

- 1. 打开一张图片
- 在默认的**intensity**格式中，是图片灰度，越黑数值越小，越白数值越大。而实际上我们测量的染色强度是光密度，染色越深，光密度值越大。
- 如果不进行光密度单位的转换，测量的数值将完全是错误的。

转换光密度单位的方法如下:

- 点击:**measure--calibration--intensity**, 调出**intensity**校正窗口。
- 然后在窗口中点**new**按钮, 再点一下下面的**std optical density**选项, 这时可以看到窗口中的直线变成了反向的曲线。
- 然后还要点一下最上面的**system**按钮。
- 最后点**close**关闭窗口。
- 这样就把程序系统的灰度单位转换成了光密度单位。
- 关于光密度校正的详细内容请参见第十帖及第十一帖。
- 校正光密度单位的操作要在打开第一张图片后立即进行。将光密度单位设定为**system**之后就不必再对后面的每一张照片都进行光密度校正了。

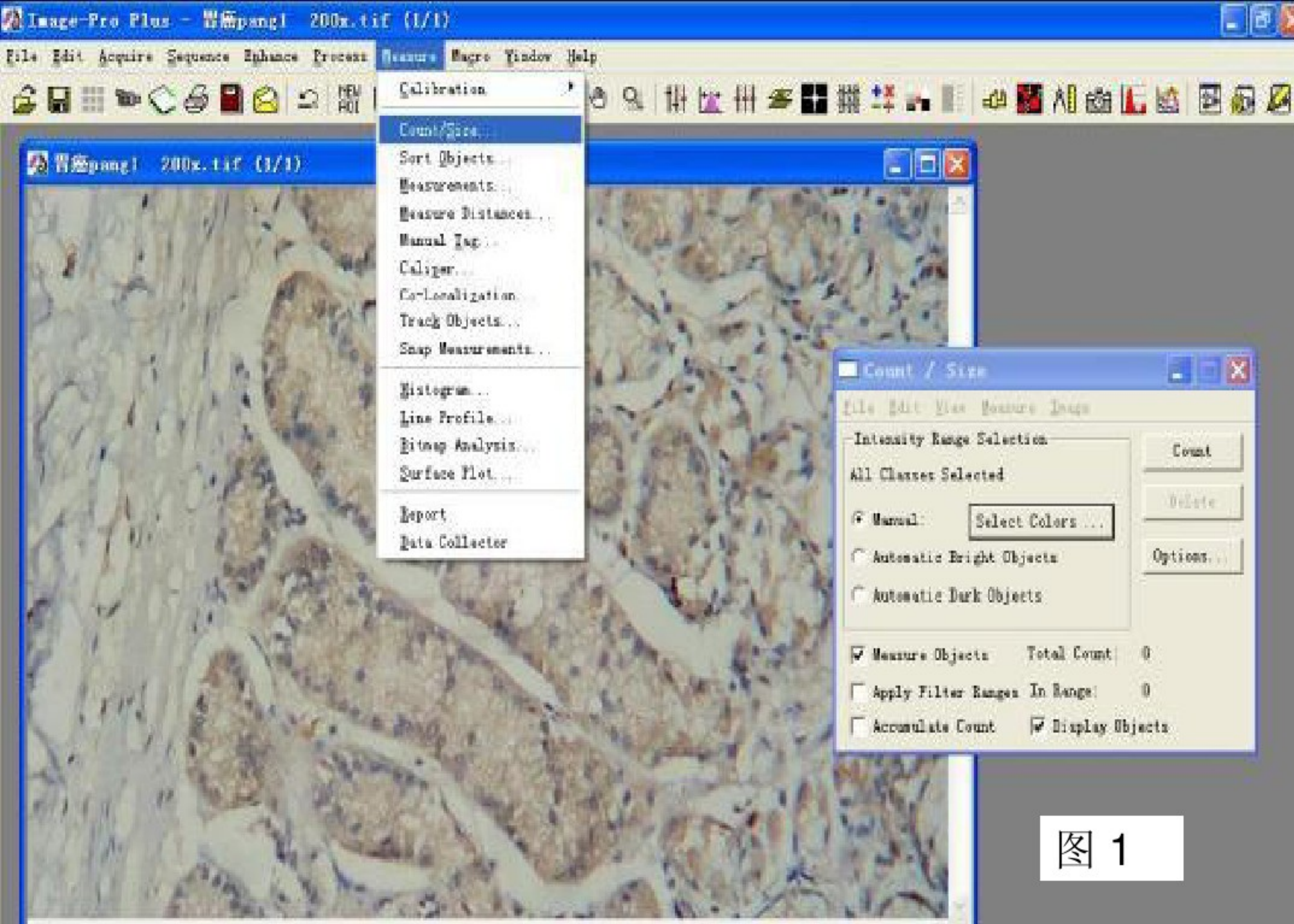


图 1

3. 在窗口中选中manual,再点击select color,弹出颜色选择窗口segmentation

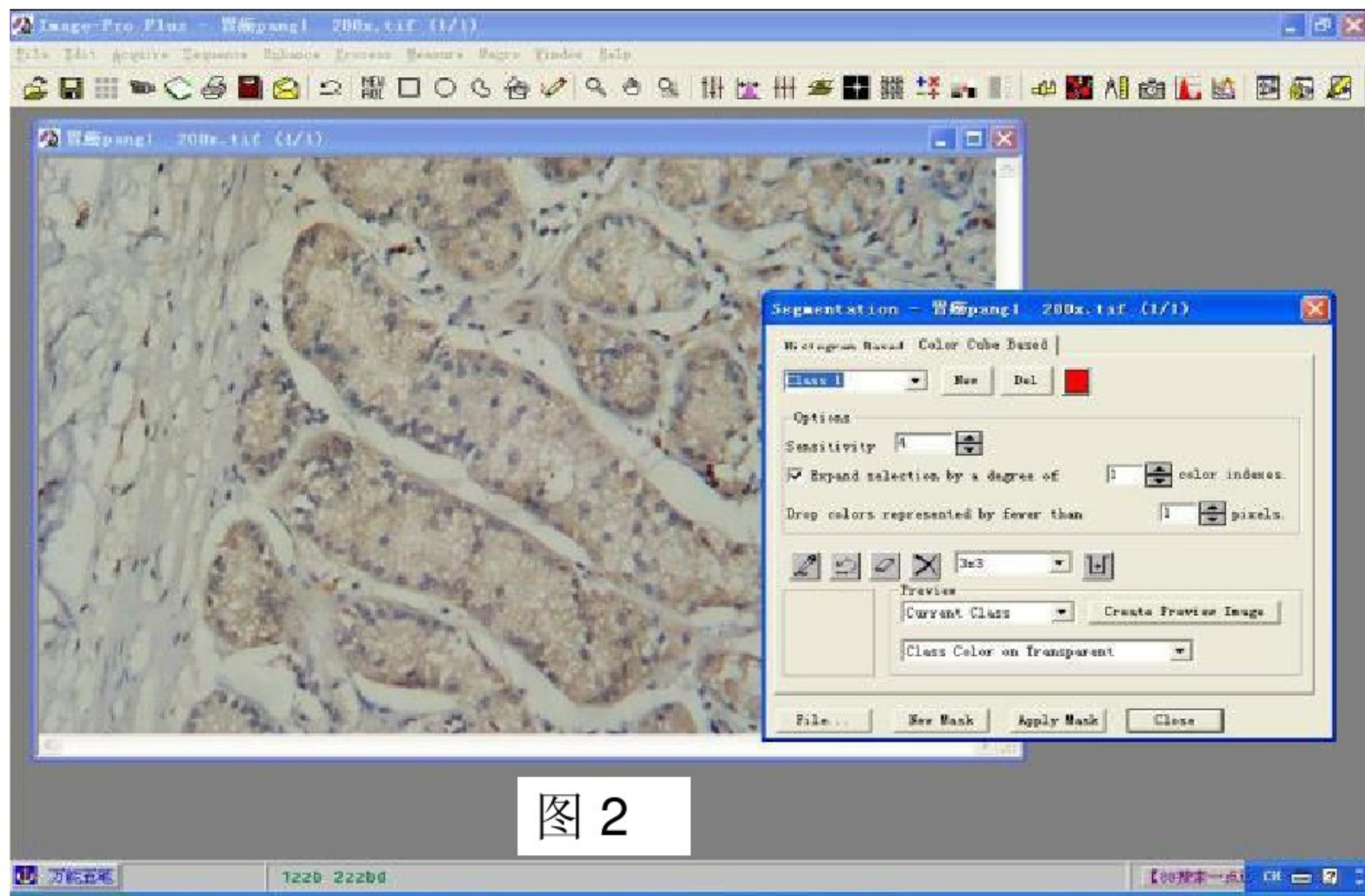


图 2

4. 点一下吸管图标，在目标区域点一下，就可以选中该点的颜色，当然一下是不可能完全选中所需要指定的全部区域，可以在未选中的地方接着再点，这样多次选取，直到把想选中的区域全部选中为止。
- 5 图3中被标上红色的区域被定义为一个 **class**，其中每一个独立的小区块被定义为这个 **class** 中的一个 **object**。以此图为例，图中深蓝色的部分是细胞核，因此所有的细胞核都被选中成一个 **class**，其中每一个细胞核就是一个 **object**。

用红框圈起来的四个工具按钮分别是:吸管、撤消上一步操作、橡皮擦、全部清除。下在的小方框里则是吸管位置的选取颜色。

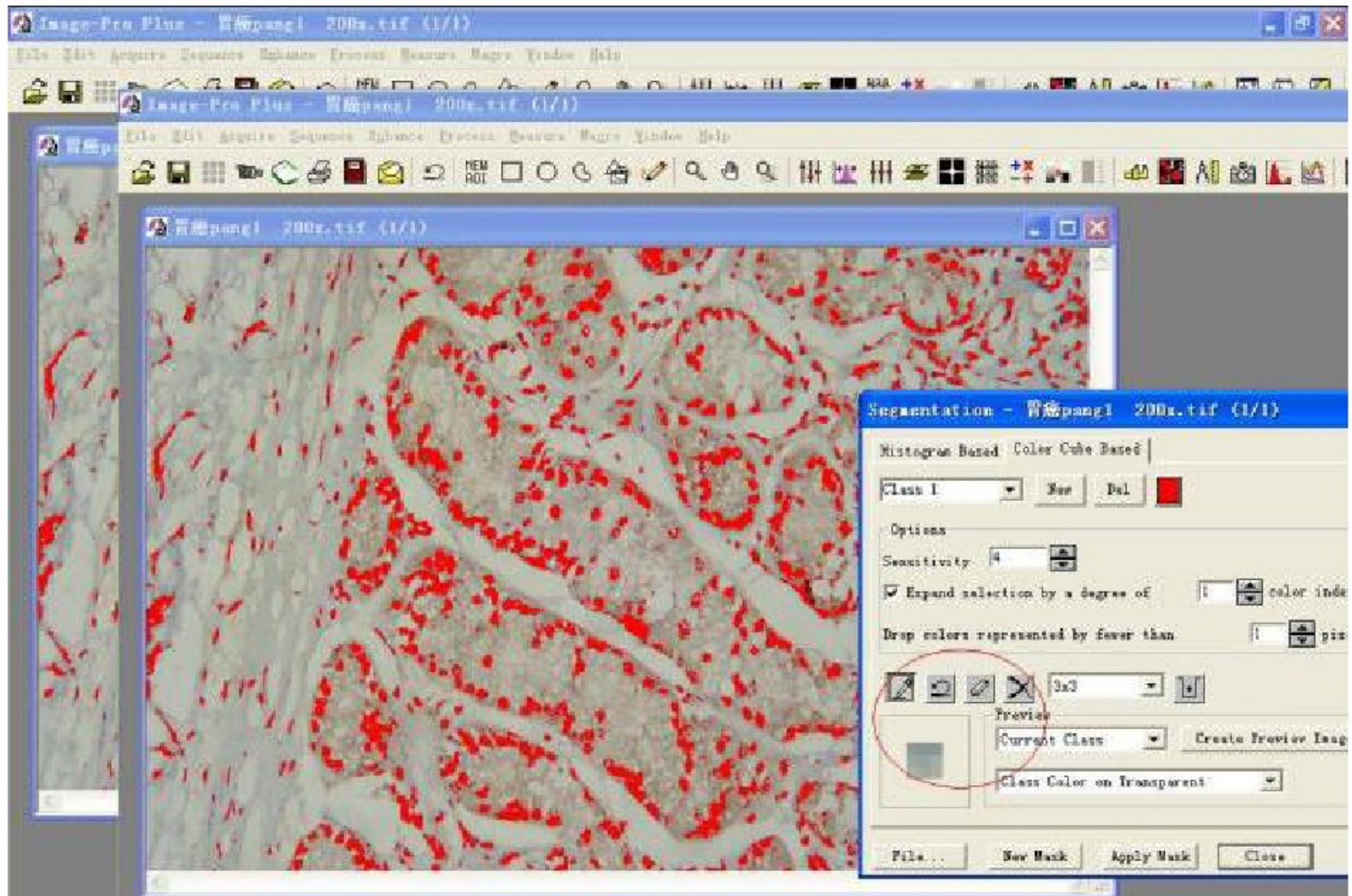


图 3

- 6 选取完AOI后，点击close回到count/size窗口，下一步就可以对选中的object进行测量操作了。如图4所示。
- 点击count/size窗口中的measure菜单，点select measure，这是选择要进行何种测量操作，在弹出的测量选择窗口左侧列出了各种可用的测量选项，最常用的测量有：
 - area面积
 - density(mean)平均光密度
 - diameter直径
 - IOD(integrated optical density)累积光密度
 - 在相应的项目上点一下，该测量项目就被选到中间的窗口中了，同时关于该测量的详细说明会显示在最右边。如果想取消某个已选中的测量项目，则在左边窗口中该项目上再点击一下就可以了。

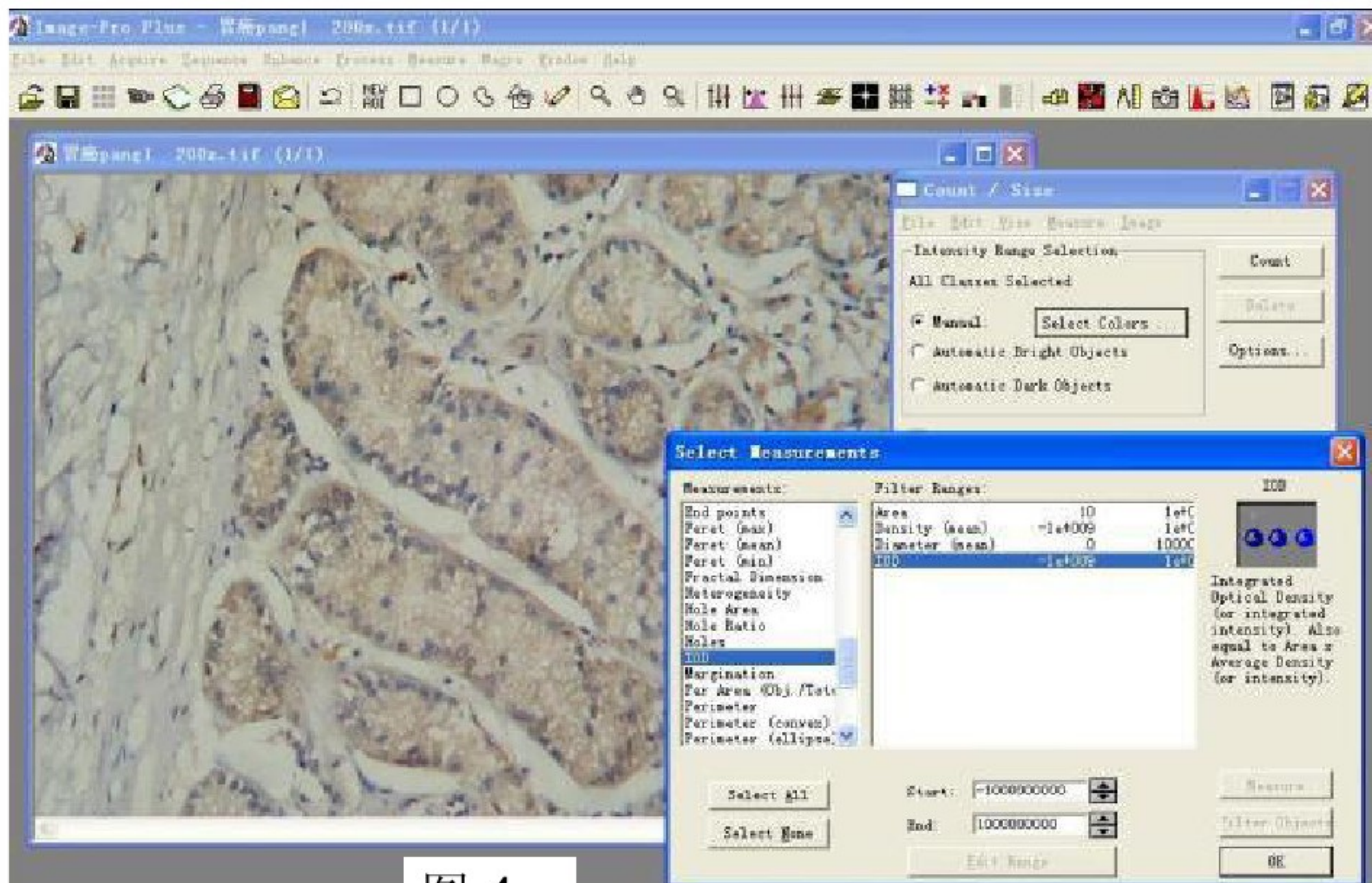


图 4

7 选好了待测量的区域，也指定了测量项目，就可以进行测量统计了，点击一下测量选择窗口的**OK**纽，关闭这个窗口，就回到了**count/size**窗口，再点击一下**count**按钮，就可以看到程序在进行测量，稍等几秒钟即可读取测量数据.如图5

- 分别点击**count/size**窗口中**view**菜单中的**measurement data**和**statistics**，就分别弹出这两个数据窗口。前者是这个**calss**中每一个**object**的测量数据，后者是这些测量数据的统计参数，如总数、平均值、累加、标准差等。本例中得到的就是每个细胞核的面积、平均光密度值、直径、累积光密度值。统计数据则可得到这张图片中所**有**细胞核的平均面积、平均光密度值，平均直径、累积光密度值，当然还有细胞核的数目，就是所有**object**的数目。

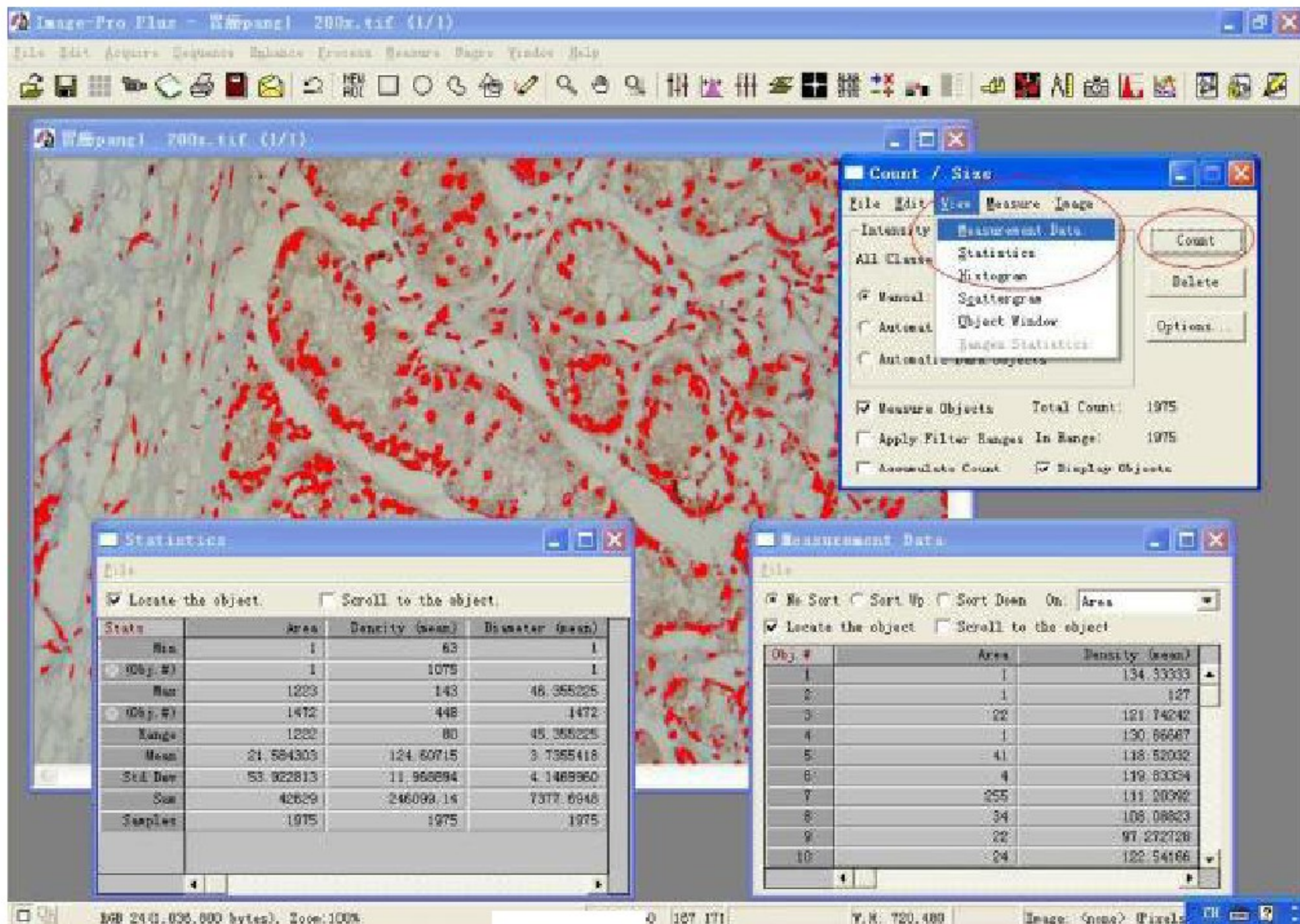


图 5

- 9 测量数据转入EXCEL处理起来最方便。
只要在数据菜单中点file - DDE to EXCEL。
数据就传到EXCEL的sheet1里去了。如图6.
- 在这个示例图片的统计数据中samples为图中所有细胞核的个数。
 - 第一列为area,其中的Mean值为各个核的平均面积，后面就是平均灰度、平均直径，这些是有意义的测量统计数值。但IOD却是SUM值更有意义。

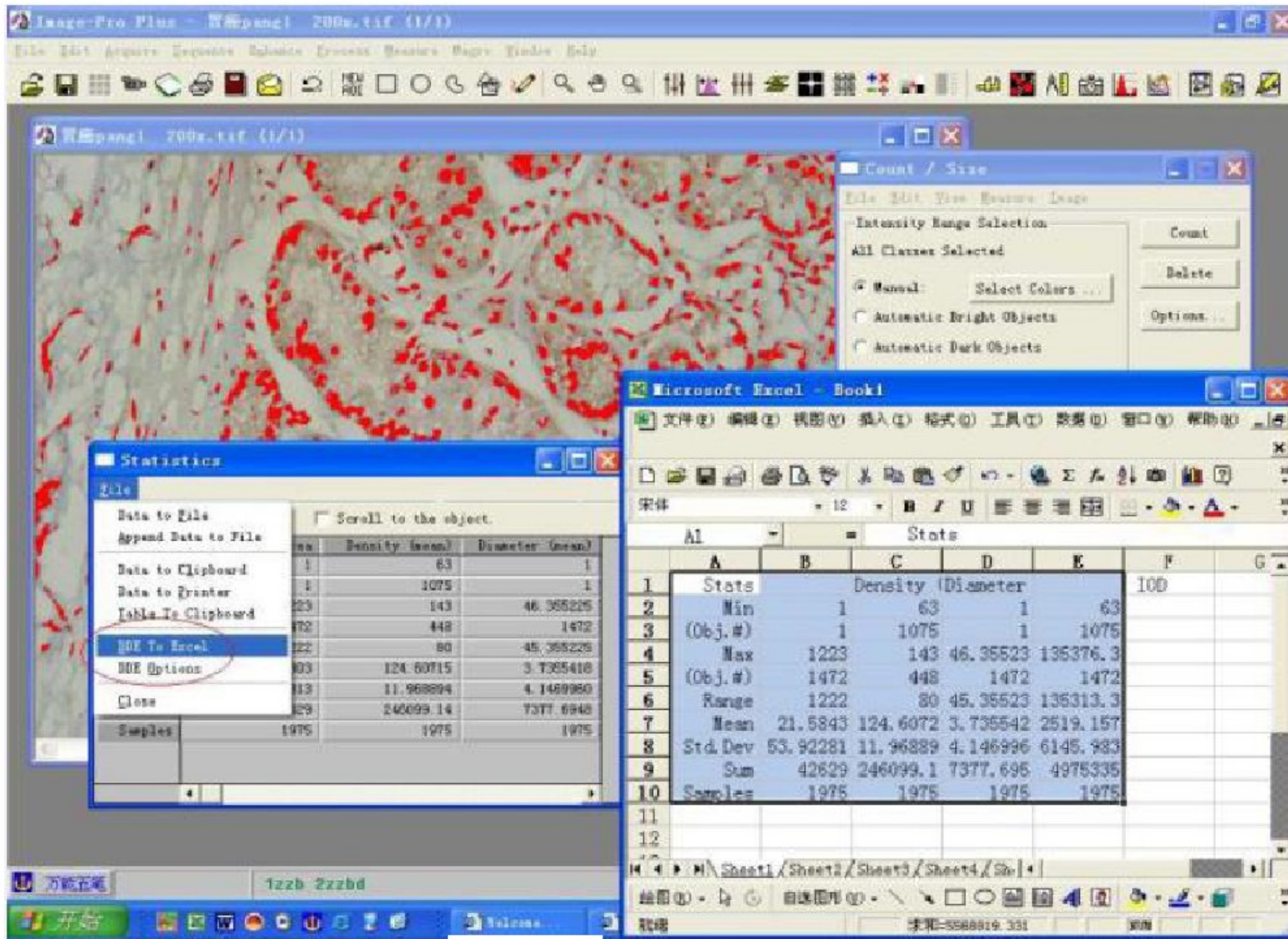
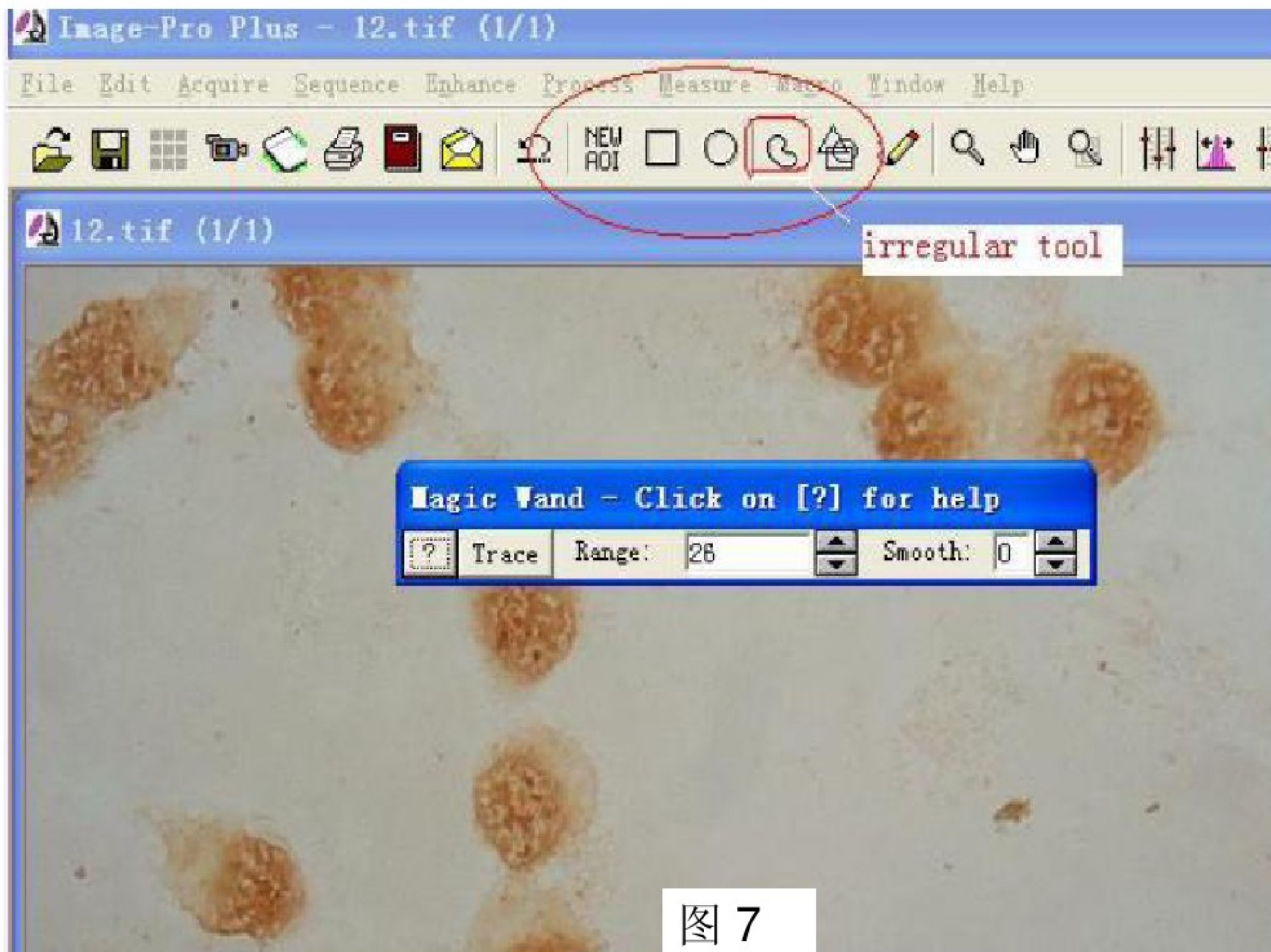


图 6

二、irregular工具

这是一个用来描绘不规则孤立对象边界的工具。图中一个个棕黄色形状是免疫组化染色的贴壁培养细胞，为了计算每个细胞的面积及蛋白表达，首先就是要选取每个细胞的边界线。这就可以用到irregular工具了。在工具栏上点一下那个不规则圆形的按钮，就调出了irregular工具条。



- 图8: 这个工具的标题叫**Magic wand**, 就是photoshop中的魔棒呀。将鼠标移至图中一个细胞的中间, 光标就变成魔棒了, 在一个位置左键点一下, 就选中了这个位置及其周围灰度相似的区域。这里"相似"的定量范围由**Range**的值来决定。较大的值为较大的灰度范围, 点一下能选中一大片区域。较小的**range**值则为较小的灰度范围。在一个区域上多点几下, 就能选中这个区域的整个边界了。最后点一下**右键**, 就确定了一个不规则形状的选定区域。
- 点一下**左边的问号**, 就能看到相应的使用说明。**smooth**值是用来平滑区域边界的。一般不需要平滑, 因此默认值为零。

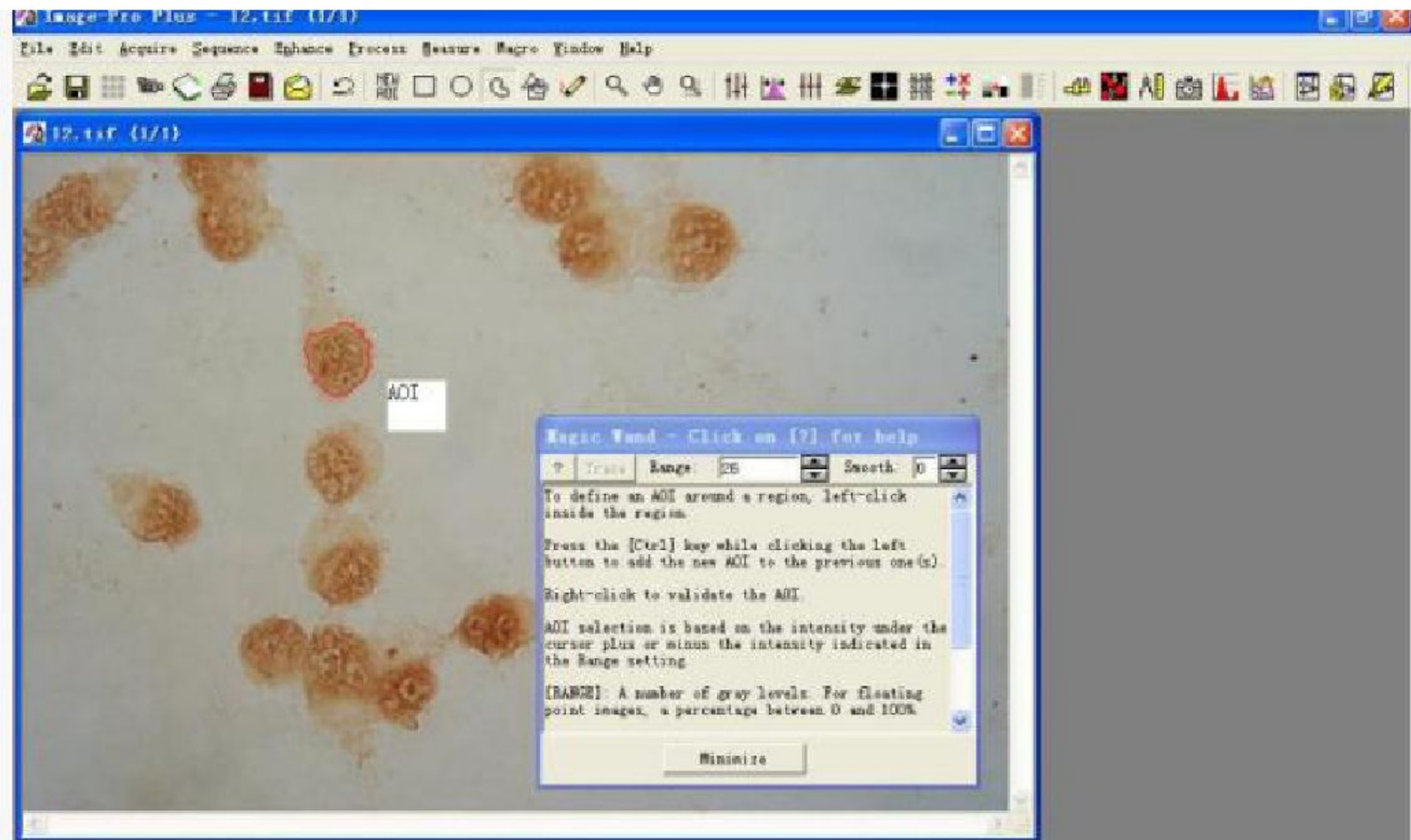
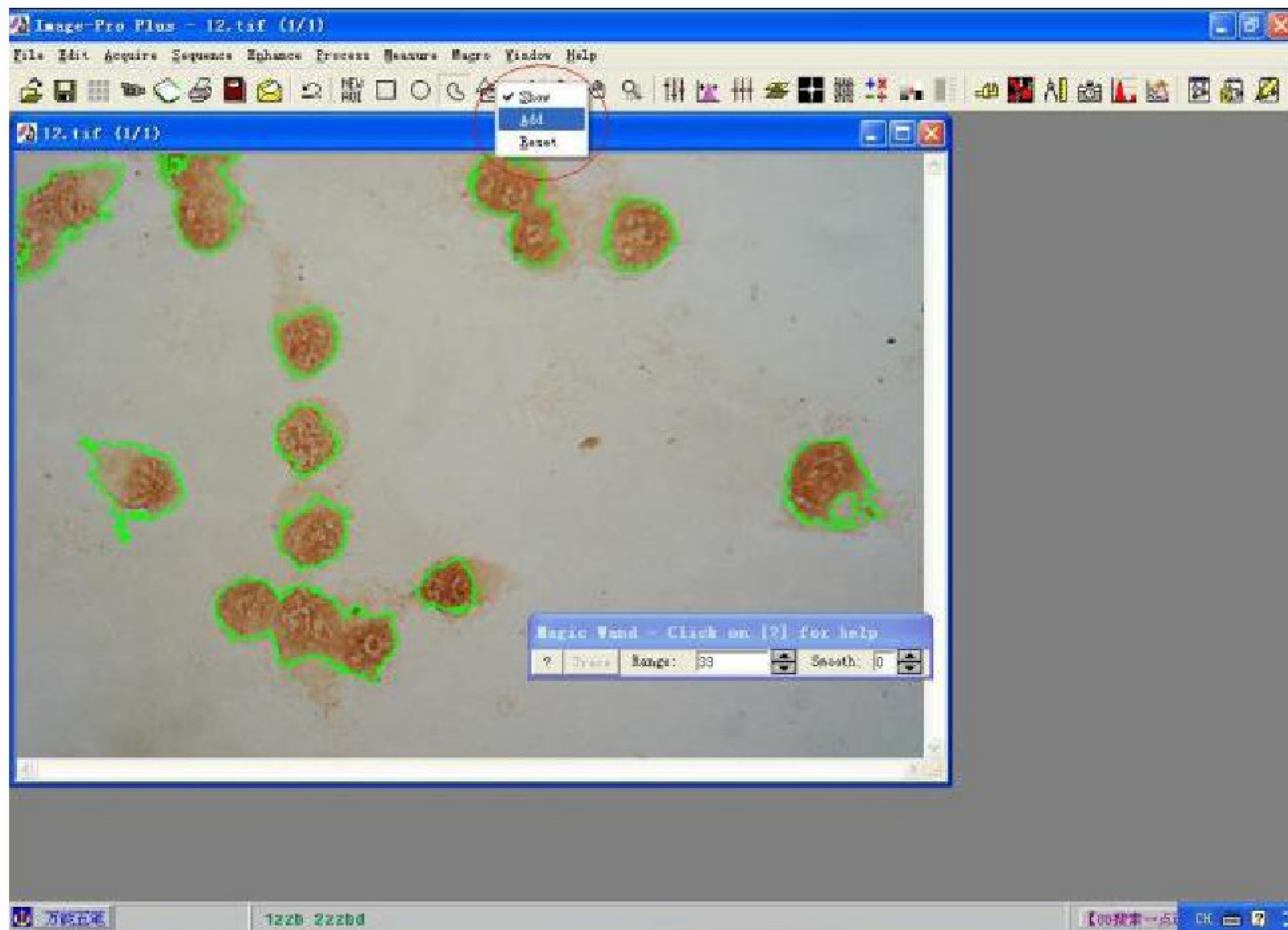


图 8

选择多个区域（图9）

- 选中一个区域后如果还要在同一张图片上再选另一个区域，不能直接点选，要先点击一下工具栏上的**Multiple AOI**按钮，再点击**add**，接下去就可以到另一个选择区域点选。
- 选好一个新的区域后再回去点**Multiple AOI--add**确认，再继续下一个，直到选取完所有的**AOI**。最后在图片上任一处点一下右键结束选择操作。结束后如果想再增加选择区域，只要再点一下**newAOI**按钮，就可以调出工具条继续增加选择区域。

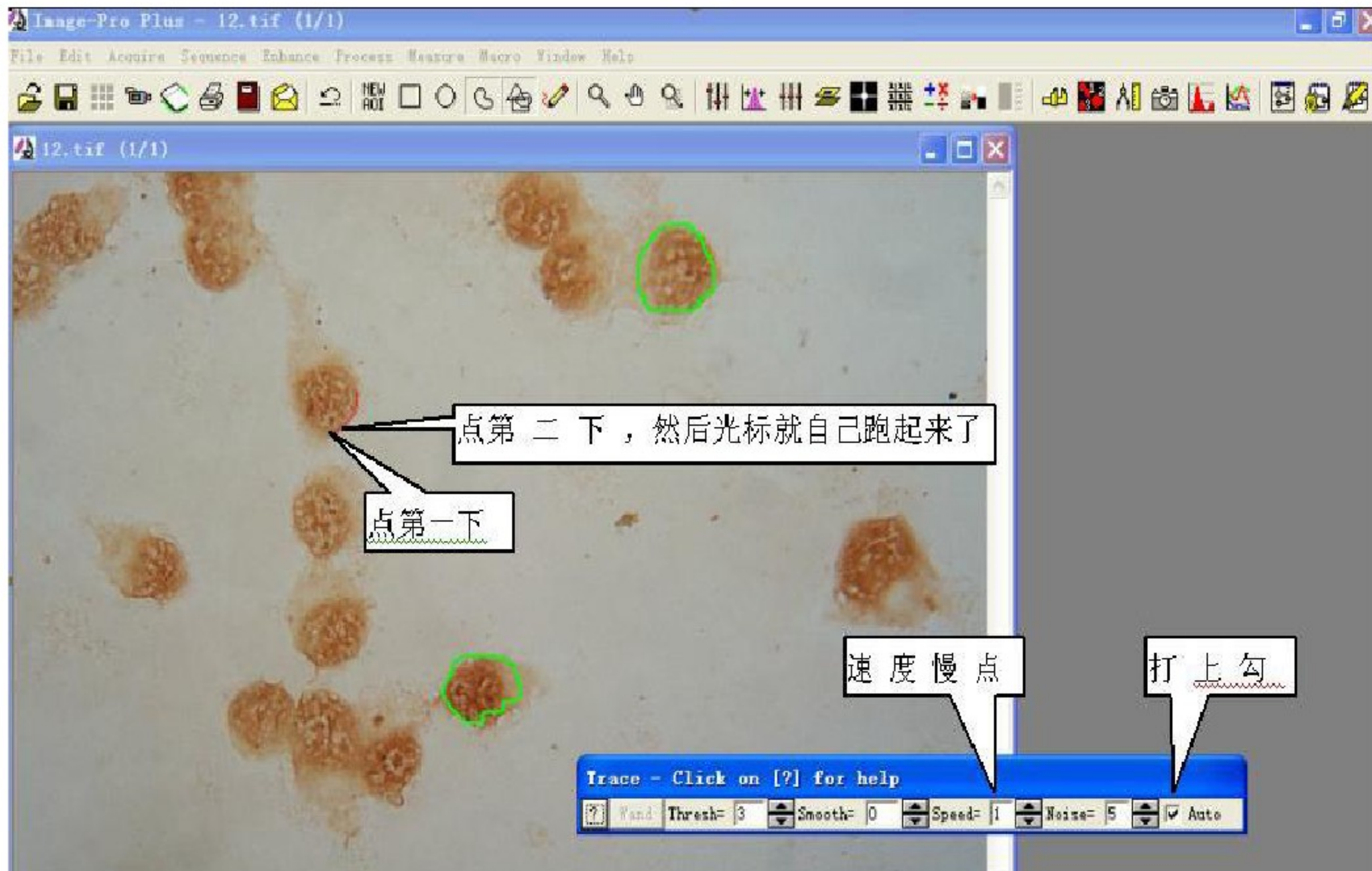
图9



- 这个irregular工具还有另一个操作方式，在问号旁边有个trace按钮，点一下它，工具条就变成另一个样子了。
- 这种操作方式是沿着孤立图像的边缘寻迹，从而画出一个沿着孤立形状边缘围成的一个AOI。
- 第一种是手画法。确认工具条右边的Auto选项没有打勾，将光标移至目标图形处按住左键拖出一个闭合图形，点右键结束。用鼠标画当然是不会准确的。实在没别的招了才会出此下策。

- 第二种方法是自动寻迹。图10所示
- 把那个**Auto**给选上，**speed**值给减到1(慢速看得清楚)，在目标图形的边缘处左键点一下鼠标，然后沿着边缘稍移动一下鼠标后再点击一下左键，这是给程序指明一个寻迹的方向，马上就能看到光标自动沿着边界走起来了，一直会走到起点处才会停止。这样就自动围成了一个闭合区域，点一下右键就确认了这个**AOI**。重复选取多个**AOI**的方法与楼上一样。
- 如果目标图形边界清晰，那么这个工具是非常管用的。可惜的是在许多情况下边界是模糊不清的，光标走到此处时会乱走一气。这时就要及时先点一下鼠标使光标暂停下来，然后在期望的方向延长再点一下左键，给程序指明一下前进的方向，如此多次，直到光标回到起点为止。最后点一下右键围成一个闭合的**AOI**。围好的**AOI**边界是绿色框。

图10

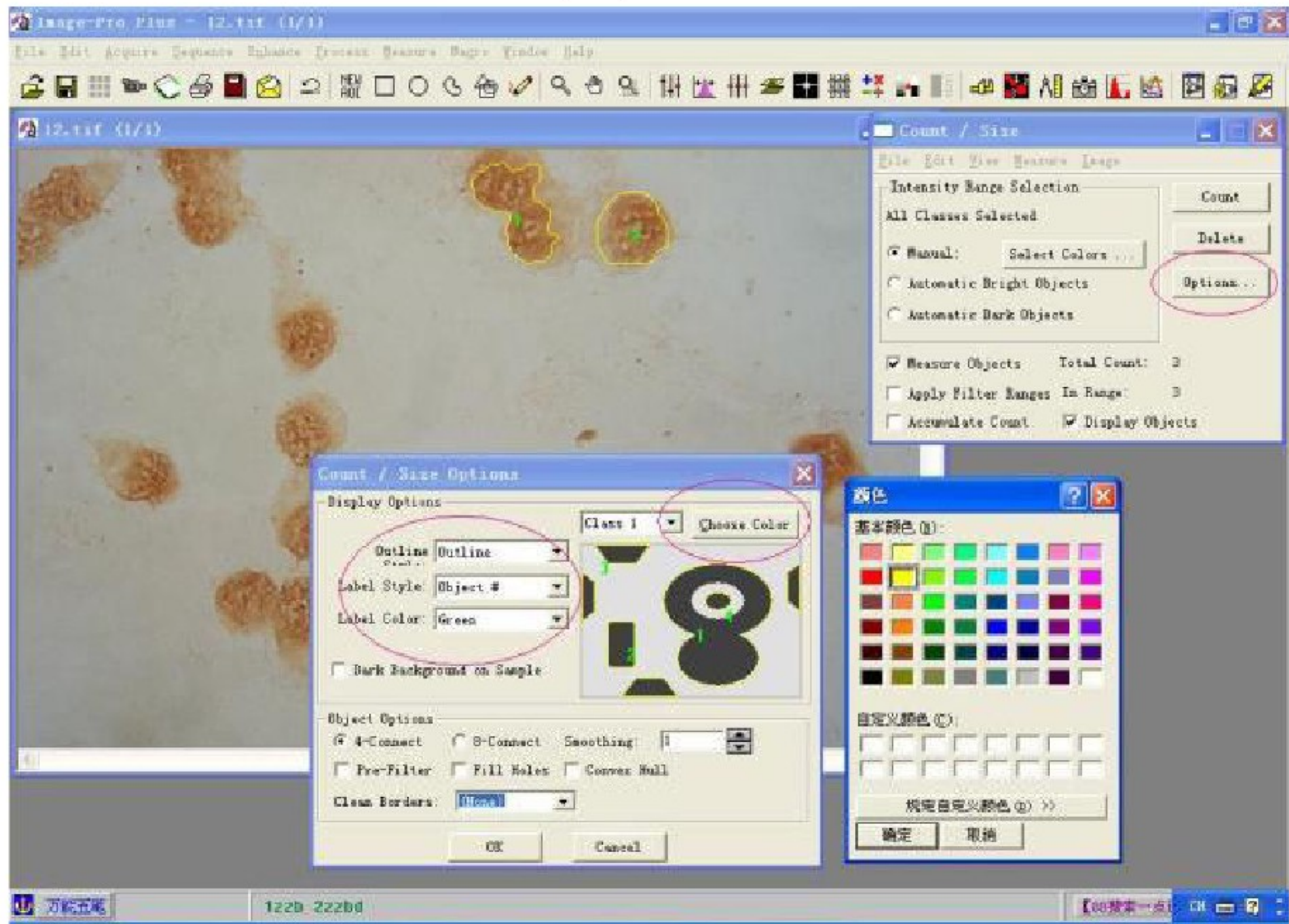


测量每个区域的几何尺寸及光密度

图11

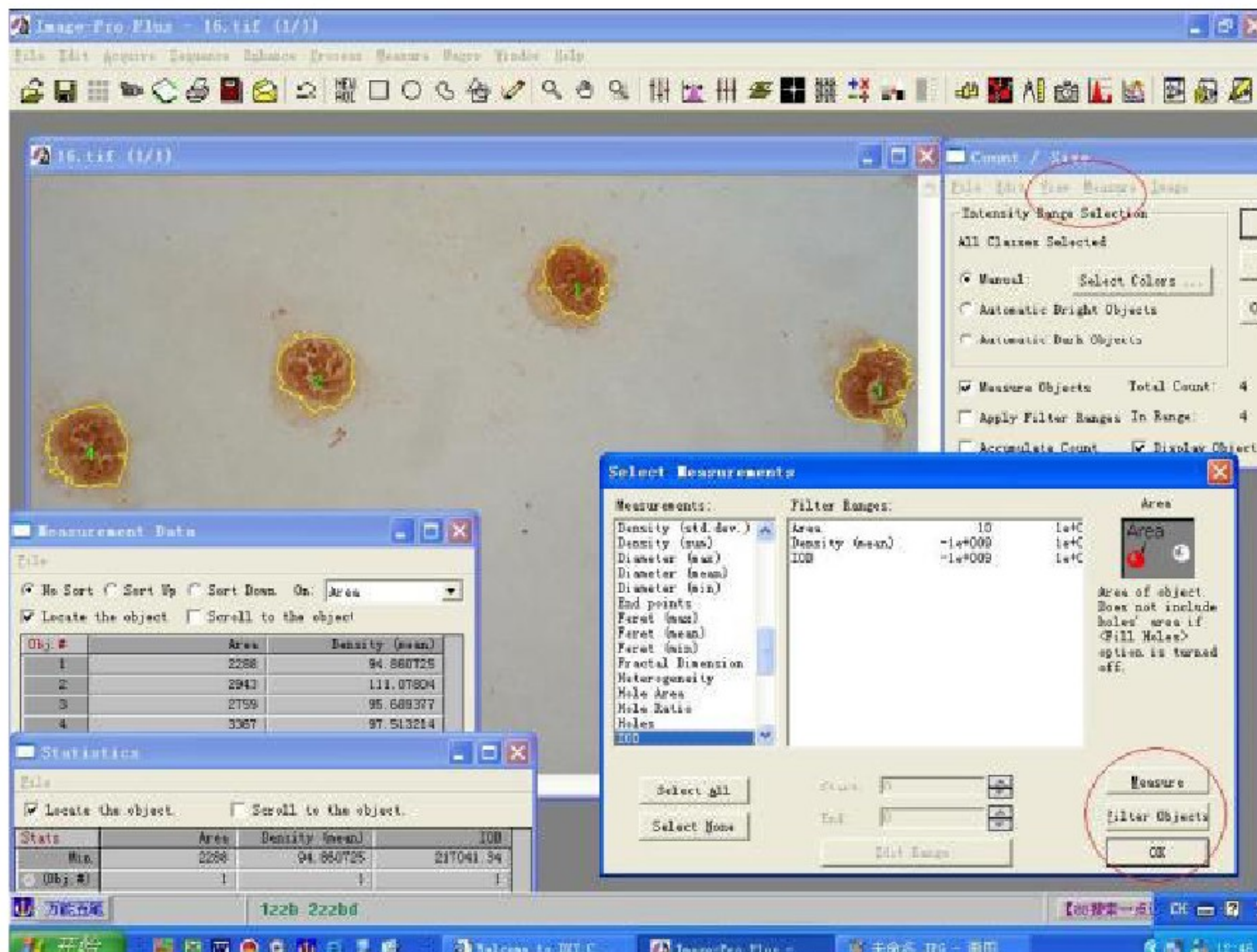
- 点开count/size窗口，点菜单EDIT---convert AOI to Objects.这样就把刚才选中的一个个AOI变成了要测量的object了，那些小区域的颜色也由AOI绿色外框线变成了object的标记了。
- object的标记类型是可以自己设定的。在count/size窗口右边有一个option按钮，点开它就能设定object标记的外观了。在option窗口中，outline style可以选outline(轮廓线)或filled(填充class颜色)。label style 可以选择为object序号或测量值。再下面是label的文字颜色。
- 右上角还有一个class的颜色选择按钮。

图11



- 下一步是点**measure**菜单下的**select measurements**。选上要测量的项目。
- **注意**，选完后要点击这个菜单中的**measure**按钮(而不是**count/size**窗口中的**count**按钮)。然后是**OK**按钮关闭**measure**窗口，点开**view**菜单下的**measurement data**和**statistics**数据窗口。几个**object**的测量数据就已经在里面了。
- 如果你还想继续增加**object**，可以直接用**irregular**工具画**AOI**，然后点**convert AOI to object**。这期间把数据窗口留着不关闭，可以看到新增的**object**测量数据会立即被更新

图12



segmentation工具

1 打开图片并调出count/size窗口 图13

