



Visualize your ideas

# Multi-SIM

## 结构光照明超分辨显微镜

### 产品操作手册

此介绍的功能适用于VSIM 2.2.1.4  
gamma版本或之后的软件版本

手机:173 2226 1173

电话:010-82410988

邮箱:support@naxi-tech.com

网址:www.naxi-tech.com

地址:北京市海淀区学清路8号科技财富中心B座305A

广东省广州市番禺区大石街石北路644号巨大创意产业园智汇港8A栋1层

安徽省合肥市高新区合欢路16号天怡新世纪商务中心研发生产楼西楼二层

北京纳析光电科技有限公司



## 自主研发、设计、制造

Multi-SIM核心技术源于中国科学院生物物理研究所李栋团队在超分辨成像技术上十余年的系列研发成果,相关工作被评为科技部2018年度“中国科学十大进展”,国际上首次通过可编程空间光调制技术来实现高速灵活结构光照明的超分辨显微镜系统。实现了多种超分辨成像模式的集成,为基础生物学、医学、临床病理研究,以及药物精准筛选提供性能优异、通用性好的5-D(X-Y-Z-Time-Color)超分辨成像解决方案。

# 目录

## 一、Multi-SIM开关机步骤

1.1. 系统模块介绍 .....	01
1.2. 开机操作流程 .....	01
1.3. 关机操作流程 .....	03

## 二、软件功能介绍

2.1. 导航栏 .....	04
2.2. 工具栏 .....	08
2.3. 【Experiment】区域 .....	07
2.4. 【Imaging Mode】区域 .....	13
2.5. 【Laser】区域 .....	15
2.6. 【Camera】区域 .....	16
2.7. 【Z Stack】区域 .....	16
2.8. 【Image View】区域 .....	20
2.9. 【File List】区域 .....	23
2.10. 【Reconstruction】区域 .....	25
2.11. 【Model Finetuning】区域 .....	29
2.12. 【Microscope Control】区域 .....	32

## 三、软件操作范例

3.1. 实验前准备 .....	36
3.2. 2D SIM操作步骤 (以TIRF-SIM模态为例) .....	37
3.3. 3D SIM操作步骤 (以3D-SIM模态为例) .....	40
3.4. Sequence功能 (以2D模态为例) .....	44
3.5. Multi-ROI功能 (以2D模态为例) .....	45
3.6. Multi-ROI功能 (以3D模态Start/End模式为例) .....	45
3.7. Merge功能 .....	50
3.8. 传统SIM重建功能 .....	52
3.9. rDL SIM Recon和rDL WF Recon功能 .....	54

3.10. Model Finetuning功能 ..... 56  
 3.11. 扫图拼图功能(以2D模态为例) ..... 59  
 3.11. 扫图拼图功能(以3D模态为例) ..... 62

**四、软件其他功能**

4.1. Live状态双击Image View位置快速位移 ..... 64  
 4.2. Live时用鼠标滚轮调节焦面 ..... 64  
 4.3. 图像保存功能(2D视图) ..... 65  
 4.4. 快速添加伪彩和过曝提示 ..... 66  
 4.5. 3D模态采集图像开启Interleave功能 ..... 67  
 4.6. Image Tool批量转tif和merge源文件 ..... 69  
 4.7. 信息中心 ..... 70  
 4.8. AdaBleach功能 ..... 71  
 4.9. Cell Trace ..... 73  
 4.10. Toolbar 画图工具 ..... 74  
 4.11.Live重建 ..... 75  
 4.12. 3D渲染 ..... 76  
 4.13. Animation Video ..... 78

# 一、Multi-SIM 开关机步骤

## 1.1 系统模块介绍

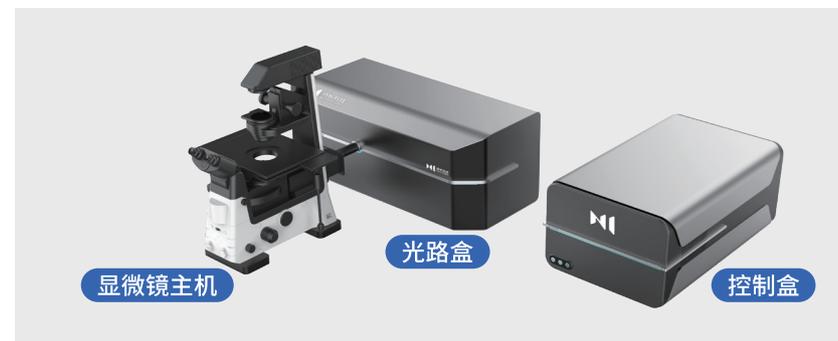


图1.1-1 Multi-SIM系统模块示意图

系统主要分为三个模块,分别是显微镜主机、光路盒和控制盒。

- 显微镜主机:观测设备
- 光路盒:超分辨率光路模块
- 控制盒:电路控制系统

## 1.2 开关机操作流程



图1.2-1 控制盒开关示意图

控制盒上有三个电源开关,从左至右分别是系统主电源开关(Main)、显微镜相关元件电源开关(Microscope)、活细胞装置电源开关(Incubator)。

第一步:打开系统主电源开关,即图1.2-1第一个开关(Main);



图1.2-2 显微镜相关元件电源开关示意图

第二步:①打开控制盒上的显微镜相关元件电源开关(Microscope)(如图1.2-2所示);

②打开显微镜上的荧光光源开关(此开关可以不关,显微镜相关元件电源开关是其总开关,如果关机时没有刻意关掉荧光光源开关,再开机也无需打开);

第三步:打开控制盒上的活细胞装置电源开关Incubator(根据需求选择性使用,如不拍摄活细胞成像,则不需要打开);

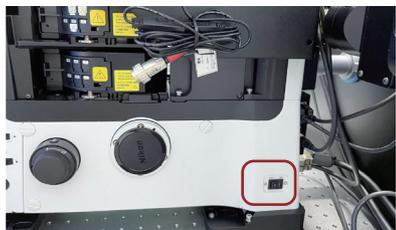


图1.2-3 显微镜电源开关示意图

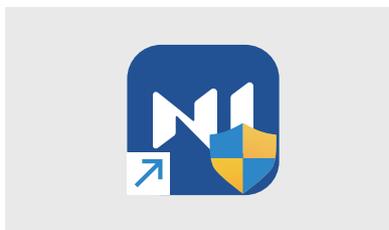


图1.2-4 VSIM 2.3

第四步:打开显微镜电源(如图1.2-3所示);

第五步:打开电脑主机电源;

第六步:打开电脑桌面上的VSIM 2.2(如图1.2-4所示)控制程序(新建Experiment后,如果连上显微镜100×1.49,即完成开机步骤)。

## 1.3 关机操作流程

第一步:停止相机采集,关闭VSIM软件;

第二步:取下样本,用镜片擦拭纸将物镜表面的物镜油擦拭干净,并将物镜降下;

第三步:关闭显微镜电源;

第四步:关闭控制盒上的活细胞装置电源开关(Incubator);

第五步:关闭控制盒上显微镜相关元件电源开关(Microscope);

第六步:关闭控制盒上系统主电源开关(Main)。

## 二、软件功能介绍

VSIM软件主界面除了导航栏外可划分三大块：

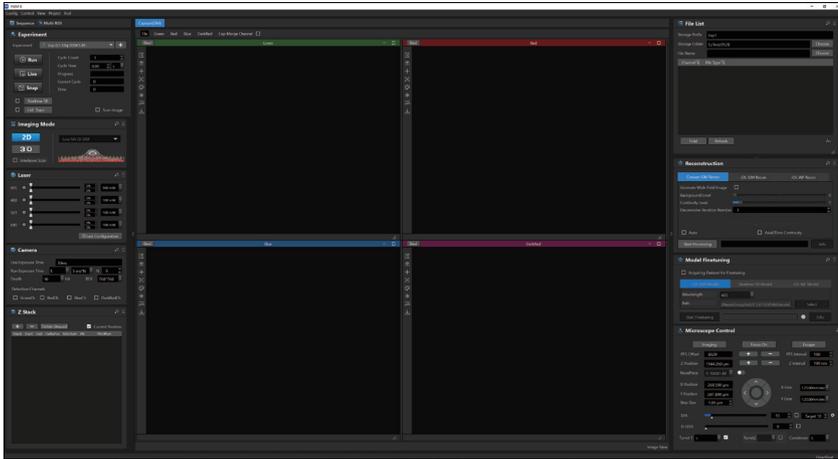


图1-1 VSIM软件主界面

- **左侧实验参数设置：**  
Sequence和Multi ROI工具栏、【Experiment】区域、【Imaging Mode】区域、【Laser】区域、【Camera】区域、【Z Stack】区域。
- **中间Image View模块：**  
【Image View】区域默认展示Capture的4通道，File List打开的图像以新的标签页显示。
- **右侧图像处理和显微镜控制模块：**  
【Reconstruction】区域、【Model Finetuning】区域、【Scan LargeImage】区域、【Microscope Control】区域。

### 2.1 导航栏

VSIM软件主界面左上角为导航栏(如图2.1-1所示)，点击可展开对应的下拉菜单。

Config Control View Project Tool

图2.1-1 VSIM软件主界面

#### Config

##### LC Voltage Table

感应电压配置表(工程师调试参数进行配置,不建议用户修改)。

##### Channel Alignment

通道对齐参数配置,使用Merge功能前需要工程师或用户进行参数配置。

#### Control

##### Camera Control

查看相机连接状态信息。

##### Laser Control

激光连接状态信息查看和激光开关控制。

##### Login

登录后可使用Debug功能、FPGA\_Command、Main Branch等功能。

##### FPGA\_Command

FPGA命令发送,工程师用于设备调试,一般情况下不建议用户操作,需要Login后才能使用。

##### Equipment Error

查看设备错误信息。

##### Power Curve

AdaBleach功能功率曲线设置。

## View

### Debug

设备各项参数设置和调试,工程师专用,一般情况下不建议用户操作,需要Login后才能使用。

### Model Finetuning

用户可选择是否开启深度学习 (rDL) 模型整合模块,勾选后显示相关模块。

### Information

用户可选择是否开启信息中心模块,勾选后显示相关模块。

## Project

### Save Project

将当前实验信息保存为.niproj文件。

### Save All Project

将Experiment列表内所有实验的实验信息保存为.niproj文件。

### Load Project

导入.niproj文件中的实验信息,导入时会将当前实验信息清空。

## Tool

### Reconstruction Parameter

用于设置传统重建相关参数,工程师专用,一般情况下不建议用户操作,需要login后才能使用。该面板可通过选择镜头类型和激发波长显示对应的 ini 配置文件的参数。当用户修改某个参数时,该参数框将高亮显示,重建将使用修改后的参数,而未修改部分则采用 ini 文件中的默认值。相关调试参数如下:

Angle0: 初步计算角度;  
NegDangle: 设置角度变化方向;  
Anticlockwise: 表示角度逐渐增加;  
Clockwise: 表示角度逐渐减小;

Detection NA: 探测 NA, 默认值为 1.1;  
Excitation NA: 激发 NA, 默认TIRF为1.41,high NA GI为 1.37,low NA GI为 1.35;  
2D Wiener: 2D 维纳滤波, 默认值为 0.01;  
3D Wiener: 3D 维纳滤波, 默认值为 0.005;  
2D Force modamp: 2D 强制约束最小调制度, 默认值为 0.3;  
3D Force modamp: 3D 强制约束最小调制度, 默认值为 0.3;  
Keep NegValue: 是否保留重建后图像负值, 0为不保留, 1为保留, 默认值为 0;  
Attenuation rate: 衰减率, 默认值为 (0.2, 1.0, 1.0);  
If Force modamp: 是否使用强制约束最小调制度, 默认使用;  
If Attenuation: 是否使用设定的衰减率进行频谱衰减, 默认使用;  
2D/3D OTF: 可选择 OTF 文件, 默认时该路径为空, 此时根据数据的物镜类型和激发波长加载对应 OTF 文件。点击 Save 可将当前面板参数保存为 ini 配置文件; 点击 Load可导入 ini 或 mrc 文件并加载对应参数; 点击 Reset 可重置参数为默认值; 点击 OK 完成参数设置并关闭参数窗口。

## 2.2 工具栏

VSIM软件的工具栏位于主界面左上角位置(导航栏下方,如图2.2-1所示),点击可打开对应的模块,开启后则为高级模式。



图2.2-1 工具栏

### Sequence

添加连续的实验序列(如图2.2-2所示),可将当前左侧实验设置的参数组合成sequence参数并添加到sequence列表中,同一实验下2D模态和3D模态的sequence不共存,sequence列表最多只能运行255个sequence,不同sequence可以设置不同实验参数,运行时按顺序从sequence 1开始执行。通过sequence列表的功能按钮对列表数据进行添加、删除、清空、更新。

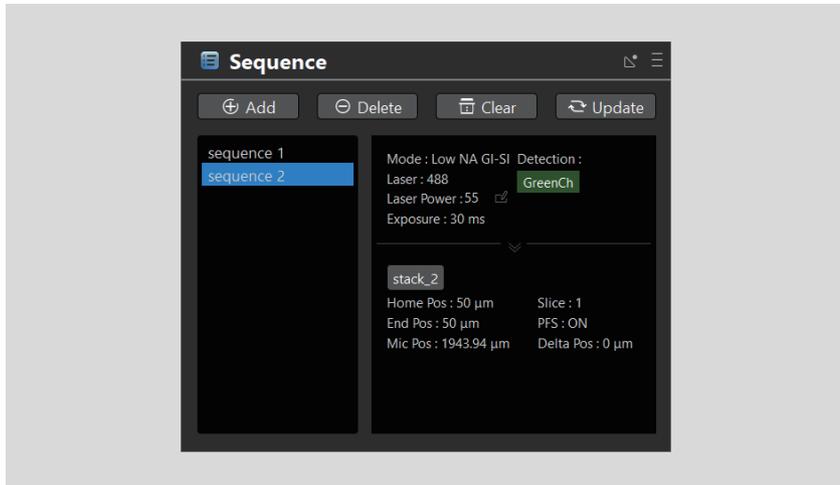
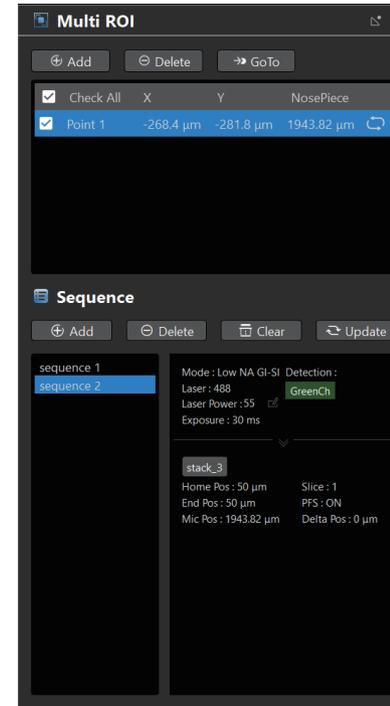


图2.2-2 Sequence工具

### Multi ROI



多区域拍摄,上半部分为Multi ROI列表数据,下半部分为sequence列表数据(功能与Sequence模块一致),Point (ROI) 总数不能超过60。第一个Point会关联当前添加的sequence参数,添加新的Point时会继承上一个Point的所有sequence。同一实验下2D模态和3D模态的sequence不共存,所有Point关联的sequence总数不能超过256,运行时按顺序从Point 1\_sequence 1开始执行,当前Point的sequence执行完成后显微镜移动到下一个Point的位置,然后去执行该Point的sequence。通过Multi ROI列表的功能按钮可对Point进行添加、删除、快速定位(Go To,如图2.2-3所示)。

► 图2.2-3 Multi ROI工具

## 2.3 【Experiment】区域

VSIM软件的【Experiment】区域默认位于主界面左上角位置(工具栏下方,如图2.3-1所示)。

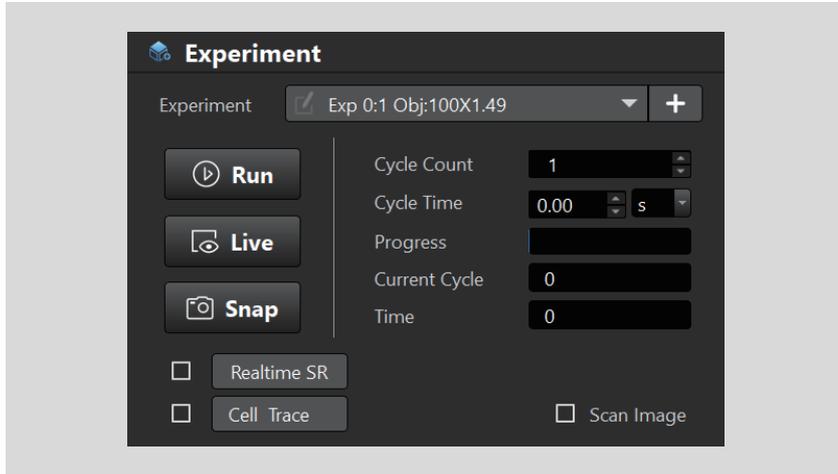


图2.3-1 Experiment区域

### Experiment

新建实验(用于软件识别显微镜物镜信息),可下拉切换实验,可删除实验,切换物镜后需要添加新的实验。

### Run、Live、Snap拍摄模式

- **Run为实验模式**,按照设定的实验参数进行拍摄,可中途停止。默认为简易模式,开启Sequence或Multi ROI则为高级模式,高级模式按设定的Sequence或Multi ROI参数执行拍摄。
- **Live为实时预览模式**,不保存数据,用于寻找样本;支持双激光预览(需要当前设备硬件支持,488和561,405和640,445和640),支持单激光多Channel预览。
- **Snap为试拍模式**,按当前位置和实验参数拍摄一张图片,用于查看拍摄效果不保存数据,高级模式则按当前选中的Sequence拍摄一张。

### Cycle Count

实验拍摄的循环次数。

### Cycle Time

每两个循环之间的时间间隔,当设定时间小于实际的拍摄时间,拍摄会连续执行,时间单位可选择ms、s、min。

### Progress

显示当前拍摄进度和已采集张数。

### Current Cycle

当前实验拍摄到第几个循环。

### Time

当前消耗的拍摄时长(单位:秒)。

### 3D Focus

Imaging Mode选择3D模式时才会显示该按钮,用户可选择是否开启。

限制条件:

- ① 多Cycle时启用;
- ② Sequence和Multi ROI中不生效;
- ③ 添加Z Stack时PFS必须为On;
- ④ Z Stack需要使用Start/End模式;
- ⑤ Cycle Time设置的时间比单个Cycle的预估拍摄时间大于5 s以上(或设置0 s)。

**尼康**设备运行逻辑:每个cycle的运行间隔会把PFS打开,拍摄下一个cycle前才会将PFS关闭。

**蔡司**设备运行逻辑:在马上要拍摄下一个cycle前,做一次definite focus。

### Realtime SR

Snap重建和Live重建勾选框和设置,用户可选择是否开启。

- 勾选后Snap时进行实时重建,一次重建一个cycle,若为3D模式,转化为Single Slice模式,只对当前层进行重建。带SIM的模式可显示重建效果图,不带SIM的模式显示叠加图,WF、BF模式为原图。
- **Live重建**:勾选后进行Live时会实时重建当前Live捕获的图像,BF、BF 3D模式不支持Live重建。点击Realtime SR按钮弹出设置Live重建时调用的不同重建算法分别为rDL WF to SR、rDL SIM Deconvolution和Wiener Reconstruction,其中rDL WF to SR和rDL SIM Deconvolution两种深度学习重建均配备了预训练好的onnx模型,rDL WF to SR可修改使用Realtime SR Model训练的深度学习模型,rDL SIM Deconvolution则不可更改深度学习模型,Wiener Reconstruction的重建参数同步Reconstruction模块中Conven SIM Recon的重建参数。

### AdaBleach

自适应漂白功能, 默认隐藏, 需要在Debug界面进行开启, 勾选后执行多cycle实验时激光功率按指定的算法调整laser功率, 使其随cycle的变化而进行功率补偿, 算法的补偿系数在Power Curve页面中设置。

### Cell Trace

细胞追踪功能, 用户可选择是否开启, 勾选后用户在每个ROI可指定唯一一个Sequence进行细胞追踪, 长时程多Cycle实验适用。点击Cell Trace按钮弹出设置窗口, 可选择追踪方法和进行运动设置。

### Scan Image

扫图拼图功能, 勾选后弹出扫图拼图设置模块, 勾选后Run采集均为扫图拼图, 包含Center方法和Boundary方法, 采集的数据保存在【File List】当前设置的Storage Folder中。

## 2.4 [Imaging Mode] 区域

VSIM软件的【Imaging Mode】区域默认位于主界面左侧位置 (【Experiment】下方, 如图2.4-1、图2.4-2所示), 不同物镜参数展示不同的模式。

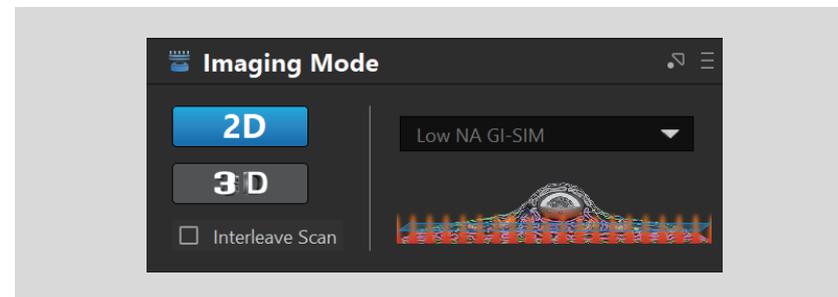


图2.4-1 3D模式

### 2D

2D模式列表 (Nikon100\*1.49NA) : TIRF-SIM、TIRF、Hight NA GI-SIM、Hight NA GI、Low NA GI-SIM、Low NA GI、Single Slice-SIM、Oblique、WF、BF。

2D模式列表 (Zeiss63\*1.46NA) : Hight NA TIRF-SIM、Low NA TIRF-SIM、Hight NA GI-SIM、Single Slice-SIM、Oblique、WF、BF。

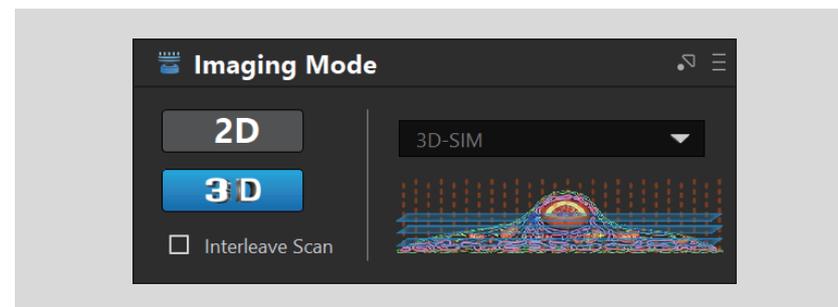


图2.4-2 3D模式

### 3D

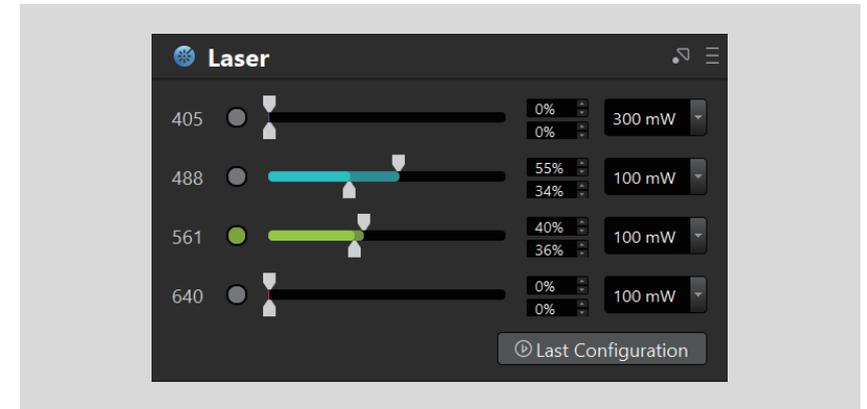
3D模式列表 (Nikon100\*1.49NA) : 3D-SIM、Oblique 3D、BF 3D、WF 3D、Stacked Slices-SIM。

**3D模态列表 (Zeiss63\*1.40NA) :**3D-SIM、Oblique 3D、BF 3D、WF 3D、Stacked Slices-SIM。

**Interleave Scan:**多色激光Sequence采集3D模态时适用,需要Sequence列表下的Z Stack参数一致。实验开始后会在第一层按Sequence顺序使用不同激光扫描采集,所有Sequence的第一层采集完成后Stack移动到第二层,继续按Sequence顺序使用不同激光扫描采集,每层采集完后移动到下一层直到将所有层都扫描完成。

## 2.5 【Laser】区域

VSIM软件的【Laser】区域默认位于主界面左侧位置(【ImagingMode】下方,如图2.5-1所示)。

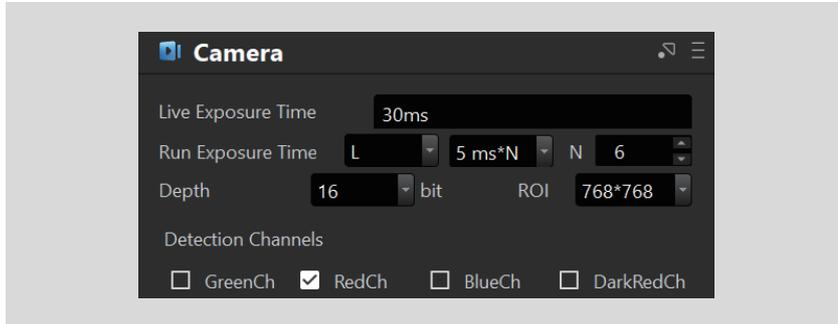


如图2.5-1 Laser区域

- 包括405 nm、445 nm、488 nm、561 nm、640 nm激光 (以实际硬件配置为准)。405和445共用Blue Channel, 488为Green Channel, 561为Red Channel, 640为DarkRed Channel。
- 选中左侧的圆点则开启对应波长激光。
- 上面滑动条代表“Snap”、“Run”(实际拍摄过程)中AOTF功率百分比,滑动条右侧的百分比值同步滑动条。
- 下面滑动条代表“Live”(预览模式)中AOTF功率百分比,滑动条右侧的百分比值同步滑动条。
- 最右侧功率下拉框代表对应波长激光器的功率(默认为100 mW, 50~500 mW可选)。
- Last Configuration: 读取上一次采集时保存的Laser设置参数。

## 2.6 【Camera】区域

VSIM软件的【Camera】区域默认位于主界面左侧位置（【Laser】下方，如图2.6-1所示）。



如图2.6-1 Camera区域

### Live exposure time

默认为30 ms，不允许修改。

### Run exposure time

L (long) 曝光时间包含1 ms、2 ms、5 ms、5 ms\*N (N范围1~100) 四种选项，默认使用5 ms\*6 曝光，S (short) 曝光时间包含0.1 ms、0.2 ms、0.4 ms、0.4 ms\*N (N范围1~12) 四种选项。

### Depth

相机拍摄位深度，16 bit动态范围为65535，噪声较高，适合亮度差别大样本（推荐）；12 bit动态范围为4095，噪声很低，适合大部分荧光样本；8 bit动态范围为255，噪声高，但速度很快，适合连续高速拍摄。

### ROI

图像分辨率 (1536\*1536、1024\*1024、768\*768、512\*512、256\*256)，其中以尼康100X油浸物镜配置的1536\*1536对应94\*94 μm<sup>2</sup>视野 (pixel size 61.2 nm/pixel)，视野越小成像速度越快，其中Depth为8 bit时，没有256\*256的配置。

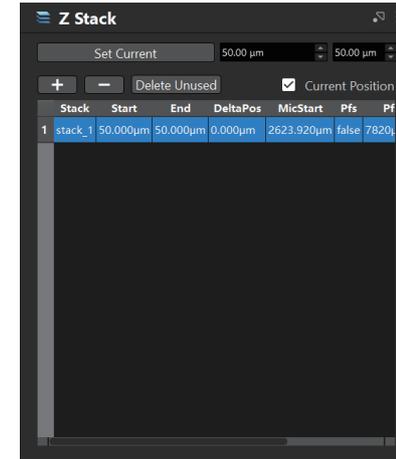
### Detection Channels

当前通道配置，单激光时会自动选择对应的Channel，也可以配置单激光多Channel。

## 2.7 【Z Stack】区域

VSIM软件的【Z Stack】区域默认位于主界面左下方位置（【Camera】下方，如图2.7-1、2.7-2、2.7-3所示）。

### 2D【Z Stack】



### Z Stack列表

显示添加的Stack信息，包括Start信息、End信息、DeltaPos信息、MicStart信息、PFS信息。

### Set Current

设置当前PZT位置，需要Login后才显示Set Current按钮，输入数值后点击Set Current生效。

► 图2.7-1 2D Z Stack



用于添加或删除列表中的Stack信息，被Sequence使用的Stack限制删除。

### Delete Unused

一键删除所有没被Sequence使用的Stack。

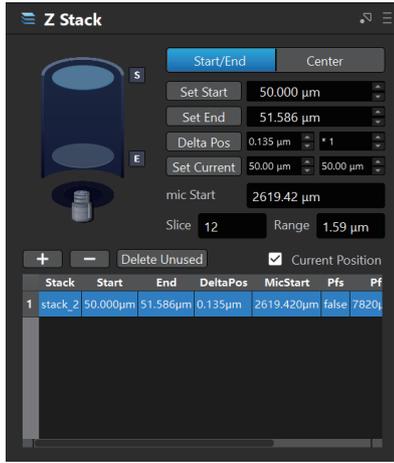
### Current Position

用于开启或者关闭Current Position功能。Run启动时：

- 当前为2D模式且Current Position选中，物镜不移动，所有Sequence以当前位置进行拍摄。
- 其它情况：物镜移至第一个Sequence的MicStartPos，以该Sequence为基准，重新计算其余Sequence的Z Stack值，判断是否有超界并提示。最终成图MicStartPosition, HomePosition, EndPosition值可能和用户操作时不一样，但物镜到平台的距离、Slice、Range和操作时一致。

## 3D[Z Stack]

### Start/End模式



#### Set Start

按钮设置扫描开始焦面。

#### Set End

按钮设置扫描结束焦面。

#### Delta Pos

扫描时, 每层厚度(在Stacked Slices SIM 模式下可以设置每层厚度为 0.135 µm的N倍)。

▶ 图2.7-2 3D Z Stack (Start/End)

#### Set Current

设置当前PZT位置, 默认隐藏, 需要login后才显示Set Current按钮, 左侧的输入框输入数值后点击Set Current生效。

#### Mic Start

当前物镜的位置坐标。

#### Slice

扫描层数。

#### Range

扫描厚度。

#### Z Stack列表

显示添加的Stack信息, 包括Start信息、End信息、DeltaPos信息、MicStart信息、PFS信息。



用于添加或者删减列表中的Stack信息, 被Sequence使用的Stack限制删除。

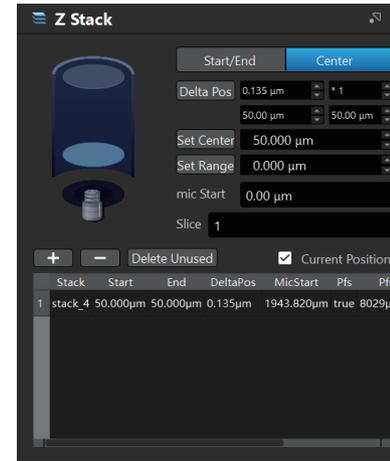
#### Delete Unused

一键删除所有没被Sequence使用的Stack。

#### Current Position

3D模式下, 该功能无效。

## Center模式



#### Delta Pos

扫描时, 每层厚度(在Stacked Slices SIM 模式下可以设置每层厚度为 0.135 µm的N倍)。

#### Set Current

设置当前PZT位置, 需要Login后才显示Set Current按钮, 输入数值后点击Set Current生效。

▶ 图2.7-3 3D Z Stack (Center)

#### Set Center

设置中心焦面。

#### Mic Start

当前物镜的位置坐标。

#### Set Range

输入需要扫描样本厚度。

#### Slice

扫描层数。

#### Z Stack列表

显示添加的Stack信息, 包括Start信息、End信息、DeltaPos信息、MicStart信息、PFS信息。



用于添加或者删减列表中的Stack信息, 被Sequence使用的Stack限制删除。

#### Delete Unused

一键删除所有没被Sequence使用的Stack。

#### Current Position

3D模式下, 该功能无效。

## 2.8 [Image View] 区域

VSIM软件的【Image View】区域默认位于主界面中间位置(如图2.8-1所示)。

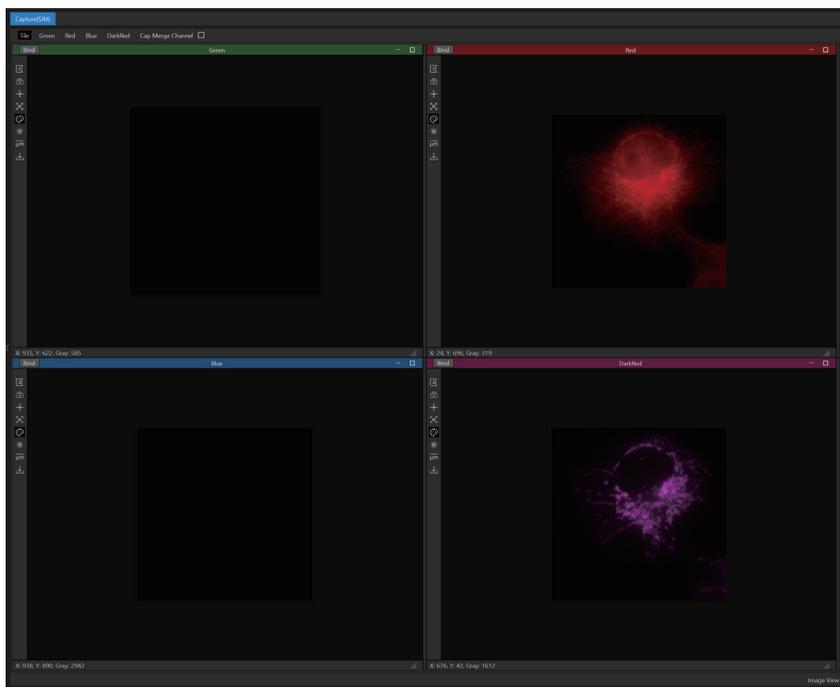


图2.8-1 Image View区域

Image View默认展示Capture (SIM) 的内容, File List打开的文件则以对应实验文件夹名称新建标签页显示, 限制最多可勾选的图像显示数量为10个。

勾选Cap Merge Channel即可进行Merge操作(需要先配置Channel Alignment参数)。可切换标签页查看不同实验的图像, Image View中可对Channel布局进行调整, 点击标签页工具栏Channel的标题可最大化该Channel, 点击Tile即恢复为默认的四通道显示(File List打开的则是平铺显示)。每个Channel左侧有一列工具栏。

### Bind

选择绑定当前Channel的Laser Emission(图2.8-2), 用户可自行配置Emission在指定的Channel位置, 已配置的Emission无法重复配置, 目前Channel只有4个。

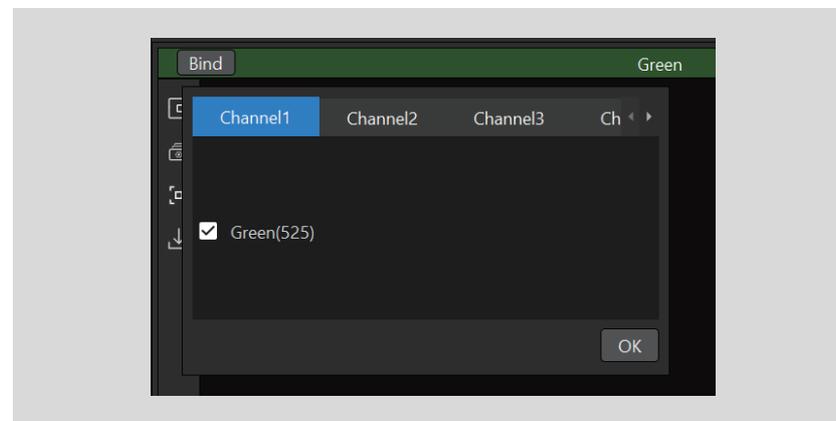


图2.8-2 Bind

### Hide/show Navigator

图像放大后通过导航器的方框快速定位感兴趣区域。

### Toolbar

工具库, 查看或修改当前图像的灰度值平均值、伪彩、过曝、画图、亮度和对比度调节、标尺等。

### 2D 3D 2D/3D

默认显示为2D视图, 当打开的是3D文件时, 可切换为3D视图。

### Reset transform

图像缩放后单击该按钮, 图像尺寸和位置恢复初始状态, 3D视图下同样适用。

### CrossLine

选择启用/关闭十字辅助线。

### Image transform

默认隐藏, 需在Debug中打开, 图像垂直翻转以及旋转。

### PseudoColor

选择启用/关闭伪彩。

### OverExpose

选择启用/关闭过曝。

### ScaleBar

选择启用/关闭标尺。

### Save image

图像保存, 可设置文件名、保存类型、保存路径, 保存为视频格式时可设置视频帧率。

### Live 滚轮

Live时出现在ImageView左侧, 点击图标, 变成高亮状态, 此时鼠标位于图像范围内可以使用鼠标滚轮控制显微镜Z Position移动。2 s之内最大位移为5  $\mu\text{m}$ 。

### Hand tool

鼠标滚轮放大或缩小图像, 按住鼠标左键拖动图像, Live状态双击鼠标中心设置中心点。

## 2.9 【File List】区域

VSIM软件的【File List】区域默认位于主界面右上角位置(如图2.9-1所示)。

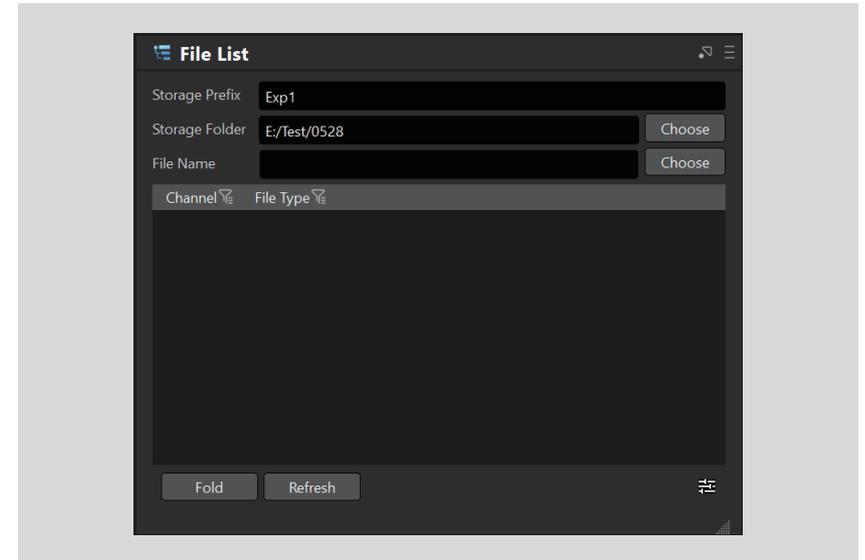


图2.9-1 File List区域

### Storage Prefix

设置实验文件夹前缀, 前缀后接自动计数(例: Exp1\_001, 计数最大为999);

### Storage Folder

设置实验文件保存路径, 在设定的保存路径下会生成实验文件夹, 该文件夹内会保存当前实验的拍摄数据, 需要点击右侧的Choose进行保存路径的选择;

### File Name

显示文件列表当前展示的文件夹路径; 获取列表数据需要点击右侧的Choose进行保存路径的选择, 选择保存实验图像数据文件夹的目录(可设置与Storage Folder一致, 或设置其他包含实验数据文件夹的目录), 点击选择文件夹即可读取当前文件夹内的实验文件列表信息。当设置文件夹有实验文件新增的时候, 点击Refresh可刷新当前File List, 刷新后可查看当前路径下最新的实验文件夹。

### Channel文件筛选

Select All为全部展示, 可根据Green、Red、Blue和Dark Red组合或单独勾选进行展示;

### File Type文件筛选

Select All为全部展示, 可根据Raw Data、WF、WF Denoise/Deconv、rDL WF、SIM、SIM Denoise/Deconv、rDL SIM、Merge data等组合或单独勾选进行展示;

### Fold

一键折叠已展开的实验文件夹。

 :位于右下角, 可选择在File List中显示的详细信息, 可选Show Channel、Show Size和Show Thumbnail, 即显示通道、文件大小和缩略图(如图2.9-2所示)。

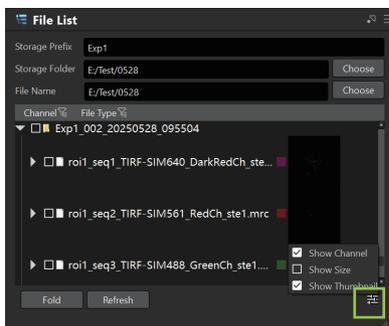


图2.9-2

### File List鼠标右键小工具:

**Copy Path:**选中文件后在对应文件鼠标右键选择Copy Path, 可复制当前文件的绝对路径信息。

**Open Path:**选中文件后在对应文件鼠标右键选择Open Path, 在文件资源管理器中打开当前实验的文件夹。

**Image Tool:**选中文件或实验文件夹鼠标右键选择Image Tool, 可将选中的实验文件夹内的mrc文件执行批量转tif格式、批量转Merge或者导出原图至指定文件夹。

**Close All:** 一键关闭打开的所有文件;

**Remove Selected:** 移除File List选中的文件;

**Removed All:** 移除File List中打开的所有文件;

**Delete Seleted:** 删除File List 中选中的文件。

## 2.10 【Reconstruction】区域

VSIM软件的【Reconstruction】区域默认位于主界面右侧位置(【File List】下方, 如图2.10-1、2.10-2、2.10-3所示)。

### Conven SIM Recon

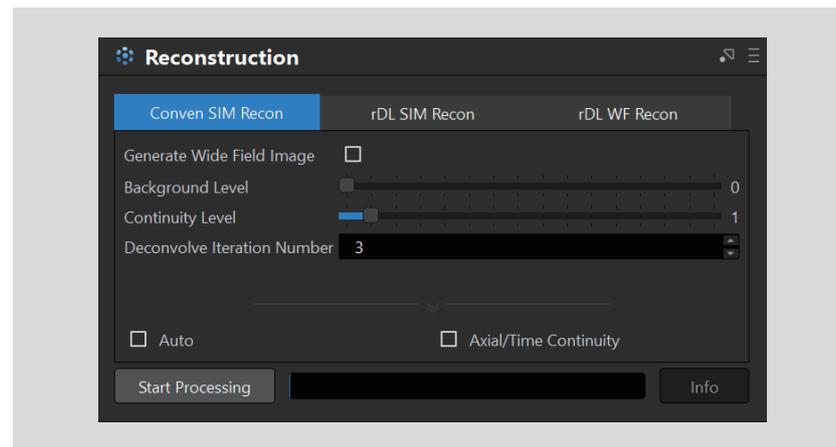


图2.10-1 Conven SIM Recon

### Generate Wide-Field Image

勾选则生成相应的宽场图, 不勾选则执行重建。

### Background Level

去背景处理程度, 包含0~15个级别。

### Continuity Level

连续性参数, 包含0~15个级别, 参数越高图像越连续(即越平滑)。

### Deconvolve Iteration Number

去卷积算法的迭代次数, 包含0~15个级别, 通常设置1~5次。

### Auto

勾选则自动估计Background Level和Continuity Level。

## Axial/Time Continuity

勾选则判断数据类型使用时间连续性或者Z轴连续性进行关联去噪, 3D数据就是Z轴连续性, 多cycle的就是时间连续性, 去噪时可将前后几帧图像数据进行关联去噪。

## Start Processing

点击按钮后程序开始执行重建或生成宽场任务。

## Info

若File List选择原始文件, 点击Info按钮则显示实验的详细设置信息; 若选择重建后的文件, 点击info按钮则显示重建过程的详细日志信息。

备注: 默认输入文件名添加相应后缀来提示重建模块参数设置信息, 其中宽场: \_WF; 重建: \_RC; 去背景: \_BgX, 其中X为1~15; 降噪: \_DnX, 其中X为1~15; 去卷积: \_DcX, 其中X为1~30; 后缀名: .out.mrc。

例: roi1\_seq1\_3D-SIM488\_GreenCh\_RC\_Bg3\_Dn1\_Dc4.out.mrc

## rDL SIM Recon

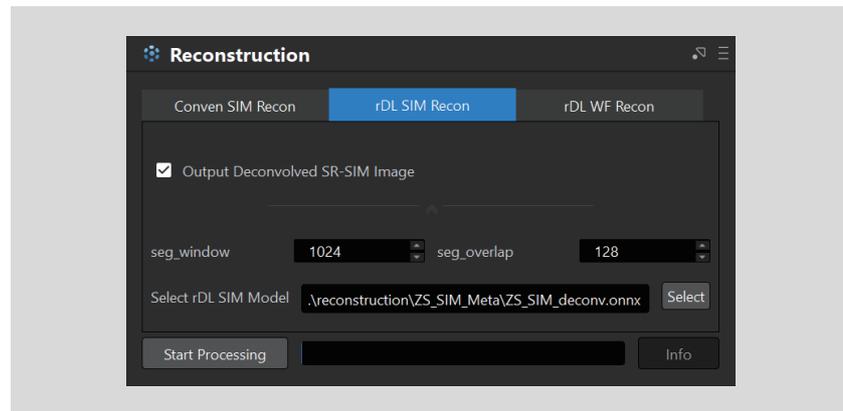


图2.10-2 rDL SIM Recon

## Output Deconvolved SR-SIM Image

勾选是否需要输出去卷积图像(限制Select rDL SIM Model时可查看到的onnx文件)。

## Select rDL SIM Model

选择需要加载的深度学习模型(onnx文件), 可以是实验室训练好的预训练模型, 也可以是用户之前在预训练模型基础上微调后保存的模型。

## seg\_window

默认1024; 当预测时提示显存不足时, 可把seg\_window调成768/512/256等更小值进行处理。

## seg\_overlap

默认128; 当输出图像亮度不均匀时, 可把seg\_overlap设置成512或更大。

## Start Processing

点击按钮后程序开始执行重建任务, 完成后在Image View中自动显示图像。

## Info

若File List选择原始文件, 点击Info按钮则显示实验的详细设置信息; 若选择重建后的文件, 点击Info按钮则显示重建过程的详细日志信息。

## rDL WF Recon

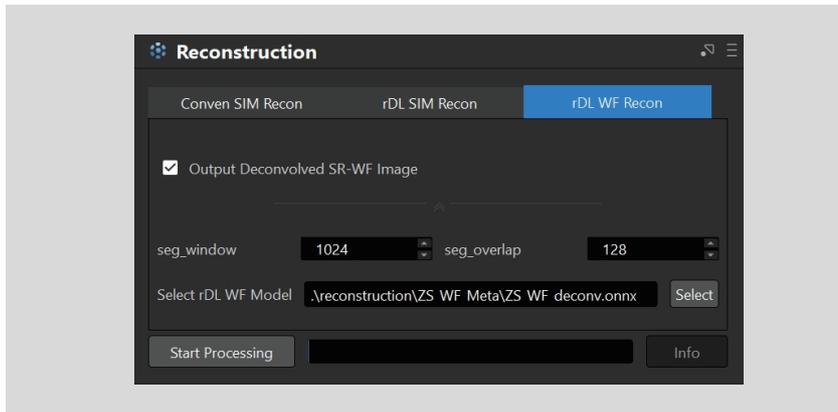


图2.10-3 rDL WF Recon

### Output Deconvolved SR-WF Image

勾选是否需要输出去卷积图像(限制Select rDL WF Model时可查看到的onnx文件)。

### seg\_window

默认1024;当预测时提示显存不足时,可把seg\_window调成768/512/256等更小值进行处理。

### seg\_overlap

默认128;当输出图像亮度不均匀时,可把seg\_overlap设置成512或更大。

### Select rDL WF Model

选择需要加载的深度学习模型(onnx文件),可以是实验室训练好的预训练模型,也可以是用户之前在预训练模型基础上微调后保存的模型。

### Start Processing

点击按钮后程序开始执行宽场处理任务,完成后在Image View中自动显示图像。

### Info

若File List选择原始文件,点击Info按钮则显示实验的详细设置信息;若选择重建后的文件,点击Info按钮则显示重建过程的详细日志信息。

## 2.11 【Model Finetuning】区域

VSIM软件的【Model Finetuning】区域默认位于主界面右侧位置(【Reconstruction】下方,如图2.11-1、2.11-2、2.11-3所示),Model Finetuning功能默认关闭,需要在导航栏View中勾选开启。

### rDL SIM Model

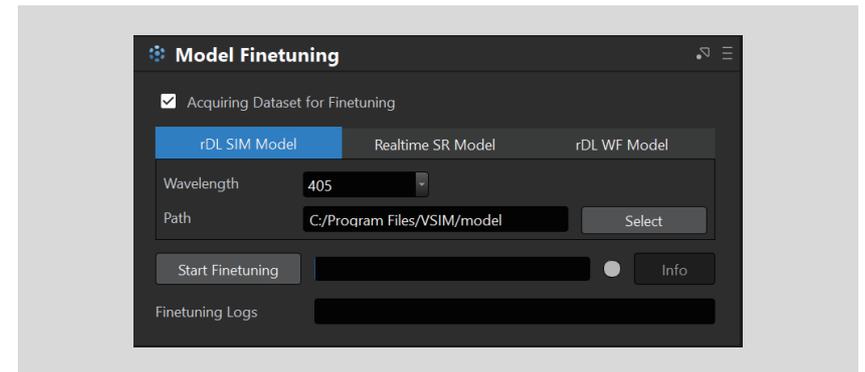


图2.11-1 rDL SIM Model

### Acquiring Dataset for Finetuning

勾选后启用采集微调数据,弹出Tips和Multi ROI,按Tips要求进行数据采集即可,训练完成后取消勾选即可退出训练模式,进行常规的实验采集。

### Wavelength

选择需要训练模型的波长,Multi ROI采集微调数据时与当前选择波长要一致。

### Path

点击右侧的Select按钮设置采集数据和模型的保存路径。

### Start Finetuning

采集数据完成后点击该按钮可进行数据微调,输出的onnx模型可在rDL SIM Recon时调用。

### Info

可查看Finetune information。

### Finetuning Logs

展示微调进程中相关的日志信息。

## Realtime SR Model

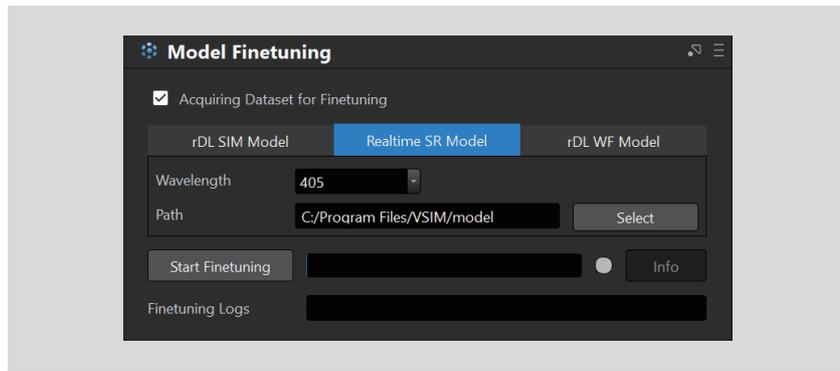


图2.11-2 Realtime SR Model

### Acquiring Dataset for Finetuning

勾选需要采集微调数据, 弹出Tips和Multi ROI, 按Tips要求进行数据采集即可, 训练完成后取消勾选即可退出训练模式, 进行常规的实验采集。

### Wavelength

选择需要训练模型的波长, Multi ROI采集微调数据时与当前选择波长要一致。

### Path

点击右侧的Select按钮设置采集数据和模型的保存路径。

### Start Finetuning

采集数据完成后点击该按钮可进行数据微调, 输出的onnx模型可在Live重建时(Realtime SR -> rDL WF SR)调用。

### Info

可查看Finetune information。

### Finetuning Logs

展示微调进程中相关的日志信息。

## rDL WF Model

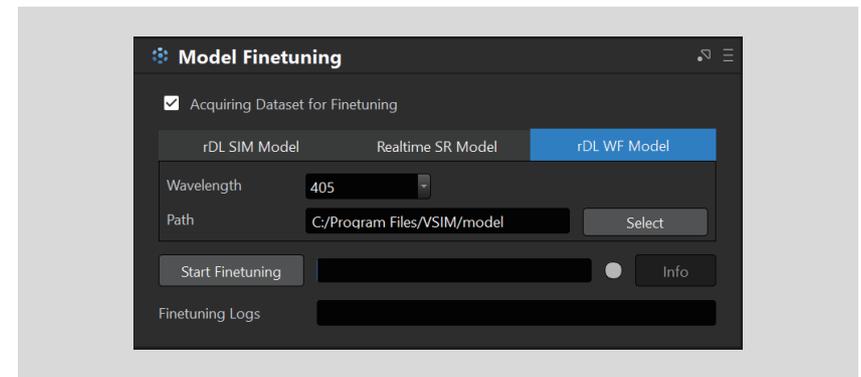


图2.11-3 rDL WF Model

### Acquiring Dataset for Finetuning

勾选需要采集微调数据, 弹出Tips和Multi ROI, 按Tips要求进行数据采集即可, 训练完成后取消勾选即可退出训练模式, 进行常规的实验采集。

### Wavelength

选择需要训练模型的波长, Multi ROI采集微调数据时与当前选择波长要一致。

### Path

点击右侧的Select按钮设置采集数据和模型的保存路径。

### Start Finetuning

采集数据完成后点击该按钮可进行数据微调, 输出的onnx模型可在rDL WF Recon时调用。

### Info

可查看Finetune information。

### Finetuning Logs

展示微调进程中相关的日志信息。

## 2.12 【Microscope Control】区域

VSIM软件的【Microscope Control】区域默认位于主界面右下角位置(如图2.12-1、图2.12-2所示)。

### 尼康显微镜



图2.12-1 尼康显微镜模块

### Imaging/Eyepiece

切换拍照模式与目镜观察模式, 目镜观察模式FITC。

### Focus On/Off

打开/关闭进行焦面锁定。

### Escape

物镜降到最底部, 再次点击可恢复到之前位置。

### PFS Offset与PFS Interval

锁焦状态下焦面的偏移量, 可通过PFS Interval与加减号进行PFS Offset的调节。

### Z Position与Z Interval

物镜当前的高度, 可通过Interval与加减号进行Z Position的调节。

### NosePiece

当前物镜参数, 右侧按钮启用后可以下拉选择切换物镜。

### X、Y Gear

电荷载物台运动速度。

### X、Y Position与Step Size

电荷载物台当前位置, 通过上下左右按钮与Step Size控制载物台的位移。

### Quick Set

Eyepiece模式下, 快速切换荧光 (FL) 和明场 (BF)。

### DIA

明场照明亮度调节, 勾选右侧方框为打开明场照明, 进行BF的Live、Snap或Run自动勾选并应用Target值。

### D-LEDI

目镜下宽场汞灯照明强度调节, 勾选右侧方框为打开汞灯照明。

### Turret 1与Turret 2

荧光转盘1与荧光转盘2的位置选择。下层给SIM用, 上层给汞灯用。

### Condenser

电动聚光镜控制(需要硬件支持)。

### Main Branch

切换汞灯的反射镜, 默认隐藏, 需login后打开。

## 蔡司显微镜



图2.12-2 蔡司显微镜模块

### Imaging/Eyepiece

切换拍照模式与目镜观察模式，目镜观察模式FITC。

### Focus On/Off

打开/关闭进行焦面锁定。

### Escape

物镜降到最底部，再次点击可恢复到之前位置。

### Z Position与Z Interval

物镜当前的高度，可通过Interval与加减号进行Z Position的调节。

### NosePiece

当前物镜参数，右侧按钮启用后可以下拉选择切换物镜。

### X、Y Position与Step Size

电荷载物台当前位置，通过上下左右按钮与Step Size控制载物台的位移。

## Quick Set

Eyepiece模式下，快速切换荧光 (FL) 和明场 (BF)。

## TL Led

明场照明亮度调节，进行BF的Live时可调节明场照明亮度，Snap或Run时应用Target值。

## HXP 120

目镜下宽场汞灯照明强度调节，勾选右侧方框为打开汞灯照明。

## Turret 1与Turret 2

目镜下宽场汞灯照明强度调节，勾选右侧方框为打开汞灯照明 (需要硬件支持)。

## Reflector

滤色镜转轮切换。

## Optovar

电动变倍器转盘切换。

## Main Branch

切换汞灯的反射镜，默认隐藏，需login后打开。

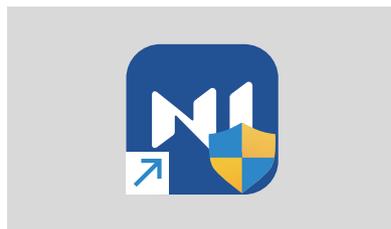
## 三、软件操作范例

### 3.1 实验前准备

- 1 电脑主机先开机, 电脑进入系统后按设备开机操作流程开启设备的各个部件。
- 2 打开VSIM软件 (SIM和SIM X软件安装后桌面图标不一致, 如图3.1-1、3.1-2所示, 按实际安装版本打开即可), 打开软件后查看软件右下角界面显示Heart Beat状态, 绿色圆型图标表示连接成功, 连接失败时显示红色, 连接失败则需要检查硬件通讯是否正常。



3.1-1 VSIM X 2.3



3.1-2 VSIM 2.3

- 3 软件连接成功后可按实验需求在显微镜滴加镜油或水 (具体看物镜的NA值)、放置样品、调焦等一系列操作。

### 3.2 2D SIM操作步骤 (以TIRF-SIM模式为例)

- 1 打开桌面VSIM软件, 添加实验并设置拍摄循环数和每个循环间隔时间。在【Experiment】区域, 点击Experiment右侧“+”输入命名并添加实验, 然后设置Cycle Count为2, Cycle Time为5.00 s (Cycle Count和Cycle Time可按实验需求进行调整, 如图3.2-1所示。)

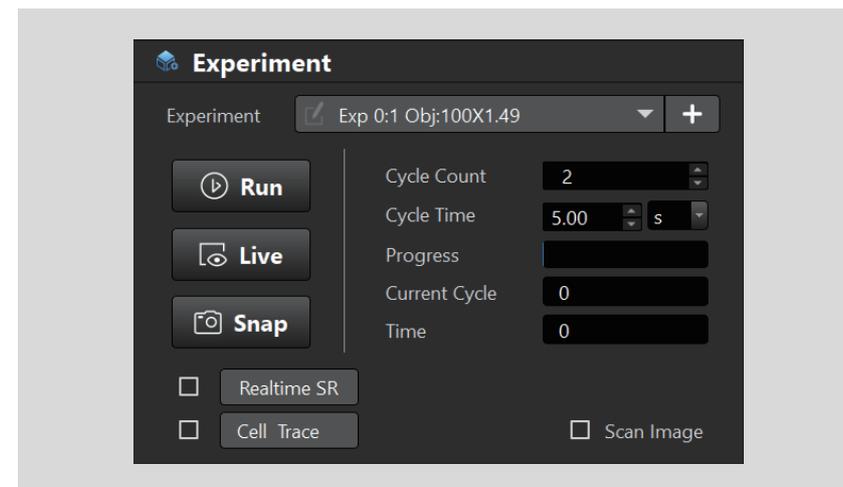


图3.2-1

- 2 根据实验需求选择模式。在【Imaging Mode】区域, 先点击“2D”再选择“TIRF-SIM”模式, (如图3.2-2所示)。

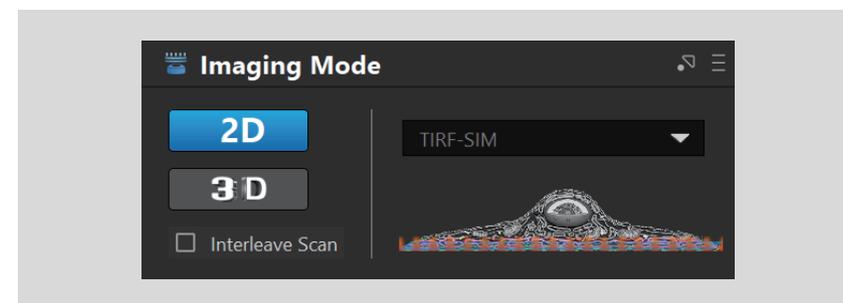


图3.2-2

3 根据实验需求设置激光的参数。

在【Laser】区域,选择488激光(点击488旁边的圆点),上面蓝色进度条代表“Snap”、“Run”(实际拍摄过程)中AOTF功率50%,下面蓝色进度条代表“Live”(预览模式)中AOTF功率50%,可以调节右边激光器的功率100mW(AOTF功率百分比和激光器功率可按实验需求进行调整,如图3.2-3所示)。



图3.2-3

4 设置相机参数。

在【Camera】区域,设置ExposureTime为30 ms、Depth为16和ROI为768\*768(曝光时间、Depth和ROI大小可按实验需求进行调整),软件会自动选中Green通道探测(备注:根据选择的激光波长,软件自动匹配对应颜色的通道探测,如图3.2-4所示)。

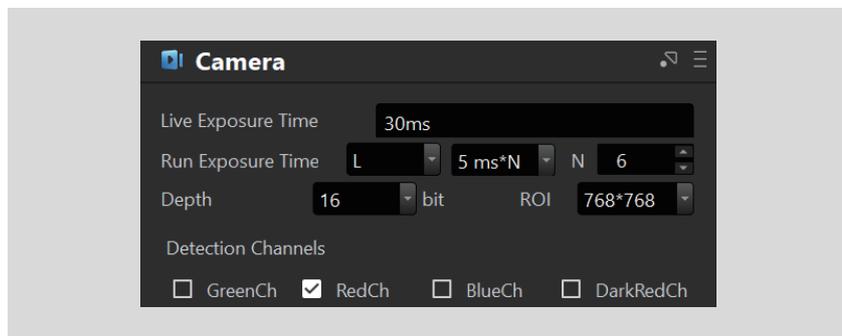
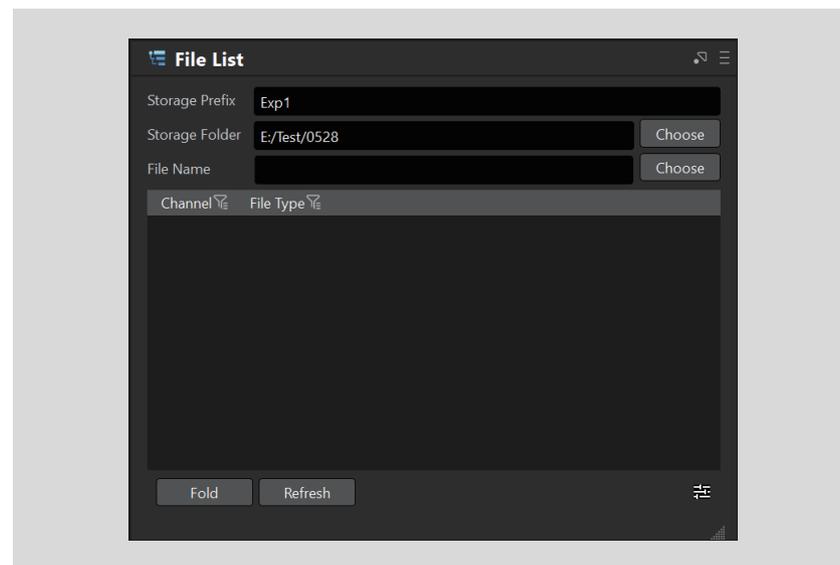


图3.2-4

5 在【File List】区域设置实验文件夹前缀和保存路径(如图3.2-5所示)。



如图3.2-5

6 样品预览。

- 【Experiment】区域点击“Live”预览样品,当前显微镜观察到的图像会在【Image View】区域Capture(SIM)中对应的Channel中显示,通过控制杆旋钮调节焦面,把显示图像调节清晰,也可对激光参数和相机参数进行调整。
- 在【Microscope Control】区域也可通过Focus On和PFS Offset功能进行锁焦和微调焦面,确认焦面调试完毕后,点击“Stop”停止预览,此时【Z Stack】会自动生成stack参数,Run的时候会默认调用该stack参数。

7 【Experiment】区域点击“Run”按钮运行实验,设备会按照当前实验信息进行图像采集,运行完毕后,在【File List】设置的实验文件保存路径找到数据文件,将原始数据重建(VSIM自带的Reconstruction功能或其他重建软件均可)后,在Image J中分析或者在【File list】中通过配置File Name路径后打开文件查阅结果。

### 3.3 3D SIM操作步骤 (以3D-SIM模式为例)

1 VSIM软件添加实验并设置拍摄循环数和每个循环间隔时间。

在【Experiment】区域, 点击【Experiment】区域右侧“+”输入命名并添加实验, 然后设置Cycle Count为2, Cycle Time为10.00 s(Cycle Count和Cycle Time可按实验需求进行调整), 勾选3D Focus (可选项, 勾选后则需要注意3D Focus生效必须满足2.3中描述的限制条件, 如图3.3-1所示)。

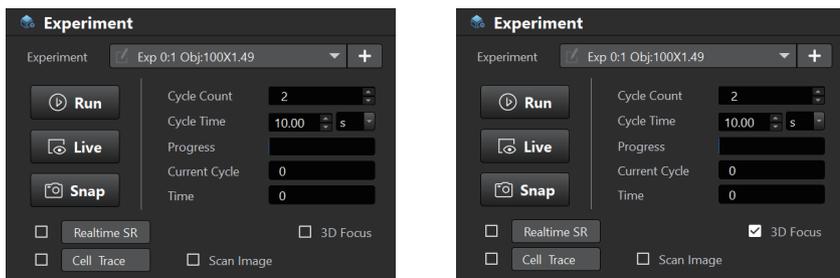


图3.3-1 左侧未开启3D Focus, 右侧开启3D Focus

2 根据实验需求选择模式。

在【Imaging Mode】区域, 先点击“3D”再选择“3D-SIM”模式(如图3.3-2所示)。

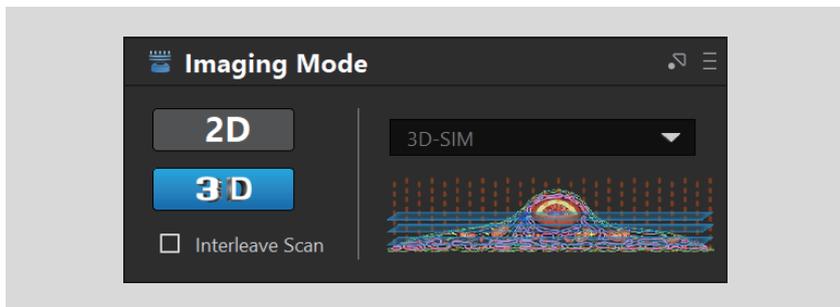


图3.3-2

3 设置激光的参数。

在【Laser】区域, 选择488通道, 并设置激光功率和AOTF百分比(如图3.3-3所示)。

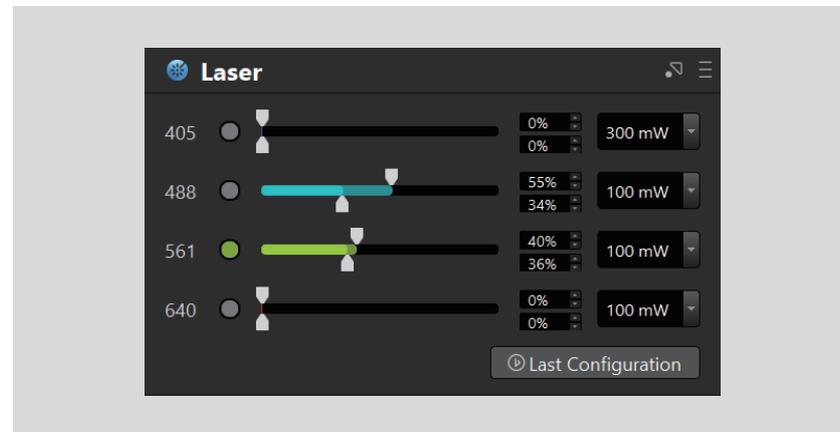


图3.3-3

4 设置相机参数。

在【Camera】区域, 设置Long Exposure Time为30 ms、Depth为16和ROI为768\*768(如图3.3-4所示)。

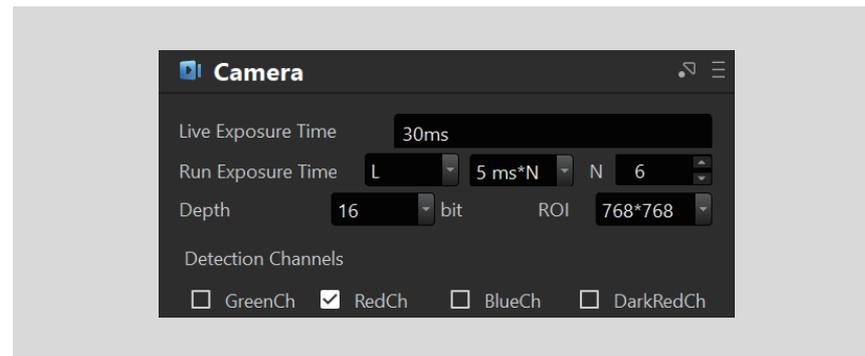


图3.3-4

5 在File List处设置实验文件夹前缀和保存路径(如图3.3-5所示)。

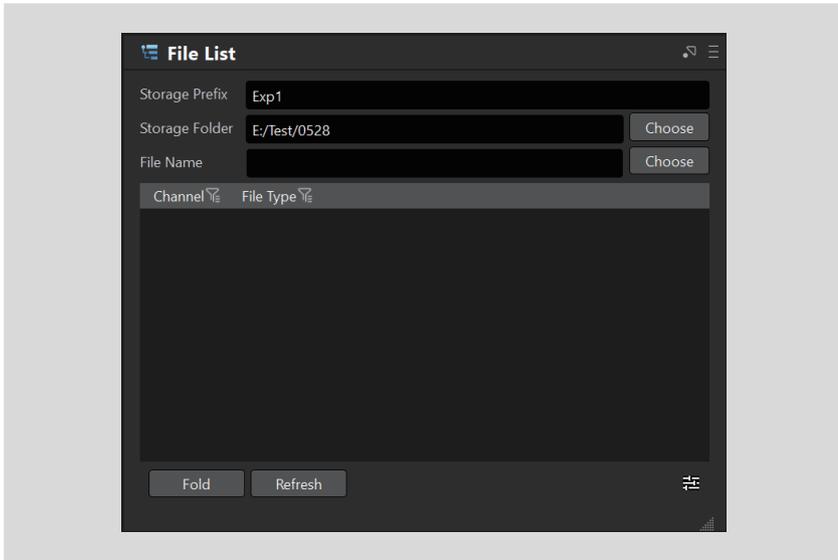


图3.3-5

6 设置扫层厚度方法一 (Start/End模式, 与Center模式二选一即可)。

【Experiment】点击Live预览, 通过控制杆调整Z轴坐标为拍摄起始位置后在【Z Stack】区域, 点击“Set Start”, 然后调整Z轴坐标为需要的结束位置, 再点击“Set End”, 在Z Stack列表中点击“+”添加stack\_1 (如图3.3-6所示)。

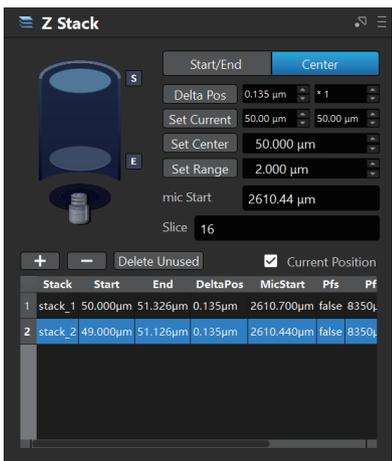


图3.3-6 Start/End模式

7 设置扫层厚度方法二 (Center模式, 勾选3D Focus时不可用该模式进行设置)。

【Experiment】点击Live预览, 在【Z Stack】区域, 通过控制杆对Z轴坐标进行调焦。当调节为最佳拍摄位置后在【Z Stack】区域选择Center页面, 点击Set Center按钮, 在Set Range的输入框输入需要拍摄的样本厚度 (备注: 以Set Center位置为中间点, 上下偏移Set Range/2的值为拍摄的起始和终止位置), 点击Set Range, 在Z Stack列表中点击“+”添加stack\_2 (如图3.3-7所示)。

8 在【Experiment】区域点击“Run”运行实验, 运行时默认会调用当前设置 (最新设置) 的Stack参数进行实验, 运行完毕后, 在之前设置的实验文件保存路径找到数据文件, 将原始数据重建后在Image J中分析。

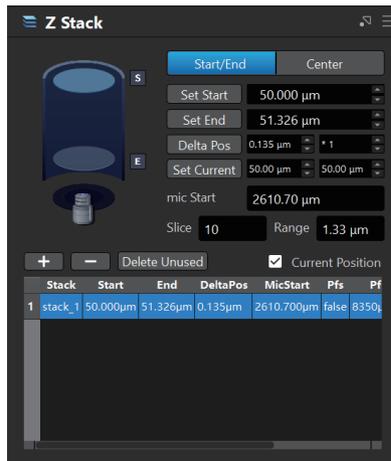


图3.3-7 Center模式

### 3.4 Sequence功能 (以2D模态为例)

- 1 点击工具栏Sequence选项, 展示Sequence操作框 (在左侧实验参数设置中, 一般在【Camera】区域下方), 打开Sequence操作框后即代表进入sequence高级模式, 在当前样本位置可添加多个实验序列进行图像采集。
- 2 按2D模态的采集步骤进行2D模态选择、激光参数、相机参数、Z Stack参数设置。
- 3 实验参数配置完成后在Sequence操作框点击Add, 可将当前【Imaging Mode】、【Laser】、【Camera】、【Z Stack】参数组合并保存为“sequence 1” (如图3.4-1所示)。

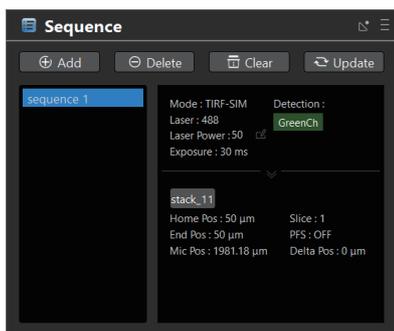


图3.4-1

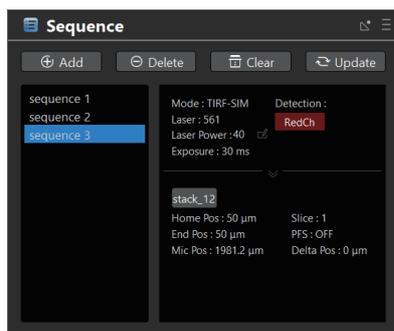


图3.4-2

- 4 可继续修改【Imaging Mode】、【Laser】、【Camera】或【Z Stack】为其它参数, 点击Add, 可将修改后的参数组合并保存为sequence 2。以此类推, 可添加sequence 3、sequence 4... (如图3.4-2所示)。
- 5 【Experiment】区域点击“Run”, 会按照Sequence列表的参数逐个Sequence执行, 运行完毕后, 在【File List】设置的实验文件保存路径找到数据文件, 将原始数据重建 (VSIM自带的Reconstruction功能或其他重建软件均可) 后, 在Image J中分析或者在【File List】中通过配置File Name路径后打开文件查阅结果。
- 6 选中列表中的sequence点击“Delete”可删除选中的Sequence; “Clear”可清空列表内的所有Sequence; 先选中列表中的Sequence, 对当前实验参数进行修改, 点击“Update”按钮可更新当前Sequence的参数。

### 3.5 Multi-ROI功能 (以2D模态为例)

- 1 点击工具栏的Multi ROI选项, 展示Multi ROI操作框 (在左侧实验参数设置中, 一般在Camera区域下方, 如图3.5-1所示)。打开Multi ROI操作框后即代表进入Multi ROI高级模式, 可标记多个样本位置 (Point) 并关联实验序列 (sequence) 进行图像采集。

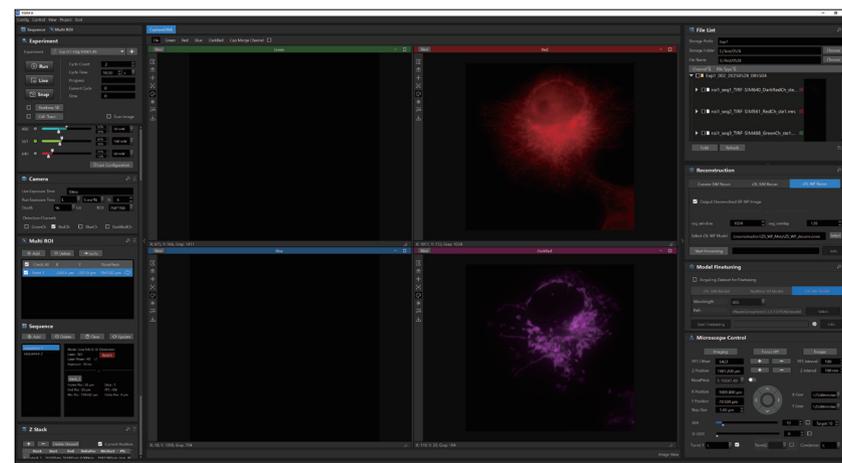


图3.5-1

- 2 按2D模态的采集步骤进行2D模态选择、配置激光参数、相机参数、Z Stack参数设置, 在【Experiment】区域点击“Live”按钮先预览样品并找到感兴趣的区域, 在Multi ROI中点击Add, 获取当前坐标信息添加Point 1并显示位移平台X、Y、Z坐标信息 (如图3.5-2、3.5-3所示)。

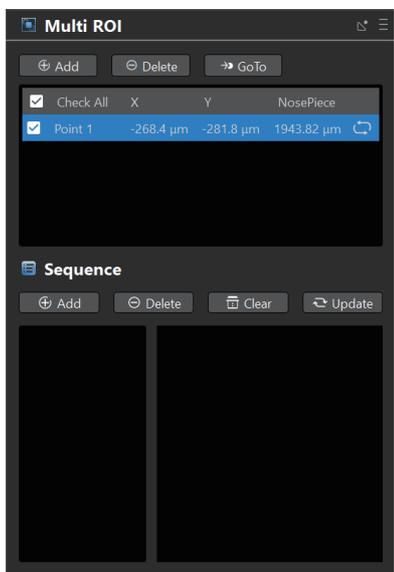


图3.5-2

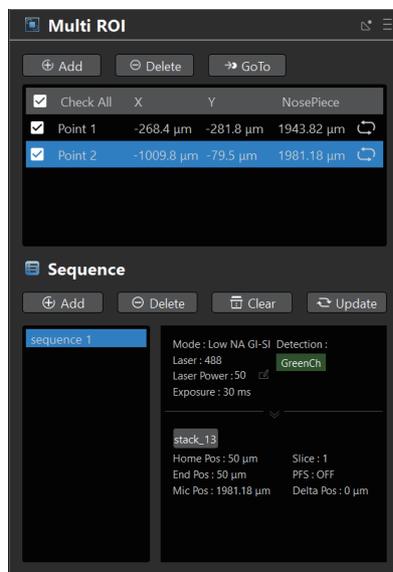


图3.5-3

3 在Sequence中点击Add,可将当前实验参数添加为sequence 1,此时也可以停止Live后修改实验参数继续添加不同的sequence,具体操作方法同3.4步骤。此时添加的sequence均会关联到Point 1(如图3.5-3所示)。

4 在Live状态下通过控制杆调节XY轴坐标进行位移,找到样本不同的拍摄区域,在Multi ROI中点击Add添加Point 2。此时Point 2会继承上一个Point的Sequence参数,也可对Point 2的Sequence参数进行修改。

5 重复以上步骤可添加多个Point和sequence,添加完成后可在【Experiment】点击“Stop”按钮停止预览。

6 【Experiment】区域点击“Run”按钮,显微镜先移动到Point 1位置,按顺序执行Point 1下的sequence,Point 1的sequence执行采集完成后显微镜移动到Point 2的位置,执行Point 2下的sequence直到完成所有的Point和cycle,运行完毕后,在【File List】设置的实验文件保存路径找到数据文件,将原始数据重建(VSIM自带的Reconstruction功能或其他重建软件均可)后,在Image J中分析或者在【File List】中通过配置File Name路径后打开文件查阅结果。

### 3.6 Multi-ROI功能(以3D模式Start/End模式为例)

1 点击工具栏的Multi ROI选项,展示Multi ROI操作框(在左侧实验参数设置中,一般在Camera区域下方,如图3.6-1所示)。打开Multi ROI操作框后即代表进入Multi ROI高级模式,可标记多个样本位置(Point)并关联实验序列(sequence)进行图像采集。

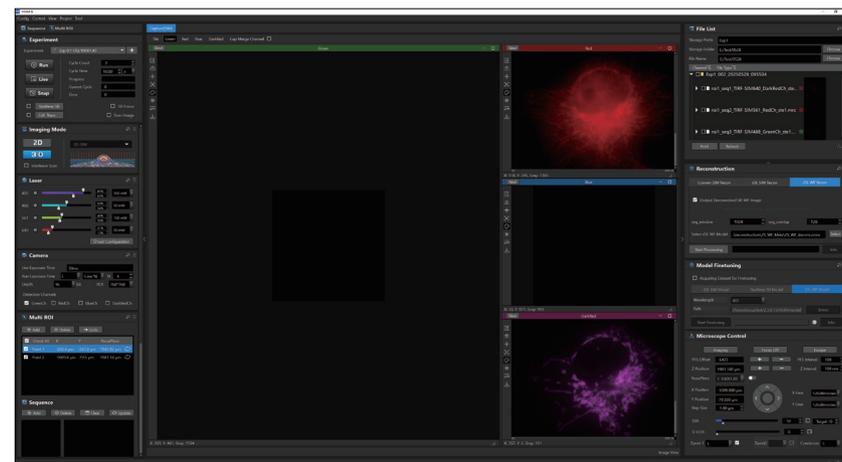
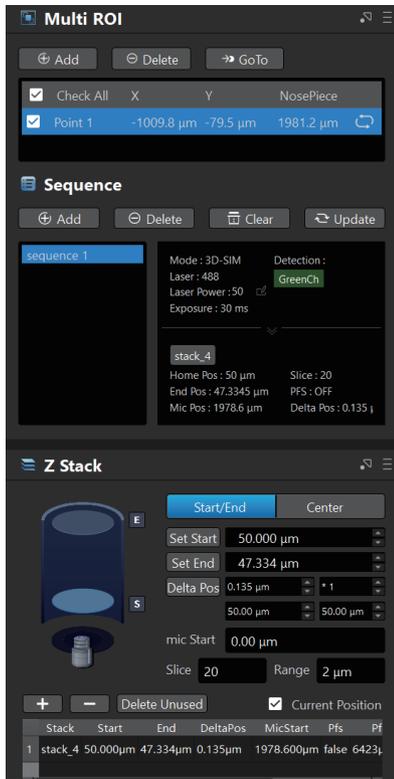
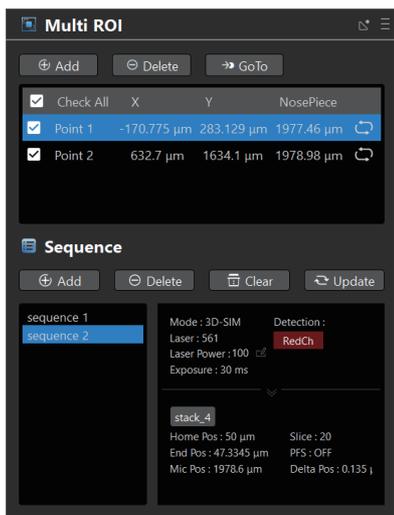


图3.6-1



2 按3D模式的采集步骤进行3D模式选择、配置激光参数、相机参数设置，在【Experiment】区域点击Live先预览样品并找到感兴趣的区域并调节到拍摄的开始焦面，在Multi ROI中点击Add添加第一个Point，然后【在Z Stack】区域点击Set Start按钮设置为拍摄开始焦面。调节焦面到拍摄的结束焦面，然后点击Set End按钮，在sequence中点击Add添加sequence 1，此时也可以停止Live后修改实验参数继续添加不同参数的sequence，具体操作方法同3.4步骤。此时添加的sequence均会关联到Point 1 (如图3.6-2所示)。

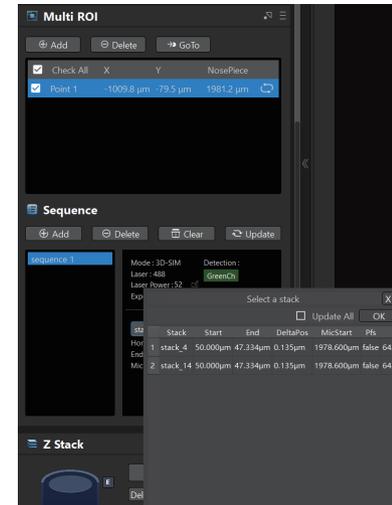
► 图3.6-2



3 在Live状态下通过显微镜控制杆调节XY轴坐标进行位移，找到样本不同的拍摄区域的开始焦面，Multi ROI中点击Add添加第二个Point (如图3.6-3所示)，此时Point 2自动继承上一个Point的sequence参数，但sequence里面stack的Mic Pos参数会依据当前添加Point的NosePiece位置重新计算stack参数，此时Point 1和Point 2下sequence的Slice数量一致，拍摄开始的层为各个Point记录的NosePiece位置。

► 图3.6-3

4 如果该位置的样本厚度不一致，可自行重新设置Start/End位置添加stack并更新到sequence参数中。先调节到需要拍摄的开始焦面，点击Multi ROI中当前Point的更新按钮 ，然后【Z stack】中点击Set Start按钮，调节焦面到拍摄的结束焦面，然后点击Set End按钮，点击“+”按钮添加stack。



► 图3.6-4

5 在sequence参数中点击stack参数按钮，双击选择当前最新添加的stack参数即可将更新该Point的拍摄焦面信息 (如图2.6-4所示)。重复以上步骤可添加多个Point和sequence，用户依据当前位置的样本厚度判断是否需要重新设置stack参数，添加完成后可在【Experiment】点击“Stop”按钮停止预览。

6 【Experiment】区域点击“Run”按钮，显微镜先移动到Point 1位置，按顺序执行Point 1下的sequence，Point 1的sequence执行采集完成后显微镜移动到Point 2的位置，执行Point 2下的sequence直到完成所有的Point和cycle，运行完毕后，在【File List】设置的实验文件保存路径找到数据文件，将原始数据重建 (VSIM自带的Reconstruction功能或其他重建软件均可) 后，在Image J中分析或者在【File List】中通过配置File Name路径后打开文件查阅结果。

### 3.7 Merge功能

1 Merge相关参数配置需要提前准备当前物镜拍摄图像的T矩阵参数(装调或售后工程师会制作), VSIM 软件导航栏点击Config选择Channel Alignment, 在Merge Channel Alignment操作框中选择对应的System参数, Objective选择当前设备对应的物镜(如图3.7-1所示)。

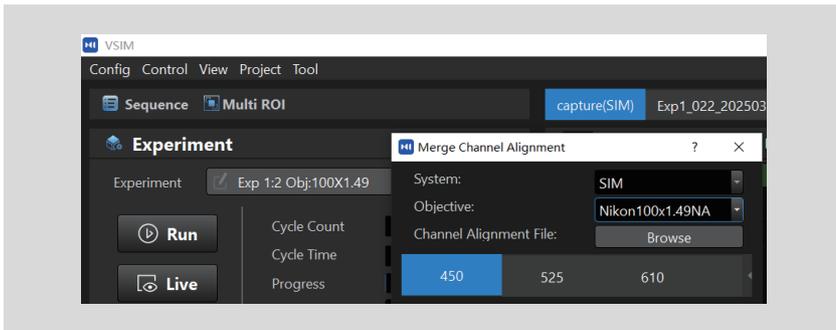


图3.7-1

2 Merge Channel Alignment选择450标签页(标签页显示的都是Emission, 需要对应Excitation的T矩阵), 点击Browse, 找到存放T矩阵参数的文件夹, 选中对应激光的T矩阵文件, 点击打开。使用相同的方法配置其他激光的T矩阵参数(610不需要配置), 点击ok(如图3.7-2所示)。

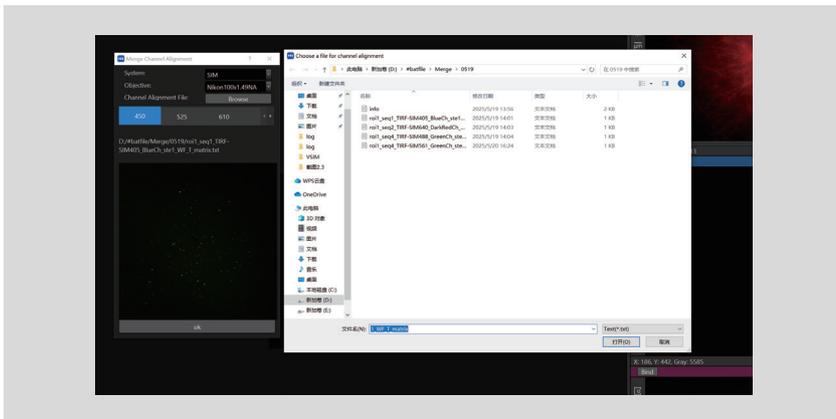


图3.7-2

3 Capture中勾选Cap Merge Channel, 以TIRF-SIM图像采集为例, 勾选488和561激光, 点击Snap, 勾选Green、Red Channel左下角的勾选框, 即可将当前Snap的图像进行Merge并显示在Cap Merge Channel中(如图3.7-3所示)。

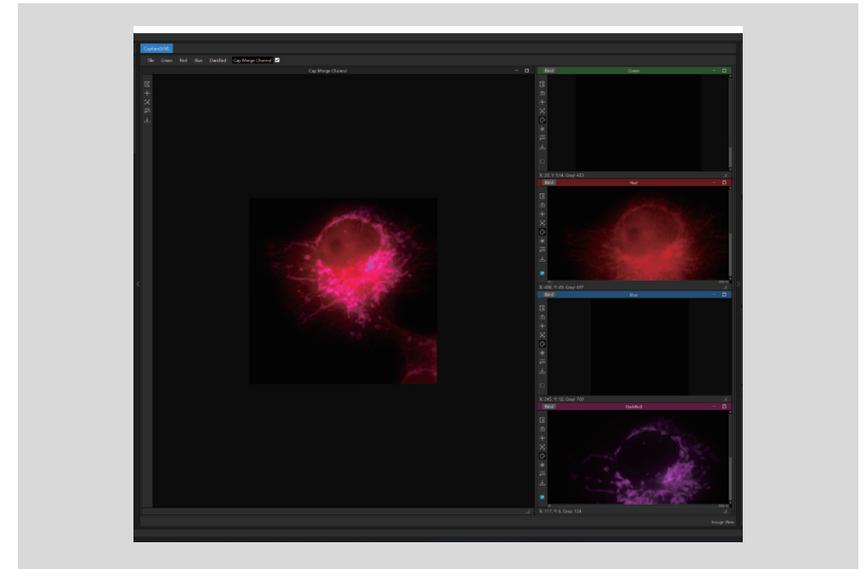


图3.7-3

### 3.8 传统SIM重建功能

1 重建功能使用前需要配置重建环境(一般在软件安装的时候会配置),【File List】点击File Name右侧的Choose按钮配置图像路径,配置路径完成后自动刷新File List。选中列表中的图像文件(点击单个文件),同一个实验文件夹下支持多选(按住Ctrl键或shift键多选文件)或者选中多个实验文件夹(选中文件夹时会全选该文件夹下所有原始图像文件),多选后一次process输出选中图像的重建结果(如图3.8-1所示)。

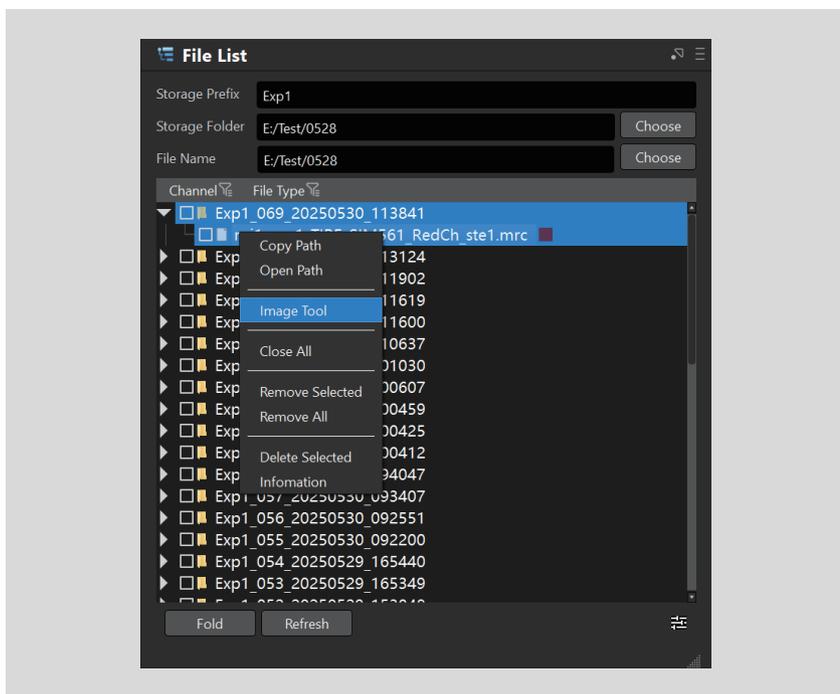


图3.8-1

2 可依据当前图像的实际情况进行重建参数调整(如图3.8-2所示),点击Start Processing按钮后程序开始执行重建或生成宽场任务。

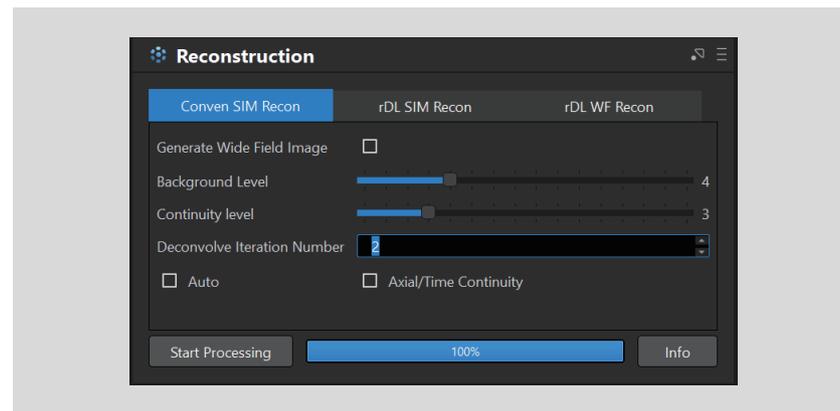


图3.8-2

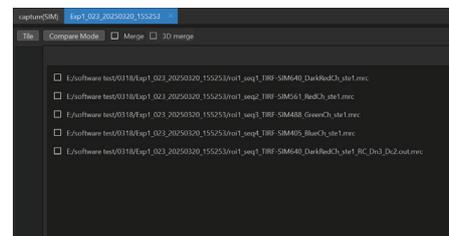


图3.8-3

3 重建完成后可以在Image View中使用Compare Mode勾选原始图像与重建后的图像查看重建前后对比图像(如图3.8-3所示),对比图像左右显示顺序由“Compare mode”选择文件顺序决定,先勾选的在左边,后勾选的在右边,拖动中间对比线可仔细观察原始图像与重建图像的差别(如图3.8-4所示)。

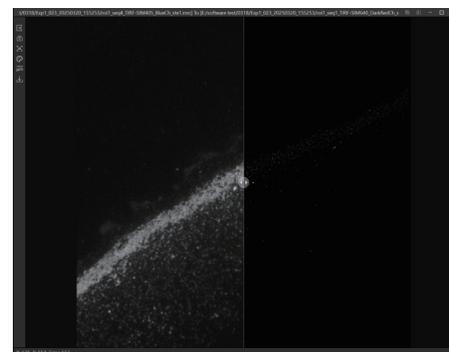


图3.8-4

4 带SIM的图像均可进行重建,不带SIM的图像无法重建,但可以执行去噪、去背景或者生成宽场图。

### 3.9 rDL SIM Recon和rDL WF Recon功能

1 rDL SIM Recon和rDL WF Recon这两个重建功能使用前还需要配置重建环境（一般在软件安装的时候会配置）和进行onnx模型训练（详见3.10步骤）。

2 【File List】点击File Name右侧的Choose按钮配置图像路径，配置路径完成后自动刷新File List，选中列表中的图像文件，选择需要重建的类型（rDL SIM Recon或rDL WF Recon），在Select rDL SIM Model（或Select rDL WF Model）可使用默认的模式或点击Select按钮选择一个对应的模型（如图3.9-1、3.9-2所示），**一次只能选一个onnx模型**，建议在File List勾选的文件和onnx模型的波长一致（选择不同波长的onnx模型会弹出提示，但也可以执行重建）。该模式**无法重建3D模态**的数据。

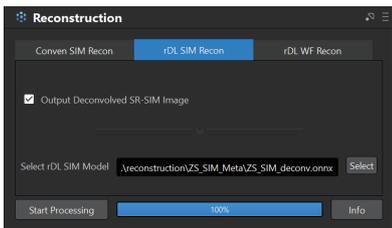


图3.9-1

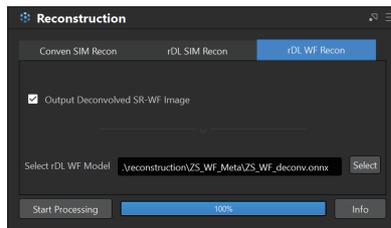


图3.9-2

3 点击Start Processing按钮后程序开始执行重建，rDL SIM Recon先执行传统SIM重建然后做去噪和去卷积，输出SIM重建图、Denoised图和Deconvolved图各一张，如果已经做了SIM重建，那直接做去噪去卷积，输出Denoised图和Deconvolved图。rDL WF Recon则执行宽场处理、宽场Denoised和宽场Deconvolve，各输出一张图。

4 不勾选Output Deconvolved SR-SIM Image时，Select rDL SIM Model只能选择带denoised后缀的onnx模型（如图3.9-3、3.9-4所示），此时执行去噪处理，输出SIM重建图和Denoised图，不会输出Deconvolve图像。不勾选Output Deconvolved SR-WF Image时同理，不会输出宽场Deconvolve图像。

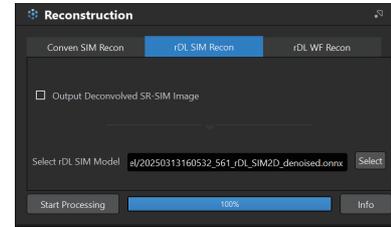


图3.9-3

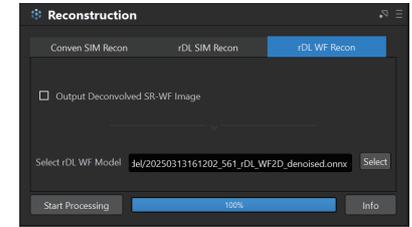


图3.9-4

3 用户可依据自身需求选择不同的onnx模型进行调用。

### 3.10 Model Finetuning功能

1 【Model Finetuning】区域勾选Acquiring Dataset for Finetuning后弹出Tips和Multi ROI (需要新建Experiment), 按Tips要求进行Multi ROI参数的添加(如图3.10-1所示), 【Experiment】区域点击Run进行数据采集(finetune采集可以是1~3个Cycle, 必须是3个ROI, 每个ROI下1个Sequence; 每个ROI下采集使用的Sequence参数需要除Z Stack以外保持一致; Sequence的发射波长与Wavelength设置一致; 限制的模态: 2D-SIM、Single Slice-SIM、TIRF-SIM、High NA GI-SIM、Low NA GI-SIM)。

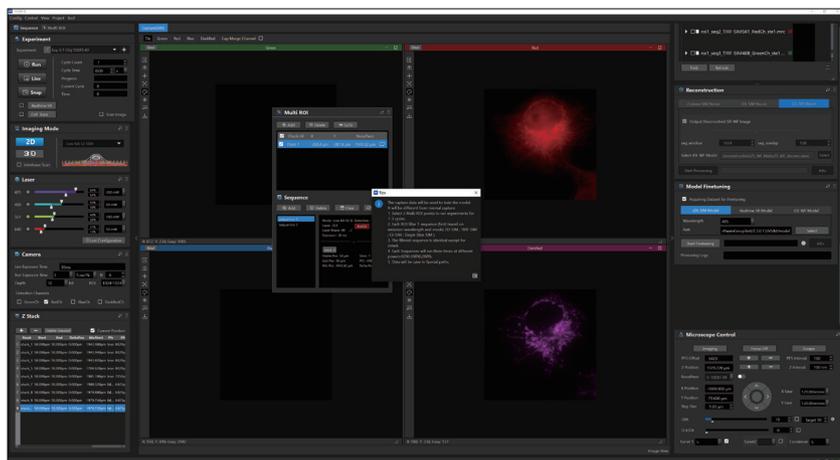


图3.10-1

2 采集的图像默认保存在Model Finetuning当前Path设置的路径下, 点击Start Finetuning执行微调。进度条右边的彩色点在每次Finetune结束之后示意本次finetune的质量(如图3.10-2所示), 共有红、黄、绿三种, 绿色表示足够好, 黄色表示一般, 红色表示不行。

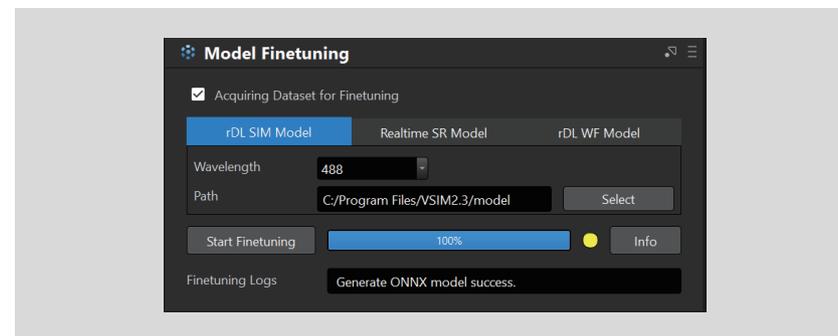


图3.10-2

3 rDL SIM Model、Realtime SR Model和rDL WF Model操作方式基本一致, 在采集后点击Start Finetuning即可执行微调并生成对应的onnx模型(如图3.10-3所示)。三者可共用一组采集的数据(先采集一次数据, 然后分别切换rDL SIM Model、Realtime SR Model和rDL WF Model页面执行Start Finetuning, 需要在在一个页面完成后才能去下一个页面Start Finetuning)。

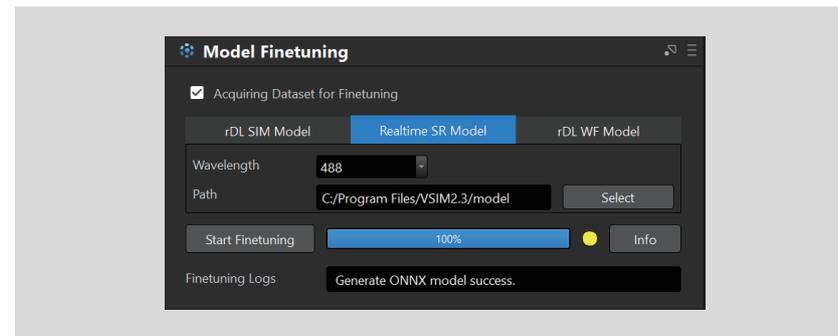


图3.10-3

4 一次只能训练一个波长的onnx模型, 按需要改变Wavelength和Multi ROI参数, 选择不同激光波长进行数据采集, 然后执行Start Finetuning。采集和Finetuning完成后将Acquiring Dataset for Finetuning取消勾选即可退出Model Finetuning模式。

5 rDL SIM Recon调用rDL SIM Model训练的模型, rDL WF Recon调用rDL WF Model训练的模型(详见3.9步骤)。

6 【Experiment】区域勾选Realtime SR, 在Live时会进行Live重建, 调用Realtime SR Model的模型, 可以在【Experiment】区域点击Realtime SR按钮, 对rDL WF to SR进行调用模型的设置, 该模型可更改成Realtime SR Model训练的结果模型(如图3.10-4所示), 不区分Laser和Channel。

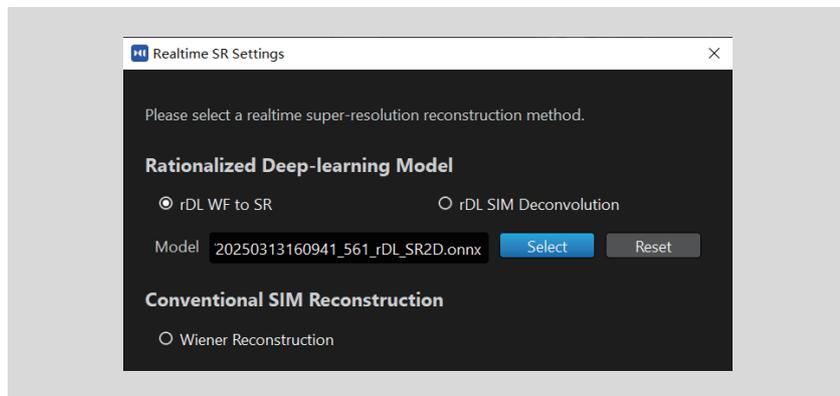


图3.10-4

7 用户依据自身需求选择不同的细胞进行训练并生成不同的onnx模型, 按需要进行调用, onnx模型可依据自己的需求修改文件名称, 但修改名称时必须保留一定长度的后缀, 框内的文字不建议修改(如图3.10-5所示), 可修改前面的时间字段。

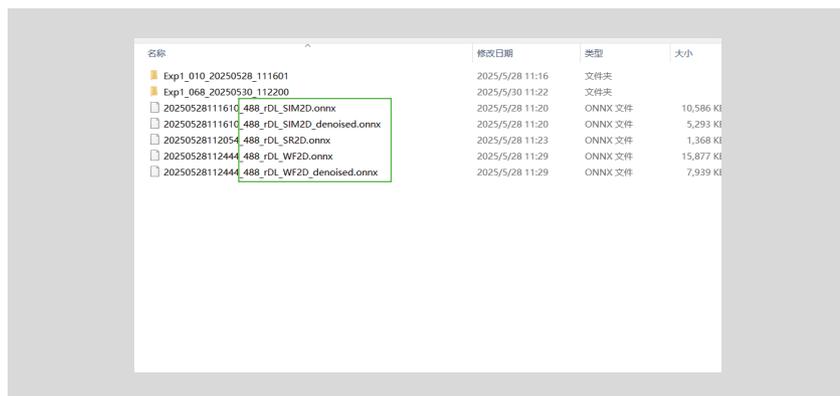


图3.10-5

### 3.11 扫图拼图功能(以2D模式为例)

【Experiment】区域勾选Scan Image可显示扫图拼图模块, 扫图的方法【Center】和【Boundary】二选一即可(如图3.11-1所示)。

扫图拼图支持多cycle的长时程采集, 多cycle扫图拼图在倒数第一个开始采集时才开始拼图。扫图拼图采集的图像也是保存在Storage Folder设置的路径下, 扫图拼图功能与Multi ROI功能互斥, 勾选Scan Image时无法使用Multi ROI。

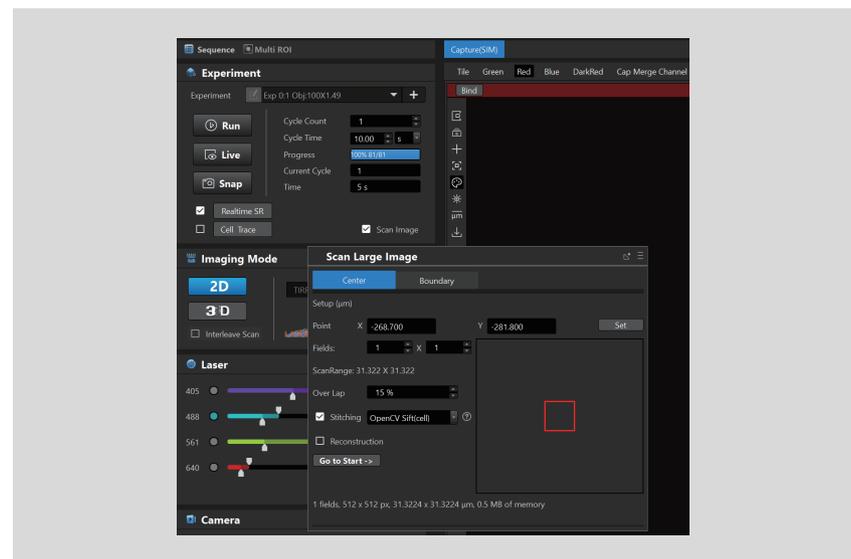


图3.11-1

【Center】方法扫图前需要确认当前物镜位置有足够的移动空间(即扫描图像的运动距离不会使物镜发生碰撞), 【Center】方法以当前设置的Point为中心, 向四周延伸m\*n个扫描Fields。

1 按2D图像采集配置进行Live, 调焦并停留在需要扫描区域的中间点位置, 点击Set按钮更新Point的位置参数, Fields设置需要扫图的区域数量(按用户需求设置), Over Lap设置相邻图像的重叠百分比(默认15%), Stitching可设置缝合方法(默认OpenCV Sift, 如图3.11-2所示), 需要重建后再拼图则勾选Reconstruction。所有参数设置完成后下方有拼图参数预估, 不勾选Stitching或Reconstruction限制最大Fields为250\*250; 勾选Stitching或Reconstruction限制最大Fields为

50\*50,且占用内存最大为1346.805 MB。

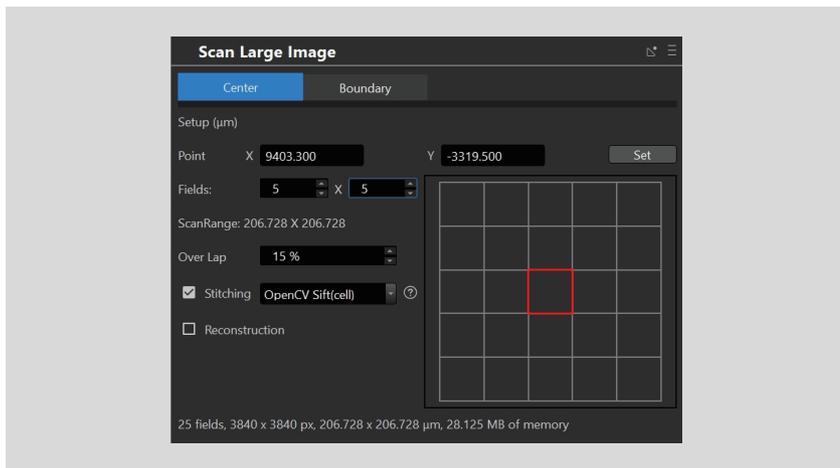


图3.11-2

② 【Experiment】区域点击“Run”按钮开始执行扫图拼图,采集的图像会保存在当前实验Storage Folder设置的位置。拼图过程会在【LargelImage Show】中显示,拼图进度达到100%后代表扫图拼图完成,拼图过程中不建议执行其他操作。简易模式2D图像拼图以点击Run时候当前Z Position数值作为拍摄焦面,sequence模式则按当前sequence的stack参数作为拍摄焦面。

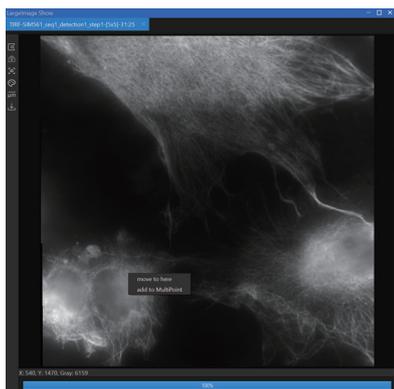


图3.11-3

③ 拼图完成后需要在【Experiment】取消勾选Scan Image后才能打开Multi ROI,在【LargelImage Show】需要拍摄图像的位置右键add to Multi-Point,使当前右键位置信息在Multi ROI中生成Point,添加Multi ROI后可执行Multi ROI采集图像的相关操作(添加sequence和Run)。在Live的状态下,【LargelImage Show】中可右键move to here快速定位(如图3.11-3所示)。

【Boundary】方法以所设置的区域为扫描边界,最终扫描的区域为包含所设置Point在内的最小矩形区域(如图3.11-4所示)。

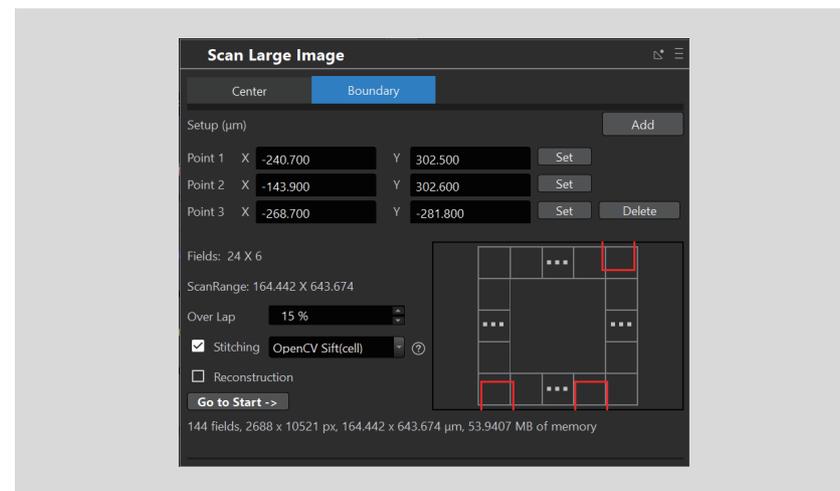
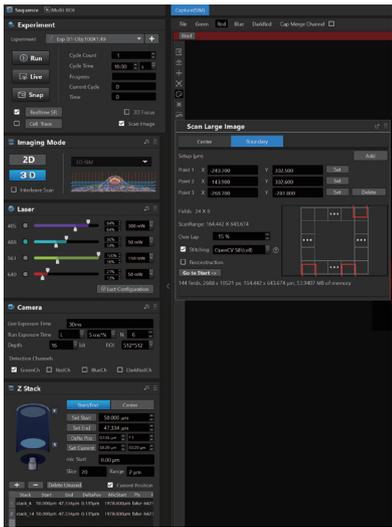


图3.11-4

① 按2D图像采集配置进行Live,找到扫描边界位置并调焦到拍摄焦面后点击Point 1这一行的Set。通过显微镜控制杆调节XY轴坐标进行位移,找到需要扫图的样本区域边界位置,点击Point 2这一行的Set,重复该步骤可设置多个Point作为扫图的边界,需要更多的Point则点击Add添加。

② 扫图参数,拍摄,add to Multi-ROI同Center模式(3.3章节)。

### 3.12 扫图拼图功能 (以3D模式为例)



① 扫图的两种方法【Center】和【Boundary】配合Z Stack为Center模式采集以清晰焦面为中心位置的3D图像时，操作方式与2D模式扫图拼图类似，在清晰焦面时在【Scan Large Image】界面相关扫图参数设置完成后，然后在【Z Stack】区域Center模式设置3D层扫描参数并添加stack参数(如图3.12-1所示)。【Experiment】区域点击“Run”按钮开始执行扫图拼图。

▶ 图3.12-1

② 当Z Stack选择Start/End模式执行扫图拼图时，扫图Center方法需要在3D图像拍摄的开始焦面位置时Set一次Point并设置其他扫图参数，扫图参数设置完成后在【Z Stack】点击Set Start设置拍摄开始位置，调节焦面到拍摄的结束位置，【Z Stack】点击Set End设置结束位置并添加stack(如图3.12-2所示)。【Experiment】区域点击“Run”按钮开始执行扫图拼图。

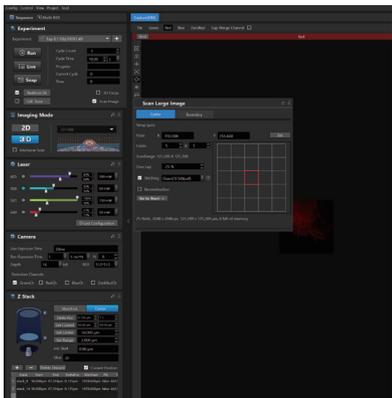


图3.12-2

③ 当Z Stack选择Start/End模式执行扫图拼图时，扫图Boundary方法需要在3D图像拍摄的开始焦面的位置时Set Point，在最后一个Point设置完成后并设置其他扫图参数，然后在【Z Stack】点击Set Start设置拍摄开始位置，调节焦面到拍摄的结束位置，【Z Stack】点击Set End设置结束位置并添加stack(扫图的时候会以当前stack的开始焦面作为所有拼图区域的开始焦面，和前面设置Point的开始焦面可能存在差异，如图3.12-3所示)。【Experiment】区域点击“Run”按钮开始执行扫图拼图。

④ 简易模式3D图像扫图拼图以配置完成扫图参数后再设置的stack焦面参数作为拍摄焦面，sequence模式则按当前sequence的stack参数作为拍摄焦面。

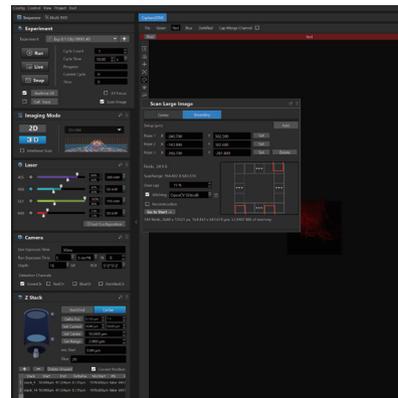


图3.12-3

## 四、软件其他功能

### 4.1 Live状态双击Image View位置快速位移

Live时，鼠标左键双击Image View图片内位置，通过比例尺反算双击的点的物理位置，控制显微镜位移平台移到该位置，即双击位置会移动到视野中心位置。

### 4.2 Live时用鼠标滚轮调节焦面

Live状态的时候点击当前Channel的Live滚轮按钮(如图4.2-1所示)，使能后可以使用鼠标滚轮对焦面进行调整，鼠标滚轮2 s之内最大位移为5  $\mu\text{m}$ 。再次点击Live滚轮按钮则关闭该功能。

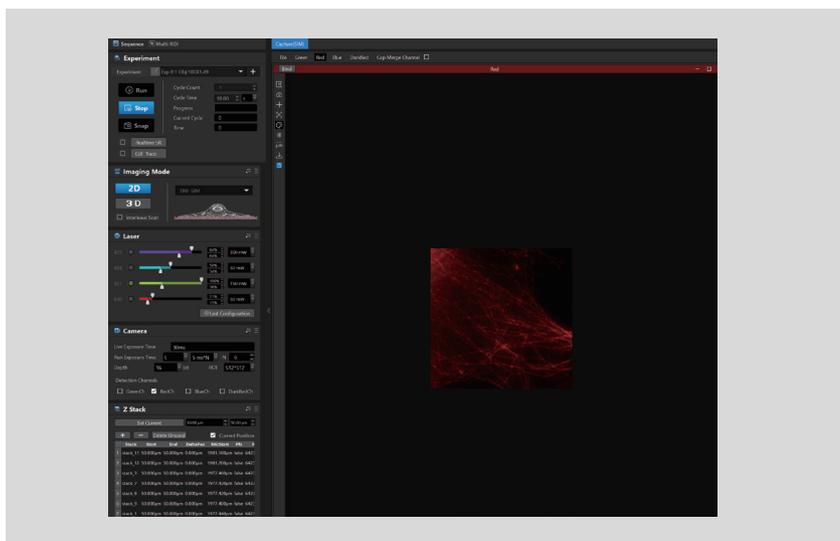


图4.2-1

### 4.3 图像保存功能(2D视图)

① 点击Channel左侧工具栏的按钮即可使用该功能。可自行修改需要的文件名、文件格式、输出路径，选择图片格式保存则以当前Channel单一帧作为图像进行保存，也可勾选Process all sequence image对当前文件所有帧进行保存(如图4.3-1所示)，仅在jpg、bmp、png、tif、tif (RGB) 的图像格式下此复选框可选。

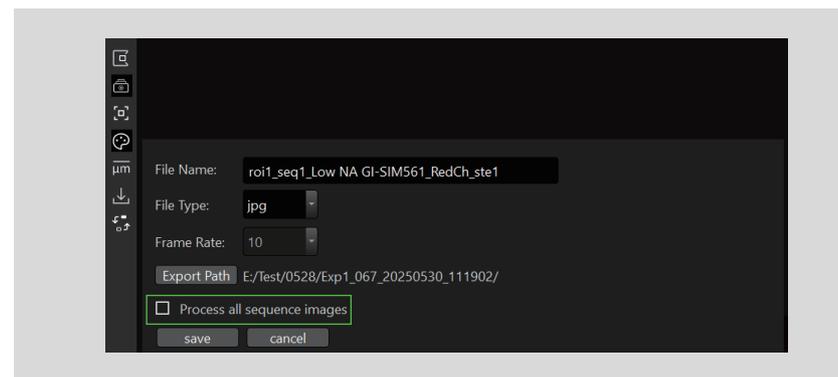
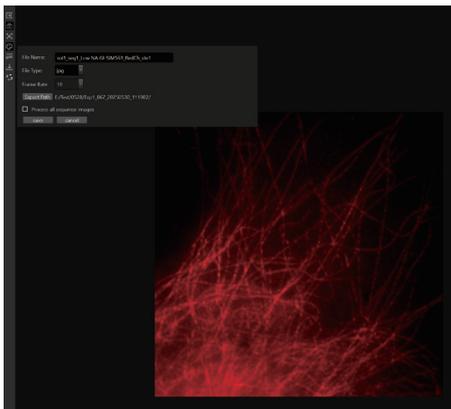


图4.3-1

② 选择avi或mp4的视频格式保存则将当前文件的所有图像宽场处理后合成视频，此时可设置视频帧率进行保存，设置参数后点击save即可保存对应格式的文件到指定路径。

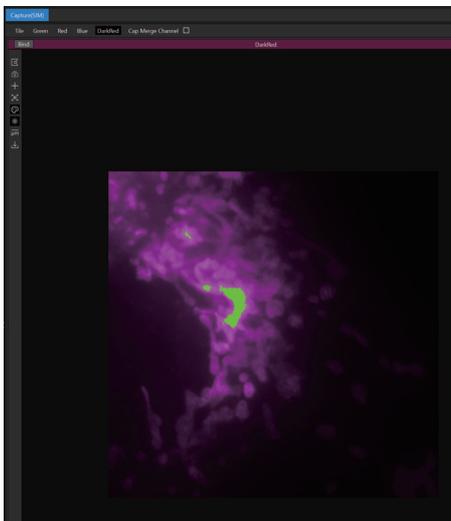
③ Capture只能保存图像格式，File List打开的文件才能保存视频格式，Merge通道和拼图largeImage Show页面也可以保存图像。Channel的亮度调节、伪彩效果也会在图像和视频中应用。

## 4.4 快速添加伪彩和过曝提示



1 Image View窗口左侧工具栏点击PseudoColor按钮可为当前Channel添加默认的伪彩(如图4.4-1所示)。

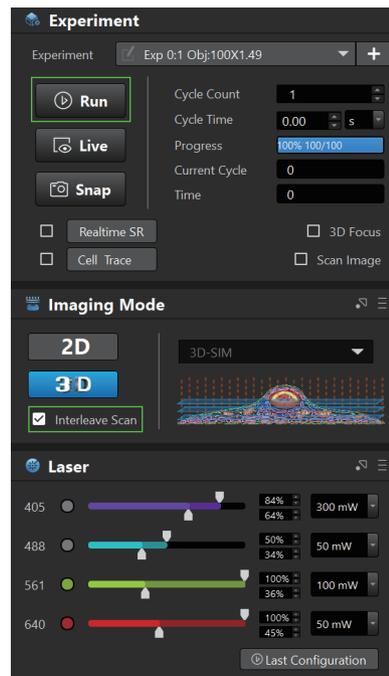
▶ 图4.4-1



2 Image View窗口左侧工具栏点击OverExpose按钮可为当前Channel开启过曝提示(如图4.4-2所示),图像过曝的点则标记反色。

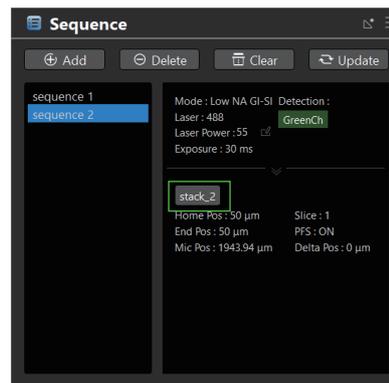
▶ 图4.4-2

## 4.5 3D模态采集图像开启Interleave功能



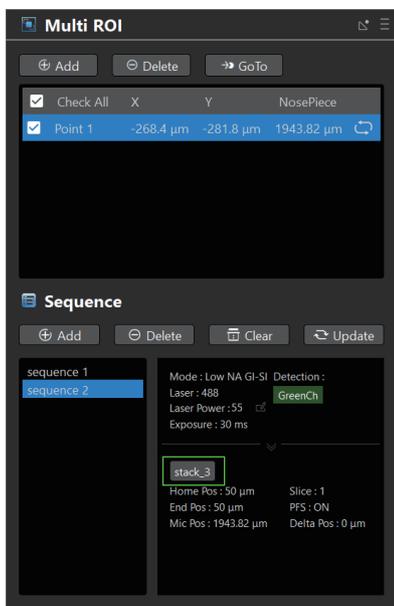
1 简易模式开启Interleave功能: 按照常规3D模态采图流程进行调焦设置Slice, 勾选Interleave Scan, 按需求勾选多个激光, 直接点击Run即可按照Interleave scan方式进行采图, (如图4.5-1所示)。

▶ 图4.5-1



2 Sequence模式开启Interleave功能: 按照常规3D模态采图流程进行调焦, 勾选Interleave Scan, 添加不同激光的sequence的时候, 要保证每个sequence的stack一致, 点击Run即可按照Interleave scan方式进行采图, (如图4.5-2所示)。

▶ 图4.5-2

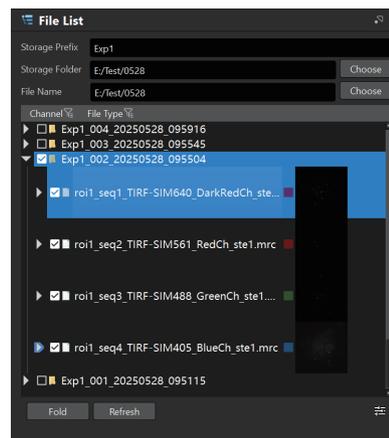


**3** Multi ROI模式开启Interleave功能:

按照常规3D模式采图流程进行调焦, 勾选Interleave Scan, 在同一个Point下添加不同激光的sequence的时候, 要保证每个sequence的stack一致, 点击Run即可按照Interleave scan方式进行采图, (如图4.5-3所示)。不同Point下的stack可以不一致。

▶ 图4.5-3

## 4.6 Image Tool批量转tif和merge源文件



**1** 操作方法:

在File List区域对需要批量处理的源文件夹进行选中, 或者按住Ctrl键或shift键多选文件夹, 又或者按住鼠标左键框选多个文件夹, 选中多个文件夹后鼠标右键弹出“Image Tool”选项 (如图4.6-1所示), 点击即可弹出Image Tool页面。

▶ 图4.6-1

**2** 进入Image Tool页面后, 首先点击Export to选择需要转tif格式文件保存的路径, File type勾选Select all进行全选, 在Processing function中可同时勾选Convert to TIF format、Convert to TIF (RGB) format和Merge files of the same type (如图4.6-2所示), 也可单独选择其中一项, 然后点击Start Processing, 待进度完成100%即可在保存路径查看转格式或Merge的图像文件。

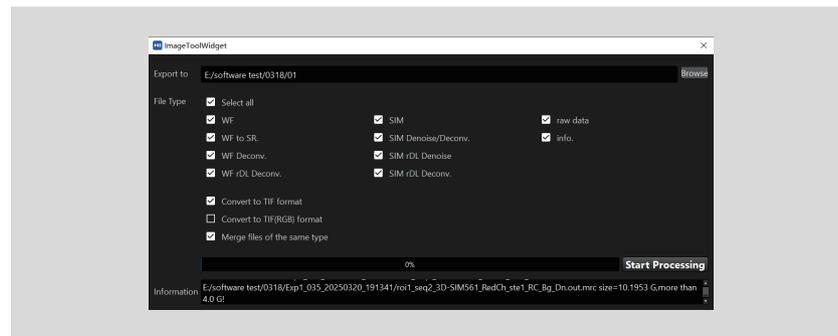


图4.6-2

**3** Processing function不勾选convert to TIF format、Convert to TIF (RGB) format和Merge Same type of file时, 可以将File type中存在的文件类型 (需要文件类型存在于当前选中的File List文件夹中) 导出到Export to设定的文件夹中。

## 4.7 信息中心

导航栏中的View勾选Information, Image View下方增加信息中心信息模块, (如图4.7-1所示)。

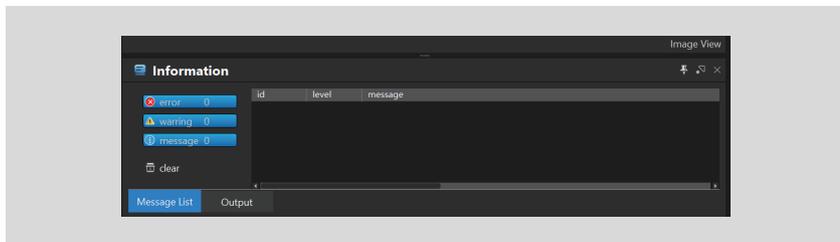


图4.7-1

## 4.8 AdaBleach功能

1 Login后打开Debug窗口, 勾选show AB check才能在Experiment区域开放AdaBleach功能按钮(如图4.8-1所示)。

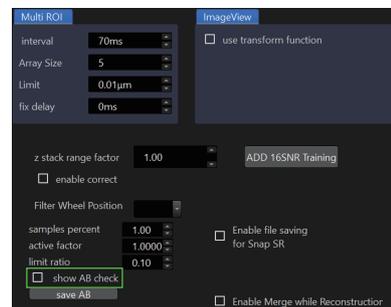


图4.8-1

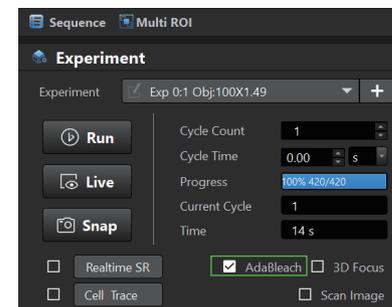


图4.8-2

2 使用AdaBleach功能先勾选Experiment的AdaBleach(如图4.8-2所示)。

3 导航栏Control下拉菜单打开Power Curve(如图4.8-3所示)。Anti Bleaching Type可选择抗漂白类型, Adaptive Bleaching为按照当前拍摄图像的灰度值对下一个cycle的激光功率进行调整; Customized Power Curve需要在当前页面设置参数计算拟合功率曲线。默认为Customized Power Curve(如图4.8-4所示), 用户可按照实际使用场景(细胞)选用合适的方式。

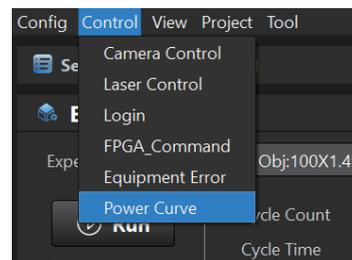


图4.8-3

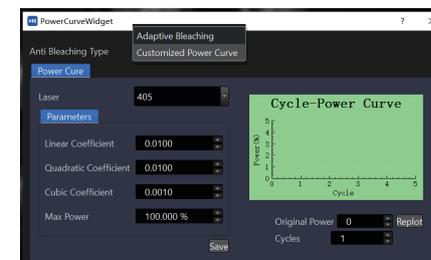


图4.8-4

4 Adaptive Bleaching方式不需要用户设置参数, 因此不做介绍。

5 Customized Power Curve方式的变化曲线使用 $y = Ax^3 + Bx^2 + Cx + D$ 这个函

数, Cubic Coefficient对应三次方系数A, Quadratic Coefficient对应二次方系数B, Linear Coefficient对应一次方系数C, Original power对应常数项D, D直接就是初始功率, x是cycle数, y是修改后的激光功率, 右侧预览图为每个cycle需要下发的功率曲线的预览。

⑥ 选择Customized Power Curve方式需要用户自行设置曲线参数, 不同激光可设置不同的参数, 按当前使用的激光设置参数, max power默认100%, Original power不能大于max power, cycle数量要大于1, 点击“Replot”按钮, 曲线预览就会出现, 当参数得出的曲线符合预期时(如图4.8-5所示), 点击“Save”按钮保存参数退出。

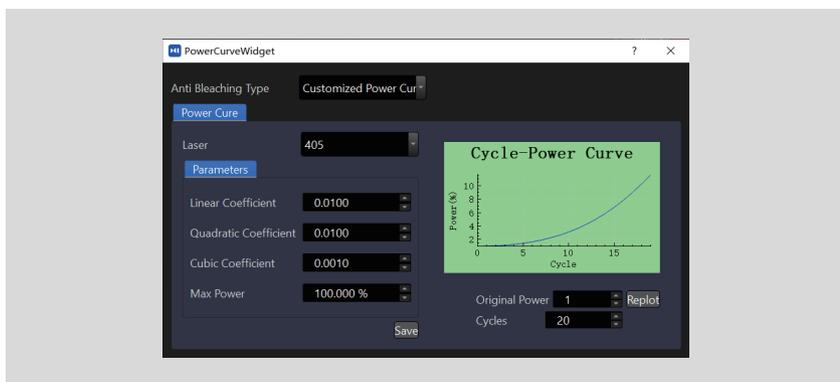


图4.8-5

⑦ 按需求设置实验参数, AdaBleach需要多Cycle的实验才生效, 点击“Run”, 执行多Cycle实验时激光功率按设定的算法调整laser功率, 使其随cycle的变化而进行功率补偿。

## 4.9 Cell Trace

① 细胞追踪功能需要勾选Cell Trace才能使用(如图4.9-1所示), 简易模式、sequence模式和Multi ROI模式下均适用, 默认选择第一个sequence进行追踪标记, 可以在sequence列表中右键Cell Trace修改为其他sequence, 每一个ROI下有且只有一个sequence作为追踪标记, 用户按实际情况选择合适的激光和模式作为追踪标记。

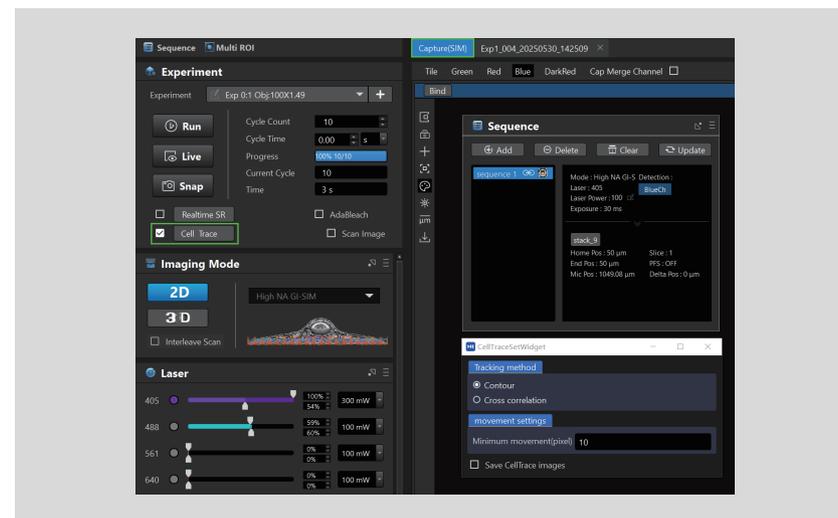


图4.9-1

② 点击Cell Trace按钮弹出Cell Trace参数设置框(如图3.9-1所示), Tracking method有两种方法可选择, 用户依据实际的细胞样本形态进行选择(一般情况默认即可), movement setting参数默认即可。

③ 用户确认好Cell Trace标记和Tracking method后, 在Experiment区域点击Run即可自动在后续cycle中对追踪标记sequence的细胞进行位置微调, 使该标记细胞在视野中央。

## 4.10 Toolbar 画图工具

① 用户在Snap, Live, Run后, 或者打开实验文件, 均可通过使用Shape Tools画图工具, 对画图区域进行灰度值计算。

② 在Image View中打开Toolbar (如图4.10-1所示), 选择Draw Shape下的各种画图方式, 提供Line, Circle, Recrangle, Polygon, Spline Contour等画图方式, 可一键清除窗口的画图轨迹。

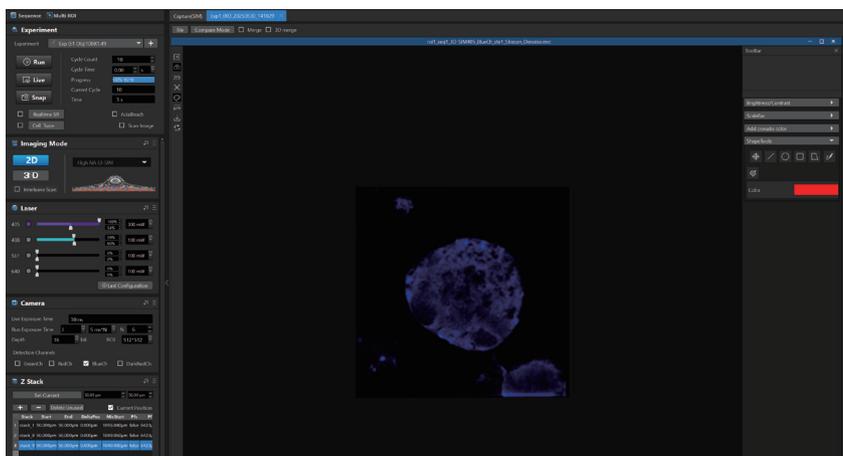
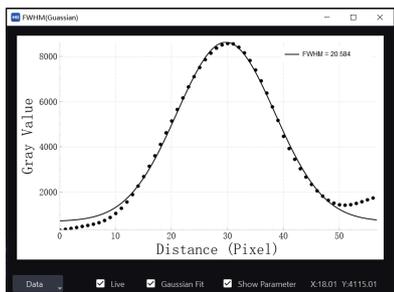


图4.10-1

③ 在画图的闭合图形内, 点击鼠标右键, 使用Measure工具, 可对该闭合区域进行计算, 结果包括闭合面积、平均灰度值、最小/最大灰度值等。



④ 直线半峰宽。  
在样品图片上绘制一条直线, 选中直线-右键-FWHM (Gaussian), 弹框显示半峰宽测量结果 (如图4.10-2所示)。

图4.10-2

⑤ 矩形工具: 按住Shift, 长宽等比例缩放绘制; 圆形工具: 绘画正圆。

## 4.11 Live重建

① 在LIVE采集模式下, 对用户采集的图像进行实时重建。可选择采用深度学习的方式进行实时重建, 或采用传统wiener算法进行实时重建 (如图4.11-1所示)。

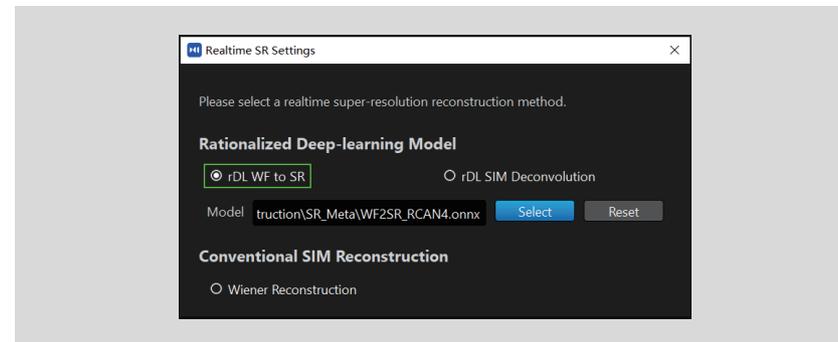


图4.11-1

### ② Rationalized Deep-learning Model

**rDL WF to SR:** 用于对单张宽场图像的重建, 不输出去噪去卷积图像, 仅输出深度学习重建图像。可以提高WF图像的清晰度。

**Model:** 不同rDL算法对应的模型, 默认值跟随上方选项变化而变化, 每次切换选项后, 均重置为默认值。不再区分波长, 所有波长共用一个模型。

**Select:** 这两种深度学习模型下, 均支持选择对应的内置模型, 用户若有其他训练好的模型, 可以选择其他的模型。

**Reset:** 重置为对应选项的系统内置模型。

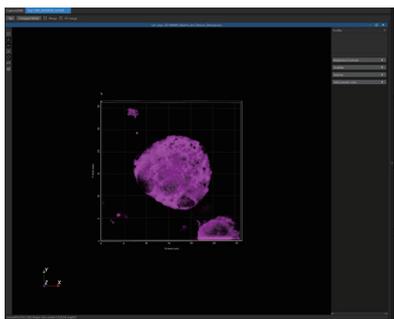
**rDL SIM Deconvolution:** Live时, 在对SIM图像进行Wiener重建的基础上进行去噪去卷积, 使用的是live实时内置的模型, 仅有一种, 不支持用户手动修改。选该选项时, 禁用选择和重置icon; 效果优于Wiener和rDL WF to SR。

### ③ Conventional SIM Reconstruction

**Wiener Reconstruction:** 采用Wiener传统算法对SIM的9张图像进行重建, 与Reconstruction模块的Conven SIM Recon中的参数共享, 使用重建默认不包含去噪去卷积效果, 效果优于rDL WF to SR, 不支持非SIM模态。

### ④ BF、BF 3D模态不支持Live重建

## 4.12 3D渲染

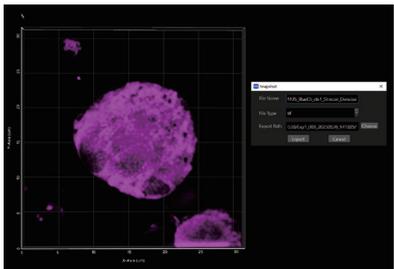


通过File List打开的3D文件在Image view窗口默认显示是2D视图, 点击窗口左侧工具栏的2D切换成3D视图, 切换后默认为Volume view (如图4.12-1所示), 鼠标右键左侧工具栏的3D, 可切换Ortho View和Projection View。

► 图4.12-1

### ① Volume View支持功能说明:

**图形旋转、缩放、移动:** 鼠标滚轮支持缩放、左键拖拽支持旋转、右键拖拽支持移动。  
**Reset Transform:** 重置变换, 指对3D图像进行移动、旋转、缩放后, 点击可快速回到初始状态。

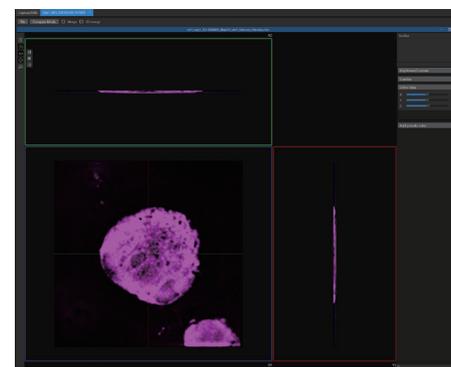


**Snapshot:** 快速保存图像, 右键视图弹出 (如图4.12-2所示), 根据存图需求自行设置即可。

► 图4.12-2

左侧工具栏打开ToolBar, Volume工具区域可以设置是否打开Frame、Axes和Tickmarks。

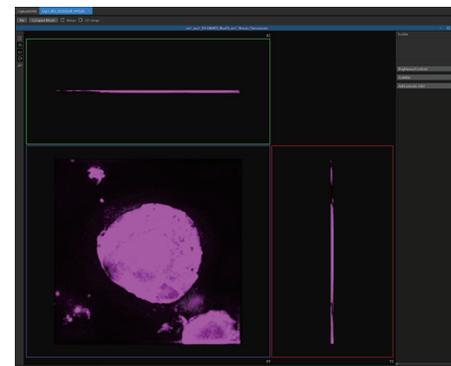
- **Frame:** 立方体线; 勾选后显示立体边框线, 不勾选则不显示, 仅显示裸图。
- **Axes:** 坐标轴; 勾选显示坐标轴, 不勾选则不显示。
- **Tickmarks:** 坐标轴的刻度线标记。



### ② Ortho View支持功能说明:

主要支持的调节参数有X、Y、Z的Position位置, 支持在右侧工具栏中调节, 也支持在Image View图像上直接拖动不同颜色的线条进行调节 (如图4.12-4所示)。

► 图4.12-4

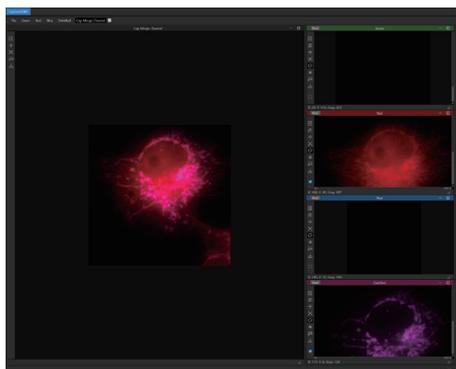


### ③ Projection View:

仅展示XY、YZ、XZ, 三个方向上的最大灰度投影的叠加显示 (如图4.12-5所示)。

► 图4.12-5

## 4.13 Animation Video



- 1 仅Volume View模式下支持该功能,单Channel和3D Merge均适用。  
在三维视图区域右键选择animation (如图4.13-1所示),弹出Animation Video操作框。

▶ 图4.13-1

- 2 Animation Video操作框可添加和删除关键帧 (如图4.13-2所示),可预览显示过渡帧动画,支持最长1000帧动画,可以导出为AVI、MP4和Tiff格式。底部Rotation和Translations可以根据用户设置实现三维视图窗口的定量旋转和平移等操作。

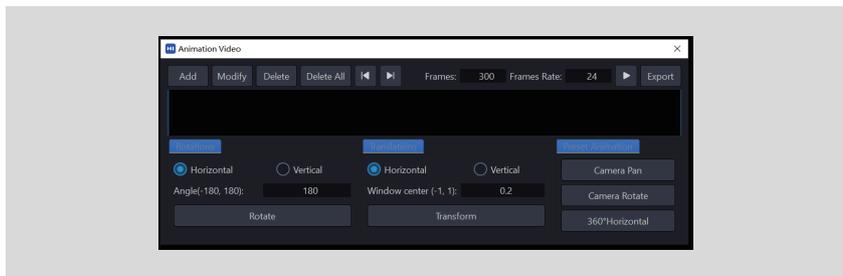


图4.13-2

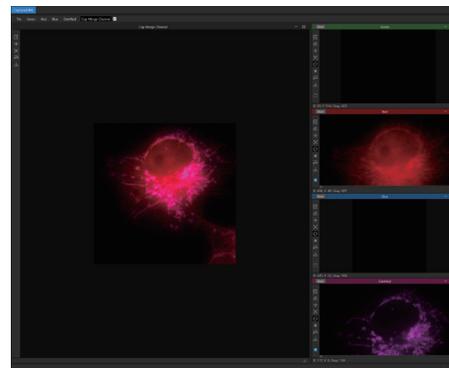
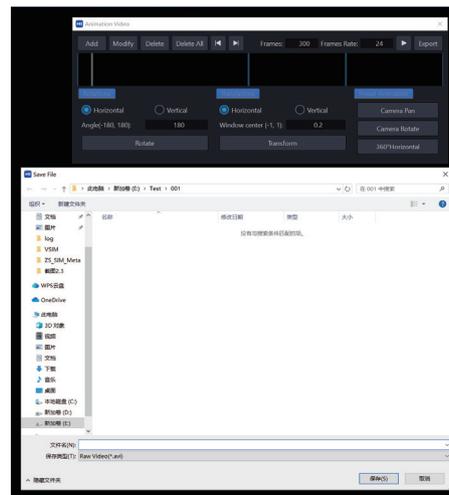


图4.13-3

- 3 用户先设置Frames和Frames rate,然后在视频关键帧设置区所需的位置点击,将三维视图中的样本按需求进行旋转或平移,点击Add添加关键帧(视频关键帧设置区的关键帧标记从灰白色变成岩蓝色),可按实际需求继续在不同位置添加视频关键帧 (如图4.13-3所示)。



- 4 添加关键帧完成后可以点击播放按钮进行预览,点击Export按钮选择保存路径并输入文件名 (如图4.13-4所示),选择需要的保存类型点击保存按钮进行视频的导出,视频关键帧设置区和Image view会同步当前视频导出进度进行播放,导出完成后弹框提示保存成功。

▶ 图4.13-4