜上聚焦到样品上。
- Ø 切换到在计算机上软件操作。
- Ø 在向导中选择光栅（Grid），反射器（Reflector），染料（Dye）和物镜(Objective)的设定。

### 注意：

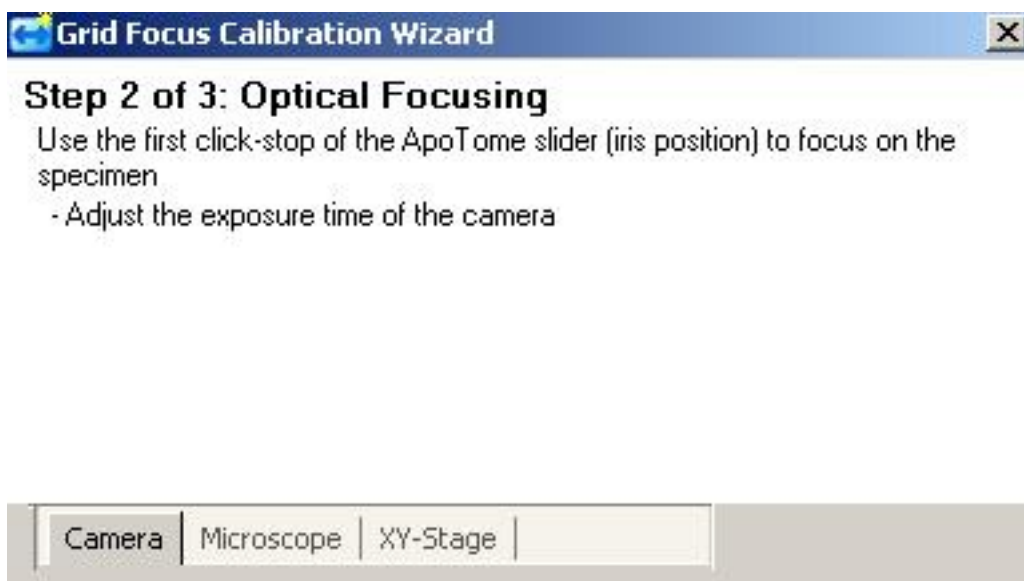
- n 确保给使用的物镜选择了正确的透射光栅。本章结尾的表格提供了光栅和物镜匹配的概览。Reflector和Dye的下拉菜单是连在一起的。如果选择一个反射器和的染料组合（例如“Refl. BF”和“FITC”），那么以后每次该反射器移动到相应位置时该染料都被自动选定。



用户也可以通过选择Dye列表里的ADD NEW Dye选项来添加更多的荧光染料。用户可以在显示的输入区内输入新染料的名字。

Ø 单击Next，实时图像自动打开。

## Step 2: 光学聚焦



Ø 单击  以设定最佳曝光时间。

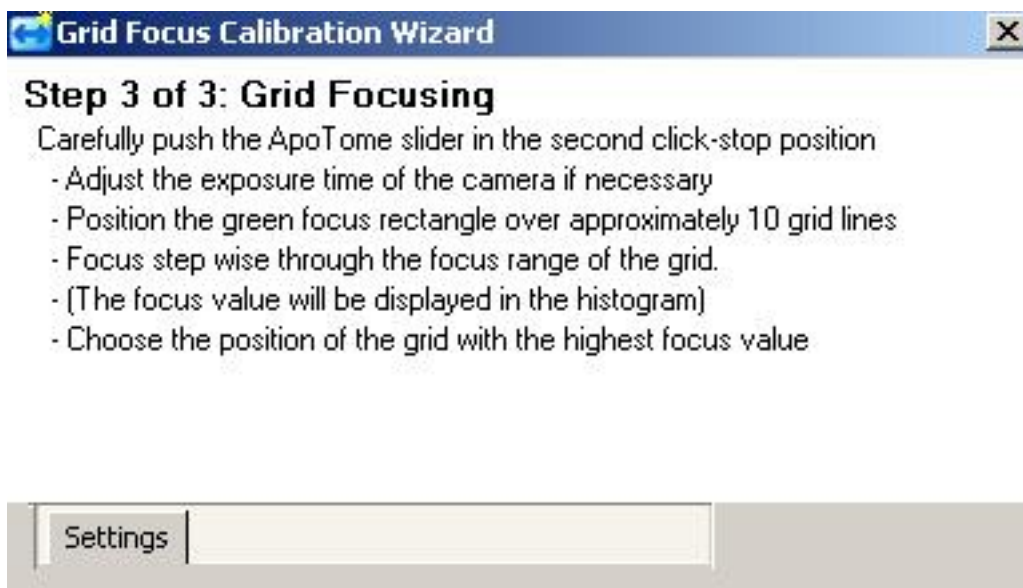
Ø 调节焦距使实时图像尽可能的清晰。



注意：

n 可以在Microscope属性页输入显微镜的常规设定。

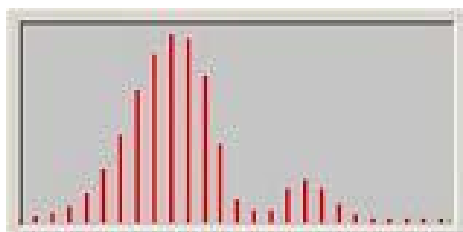
Ø 单击Next进行下一步。





### Step 3: 光栅聚焦



- Ø 把ApoTome滑块移动到第二个停留位置(ApoTome模式)。
- Ø 单击  把光栅移动到起始位置。
- Ø 在实时窗口中把聚焦矩形移动到荧光尽可能均匀明亮的位置。
- Ø 反复合击  以逐步聚焦光栅。一个绿条标记当前光栅位置。目的是平衡物镜焦点（由样品的清晰度来定义）和光栅焦点：样品和光栅必须同时清晰呈现。

对于光栅的每一个焦点位置都在直方图中显示一个清晰度值。



用户可以通过单击光栅聚焦键（粗调：和；细调：和）来移动到最好的光栅聚焦位置。或者可以直接在直方图上单击相应位置。

Ø 单击Close结束校准，显示下列对话框：



Ø 如果需要进一步校准则单击Yes，否则单击No。

校准结束后，将在ApoTome对话框的状态窗口中显示相应的图像（Acquisition菜单 ApoTome功能 ApoTome Dialog）。


## 用 ApoTome 获取图像

作为一个使用数字CCD摄像头的ApoTome图像系统，ApoTome模式可以被认为是摄像头功能的扩展。

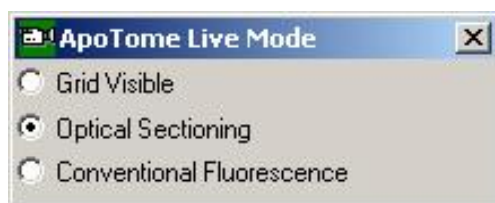
简单的图像获取操作如下：

Ø 打开摄像头曝光时间（Acquisition菜单 Adjust功能 Exposure）、快门和反射器（Microscope菜单 Reflected Light功能 Reflector或者Internal Shutter）控制元件。

Ø 确认ApoTome滑块位于第二个停留位置（ApoTome模式）。

Ø 使用工具栏上的  **Live** 键打开实时图像。快门自动和实时图像一起打开。

一旦通过单击  **Measure** 给CCD摄像头设定了最佳曝光时间，就可以在ApoTome模式下进行多种设定。对于ApoTome中的实时图像有三种可用设定。（ApoTome对话框中Settings属性页）。



Ø **光栅可见 (Grid Visible)**：实时图像的特性和在常规摄像头中一样，没有经过任何处理。由于光栅位于光路中，它在实时图像中也是可见的。光栅不断地上下移动，以免光栅的线条由于荧光漂白作用而被“烧录”在样品上。

Ø **光学切面 (Optical Sectioning)**：这种模式下每次取三张图像，在线合并成一个光学切面并显示。由于这种模式需要取三张原始图像，实时图像的速度相应降低。

注意：

n 这种模式下，如果显微镜焦距或样品位置发生变化，则在实时图像中可能短时间出现人为的线条。如果显微镜出现震动也可能出现这种情况。样品稳定后这种情况就会消失。

Ø **常规荧光 (Conventional Fluorescence)**：这种模式下每次取两张原始图像，光栅的位置由同样宽度的线条取代。从这两张原始图像中，可以计算产生相应于常规荧光图像（宽场）的图像。该模式下可以比较常规荧光图像和光学切面。



通过工具栏上的 **Snap** 键来启动图像获取。

对于ApoTome中的实时图像有三种可用设定。（ApoTome对话框中Settings属性页）



**Ø 不处理（No Processing）**：图像获取的特性和在常规摄像头模式下一样，不进行任何处理。虽然光栅位于光路中，但是由于它不断上下移动，所取得的图像仍和常规荧光图像一样。一般仅在同时自动获取几个通道的图像时采用这种模式。

**Ø 光学切面（Optical Sectioning）**：这种模式下每次取三张图像，在线合并成一个光学切面并显示。

**Ø 常规荧光（Conventional Fluorescence）**：这种模式下每次取两张原始图像，光栅的位置由同样宽度的线条取代。从这两张原始图像中，可以计算产生相应于常规荧光图像（宽场）的图像。该模式下可以比较常规荧光图像和光学切面。

光学切面的厚度可以在Extras属性页的Depth Info区显示。

ApoTome Depth Info			
	DAPI	FITC	RHOD.
Airy Units:	0.8	0.6	0.6
Micrometer:	1.7	1.7	1.8

注意：

- n 根据样品、荧光染料、曝光时间等的不同，ApoTome模式产生的图像上可能会有可见的细残留线条。这种线条可以用滤镜去除。用户可以选择关（Off）、弱（Weak）、中等（Medium）和强（Strong）几种模式。

残留线在Fourier空间显示为沿着一条垂直线的点。滤镜从Fourier光谱中去除特定的某组点。

最初选择Weak。如果还有残留线的话，逐步提高设置。由于滤镜是在计算光学切面的过程中使用，所以在任何时候改变滤镜设定是都需要重新取图。



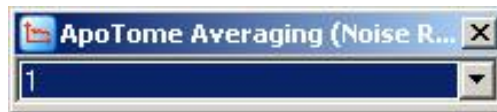
在Averaging（降噪）区域设定一个大于1的值可以进一步提高图像质量。例如，如果设定为2，则获取两幅ApoTome图像并平均。该方法能显著降低噪声，还可以降低甚至去除图像中的残留线。

## 用 ApoTome 进行多维取图

ApoTome功能完全整合到AxioVision的自动图像获取模块中。用户可以使用ApoTome获取多通道荧光图像，z-stack图像，时间序列图像和它们的任意组合。这些图像根据ApoTome: Acquisition Mode中的设定来获取.关于多维取图功能的详细描述请参见“多维取图”节。

上述的一个前提是已经按第九章中“配置”和“标尺设定”节进行了系统校准。本质上前面章节描述的功能同样可以应用于多维取图。

例如，如果在多维取图过程中反射器位置自动改变了，将在用 ApoTome 取图时考虑到当前荧光滤镜设定的信息，特别需要考虑所使用的荧光染料（Dye）的情况。该信息对应于多维取图功能的 C（通道）属性页上的 Dye 选项。如果在 C（通道）属性页中没有染料的信息，ApoTome 则使用与反射器位置相对应的染料信息。



如果单击 ADD NEW Dye 选项下拉菜单：



则打开 Add A New Dye 对话框：



输入一个有意义的名字然后单击 OK。

如果在多维取图的 C（通道）属性页中出现了一个 ApoTome 没有校准的染料名字，则停止取图并显示错误信息。

如果对于一个反射器位置对两个或者更多染料进行了校准，则需要指定所用的染料。

## 物镜 – 光栅匹配表

下表提供物镜和光栅匹配概览。

	Axioplan	Axioplan	Axiovert	Axiovert
物镜	光栅PL	光栅PH	光栅V L	光栅V H
10x/0, 3	x		x	
10x/0, 45	x		x	
20x/0, 75	x		x	
25x/0, 8 Oil	x		x	
25x/0, 8 H <sub>2</sub> O	x		x	
40x/0, 75		x		x
40x/1, 3 Öl	x		x	
40x/1, 2 H <sub>2</sub> O	x		x	
63x/1.4 Oil		x		x
63x/1.3 Oil		x		x
63x/1, 2 H <sub>2</sub> O		x		x
100x/1.3 Oil		x		x
100x/1.45 Oil		x		x



## 10.2 自动调焦（Autofocus）

### 概述

自动调焦可以对样品自动进行聚焦。该功能需要具有电动Z-驱动的显微镜。除了那些仅用TWAIN界面控制的镜头，自动调焦可以操作所有AxioVision可用的镜头。该功能可以采用包括反射光、透射光、明场/暗场以及荧光在内的多种光照。

注意：

n 自动调焦功能不适用于相差和DIC。

为了能够在不同显微镜程序和所有放大倍数下使用自动调焦，需要提前在一个手动聚焦后的样品上进行校准。校准需要物镜和optovar放大倍数、物镜数字光圈和光照方式的信息，如果是数字摄像头的话还包括相应分辨率。如果显微镜的所有部件都是电动的，AxioVision可以自动检测这些参数；否则需要手动输入这些信息。

注意：

n 建议每次显微镜组件改变后都重新校准系统。

## 校准自动调焦

### 准备

把光路切换到摄像头。单击Standard工具栏  图标打开实时图象窗口，或者从Acquisition菜单选择Live功能。

Ø 调整摄像头焦距并选择要取的图象帧。

### 校准

Ø 从Acquisition菜单选择Autofocus功能。



Ø 激活Settings属性页。

Ø 确认光照（Illumination）和物镜（Objective）类型、optovar和实时图象速度等的设定和用户系统的实际配置相匹配。



注意：

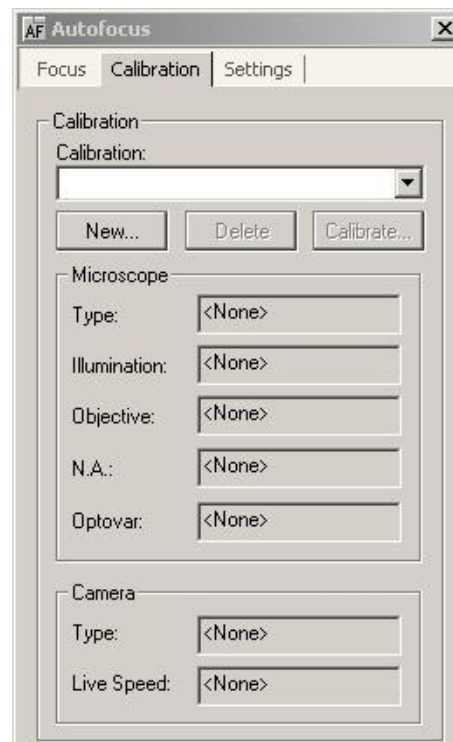
n 设定选项取决于系统配置，因此可能和这里显示的不一样。

- Ø 激活Calibration属性页。
- Ø 检查Microscope和Camera的设定。

注意：

- n 如果个别的组件不是电动的或者编码的，则必须手动输入相关信息。

- Ø 然后单击New创建一个该设定的新校准。



- Ø 给该校准输入一个名字然后单击OK。



校准过程即自动开始。

## 使用自动调焦

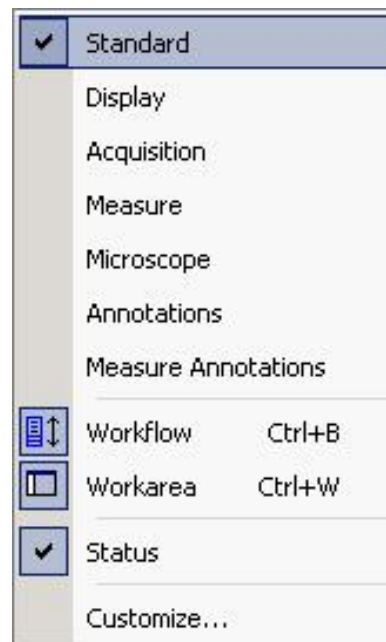
使用Autofocus最简便快捷的方式是通过实时图象窗口底部的工具栏直接运行。

如果聚焦结果不满意，用户可以通过Autofocus属性页进行细调。关于各个参数的详细描述参见在线帮助。同其他图象获取模块一起使用Autofocus的介绍参见相关章节。

注意：

- n 在能够使用Autofocus之前，必须对显微镜和摄像头的设定进行校准。参见下一章。
- n 如果在执行操作时出现问题或者由于某些原因操作无法执行，请检查Acquisition菜单中的Autofocus功能。激活Focus表并查看Status。在这里你可以看到操作为何失败的提示。

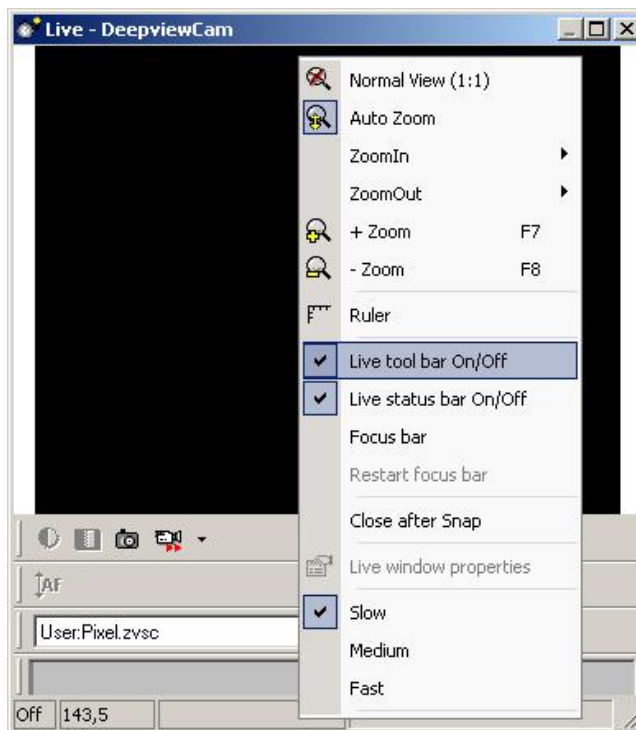
Ø 确认Standard是否显示：右击菜单或任何工具栏，激活Standard（在它前面应该有一个勾号）。



Ø 把光路切换到摄像头。单击Standard工具栏图标打开实时图象窗口。



Ø 如果实时图象窗口的工具栏没有显示，右击实时图象窗口并激活Live tool bar On/Off选项（在它前面应该有一个勾号）。



Ø 选择样品上所想要取图的区域，然后单击实时图象窗口工具栏上的Autofocus键。



注意：

n 如果聚焦结果不满意，用户可以通过Autofocus属性页进行细调。从Acquisition菜单选择Autofocus功能，激活Focus表然后进行想要的调节。

Ø 然后单击Snap以获取单幅图象。



## 10.3 多维取图

具有超过两个维度的图象无法使用摄像头一般的取图功能来获取。这种图象可能包括几个通道或者是一个时间序列。对于这些图象AxioVision需要附加的信息，如通道的数目，z平面等。这些信息的集合在AxioVision中被称作“实验（experiment）”。

在工作区中有Multidimensional Acquisition按键，单击可以打开Experiment属性页，里面包括多通道荧光（Multichannel Fluorescence），Z-Stack，标记与查找（Mark&Find）和时间序列（Time Lapse）等的控制元件，取决于用户购买了哪些模块。

Experiment属性页包括已安装模块的概览和选定的重要控制元件。从该页用户可以执行各种功能来控制、修改、保存和执行预先准备好的实验。在该页还可以通过Reuse功能重新使用已经获取的图象的参数设定。

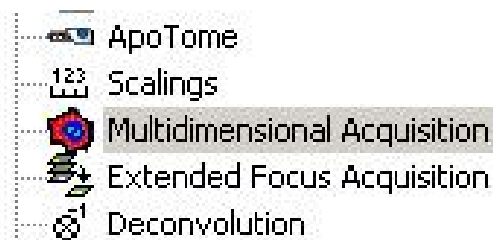
每个模块也有它自己的表格，可以进行基本的设置。

注意：

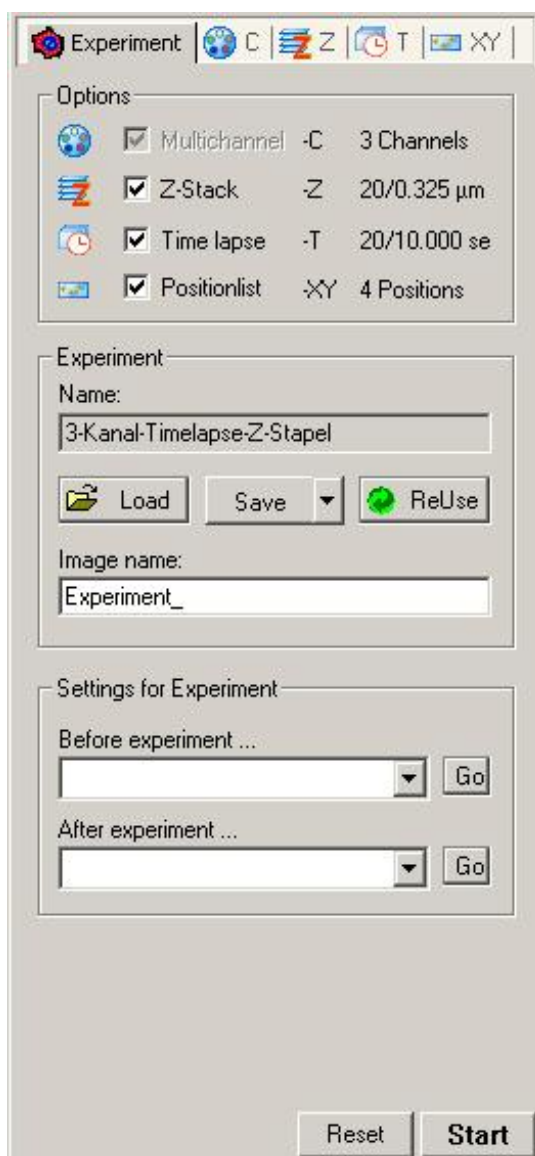
- n 请注意用户的系统不一定具有这里所描述的所有模块和功能，这取决于用户所购买的选配件。
- n 关于各个功能和命令的详情请参见在线帮助（F1键）。

如何创建一个实验?

Ø 在工作区内单击Multidimensional Acquisition。



Ø Experiment属性页将显示在工作区中。



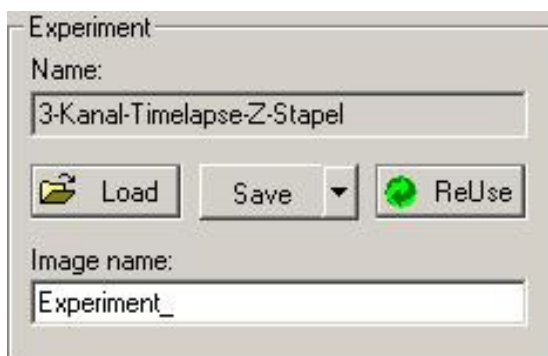
注意：

n 请记住只有当相应的模块可用时质粒所列出的选项才会显示。

Ø 在Options区域可以选择实验的维度。




Ø 当前实验的名字显示在Experiment窗口中。

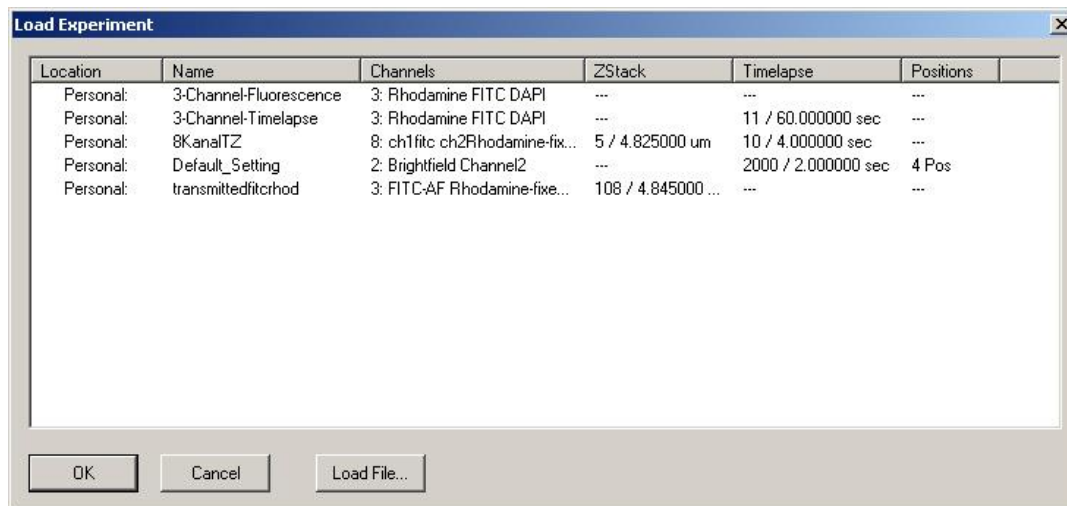


默认的实验名字是“Default\_Setting”。获取的图象的默认名字是 。取图后该名字将附加上一个序列号。用户可以在取图前指定图象的基本名字。

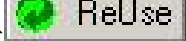
Ø 为用户实验进行设定后单击 ，打开一个对话框，然后保存新的实验。

Ø 单击 ，从下拉菜单中选择一个实验并单击OK。





一旦加载了该实验，它所包含的设定也被采用。

Ø 如果想要调用一个已保存的ZVI图象中的设定，单击 ，选择目的图象，并单击OK确认。该操作只调用该图象的取图设定而不加载该图象。该功能使用户可以轻易地在可重现的条件下取图。

Ø 单击  执行实验。

## 多通道荧光模块

使用多通道荧光模块用户可以定义多达8个通道用于取图。这些通道一起保存在ZVI文件中。这样用户可以在不同视图间快速地切换以比较不同通道的图象。

注意：

- n 请注意用户的系统不一定具有这里所描述的所有模块和功能，这取决于用户所购买的选配件。
- n 关于各个功能和命令的详情请参见在线帮助（F1键）。

如何创建一个多通道实验？

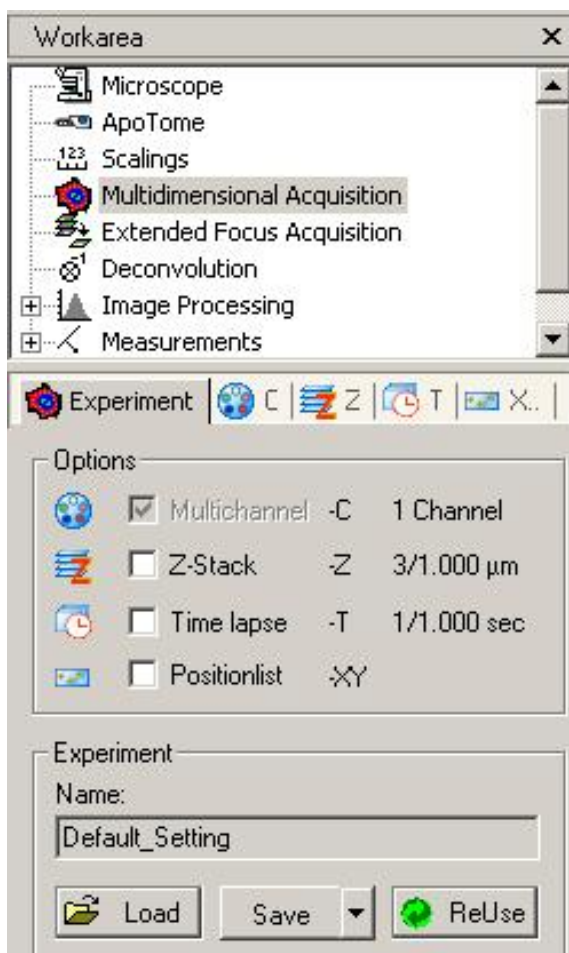
下面的例子说明如何生成一幅3通道的荧光图象。通道应分别定义为Rhodamine，FITC和DAPI。请用参比样品检查设定。


注意：

n 下面的说明需要使用电动显微镜。

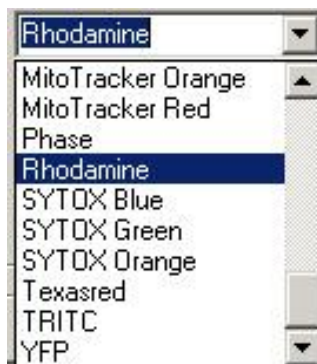
用户也可以在Settings Editor中生成、编辑和应用设置，并应该已经生成了通道特异的设置（见第九章“配置”-“设置编辑器”）。用户系统的可用硬件组件可能会与本例中不同。

Ø 在Workarea激活Multidimensional Acquisition属性页：



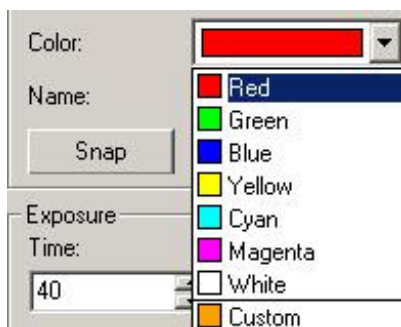
Ø 进入C属性页。要生成不同的通道，需要在这里输入通道特异的参数。

Ø 从Dye区域选择Rhodamine荧光染料。



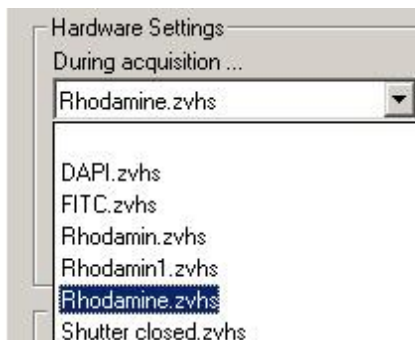
选中该染料之后，将为该通道分配建议的色彩和激发/发射波长。


Ø 如果不喜欢建议的色彩，用户可以从列表中选择其它颜色（例如改为100%红）：



Ø 系统将自动以该染料名字  为该通道命名，必要时也可以改变 。

Ø 然后从During Acquisition区域中的列表例选择“Rhodamine.zvhs”，为该通道分配一个硬件设置：




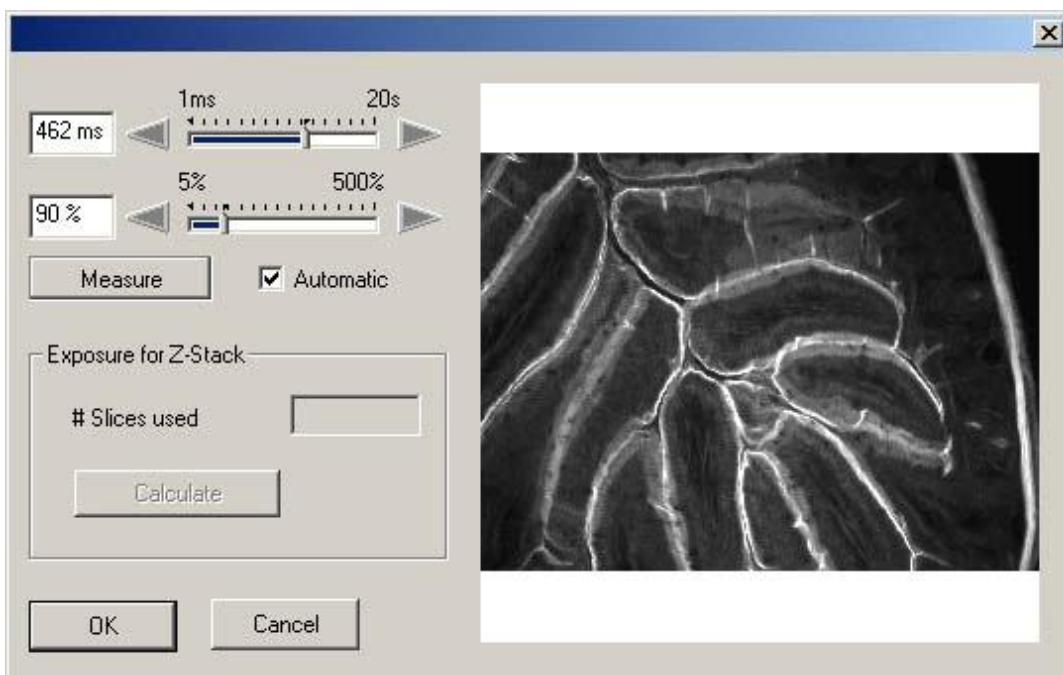
Ø 可以单击  键以检查该设置。这样会打开荧光快门，并把反射器切换到正确的滤镜位置。

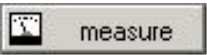

Ø 对下一个区域重复以上操作，并选择“shutter closed.zvhs”设置，以保

证在取图后快门立即关闭。




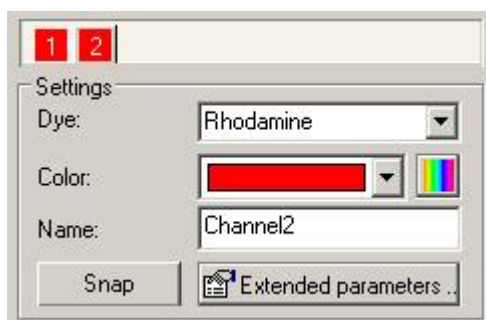
Ø 单击Exposure区域然后单击  **measure** 键以确定Rhodamine通道的曝光时间。选定的硬件将应用到显微镜上并打开对话框：



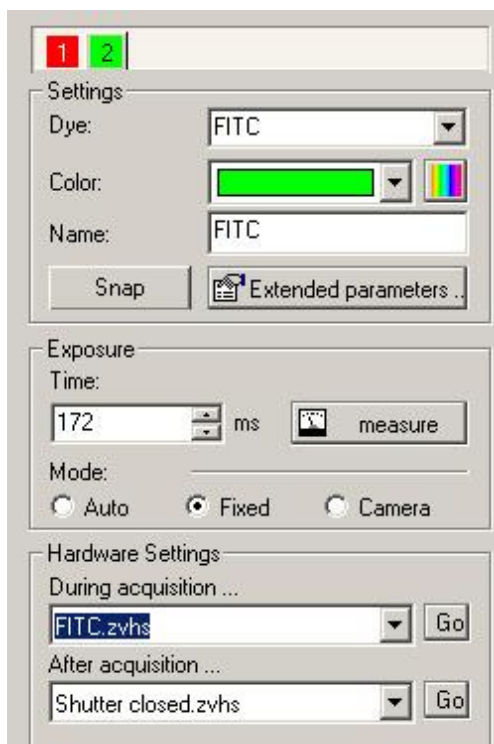
Ø 单击  键并单击  以关闭对话框以设定正确的曝光时间。新的曝光时间被输入并应用于该通道



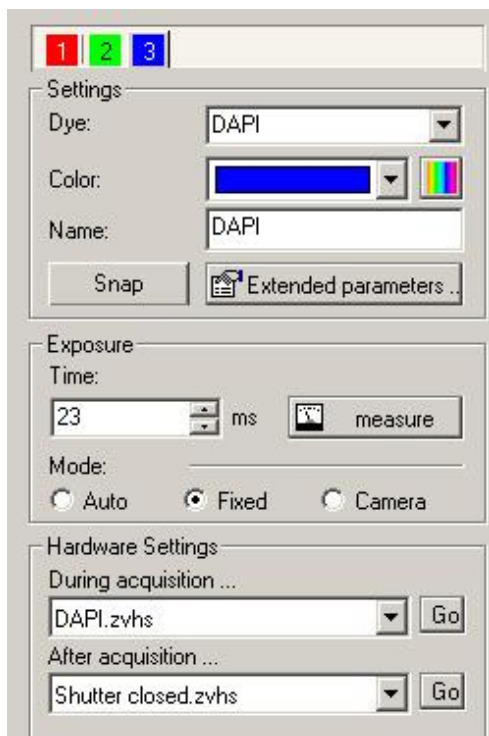
Ø 为用户的实验添加新通道。单击  上的 Extended Channel Parameters 对话框，则一个用户配置好的通道的复件添加到该实验中。



Ø 然后改变新通道相关的设置（通道名字、染料、取图时的硬件设置、曝光时间等等）：



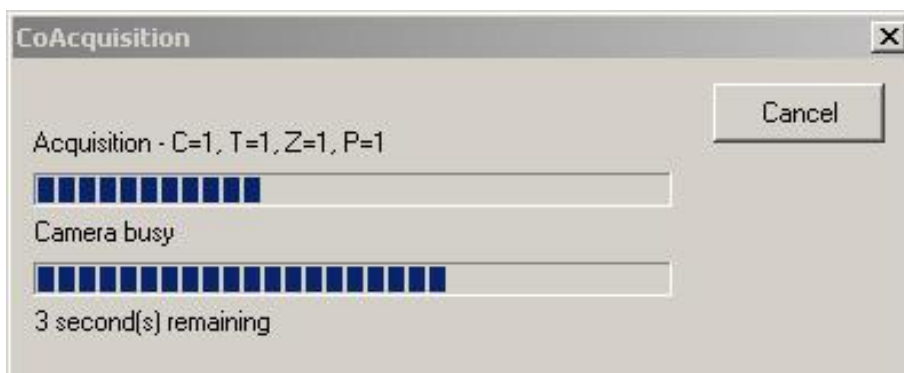
Ø 复制第二个通道，按DAPI染料改变其设置：



Ø 用同样方法可以添加多达8个通道。

Ø 接着可以把用户进行的设置保存为一个新的实验（见上），一边将来使用。

Ø 单击 **Start** 即可获取3通道图象。取图过程中有一个进度条显示

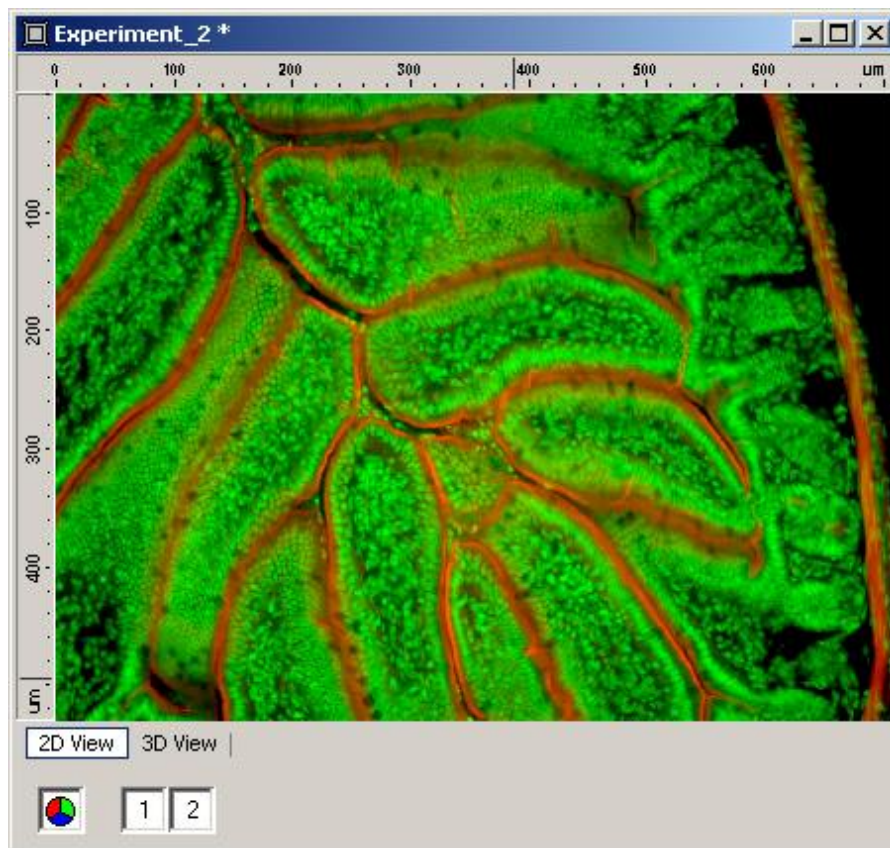


操作进度：

Ø 如果要取消该操作，则单击Cancel。



Ø 生成的图象显示在图象区，在这里可以用播放器对它进行操作：



该图象还未被保存，这时可以看见图象名字是\*号。保存图象。系统自动记住最后搜索的保存目录。

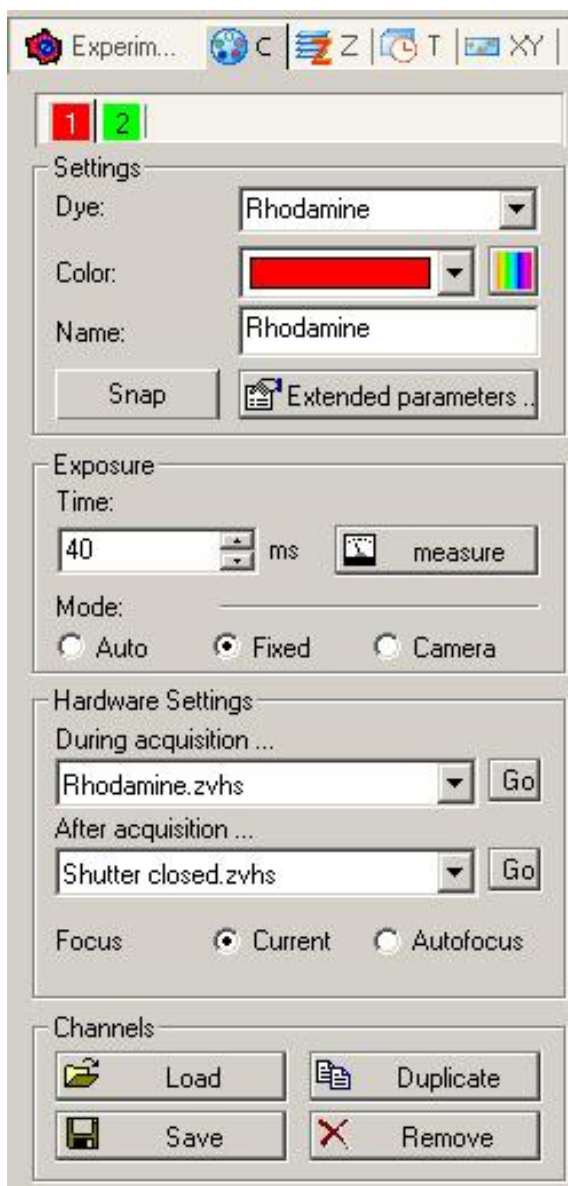
如何管理通道设置（使用通道库）？

上面介绍了如何为多通道图象配置通道和把它保存为实验。这样，一个实验包括该实验的特定设置。用户会逐渐发现通道设置可以应用于许多不同情况。用户可能还希望合并来自不同情况的通道，通道库就是为这个目的而创建的。下面介绍如何使用通道库。

注意：

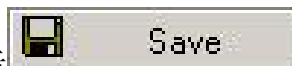
n 下面的说明需要使用电动显微镜。用户系统的可用硬件组件可能会与本例中不同。用户必须能生成、保存和加载实验，并已经创建了一个多通道实验。

Ø 加载一个可用的多通道实验。在本例中加载了一个3通道实验（Rhodamine/FITC/DAPI）。进入Channel属性页可以看到，例如，下列通道参数：






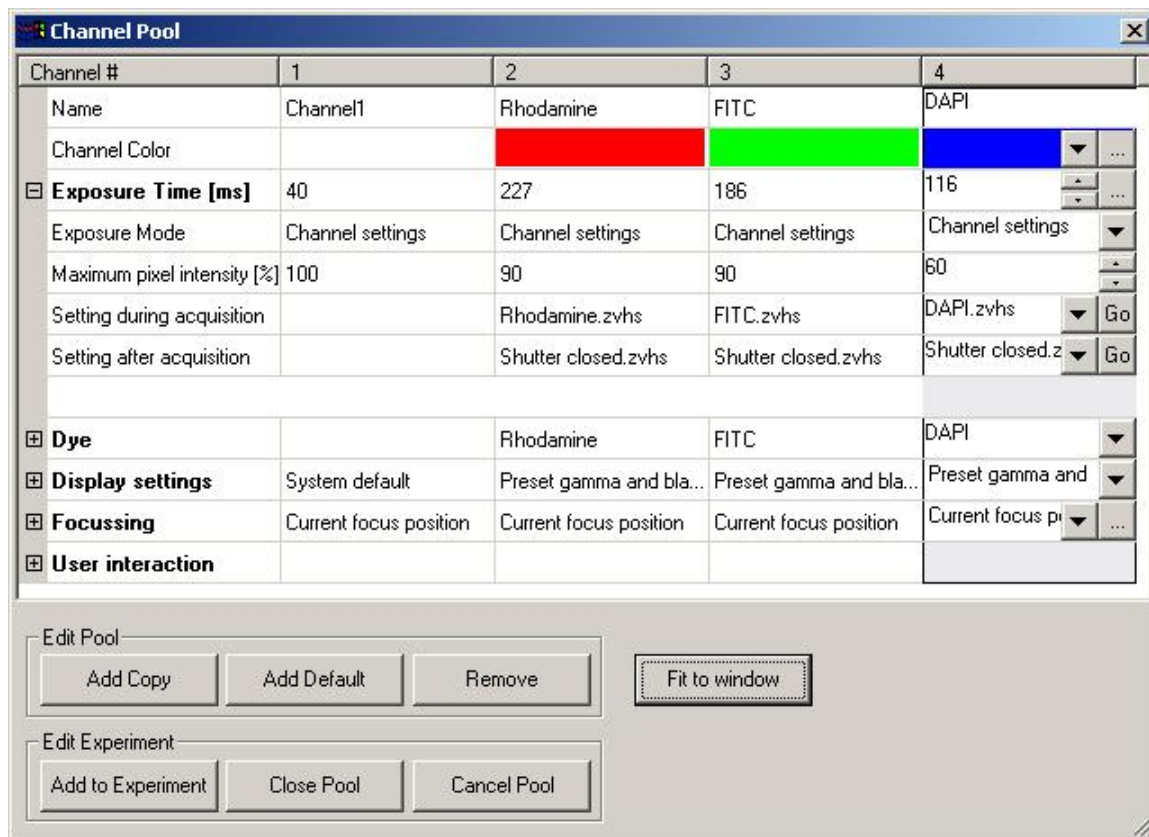
Ø 选择Rhodamine通道：在Channels区域单击



Ø 对另一个通道重复上述操作。

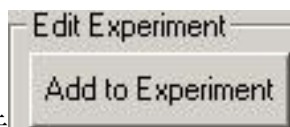
Ø 然后反复单击  以从实验中除去通道。C（通道）属性页现在应只包括一个通道。

Ø 单击  键，通道库作为一个新的对话框打开：

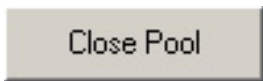


该对话框的大小可以改变，以保证足够的空间来处理通道参数。

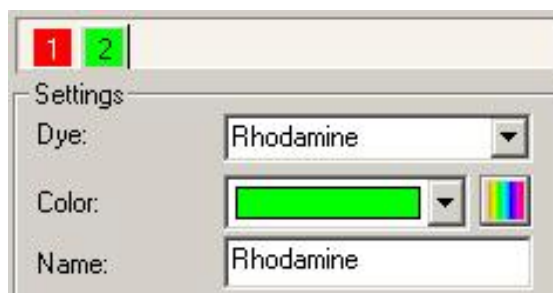
Ø 选择Rhodamine通道



.....并单击 **Add to Experiment** 键把它添加到空实验中。单击



**Close Pool** 关闭通道库，同时该通道显示在C属性页：



Ø 重复上述步骤以添加另一个通道。

Ø 在通道库中也可以通过选择目的通道并单击相应按键来复制、修改或者去除通道。

## Z-Stack 模块

利用Z-Stack模块可以在预定的Z焦距范围内获取一系列图象，得到的图象就是一个z-stack。在计算3维显示时需要用到这种图象。

Z-stack是3D去模糊模块所必需的。ApoTome模块也得益于z-stack图象，因为它们可用于快速生成令人印象深刻的3D图象。使用扩展焦距模块可以从z-stack计算得到清晰的图象。

如果要达到物镜的最大轴向分辨率，AxioVision的Z-Stack模块可以轻松确定z-stack各个图象间的正确距离。最佳的步进大小（也称为Nyquist 标准）是物镜的数字光圈和记录波长（对于荧光通常是最大发射波长）的函数。它的计算如下：

轴向分辨率 $d$ 由下面公式近似得到：

$$d_{axial} \approx 2 \frac{\eta \lambda}{N.A.^2}$$

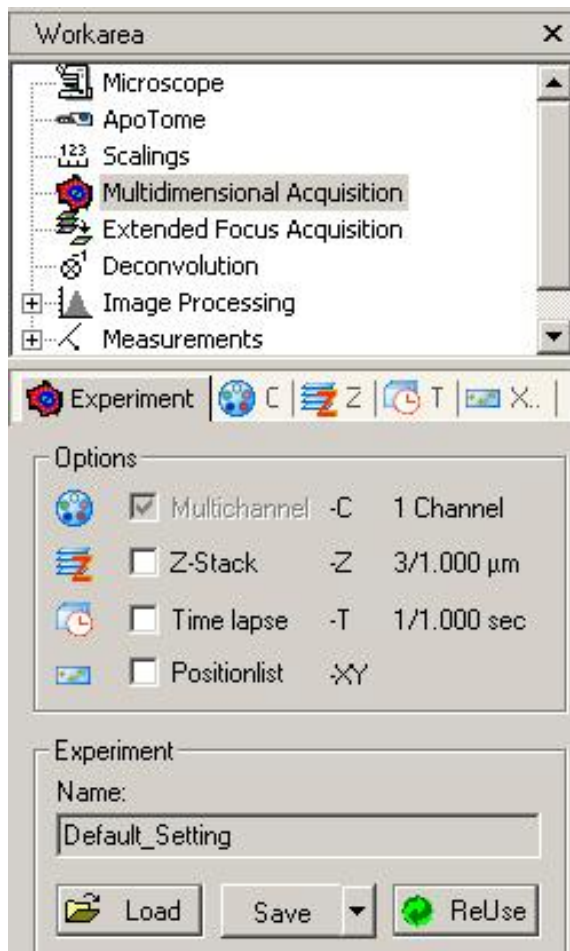
在给定的波长 $\lambda = 540 \text{ nm}$ 和数字光圈 $N.A. = 1.3$ ，折射系数 $\eta$ 为1.52的情况下， $d_{axial} = 0.970 \text{ }\mu\text{m}$ 。根据Nyquist两倍的过量采样（相邻Z平面之间距离大约485 nm）即可采集到所有可用信息。这个采样定律仅适用于用AxioVision 3D-去卷积模块进行z-stacks重建时。

注意：

- n 请注意用户的系统不一定具有这里所描述的所有模块和功能，这取决于用户所购买的选配件。请先参阅“如何创建实验”中关于“实验”的文档。
- n 关于各个功能和命令的详情请参见在线帮助（F1键）。

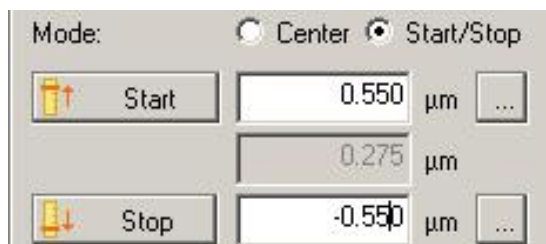
如何创建一个 z-stack?

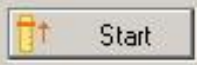


Ø 在工作区激活Multidimensional Acquisition下的属性页。

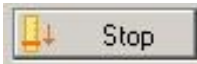





Ø 在Experiment属性页选择（Z-Stack）功能 。

Ø 从两个可能的定义模式中选择Top/Bottom模式：






Ø 单击控制元件  Start  μm  中的  键，打开一个包含实时图象和调焦控制元件的对话框。请注意只有当光被手动引导到样品上或者对于选定的通道已经配置了硬件设置时，光才会照到样品上。在显微镜上聚焦到z-stack开始的区域。单击OK关闭该对话框，新的Z轴位置自动调用到开始区域。



Ø 使用  Stop  μm  控制区的  键重复上述步骤以确定Stop位置。

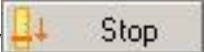
Ø 定义各个Z-平面之间的距离。在这里可以输入任何值。单击  Optimal distance 以保证最大的Z轴向分辨率。考虑物镜的数字光圈和荧光团的发射波长后，计算出正确的值（如果从列表中选定了荧光团则该步骤会自动进行）。如果没有指明发射波长，将采用500 nm波长作为基础。


Ø 用户可以通过z-stack导航功能快速浏览z-stack来检查设置是否正确。打开一幅实时图像，激活目标通道的硬件设置（例如在通道页上面

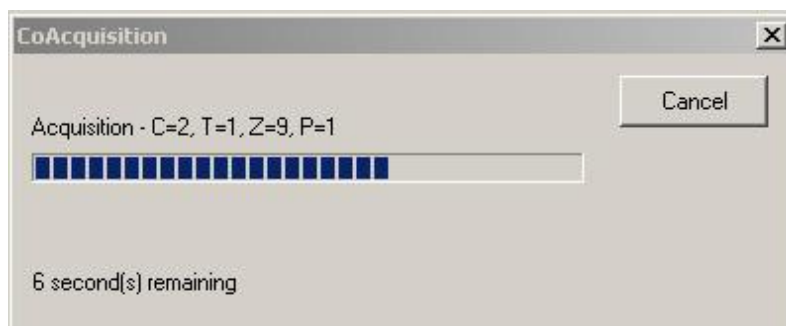


Ø 然后就可以把聚焦驱动调到已定义的z-stack的上 、下  或者中心  位置。

Ø 如果对已定义的z-stack不满意，用户可以用键或者键按已设定的步进逐步调节。单击z-stack设置控制区里的

 **Start** /  **Stop** 键即可调用新的定义。

Ø 单击  **Start** 开始取图。取图进度通过一个进度条显示：



单击Cancel即可取消取图。

Ø 生成的图像显示在图像区，在这里可以用播放器对它进行操作。该图像还未被保存，这时可以看见图象名字是\*号。保存图象。系统自动记住最后搜索的保存目录。

## 时序模块

时序模块可用于获取一定时间内的一系列图像，生成的图像就是一个时间序列，可用于分析随时间变化的过程。

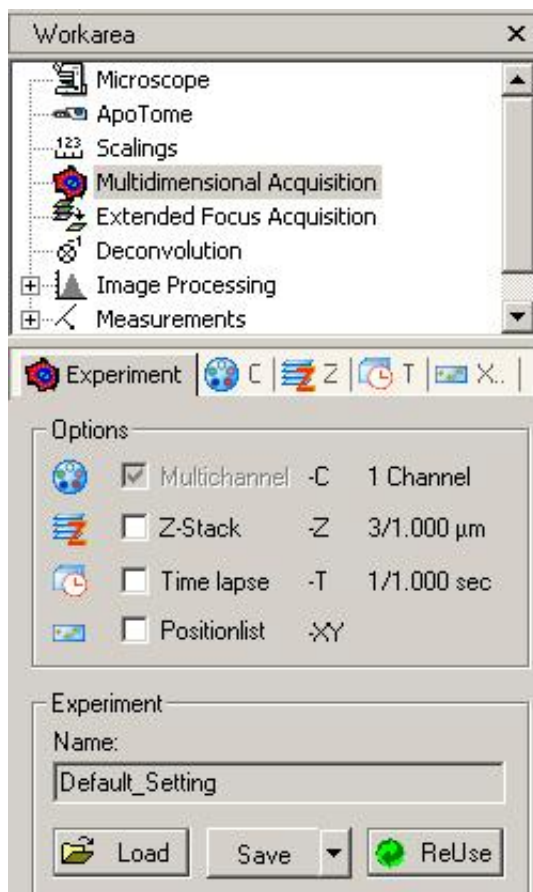
注意：


n 请注意用户的系统不一定具有这里所描述的所有模块和功能，这取决于用户所购买的选配件。请先参阅“如何创建实验”中关于“实验”的文档。

n 关于各个功能和命令的详情请参见在线帮助（F1键）。

如何创建一个时间序列？

Ø 在工作区激活Multidimensional Acquisition下的属性页。



Ø 在Experiment属性页选择Time lapse功能 。

Ø 输入需要的时间间隔，例如2分钟。时间单位可以从下拉菜单中选择。

Ø 然后输入想要获取的图像数目（# Cycles）。从这两个数字可以计算出总的实验时间。

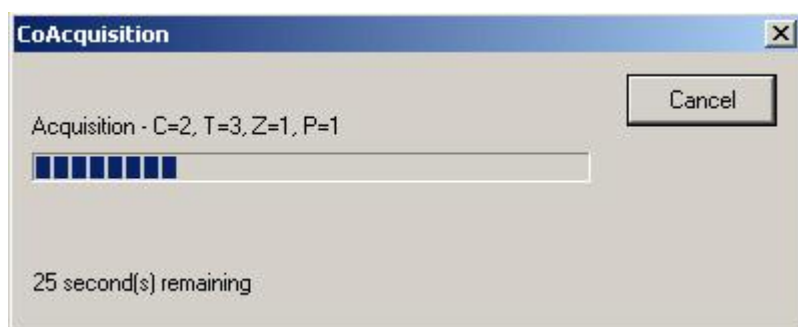
Ø 用户也可以输入时间间隔和总的持续时间，系统会自动计算图像数目。选择需要计算的功能。



Ø 也可以直接在输入区输入数值，然后单击



Ø 单击 **Start** 开始取图。取图进度通过一个进度条显示：



单击Cancel即可取消取图。

Ø 生成的图像显示在图像区，在这里可以用播放器对它进行操作。该图像还未被保存，这时可以看见图象名字是\*号。保存图象。系统自动记住最后搜索的保存目录。

## 高级成像：标记与查找（Mark&Find）

用户可以使用标记与查找模块来获取样品不同位置的图像，同样也可以和多通道成像模块组合。生存的图像可以自动保存在用户指定的文件夹中，并可生成基于该文件夹的存档，这样便于管理各个图像。

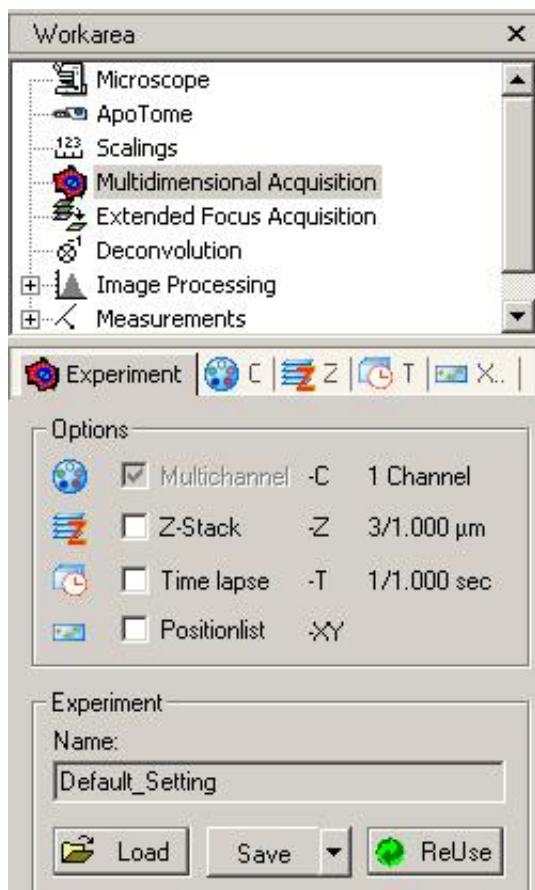


注意：

- n 请注意用户的系统不一定具有这里所描述的所有模块和功能，这取决于用户所购买的选配件。
- n 请先参阅“如何创建实验”中关于“实验”的文档。
- n 关于各个功能和命令的详情请参见在线帮助（F1键）。

如何创建一个标记&查找实验？

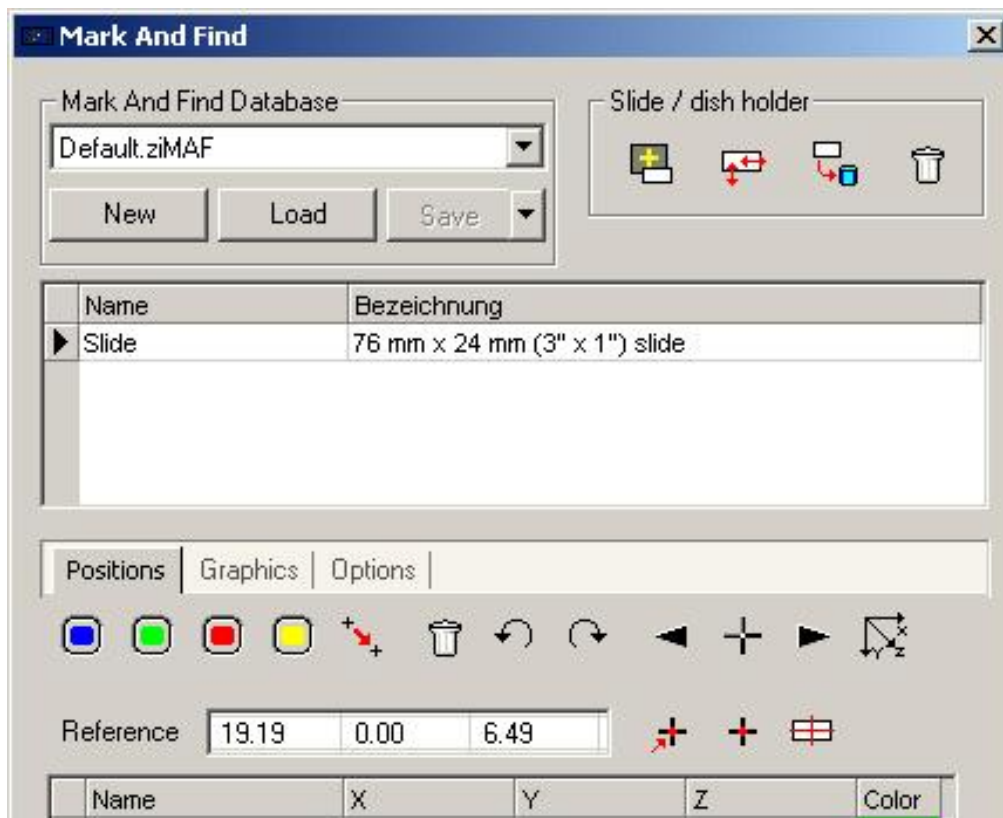
Ø 在工作区激活Multidimensional Acquisition下的属性页。



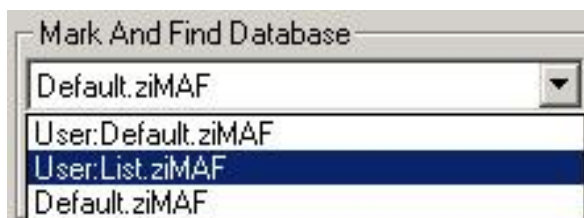
Ø 选定Experiment属性页并加载一个实验。


∅ 选择  属性页

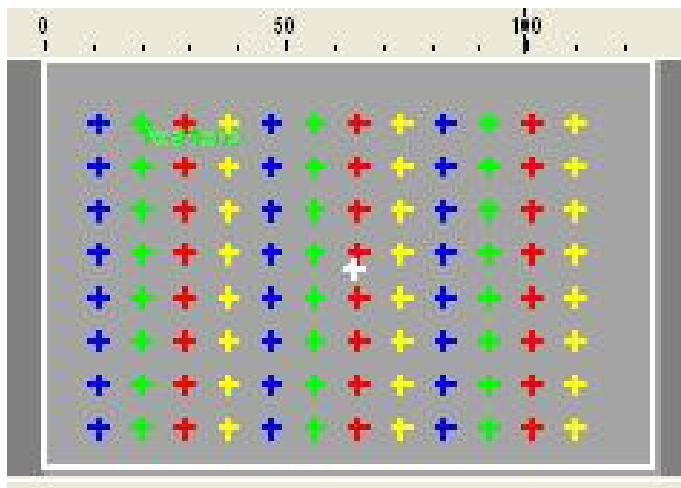
∅ 单击  打开标记与查找对话框。



∅ 从下拉菜单中加载一个标记与查找数据库，或定义一个新列表（请参见10.5节“标记与查找”–“如何创建一个标记与查找列表?”，或者查阅在线帮助（F1键））。



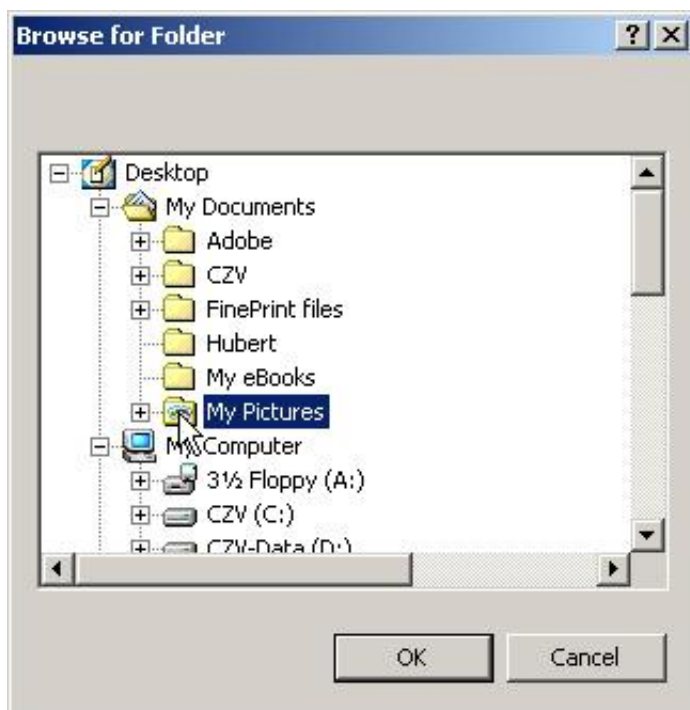
∅ 标记与查找控制元件将显示选定的列表。如果切换到图形显示（ 标签）则显示位置列表的图示。



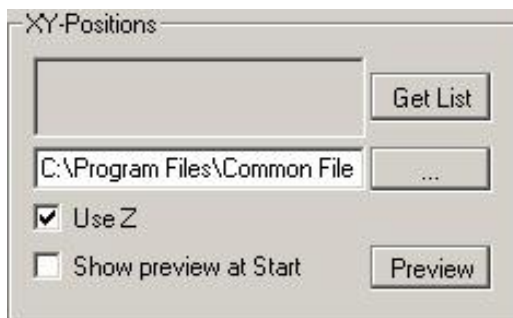
注意:

n 只有当样品参照点和样品固定器中心固定了图示才会正确。请参见 10.5节“标记与查找”-“如何创建一个标记与查找列表?”, 或者查阅在线帮助 (F1键)

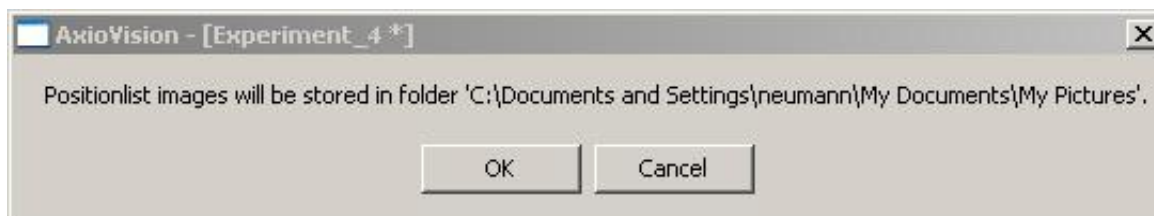
Ø 单击  并选择合适的路径保存图像。单击OK关闭对话框。



Ø 这时标记与查找控制元件也会显示该路径：



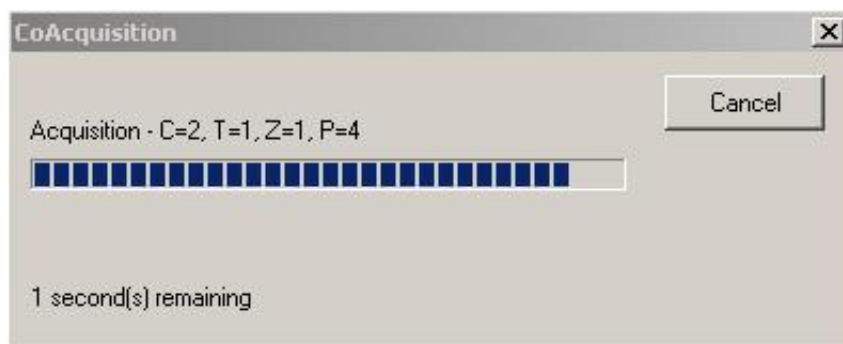
Ø 单击 **Start** 开始取图。开始取图前会有一个对话框再次提示图像保存位置：



注意：

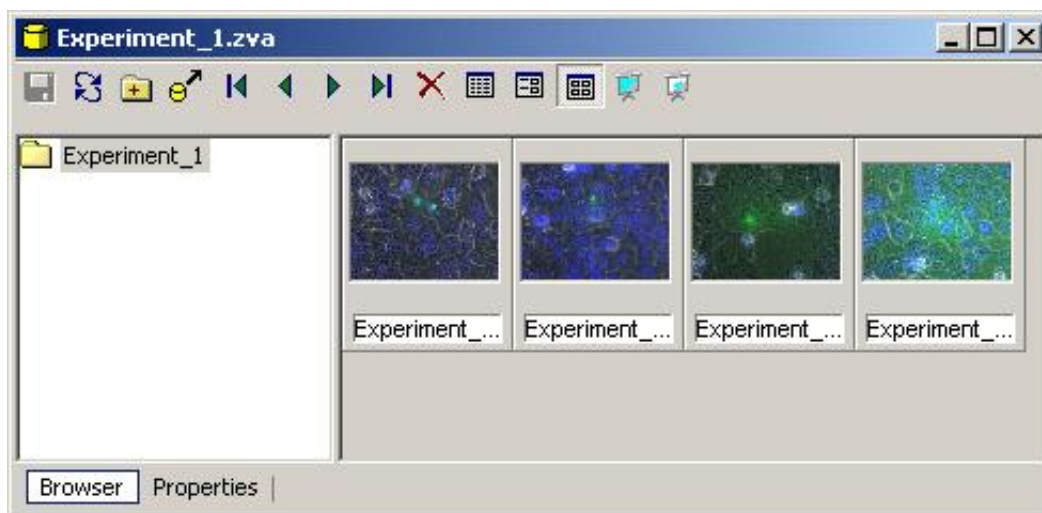
n 请记住该路径和通常取图时所用的路径不同。

Ø 取图进度通过一个进度条显示：



单击Cancel即可取消取图。

Ø 上述操作结束后将创建一个显示所有生成的图像的存档。这些可以象通常的单个图像一样调用和处理。



注意：

n 在获取一个位置列表时不会显示图像。要查看图像需要退出该实验。

## 10.4 扩展聚焦（Extended Focus）


### 概述

扩展聚焦功能是AxioVision的一个选配模块。该功能可以在单个图像中显示样品不同聚焦位置的清晰图像。

本质上扩展聚焦模块是互动操作的，并且不需要电动显微镜。在不同焦距获取若干张图像，然后提取其中清晰的部分并自动合并得到一张清晰的二维图像，而不同焦距的各个图像则不被保存。焦距在整个Z范围内手动调节以使所有细节都清晰显示。对于需要取多少张图像和两个焦距之间的距离多大没有任何规定或公式，这始终取决于具体的样品。一般说来，多比少好。

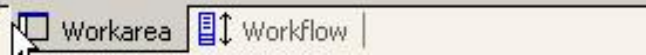
或者，某一区域的扩展聚焦图像也可以从一个z-stack中计算出来。参见10.8节“z-stack图像”）

### 获取扩展聚焦的图像

扩展聚焦功能可以通过窗口左边的工作区来运行。如果该工作区没有显示，可以通过Standard工具栏激活它 。

或者在View菜单中选择Windows功能然后选择Workarea选项。

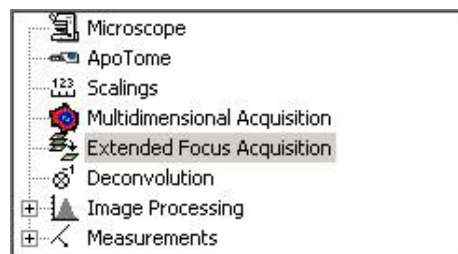
注意：

- n 工作区可能实际上只是被 workflow 挡住了，这时只需要单击下面的 Workarea 标签  即可。

Ø 把光路切换到摄像头，单击 Standard 工具栏上的实时图像图标打开实时图像窗口。或者从 Acquisition 菜单选择 Live 功能。

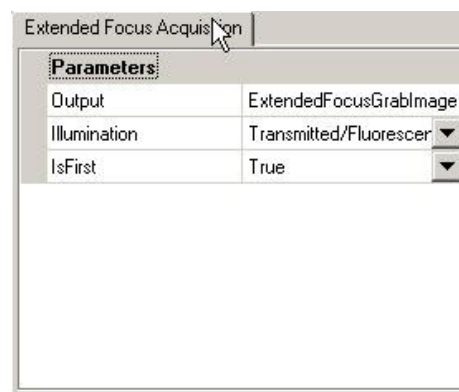


Ø 在工作区选择 Extended Focus Acquisition。



Ø 选择 Illumination。

Ø 确认 IstFirst 参数的 True 设置处于激活状态。



注意：

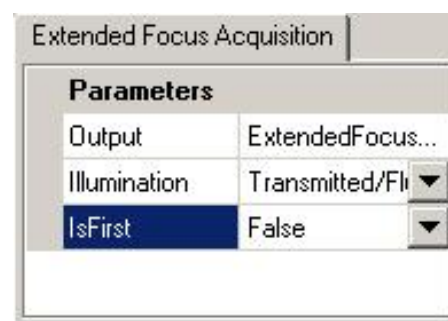
- n Yes 将创建一幅新图像，已存在的将被覆盖。

Ø 单击 Start 开始获取第一幅图像。



Ø 然后进行下一个位置的图像获取。

Ø 确认 IstFirst 参数被设为 False（通常第一幅图像获取后就自动设为 False 了）。



Ø 单击 Start 获取下一张图像。

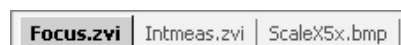


注意：

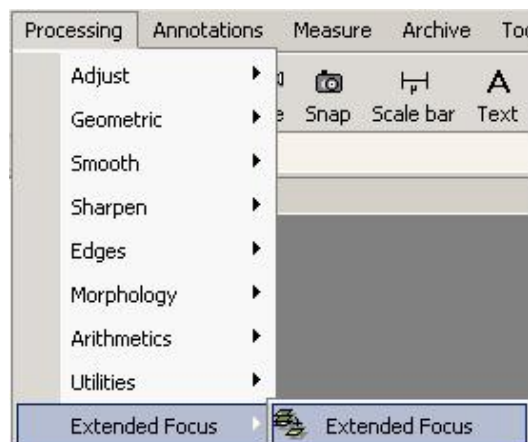
- n 第二个焦距的图像自动和第一张合并。
- n 可以继续获取图像直到满意为止。
- n 如果结果不满意，还可以尝试其它类型的光照，很多情况下结果会得到改善。

## 在扩展聚焦中使用 z-stack 图像

Ø 单击图像或文档顶部的标签，激活想要应用扩展聚焦功能的图像。



Ø 然后从Processing菜单选择Extended Focus功能。



Ø 两个缩略图分别显示原始图像（左）和生成的图像（右）。

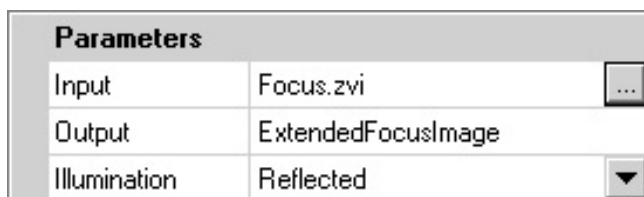


用户可以缩小缩略图或者从中选择任何区域放大。





Ø 选择Illumination.



Ø 单击Start来检查结果。



Ø 然后单击Close退出。

## 10.5 标记与查找

### 概述

标记与查找模块可以记录电动的或者编码的显微镜台的位置。定义位置之后可以重新把镜台定位到原来的位置。

通过Microscope Mark&Find菜单打开标记与查找功能。

已定义的位置保存在数据库中。一个数据库可以包括若干个样品，用户可以从已定义的标准样品大小中选择，也可以自己定义。有两种类型的样品：矩形的载玻片和圆形的petri皿。可以使用76 mm x 24 mm (3"x1")，76 mm x 50 mm (3"x2")，48 mm x 25 mm，48 mm x 27 mm 或者用户自定义尺寸的载玻片。Petri皿的直径可以是35 mm，60 mm或者用户自定义。

为了以图示方式显示，必须先根据样品在x/y镜台上的位置定义其中心位置。如果还希望能在镜台不一样的其它显微镜上使用已定义的位置，就必须使用绝对镜台位置（参阅在线帮助Microscope菜单，F1键）。

同样也可以通过定义一个尺寸和多孔板一样的样品（输入“载玻片”）来保存多孔板的位置。多孔板的孔位置是规则的，因此可以从其它程序（如Microsoft Excel）生成的文本文件中导入位置列表。这种文档的结构如下：

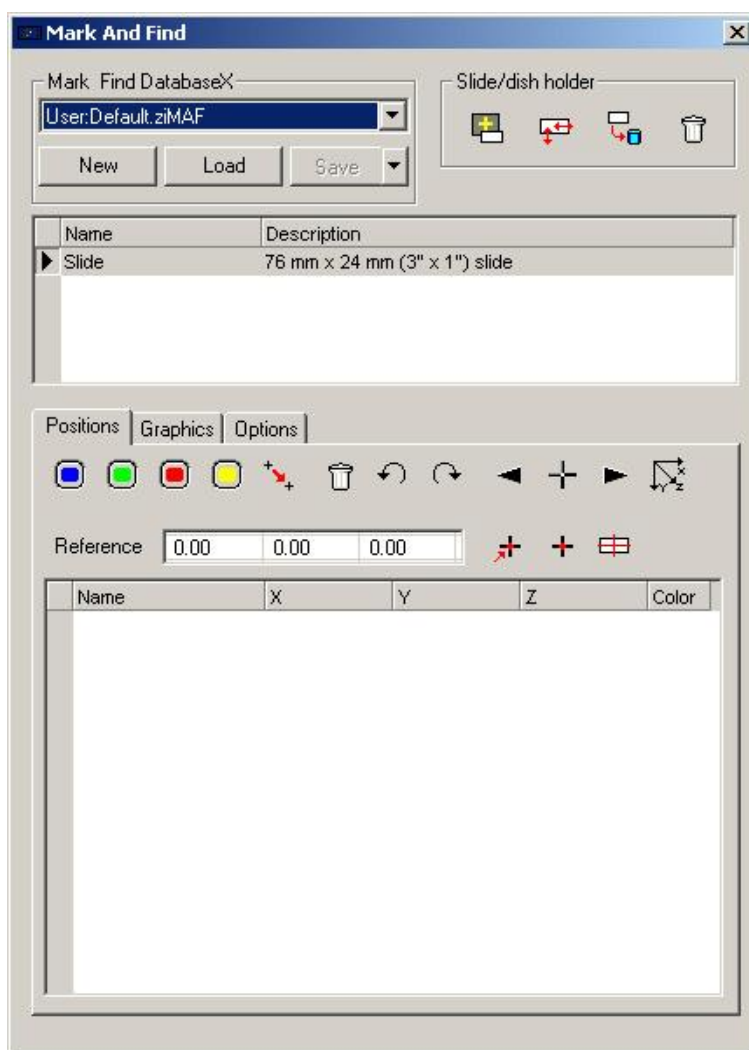
```
Slide, , ,
Name, Width, Height, ,
Slide, 76000.00, 24000.00, ,
Positions, , , ,
Comments, PositionX, PositionY, PositionZ, Color
"Position(1) ", -11058.36, -4043.66, 1.00, Blue
"Position(2) ", -2382.21, 5485.68, -1.55, Red
"Position(3) ", 10049.20, -4067.70, -2.25, Green
"Position(4) ", 3674.27, -1514.12, 3.00, Yellow
```

文档必须保存为CSV文件（值用逗号分开）以使标记与查找模块能够理解。如Microsoft Excel中就这样的输出选项。

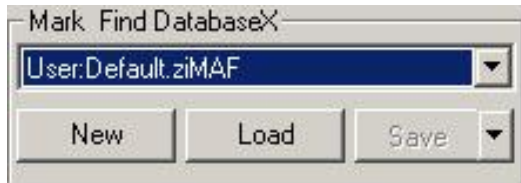
## 如何创建一个标记与查找列表？

在下面的例子中将生成一个新的数据库，并为常规的显微镜载玻片保存4个位置。为了便于生成正确的样品图示，需要把载玻片中心定位。此外，还要在载玻片上确定一个参照位置。本例中位置坐标将以载玻片中心为参照来确定。

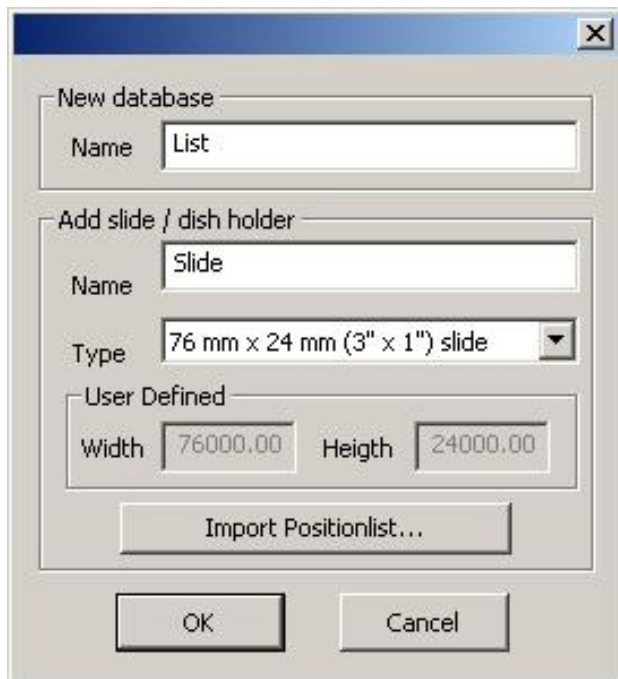
Ø 通过菜单命令Microscope Mark and Find打开标记与查找窗口。



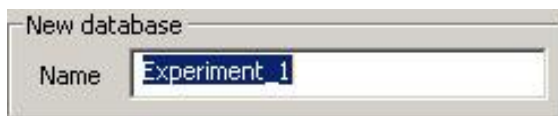
Ø 单击New键创建一个新数据库（Mark and Find Database）。



Ø 下列对话框打开：



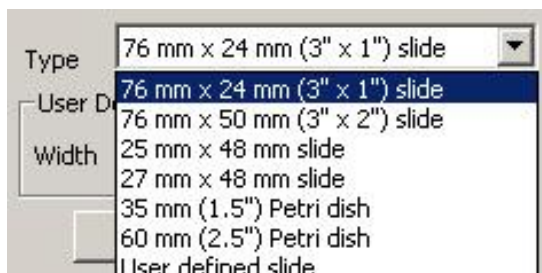
Ø 输入一个新的数据库名字，例如“Experiment\_1”。



Ø 命名新样品，例如“slide\_1”。



Ø 从下拉菜单中选择标准“3"x1" slide”：




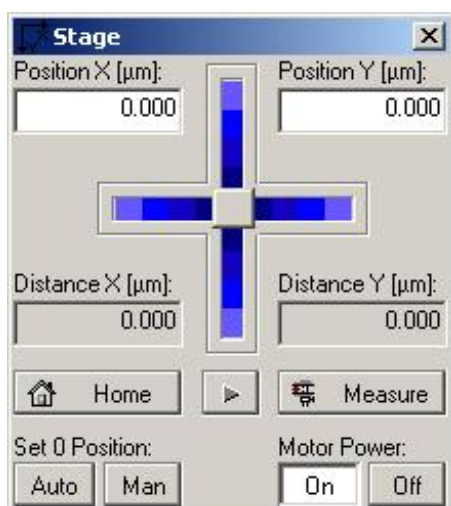
Ø 单击  确定。


Ø 在Mark&Find对话框的样品列表中将会出现一个新条目：

Name	Description
Objekträger_1	76 mm x 24 mm (3" x 1") slide

Ø 把随镜台配的标准载玻片（“Home slide”，Carl Zeiss序列号453583）放进显微镜的载玻片固定器。该载玻片具有精确标记的中心和精确切割的边缘，便于和载玻片固定器对准。


Ø 移动镜台，使该载玻片的中心标记处于视野的正中间。单击  键打开镜台控制窗口。

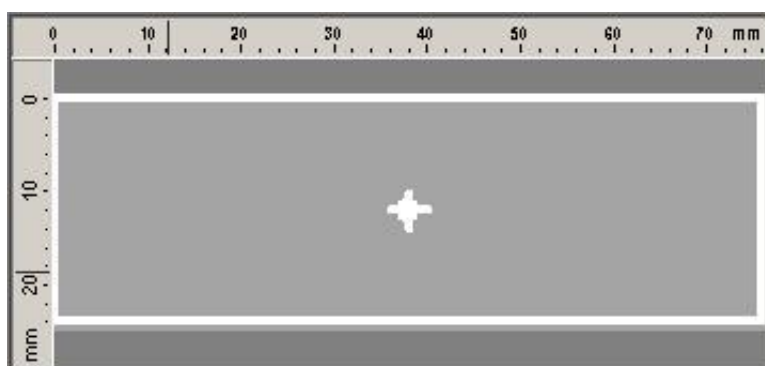


Ø 单击  键手动把镜台位置调到0。

Ø 在标记与查找窗口中切换到图示视图：




Ø 然后单击  定义玻片中心。这时玻片图示如下：

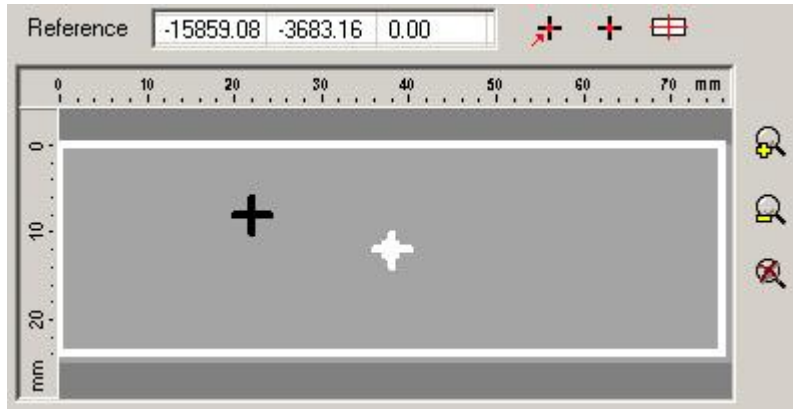


Ø 白色十字标明了相对显微镜光轴的镜台实际位置。

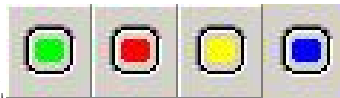
Ø 取下标准载玻片，把用户的载玻片放进样品固定器。

这时可以看到样品上有显著的标记，便于以后再次定位。单击

，在图示中出现一个定义参照位置的黑色十字。同样也可以看到用  $\mu\text{m}$  表示的x, y和z坐标。

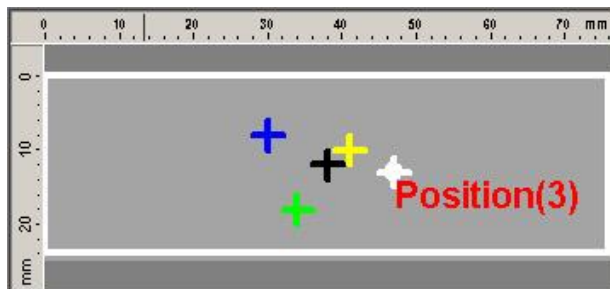


Ø 完成上述准备工作后，将镜台移动到感兴趣的位置（最好参考实时图像）。单击一个彩色位置键，保存该位置。重复操作直到所有感兴趣的位置都已经保存。四种颜色

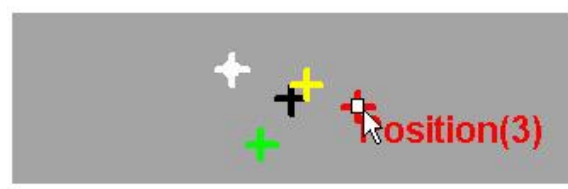



可以区分样品的不同区域（例如根据细胞类型）。

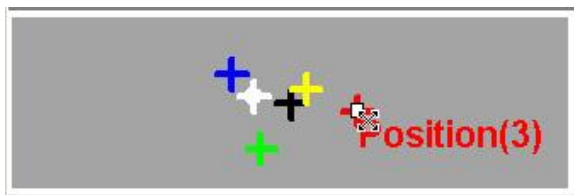
Ø 选定的位置以彩色十字显示在图示上。白色十字代表当前选定的位置，并显示其名字和编号。



Ø 然后用户可以通过单击选中某个位置来视镜台重新定位到该位置：



单击  键把镜台移动到选定的位置，也可以双击某一位置来移动镜台。白色十字将移动到新选择的位置，表明镜台已经移动了：



单击数据库区域的  键来保存这些位置。

现在已经成功地创建了一个位置列表，该列表可在将来任何时间再次查找用户样品上感兴趣的位置，也可用于多维取图（Multidimensional Acquisition）如时间序列实验。

注意：

n 可以通过组合键来添加位置。相应的命令在菜单 **Microscope Mark And Find Positions** 中：

添加蓝色位置： Alt+B

添加红色位置： Alt+R

添加绿色位置： Alt+G

添加黄色位置： Alt+Y



## 11 图像处理模块

### 11.1 高级成像（Imaging Plus）

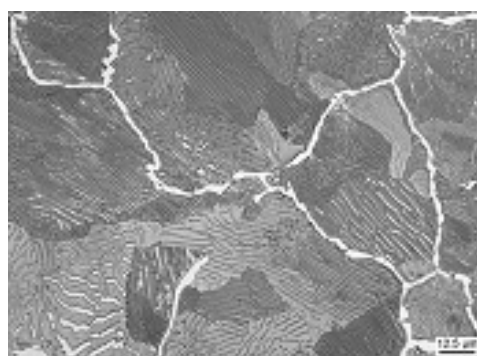
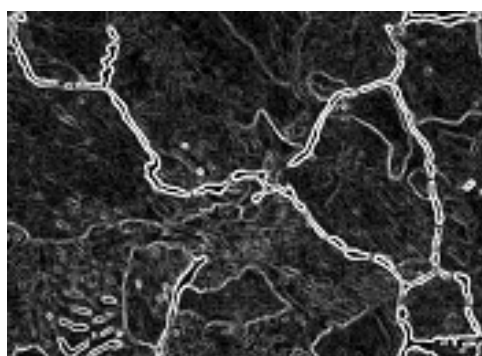
#### 概述

第六章“图像处理”中已经提到，图像处理功能涵盖许多不同的任务。除了传统的校正和优化功能外，还具有第三个功能：数据提取。例如：把目标结构显示为高亮，使图像更易于观察；或者有目的地检测目标以便以后能进行测量。

高级成像模块通过在基本程序的基础上增加以下功能和功能组来扩展图像处理功能。

#### 图像增强

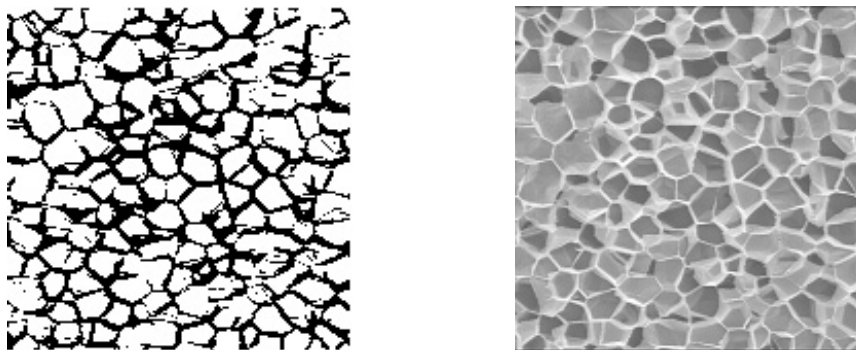
增加了增强对比度、亮度、色彩功能以及用户自定义的平滑、锐化、边缘检测等滤镜操作。



用Sobel滤镜进行边缘检测。

## 灰度形态（Gray morphology）

灰度形态功能可以重构相连物体的边缘。



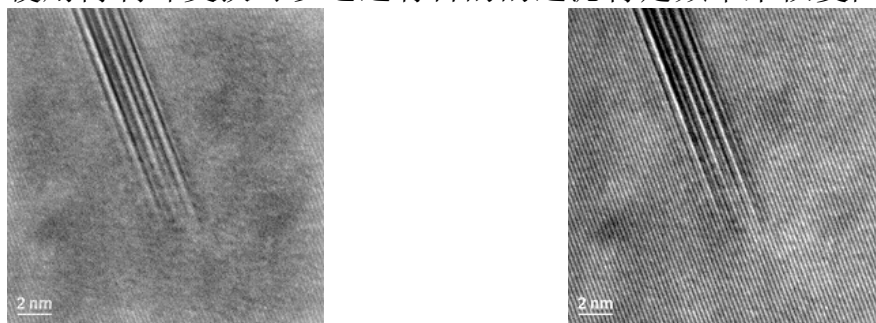
通过重构粗糙的图像边缘，能对图像进行自动测量。

## 图像运算（Image arithmetics）

利用图像运算器功能，AxioVision可以组合、比较图像，并提取相关信息。

## 傅利叶变换（Fourier transformation）

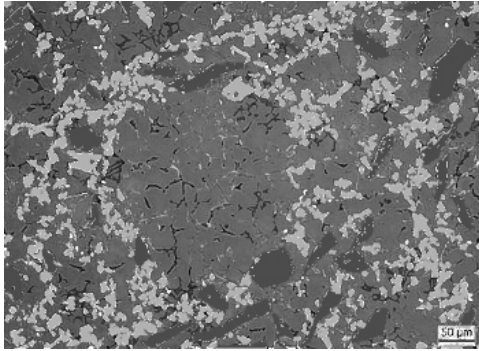
使用傅利叶变换可以通过有目的的过滤特定频率来恢复图像。



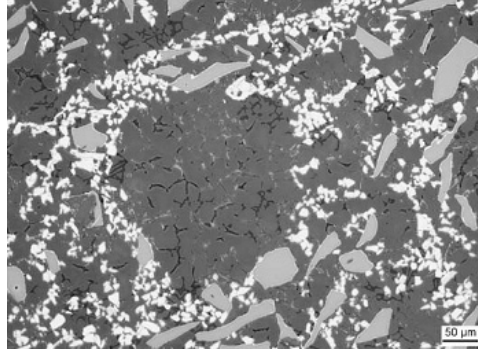
例如：通过傅利叶变换，可以有目的的删掉（右图）正弦冗余值（左图）。

## 颜色空间切换（Color space transformation）

颜色辨别功能可以更有效的基于颜色来区分物体和图像背景。这项功能能更好地区分不同类物体。



混合材料的明场图像，PtOx对比。



不同两相的杂色叠加。

## 使用图像处理功能

第六章“图像处理”中讲述了高级成像模块各项功能的基本工作方式。

其中还含有图像处理、存储等功能的相关背景资料。建议把该章作为应用高级成像功能的基础。具体各项功能和相关参数的描述请参照在线帮助。

下列例子中各项步骤可以用原始图像练习。图像样本安装在AxioVision文件夹中，默认的该文件夹路径为：**C:\Program Files\Carl Zeiss Vision\AxioVision\0009\Templates\Images**。

如果该文件夹中没有图像，请从AxioVision Viewer光盘中加载。

## 缩小或放大图像或局部图像

**Resample**功能用于缩小或放大一幅完整的图像或一幅图像中某一任意选定的区域。缩小或放大由缩放系数（**Scale**）定义。当缩小或放大某一区域时，应该指出区域中心（**Shift**）。依据缩放系数（**Scale**），可以调节生成的图像的尺寸（**ForceSizes = On**）。同时，也可以用原始图像的尺寸产生新的图像（**ForceSizes = Off**）。

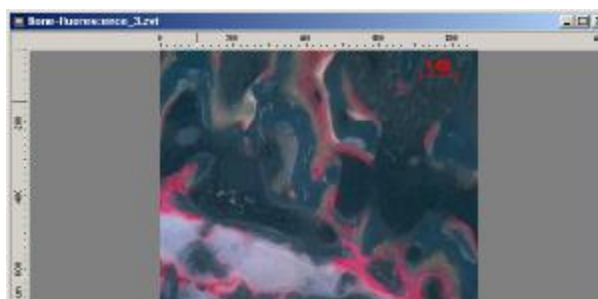
旁边像素的影响也可以考虑在内（**Interpolation**）。

注意：

- n 如果只是简单的想缩小或放大一幅图像而不产生新的图像，可以通过使用图像窗口快捷菜单中的+ **Zoom**和- **Zoom**功能实现。

下例逐步解释如何缩小一幅图像或放大一幅图像的某一区域。

- Ø 通过File Open Image加载图像“Bonefluorescence\_3.zvi”，或者用摄像头获取一幅图像。



- Ø 图像显示在AxioVision图像窗口中。

第一个例子中，加载的图像缩小为原来的1/2。第二个例子中，加载的图像放大为原来的2倍。

从Processing菜单中选择Utilities功能组，再选择Resample功能。

Ø 这时可以看到Resample功能对话框。

Ø 如果Automatic Preview功能被激活，将显示缩小的输入图像。

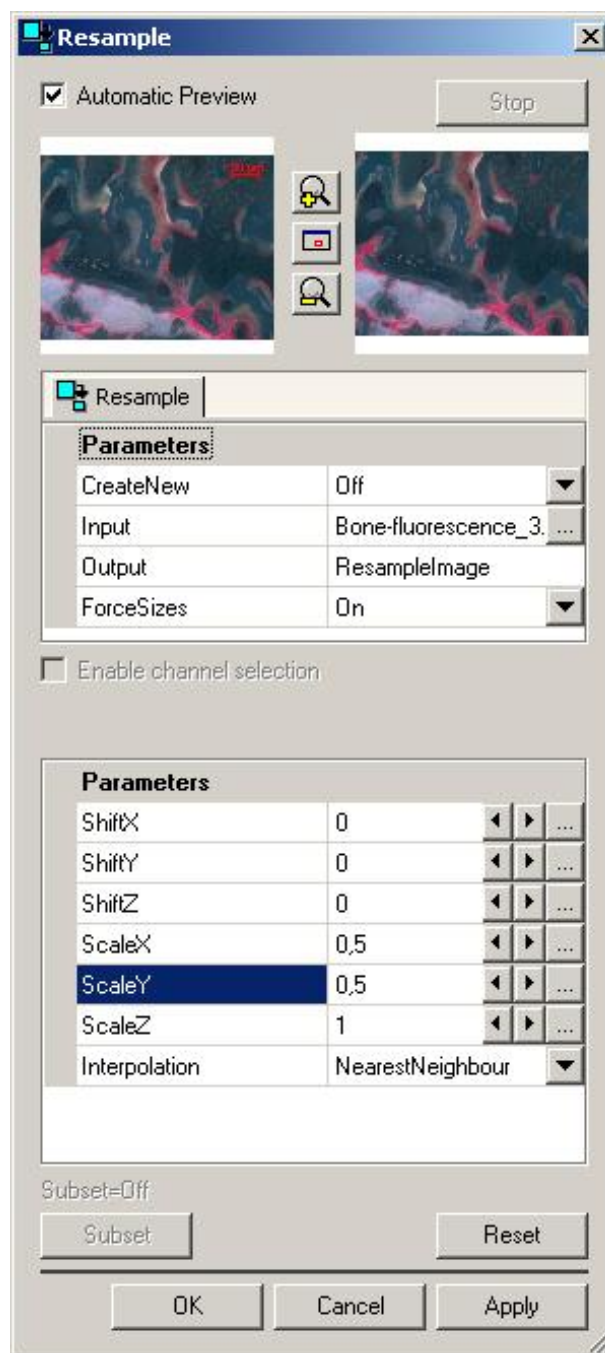
Ø 将CreateNew设置为Off，以便自由选择图像。

Ø 单击箭头键或直接输入下列值进行设置：

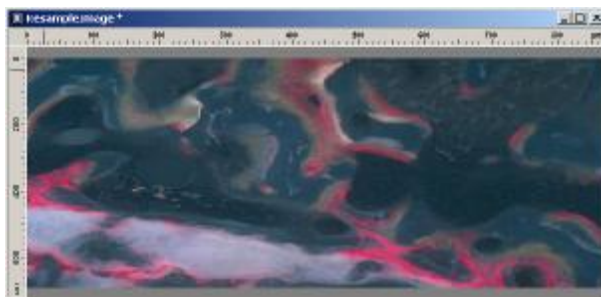
ForceSizes=On, ShiftX=0,  
ShiftY=0, ShiftZ=0,  
ScaleX=0.5, ScaleY=0.5,  
ScaleZ=1, Interpolation=  
NearestNeighbour.

Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。

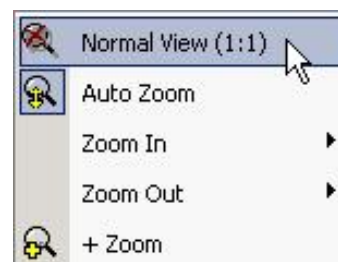
Ø 单击OK关闭对话框。



- Ø 生成的图像包括所有原始图像的结构，但都被缩小为原来的1/2。
- Ø 当ForceSizes设置为On时，图像尺寸被相应调节。



- Ø 将光标指针置于图像上，单击鼠标右键，从快捷菜单中选择Normal View (1: 1)。

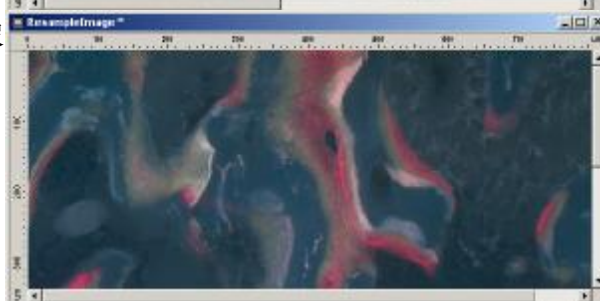


- Ø 对原始图像进行同样操作。
- Ø 比较两幅图片。正常视图下，可以看到两幅图片有明显区别。

原始图像



处理后图像

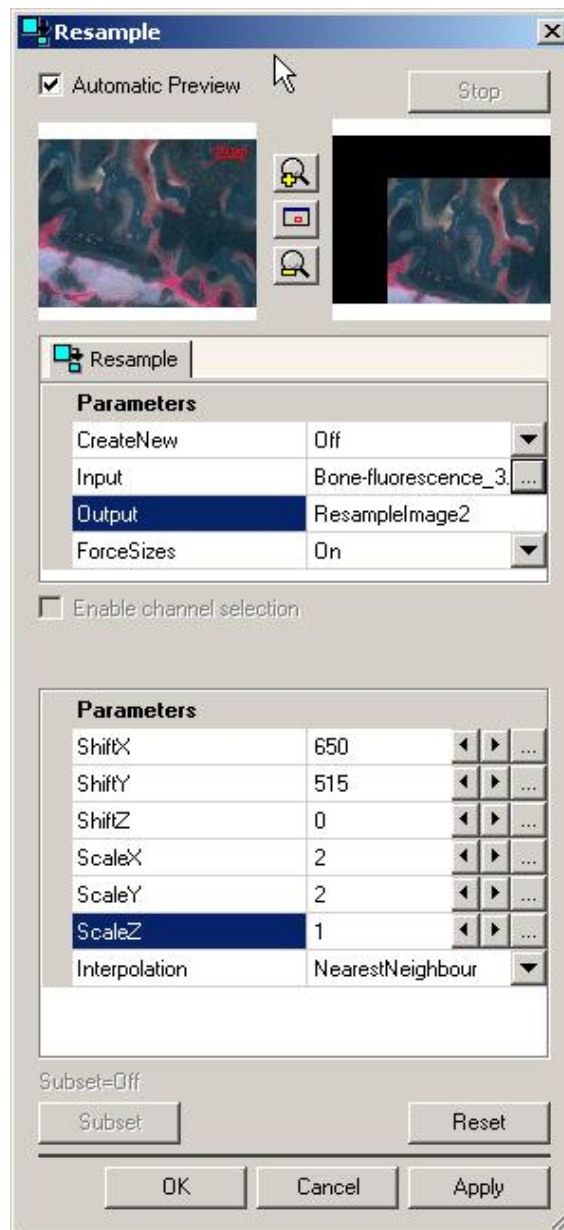


第二个例子：再次从Processing菜单中选择Utilities功能组，然后选择Resample功能。

- Ø 可以看到Resample功能对话框。
- Ø 如果Automatic Preview功能被激活，将显示缩小的输入图像。
- Ø 从Input再次选择原始图像，在Output中指派一个新的图像名。
- Ø 单击箭头键或直接输入下列值进行设置：

ForceSizes=Off, ShiftX=650,  
ShiftY=515, ShiftZ=0,  
ScaleX=2, ScaleY=2,  
ScaleZ=1, Interpolation=  
NearestNeighbour.

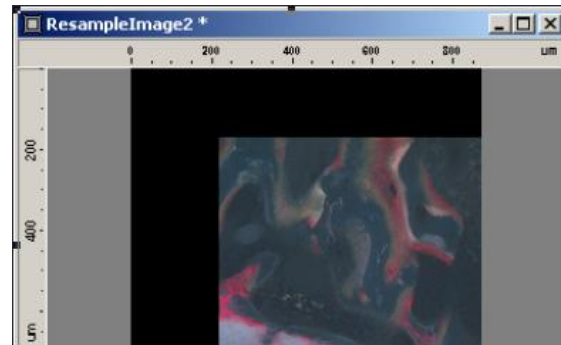
- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。
- Ø 单击OK关闭对话框。



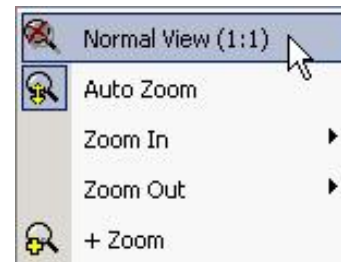


生成的图像仅显示原始图像的左上1/4部分。该区域是由ShiftX和ShiftY定义的。

- Ø 这部分区域现在由缩放系数2定义为原始图像的2倍。
- Ø 由于ForceSizes设置为Off，图像尺寸被保留。



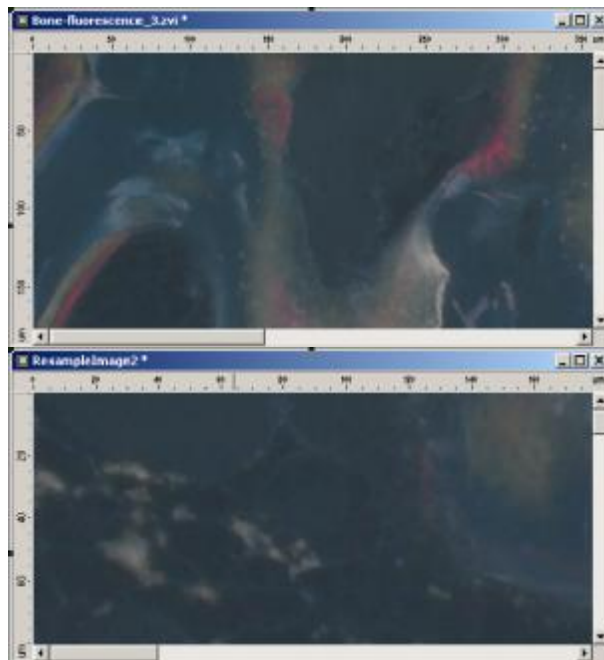
- Ø 将光标指针置于图像上，单击鼠标右键，从快捷菜单中选择Normal View (1: 1)。



- Ø 对原始图像进行同样操作。
- Ø 比较两幅图片。正常视图下，可以看到两幅图片有明显区别。

注意：

- n 若有必要，调节图片结果的显示特征曲线。





## 从同一个图像复制不同的区域产生新的图像

通常，用户只想进一步处理一幅图片的某一特定区域，或者从不同图像、不同图像的不同区域产生一个混合图像。

使用Copy Region功能，用户能从原始图像自由复制区域到新的图像中。原始图片和目的图片（SourceStart, DestinationStart）以及复制的区域尺寸（Size）必须是指定的。如果用户只复制一个区域，目的图片的大小能适合此区域（ForceSizes = On）。然而，用户也可以产生与原始图片一样大小的目的图片（ForceSizes = Off）。

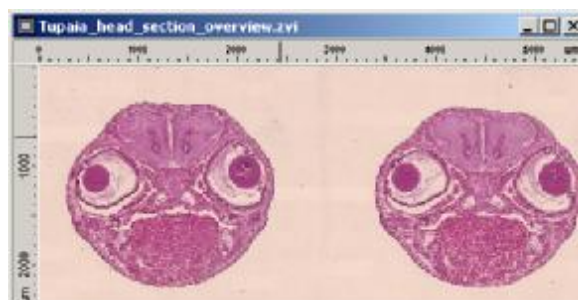
要从不同图片或同一图片不同区域创建一个混合图片，用户需要定义整个图片尺寸（Size, ForceSizes = KeepMaxSize）。然后单个的图片一步一步复制到该图片中来。在复制一个单独的图片时，复制的区域外的部分能在目的图片中被保留（ClearOutside = Off）或删除（ClearOutside = On）。

注意：

- n 如果只想复制一幅图片的某一区域并据此产生一幅新的图片，可以通过Edit菜单里的Select ROI/Copy ROI和Paste功能实现。

下例逐步解释如何复制一幅图片的不同区域到一幅新的图片中。

- Ø 通过File Open Image加载所需的图像“Tupaia\_head\_section\_overview.zvi”，或者通过摄像头获取图像。
- Ø 图像显示在AxioVision的图像窗口。



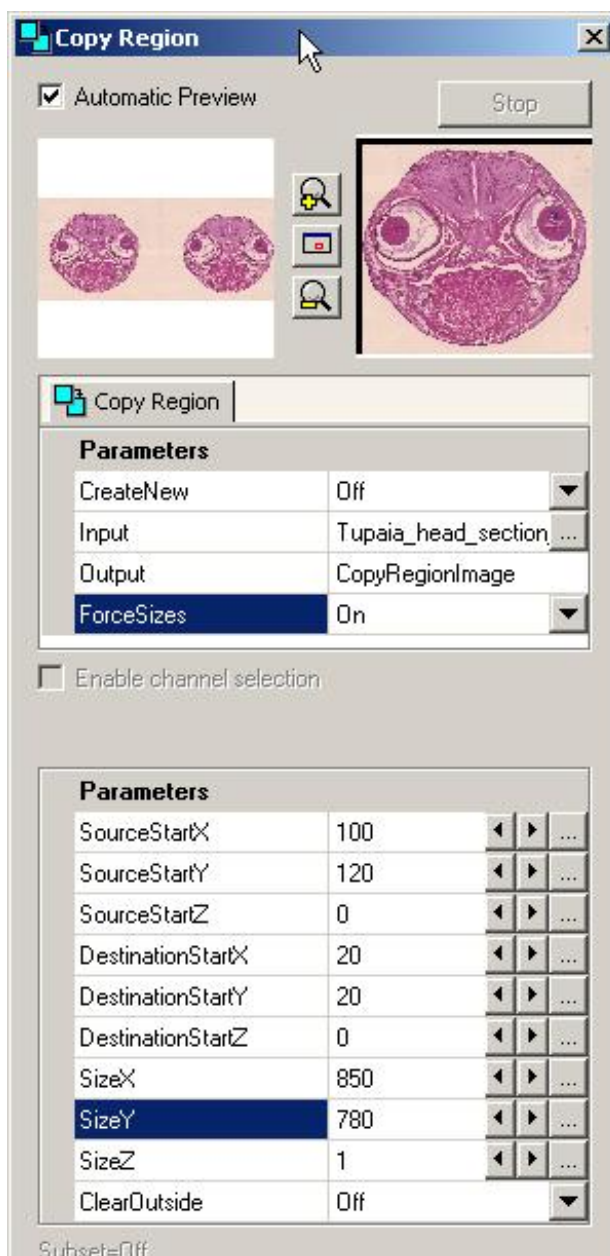
该图像包括穿过胚胎头的两个组织切片。第一个例子中，只有一个胚胎头被复制到新图像中；第二个例子中，两个胚胎头复制到新图像中，并尽可能减少背景。

从Processing菜单中选择Utilities功能组，然后选择Copy Region功能。

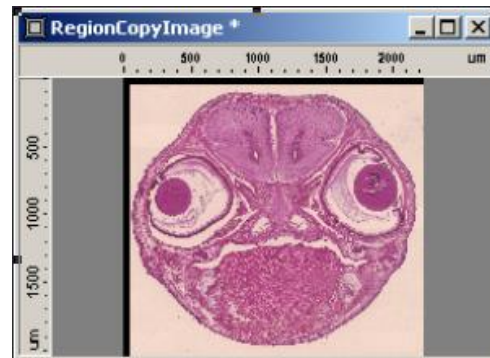
- Ø 显示Copy Region功能的对话框。
- Ø 如果Automatic Preview复选框被激活，则会显示缩小的输入图像。
- Ø 设置CreateNew为Off以便自由选择图像。
- Ø 单击箭头键或直接输入下列值进行设置：

ForceSizes=On, SourceStartX=100, SourceStartY=120, SourceStartZ=0, DestinationStartX=0, DestinationStartY=0, DestinationStartZ=0, SizeX=850, SizeY=780, SizeZ=1, ClearOutside=Off.

- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。
- Ø 单击OK关闭对话框。



- Ø 该例子中，只有一个区域（ROI）复制到新图像中。因此生成的图像只显示第一个胚胎头。
- Ø 由于ForceSizes设置为On，图像大小被调整为指定尺寸850 x 780像素。

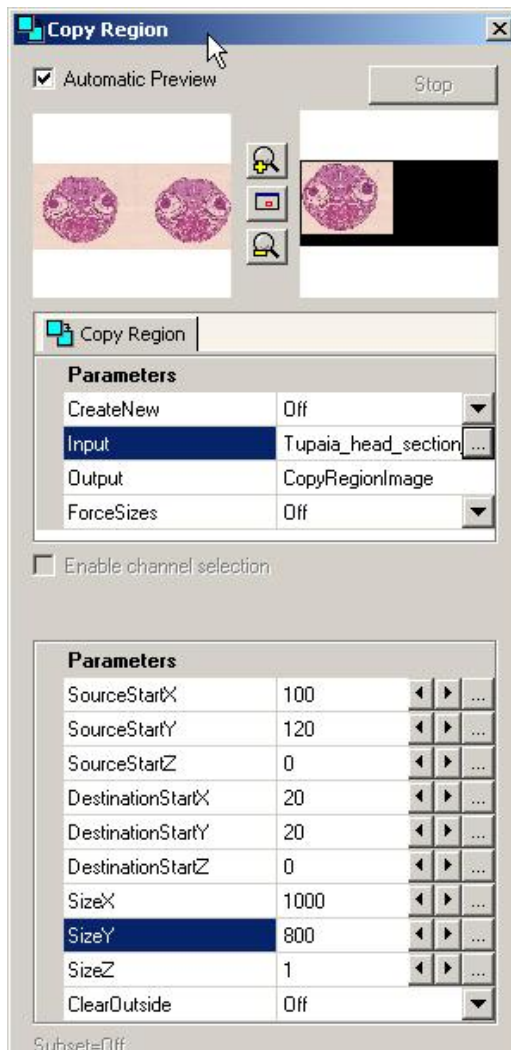


第二个例子中，再次从Processing菜单中选择Utilities功能组，然后选择Copy Region功能。

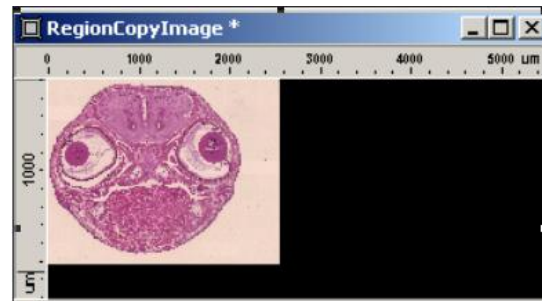
- Ø 现在用户可以看到Copy Region功能的对话框。
- Ø 如果Automatic Preview被激活，则显示缩小的输入图像。
- Ø 在Input下再次选择原始图像。
- Ø 单击箭头键或直接输入下列值进行设置：

ForceSizes=Off, SourceStartX=100, SourceStartY=120, SourceStartZ=0, DestinationStartX=0, DestinationStartY=0, DestinationStartZ=0, SizeX=1000, SizeY=800, SizeZ=1, ClearOutside=Off.

- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。
- Ø 单击OK关闭对话框。



- Ø 生成的图像在左上角显示第一个胚胎头。
- Ø 由于ForceSizes设置为Off，图像尺寸对应于原始大小。图像其余部分为黑色。

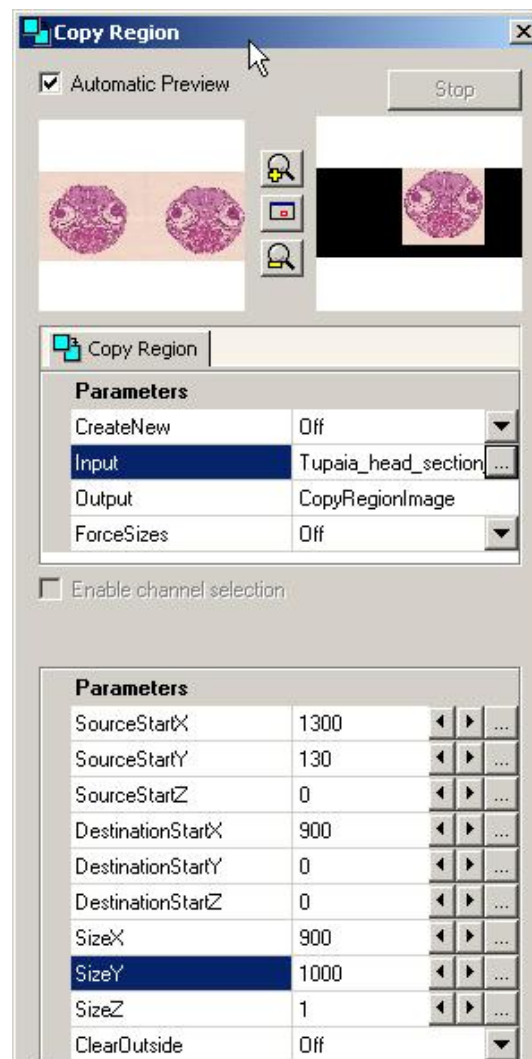


再次从Processing菜单中选择Utilities功能组，然后选择Copy Region功能。

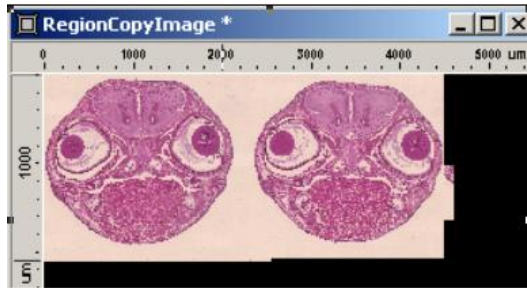
- Ø 现在用户可以看到Copy Region功能的对话框。
- Ø 如果Automatic Preview被激活，则显示缩小的输入图像。
- Ø 在Input下再次选择原始图像。
- Ø 单击箭头键或直接输入下列值进行设置：

ForceSizes=Off, SourceStartX=1300, SourceStartY=130, SourceStartZ=0, DestinationStartX=900, DestinationStartY=0, DestinationStartZ=0, SizeX=900, SizeY=1000, SizeZ=1, ClearOutside=Off.

- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。
- Ø 单击OK关闭对话框。



- Ø 现在生成的图像中能看到两个胚胎头。
- Ø 由于保留了图像尺寸，图像并未完全充满画面，含有一些黑色区域。因此下一步涉及再次剪裁两个胚胎头使其充满整个画面。

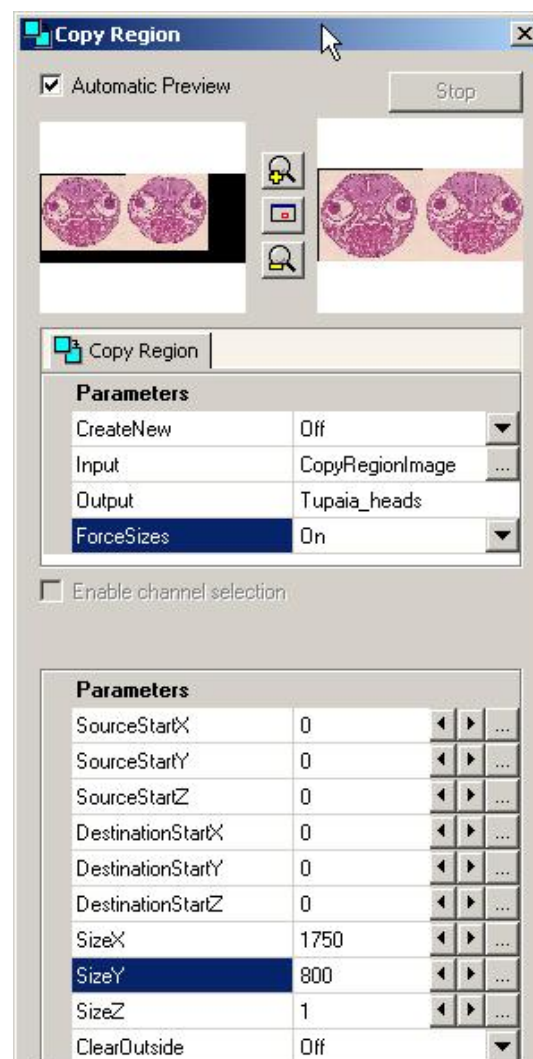


再次从Processing菜单中选择Utilities功能组，然后选择Copy Region功能。

- Ø 现在用户可以看到Copy Region功能的对话框。
- Ø 如果Automatic Preview被激活，则显示缩小的输入图像。
- Ø 在Input下选择刚生成的图像，在Output下重新命名新图像。
- Ø 单击箭头键或直接输入下列值进行设置：

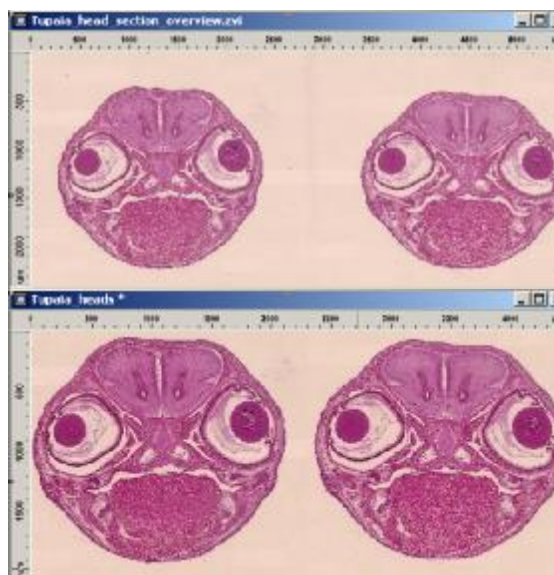
ForceSizes=On, SourceStartX=0, SourceStartY=0, SourceStartZ=0, DestinationStartX=0, DestinationStartY=0, DestinationStartZ=0, SizeX=1750, SizeY=800, SizeZ=1, ClearOutside=Off.

- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。





- Ø 生成的图像在小于原始图像的区域内显示两个胚胎头。
- Ø 由于ForceSizes设置为On，图像尺寸根据SizeX和SizeY进行调整。



注意：

- n 如果有必要，调整生成的图像的显示特性曲线。

## 使用单一的颜色通道

彩色图像含有红、绿、蓝三种单一颜色通道各自的黑白图像。许多情况下只想对某一颜色通道进行图像处理。这意味着用户不得将图像分到单一的颜色通道。这些颜色通道呈现为黑白图像，允许用户独立地对每个颜色通道进行图像处理。将处理后的各个通道合并又能得到一幅彩色图片。

注意：

- n **HLS**模式（色调、亮度、饱和度）更能适合图像处理的需要。在此模式下，图像也能被分成单独的通道。要用**HLS**模式处理图像，首先需使用**Color Model**功能转化到**HLS**模式。用**Split Channels**功能将图像分成单独的通道后，每个通道都能分开处理。处理后各个通道通过**Combine Channels**功能进行合并，组合的图像能再次通过**Color Model**功能切换到**RGB**颜色模式。

下面的例子将逐步解释如何将彩色图像分成独立的颜色通道；并对通道进行处理后再次合并。

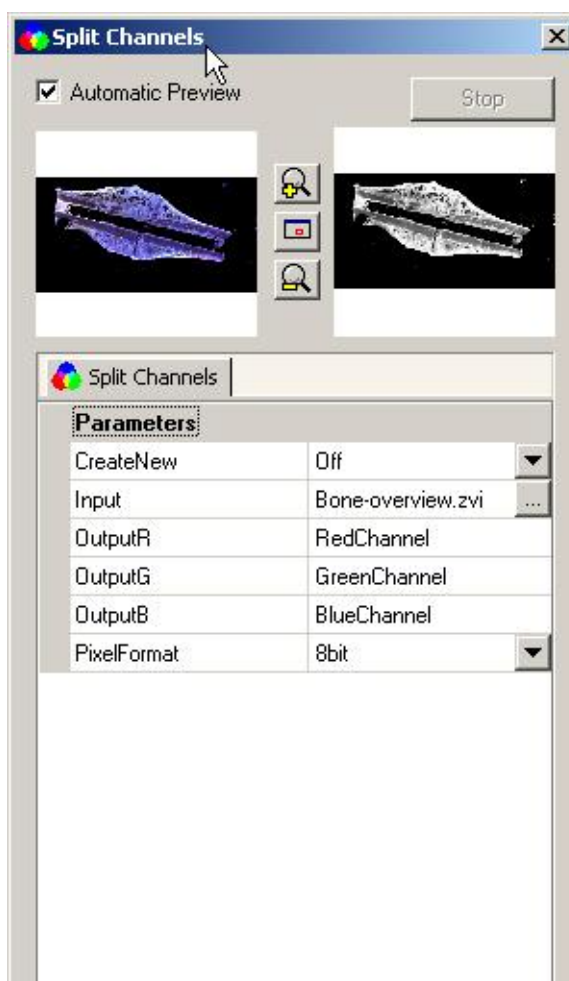
Ø 通过File Open Image加载所需的图像"Boneoverview.zvi"，或者通过摄像头获取图像。



Ø 图像显示在AxioVision图像窗口。

从Processing菜单选择Utilities功能组，然后选择Split Channels功能。

Ø 现在用户能看到Split Channels对话框。



Ø 如果Automatic Preview功能被激活，用户会看到缩小的输入图像。

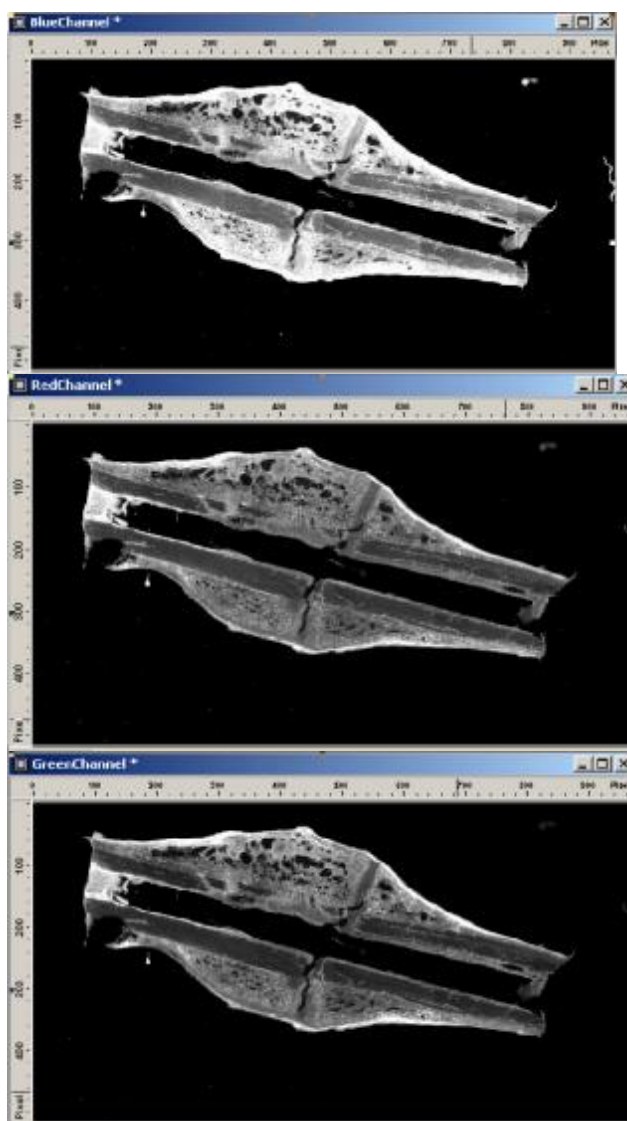
Ø 设置CreateNew为Off以便后面能自由选择输入的图像（Input）。

Ø 在PixelFormat处选择"8bit"。

Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。


Ø 单击OK关闭对话框。

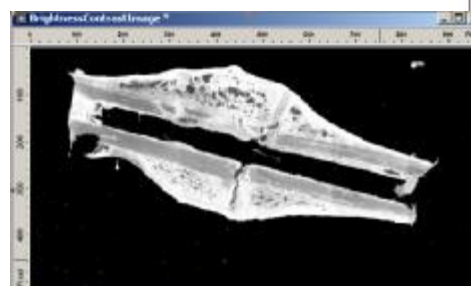
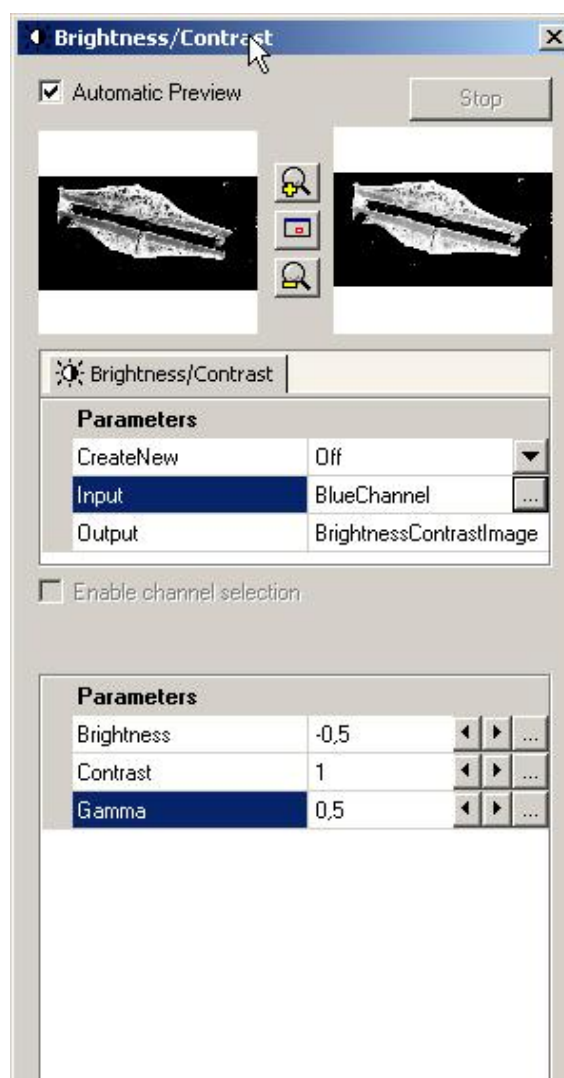
- Ø Split Channels功能将彩色图像分成红、绿、蓝三个独立的彩色通道。每个通道的图像都是黑白图像。






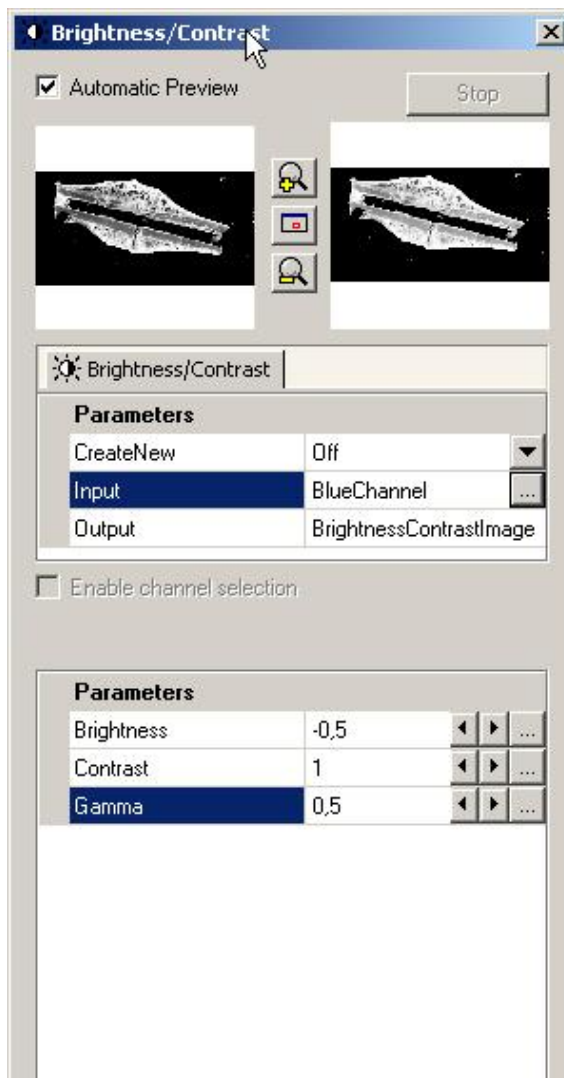
从Processing菜单选择Adjust功能组，然后选择亮度/对比度（Brightness/Contrast）功能。

- Ø 现在用户能看到亮度/对比度功能对话框。
- Ø 如果Automatic Preview功能被激活，用户可以看到缩小的输入图像。
- Ø 在输入区单击  按钮，将出现图像图库。单击选择蓝色通道的黑白图像。
- Ø 单击箭头键设置亮度值为-0.5，对比度值为1，Gamma值为0.5，或者直接输入数值。
- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。
- Ø 单击OK关闭对话框。
- Ø 蓝色通道图像的亮度增加。



从Processing菜单选择Utilities功能组，然后选择Combine Channels功能。

- Ø 现在用户能看到Combine Channels对话框。
- Ø 如果Automatic Preview功能被激活，用户会看到缩小的输入图像。
- Ø 在Input区域单击  按钮，会显示图像图库。单击选定要处理的图象。对于InputR选择红色通道的黑白图像，InputG选择绿色通道的黑白图像，InputB选择蓝色通道的黑白图像。
- Ø 在PixelFormat处选择"24bit"。
- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。
- Ø 单击OK关闭对话框。
- Ø 此操作大大地增加了生成的图像的亮度。



注意：

- n 若有必要调整生成的图像的显示特性曲线。

## 将彩色图像转化为黑白图像

注意：

- n 有关图像格式和数据位数的更多信息在第六章图像处理第6.1概述中。

如果图像由数码摄像头获得，图像依据不同的摄像头具有10位图像（或 $3 \times 10 = 30$ 位彩色图像），12位图像（或 $3 \times 12 = 36$ 位彩色图像），14位图像（或 $3 \times 14 = 42$ 位彩色图像）。另一方面，模拟摄像头只能产生8位图像（或 $3 \times 8 = 24$ 位彩色图像）。图像灰度值分布显示在显示特性曲线中（View Properties Display属性页）。图像数据位数可由最大灰度值看出。

数据位数	最大灰度值
8	256
10	1024
12	4096
14	16384
16	65536

由于许多程序只在8位图像下工作，或只区分8位和16位图像，因此将图像转化为其它数据格式很有用。

Convert Pixel Format功能也只区分8位及16位黑白图像和24位及48位彩色图像。彩色图像具有三个通道，因此所需存储空间为黑白图像的三倍。16位图像因为所含灰度值信息更多，要求更大的存储空间。通常8位灰度值信息就足够了。所以Convert Pixel Format功能适用于将彩色图像转变为黑白图像，或将16位图像转变为8位图像。

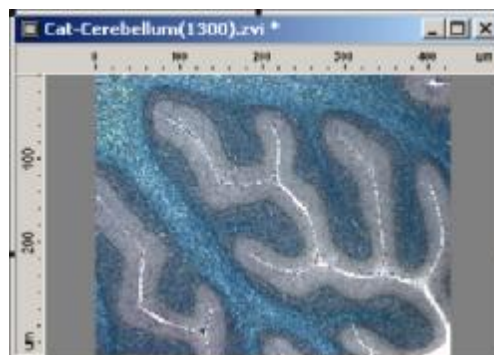
如果用户需要将同一图像转变为不同像素格式，我们推荐用户将CreateNew设置为Off。这样用户不仅可以选择输入图像，而且可以改写或重命名生成的图像。相反，如果将CreateNew设置为On，一旦输入新的图像就会自动创建新的图像。下面的例子一步一步解释如何将同一输入图像转化为不同像素格式图像。

注意：

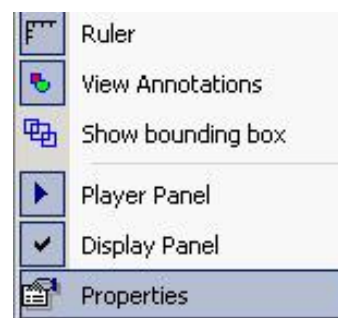
n 使用File 菜单中Export 或 Batch convert功能，也能将彩色图像转变为黑白图像。

Ø 通过File Open Image加载所需的图像"Cut-Cerebellum (1300).zvi"，或者通过摄像头获取图像。

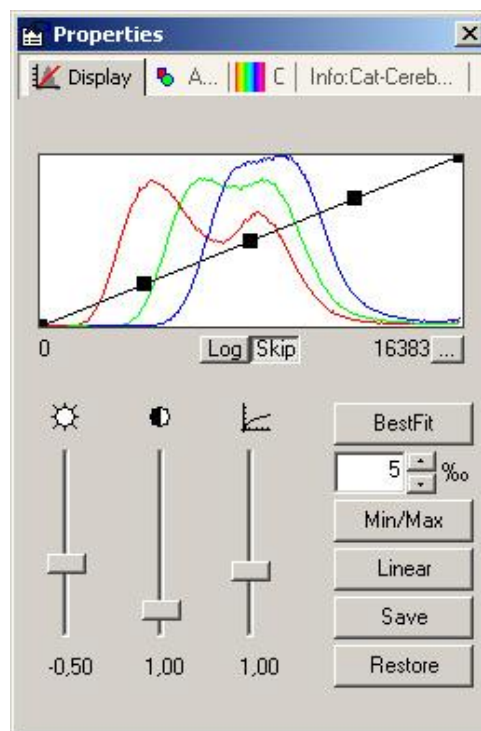
Ø 图像显示在AxioVision的图像窗口中。



Ø 将光标置于图像上，单击鼠标右键，从快捷菜单中选择Properties功能。

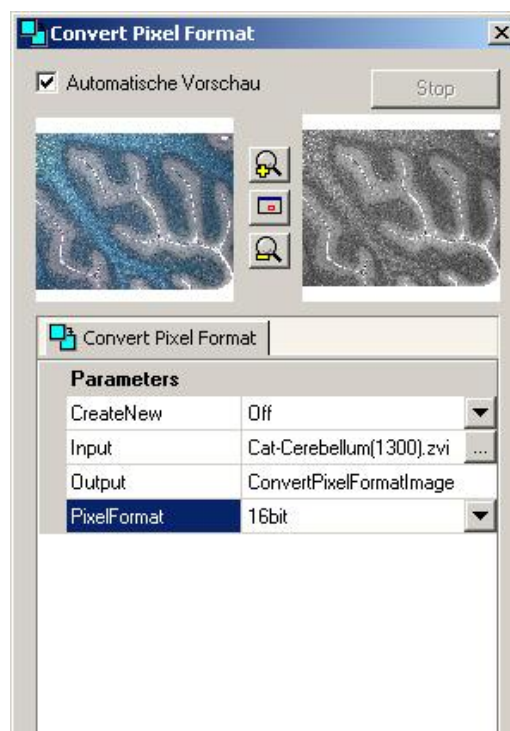


- Ø 单击Display菜单标签，在这里显示图像显示特性曲线。这显示了3 x 14位红、绿、蓝颜色通道的灰度值分布。

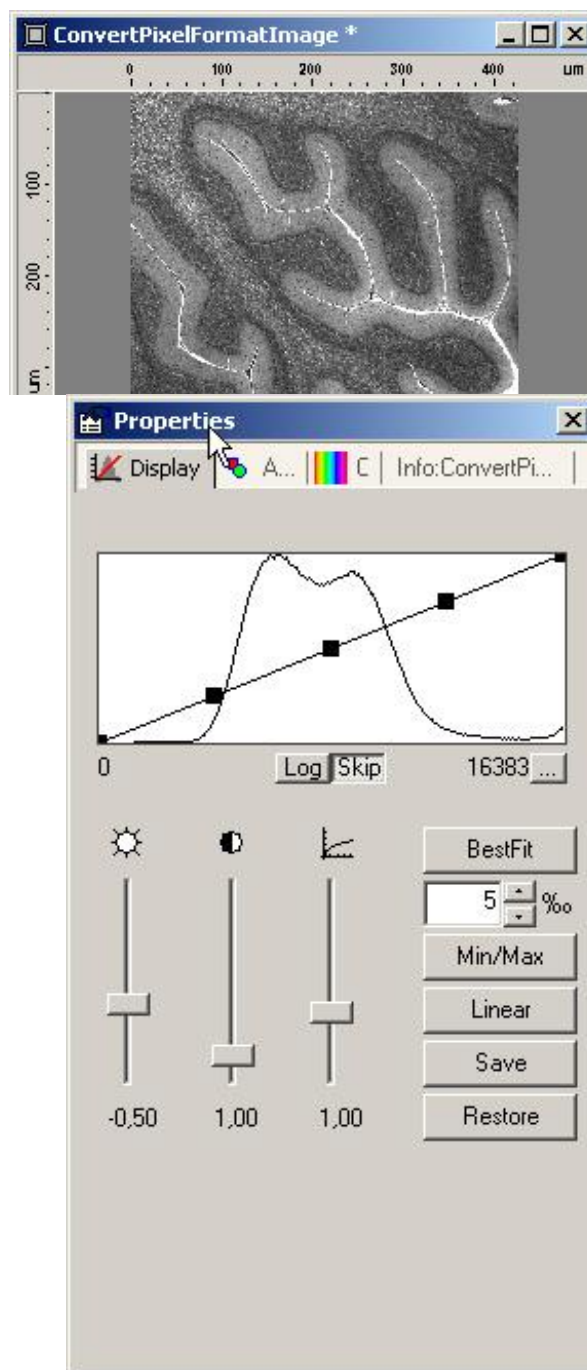


从Processing菜单中选择Utilities功能组，然后选择Convert Pixel Format功能。

- Ø 现在可以看到Convert Pixel Format功能的对话框。
- Ø 如果Automatic Preview被激活，则显示缩小的输入图像。
- Ø 设置CreateNew为Off以便后面进行不同转换时使用同一图像。
- Ø 在PixelFormat下选择16位。
- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。
- Ø 单击OK关闭对话框。



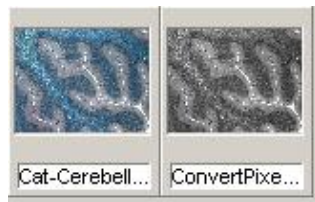
- Ø 原始图像被转变为16位黑白图像。显示特性曲线表示灰度值的分布。



再次从Processing菜单中选择Utilities功能组，然后选择Convert Pixel Format功能。

Ø 现在可以再次看到Convert Pixel Format功能的对话框。

Ø 在Input区域单击...按钮显示图像图库，单击选择原始图像。

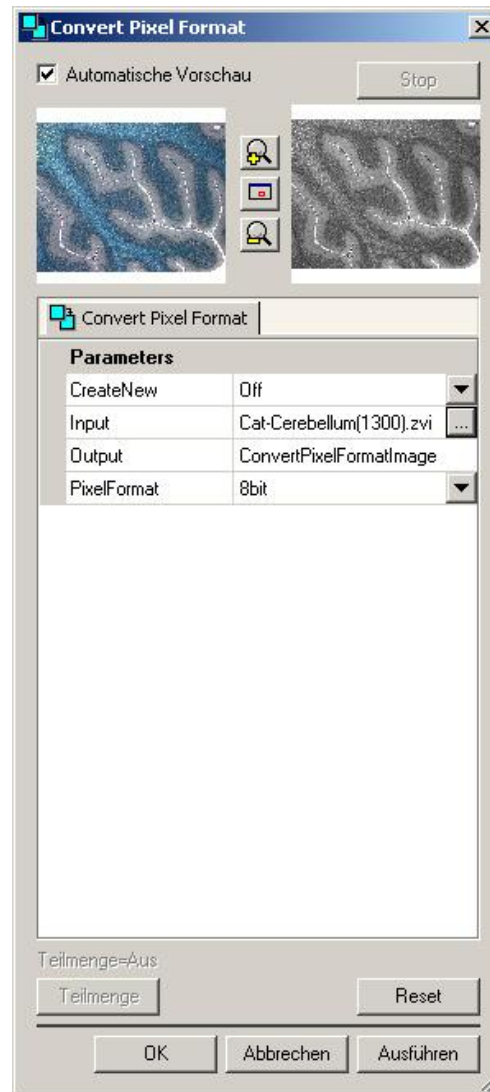


Ø 在PixelFormat下选择8位。

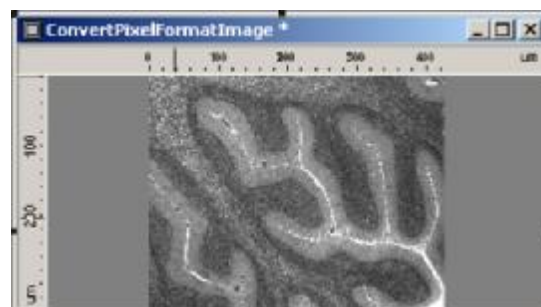
Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。

Ø 生成的图像的名字不变，图像被覆盖。

Ø 单击OK关闭对话框。

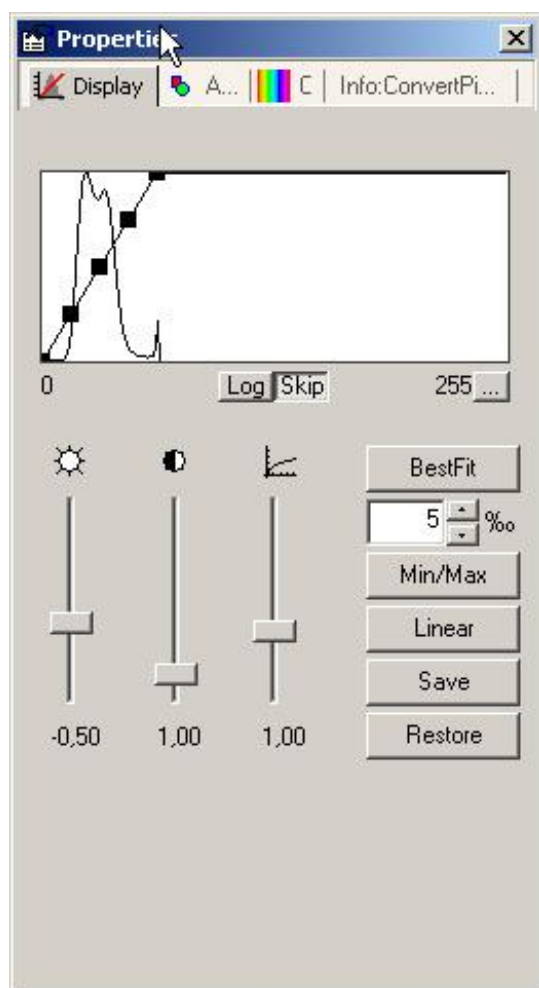


Ø 生成的图像是一幅8位黑白图像。






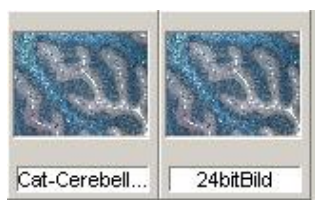
Ø 生成的图像的显示特性曲线表示8位黑白图像的灰度值分布。



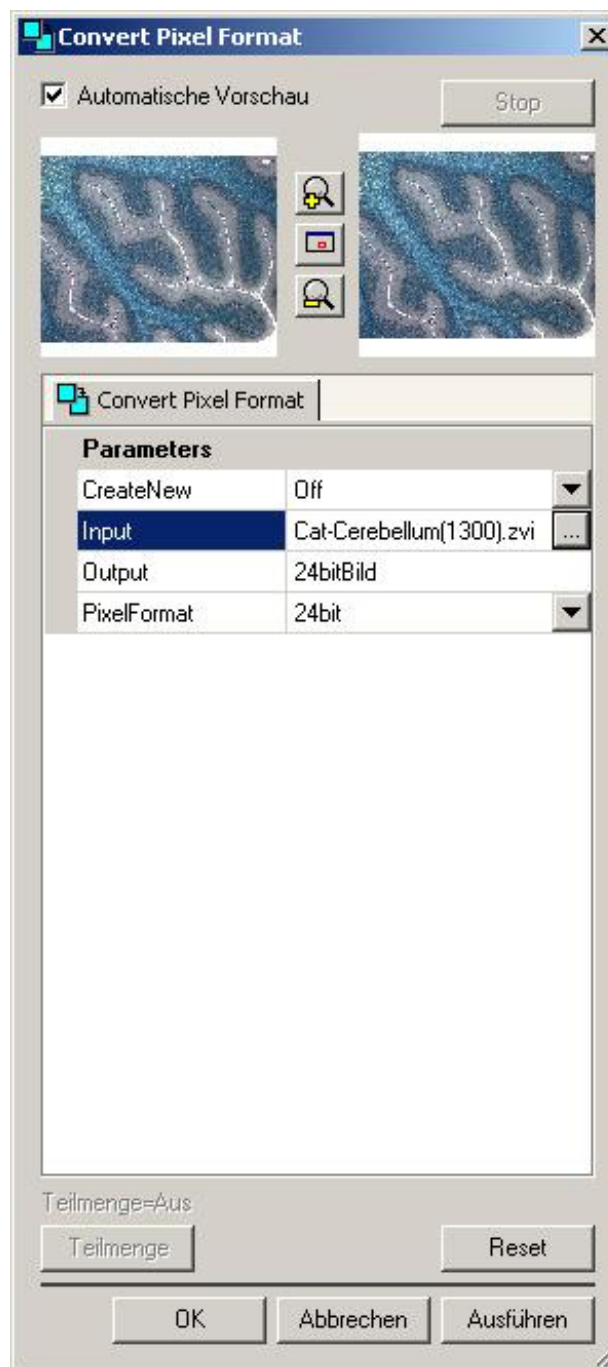
再次从Processing菜单中选择Utilities功能组，然后选择Convert Pixel Format功能。



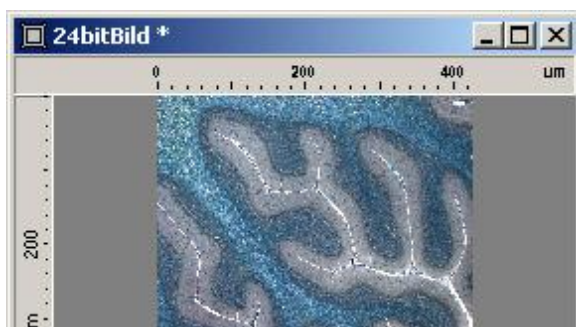
- Ø 在Input区域再次选择原始图像。
- Ø 在Output区域指定一个新名字以产生新的图像。
- Ø 在Input区域单击  按钮显示图像图库, 单击选择原始图像。



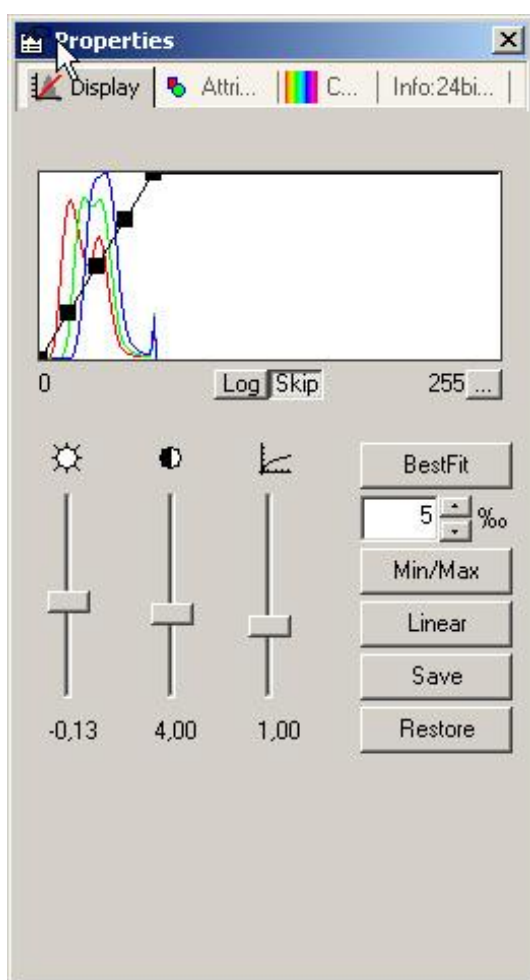
- Ø 在PixelFormat下选择24位。
- Ø 单击Apply在预览中浏览生成的图像。
- Ø 单击OK关闭对话框。



Ø 生成的图像是一幅24位（3x8）的彩色图像。



Ø 生成的图像的显示特性曲线表明了各个颜色通道的灰度值分布。



## 11.2 Inside4D

### 概述

Inside4D可以以三维方式显示用AxioVision生成的z-stack。z-stack可以是单色或彩色的，也可以是时间序列。

为了在二维介质如显示器上显示第三维，数据被投影到一个虚拟空间。第三维或者通过设置参考点（例如阴影）或者动态图像来表现。三维显示对于显示通过3D去卷积模式去模糊或通过ApoTome模式获取的图像叠尤其有效。

同时还可以在每个显示图像中将时间（随时间变化的图像）作为第四维（3D投影动画和时间序列回放）。

### 设置 Inside4D

该功能打开含有Data、Illumination、Series、Special和Info的属性页。这些属性页可以对不同3D图像进行设置。

### 激活二维图像（Ctrl+1）

此功能用于在三维和二维视图间切换。使用键盘快捷键Ctrl+1 和Ctrl+2，能够在这些视图之间直接快速来回切换。

### 激活三维图像（Ctrl+2）

此功能用于在二维和三维图像间切换。使用键盘快捷键Ctrl+1 和Ctrl+2，能够在这些图像直接快速来回切换。

## 图像底部的三维视图

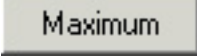
如果用户选择了安装Inside4D，在每个z-stack上都能看到两个标签 **2D View** **3D View**。用户能使用这些标签从标准的二维图像切换到三维图像，然后回到二维图像。

## 选择视图








加载图像叠到AxioVision浏览器后，单击 **2D View** **3D View** 按钮可以切换到三维视图。此处有四种不同的视图可供选择：**Shadow**、**Transparency**、**Surface**和**Maximum**。


单击 **Shadow** 按钮，图像中的结构被一个虚拟光源照射，而阴影则投射到背景上。这能给数据一个空间参照，使图像更加形象。该模式下显示的图像仅通过计算机CPU计算（Voxel模式）得到。单击 **Transparency** 按钮计算得到透明效果的三维图像。这种视图对于形象显示图像内部结构之间的三维位置关系十分有用。这种模式既能通过Voxel模式显示又能通过在所谓的OpenGL模式下（在强大的显卡帮助下）加速计算来显示。




在表面模式下（**Surface** 按钮），图像结构显示为各个表面。这能特别突出扁平结构（如细胞壁）。在这种模式下，也能选择Voxel（CPU）或OpenGL（显卡）显示。


最后，单击  按钮切换为最大投影模式，这种方式通过考虑每个像素沿投影轴的信号强度计算生成三维视图。这种视图对于在二维中显示三维图像特别有用，例如在出版物中。该模式仅由计算机CPU计算（Voxel模式）。


## 窗口中的控制元件

第一次切换的标准视图是Transparency模式的正视图（显卡加速模式）。可以使用滚轮  放大或缩小  及旋转视图的x 、y 、z  轴。鼠标对图像的直接作用可以通过左图边缘中间三个按钮来配置：如果按下  按钮，可以自由旋转图像；按下  按钮，向上移动鼠标放大图像，向下移动鼠标缩小图像；

按下  按钮，可以围绕一个假想的旋转中心移动图像，例如在放大模式下观察某些特定的结构。用户也可以通过按下Ctrl键加上鼠标来暂时激活这些功能。


用户也可使用图像下缘  按钮来为图像叠加一个框；使用  按钮显示x、y、z轴（x为红色、y为绿色、z为蓝色）；在有刻度的数据时，使用  按钮来添加标尺。这些功能帮助用户在虚拟的空间内定位。如果用户将光标移到以上任意一个按钮上，都会看到有关功能的解释。


 按钮能使用户可以随时从所选择的视图回到正视图，同时也调整缩放倍数，使全部图像内容都显示在图像框架中。


 按钮允许用户通过鼠标连续移动物体（动画）。该点大大增加了三维图像的表现力。

注意：

n 动画模式中，每个投影视图都经过重新渲染。对于大图片（超过20MB），为保证动画平滑，需要配有好的显卡的强大的计算机。

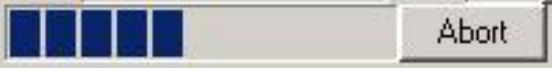
如果加载了时间序列图像，则窗口下沿将显示播放工具栏。用户可以按时间顺序播放图像。然而，播放器不等图像渲染结束就会移动到下一个时间段。因此应该选择较慢的时间设置（ 按钮）以保证图像渲染。

单击  按钮显示Inside4D Settings属性页，可在此对所选的渲染模式进行详细设置。

 按钮以当前渲染模式创建一幅新的图像。生成的图像自动分开为一个新的独立文件。



使用 **Precise** **Fast** 滑块可以减少用于计算的图像数据的复杂性。计算速度随数据复杂性的降低而增加。虽然滑块应用于不同模式时有不同效果（像素、材质、三角形的数目等），但是上述结论对所有模式都成立。在 **Special** 属性页可以进行更精细的设置。

在渲染过程中会显示一个进程条。如果计算所花时间太长，用户可单击 **Abort** 按钮  提前中止进程。

## Inside4D 属性页

属性页有五个标签（**Data**, **Illumination**, **Series**, **Special**和**Info**）。

用户所作的设置和更改可以独立于图像保存，并应用到别的图像中。在 **Data** 属性页 **Settings** 区域单击 **Save** 按钮保存，并命名文件，后缀自动设为 \*.zv3。此设置文件考虑了用户可能对 **Inside4D** 的所有设置和

各个设置的选项（除了横向位置 ）所作的各种修改。这项功能的重要性在于允许用户在相同条件下对不同样品图像进行比较。

用 **Load** 按钮加载以前保存的 \*.zv3 设置并用于 z-stack 中。

**Save as Default** 按钮将当前设置保存为默认设置，此设置自动用于下面所有的图像中。

单击 **Reset** 按钮可恢复到缺省模式。

注意：

- n **Settings**区域应用于所有四种渲染模式，并在**Data**，**Illumination**和**Series**属性页上显示。

用户可以单击图像右侧的按钮  从任意当前视图创建一个新的图像。

用户可以改变的设置取决于所选择的渲染方式。下面章节中将分别解说每一种渲染模式中每一属性页。


对于每种模式，只有创建系列的设置（**Series**属性页）是相同的。此设置将在单独章节中解说。

## 阴影模式

此模式中，图像空间由虚拟的光源照射。观察者从上方观察图像。视图与从显微镜目镜观察物体一致，阴影投影到一个虚拟的表面（图像背景）上。

空间效果通过光反射、不透明度和投射阴影来产生。

## 数据属性页

在此属性页中，每个通道的设置使用滑块或在相应输入区域键入数值来独立输入。单击相应的按钮（如 ）选择通道。


使用**Threshold**以百分比形式指定显示灰度值的最小值。这将决定哪些数据用于图像渲染。

如果某一荧光通道含有较强的均匀荧光信号，则需要将此通道的阈值设置得高一些，以“保护”别的较弱的通道信号不被淬灭。



**Ramp**控制从完全透明到完全不透明的切换程度（0-100 %）。

**Maximum**影响不透明度（0-100 %）。

该影响用直方图表示。**X**轴代表灰度值，**y**轴代表不透明度。用户也可以用鼠标对直方图曲线进行调整。


用户还可以调整图像结构表面显示的粗糙度。这将改变显示的可塑性（0-1）。如果像素达到饱和，此项设置的改变会造成一定假象，应该相应地降低图像粗糙度。

投射角度设置仅用于**Transparency**和**Surface**模式。

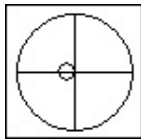
注意：

- n 可通过使用均一强度的同一结构图像来展示这些设置的影响。例如AxioVision浏览器光盘中的“Inside4D\_demo\_image.zvi”范例图像。


光照属性页

亮度通过输入区域或滑块来控制。在伪彩模式（播放面板中的按钮）下浏览时，通常亮度值大于1.6会得到较好的荧光数据。

通过使用滑块或输入数值或用鼠标移动小圆圈来调整**Azimuth**（描述水平线上方虚拟光源的角度）和**Elongation**（描述沿水平线的光线方向）。



光源位置由大圆内的小圆表示。

单击  按钮打开窗口可选择背景颜色。

用户既可以从64种标准颜色（顶端选择区域）中选择背景颜色，也可以自定义颜色。用户可以通过直接单击调色板或在数值区域手动输入颜色值。单击Add to Custom Colors按钮增加新选择的颜色到用户定义颜色区。

要使用用户定义的颜色，单击相应的颜色区域（“基本颜色”或“自定义颜色”），确定后单击OK。要想使阴影效果达到最好，需要采用浅色或白色背景。使用Shadow复选框，可以在显示的图像上增加或删除阴影。使用Distance滑块，可以指定物体到表面的距离（0.5-3倍物体的平均直径）。

### 特殊属性页

此处用户可以在不同模式之间切换（使用下拉列表）。在OpenGL加速模式中，用户也可以改变使用的渲染模式（使用下拉列表）。由于阴影模式只使用计算机处理器，Method下拉菜单不能被激活。

在Precision区域，对于阴影模式，用户可以逐步减少用于计算的横向（x，y）和轴向（z）的像素数目（二次抽样）。在某些情况下，这样能显著减少计算时间。移动相应的滑块或在输入区域键入需要的数值。在x、y方向各缩小1/2，则数据大小减少为原来的1/4。

z轴值为2时两个z平面合并成一个，数据大小减少一半。

然而，随着减少的数据增加，速度增加程度也越来越小。通常减少2-3倍即可平滑显示图像。

View区域显示x、y和z轴设置的角度。除此以外，还可看到横向位移的程度和所用的缩放倍数。

也可以在各自的输入区域编辑这些值，手动输入图像的位置。

## Info 属性页

该属性页的信息区显示了性能值。这些性能值有助于用户估计渲染的实际速度。对每一图像的计算都会给出一个时间值（毫秒）。由此可得到每秒计算的图像数目。同时也可以看到当前设置的角度值。这对精确定位空间图像叠很有用。

Shadow模式仅由主要处理器进行计算。因此，与OpenGL加速模式的Transparency和Surface相比，只能看到上面的值。


在Precision区域，对于阴影模式，用户可以逐步减少用于计算的横向（x，y）和轴向（z）的像素数目（二次抽样）。在某些情况下，这样能显著减少计算时间。移动相应的滑块或在输入区域键入需要的数值。在x、y方向各缩小1/2，则数据大小减少为原来的1/4。z轴值为2时两个z平面合并成一个，数据大小减少一半。

然而，随着减少的数据增加，速度增加程度也越来越小。通常减少2-3倍即可平滑显示图像。

## 透明模式


与Shadow模式相比，该模式中背景被散射、白光所抵消。使用设置选项可以将几个通道混在一起，也可以使内部结构可见。

### 数据属性页

在此属性页中，每个通道的设置使用滑块或在相应输入区域键入数值来独立输入。单击相应的按钮（如 ）选择通道。使用Threshold以百分比形式指定显示灰度值的最小值。这将决定哪些数据用于图像渲染。

**Ramp**控制从完全透明到完全不透明的切换程度（0-100 %）。

**Maximum**影响不透明度（0-100 %）。

直方图  的x轴代表灰度值，y轴代表不透明度。用户也可以用鼠标对直方图曲线进行调整。

注意：

- n 可通过使用均一强度的同一结构图像来展示这些设置的影响。例如AxioVision浏览器光盘中的“Inside4D\_demo\_image.zvi”范例图像。


如果在Special属性页选择Texture（graphics card）方法，则可以在Data属性页改变显示图像的投射角度（10°~80°）。使用滑块




或在输入区域键入角度值。透视效果类似于通过远景镜或广角镜浏览3D图像的效果。

如果在Special属性页选择Voxel (computer) 方法，则不能进行以上调整。

## 光照属性页

亮度通过输入区域或滑块来控制。在伪彩模式（播放器面板中的  On 按钮）下浏览时，通常亮度值大于1.6会得到较好的荧光数据。

单击  按钮打开窗口，可选择背景颜色。

用户既可以从64种标准颜色（顶端选择区域）中选择背景颜色，也可以自定义颜色。用户可以通过直接单击调色板或在数值区域手动输入颜色值。单击Add to Custom Colors按钮增加新选择的颜色到用户定义颜色区。

要使用用户定义的颜色，单击相应的颜色区域（“基本颜色”或“自定义颜色”），单击OK确定。

使用深色或黑色背景增加透明效果。

## 特殊属性页

在这里可以在不同模式之间进行切换（使用下拉列表）。在OpenGL加速模式中也可以改变以往使用的渲染方式（使用下拉列表）。在透明模式下，两个选项Voxel (computer) 和Texture (graphics card) 可供选择。

较为复杂的方式Texture (graphics card) 给出3D图像表面结构, 即所谓的材质, 它又是由单独的元素 (texels) 构成。所需要的元素越少, 则渲染速度越快 (帧/秒)。Voxel (computer) 方式下, 渲染仅由CPU进行, 没有OpenGL的支持; 计算的模型也相对简单。因此, 在具有较小显卡的较慢计算机上运行这种方式通常较快。然而, 图像的质量也会相应降低。

在Precision区域, 对于阴影模式, 用户可以逐步减少用于计算的横向 (x, y) 和轴向 (z) 的像素数目 (二次抽样)。在某些情况下, 这样能显著减少计算时间。移动相应的滑块或在输入区域键入需要的数值。在x、y方向各缩小1/2, 则数据大小减少为原来的1/4。z轴值为2时两个z平面合并成一个, 数据大小减少一半。

然而, 随着减少的数据增加, 速度增加程度也越来越小。通常减少2-3倍即可平滑显示图像。显卡存储所有材质面的能力是决定是否能用Texture (graphics card) 方法对图片叠进行平滑渲染 (动画模式) 的关键因素。因此用户需要在Info属性页的info区域设置滑块。"Nr. Texture planes = ..." 值将会显示。

View区域显示x、y和z轴设置的角度。除此以外, 还可看到横向位移的程度和所用的缩放倍数。

也可以在各自的输入区域编辑这些值, 手动输入图像的位置。

## Info 属性页

该属性页的信息区显示了性能值。这些性能值有助于用户估计渲染的实际速度。


在Precision区域，对于阴影模式，用户可以逐步减少用于计算的横向（x，y）和轴向（z）的像素数目（二次抽样）。在某些情况下，这样能显著减少计算时间。移动相应的滑块或在输入区域键入需要的数值。在x、y方向各缩小1/2，则数据大小减少为原来的1/4。z轴值为2时两个z平面合并成一个，数据大小减少一半。

然而，随着减少的数据增加，速度增加程度也越来越小。通常减少2-3倍即可平滑显示图像。

## 表面模式

目前为止描述的两种模式都是通过依赖于设置的软过渡或透明外观来显示数据。在表面模式中，程序从灰度值计算出纯粹的表面。该模式可用于突出某一特定结构，而隐藏内部的其它结构。

## 数据属性页

在该属性页可以通过使用滑块或在相应输入区域键入数值为每个通道独立输入设置。单击相应的按钮（如 ）选择通道。使用Threshold设置灰度值阈值（在256位可能的灰度值中的百分比）。用户也可以设置散射亮度（Ambient描述散射的间接光源）和直射亮度（Specular，百分比值）。后者的值同时会影响反射强度。Shininess改变表面的光泽度（百分值）。

### 注意：

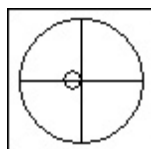
- n 可通过使用均一强度的同一结构图像来展示这些设置的影响。例如AxioVision浏览器光盘中的“Inside4D\_demo\_image.zvi”范例图像。

如果在Special属性页选择Variable detail (graphics card) 或Maximum detail (graphics card) 方法, 用户可以在Data属性页改变投射角度 ( $10^{\circ}\sim 80^{\circ}$ ) 来观察图像。使用Projection - Angle滑块或在输入区域键入角度值。透视效果类似于通过远景镜或广角镜浏览3D图像的效果。如果在Special属性页选择Voxel (computer) 方法, 则不能进行以上调整。

## 光照属性页

这里可以改变光照参数。

用户可以通过滑块或输入区域控制Distance, Azimuth (描述虚拟的水平线之上光源的角度) 和Elongation (描述光线的水平方向)。



光源位置由大圆内的小圆表示。用户可以通过鼠标移动小圆改变光照。

单击  按钮打开窗口可选择背景颜色。

用户既可以从64种标准颜色 (顶端选择区域) 中选择背景颜色, 也可以自定义颜色。用户可以通过直接单击调色板或在数值区域手动输入颜色值。单击Add to Custom Colors按钮增加新选择的颜色到用户定义颜色区。



要使用用户定义的颜色，单击相应的颜色区域（“基本颜色”或“自定义颜色”），单击OK确定。

## 特殊属性页

在该属性页用户可以在不同模式之间进行切换。用户可以从Method下拉菜单中看到有三种方法可供选择：快速方法Voxel（computer），显卡加速方法Variable detail（graphics card），和Maximum detail（graphics card）方法。

如果选择Variable detail（graphics card）和 Maximum detail（graphics card）方法，用户可以在Data属性页上改变投射角度（10°~80°）来观察图像。使用滑块或在输入区域键入角度值。透视效果类似于通过远景镜或广角镜浏览3D图像的效果。根据数据大小，Variable detail（graphics card）方法可由兼容的OpenGL显卡加速。

Maximum detail（graphics card）方法逐层计算表面模型，可用的通道逐个加入到模型中。由于这种方法试图将所有图像数据保留在显卡内存中，花费的处理时间比Variable detail（graphics card）长很多。然而，这种方法通常能处理出最好的结果。

Voxel（computer）方式下，计算仅由CPU进行，不需要OpenGL的支持；用于基本计算的格式也相对简单。因此，在具有较小显卡的较慢计算机上运行这种方式较快。然而，图像的质量也有一定降低。

在Precision区域，对于阴影模式，用户可以逐步减少用于计算的横向（x，y）和轴向（z）的像素数目（二次抽样）。在某些情况下，这样能显著减少计算时间。

移动相应的滑块或在输入区域键入需要的数值。在x、y方向各缩小1/2，则数据大小减少为原来的1/4。z轴值为2时两个z平面合并成一个，数据大小减少一半。

在表面模式中，用户可以决定使用三角形的最大数目。模式中使用的三角形越少，渲染速度越快，同时细节也相应减少。然而，随着减少的数据增加，速度增加程度也越来越小。通常减少2-3倍即可平滑显示图像。三角形数目不能少于5000，否则图像分辨率不够。要想在Maximum detail (graphics card) 模式中达到和在Variable detail (graphics card) 模式中一样的效果，设置的三角形数目必须达到几百万（在数值区域输入）。

View区域显示x、y和z轴设置的角度。除此以外，还可看到横向位移的程度和所用的缩放倍数。也可以在各自的输入区域编辑这些值，手动输入图像的位置。

## Info 属性页

该属性页的信息区显示了性能值。这些性能值有助于用户估计渲染的实际速度。与透明模式相比，表面模式中表面计算是最花时间的一步，而与已完成渲染的图像相互作用比较快。


在Precision区域，对于阴影模式，用户可以逐步减少用于计算的横向(x, y)和轴向(z)的像素数目(二次抽样)。在某些情况下，这样能显著减少计算时间。移动相应的滑块或在输入区域键入需要的数值。在x、y方向各缩小1/2，则数据大小减少为原来的1/4。z轴值为2时两个z平面合并成一个，数据大小减少一半。

在表面模式中，用户可以决定使用三角形的最大数目。模式中使用的三角形越少，渲染速度越快，同时细节也相应减少。然而，随着减少的数据增加，速度增加程度也越来越小。通常减少2-3倍即可平滑显示图像。三角形数目不能少于5000，否则图像分辨率不够。要想在Maximum detail (graphics card) 模式中达到和在Variable detail (graphics card) 模式中一样的效果，设置的三角形数目必须达到几百万（在数值区域输入）。


## 最大模式

只有强度最高的像素才沿观察轴显示。

## 数据属性页

在此属性页中，每个通道的设置使用滑块或在相应输入区域键入数值来独立输入。单击相应的按钮（如 ）选择通道。使用Threshold 以百分比形式指定显示灰度值的最小和最大值。小于最小值或大于最大值的数据在渲染时不予考虑。该设置对于多通道图像叠的渲染尤其有用。投影角度设置仅适用于Transparency 和 Surface模式。因此这里此区域为空白。

## 光照属性页

使用 **Brightness** 滑块或在输入区域输入数值来控制显示的亮度。在混合颜色模式下，多通道图像会迅速达到饱和，这时可以减少整体亮度。单击  按钮打开窗口可选择背景颜色。用户既可以从64种标准颜色（顶端选择区域）中选择背景颜色，也可以自定义颜色。用户可以通过直接单击调色板或在数值区域手动输入颜色值。单击 **Add to Custom Colors** 按钮增加新选择的颜色到用户定义颜色区。

要使用用户定义的颜色，单击相应的颜色（“基本颜色”或“自定义颜色”），然后单击 **OK**。使用深色或黑色背景可以增加透明效果。

## 特殊属性页

在该属性页用户可以通过下拉列表在不同模式之间进行切换。

此方法是基于 **voxel** 的（**Voxel computer**），不经过显卡渲染。因此 **Method** 下拉菜单不能被激活。

在 **Precision** 区域，对于阴影模式，用户可以逐步减少用于计算的横向（**x**, **y**）和轴向（**z**）的像素数目（二次抽样）。在某些情况下，这样能显著减少计算时间。移动相应的滑块或在输入区域键入需要的数值。在 **x**、**y** 方向各缩小  $1/2$ ，则数据大小减少为原来的  $1/4$ 。**z** 轴值为 2 时两个 **z** 平面合并成一个，数据大小减少一半。

然而，随着减少的数据增加，速度增加程度也越来越小。通常减少 2-3 倍即可平滑显示图像。


View区域显示x、y和z轴设置的角度。除此以外，还可看到横向位移的程度和所用的缩放倍数。也可以在各自己的输入区域编辑这些值，手动输入图像的位置。

## Info 属性页

该属性页的信息区显示了性能值。这些性能值有助于用户估计渲染的实际速度。对每一图像的计算都会给出一个时间值（毫秒）。由此可得到每秒计算的图像数目。同时也可以看到当前设置的角度值。这对精确定位空间图像叠很有用。

在Precision区域，对于阴影模式，用户可以逐步减少用于计算的横向（x，y）和轴向（z）的像素数目（二次抽样）。在某些情况下，这样能显著减少计算时间。移动相应的滑块或在输入区域键入需要的数值。在x、y方向各缩小1/2，则数据大小减少为原来的1/4。z轴值为2时两个z平面合并成一个，数据大小减少一半。

## 生成图像系列

一旦确定了视图模式并输入了设置，用户就可以将视图作为一系列独立的图像进行计算。虽然  按钮（见Control elements in the window）可以产生实时动画，但也需要在当前时间点及时对每幅图像重新计算。这里可以用一系列想要的独立图像来形成动画。

由于不再需要重新渲染，根据图像大小，图像系列的显示将比实时动画更快更平滑。这种类型的图像系列可以作为电影（avi格式）输出，也可以作为一系列独立的图像文件格式输出。


## 系列属性页

该属性页在Inside4D提供的Shadow, Transparency, Surface和Maximum模式中是一样的。这里用户定义的参数设置用来产生动画。至少需要定义开始角度和结束角度。

在Series下拉菜单中,用户可以在五个不同的选项中进行选择。前三个选项(X-Axis, Y-Axis, Z-Axis)可以通过设置动画转动的固定坐标轴来创建系列。选定任一选项都会出现三个滑块。

- Ø Views滑块指定动画中的图像数目。输入的图像数目越多,显示越平滑,同时生成图像的大小也会增加。滑块设置的范围为1-100,用户也可以在数值区域输入更高的值(不超过999)。
- Ø 另外两个滑块用来定义开始角度(Start Angle)和结束角度(End Angle)。用户可以在-360°到+360°之间选择。通常输入较小的角度范围,如-35°到+35°,就已经可以给出令人满意的结果,不需要大量的视图就可以达到平滑翻转的效果。

用户也可以在位置列表中保存物体的任意视图,并生成一个具有变化的旋转轴和/或缩放倍数的动画。在Series下拉菜单中选择Position List选项,打开另一个下拉菜单。

单击  按钮,添加包括x, y, z和d(缩放倍数)的当前位置。在图像窗口中按需要改变物体的方向,保存新的位置。如果在下面列表框的下拉菜单中选择Use Settings,则对图像系列进行计算时将考虑用户对Data和Illumination属性页所作的任何修改。

利用这个特点可以设置阈值为100%使某一通道消失。利用该技术，用户可以展示被其它通道信号所掩盖的结构。

单击 **Remove** 可以删掉某个或更多甚至全部 **Remove All** 位置。双击位置条目可以激活图像的此项设置。

如果创建了一个时间序列图像，则可以通过单击**Time Series**选择产生一个时间序列视图。

如果想利用**Data**和**Illumination**属性页的设置产生系列，用户可以从位置列表下边的下拉菜单里选择**Use Settings**或**Without Settings**功能。

单击**Create Series**生成系列。结果是相应于时间序列的与操作（播放工具栏）相关的新图像。新图像系列文件可以作为zvi图像保存或以别的格式输出，如**Windows**视频（avi）。

注意：

n 计算具有大量位置和/或图像的复杂图像系列需要花好几分钟。

非压缩形式下复杂系列变得非常大，从而很难将它们导入如**Microsoft PowerPoint™**中显示。因此推荐用户在输出时压缩**AVI**或**QuickTime** 文件（此项帮助请参见**Export**帮助主题）。

## 11.3 3D 去卷积

从Processing菜单中选择3D-Deconvolution条目，打开包括Deconvolution和Point Spread Function属性页的浮动对话框。

也可以从Workarea单击Deconvolution条目打开相应页面。

### 要求

对3D去卷积，用户需要有黑白的12位或14位z-stack图像，不含有任何饱和像素，即不含有最大灰度值。使用AxioVision获取z-stack需要有Z stack模块。获取几个荧光通道的z-stack还需要有多通道荧光模块。

### 注意：

- n 强烈建议不要使用彩色摄像头，如AxioCam MRc，来获取z-stack图，因为这些摄像头的传感器含有彩色遮罩，会减少灵敏度和横向分辨率（部分插值）。信号变差对于去卷积结果的质量会有负面影响。

对3D去卷积选择合适的z轴距离具有重要作用。基于去卷积理论需要，图像平面间的距离必须是沿z轴光学系统分辨率的一半或更小。对样品两倍过度采样可以达到所谓的Nyquist标准。z轴方向的分辨率取决于所用物镜的光圈、浸没介质的折射率和记录的发射波长。



AxioVision的z-stack模块提供计算正确距离的简单选项。获取z-stack时应选取最小距离。较好的分辨率有利于3D去卷积。但是，还需要考虑对样品的光毒性。

注意：

**n** 最近相邻法不需要遵守Nyquist标准。

获取z-stack时，需要确保在目的结构的上下范围获取了足够多的平面。由于这些z平面的灰度值也来自于样品，所以在计算中也需要包括这些值。

额外所需的平面数目很大程度上依赖于样品和用户要解决的问题，在这里很难准确地推荐该数目的“正确”数值。一般说来，可以将z-stack图像的起始和终止的点设置在看不清目的结构的点。如果作不到该点，那至少需要获取上下一倍厚度的图像。

注意：

**n** 最近相邻法不需要过度取样。

## 去卷积属性页

选择一幅合适的图像来进行去卷积，可以从三种不同算法中选择：

### 最近相邻法（Nearest Neighbor）

最近相邻法使用的算法最快最简单。该方法仅考虑校准的z平面的上下相邻层，减去每个平面焦点外的信息，然后对整个3D stack连续进行这项处理。这种方法可以迅速增强对比度。

### 正则化反相滤镜

由于算法是真实3D的，正则化反相滤镜能得到比最近相邻法更好的结果。它适用于快速处理图像叠以找出哪些图像需要使用高端迭代方法。依据Nyquist标准，需要适当在z-stack所需体积上下过度采样。

### 有限迭代

使用有限迭代最大可能性算法（**Constrained Iterative Maximum Likelihood Algorithm**）可以达到最好的图像质量。只有这种算法能根据“共聚焦”的性质，有选择地去掉数据来。此外该方法能外推出缺失数据。空间分辨率能增加到理论限度（一个voxel）而不产生假象。z-stack要按Nyquist标准采样，并要求过度采样（见前面相关内容）。

由于算术方法的复杂性，根据图像大小和计算机性能，计算可能会花费好几个小时。


## 通道特异的设定

- Ø 归一化（Normalization）：影响对生成图像数据的处理。
- Ø 修剪（Clip）：将图像灰度值的负值设置为0（黑色），大于最大值的数设置为最大灰度值（白色）。如果输入图像没有超出摄像头传感器动态范围，该模式下可以对原始图像和目标图像进行定量比较。该模式可以轻易地演示去卷积的光子重分配效果。
- Ø 自动线性化（AutoLinear）：归一化输出，使最小值是0，最大值是图像灰度值的最大值。生成的图像的灰度值范围与原始图像不同。这是缺省设置。
- Ø 输入匹配（Match Input）：原始图像和目的图像相匹配。该模式下输入和输出图像具有相同的动态范围，目的图像不使用可能的全部动态范围。

强度设定（Strength settings）：激活Set strength manually复选框，手动确定重建强度。向Strong方向移动滑块，使重建效果加强。如果向Weak方向移动滑块，效果减弱。

滑块影响去卷积前图像数据的平滑程度（图像噪音减弱）。平滑越强，图像修复的程度越弱。相反，如果平滑太弱，会产生假象，特别对于弱的原始强度的荧光图像更是如此。

如果Strength settings区域没有激活，那么Generalized Cross Validation（GCV）功能会自动确定最佳合图像处理的重建强度。这项操作统计分析图像噪音，并由此确定平滑处理的最佳数值。

单击  按钮开始进行去卷积。可以从进程条或View菜单/Windows功能里面的Joblist功能可以看到计算进程。用户也可以中止或取消计算，这样仍然有目的图像产生，只是仅含部分数据。如果达到了最佳图像质量，计算会自动中断。

## 点扩展函数（Point Spread Function）

单击Point Spread Function标签菜单。

在AxioVision 3D去卷积模块中使用从显微镜和样品得到的数据来计算理论点扩展函数（PSF）。以下数据对于计算PSF是必须的，可以在PSF参数的编辑区域进行定义：

编辑区	内容
Excitation	荧光染料的激发光波长
Emission	荧光染料的发射光波长
N.A. Obj.	物镜数字光圈
N.A. Con	聚光器数字光圈(仅透射光z-stack去卷积要求。投射光z-stack定义为相同的激发和发射波长。)
Immersion	使用的浸没介质
Ref. Index	浸没介质的折射率
Pinhole	针孔直径（仅共聚焦LSM z-stack去卷积要求）
Scale lateral	x/y方向的几何尺寸
Scale axial	z方向的几何尺寸

AxioVision中所有参数都可以由zvi图像文件自动确定。下列是必要条件：

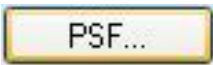
- n 图像分析系统必须已经在测微尺滑块的帮助下确定了几何尺寸。
- n 物镜已经在Microscope Configuration程序中精确设置，便于确定放大倍数和数字光圈。
- n 选择多通道荧光时，必须指定每个通道颜色的激发和发射波长。如果选择预先定义荧光染料，也就确定了相应的波长。

如果可以从图像数据确定相关的参数，则相应的输入区域处于非激活状态；而对于不能从图像文件确定的参数，相应区域处于激活状态而且必须手动定义。这时有一个对话框提示用户编辑必须的区域。

输入所有参数后，Sampling Information区域会显示过度采样的信息。

Sampling in lateral dimension (x/y刻度) 的数值应接近或大于2。由于该数值通常由物镜、摄像头适配器和摄像头本身决定，所以只能用Optovar调节该数值。

Sampling in axial dimension的数值应大于2，并且越高越好。如果低于2，在获取z-stack时，需要减小图像平面间的距离。

单击  按钮，显示理论点扩展函数。所示为去掉z轴方向PSF的中心主平面。

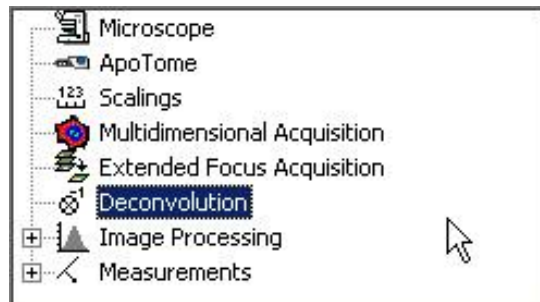
如果用户想手动修改或输入DCV参数，可单击 **Override** 按钮。用户可以编辑所有区域（单击别的区域以确认改变）。当数据改变后，按钮变成 **Reset** 并处于激活状态。单击此按钮可以将数值重新设置为上次保存的值。一旦用户用变更的数值保存了文件，旧的设置就丢失。

注意：

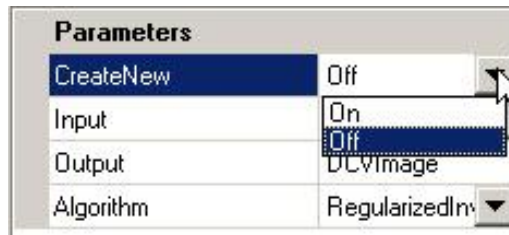
- n 当使用精确校准的系统获取图像叠时，这些数值通常是正确的，不应该改变。输入错误的数值会导致去卷积后出现不希望得到的结果。
- n 用户可以通过选择某一区域（通过View菜单选择ROI功能）来显著减少计算时间。计算只在用户选定的范围内进行，这样可以快速尝试不同的算法。

如何使用正则反相滤镜去卷积？

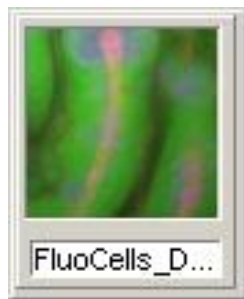
- Ø 加载合适的图像。在AxioVision浏览器光盘中有一幅3通道z-stack “Fluo cell\_DCV-Teststack.zvi”图像，适合在此应用。
- Ø 在工作区切换到Deconvolution条目。



- Ø 打开Deconvolution属性页。首先禁用CreateNew功能，以确保只产生一幅目的图像，且始终选择输入的这副图像。这样允许用户随意改变参数而不会每次改变都产生一幅新的图像。



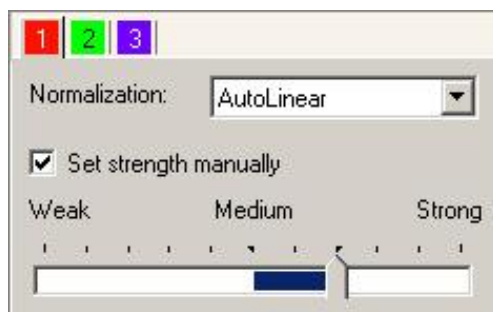
- Ø 选择Deconvolution后，如果想要的图像处于前台，则已经作为输入图像加载。否则，单击  按钮从图库中选择图像加载：



- Ø 目的图像的名字可以更改。我们推荐在命名中指出使用的方法：

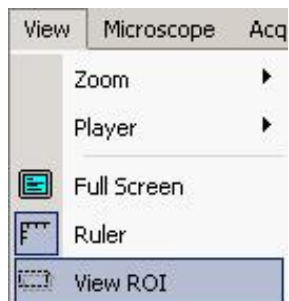


- Ø Regularized Inverse Filter方法已被选定。
- Ø 在Channel specific settings部分可以对不同通道输入不同设置，如：需要的重建强度。对第二个通道（绿色），选择手动设置强度：

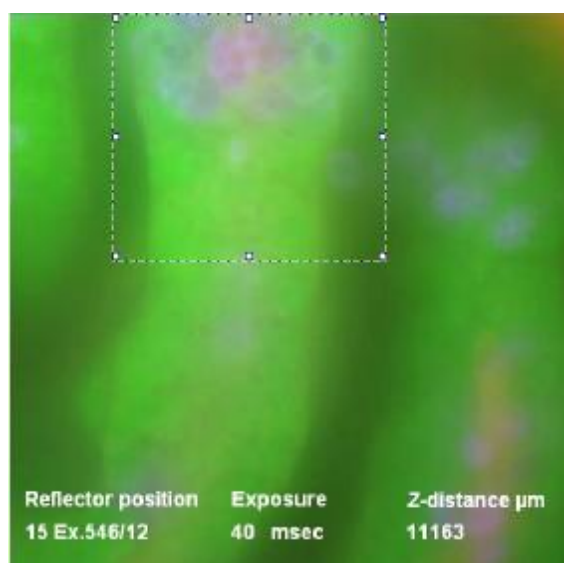


别的通道自动设置强度。

- Ø 使用AutoLinear设置进行归一化。
- Ø 使用Select ROI菜单命令定义一个亚区。

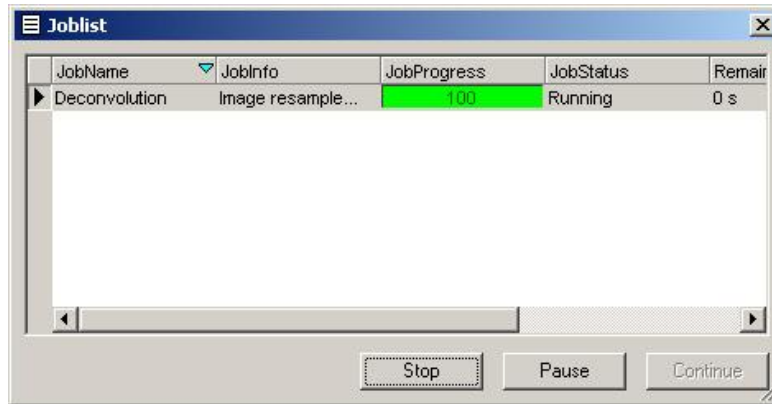


- Ø 在图像中定义一个想要进行去卷积的小区域。

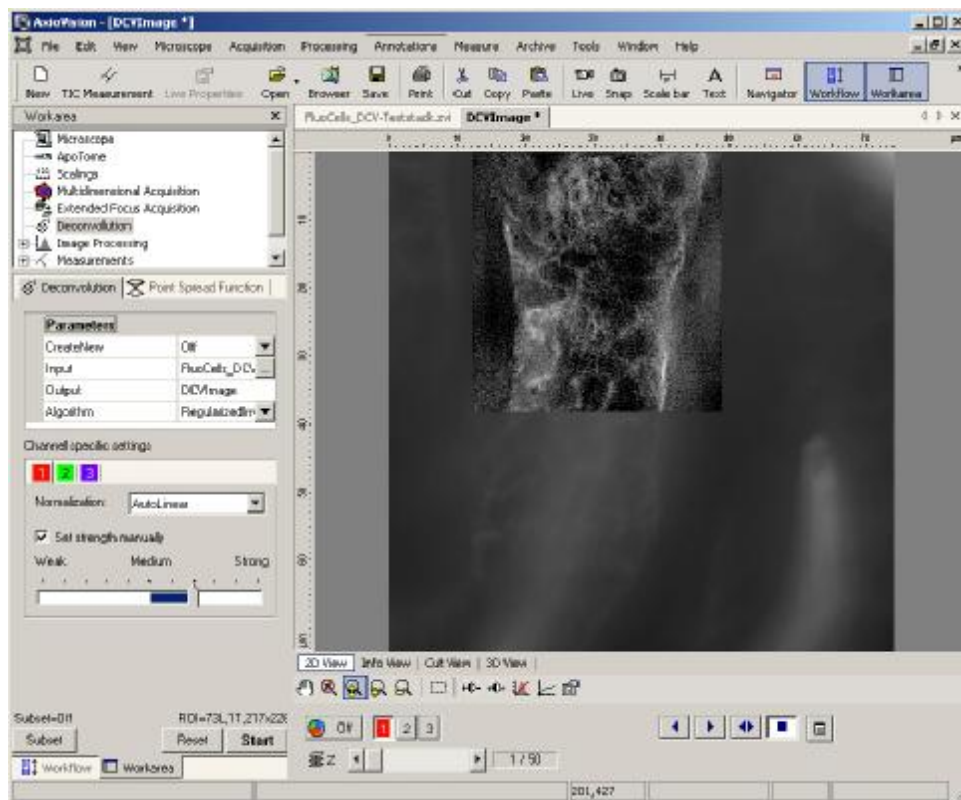




- Ø 打开Joblist (Ctrl+J)。这里用户可以随时监测处理过程。
- Ø 单击 **Start** 按钮开始处理。按照工作列表中的显示进行：

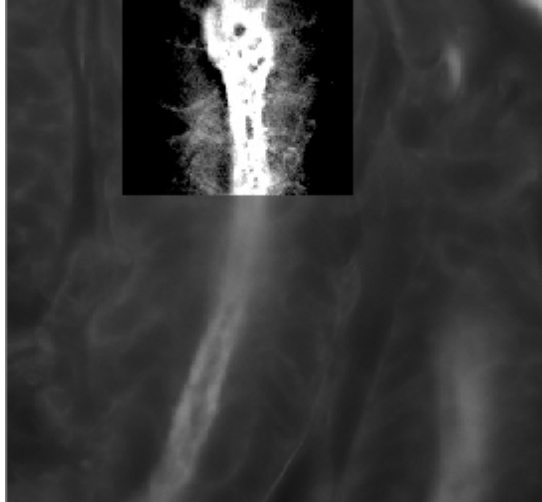


- Ø 生成的图像看起来应该是这样：




显示第一个通道，用可以看到应用于该ROI的反向滤镜的效果。

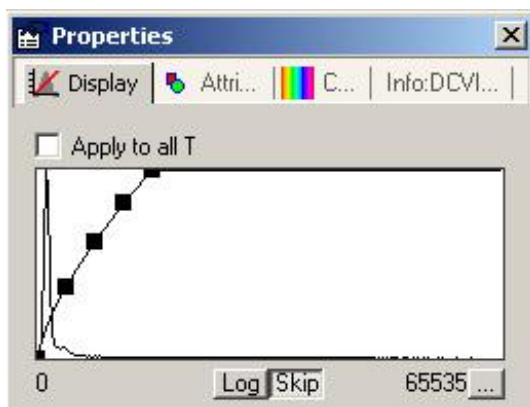
- Ø 调节Z滑块  直到大约z-stack的中心。现在图像看起来应该像这样：



- Ø 荧光细胞样品肌动蛋白结构的高亮区域显示过饱和。这是自动归一化的结果。

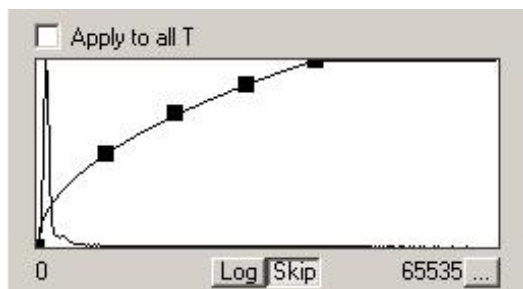
打开Properties窗口，在图像窗口的显示区域使用  按钮（或Alt+Enter）对此进行补偿。

- Ø 在图像直方图中显示特性曲线仍然和原始图像一致：

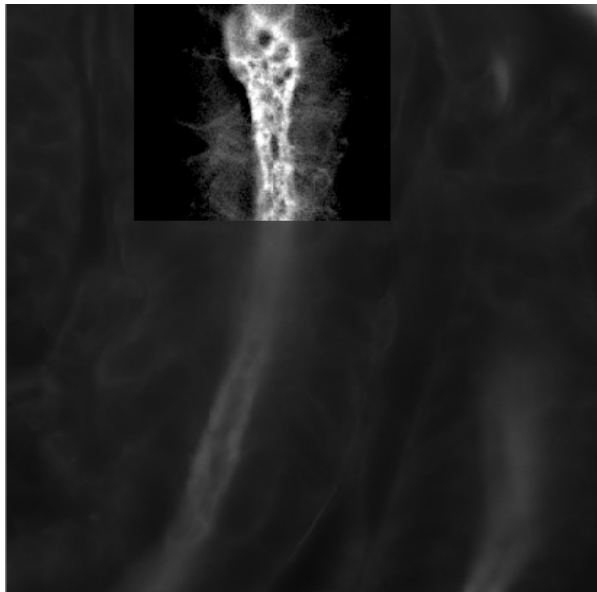


Ø 由于完全使用了16位动态范围（= 65536灰度水平），应该重新调节显示特性曲线以适应新的数据范围。

Ø 单击 **BestFit** 按钮，此按钮下面的输入区域的值应该是 1%。显示特性曲线应设置为图像中最亮像素的0.1%显示为白色，图像中最暗像素的0.1%显示为黑色。这些设置只影响监视器的显示，而不影响图像的像素值。直方图现在看起来应该像这样：



Ø 图像对比度设置大致正确。这意味着用户可以适当地评估去卷积增强的图像部分。

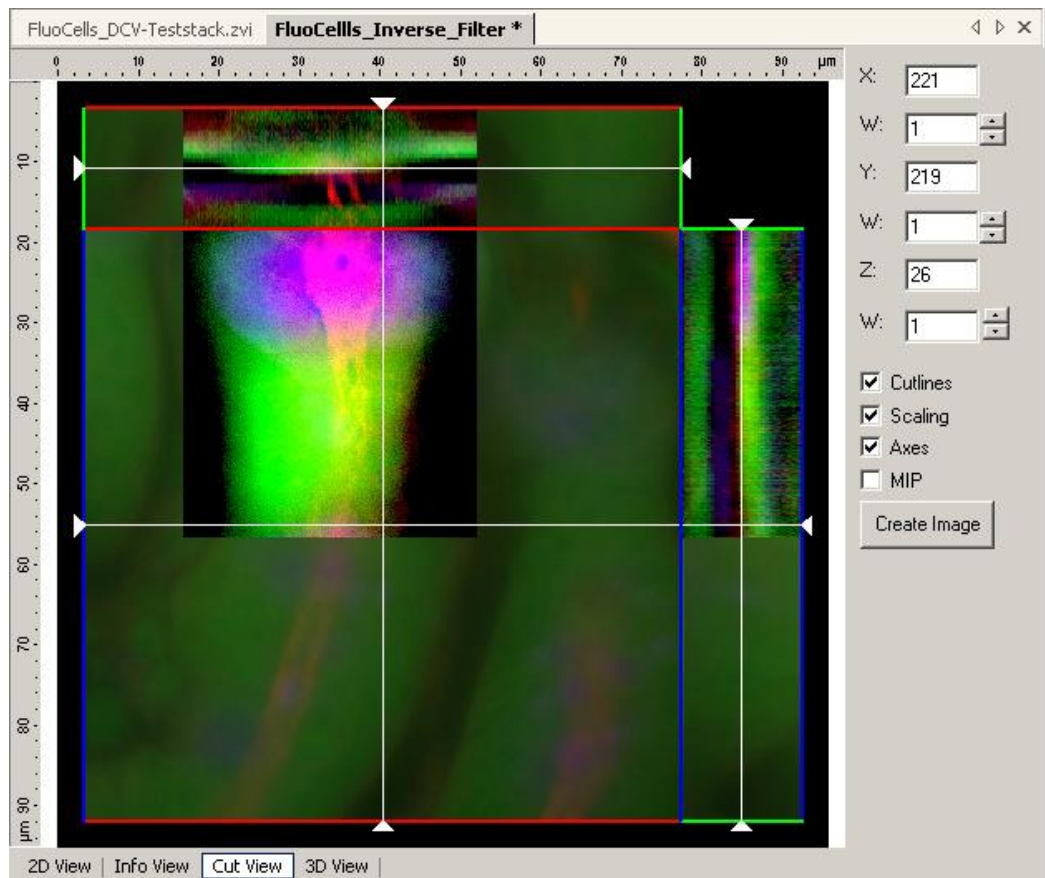


- Ø 对通道2、3重复以上步骤直到在叠加彩色模式

(按钮)下可以看到一个好的高对比度图像。

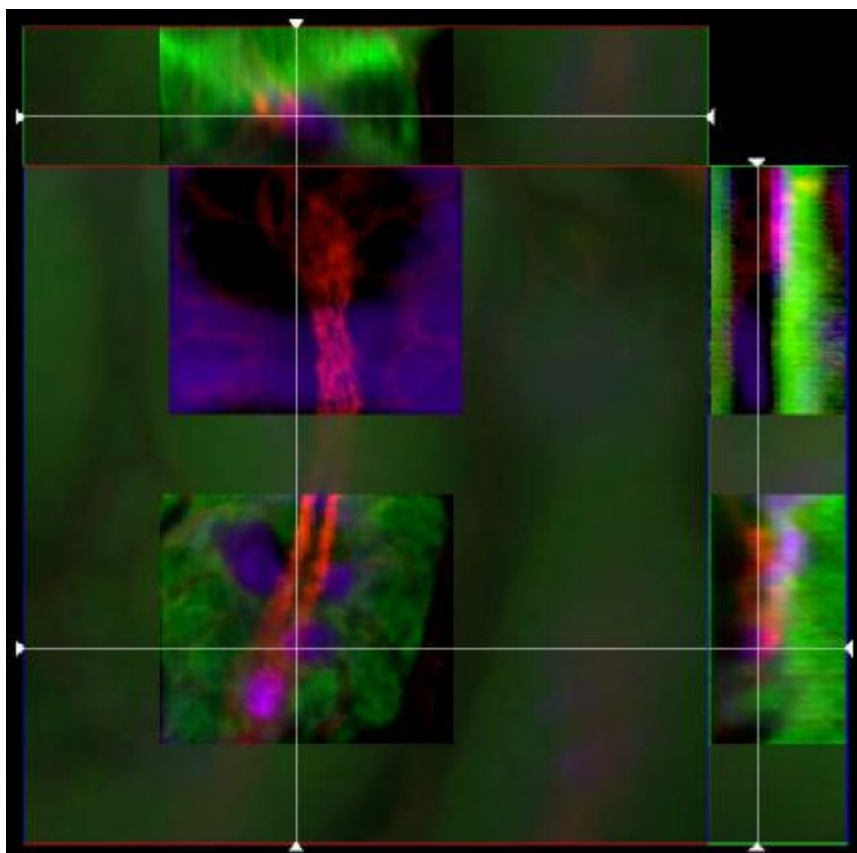
- Ø 正交视图对于评估结果特别有用。单击Cut View标签

切换到正交视图。将正交线放在去卷积区域内（例如）：



- Ø 现在可以清楚地看到对比度提高的效果。尤其是绿色通道（代表荧光细胞样品中肠细胞核）和红色肌动蛋白只有在去卷积后才可以清楚地分开。

- Ø 然后可以用不同参数和去卷积方法进行实验。如果不改变生成图像的名字，每次单击 **Start** 按钮都会覆盖上次生成的图像。选择不同方法后，在输入图像内移动ROI（感兴趣的区域），可以在单一生成的图像中同时显示不同的去卷积方法。



- Ø 保存想要的图像。

## 12 图像分析模块

### 12.1 互动测量

#### 概述

互动测量模块是基本程序的一个标准图像分析功能。它提供两个额外的特性：

- Ø 测量参数扩展列表：除已有的标准参数外，还包括几个距离测量工具，两个圆弧测量工具（可用鼠标确定轮廓），以及其它一些工具。
- Ø 用于在互动测量中生成测量程序的向导。

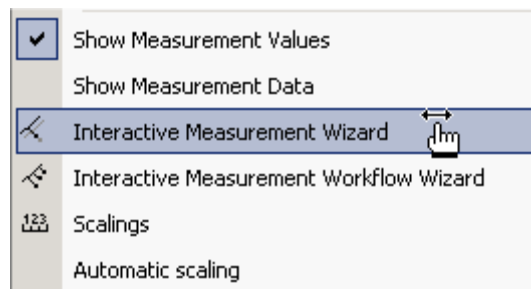
#### 注意：

- n 请先阅读第七章“图象分析”以了解如何使用测量功能的背景知识和基本操作。
- n 所有测量参数的完整列表和详细描述可在在线帮助里找到。

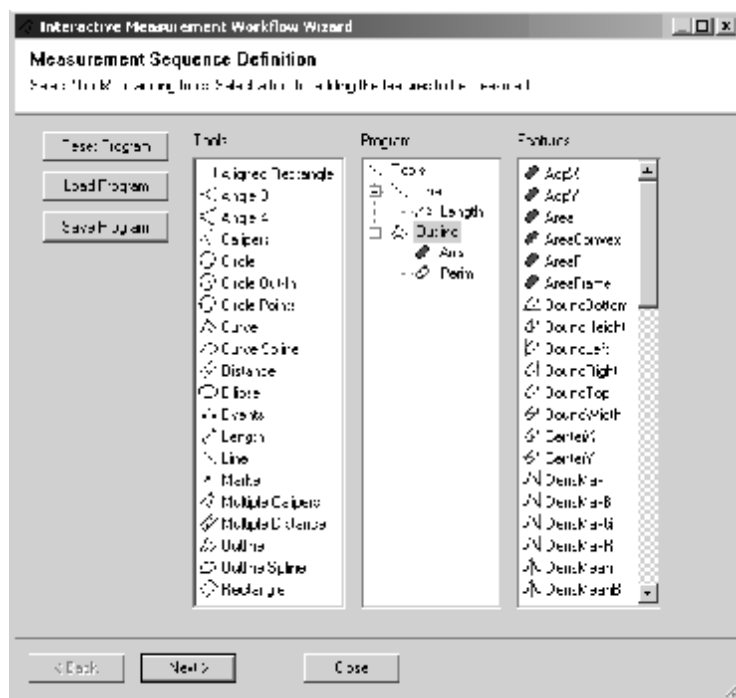
#### 测量程序向导

测量程序可以把用户选择的必须按一定顺序运行的参数放在一起，从而建立一种电子工作指令，以确保测量顺序正确完整。该程序可以保存并在以后常规调用

- Ø 从Measure菜单中选择Interactive Measurement Wizard功能以启动向导。

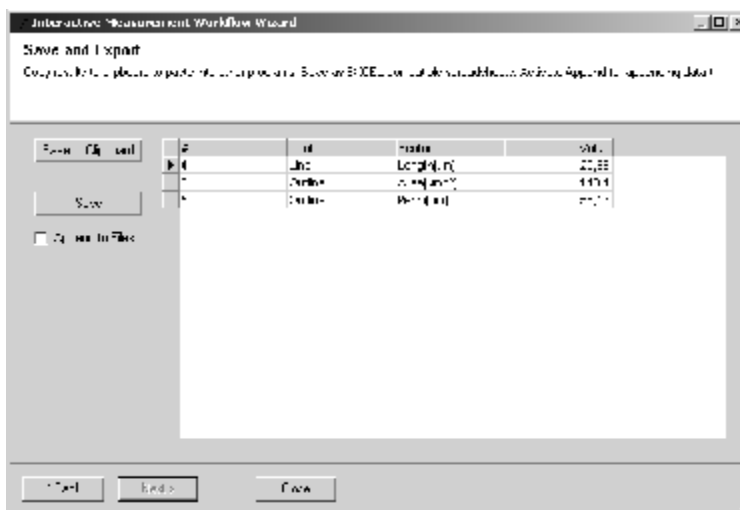
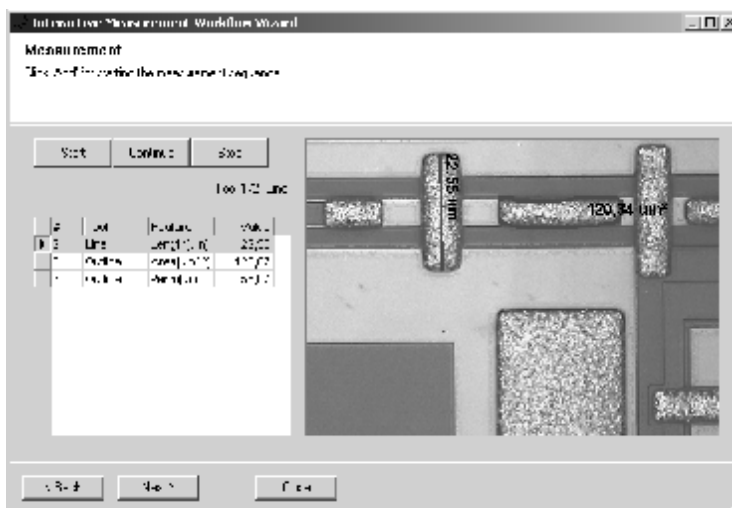


- Ø 双击Tools列表，把各个参数添加到测量程序。
- Ø 双击列表中的参数，继续添加选定的参数
- Ø 可以通过Reset Program按钮从程序中删除条目。
- Ø 单击Save Program保存程序（或单击Load Program调用已保存的程序）



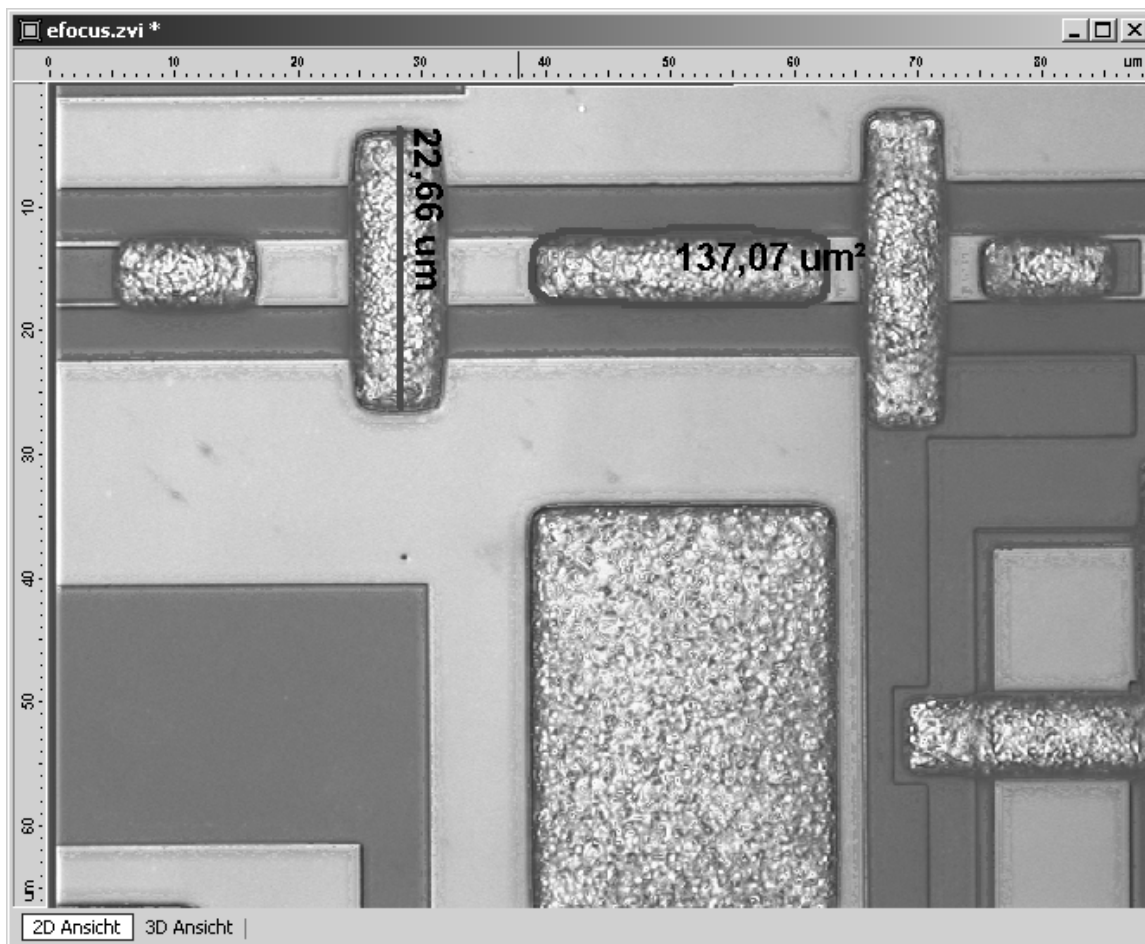
- Ø 单击Next.






- Ø 单击Start启动测量序列，直接把参数拖到图象中。
- Ø 当前参数显示为文本。
- Ø 已测量的参数自动显示为列表。
- Ø 单击Next.
- Ø 最后所有已测量的值显示为一个列表。
- Ø 如果图象不是以ZVI格式保存，则单击Save输出测量数据。
- Ø 单击Close退出向导

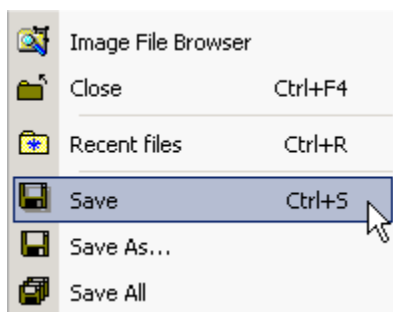




Ø 退出测量程序向导后，测量结果显示为注解。



Ø 单击Standard工具栏中      的Save或从File菜单中选择Save功能以保存测量结果。



注意：

n 只有当图象保存为ZVI格式时测量数据才会保存在图象里。

## 12.2 自动测量（AutoMeasure）

### 概述

对图象中感兴趣的对象进行自动测量和硬件的快速发展紧密相关。没有这些发展，进行这些测量将会花费大量的时间（某些情况下涉及数百张图片）。

得益于现代PC的性能，现在可以运用越来越复杂的图象分析功能，并进行自动计算。

“自动测量”尤指对感兴趣的对象的自动识别（automatic recognition）。与互动测量相反，它不再需要用鼠标去勾勒图象中待测对象的轮廓。基于其亮度、色彩以及其他描述性参数（形状、大小等），程序可以自动识别这些对象。

自动测量主要包括6个步骤，这些步骤代表了图象分析的一般过程。它们不仅适用于AxioVision，对其它类似程序也相似。现简要说明如下：

#### 1. 图象获取

图象获取是分割之外图象分析中最重要的步骤。用户需要通过图象获取来得到可用的原始数据。图象信息缺乏甚至错误的情况下不可能得到精确的测量结果。它甚至会使本来很简单的样品变得无法分析。这种情况下用户只能切换到互动测量模式下。

在图象获取时没有得到的信息很难通过图象增强来重建，在很多情况下这根本不可能。

用户必须充分利用显微镜和摄像头的优势，通常在样品制备方面会有比较大的提高空间，因此应对样品的质量精益求精。

## 2. 图象增强

一般说来，可以分为两种实际情况：

图象的光学增强（optical enhancement）有助于用户正确解释测量系统的精确度。这包括亮度和对比度的增强和gamma校正。然而，图象的光学增强不会影响识别结果的质量。

用于数据提取（data extraction）的功能可以增强识别效率，从而在某些图象质量不够好的情况下也能进行自动测量。这些功能包括，例如，消除光照缺陷（阴影校正）。

## 3. 分割

分割是自动测量正确进行的关键。该处理过程涉及到由测量系统自动检测待测对象，并同图像背景分开。最初该步骤是基于亮度或色彩信息来进行。用鼠标在图像里画出参照物的轮廓或者使其高亮，然后AxioVision就自动识别出其它所有对象。也可以使用亮度或色彩分布直方图直接设定一个代表待测对象亮度或色彩范围的阈值，但这需要有一定的经验。

分割结果产生一个“测量遮罩”，由内置的所谓二进制图像显示，该遮罩用黑色把背景区域掩蔽起来，而待测区域显示为白色。

用户不会直接接触到该遮罩，它在AxioVision中显示为叠加在原始图像上的彩色图像。

#### 4. 处理测量遮罩

只有当仅有待测对象被正确识别之后才能进行测量。但有时不可能正确识别，程序可能产生用户所不希望的假象，例如测量了不需要的对象或者由于几个对象靠在一起而被认为是一个。在开始测量前，这些必须进行校准。

典型的处理步骤包括删除假象，填充对象内部的缺陷，和自动分割对象。某些情况下还需要进行互动处理（删除，分离，画出对象等）。

#### 5. 测量

在测量中，测定选定的参数并把它们保存为两种结果文件，分别对应于所谓的区域特定的（region specific）和视野特定的（field specific）图像数据。

- Ø 区域特定的图像数据测定图像中各个对象（即图像区域），例如，待测对象的面积、周长和形状，或者其光密度值如平均灰度值。测量结果以每个区域（或对象）一行的格式输出到结果文件中。
- Ø 视野特定的图像数据指对整个图像视野（field）测定的数据，例如对象数目或对象占据整个图像的比例等。视野特定的测量在结果文件中显示为一幅图一行。

## 6. 计算

在用感兴趣对象的测量数据对图像下结论之前，需要先对这些数据进行计算。由于已经有很多可用的计算程序如Microsoft Excel，AxioVision自己没有配置计算程序，结果数据可以以Excel格式输出。

除了纯粹的测量数据之外，还应该保存图像结果，以确定数据是由哪些对象产生的。AxioVision可以以轮廓线显示对象，并把数据直接显示在图像中。

### 自动测量模块概念

自动测量模块的概念基于Carl Zeiss在自动图像分析领域多年的经验。在大多数情况下，可用功能中只有一小部分会实际用到，所以本模块的目的就是把这些功能组织起来，使它们便于操作，使不太熟悉的用户也能快速准确地进行测量。

由于自动测量一般不会只分析一幅图像，而是分析大量图像，这时通过菜单功能或者工作流程来进行互动测量常常是不现实的。然而，利用自动测量模块用户可以快速高效地测量图像（下面将会进一步讨论）。

涉及的两点——“复杂技术，简单实现”和“大量图像分析”——反应在自动测量模块的结构中。

该模块由两部分组成：

- Ø 自动测量程序向导（Automatic Measurement Program Wizard）使用户可以快速简便地生成自动测量程序。
- Ø 运行自动测量程序功能使用户可以对任意数量的图像执行所生成的程序。无论这些图像是通过摄像头获取的还是已经存在的文件。

注意：

- n 这里要强调自动测量模块不一定适用于所有需求。它只是作为简化日常工作的工具。
- n 利用高级自动测量（AutoMeasure Plus）模块可以进行更复杂的任务。在该模块中所有图像分析功能都可以通过AxioVision菜单使用，并且可以自由组合。具有一定数字图像分析背景知识的用户可以生成复杂的程序来实现各种各样的应用。

## 自动测量程序向导

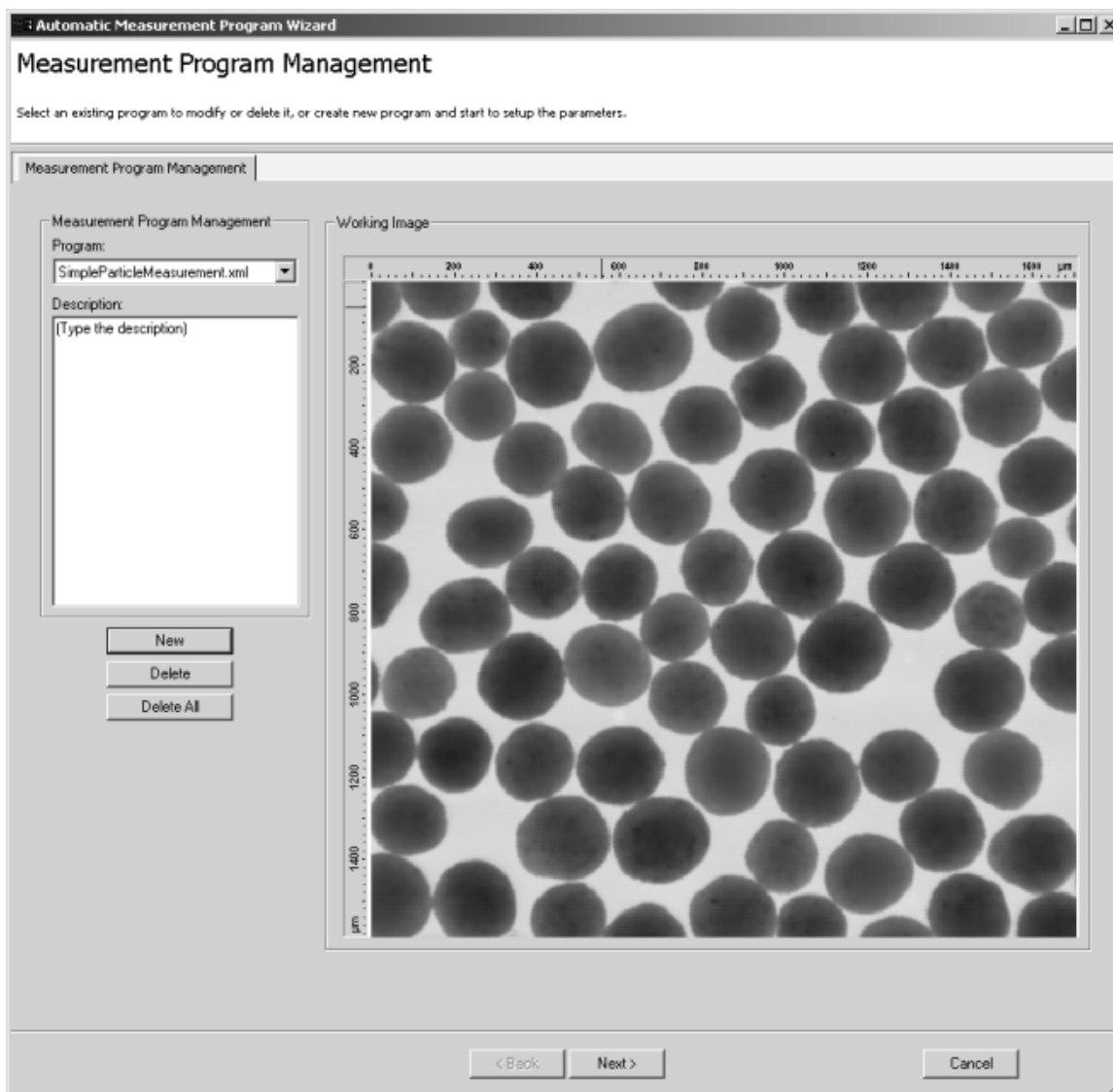
自动测量程序向导引导用户逐步完成数字图像分析的各个步骤（参阅本章前面的“概述”）

从硬盘加载或用摄像头采集一幅图像，然后运行Measure菜单中的Automatic Measurement Program Wizard功能。关于各个步骤、功能和功能参数的进一步信息请参阅在线帮助（F1键）。

在各步骤中可以使用以下功能：

## 程序管理

程序管理给出可用程序的概览和简介：



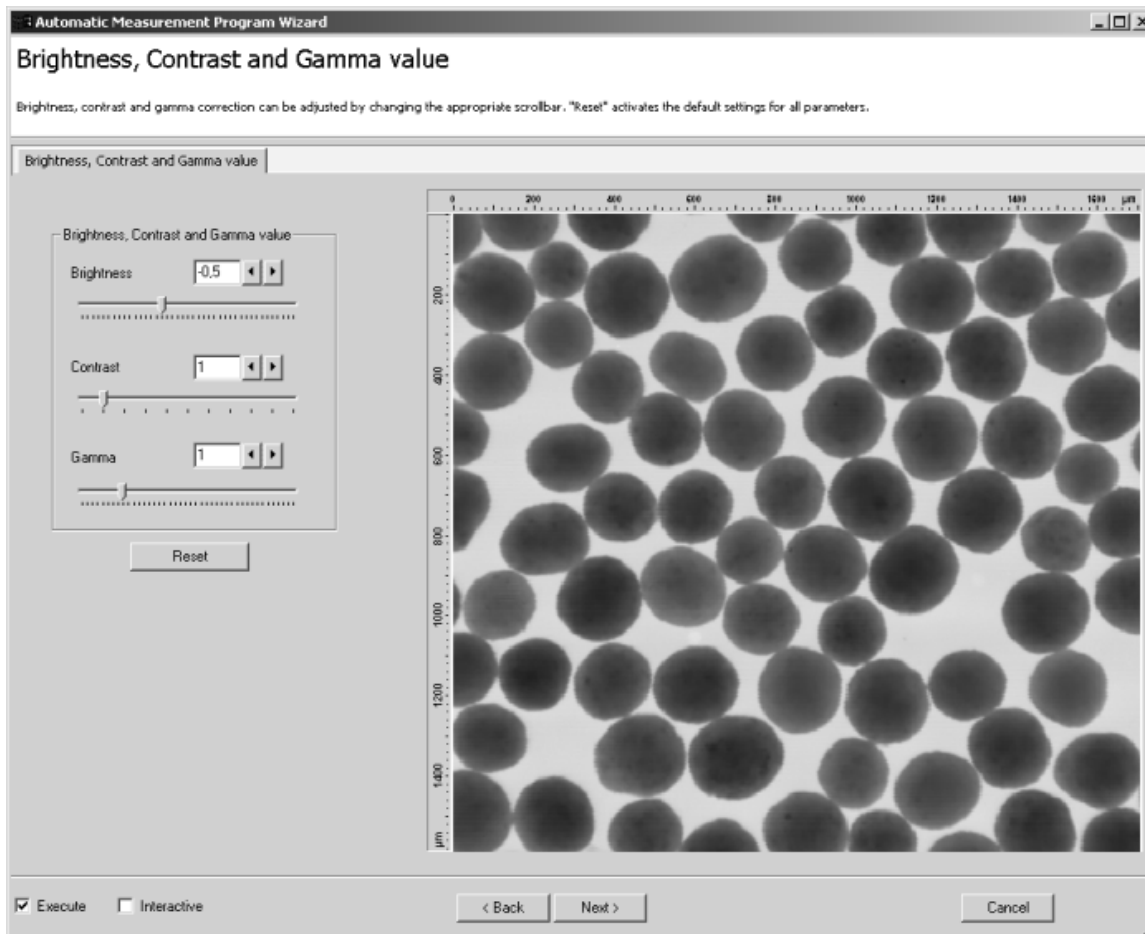
### 程序概览和选定程序的简介

注意：

- n 测量程序默认保存在“My Documents\Carl Zeiss\Data\Automatic Measurement Projects”文件夹中。

## 图像增强

光学图像增强包括亮度调节、对比度增强和gamma校正。



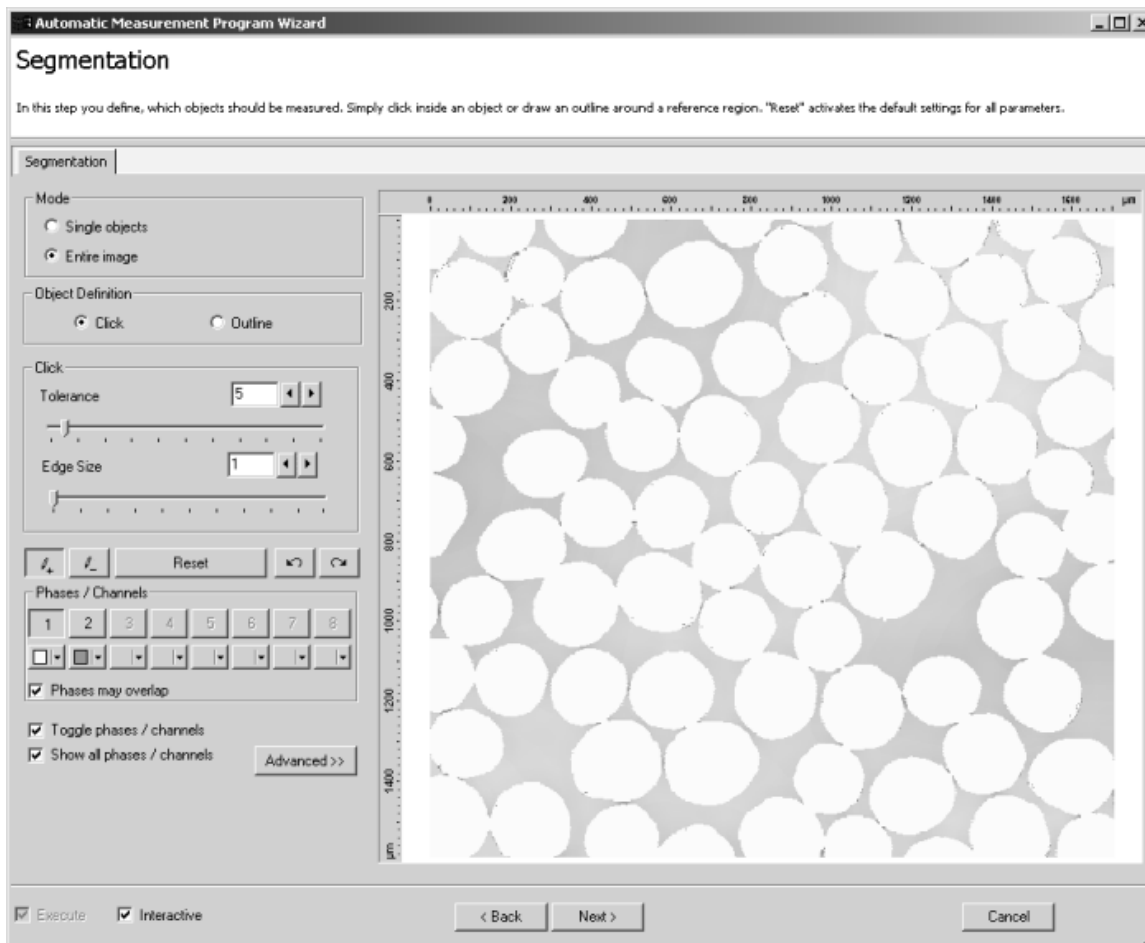
### 亮度、对比度和gamma值增强

图像可以进行平滑（Sigma滤镜）、光照错误校正（阴影校正）以及对对象边缘锐化（轮廓）。



## 分割

分割可能是自动测量模块最强大的功能。



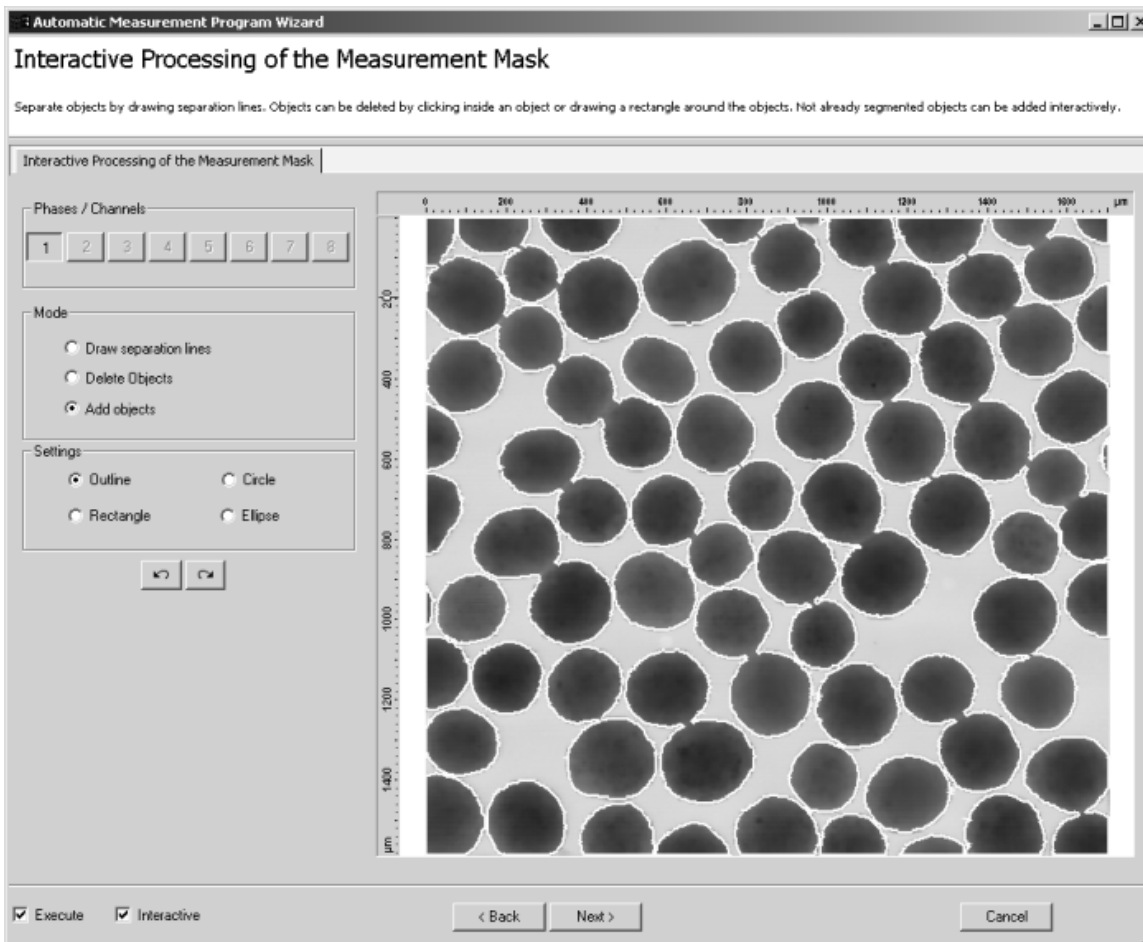
图像分割对话框

用户仅仅通过单击或者描出参照对象的轮廓就可以把待测对象和背景分开。选择是仅需要分割单个对象还是整个图像。

对于多维图像，用户可以对多通道图像的每个通道分别进行分割。如果是使用“正常”的灰阶或者彩色图像，最多可以定义8个相（取代通道）。

## 执行测量任务（二进制图像处理）

一般说来，必须同时处理分割时生成的测量遮罩以保证只有需要的对象是高亮的。



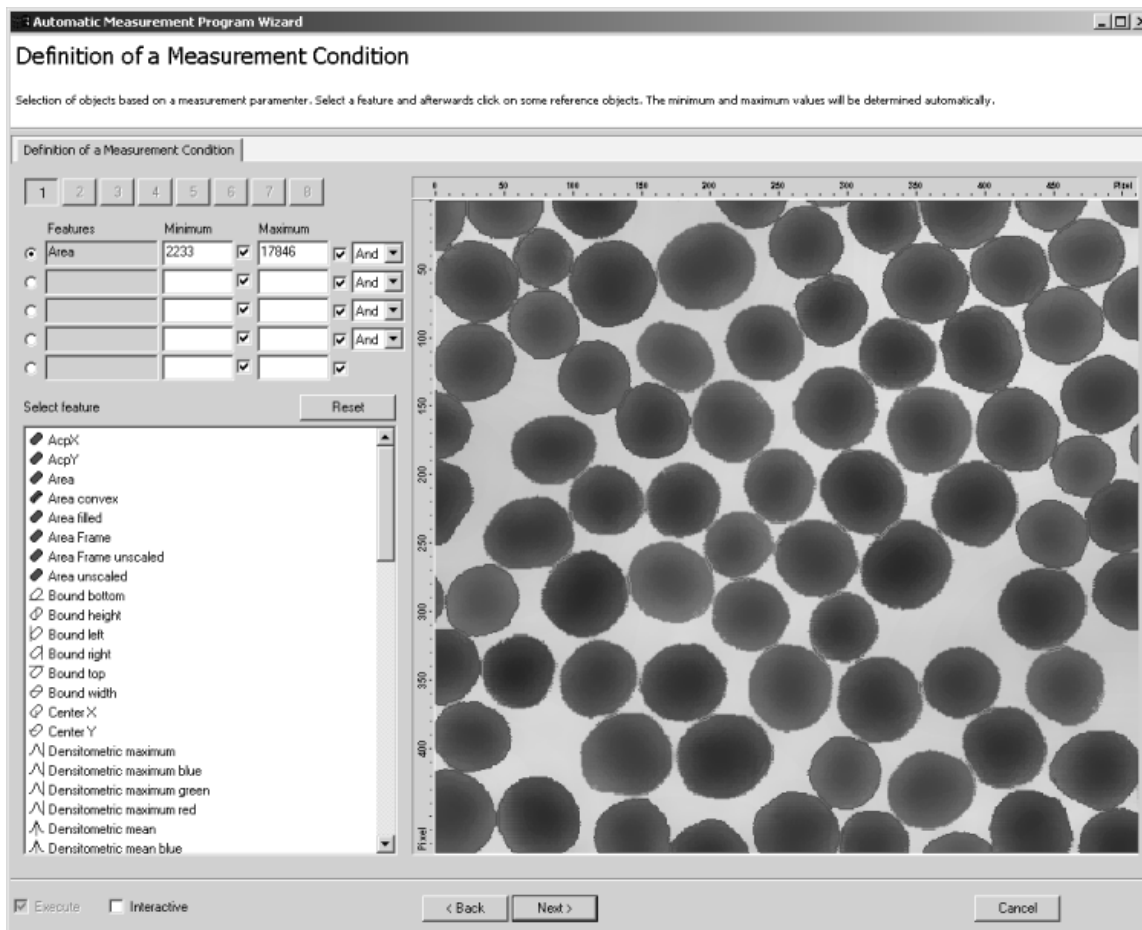
### 测量遮罩的互动校正

测量向导包含自动分割目标对象（侵蚀/扩张、分水界）和随后对遮罩的互动处理（添加分割线、删除和添加对象）的功能。

两个步骤开始的功能都是消除假象和填充缺陷（清理测量遮罩）。

## 测量

实际测量程序由几个步骤组成，这样可定义测量执行的详细情况。



定义测量条件（“对象滤镜”）

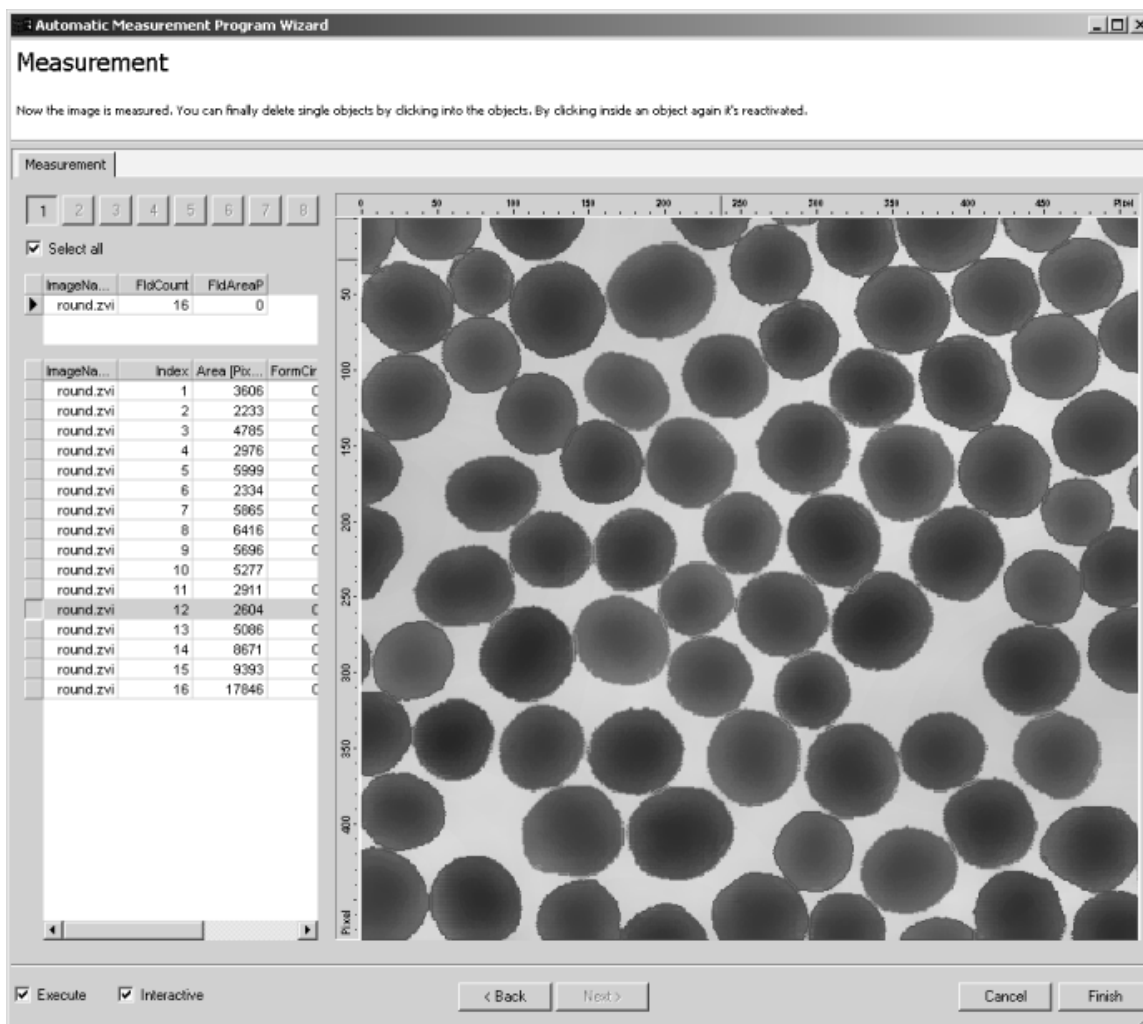
### 各个步骤

- Ø 确定区域特定（单个对象的）和视野特定（整个图像）的测量参数。
- Ø 定义测量结束后已测对象的显示方式（轮廓线、测量参数等等）。
- Ø 生成测量条件，定义测量对象必须满足的条件，即所谓的“对象滤镜”，例如，可用于指定只有在某一大小范围内的对象才被测量。

- Ø 定义测量框架，指定图像边缘的对象应该如何处理以避免可能造成的测量误差。

## 计算

最后一步，AxioVision再次显示选定用于测量的对象，用户可以进行任何修改，例如，单击即可删除单个对象。



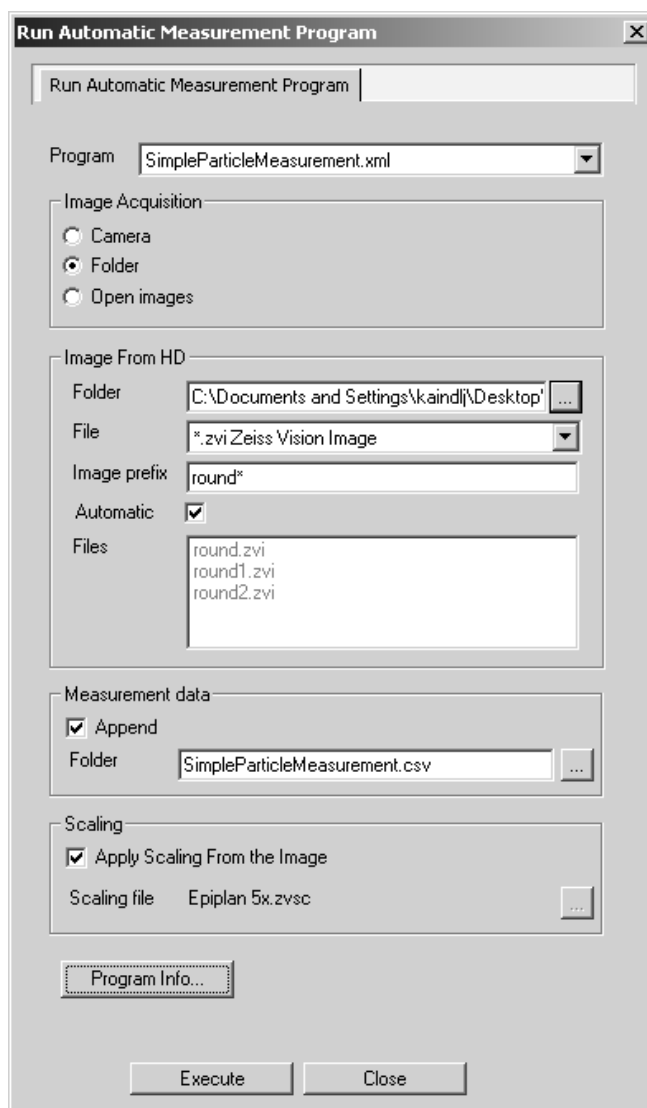
测量数据最后以所谓的CSV（逗号分隔数值，Comma Separated Values）格式保存。它是一种纯文本格式，各个值之间用特定符号分隔开，各个国家有通过Windows控制面板设置的不同标准。

CSV格式的文件有两个优点：一方面，它们可以直接用Microsoft Excel 打开和处理；另一方面，它也可以被导入到任何其它程序中。

## 执行测量程序

测量程序生成后可以任意数目的图像进行系列分析。从Measure 菜单启动Run Automatic Measurement Program功能即可。

关于各步骤、功能及其参数的进一步信息请参阅在线帮助（F1键）。



执行测量程序的功能

注意：

- n 测量向导在最后以表格形式显示测量结果，该向导也可以用于单个图像的测量。一个有用的特性是，用一个辅助程序（具有相同的名字）来取代了每次重新生成新的测量程序。

## 12.3 高级自动测量（AutoMeasure Plus）

### 概述

自动测量模块主要设计用于简单操作（即灵活性较差），而高级自动测量则设计用于各种各样的用途。

使用这些功能需要有一定的图像分析处理知识。在使用高级自动测量模块之前，用户应先阅读12.2节“自动测量”，用户可以找到测量的基本程序及其背景知识。

### 高级自动测量模块概念

为了给用户提供尽可能大的灵活性，测量中所用到的所有功能都可以通过Processing和Measure菜单执行，而自动测量中所有功能只能通过向导调用。

一般说来，有两种途径可以自动进行测量：

第一步包括指定在时间测量中所要执行的操作。也就是说需要指定测量属性（参阅“使用自动测量的功能”）。在本步骤中有以下问题：

- Ø 要测量哪些参数？
- Ø 如何处理不是全部显示在图像中的对象？

Ø 是否要求仅有满足特定条件（例如，面积在50和100  $\mu\text{m}^2$ 之间）的对象被测量？

有向导指导用户来定义这些设置。属性定义好之后可以保存下来，并在需要的时候调用它们（同样由向导指导）。还有一个单独的功能可以在进行测量前先测试用户的设定。

第二步就是利用用户定义的设置进行测量。

通常有两种途径可以进行自动测量：

- Ø 通过 workflow 或者工具栏调用各个功能（参阅9.4节“调整用户界面”）
- Ø 利用VBA模块生成应用程序（参阅12.1节“VBA”）

## 使用分割功能

下列步骤也适用于其它原始图像。示例图像安装在AxioVision文件夹中，默认为“C:\Program Files\Carl Zeiss Vision\AxioVision4\0007\Templates\Images”文件夹。如果没有找到，可以从AxioVision浏览器光盘中加载。

## 动态分割

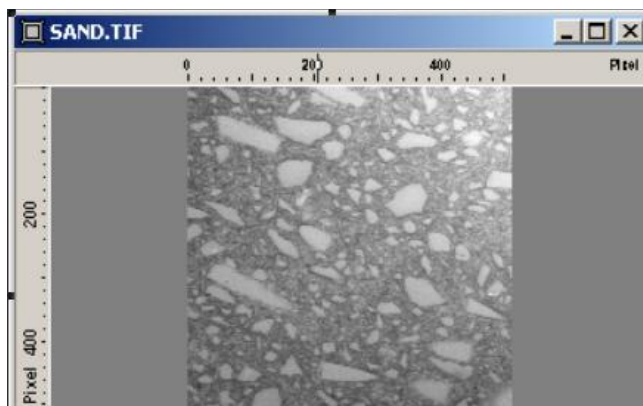
动态分割对于检测在变动背景中的精细结构尤其有用，这时仅仅用阈值分割不能达到好的效果。

当然动态分割也适用于光照不均匀的图像。动态功能内置了平滑滤镜，可用于平衡背景的不均匀光照或灰度波动。



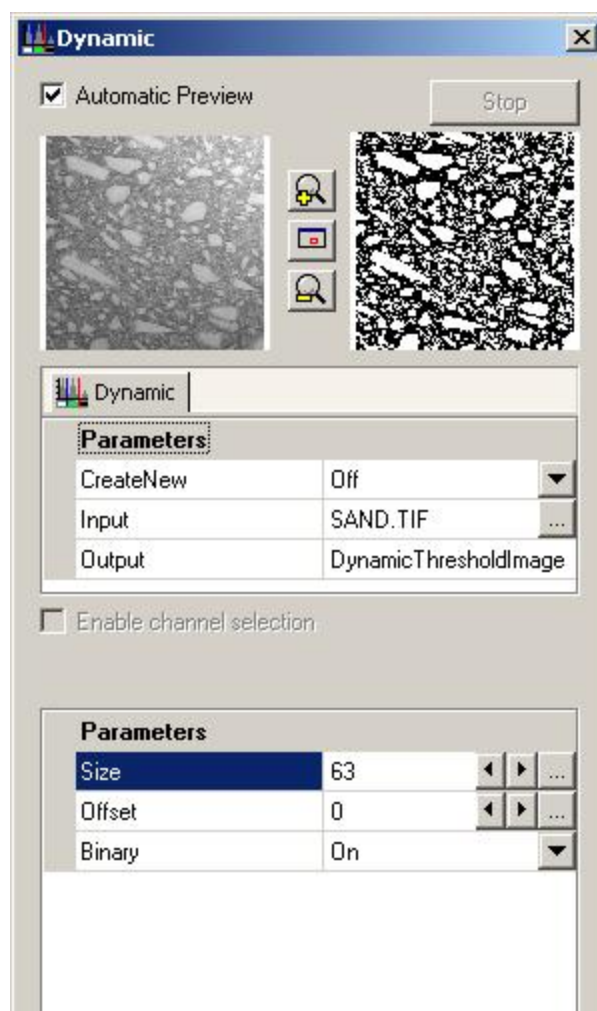
下列例子逐步讲解如何进行动态分割。

- Ø 通过功能File Open Image加载图像“SAND.TIF”，或用摄像机获取一幅图像。
- Ø 图像显示在AxioVision的图像窗口中。

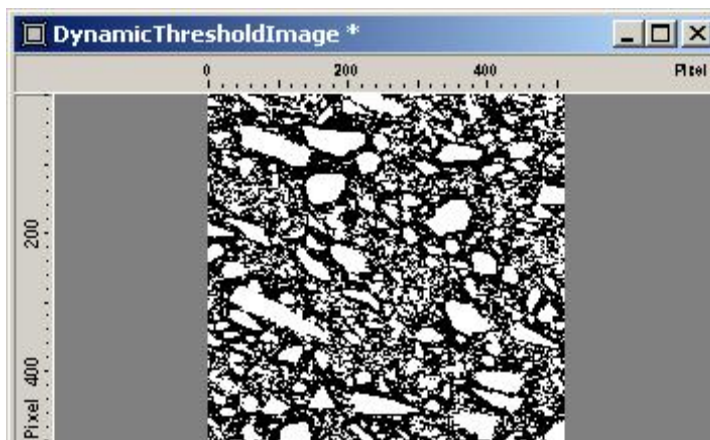


从Processing菜单中选择Segment功能群，然后选择Dynamic功能。

- Ø 现在可以看见Dynamic功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览 (Automatic Preview) 多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 通过点击箭头或直接输入设定Size值为63，Offset为0。
- Ø 设定Binary为On.
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。

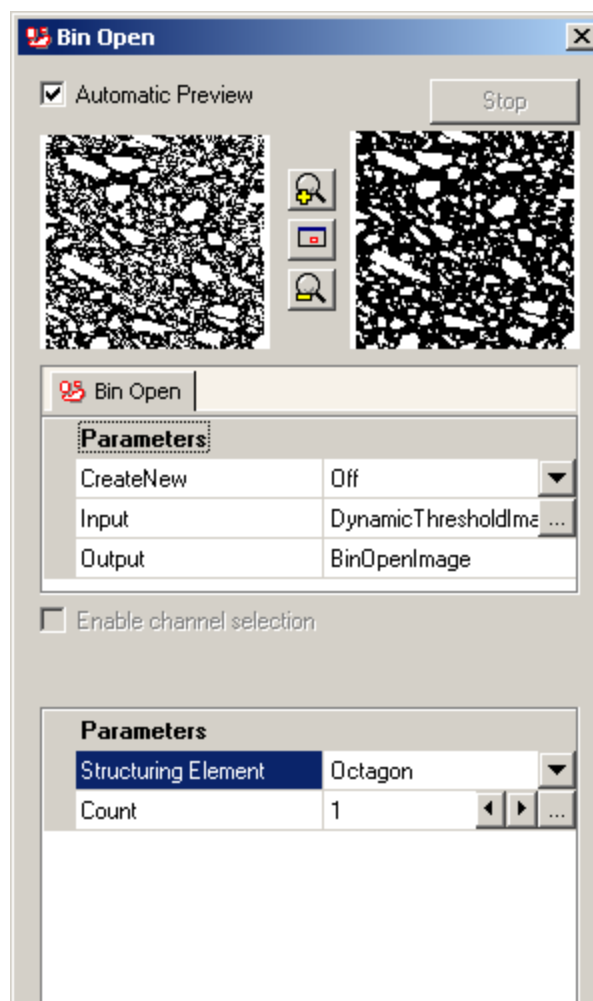


- Ø 生成的图像具有良好的分割结果。
- Ø 尽管原始图像光照不均匀,但事先没有进行阴影校正。
- Ø 图像的亮度不均匀由动态分割进行了补偿。

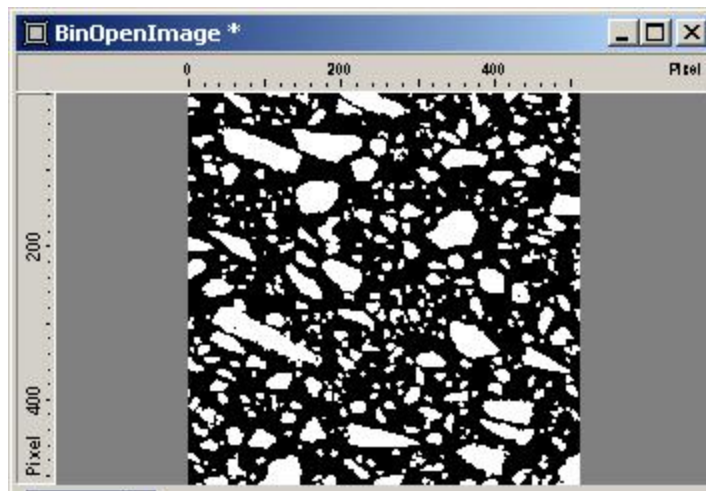


现在用户可以进一步处理二进制图像。从Processing菜单中选择Binary功能群,然后选择Bin Open功能。

- Ø 现在可以看见Bin Open功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览 (Automatic Preview) 多选框,用户可以看见缩小的图像。
- Ø 设定Structuring Element为“八角形 (Octagon)”, Count值为1。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。



- Ø 在生成的图像中，对检测到的对象进行了平滑，小的对象被去除。



### 多通道 z-stack 图像中一个荧光通道的自动分割

在检测多通道z-stack图像中的结构时，可以选择是测量整个z-stack图像，还是所有通道或选定的某一通道。

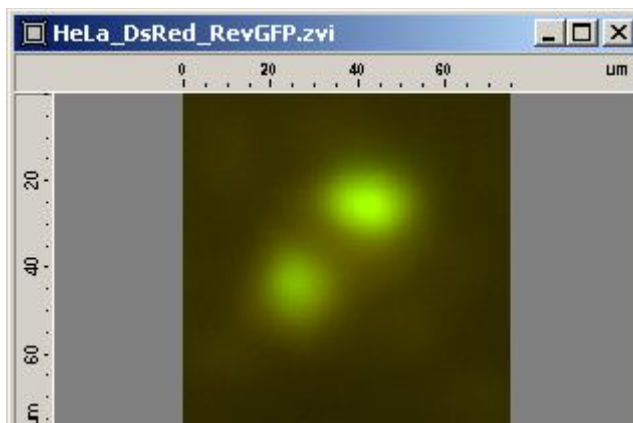
由于各个通道的色彩和结构会有显著不同，因此可以逐个通道进行设定。对于各个图像不需要分别输入z-stack的特定设置。对单个图像所作的设置应用于z-stack中所有图像，可以非常快地产生检测结果。

图像的自动分割依赖于对图像灰度分布的局部最小值进行自动检测。**Automatic**利用这些最小值作为阈值以从背景中分离待测结构。也就是说不需要在**Threshold**功能中那样手动输入阈值。

常常只有在某一荧光通道中的特定结构（例如细胞核）是用户所感兴趣的。在多通道z-stack图像中，每个通道的z-stack具有相同的切面数。某些情况下待测结构并不出现在整个图像叠中。设置**Subset**可以选择各个通道或切面。

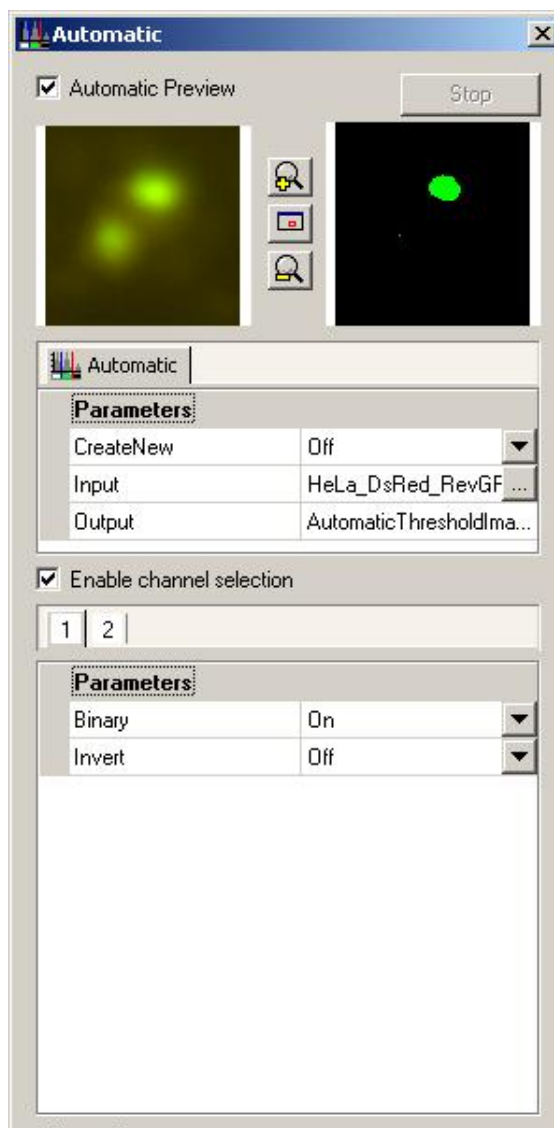
下列例子逐步讲解如何对多通道荧光z-stack图像中一个荧光通道的选定切面进行分割。

- ∅
- ∅ 通过功能File Open Image 加载图像  
“Hela\_DsRed\_RevGFP.zvi”,  
或用摄像头获取一幅图像。
- ∅ 图像显示在AxioVision的图  
像窗口中。

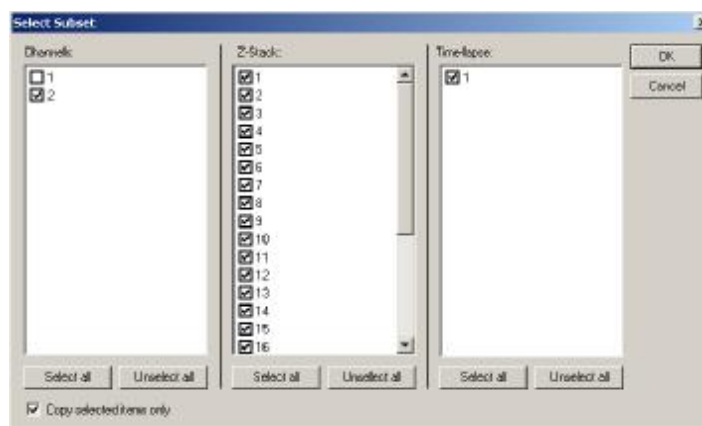


从Processing菜单中选择Segment功能群，然后选择Automatic功能。

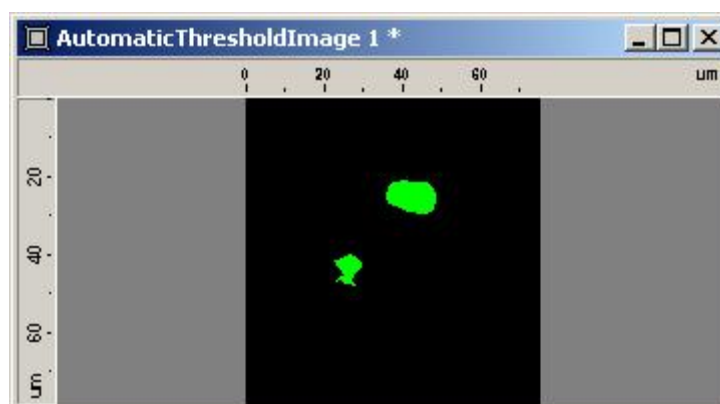
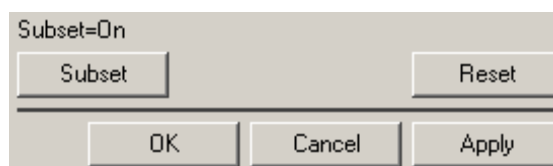
- ∅ 现在可以看见Automatic功  
能对话框。
- ∅ 如果激活了自动预览  
(Automatic Preview) 多选  
框, 用户可以看见缩小的图  
像。
- ∅ 单击Subset在Select Subset  
窗口中输入指定设置。



- Ø 只激活需要分割的通道(本例中为通道2)。
- Ø 前5各切面几乎没有什么结构,不必考虑。单击它们使其无效。
- Ø 激活Copy selected items only复选框,这样只有选定的通道和切面被分割。



- Ø 单击OK.
- Ø 单击Automatic对话框中的OK关闭对话框。
- Ø 生成的二进制图像只包含通道2的选定切面。该图像可以作为自动测量的遮罩。



## 边缘检测

许多图像中对象和背景之间没有明显的区别。不同对象靠得很近,通过亮的或者暗的边线分开。这时,阈值分割不能达到满意的效果,因

为轮廓具有显著的灰度波动。对于这种图像，边缘检测能提供解决办法。

考虑一幅具有大范围灰度值的图像，具有暗灰度形成的谷（Valleys），也有亮灰度形成的峰。在下例中将使用Valleys功能来检测明暗之间的边缘。

在检测边缘之前需要用Sigma功能进行平滑。高的Sigma参数值以为着强的平滑。

通常边缘暗度不一致。可以通过Threshold参数来控制边缘检测。低的Threshold将排除亮的边缘，而高的Threshold值会检测到较少的边缘。通常该值设为较低，以保证所有边缘都被检测到，然后再除去假象。

注意：

- n 请注意Threshold的设定取决于图像的象素类型。Threshold值为0.00001对应于16位图像的灰度值（1/65536）。对于8位图像，灰度值相应为0.03（1/255）。这就意味着对于16位图像Threshold值可以很低，而对8位图像就必须设得较高一些。

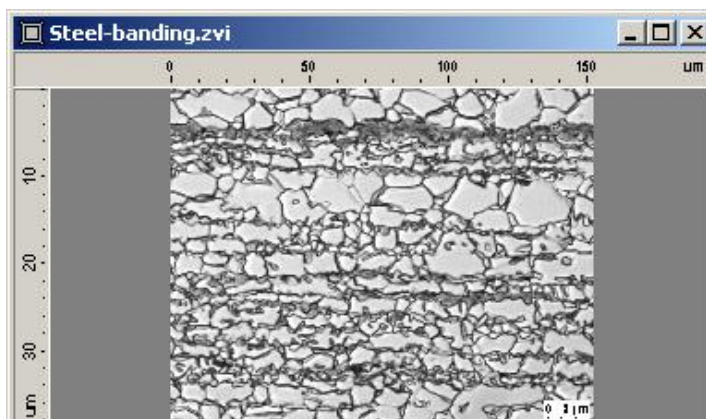
如果图像的待测对象是由亮的边缘分开的暗的物体，建议在应用Valleys功能前先对图像反相。可以使用Contrast功能组中的Negative功能或者Binary功能组中的Not功能来进行反相。

如果使用彩色图像作为输入图像，在执行Valleys功能前后应先把图像分为不同通道（Utilitie功能组，Split Channels功能），分别处理这些通道，然后再在测量前组合成一幅二进制图像（Binary功能组，Or功能）



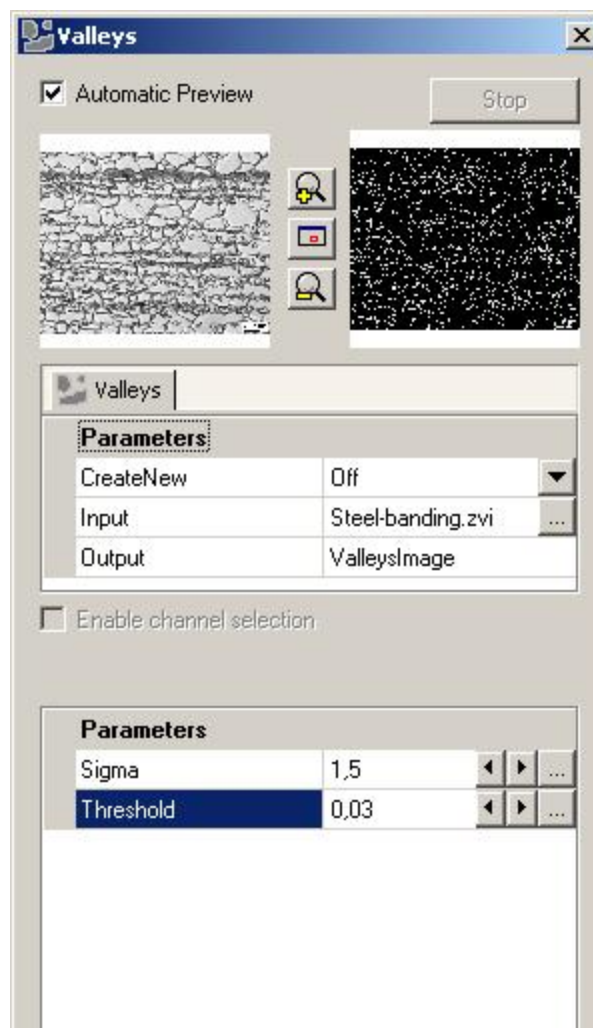
下列例子逐步讲解如何检测由暗轮廓分开的亮结构的边缘。

- Ø 通过功能File Open Image加载图像“Steelbanding. zvi”，或用摄像头获取一幅图像。
- Ø 图像显示在AxioVision的图像窗口中。

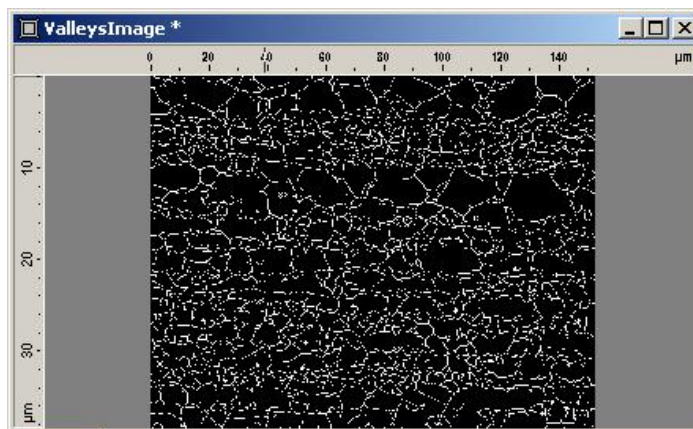


从Processing菜单中选择Segment功能群，然后选择Valleys功能。

- Ø 现在可以看见Valleys功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 通过点击箭头或直接输入设定Sigma值为1.5。
- Ø 直接输入设定Threshold值为0.03
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。

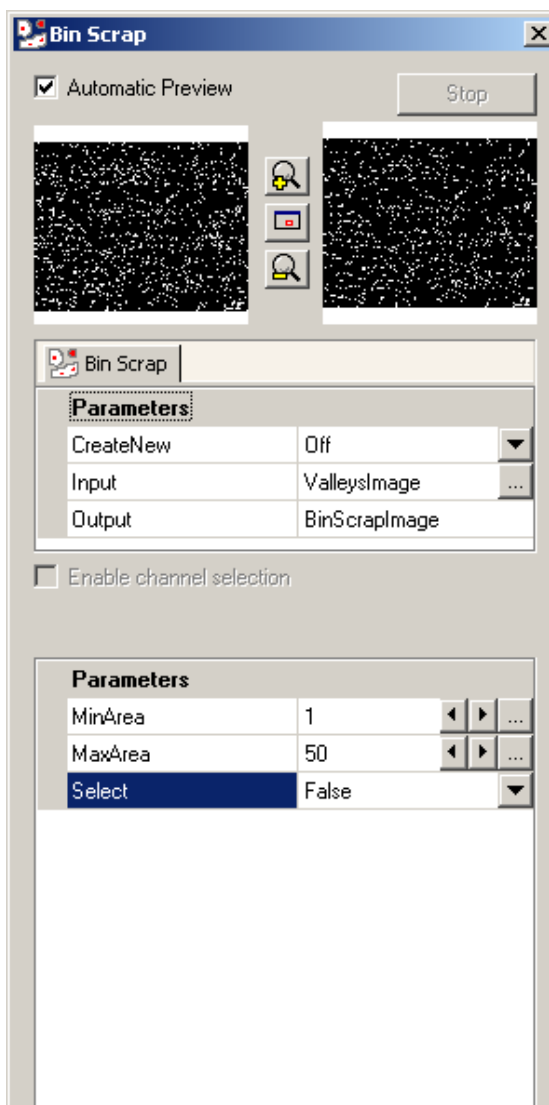


- Ø 生成的图像具有已检测的边缘，但也有大量的小结构（假象）。



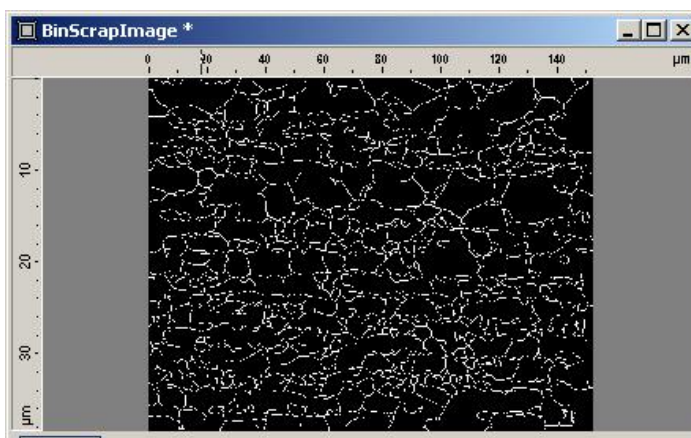
从Processing菜单中选择Binary功能组，然后选择Bin Scrap功能。

- Ø 现在可以看见Bin Scrap功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 通过点击箭头或直接输入设定MinArea值为1，MaxArea值为50。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。

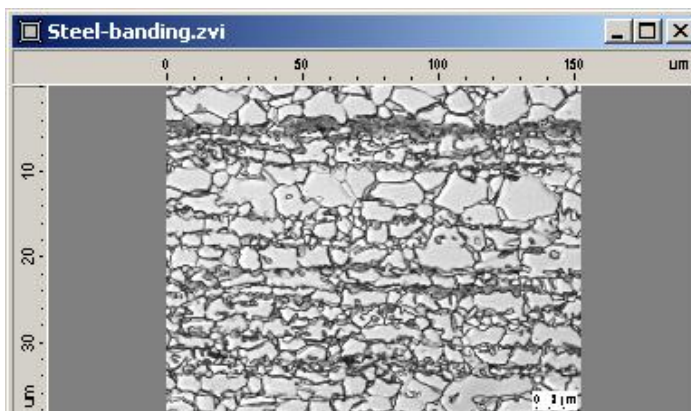




- Ø 图像中的假象已经消失。和原始图像比较可以看出，检测到的边缘包含一些缺陷。



- Ø 为了正确测量图像，对象（区域）的边缘必须是封闭的。使用分水线（watersheds）功能可以重建它们以形成完整的轮廓线。



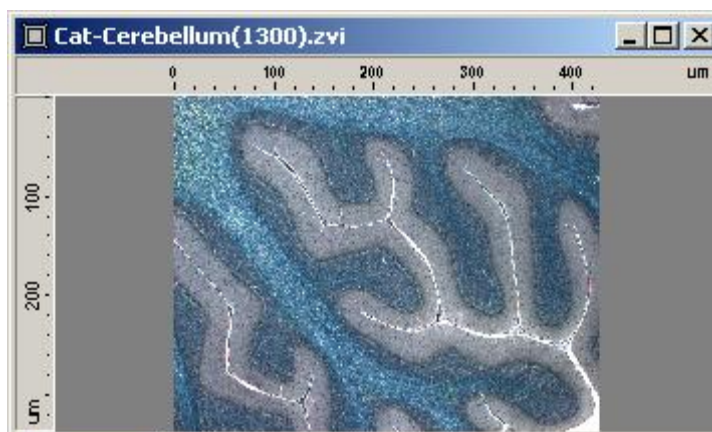
## 进行二进制图像处理

处理二进制图像（平滑，去除假象，填充缺陷）

要想自动测量图像，必须先进行分割，产生所谓的遮罩（二进制图像）。这种二进制图像常常并不完美，必须进行进一步的处理。在分割中常常会产生不完整的或者多余的结构（缺陷，周边区域或其它结构）Axiovision提供专用的功能来处理这些结构。

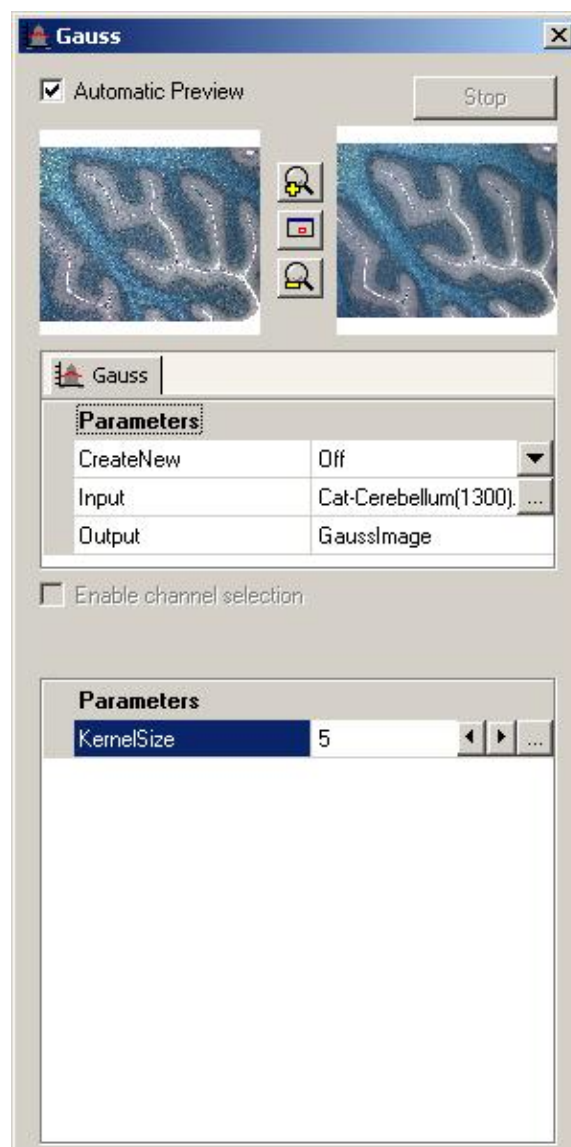
下列例子逐步讲解如何对一幅已经分割的图像进行形态学处理和优化。

- Ø 通过功能File Open Image加载图像“Cut-Cerebellum(1300).zvi”，或用摄像头获取一幅图像。
- Ø 图像显示在AxioVision的图像窗口中。



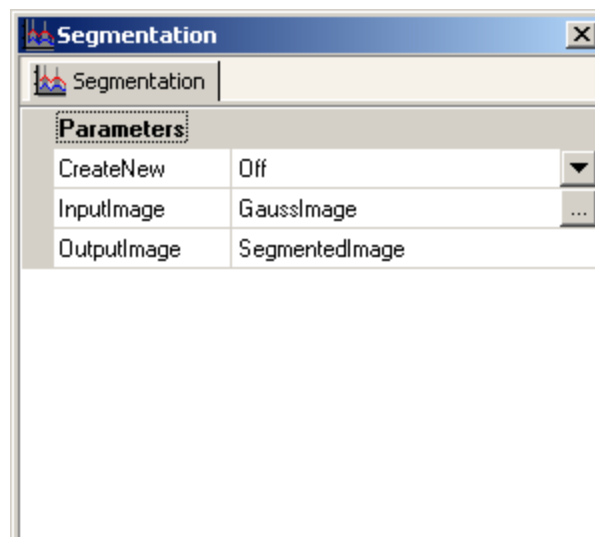
从Processing菜单中选择Smooth功能群，然后选择Gauss功能。

- Ø 现在可以看见Gauss功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 具有不均匀结构的图像更难于进行分割。因此图像要预先用滤镜进行平滑。
- Ø 通过点击箭头或直接输入设定KernelSize值为5。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。



从Processing菜单中选择Segment功能群，然后选择Segmentation功能。

- Ø 现在可以看见Segmentation功能对话框。
- Ø 设定CreateNew为Off。在输入图像中选择GaussImage。
- Ø 单击Start.



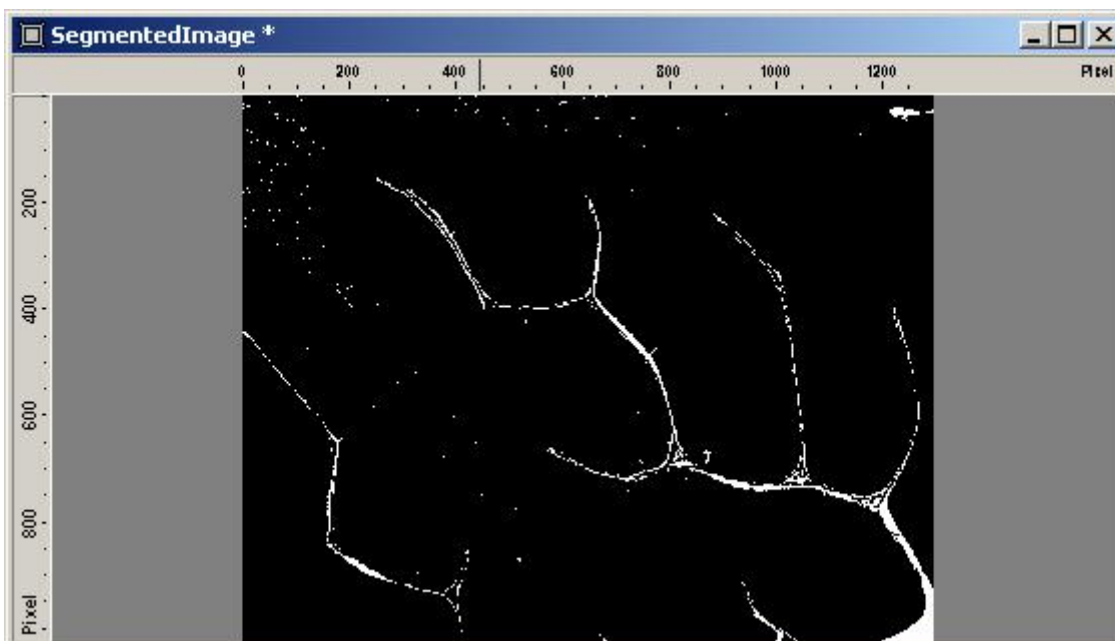
- Ø 现在可以看见具有Segmentation功能的对话框。



Ø 在Segmentation属性页进行设置。

分割的结果是一个“测量遮罩”，通过所谓的二进制图像来表示。该遮罩用黑色象素掩蔽背景，而待测区域显示为白色。用户不会直接接触到该遮罩，AxioVision把它显示为叠加在原始图像上的一幅彩色图像。

Ø 单击Next。生成的Segemented Image图像显示在图像窗口。



用分水线（watersheds）分离和/或重建结构

一般用户要测量的图像结构显示为附聚体，或者彼此靠得很近。这样在分割后还需要进行分离。仅检测对象轮廓经常是不完整的，需要重建以形成完整的轮廓线。

如果常规的分离功能（Bin Erode和Bin Dilate或Exoskeleton的组合）无法生成可用的结果，则考虑使用分水线功能。



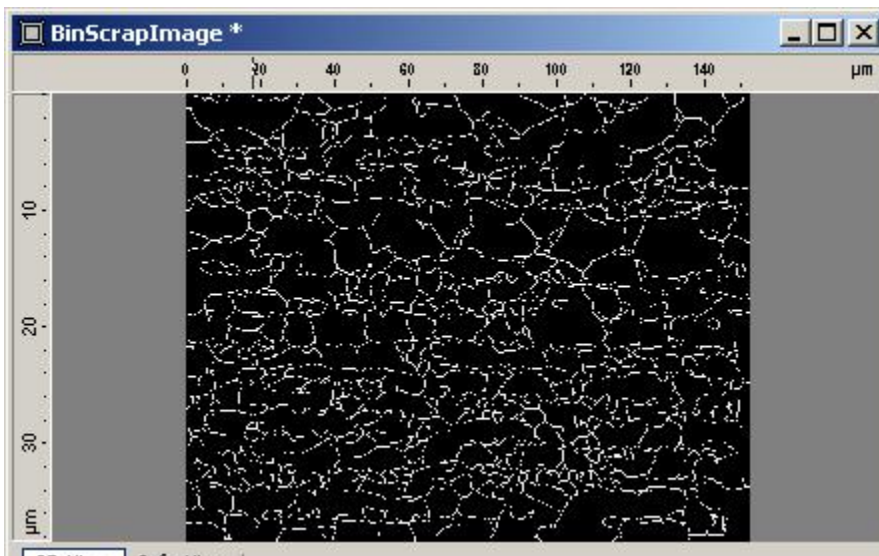
对分割后的图像首先应该进行平滑(使用Lowpass, Gauss或Median), 以消除多余的结构和太小的结构。也可以在分割前就进行平滑。

距离转换 (Bin Euclidean Distance) 用于生成平滑后二进制图像的距离图。在生成的图像中白色区域到黑色背景之间的距离编码显示为灰度, 距离图上亮的灰度代表物体之间距离大。

图像可以被认为是一幅灰度地形图, 具有山谷(暗灰度值)和山峰(亮灰度值)。在距离转换后的图像中, 区域应显示为山谷, 以便分水线算法能发挥作用。分水线 (Watersheds) 功能填充山谷并标记其聚集位置, 显示为分隔线和重建线。

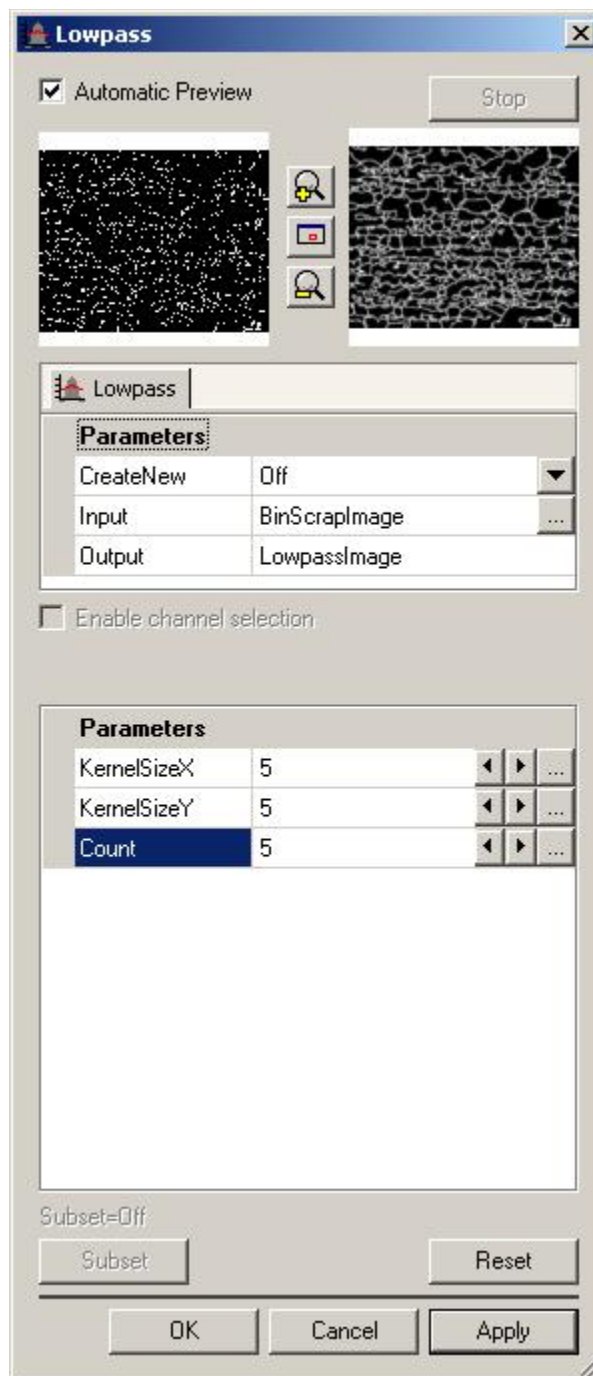
下列例子逐步讲解如何利用分水线功能生成分隔线。

- Ø 使用前面所述边缘检测中生成的图像, 或者生成一幅相似的图像。



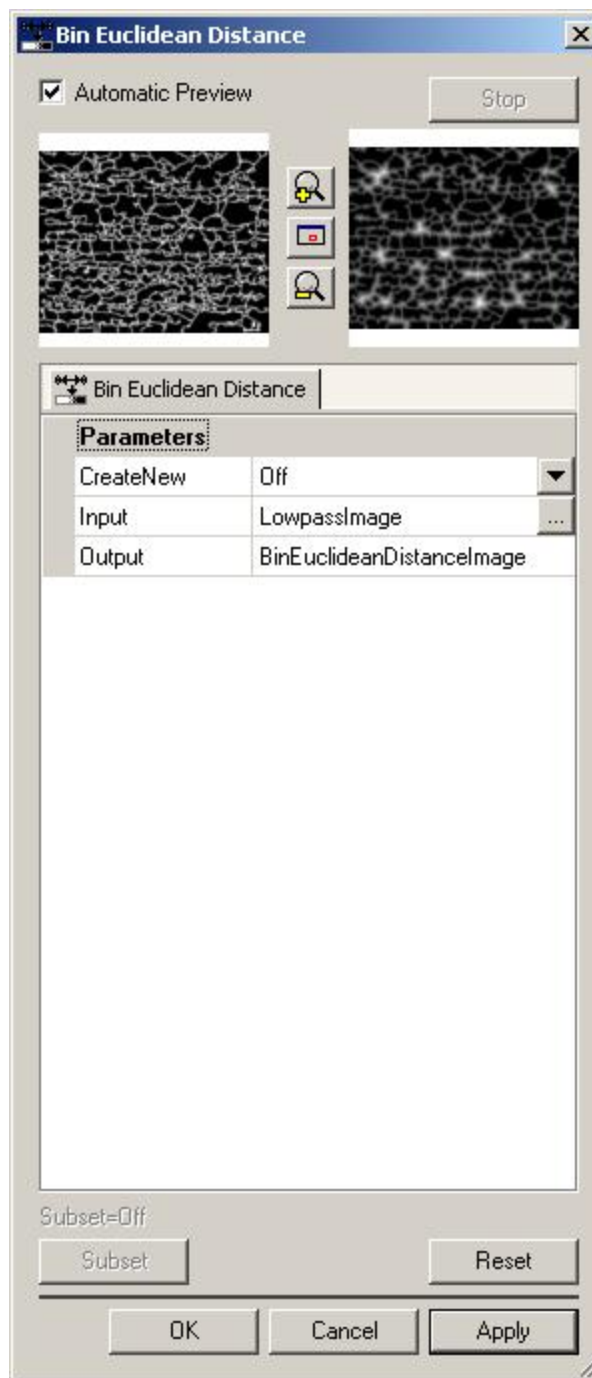
从Processing菜单中选择Smooth功能群，然后选择Lowpass功能。

- Ø 现在可以看见Lowpass功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 设定CreateNew为Off，这样可以随意选择图像。
- Ø 单击Input区的...按钮显示图库，单击以选择原始图像。
- Ø 点击箭头或直接输入设定KernelSizeX，KernelSizeY和Count值为5。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。



从Processing菜单中选择Binary功能群，然后选择Bin Euclidean Distance功能。

- Ø 现在可以看见Bin Euclidean Distance功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。



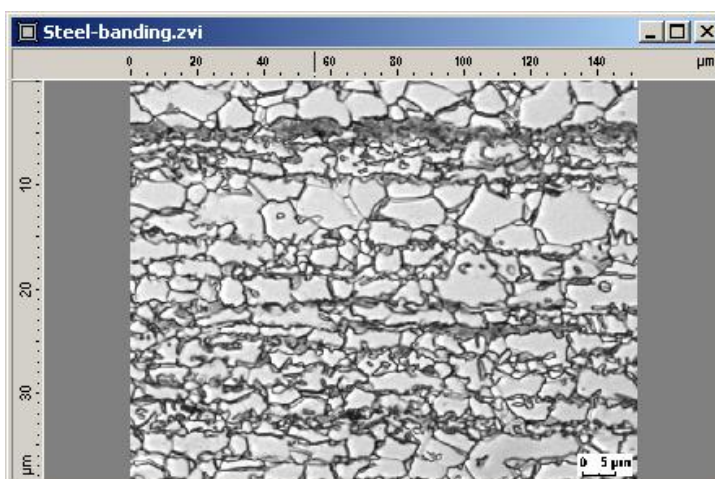
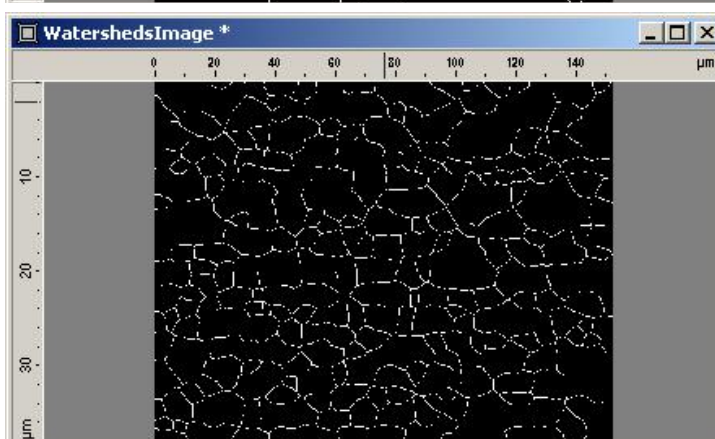
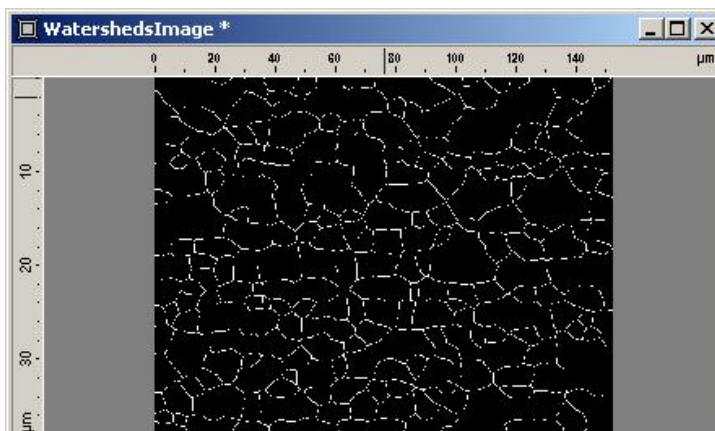
从Processing菜单中选择Morphology功能群，然后选择Watersheds功能。

- Ø 现在可以看见Watersheds功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø Basins设定为Off。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。





- Ø 生成的图像中显示重建后的分隔线
- Ø 和原始图像比较表明，不完整的分隔线已经完整，多余的结构被去除。
- Ø 和原始图像比较表明，用分水线可以非常有效地检测不清晰的对象轮廓。
- Ø 如果要使用生成的图像作为测量遮罩，必须先用 Not 功能进行反相。



### 掩蔽结构/使用逻辑函数

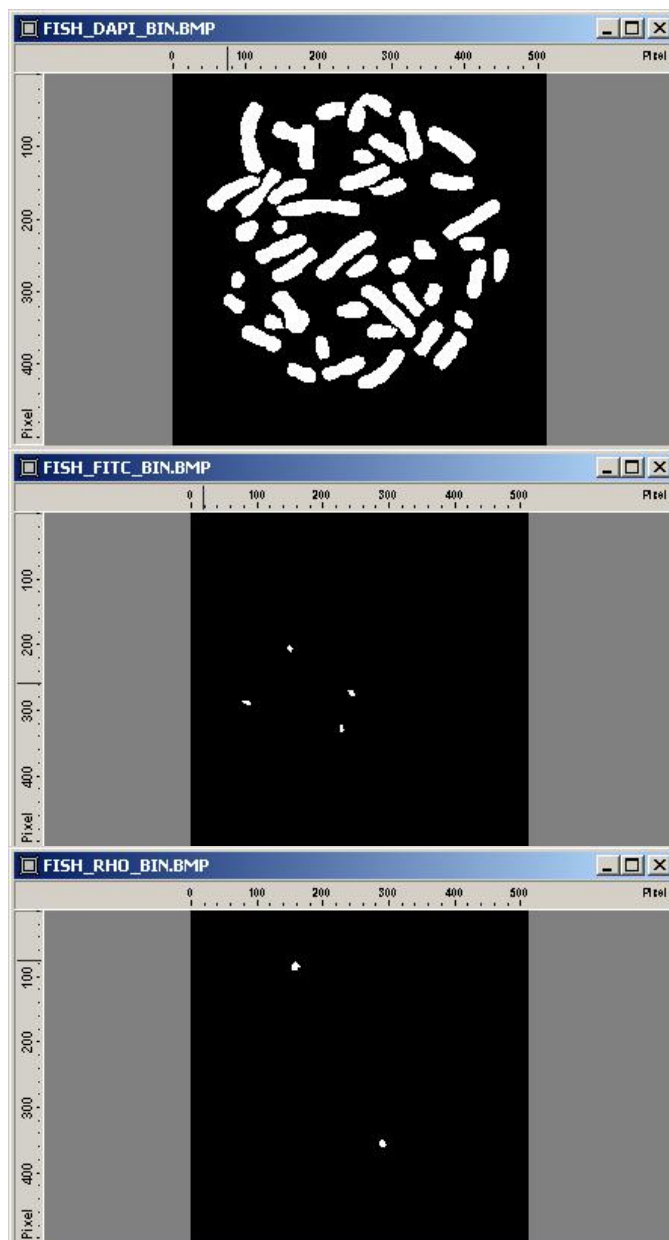
图像常含有亮度或色彩各异的结构，可通过若干分割步骤来检测。一些情况下生成的二进制图像需要进行组合以连在一起或掩蔽结构。

逻辑操作可以用于这个目的。


And函数可用于掩蔽结构，而Or和Xor函数更适用于组合结构。经常需要用到的反相图像可以用Not函数生成。

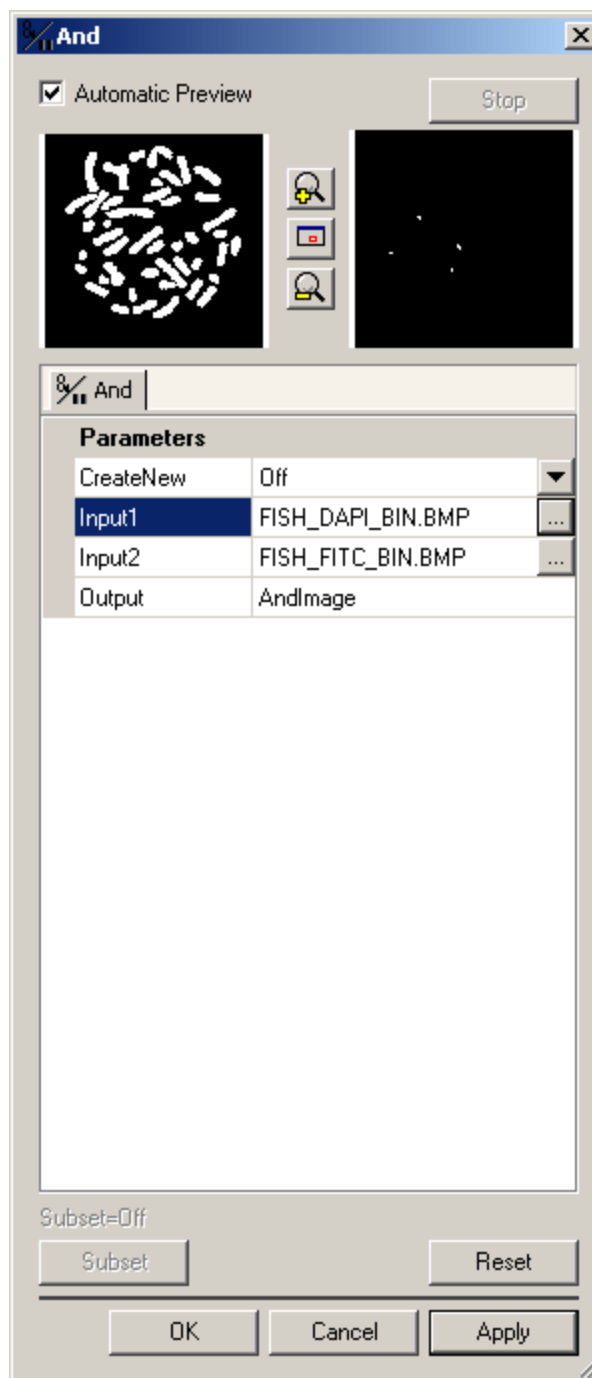
下例子逐步讲解如何对掩蔽或组合来自不同二进制图像的结构。

- Ø 使用分割功能生成三幅检测了不同结构后的二进制图像。
- Ø 本例使用一幅分裂中期图像，并已经对其中的DAPI通道、FITC通道和Rhodamine通道分别进行了检测。

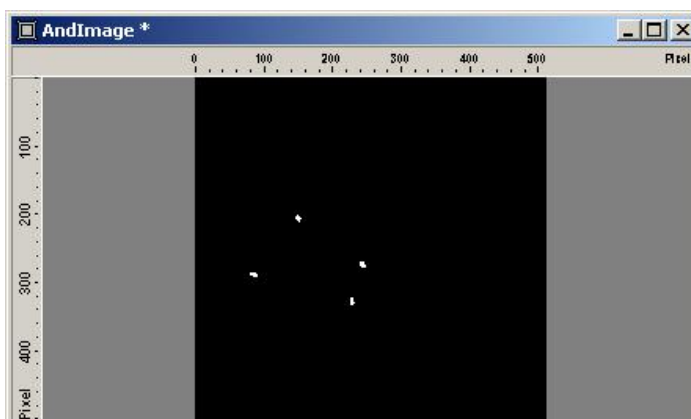


从Processing菜单中选择Binary功能群，然后选择And功能。

- Ø 现在可以看见And功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 设定CreateNew为Off，这样可以随意选择图像。
- Ø 单击Input区的按钮显示图库，单击以选择待测图像。对Input1和Input2选择不同的二进制图像。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。

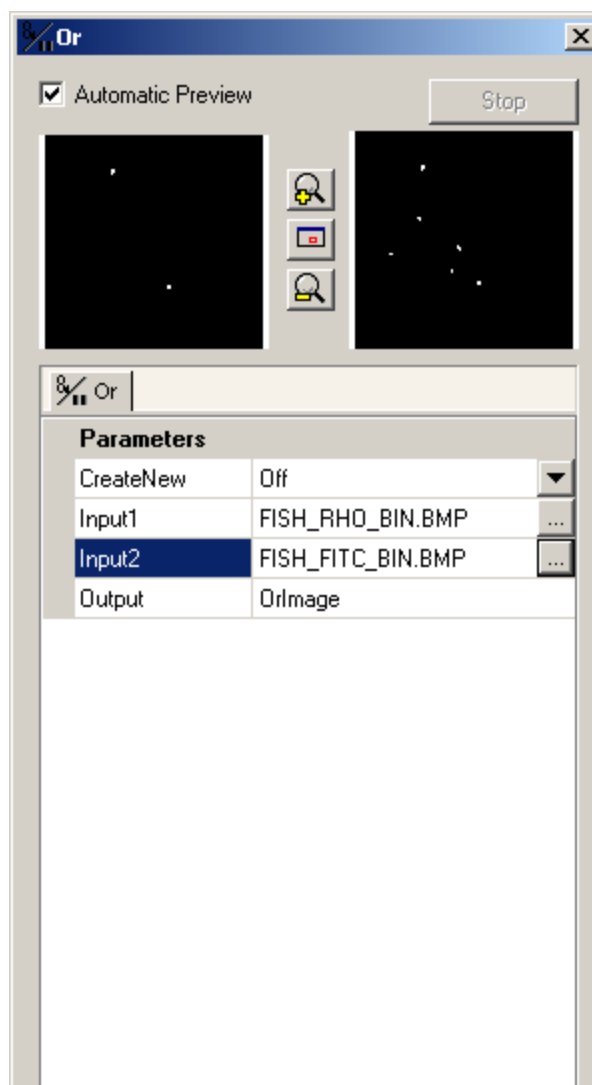


- ∅
- ∅ And功能只掩蔽在两幅图像中都有的结构。
- ∅ 在示例图像中，FITC结构直接位于DAPI结构上，所以生成的图像和FITC二进制图像一模一样。

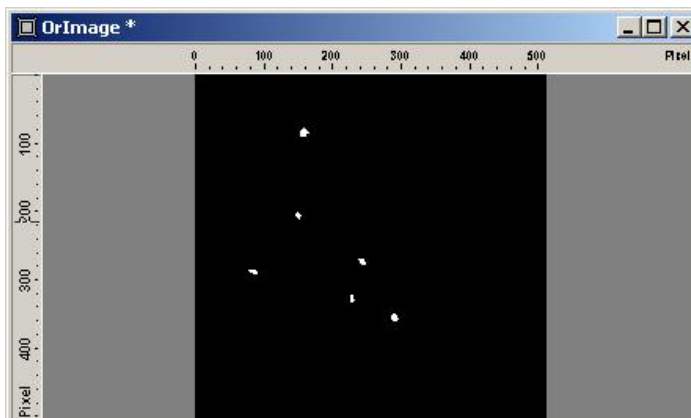


从Processing菜单中选择Binary功能群，然后选择Or功能。

- ∅ 现在可以看见Or功能对话框。
- ∅ 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- ∅ 单击Input区的...按钮显示图库，单击以选择待测图像。对Input1和Input2选择不同的二进制图像。
- ∅ 单击Apply以预览结果。
- ∅ 单击OK关闭对话。

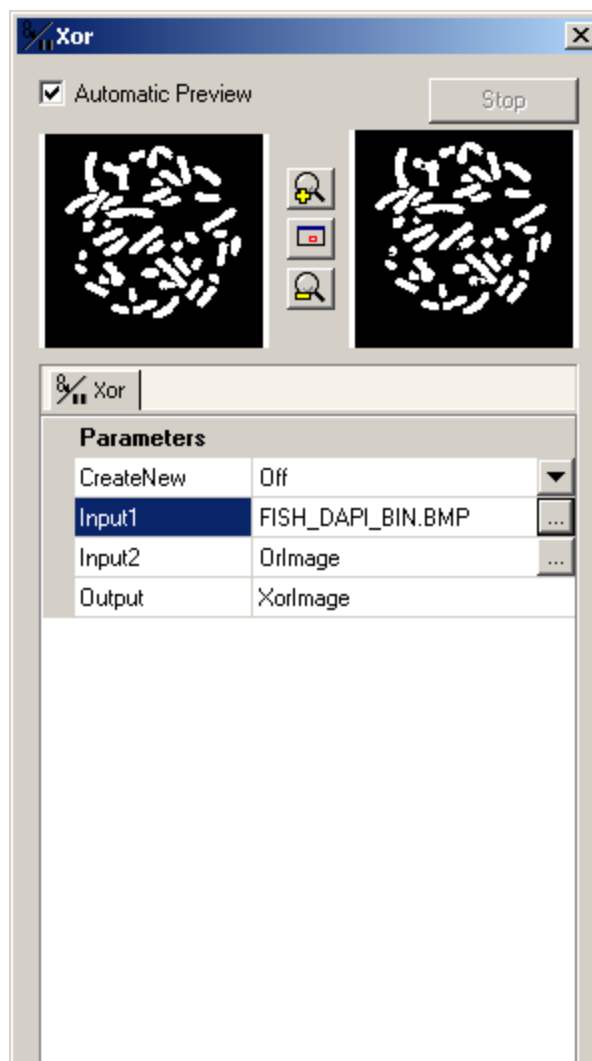


- Ø
- Ø Or功能掩蔽两幅图像任意一幅图像所有的结构。
- Ø 在示例图像中，FITC结构和Rhodamine结构位置不同，这两种结构都显示在生成的图像中。

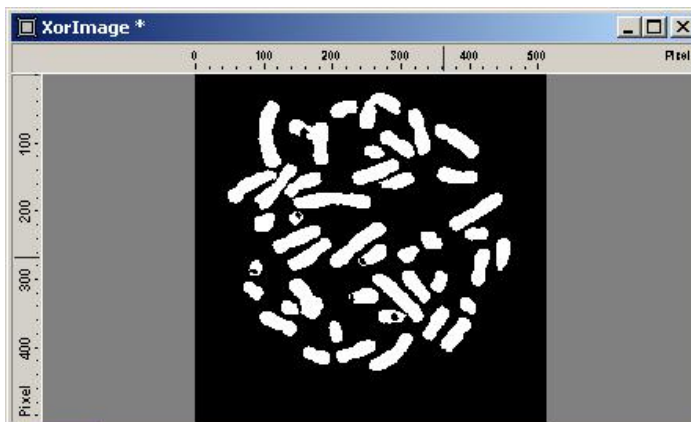


从Processing菜单中选择Binary功能群，然后选择Xor功能。

- Ø 现在可以看见Xor功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 单击Input区的...按钮显示图库，单击以选择待测图像。对Input2选择OR功能生成的图像，对Input1选择另一幅二进制图像。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。




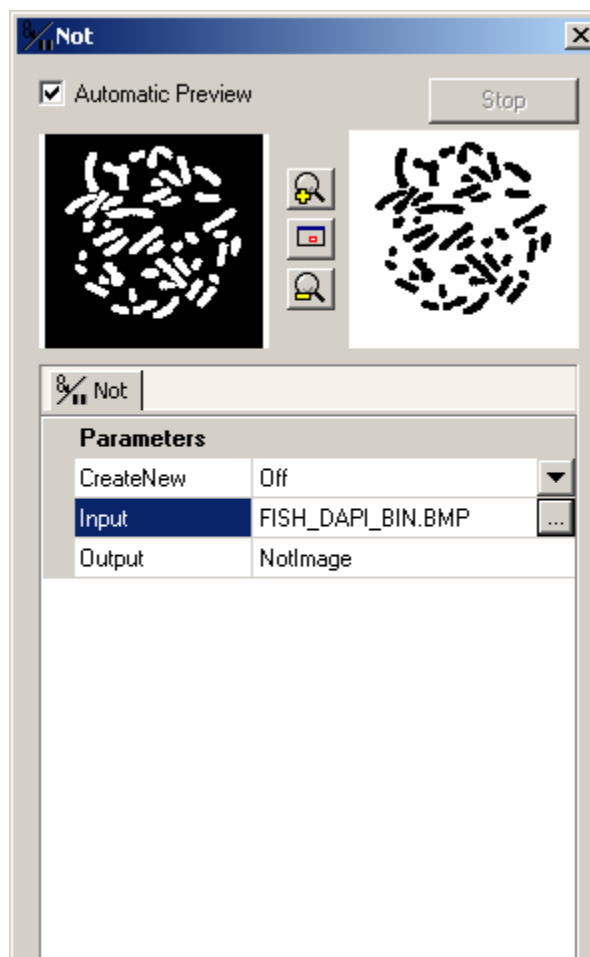
- Ø Xor功能掩蔽两幅图像都有的结构为黑色，而任意没有重叠的白色结构在生成的图像中仍然显示为白色。



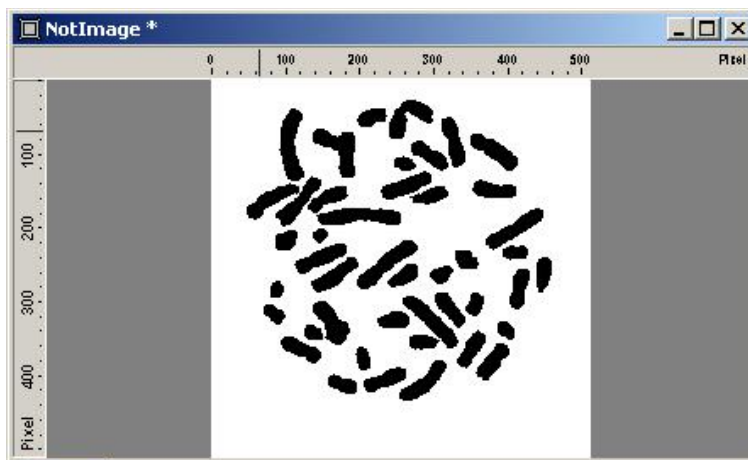
- Ø 在示例图像中，FITC结构和Rhodamine结构直接位于DAPI结构上。生成的图像中的结构显示为DAPI图像中的凹。

从Processing菜单中选择Binary功能群，然后选择Not功能。

- Ø 现在可以看见Not功能对话框。
- Ø 如果激活了自动预览（Automatic Preview）多选框，用户可以看见缩小的图像。
- Ø 缩小的图像。
- Ø 单击Input区的按钮显示图库，单击以选择待测图像。对Input1选择任意的二进制图像。
- Ø 单击Apply以预览结果。
- Ø 单击OK关闭对话。



- Ø
- Ø 生成的图像白色显示为黑色，而黑色显示为白色。



## 使用自动测量功能

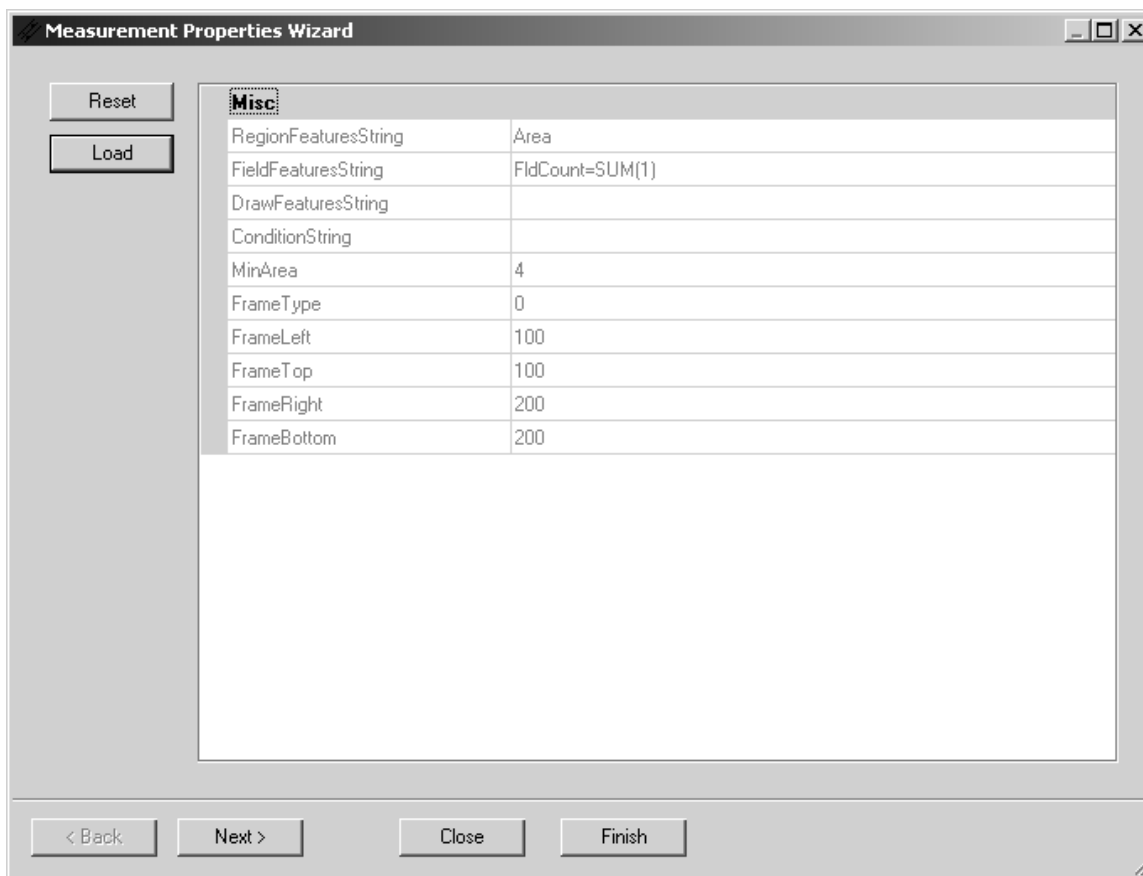
### 生成测量属性文件和测量

生成测量属性文件包括几个步骤，以详细定义测量如何进行。

它需要一个正确的测量遮罩（二进制图像）。关于如何生成二进制图像请参阅前面的章节。

- Ø 从Measure菜单选择 Measurement Properties Wizard功能。
- Ø 给MaskImage选择测量遮罩（二进制图像），DensImage选择原始图像。
- Ø 单击Start启动测量属性向导（Measurement Properties Wizard）。





测量属性向导的起始页

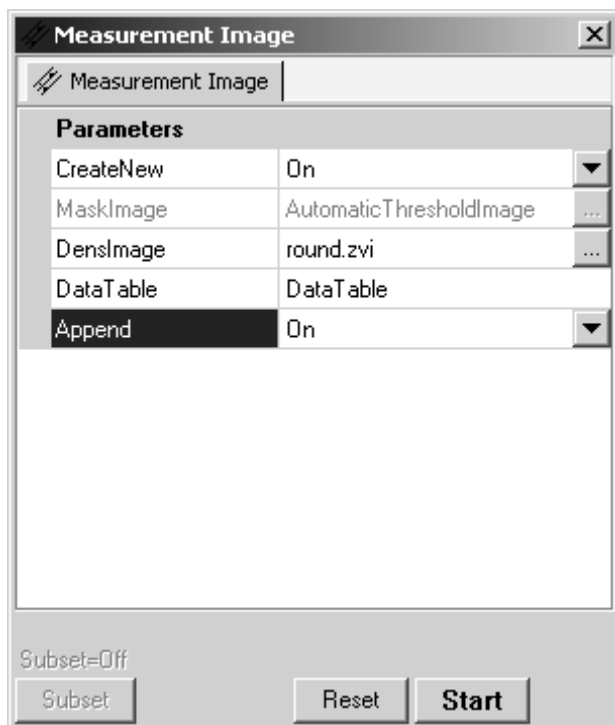
## 步骤

- Ø 确定区域特定的（单个对象）和视野特定的（整个图像）测量参数
- Ø 定义测量结束后已测对象的显示方式（轮廓线、测量参数等等）。
- Ø 生成测量条件，定义测量对象必须满足的条件，即所谓的“对象滤镜”，例如，可用于指定只有在某一大小范围内的对象才被测量。
- Ø 定义测量框架，指定图像边缘的对象应该如何处理以避免可能造成的测量误差。
- Ø 保存设置



注意：

- n 用户可以通过向导第一页的Load按钮加载已有的属性文件。单击Finish以结束向导即可继续进行测量。
- n 在通过Measurement Properties Wizard后（或者直接加载属性文件后），从Measure菜单选择Measure Image功能启动测量：



测量数据最后以所谓的CSV（逗号分隔数值，Comma Separated Values）格式保存。它是一种纯文本格式，各个值之间用特定符号分隔开，各个国家有通过Windows控制面板设置的不同标准。

CSV格式的文件有两个优点：一方面，它们可以直接用Microsoft Excel 打开和处理；另一方面，它也可以被导入到任何其它程序中。

## 13 存档模块

### 13.1 AxioVision Cumulus 单用户

在AxioVision存档中用户组织保存图像及其所包含的信息的方式不受限制。

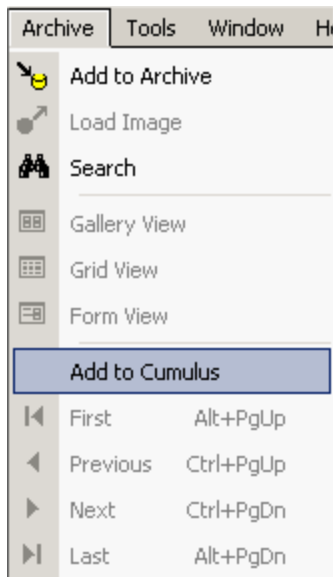
用户也可以使用专业用于保存管理大量数字文档的AxioVision Cumulus系统。使用AxioVision ZVI格式可以在实际图像之外保存包括取图条件等的重要数据。

可以使用AxioVision Cumulus来查找某一特定图像文件，并立即在AxioVision中对它进行处理。查找标准可以包括任意信息如“摄像头类型”等及其组合。

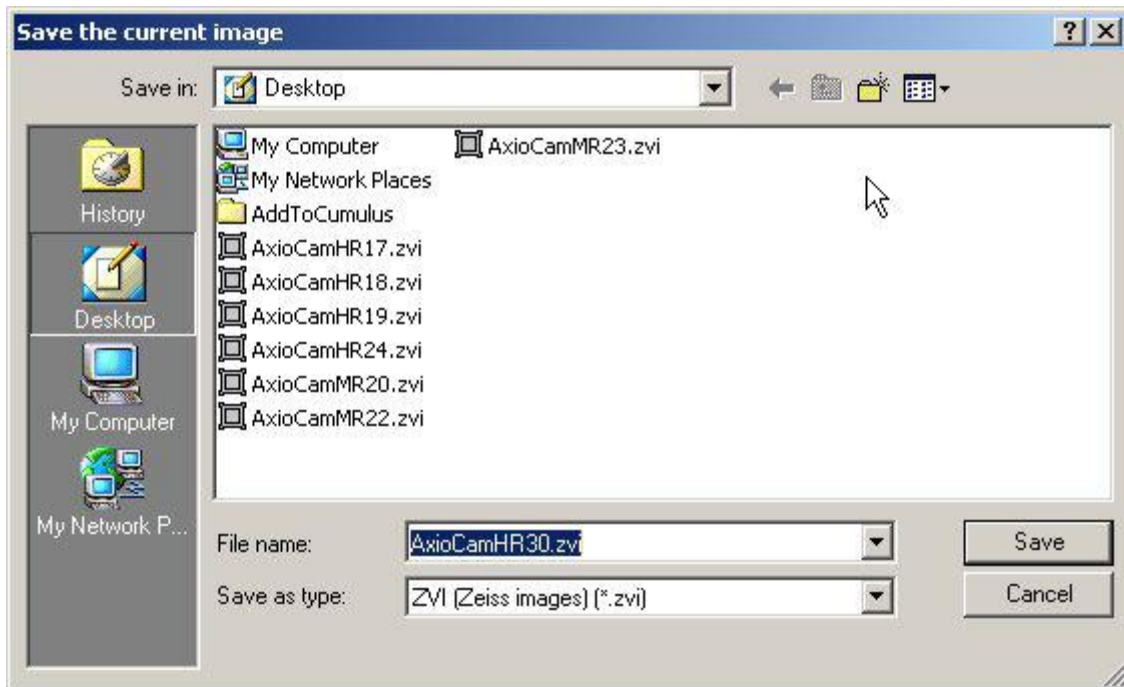
此外,用户可以分类存储图像文件。可以把一幅图像同时分给若干个类型。用鼠标同时选择多个条件可以根据用户数据库内容执行复杂的搜索要求。

可以编辑和保存注解和关键词，还可以和数据一起保存声音注解，这样可以轻松查找处理图像。

从Archive菜单选择Add to Cumulus功能即可在取图后立即保存图像文件。



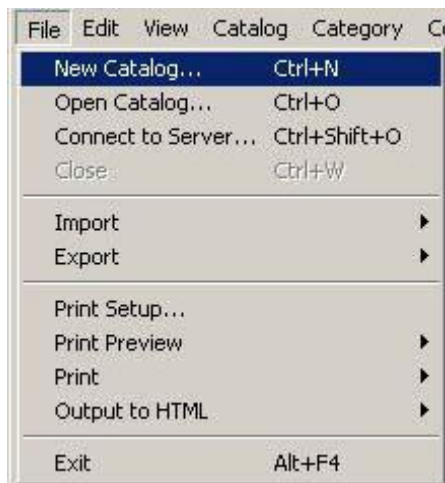
如果图像没有被保存，AxioVision Save对话框将提醒用户保存图像。



图像成功保存后，AxioVision Cumulus自动启动，该图像被编目保存在活动目录中。如果打开的目录不止一个，将会提醒用户选择目的目录。如果没有目录文件，用户可以在Open对话框中选择保存位置。



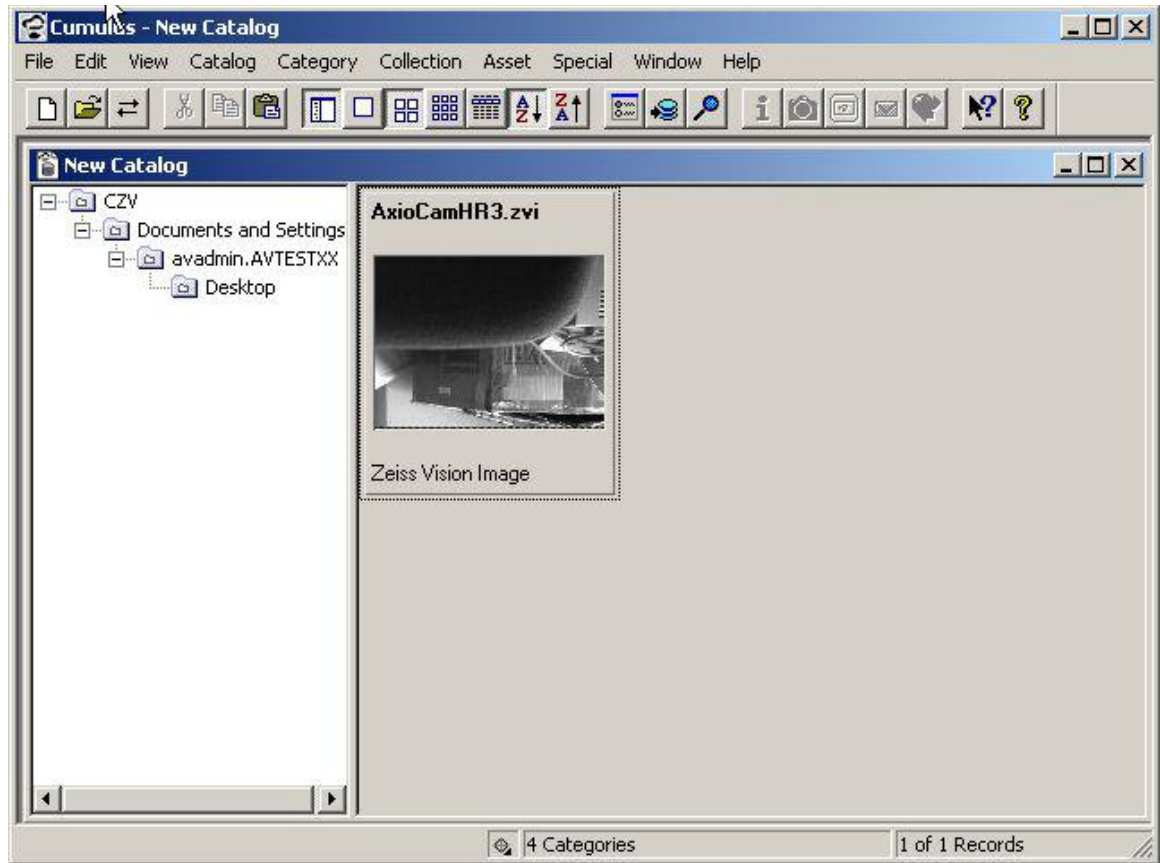
如果用户的硬盘上还没有图像目录文件，用户可以通过File菜单中的New Catalog功能创建一个新的目录文件。



注意：

- n 用户需要在AxioVision Archive菜单中再次选择Add to Cumulus功能。

图像文件随后被导入到目录文件中，在状态栏用户可以看见目录中新创建的数据记录的数目。



关于如何使用图像存档的进一步信息请参阅AxioVision Cumulus的用户手册。

## 14 配置模块

### 14.1 VBA

#### 概述

VBA模块可以通过宏（macro）来简化用户的日常工作以及生成用户自己的应用程序。

AxioVision含有最新的VBA 6。在该版本中VBA的语言性能可以和Visual Basic相比。

建议以前从来没有编过程的用户先对编程有一定了解。因为Visual Basic/Visual Basic for Applications适使用非常广泛的标准，用户可以轻松找到各种训练程序和文档。

9.4节“调节用户界面”描述了如何利用 workflow、工具栏和快捷键来使AxioVision满足个人的工作需要，使用户的工作更为轻松便捷。利用VBA模块提供的额外可能，用户可以充分发挥想象，任意配置AxioVision 以满足用户需要。

#### AxioVision 对象模式

除了对一般的VBA函数的描述之外，AxioVision的在线帮助还包括AxioVision对象的文档。在线帮助位于“C:\Program Files\Common Files\Carl Zeiss Vision\System\ZIPL”文件夹中，双击“zipl.chm”文件即可打开。

## 管理和运行宏

有两种方式可以运行在Visual Basic编辑器中创建的宏：

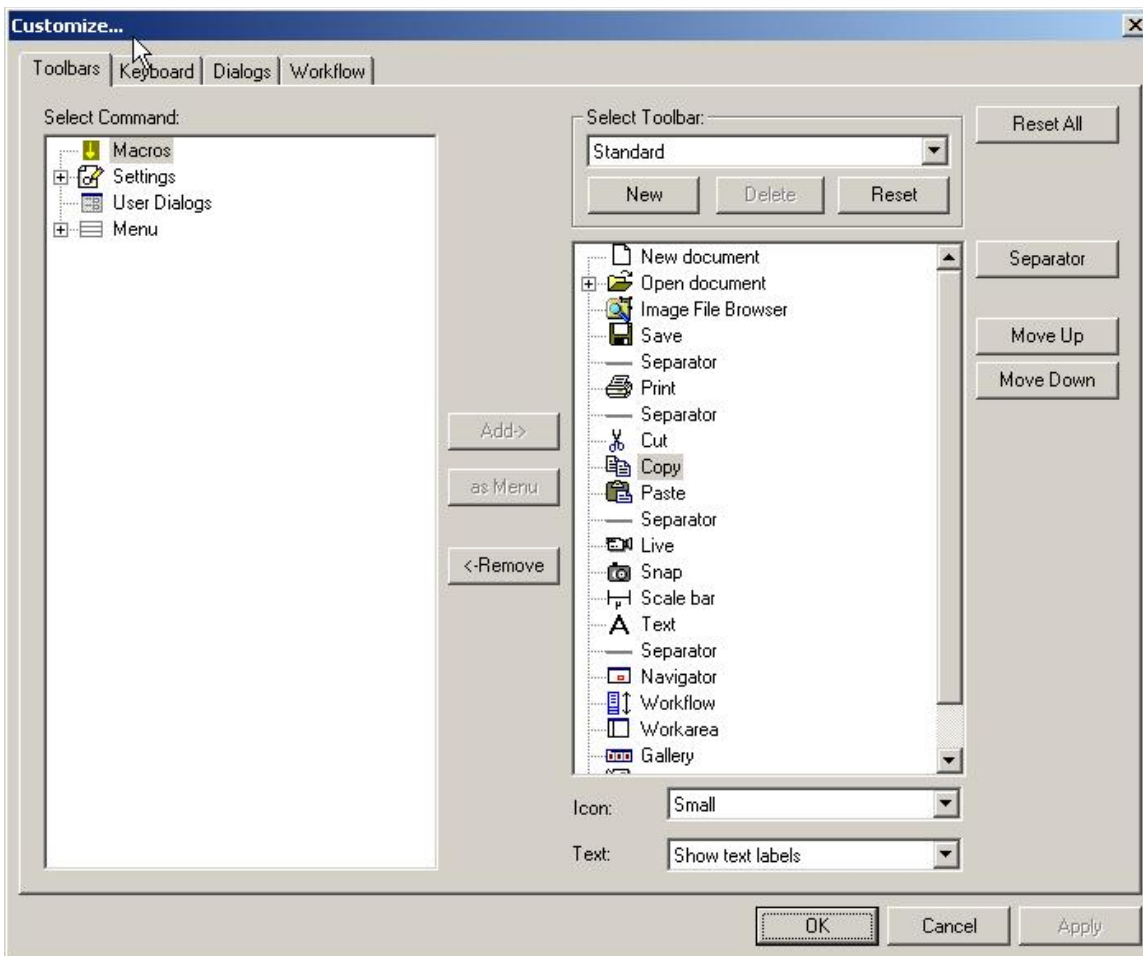
- Ø 第一种方式是通过宏管理。从Tools菜单选择Macros功能。除了运行宏之外，用户还可以删除宏或者启动Visual Basic编辑器等。
- Ø 第二种方式是通过宏运行功能。从Tools菜单选择Run Macro功能，所有用户创建的宏都显示在一个列表中。选择要运行的宏并单击Start来运行它。

## 通过 workflow、工具栏和快捷键来运行宏

把宏整合到用户界面中使用起来要方便得多。

宏在AxioVision中可以象任何其它功能一样处理，因此也可以根据需要通过 workflow、工具栏和快捷键来使用。

在相应属性页的Tools菜单的Customize功能下用户可以发现Macros分支，也可以看到用户创建的宏的列表。



注意:

- n 9.4节“调节用户界面”描述了如何使用 workflow、工具栏和快捷键来根据用户需要调节 AxioVision，从而大大简化用户的工作。

## VBA 在线帮助

VBA在线帮助提供以下信息:

## Visual Basic 文档

Visual Basic的文献极其繁多。对于该产品的每一个方面都有单独的文献来帮助用户。Visual Basic附带的文档包括以下组成部分:



## Visual Basic 用户界面的使用帮助

提供关于Visual Basic编辑器界面元件的信息，如命令、对话框、窗口和工具栏等。

## Visual Basic 概念

该帮助内容取决于实际情况，可以提供关于Visual Basic编程的知识。

## Visual Basic 操作帮助

在这里用户可以找到常见操作的情况，如使用对象目录或者Visual Basic环境选项的指定。

## Visual Basic 语言目录

语言目录提供Visual Basic编程语言的信息，即它所有的方法、特性、声明、函数、操作子和对象。

## Visual Basic 附加模式

如果用户希望调节Visual Basic编辑器，可以在语言目录中找到对象模式的信息，它可以知道用户扩展环境。

## Microsoft Forms 参考

这里提供关于Userform对象和控制元件以及使用它们在Visual Basic中进行编程的信息。