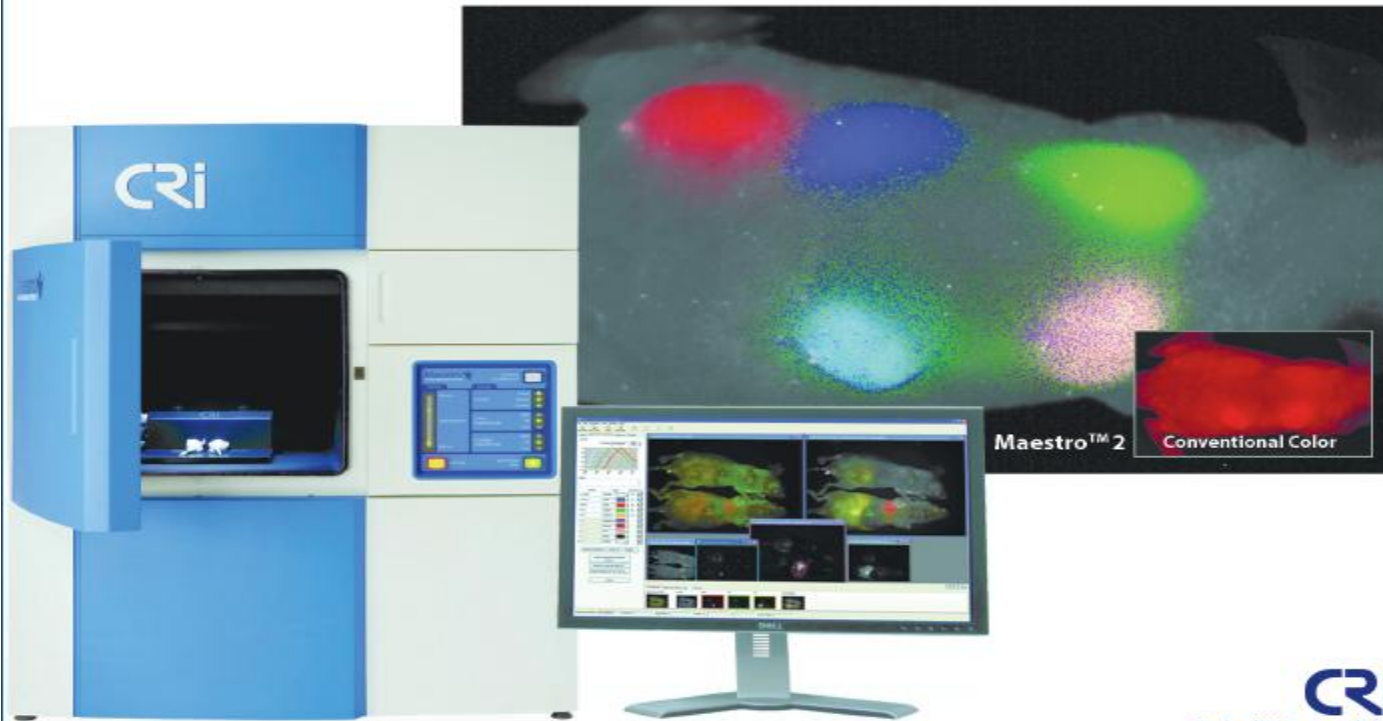


Maestro 2.10 Manual





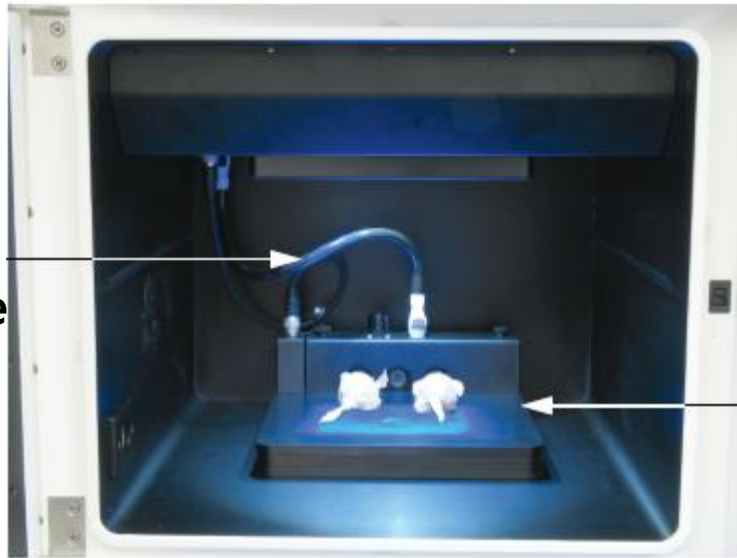
How to Power-Up the System

항상 아래순서대로 Maestro를 켜야 기계 자체의 error를 줄일 수 있다.

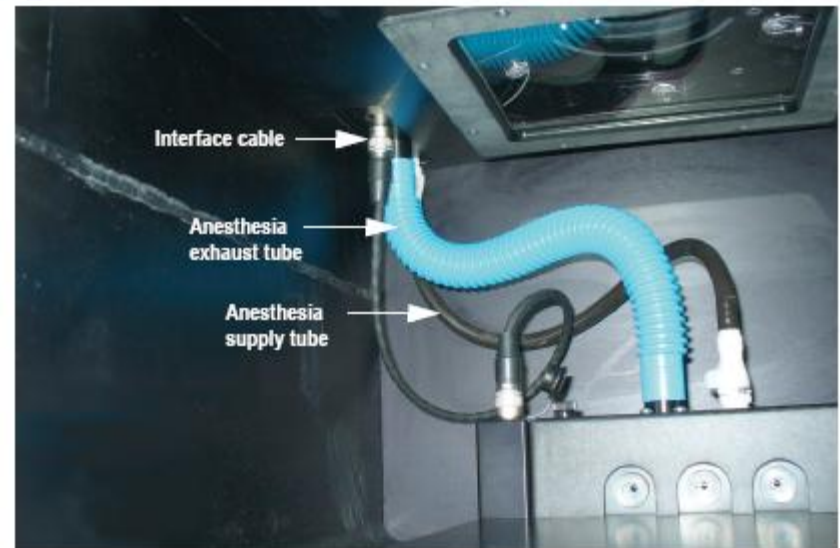
1. Maestro Imaging Module의 스위치가 꺼져있는지 확인
2. 컴퓨터의 전원을 킴
3. Maestro 의 전원을 키고 initialization이 될 때 까지 1분 정도 기다림
4. focus Knob이 연결되어있으면, 파랑색불이 들어왔는지 확인. 들어와있지 않으면, 3D Connexion Control panel 을 컴퓨터에서 확인함
5. Maestro software을 킴 (LCTF의 initialzing을 기다릴필요 없음)
6. Excitation Lamp 버튼을 3초 동안 눌러 excitation lamp 을 킴 .

Heated Specimen Chamber and Stage

Anesthesia
Supply Tube



Heated Anesthesia Stage



Interface cable

Anesthesia
exhaust tube

Anesthesia
supply tube

Controlling the chamber Environment

Maestro 2 software을 이용하여 chamber 와 stage의 타켓 온도와 min/max 의 범유을 정함

1. **Hardware>Edit Hardware Setting. Chamber Environment tab**을 선택.
2. **Heater on check box**을 이용하여 stage와 Chamber heater 켜고 끌 수 있음.
3. **Target box**을 이용하여 온도를 정함
4. In-Range limits는 High and Low temperature warning light을 정함. 이 값들은 타켓 온도에 맞추어 자동으로 설정되지만, 어느정도의 범의 내에서는 값을 임의로 정할 수 있음.

Control panel



➤ Interior Illumination

이 버튼은 Illumination을 조정함. 이 버튼이 켜져 있으면 하얀색 불이 켜짐. Image나 image cube을 찍을 때에는 이불을 끄고 Excitation Lamp을 켬

➤ Excitation Lamp

이 버튼은 excitation Lamp을 조정함. 약 3초 동안 누르고 있어야 lamp가 켜짐. Excitation lamp는 15분에서 20분 정도 후 stable 해지기 때문에 정확한 결과를 얻기 위해서는 미리 켜두어야 한다는 점을 고려해야 함.

Lamp 500-100시간 사용 후부터는 intensity가 50%이상 떨어지기 때문에 장시간 사용하지 않을 경우 꺼두는 것이 좋음.

➤ **Shutter**

image을 acquire 할 준비가 되면 SHUTTER 버튼을 눌러서 shutter을 열어서 excitation light 이 specimen chamber 안으로 들어가게 함.

➤ **Filter Wavelength Indicator**

Image을 acquire 하는 동안 current filter wavelength을 보여주는 창. 또한 system이 시작할 때 LCTF 이 exercising을 하는 동안 위아래로 움직임.

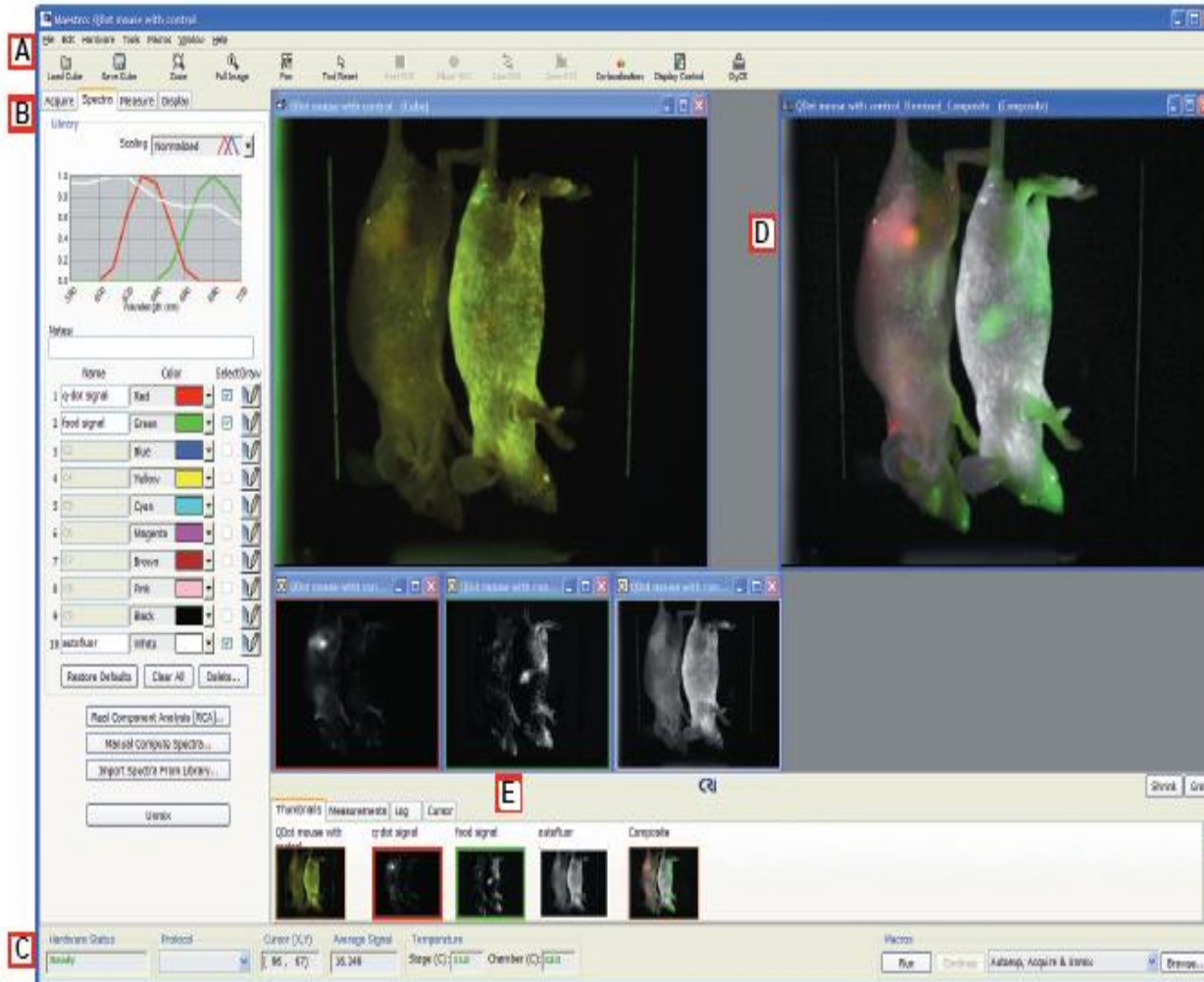
➤ **Status: system**

system을 현재 상태를 보여줌. **Power light**을 통해 system 전체가 켜졌는지 을 확인할 수 있고 , **Motion light** 은 녹색 일경 우 motor 와 filter wheel이 준비되어있는상태임. **Camera light**이 녹색일 경우 camera의 상태가 acquire 하기 위해서 준비되어있는 상태임.

➤ **Status: Chamber Temperature**

Chamber 온도를 표시함.

Understanding the Maestro work area



A. Tool box

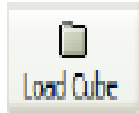
B. Control panels

C. Status Bar

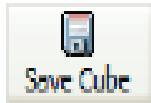
D. Imaging Gallery

E. Thumbnails
imaging Data
Pages

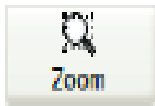
A. Tool Box



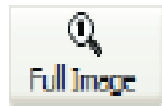
이 버튼을 클릭하거나 File Menu에서 Open Cube 을 선택하여 Image Cube을 열수있는 기능



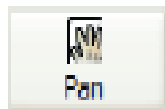
이 버튼을 클릭하여 image 나 multispectral dataset 을 저장하는 기능



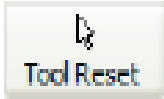
이 버튼을 클릭하여 image을 zoom in/out 하는 기능



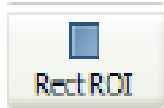
이 버튼을 클릭하여 full image 로 돌아가는 기능



Zooming을 했을 때, 이 버튼을 클릭하여 focus된 image안에서 이동 할 수 있는 기능
(화살표모양이 손 모양으로 전환됨)



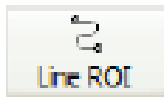
손 모양의 mouse pointer을 화살표 모양으로 전환하는 기능



이 버튼을 클릭하여, 사각형의 pixel으로 spectral library의 sample spectral signal 을 얻을 수 있는 기능



이 버튼을 클릭하여, 동글 한 pixel으로 spectral library의 sample spectral signal 을 얻을 수 있는 기능



이 버튼을 클릭하여, line pixel 으로 spectral library의 sample spectral signal 을 얻을 수 있는 기능



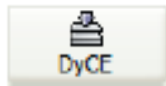
이 버튼을 클릭하여, freehand drawing pixel으로 spectral library의 sample spectral signal 을 얻을 수 있는 기능



이 버튼을 클릭하여 Co-localization tool box을 오픈 하는 기능



이 버튼을 클릭하여 Display Control box을 오픈하는 기능



이 버튼을 클릭하여 Dyce을 실행시킬 수 있음

B. Control Panels

- **Acquire>Brightfield Panel**- brightfield의 images와 image cube을 control 할 수 있는 panel
- **Acquire>Fluorescence**- fluorescence의 images와 image cube을 control 할 수 있는 panel
- **Spectra Panel** –spectra libraries와 unmix cubes 을 만드는 panel
- **Measure Panel** – component image을 찾고 measure 하고 measurement을 adjust 할 수 있는 panel
- **Display Panel** – display setting 을 change 하는 기능

C. Status Bar

- **Hardware Status box**- Camera의 status 나타내어주는 box (“No Hardware” “Ready”)
- **Protocol Drop down box**-현재 사용되고 있는 Protocol을 디스플레이해주는 box
- **Cursor X/Y and Average signal boxes** – 마우스가 가르치고 있는 부분의 coordinate location 과 signal level을 디스플레이해주는 box
- **Marco Drop down list and associated buttons** –Nuance 의 pre-recorded macros 저장list에서 선택할수있는 버튼. Macro을 만들어서 저장할수도 있음

D. Image Gallery

Live image, 지금 사용되고 있는 cube 그리고 unmixed composite, component 의 image 등을 디스플레이 하는 공간

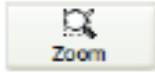
E. Thumbnails and Image Data pages

Shrink 와 **Grow** 버튼으로 창 화면의 사이즈를 변화시킬 수 있음

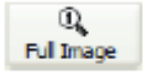
- **Thumbnails page**-현재보고 있는 image들을 담고 있는 페이지
- **Measurement page**- measurement data을 담고 있는 페이지
- **Log page** – 지금까지 했던 action history 을 담고 있는 페이지
(오른쪽아래를 클릭하여 지우거나 저장할 수 있음)
- **Cursor page** –마우스가 가르치고 있는 부분의 image의 pixel을 담고 있는 페이지

F. Zooming In and Out

➤ **To zoom in;**

Zoom  을 클릭 하거나 마우스를 scroll 면
마우스 Pointer가 magnifying glass 호 전환되면서 Zoom In이 되는
기능

➤ **To Zoom out;**

Full image  을 클릭하거나 마우스를 scroll 하면
Zoom out이 되는 기능

G. Panning a Zoomed image

Zoom In으로 인한 전체적인 사진을 볼 수 없을 경우 panning 을 통해 원하는 부분 image로 이동할 수 있는 기능

➤ To Pan a zoomed image;

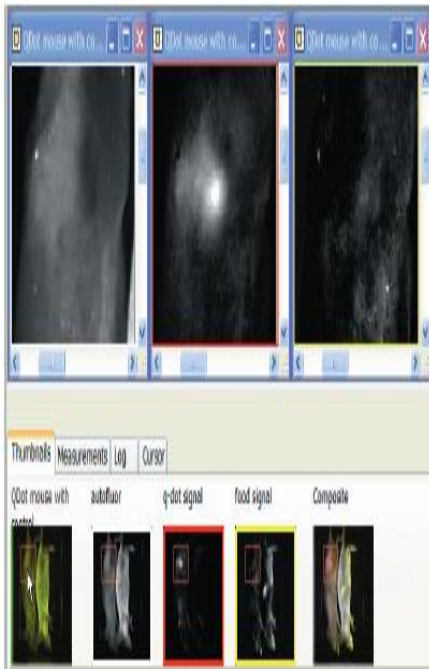


- 마우스를 image을 가르치게한후, 마우스에 오른쪽버튼을 클릭하여, pop-up menu 중 **Pan**을 선택한다. 원하는 부분이 보일 때까지 마우스를 클릭 체 이동.
- Thumbnails page 안에 있는 zoom view rectangle 을 이동
- 가로로 움직일 때; Shift Key을 누른체 마우스의 wheel을 scrolling함
- 세로로 움직일 때; Control Key을 누른체 마우스의 wheel 을 scrolling함

G. Panning a Zoomed image

Zoom In으로 인한 전체적인 사진을 볼 수 없을 경우 panning 을 통해 원하는 부분 image로 이동할 수 있는 기능

➤ To Pan a zoomed image;



- 마우스를 image을 가르치게한후, 마우스에 오른쪽버튼을 클릭하여, pop-up menu 중 **Pan**을 선택한다. 원하는 부분이 보일 때까지 마우스를 클릭 체 이동.
- Thumbnails page 안에 있는 zoom view rectangle 을 이동
- 가로로 움직일 때; Shift Key을 누른체 마우스의 wheel을 scrolling함
- 세로로 움직일 때; Control Key을 누른체 마우스의 wheel 을 scrolling함

Specifying Nuance Hardware Settings

➤ Hardware > Edit Hardware Setting > Camera

- **CCD Bit Depth** –image per wavelength로 8-bit(256level)나 12-bit(4096level)로 capture할 수 있다.
12bit이 보다좋은 질의 image을 얻을 수 있지만 대부분의 Microsoft Windows (non-scientific imaging application)에선 열리지 않을 수 있음
- **Gain**- CCD readout 을 modifies 하기 때문에 Gain 은 image 의 질에 영향을 줌. Low intensity image 들은 Gain Value을 높아 주어 따라 Brighter pixel 을 됨.
또한 exposure time이 줄어듬.
* **High Gain은 signal noise을 높을 수 있음***
Gain Value 1,2,와 3이 가장 suitable 함.
- **Flip Image**- live image stream 과 acquired 된 image 을 180도씩 회전이 가능함

- **Check Dark Current-** camera background 의 noise 을 계산하는 기능
0초의 exposure time 와 camera의 light 이 가지
않을 경우를 기준
- **Check Dark Frame-** camera background 의 noise 을 계산하는 기능
- **Frames to Average-** signal-to-noise 비율을 높여 noise 을 낮추는 기능
- **Fluorescence/Brightfield Autoexpose target % of dynamic range**

Imaging the Cri Business card with Qdat Spots

- ✓ Acquiring an Image Cube
- ✓ Unmixing the Image Cube

Acquiring an Image cube

1. **Live** 버튼을 클릭함.
2. **Binning**을 2X2와 **Region of Interest** 을 full로 놓음. (default 값) **maximum sample size(3.3"X4.4")**을 선택하여, business card image가 다 보이게 함.
3. **Wavelength And Exposure**을 590nm로 선택함. **Autoexpose Mono** 버튼을 클릭하여 live image의 좋게 함. 계산된 exposure setting 은 Exposure(ms) box표시됨.
4. external focus knob 혹 Focus slide을 사용하여 초점을 맞춤.
5. 필요하다면, 문을 열어 명함의 위치를 바꾸고, 다시 문을 닫음.
6. Qdot에 적당한 excitation wavelength는 455nm임으로, blue filter set을 이용함. **Filter/Wavelength Selection group** 에서 **Blue(500:10:720)** 선택하면 자동적으로 Start, Step, end 값이 정해짐.
7. Interior white light을 Turn on Illumination check box을 지우거나 INTERIOR

8. Open Shutter check box을 표시함.(blue light illumination 됨)
9. Wavelength and Exposure group에서 AutoExposure Cube 버튼을 클릭함.
10. Fluorescence Panel 에서 Acquire Cube 버튼을 클릭하여, image을 acquire함
11. Image 다 얻은 진후 , cube 가 display됨
12. Tool bar에서 save cube 버튼을 클릭하거나, save cube dialog box에서 저장 될 장소와 이름을 정하고 save 버튼을 클릭함.

Monitor: Nothing (x64) [Live Stream]

File Edit Hardware Tools Window Help

LoadCube Zoom Full Image Pan ToolReset

ABURD Spectra Measure Display

Fluorescence Low Light Focus

Bring And Region Of Interest
 Settings: Max Sample Size: 822
 2x2 [0.2" x 4.4"] Max Full

Wavelength And Exposure
 Wavelength (nm): 580 Exposure (ms): 280.00

Color Scale: 500 800

Autopose Mono Autopose Cube

Filter/Wavelength Selection
 Start Stop End Narrow
 50 10 70

Size (50 x 10 x 70)

Focus Focus: 1

Multi Fiber Support
 Add

Lighting
 Open Shutter Turn On Illuminator

Flat Fielding
 Flat Field Acquire Flat Images

Sample ID

Notes

Acquire Mono Acquire Cube
 Acquire ByCS

35-B Cabot Road Woburn, MA 01801
 Tel: 781.935.9099 Fax: 781.935.3388
 Toll Free: 1.888.372.1242
 website: www.cri-inc.com
 email: [redacted]

Shrink Grow

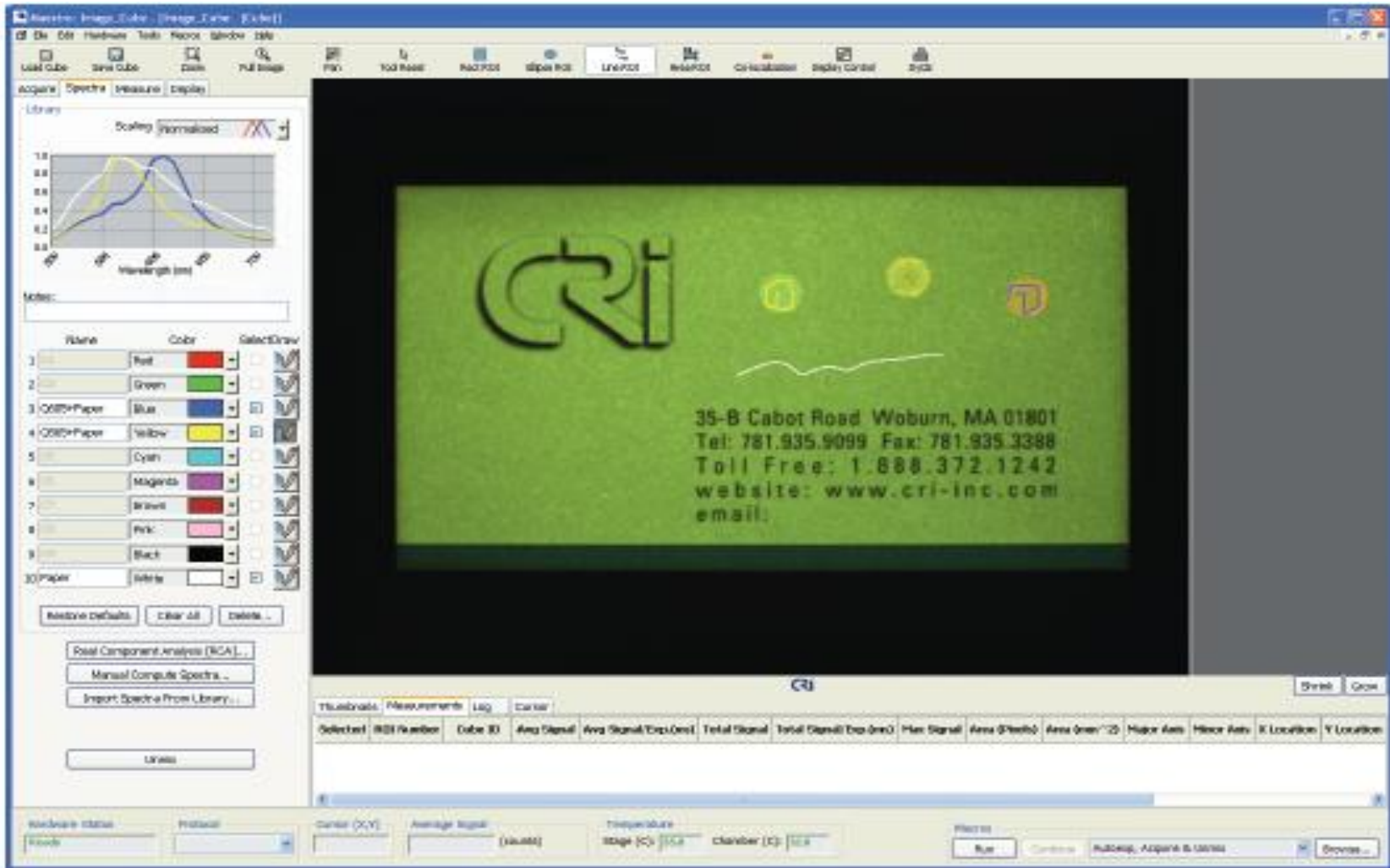
Thumbnail Measurements Log Cursor

Selected	ROI Number	Cube ID	Avg Signal (counts)	Avg Signal (scaled counts)	Avg Signal (x10 ⁻⁶ photons/cm ² /s)	Avg Signal (DB)	Total Signal (counts)	Total Signal (scaled counts)

Hardware Status Protocol Cursor (C,Y) Average Signal Temperature
 Ready [redacted] [361, 185] [2863.908] Stage (C) [redacted] Chamber (C) [redacted]

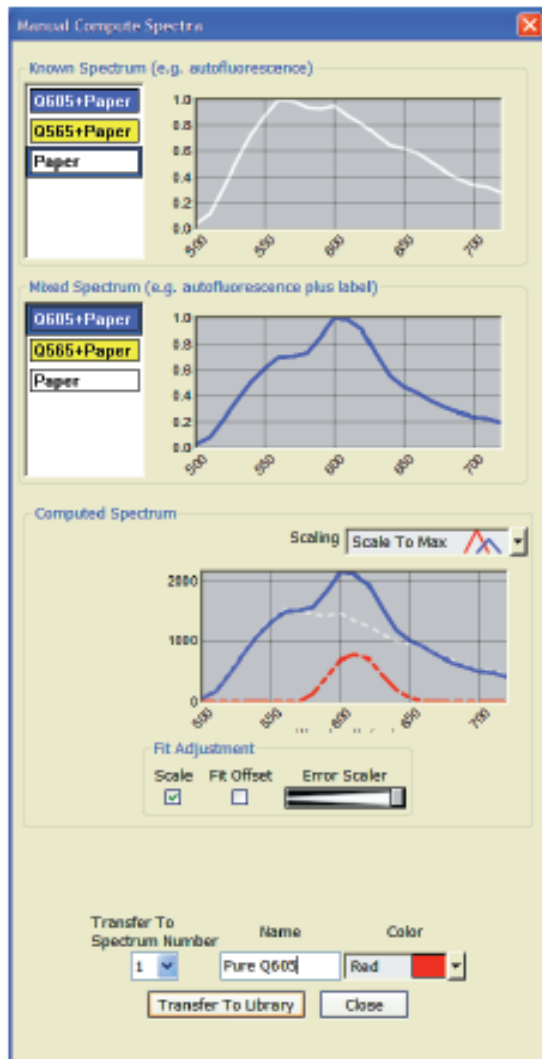
Power On
 Run Continue Acquire, Acquire & Unload Stop

Unmixing the Image Cube



1. Cube window을 maximize button을 클릭하여 화면을 크게 만듦.
2. **Spectra Tab** 을 선택함
3. **Sample the Autofluorescence signal**
 - a. color palette중 10번째의 Draw 버튼을 클릭하여 autofluorescence 가 있는 곳에 선을 그림.
 - b. check 표시를 하고 이름을 "C10"에서 "Paper"로 바꿈.
4. **Sample the 605nm fluorescence plus the paper signal using the Blue color**
 - a. # 3에서 Draw 버튼을 클릭하여 가장 오른쪽에 있는 dot 위에 선을 그림.
 - b. Check표시를 하고 이름을 "C3"에서 "Q605+Paper" 로 바꿈.
5. #4줄의 노랑색을 이용하여 Qdat 565nm을 spot 함. 가장 왼쪽에 위치한 dot이며 이름은 "Q565+ Paper"로 바꿈.

Calculating the Pure Spectra



1. Manual Compute Spectra 버튼을 클릭함
2. Remove the autofluorescence from the 605nm Qdot signal
 - a. Known Compute Spectrum 에 white Paper color market을 선택함.
 - b. Mixed Spectrum에 blue "Q605+Paper" 을 선택함.
 - c. Computed Spectrum에서 Scaling drop down box 에서 "Scale to Max"을 선택함
 - d. mixed spectrum은 파랑색으로 computed spectrum은 빨강색으로 표시됨
 - e. 정확한 pure spectrum 얻기 위해서는 정확한 양의 autofluorescence을 빼야함. Autofluorescence 와 pure fluorescence 사이에 overlapping region 이 가까워야함.
 - Error scalar을 이용하여 spectra가 서로 가까이 aligned 될 수 있게 함.
 - 만약 가깝게 조정이 안될경우, scale unchecked 함

f. 창 가장 아래 부분에 위치한 이름창에 "C1" 의 이름을 "Pure Q605" 로 바꿈

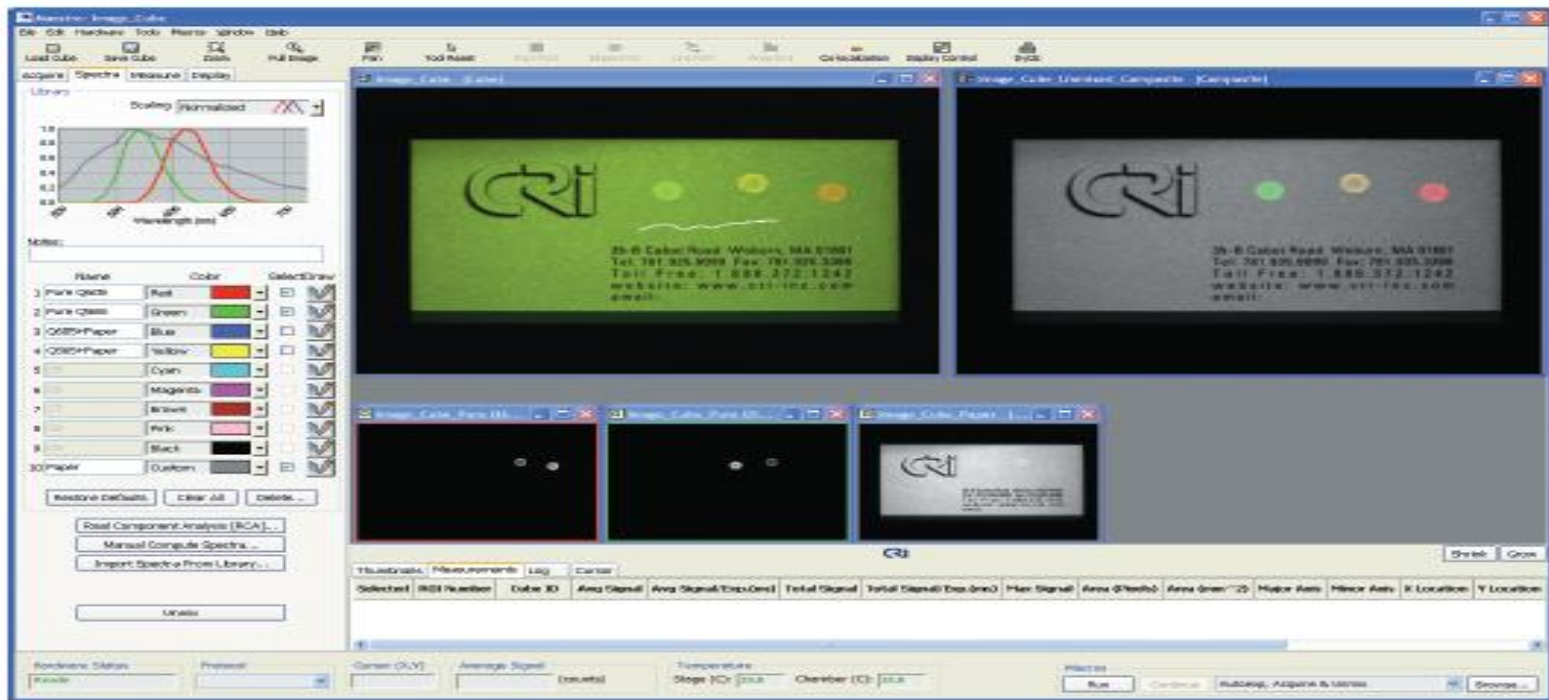
g. Transfer to Library 버튼을 클릭함

3. 똑같은 방식으로 Q656 nm signal의 autofluorescence 도 remove 함

4. Manual Compute Spectra dialog box을 닫음.

Unmixing the Image

1. Paper, Q605, Q565 marker 들이 선택되어있는 확인
2. unmix 버튼을 클릭함
3. Software 가 자동으로 pure fluorescence(Qdot)signal들을 계산하여 새로운 image들이 나타남.
4. protocol을 저장하고 싶을 시, File>save protocol을 한후 저장위치와 파일명을 정함



Acquiring Spectral Images

Acquiring Images Using Saved Saved Protocol

➤ **To open a Protocol;**

1. File >Open Protocol

2. 만약 다른 Protocol이 열려있으면, save 의 여부 확인.

3. choose Protocol dialog box에서 원하는 protocol 을 클릭
Tip=My Computer 에서 protocol file(*.pro) 을 더블
클릭하여 열수도 있음

4. 마지막으로 saved 되었던 exposure과 Wavelength의
setting으로 protocol file 이 열림

Viewing a Live Image Stream

Exposure time와 frame rate of live image 는 연관성이 있음

- Black image= exposure setting이 너무 낮을때 생기는 현상
- Solid red = exposure setting이 너무 높을때 생기는 현상

➤**To View a live Image;**

1. **Fluorescence acquire panel**로 바꿈. **Live Stream window** 로 자동으로 변화됨
2. **AutoExpose Mono** 버튼을 클릭하면 현재의 wavelength에 최적함 exposure time 으로 자동 변화됨.
3. Fine- tune the focus if necessary.

➤ **To apply a live image overlay;**

Quantitative 결과가 필요 시, **Live Image Overlay** 사용하여 전에 찍었던 image 와 현재 specimen을 overlay 하는 방법.

1. 사용하고자 하는 image open

2. 마우스에 오른쪽버튼을 클릭하여 **Set As Image Overlay**을 선택함

➤ **To Freeze the live image;**

Live 버튼을 1-2초 정도 클릭하면 다시 Live 버튼을 클릭할 때 까지 frozen 됨.

Camera Binning, Zoom and Region of Interest



Higher Binning은 exposure time 과 image size 은 줄일 수 있지만 resolution 은 낮춤.
Default setting 은 2-pixel (2X2) binning 이다

➤ To set camera Binning

- binning을 원치 않을 경우(Maximum image resolution과 사이즈), 1X1 binning option을 선택
- 2X2 binning은 2X2의 pixel을 하나의 픽셀 합침
- 4X4 Binning은 4X4의 pixel을 하나의 픽셀로 합침

➤ To Zoom in on the image

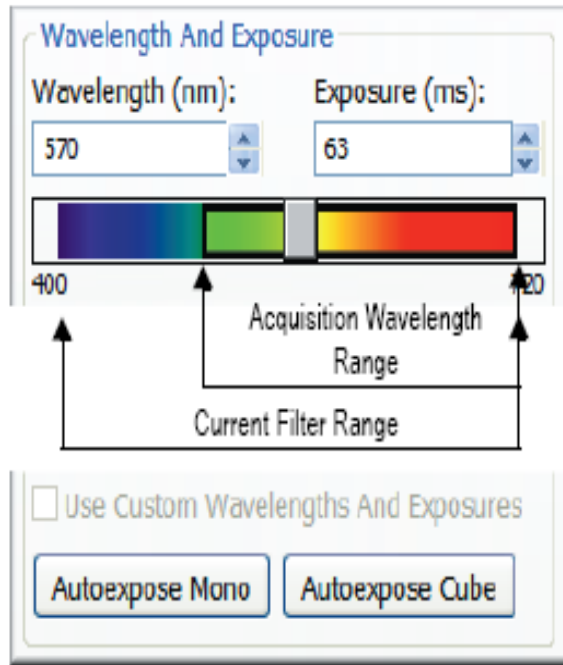
Maximum Sample Size을 선택하고 Zoom의 level을 올려 선택하므로써 작은 부분을 볼 수 있음

➤ **ROI(Region of Interest)**

- Full Frame, 2/3-frame, 1/2frame 또는 1/3frame을 찍고 싶은 경우, Predefined option 에서 선택
- 원하는 곳을 선택하고 싶을 경우 **custom** 을 선택한 후 마우스로 원하는 부분을 draw하는 방식 혹은 Hardware>Set Custom Camera ROI.

Specifying the Current Wavelength and Exposure

Wavelength And Exposure box 에서 Wavelength(nm) 와 Exposure time(ms) 을 조절할 수 있음



➤ Adjusting the Current Wavelength

✓ To manually set the current wavelength

slider 을 drag 하여 원하는 wavelength 에 맞추는 혹은, wavelength text bar에 직접기재할수 있거나(1nm 단위) 또는 bar에 적힌 value(10nm 단위)로 정할 수 있음

➤ Adjusting the Exposure Time(Autoexpose)

❖ To autoexpose at the current wavelength

Autoexpose Mono 버튼을 클릭하면 자동적으로 최적의 exposure time을 계산되어 Exposure text box에 나타남

❖ To autoexpose a cube

1. Image cube을 하기 전, **Autoexpose Cube** 버튼을 클릭

2. Multiple filter feature을 사용하고있을시, 시스템이 알맞은 filter set을 알려줌. 그 filter set을 install함.

3. Nuance자체에서 image cube에 알맞은 exposure time을 계산하여 Exposure Text box에 표시함.이때, Use Custom Wavelengths and Exposure 에 체크 표시가 됨.

❖ To manually enter an Exposure Time

- Exposure value을 Exposure box에 직접 type 하거나 strollers를 사용하여 적용. Exposure setting 바꾸면서, live image의 밝기의 변화를 볼 수 있음
- multiple filter feature을 사용시, 각각의 필터의 exposure time을 다르게 적용할 수 있음

❖ To use custom wavelengths and exposures

- Custom Wavelengths and Exposure 을 클릭하여 설정함

Specifying Custom Wavelength and Exposure settings

➤ To specify custom collection settings;

1. **Hardware>Edit Hardware Setting**을 하거나 control key+H을 이용하여, **Edit Protocol dialog box**을 open 함
2. **fluorescence Custom tap** 을 클릭함
3. **Wavelength/Exposure table**이 맞추어있는 setting으로 전환됨
4. 이 setting 을 바꾸려면, **Start/End Wavelengths>Fill wavelengths box>Step interval**을 사용하여 원하는 wavelength 로 변한 시킴
5. **Fill Exposure box** 에 exposure time을 정함
6. **Wavelength/Exposure box** 로 돌아와, individual setting 을 편집함
7. OK 을 클릭한 후 dialog box을 닫음
8. **Brightfield panel** 이나 **fluorescence panel**에서 **Use Custom Wavelength and Exposure** 을 선택함.

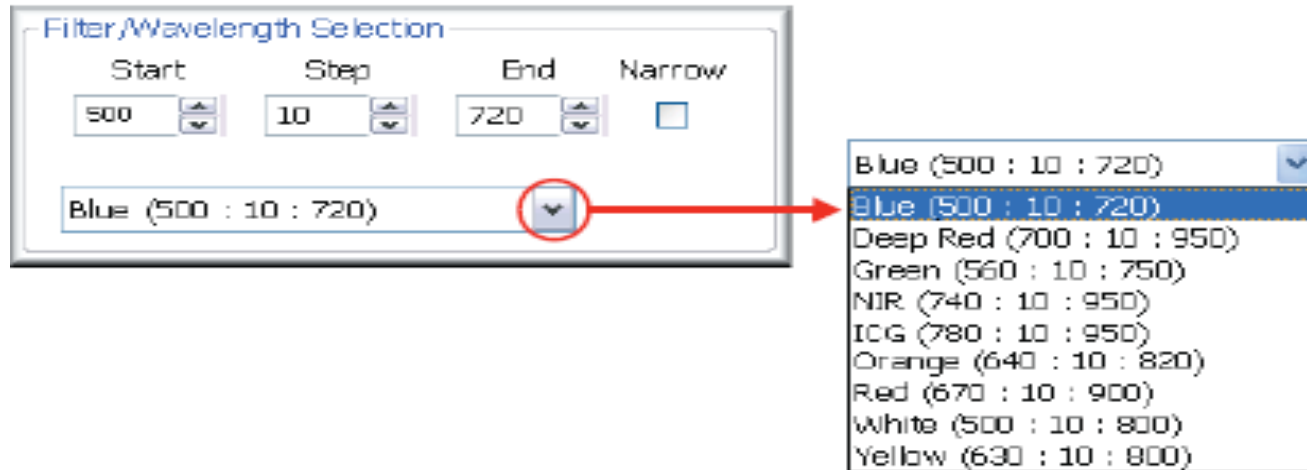
➤ **To save custom collection settings as a table to load again later**

1. **Custom collection** 을 setting 한 후, save 버튼을 클릭한다.
Choose custom Table dialog box 을 open함
2. Directory와 filename 을 정하고 save을 클릭함

➤ **To load a wavelength and exposure table**

1. **Brightfield Custom** 혹은 **Fluorescence Custom** tab에서 load 버튼을 클릭함
2. load하고 싶은 부분에 table을 위치한 후 Open 을 클릭함.
Wavelength/Exposure table이 나오면 다시 OK 을 클릭함

Making a Filter/Wavelength Selection



Maestro는 full complement of excitation과 emission filter를 가지고 있음.

Using Predefined Filter Settings

➤ To Select a predefined filter set

Drop down box 에서 옵션을 선택함

Maestro Filter Setting Name	Excitation Filter (Range)	Emission Filter	Acquisition Settings*
White	Neutral attenuator	Transparent glass filter	500 to 800 in 10 nm steps
Blue	455 nm (435 to 480 nm)	490 nm longpass	500 to 720 in 10 nm steps
Green	523 nm (503 to 548 nm)	560 nm longpass	560 to 750 in 10 nm steps
Yellow	595 nm (576 to 621 nm)	635 nm longpass	630 to 800 in 10 nm steps
Orange	605 nm (586 to 631 nm)	645 nm longpass	640 to 820 in 10 nm steps
Red	635 nm (616 to 661 nm)	675 nm longpass	670 to 900 in 10 nm steps
Deep Red	681 nm (641 to 688 nm)	700 nm longpass	700 to 950 in 10 nm steps
NIR	704 nm (684 to 729 nm)	745 nm longpass	740 to 950 in 10 nm steps
ICG	735 nm (700 to 770 nm)	790 nm longpass	780 to 950 in 10 nm steps

* The ending wavelength can always be made longer if there is fluorescence beyond the suggested end point.

Changing Wavelength Settings

원하는 filter setting이 없을 경우, Stat, step, and End 값으로 직접 정할 수 있음

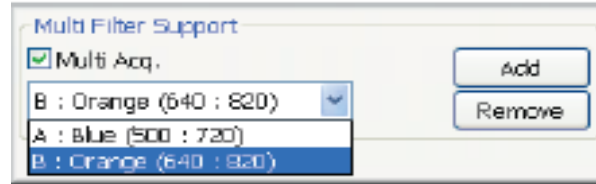
Acquisition Setup Using Multiple Filters

Multi Filter Support 기능은 서로 다른 excitation/emission filter set을 사용하여 Fluorescence imaging 을 acquire하게 해줌

exposure time은 각각의 필터에 맞추어 바꿀수있지만, ROI, Binning, bit depth 그리고 depth 값은 같아야 함.

❖ To configure multiple filter sets

1. **Multi Filter Support**에서 **Add** 버튼을 클릭. **Add Filter dialog box**에 filter set to add을 선택한후 OK버튼을 클릭함.



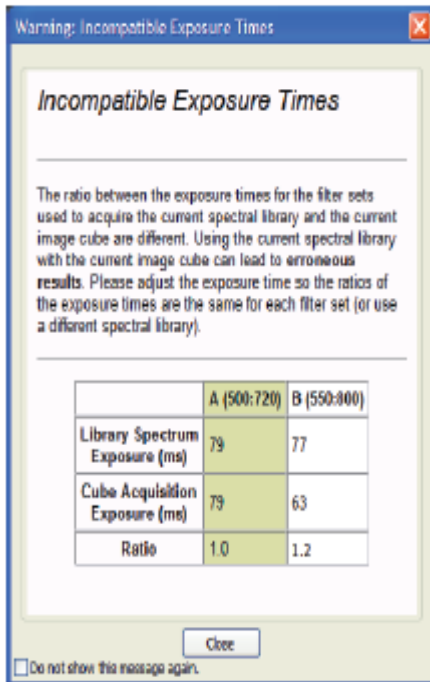
2. 세 번째 혹은 그 이상의 Filter를 적용 시- Add 버튼 다시 클릭하여 filter setting 을 add 함.

- To remove filter setting- remove하고 싶은 setting 을 선택한 후, remove 버튼을 클릭함. 자동적으로 남아있는 filter set 의 순서가 위로 올라감.

- Multi acquisition list에서 하나의 filter setting 만을 쓰고 싶을 경우, 원하는 filter setting 선택 한 후, Multi Acq. Box의 체크 표시를 없앴.

3. 다음에 다시 사용 할 시, 이 protocol을 을 저장함
4. 준비가 된 후, **Multi Acq. Box** 에 체크를 클릭함

➤ Maintaining Compatible Exposure Time Ratio



Multiple filter와 Spectral library을 Multi-filter cube 으로 부터 사용될 때, filter set, spectral library와 exposure time 간의 consistent 한 ratio로 지켜져 야함. 맞지 않는 Ratio 을 쓸 경우, erroneous result 가 나올 수 있음.

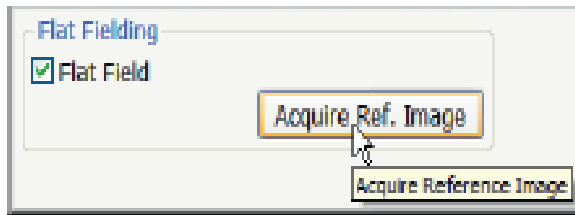
➤ **Saving Many Filter Protocols in one Maestro Protocol**

Multi Filter Support feature 을 이용하여, 여러 개의 filter protocol들을 하나의 protocol로 저장할 수 있음.

➤ **Taking a Reference Image for Flat Fielding**

Flat Fielding은 보다 밝은 Mono image와 fluorescence 의 image cube을 얻을 수 있는 software임. Fluorescence image에서 Flat Fielding 을 사용하지 않을 시, image 의 바깥쪽이 다른 부분들의 비해 조금 더 어두운 것을 알 수 있음.

1. **Flat Field Check box**을 선택-Acquire Ref. Image은



활동화되고 Acquire Mono 와 Acquire Cube 은 비활성화됨.

2. Plastic fluorescent slide로 specimen으로 교체함.

3. **Acquire Ref. Image** 버튼을 클릭함.

4. Reference image을 찍은 후, specimen을 원래 자리로 위치함

Acquiring a Mono Image (Snapshot)

Acquire Mono 버튼을 클릭하여, 현재의 live image 의 Snapshot 을 찍음.
(이 기능은 single picture을 위함임. Image cube은 찍히지 않음)

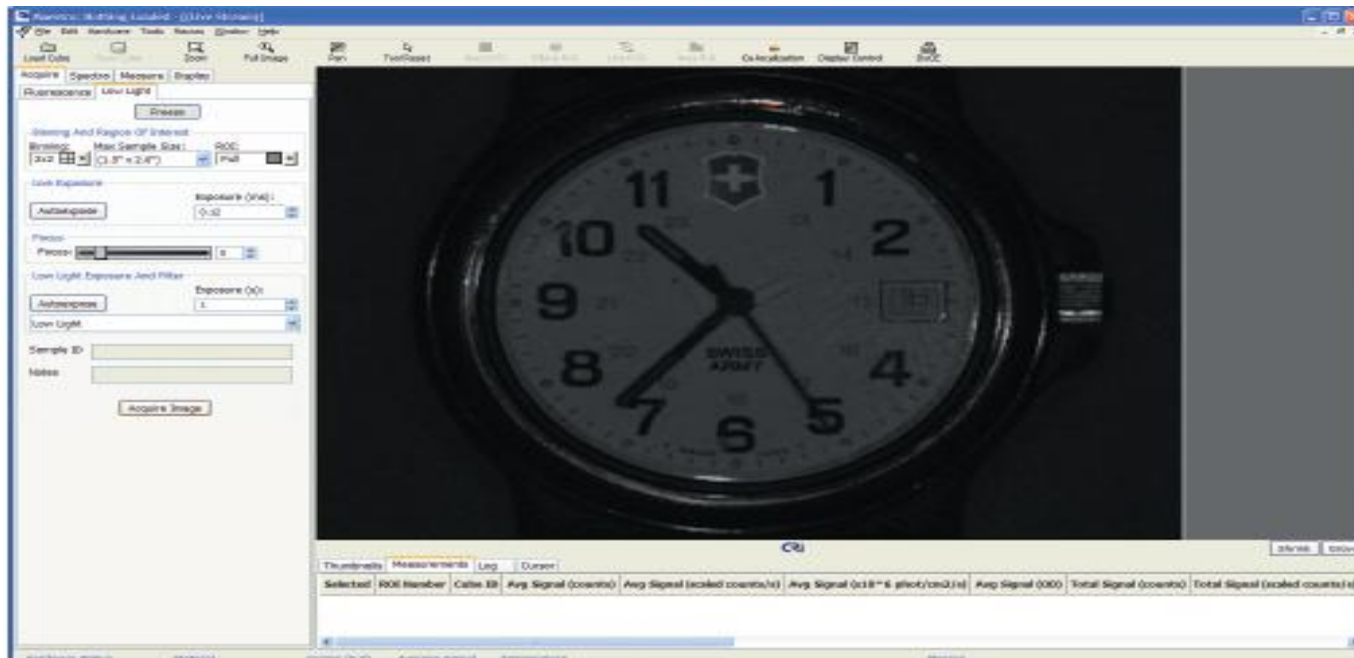
Acquiring a Fluorescence Image Cube

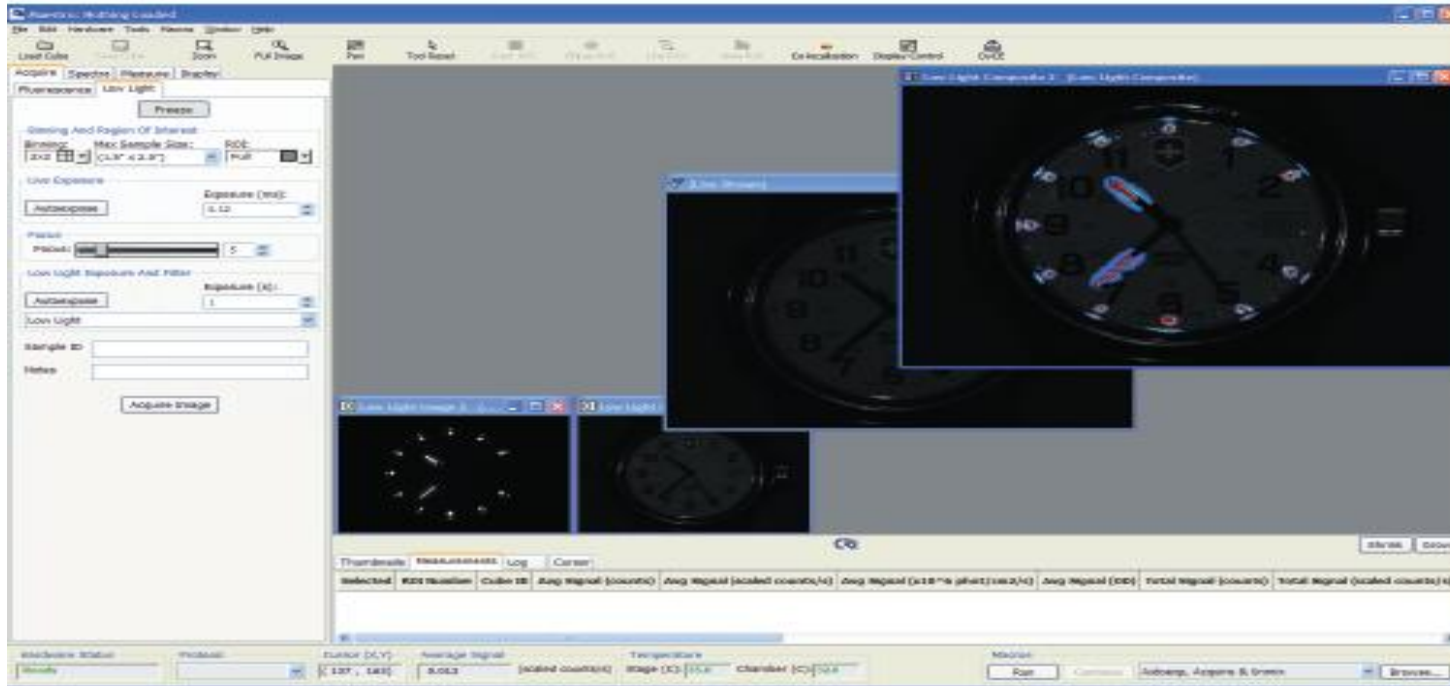
1. **Autoexpose Cube**을 함
2. Wavelength 와 exposure setting이 적절하면, **Acquire Cube**을 함

Acquiring Low-Light Images

Taking a Low-light Image

1. stage에 specimen을 넣고 문을 닫는다
2. Acquire>Low Light panel. Excitation light을 끄. System이 자동적으로 shutter을 닫고 Low Light filter set 으로 바꿈.
3. interior illumination(white) light을 이용하여 live image의 autoexposes 을 함.(live image가 보이지않을경우, live버튼을 클릭함)
4. binning, Max Sample Size, ROI을 정함.

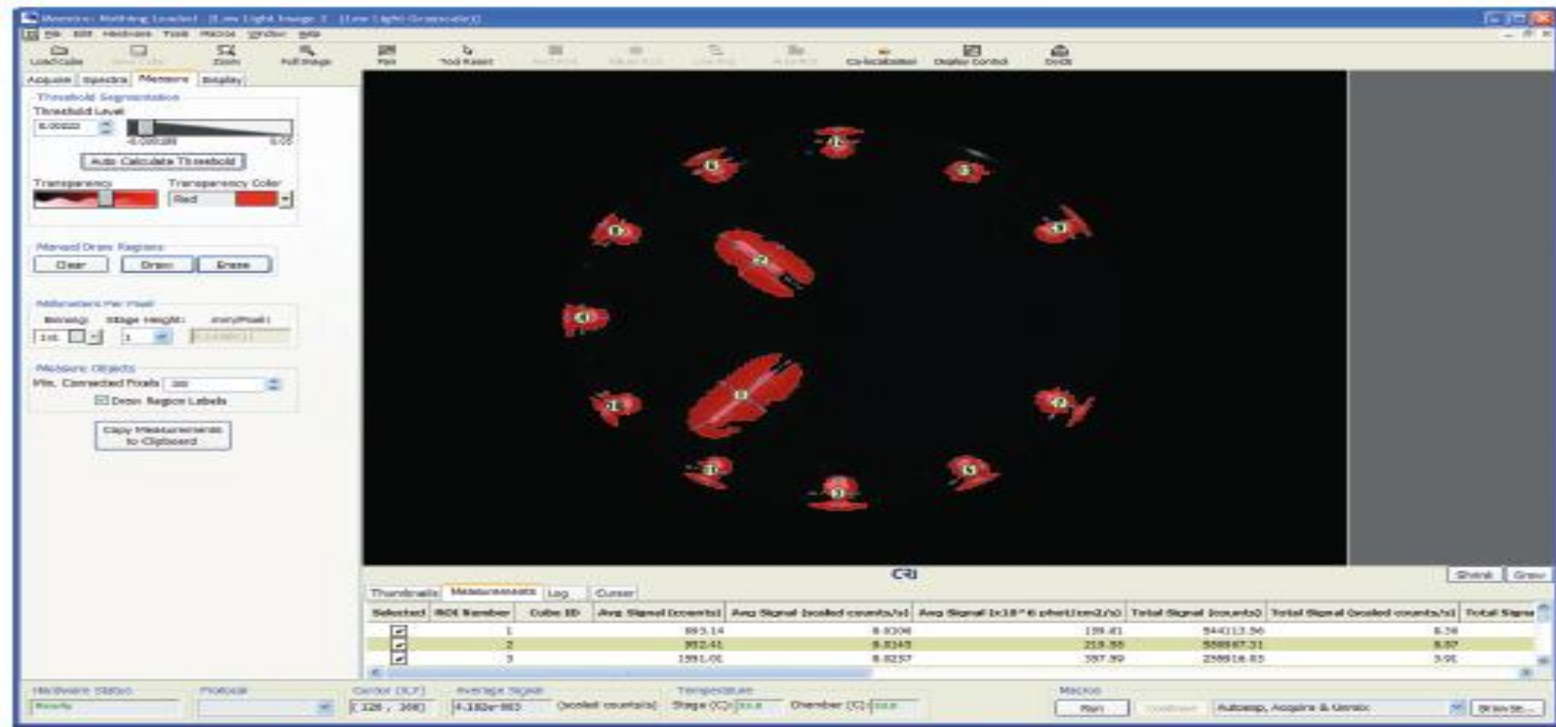




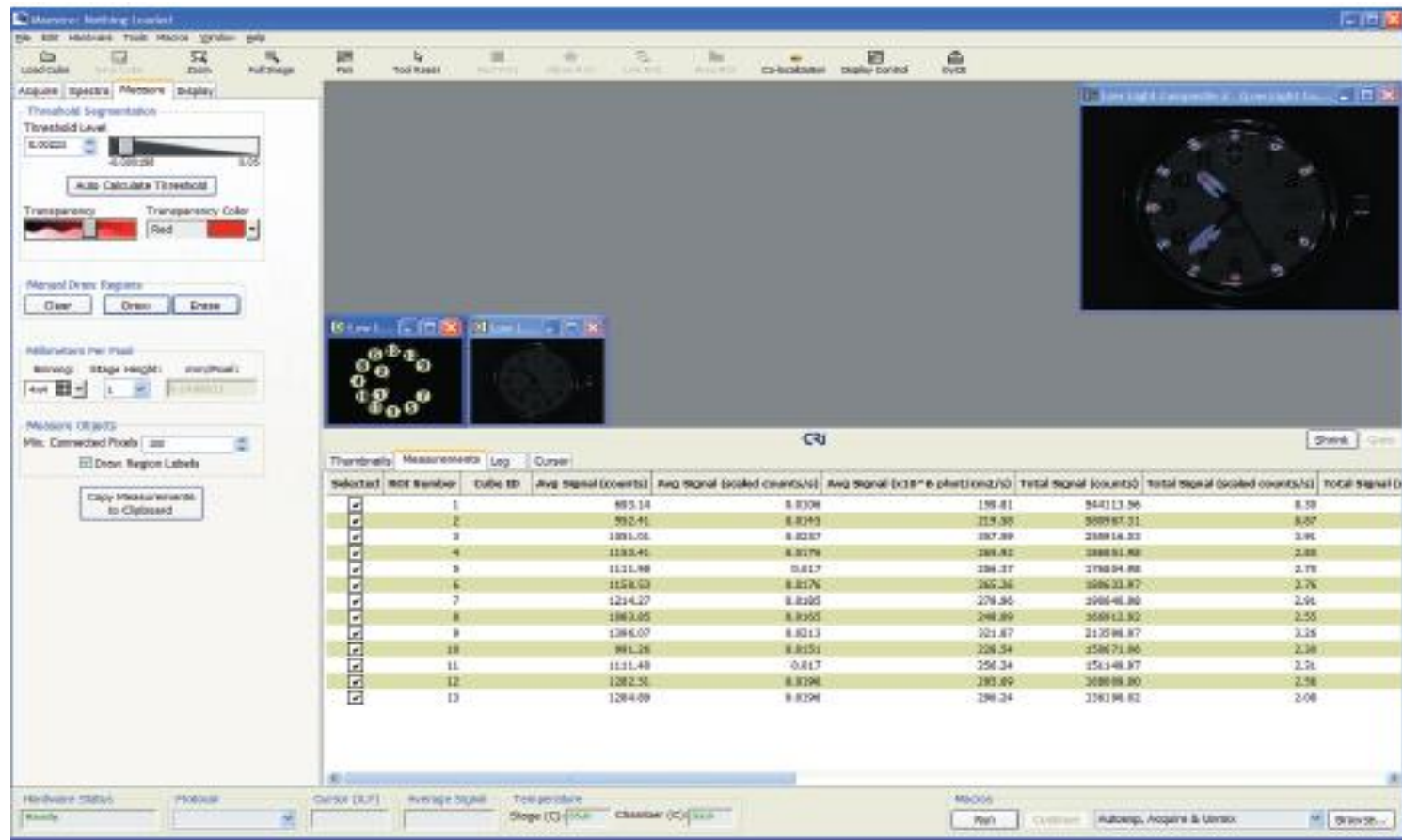
5. Chamber 문을 닫고 Acquire Image 버튼을 클릭함.

- Low light Image(lower left)
- Low light Pose(second from left)
- Low light Composite(upper right)

Quantifying Low-Light Images

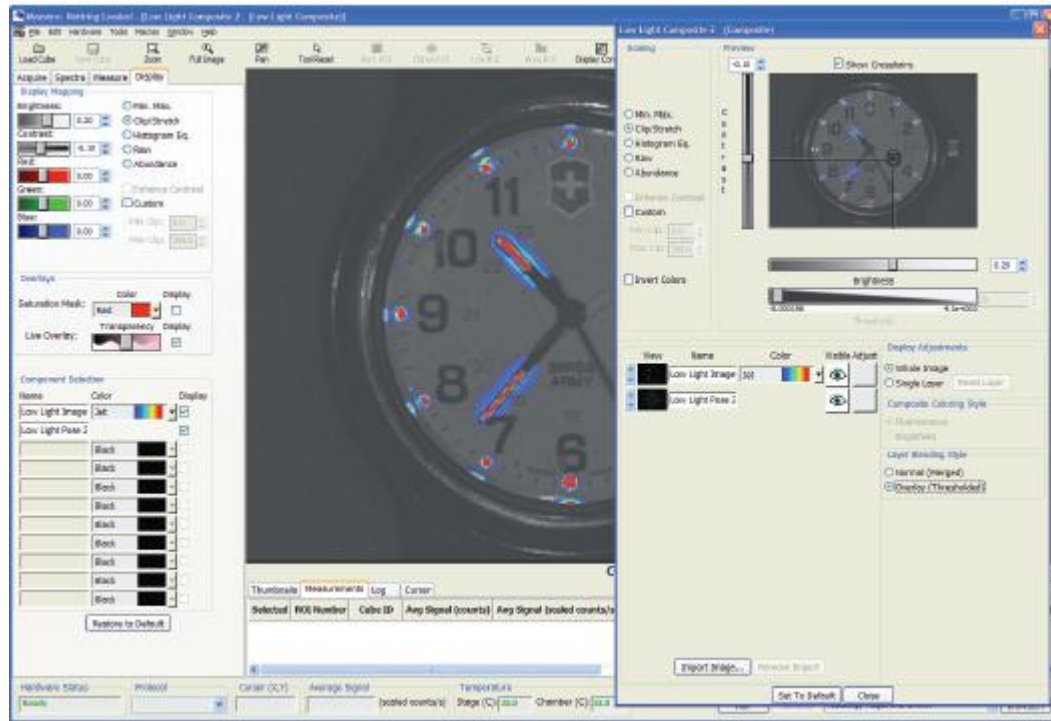


1. Measure Panel 로 바꾸고 Low Light Image window을 크게함.
2. Auto Calculate Threshold이나 직접 RIO을 정할수있음.



Measurement date tab 아래쪽에 있는 Grow 버튼을 클릭하면 손 쉽게 Average Signal, Total Signal 등등의 정보를 알수있음.

Enhancing Low-Light Images



1. Image을 크게 한 후, Display Control 버튼을 클릭함.
2. contrast와 Brightness을 조절해서 원하는 image의 질로 만듦

Saving Low-Light Images

- **Saving the Composite**
File>Save Composite
- **Saving Images as Unscaled DATA**
File>Save All Images(As unscaled Data)

Assigning Sample IDs and Notes

➤ To Assign a Sample ID to an Image Cube

Sample ID text box을 사용하여 cube 에 ID을 만들어 주는 방법.
Cube ID는 Measurement Page 아래쪽에 표시됨.

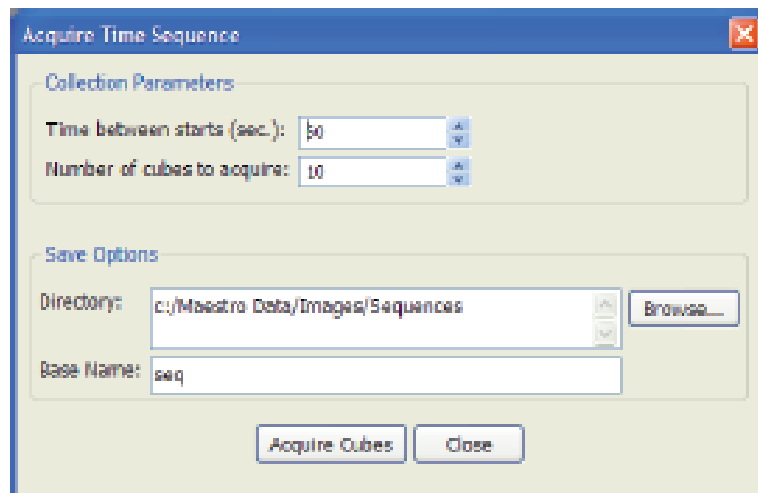
✓ To save Notes with an Image Cube

Notes text box을 이용하여, cube 에 note을 함.

Acquiring Timed Sequences of Image Cubes

원하는 Timed acquisition interval을 정할수있음

1. **Tools>Acquire Time Sequence**- Acquire Time Sequence dialog box 을 open 함.

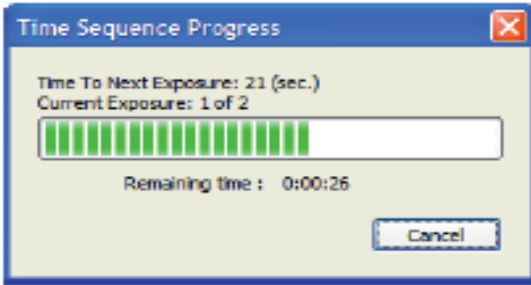


2. 원하는 시간을 정함- 예를 들어 60초로 정하면 15초 동안 첫 cube 을 찍고 45초 후에 다음 cube 을 찍게 됨.

3. number of cube을 정함.

4. **Browse** 버튼을 클릭해서 저장할 공간을 정함.

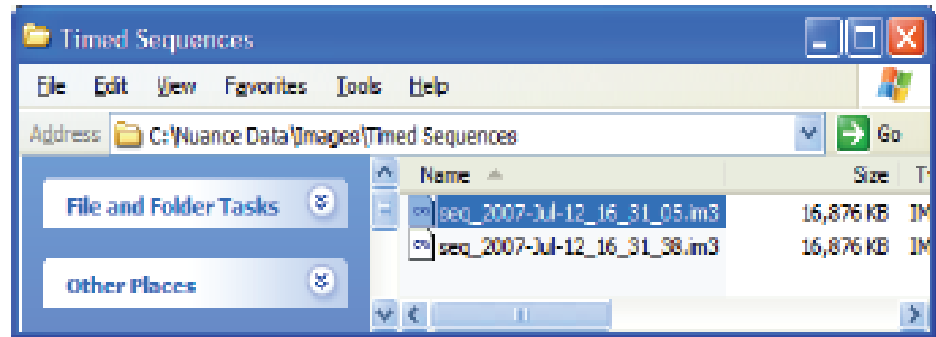
5. 모든 cube을 저장-**base filename**을 넣음.



6. **Acquire Cubes** 버튼을 클릭하여 acquisition sequence을 시작함.

7. 자동적으로 각각의 cube이 저장됨.

8. Acquisition sequence을 마친후, cubes 을 destination directory위치한 후, Nuance 에 서 open 할 수 있음.



Saving Images and Image Cubes

➤ To save an Image Cube

1. Save cube 버튼을 클릭하거나, **Select File>Save Cube** 사용하여 image 을 저장함. **Cube dialog box**을 선택하여, open함.
2. 저장하기 원하는 장소를 찾음.
3. **Save as type box**에서 cube type을 고르는 방법
 - Cri image cube으로 저장할 시- "**Image Cubes**"을 선택
 - Zipped file 로 저장할 시- "**Image Cubes(with lossless Compression)**"을 선택
 - Series of TIFF image로 저장할 시- "**TIFF Cubes**"을 선택
4. file name을 정하고 **save** 버튼을 클릭함.

➤ **To save images;**

1. **File > Save Image** 을 선택한 후 **Save Option**을 선택함.

- Save(As Displayed)
- Save All(As Displayed)
- Save image(As Un-scaled Data)
- Save image(As Un-scaled Data)

2. **dialog box**을 열어 저장할 공간을 찾음.

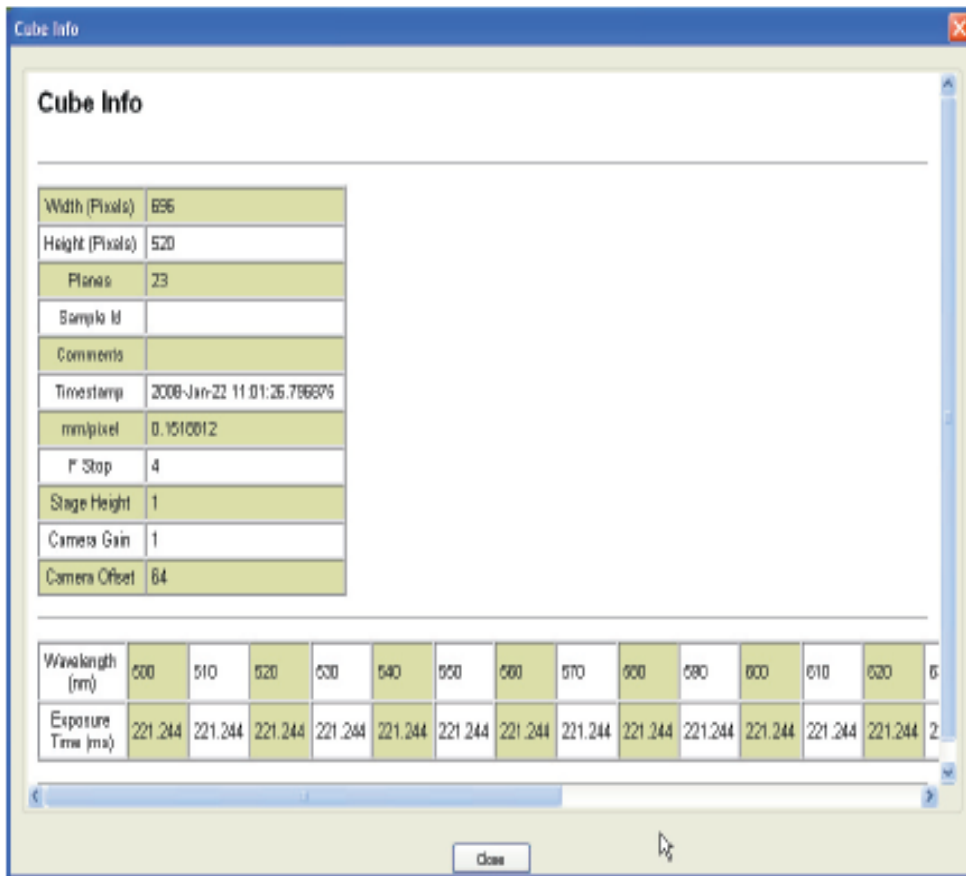
3. file명을 정하고 **save** 버튼을 클릭함.

➤ **Saving Image Cubes Automatically**

• To specify automatic save options;

1. **Hardware > Edit Hardware Settings**에서 Autosave tab을 클릭함.
2. **Autosave Image Cubes option** 을 선택함.
3. **Browse** 버튼을 클릭하여 특정한 default directory을 정함.
4. **Base Name field** 에 base name 을 type 함.
5. **Auto-naming options**에서 naming option 을 정함.
6. **Ok** 버튼을 클릭한 후 dialog box 을 닫음.

Viewing Cube Information



The screenshot shows a window titled 'Cube Info' with a scrollable area containing two tables. The first table lists general scan parameters, and the second table shows a grid of wavelength and exposure time data.

Cube Info	
Width (Pixels)	656
Height (Pixels)	520
Planes	23
Sample Id	
Comments	
Timestamp	2008-Jan-22 11:01:26.796976
mm/pixel	0.1510812
F Stop	4
Stage Height	1
Camera Gain	1
Camera Offset	64

Wavelength (nm)	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	6
Exposure Time (ms)	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	221.244	2

Cube window 에서 image 의 오른쪽을 클릭하여 **cube Info** 을 선택함.

Extracting an Image Plane from a Cube

➤ Cube에서 사용되었던 각각의 wavelength image들의 볼 수 있는 기능.

1. **cube** window에서 오늘쪽을 클릭하여, Extract Channel 을 선택함.
2. 원하는 Channel을 클릭하면, 선택된 wavelength의 monochrome image을 볼 수 있음.



Unmixing Spectral Images

- **Opening a Spectral Library**
- **Opening an Image Cube**
- **Computing and Unmixing Spectra Automatically**
- **Computing and Unmixing Spectra Manually**
- **Saving An Unmixed Result Set**
- **Working With A Saved Result sets**
- **Checking Your Spectral Library**
- **Subtracting Spectra from a Cube**
- **Using Line Profiles to Analyze Signals**
- **Comparing Multiple Images**
- **Processing a Batch of Cubes**

Opening a Spectral Library

➤ To Open a Spectral Library

1. **File>Open Spectral library.** Library의 filename 과 location을 선택한 후 open을 클릭함.

- 현재 library가 비어있을경우, 지금 선택한 library가 열림.
- 다른 library가 열어있을경우, Import Spectra From Library dialog box로 열림.

2.color palette이 서로 열린 spectra을 표시함.



My Computer에서 library(*.csl)file 을 더블클릭 하여 열수 있음.

Opening an Image Cube

1. Load Cube 버튼을 클릭하거나, **File>Open Cube**.
2. **Choose cube dialog box**에서 image cube을 저장위치를 찾음.
Cri의 format(.im3) image cube으로 열 경우, file을
더블 클릭함
 - TIFF Image cube로 열 경우, image의 folder 을 열어서
TIFF image을 더블클릭함.
3. Image gallery에 cube가 open됨.

Computing and Unmixing Spectra Automatically

➤ **To compute Spectra using real component analysis:**

1. cube을 열거나 acquire함. Spectra tab 을 선택하고 real component analysis[RCA}버튼을 클릭
2. RCA dialog box 오픈함
3. RCA의 computation image 보다 적은 부분을 선택할 시- Select Area 버튼을 클릭함. 마우스를 이용하여 사각형의 region 을 그림. Clear Area 버튼을 이용하여, 다른 user 들이 선택한 area의 clear 할 수 있음
4. 만약 initial guess of background signal 을 정하고 싶다면, **Select Area** 버튼을 클릭한 후 마우스의 pointer 을 이용하여 정함.



5. Find Component Images 버튼을 클릭함.

6. Unmixing에 사용 될, component image을 선택함.
 "Signal"- single 클릭 "background"-double 클릭

7. Find Spectra 버튼을 클릭함.

8. Computed spectra는 Gaussian curve와 비슷한 모양으로 형성됨. Weak signal 일 경우, baseline offset이 될 수 있으므로, **Fit Offset** 을 선택하여 **Find Spectra** 버튼을 다시 클릭함.

9. Spectrum의 이름이나 color 등의 computed Spectra 에서 바꿀수있음

10. Transfer to Library 을 클릭하여, Spectra를 main spectral library로 옮김.

11. RCA dialog box을 close 함.

12. Unmix을 하고 싶은 Spectra을 확인한후, unmix 버튼을 클릭함.
Transfer to library, Unmix and close 을 버튼을 클릭하면,
이 가능을을 한번에 실행할 수 있음.

13. 이 sperctral library를 다시 쓰고 싶을 경우, save함

Computing and Unmixing Spectra Manually

➤ Sampling Spectra from a Cube

✓To sample Spectra

1. Open 하거나 acquire cube을 하고, **Spectra tab**을 선택함.
2. Draw 버튼을 Sampled Spectrum 을 원하는 곳에 위치한 후 클릭함.
3. cube 을 하고 싶은부분에 선을 그리고 클릭함 . 마우스 버튼을 놓으면 select column 에서 check-mark 가 나옴.
4. 다른 모형으로 ROI을 선택하고 싶을 시, default line sampling tool 을 사용함.
5. 각각의 spectrum 에 name 을 정함.
6. 정해진 spectrum의 색상을 바꿀시,color menu 에서 정함.



✓**To hide a signal (e.g., background) in an unmixed image**

Unmix 된 signal 중 원치 않는 부분은 black으로 바꿈

✓**To clear the spectral library**

Clear All 버튼을 클릭함. Library의 spectra 와 spectral curve을 모두 clear 하게 됨.

✓**To restore default or saved colors**

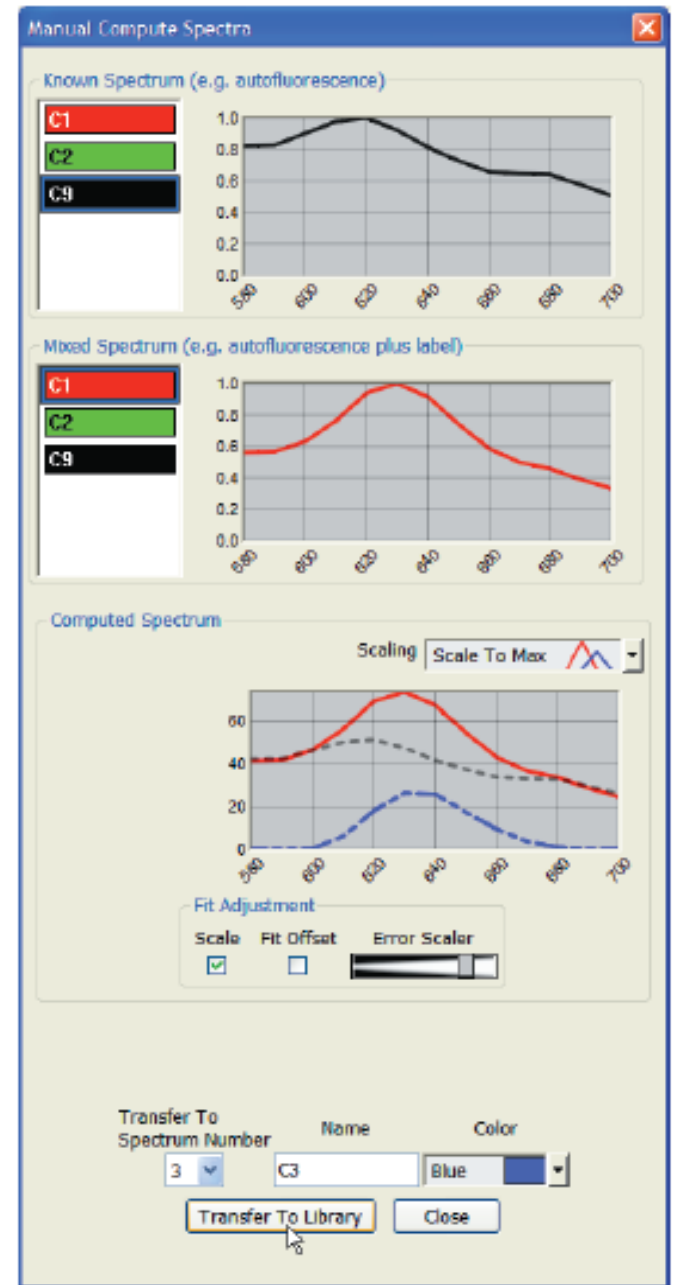
Restore Defaults 버튼을 클릭함

✓**To add notes to the current spectral library**

Notes Box에 메모함. Spectral library가 저장될때 노트와 함께 저장됨

➤ Manually Computing Spectra

1. Cube 을 open 하거나 acquire하고 Spectra tab 을 선택함.
2. Spectra Library을 build 하거나 loading 한 후, Manual Compute Spectra 버튼을 클릭함
3. Known Spectrum 그룹에서 Known Spectrum 을 선택(autofluorescence). multi known spectra 은 control key을 눌린 채, 선택함.
4. Mixed Spectrum 그룹에서 Known spectra와 다른 spectrum들을 선택함.
5. computed Spectrum이 화면 밑에 정해진 색상을 표시됨.



6. "Fine Tune"이 필요하면 Scale function을 사용함.
7. 이름,row, 색상을 정하고 Transfer to Library 버튼을 클릭함.
8. 이 방법을 다른 mixed spectra에 도 적용함.
9. Cube 을 unmix 할 준비가 되었으면 dialog box 을 받고, Spectra tab에서 Unmix 버튼을 클릭함.
10. new spectral library을 저장함.

➤ Error Scaling When Manually Computing Spectra

정확한 spectrum 을 얻기 위해서는 mixed spectrum에서 정량의 autofluorescence 가 차감되어야 함. Nuance의 software는 autofluorescence을 자동으로 차감시킴.

1. Computed Spectrum group 중 "Scale To Max"을 scaling drop box 에서 선택함.- 가장 좋은 spectra representation을 볼 수 있음.
2. Mixed spectrum과 computed spectrum 각각의 색상으로 나타남. 점선으로 autofluorescence의 부분이 표시됨.
3. Scaling box 에 체크를 하고 Error Scaler을 오른쪽으로 increasing을 하면서 (혹 왼쪽으로 줄이면서) Known과 mixed spectra의 겹치는 곳이 가장 작은 위치를 선택함
4. Transfer to Library 버튼을 클릭함.
5. Library에 add가 끝나후, 저장함 .

The screenshot displays the 'Manual Compute Spectra' window with three main sections:

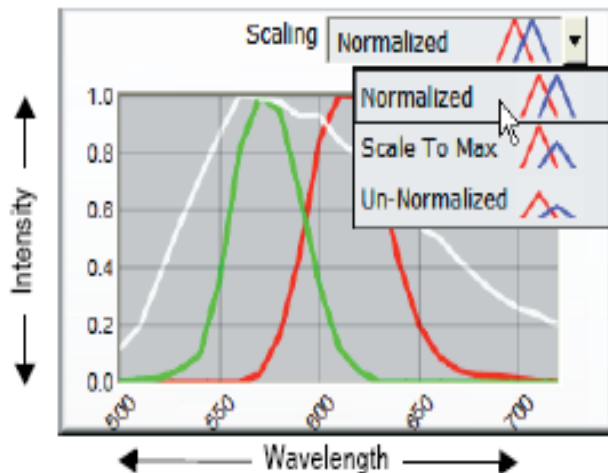
- Known Spectrum (e.g. autofluorescence):** Shows a black curve on a graph with a y-axis from 0.0 to 1.0 and an x-axis from 580 to 700. A legend on the left shows C1 (red), C2 (green), and C3 (black).
- Mixed Spectrum (e.g. autofluorescence plus label):** Shows a red curve on a similar graph. The legend shows C1 (red), C2 (green), and C3 (black).
- Computed Spectrum:** Shows a red curve (Mixed Spectrum) and a blue dashed curve (Computed Spectrum) on a graph with a y-axis from 0 to 60 and an x-axis from 580 to 700. A 'Scaling' dropdown is set to 'Scale To Max'. Below the graph is a 'Fit Adjustment' section with 'Scale' checked, 'Fit Offset' unchecked, and an 'Error Scaler' slider.

At the bottom, there is a 'Transfer To Spectrum Number' dropdown set to '3', a 'Name' field containing 'C3', and a 'Color' dropdown set to 'Blue'. 'Transfer To Library' and 'Close' buttons are also visible.

➤ Using Fit Offset

Weak signals이 baseline offset 일 경우, 원하는 unmix results 가 나오 않음- Manual compute Spectra dialog box 에서 Fit Offset을 선택하여 unmix result을 향상시킴. Computed spectra은 simple Gaussian graph여야함. Spectrum의 번호 이름 그리고 색상을 선택한후 Transfer to Library 버튼을 클릭함.

➤ Changing the spectral Graph Scale



1. **Scaling drop box** 에서 옵션을 선택함.
"Normalized" "Scale to Max" or "Un-normalized"
2. 마우스를 움직이면 White Curve의 변화를 관찰할 수 있음

Saving An Unmixed Result Set

➤ To save the Current Unmixed result set

1. **File>Save Result Set**

2. **Choose Results set** dialog box을 open 함.

3. 새로운 이름을 정하고 **Save** 버튼을 클릭함. (.umx) file 로 저장됨.

Working With Saved Result Sets

➤ To open a result set

1. **File > Open Result set. Choose result set** dialog box 에서 “**result_set.umx**”file를 open함.
2. Unmixed Image가 image gallery에 open 됨.
3. 만약 자동으로 cube이 load 되지 않을 시, Import the cube into the result set 을 이용하여 open함.

➤ To import a cube into a result set

1. RGB image 에서 마우스의 오른쪽을 클릭하여, import Cube 을 선택함.
2. Choose Cube dialog box을 open 함.
3. import 하고 싶은 cube을 선택한후 open를 클릭.

Checking Your Spectral Library

➤ Viewing Error Images

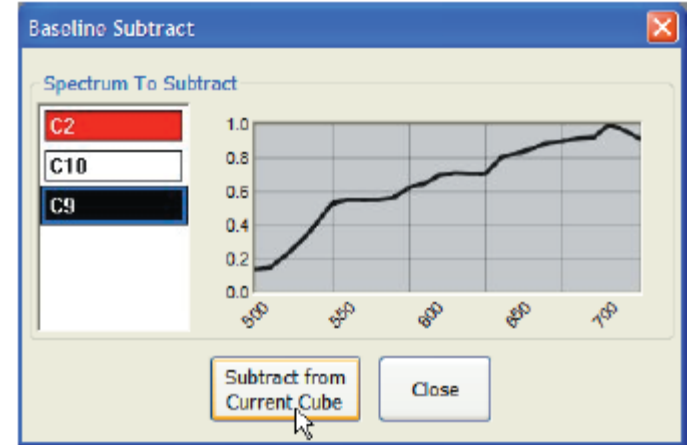
현재 사용되고 있는 library의 spectra 을 토대로 cube의 spectral signal 을 unmix함. Signal중 현재 사용되지 않은 component의 images을 자동으로 저장함. Cube을 다시 만들고 싶을 때 사용하기 위해 Error image는 모든 signal 의 포함하고 있음.

Unmixing 한후, Tool>Show Error Images을 하면 두 개의 image 가 나타남(Error Cube와 Error Magnitude). Error cube은 spectral variation의 error을 가지고 있고, Error magnitude는 error energy을 가지고 있음. 이 image 들은 bright signal이 아닌 " Background noise 을 가지고 있어야 함.

Subtracting Spectra from a Cube

1. Tool>Baseline Subtract

2. Dialog box 에 현재의 spectral library의 spectra display됨.
3. 빼고 싶은 spectra을 선택하고,
Subtract from Current Cube 버튼을 클릭함.
4. Cube 의 filename "_subt"으로 바꿈



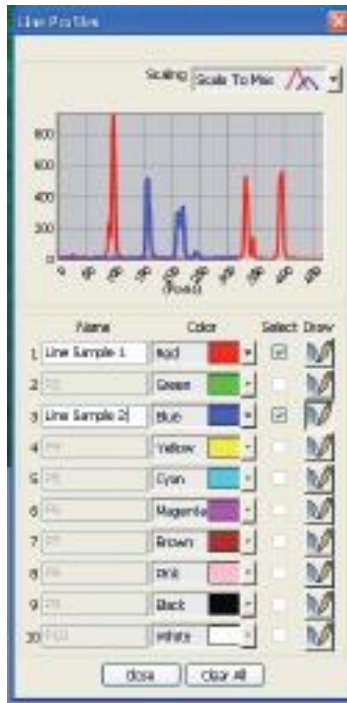
Using Line Profiles to Analyze Signals


➤ To use the Line Profiles tool

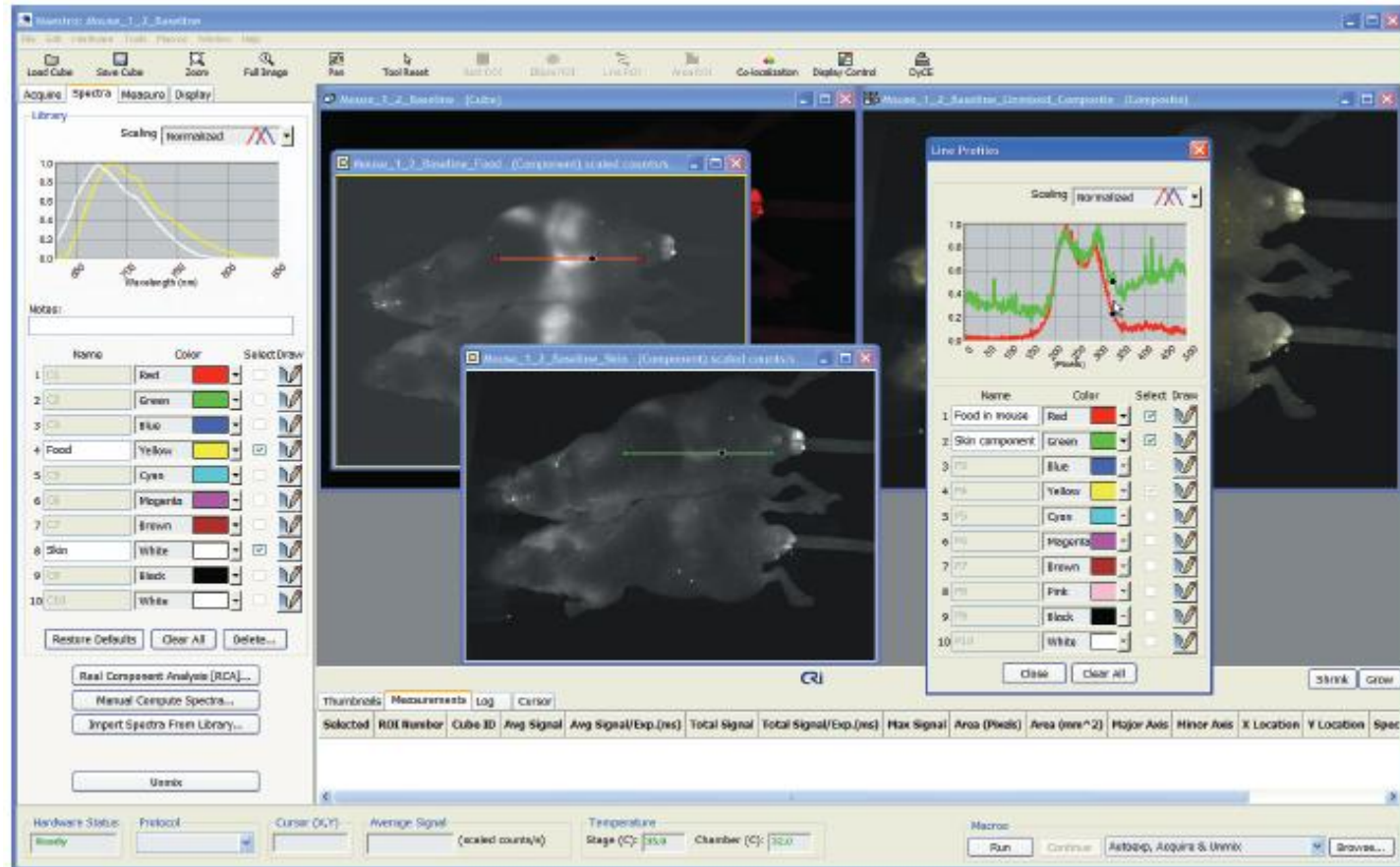
1. monochrome image을 Image Galley 에서 오픈함

2. **Tools>Line Profiles** Line Profiles dialog box 을 오픈함.

- 10가지 색상으로 10가지 profile lines을 그릴수 있음
- Spectral Graph에 profile line의 색상에 따라 나타남]
- "Normalized "or "Scale to Max"로 바꿀 수 있음
- Clear All 버튼을 클릭하면, 모든 선과 spectral Graph가 clear 됨.



3. Draw  버튼을 클릭하여 마우스를 이용하여 원하는 분야의 라인을 그림.



Line Profiles drawn on component images

➤ Working with Line Profiles

line profile을 그린 후, **copy, clone, move and delete** line을 마우스의 오른쪽 클릭을 사용하여 할수있음.

Comparing Multiple Images

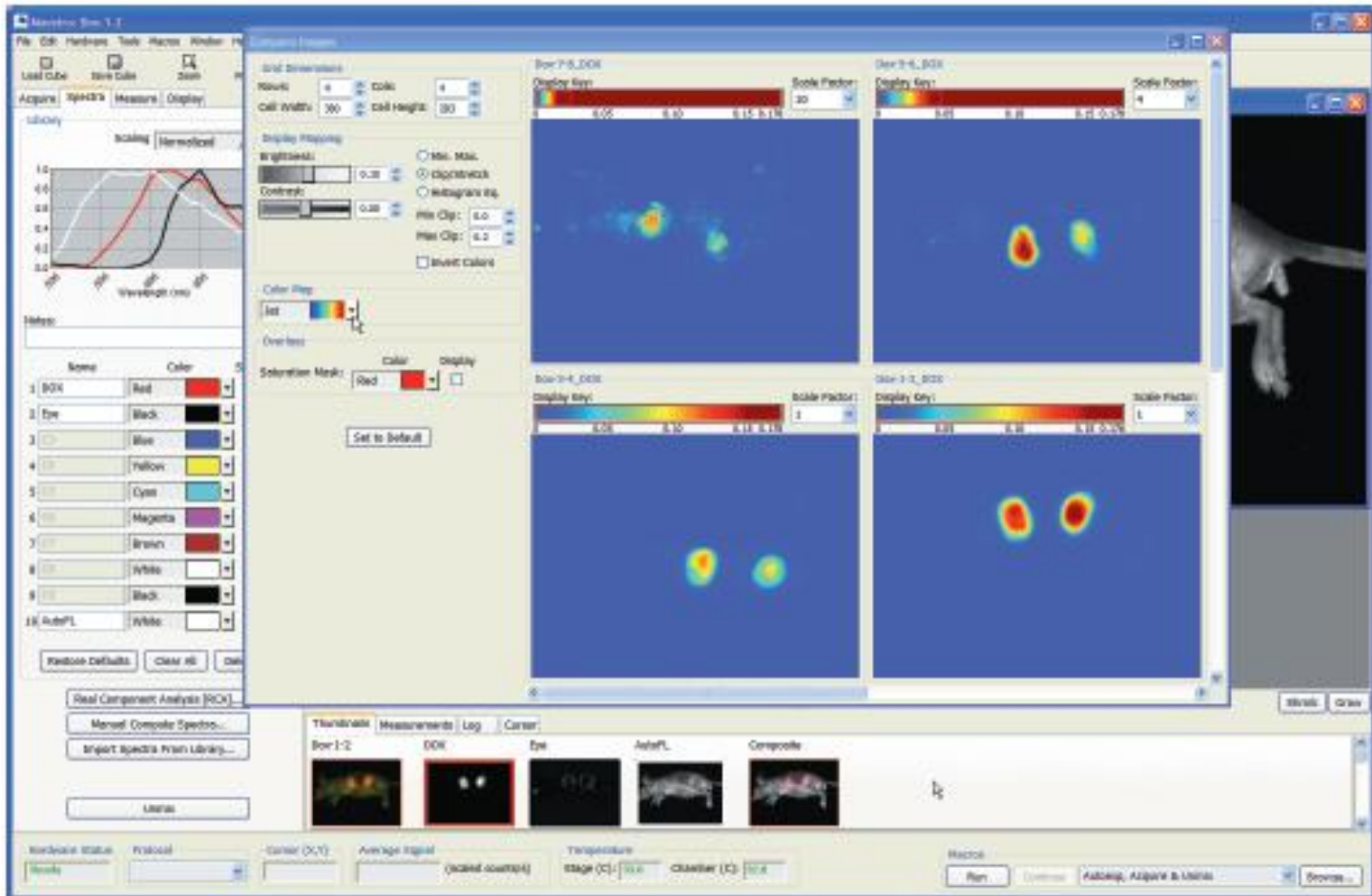
The screenshot displays the MicroManager software interface, specifically the 'Compare Images' window. The interface is divided into several panels:

- Left Panel:** Contains a 'Library' section with a 'Scaling' graph showing two curves (red and black) on a plot of intensity vs. wavelength (nm). Below the graph is a 'Notes' field and a color selection table with 10 entries (Red, Black, Blue, Yellow, Cyan, Magenta, Brown, White, Black, White).
- Top-Left Panel:** 'Grid Dimensions' section with fields for Rows (4), Cell Width (380), and Cell Height (283). It also includes 'Display Mapping' options for Gamma, Brightness, Contrast, Min/Max Dips, and Invert colors.
- Top-Right Panel:** 'Color Map' section with a 'Gray' color map and 'Overlays' section with 'Substrate Mask' set to Red.
- Center Panel:** A 2x2 grid of image windows, each titled 'Diss-1-4_0000'. The top-left window shows a dark image with two bright spots. The top-right window shows a similar image with a different processing. The bottom-left window shows the same image with a different processing. The bottom-right window shows the same image with a different processing. A red arrow points from the 'Diss-1-4_0000' window in the bottom-left of the grid to the 'Diss-1-4_0000' window in the bottom-left of the 'Thumbnail' section.
- Bottom Panel:** 'Thumbnail' section with tabs for 'Thumbnail', 'Measurements', 'Log', and 'Camera'. It shows five thumbnails: 'Diss-1-4', 'Diss-1-4_0000' (highlighted with a red border), 'Eye', 'AutoFL', and 'Camera'. Below the thumbnails are fields for 'Hardware Status' (Ready), 'Focal' (set to a value), 'Cursor (X,Y)', 'Average signal' (scaled counts/s), 'Temperature Stage (C)' (set to 30.0), and 'Temperature Chamber (C)' (set to 30.0). The 'Macros' section at the bottom right includes buttons for 'Run', 'Continue', 'Abort', 'Acquire & Upload', and 'Device...'

➤ To compare multiple Images

1. Thumbnails list에 unmix cube들을 open 함.
2. **Tools>Compare Images**- Compare Images dialog box.
3. Image Gallery나 Thumbnails list 에서 grayscale component image 을 drag 하여 옮김.
4. 16 images까지 비교 가능. Grid Dimensions group을 이용.
5. 모든 image들의 scaled는 가장 밝은것부터 display 됨.
*앞쪽 페이지에서 볼 수 있듯, 왼쪽 가장 위 사진은 autofluorescence 이면서 가장 밝은 signal인 786 counts이 Display key 에 표시됨.

6. 비교하고자 하는 image가 너무 어둡거나 밝으면 Scale Factor 을 이용함.



➤ **To modify Display settings**

▪ **Display Mapping** 을 이용하여, 모든 image의 brightness와 contrast 을 한번에 조절할 수 있음.

• **Color Map drop down box** 을 이용하여 pseudo color로 change할 수 있음. **Saturation Mask**로 saturated pixel 을 조정할 수 있음.

➤ **To zoom and pan images**

• 마우스에 오른쪽 버튼을 클릭하여 **zoom**이나 **pan** 을 선택함

• **Zoom To Full Image** 버튼을 클릭하여 원래의 Full Image 로 돌아갈 수 있음.

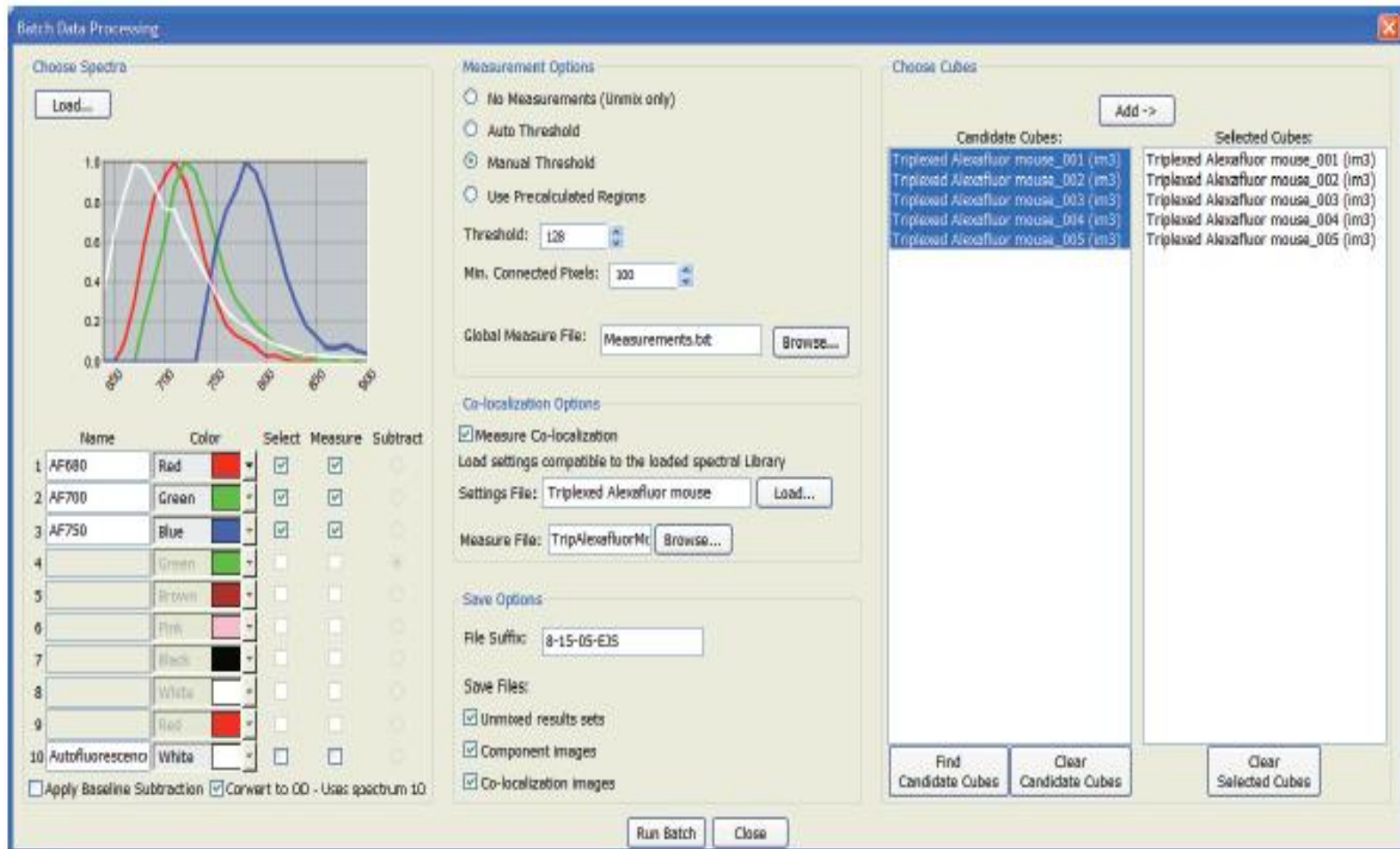
➤ **To save displayed images**

• **Save Image As Displayed**- Choose RGB file(TIF 나 JPG format) 으로 저장함.

• **Copy Whole Image To Clipboard**- 전체 Image을 clipboard로 copy 하여 다른 프로그램에 paste 함.

• **Copy Displayed Image To Clipboard**- 현재 보이는 image을 copy 하여 다른 프로그램에 paste 함

Batch Data Processing



1. **Tool>Batch** . Batch Data Processing dialog box 을 open함.

2. 이미 Spectral library가 열어있을경우, color library 로 display 됨.
Lord 버튼을 클릭하여, 새로운 spectra를 open 할 수 있음.

3. **Select column** 에 **check box** 을 사용하여 spectra를 unmixing함.
Batching 을 하는 동안 Unmix된 component image을 **measure column**
에 **check box**을 사용하여 measure 할 수 있음 .

4. **Apply Baseline Subtraction check box**을 클릭하여 Baseline
Subtraction feature 을 사용할수있음

5. **Convert to OD box** 체크하면 모든 cube 을 Optical Density로 바꿈.

6. Measurement Options

- No Measurement(unmixed only)-선택된 cube 만 unmixed
- Auto Threshold- 이 옵션을 선택한후, Min. Connected Pixels parameter와 적어도 하나이상의 image component 정함 .
- Manual Threshold- 이 옵션을 선택하면, Threshold 와 Min. Connected Pixels 을 정해야함. 그리고 적어도 하나이상의 image component 을 정함.
- Use Recalculated Regions –unmix된 결과에 사용하고 싶은 Regions(.roi) file 혹 measurement(.Txt) file을 정함.

7. Co-localization detection을 하고싶을때, Measurement Co-localization을 선택함.

a. Load을 클릭하여 co-localization settings(.col) 파일을 로드 함

b. Measure file을 찾음

8. Save option에서 파일명과 파일종류, 저장위치를 정함.

- File Suffix- 파일명에 suffix을 넣을수있음.

- Save file

- ✓ Unmixed result sets 은 result set(.umx) file로 저장됨

- ✓ Component images 은 date file(.tif)로 따로 저장됨

- ✓ Co-localization은 각각의 cube (.Jpg)로 저장됨

9. Run Batch 버튼을 클릭함

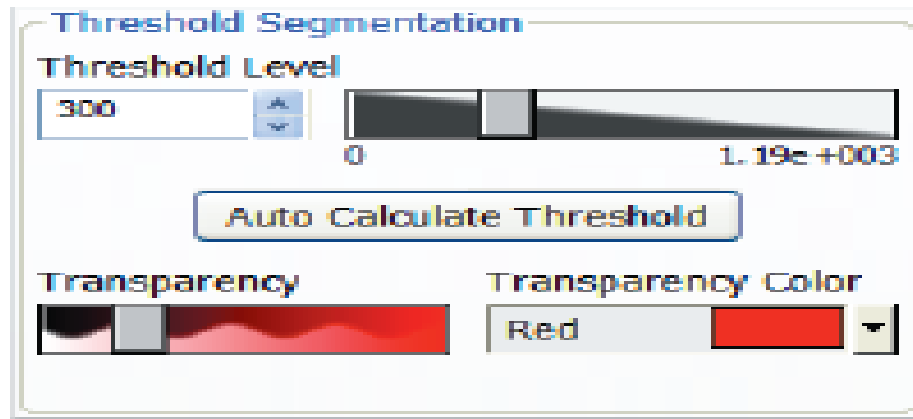
Quantifying Results

- **Measuring Regions**
- **Ignoring Smaller Regions**
- **Adjusting Region Transparency and Color**
- **Understanding Region Measurements**

Measuring Regions

➤ Finding Regions Automatically using Threshold Segmentation

1. measured component image을 선택함.
2. Threshold Segmentation에서 Auto Calculate Threshold 버튼을 클릭함.
3. Specified threshold 아래 Intensity value는 무시됨.
만약에 auto calculated threshold level의 결과가 만족스럽지 못할 경우, Threshold Level 에 새로운 value을 대입함.





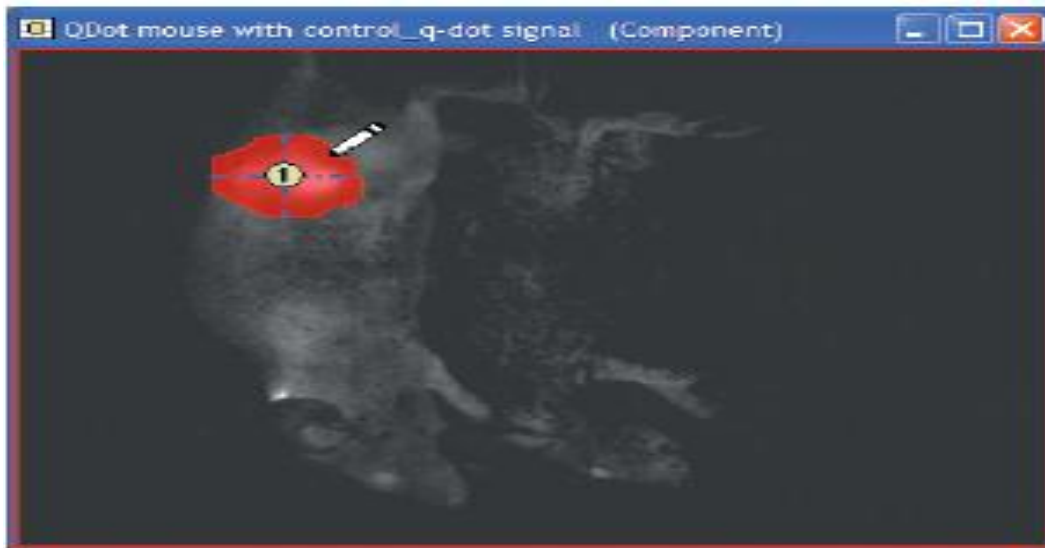
4. Measurement region이 너무 작거나 너무 많으면, Threshold Level 혹은 Minimum Connected pixels value을 조정함

5. Transparency region 과 색상을 조정/바꿀 수 있음.

➤ Manually Drawing and Modifying Regions

✓ To draw a region

1. Measure panel에서 Draw 버튼을 클릭함.
2. Draw tool shape 선택하기- 마우스에서 오른쪽을 클릭하거나 Toolbar에서 pop-up menu에서 rectangle- ellipse-line- or area-ROI 을 선택함
3. 마우스 포인터를 이용하여 새로운 region을 draw함
4. 각각의 region 는 ROI 번호를 가지게 되며, measurement page 에 list 됨



✓ **To Erase part of a region**

1. Erase 버튼을 클릭함.
2. Erase tool shape 을 선택함- 마우스에서 오른쪽을 클릭하거나 Toolbar에서 pop-up menu에서 rectangle- ellipse-line- or area-ROI 을 선택함.
3. 마우스 포인터를 이용하여 pixel 을 제거함.

✓ **To clear all regions**

Clear 버튼을 클릭하면 모든 measurement region이 지워짐.

✓ **To move or delete a region**

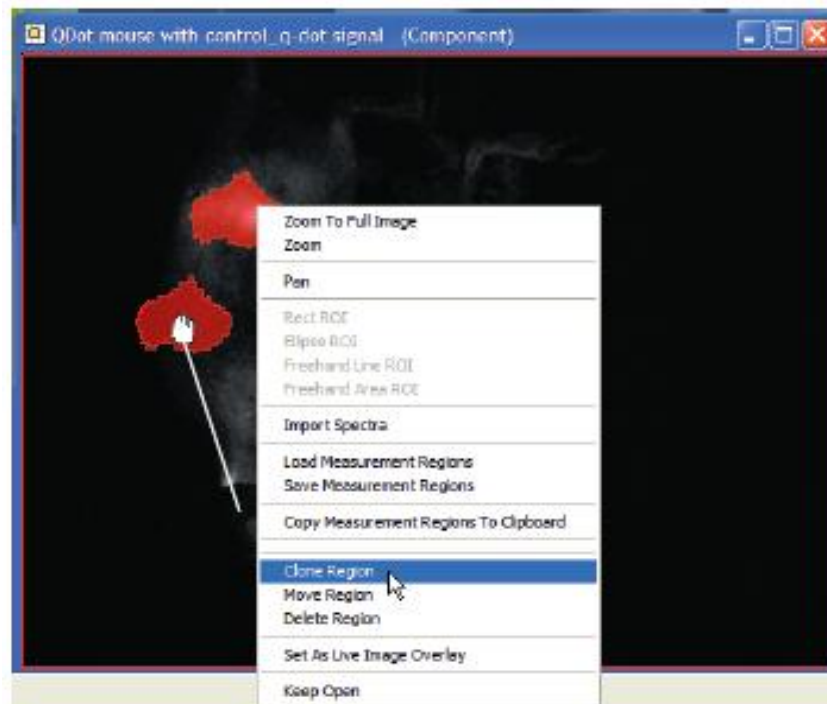
move 혹은 delete 하고 싶은 부분에서 마우스의 오른쪽 클릭하고 pop-up menu 에서 선택함.

➤ Cloning Regions

이 기능은 바로 control region과 fluorephore region의 image 을 비교 할 수 있게 함.

✓ To clone a region

1. 오른쪽버튼을 클릭하여 Clone region 을 선택함.
2. 원하는 부분으로 clone region을 옮김.



➤ **Dragging a Copy of a Region to Another Image**

copy된 region 을 image 에서 다른 image로 옮길 수 있는 기능.

✓**To drag a region to another image**

1. copy 하고자 하는 region 을 클릭함. 마우스버튼을 holding 한 채, new image 로 drag 함.
2. 마우스 버튼을 release 함.

➤ **Copying all Regions to the Clipboard**

1. 마우스의 오른쪽 을 클릭하여, Copy Measurement Regions to Clipboard을 선택함.
2. paste 하고 싶은 부분에서 마우스의 오른쪽을 클릭하여, Paste Measurement regions From Clipboard 을 선택함.
3. 모든 measurement regions이 현재의 image로 paste 됨.

➤ **Saving and Loading Regions**

measurement region 을 저장하면, 손쉽게 다른 image에 load 할 수 있음.

✓ **To save a region**

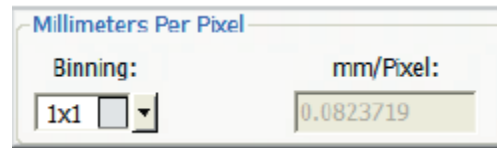
1. 마우스의 오른쪽을 클릭하여(image 안에서), **Save Measurement Regions** 을 선택함.
2. **choose Measurement Regions** dialog box에서 name을 넣고 Save 버튼을 클릭함

➤ **To load a region to an image**

- 1.마우스의 오른쪽을 클릭하여(image 안에서), **Load Measurement Regions** 을 선택함.
2. 저장되었던 위치에 loading 됨. 마우스의 오른쪽을 클릭하여 **Move Region** 을 선택하여 옮길 수 있음.

➤ Obtaining Accurate Measurement Data

Nuance software는 binning 에 선택되어있는 각각의 region area을 pixel 과 mm로 **Measure panel**에 계산값을 표시함.



✓ To Change the binning

binning drop box에서 부터 설정함.

Ignoring Smaller Regions

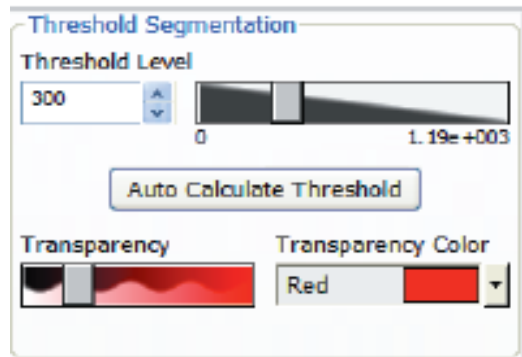
Measure panel 에 있는 Measure objects 그룹은 pixel 에 따라서 region의 size 가 정해짐. Min. Connected pixels 보다 큰 부분만 고려됨.



➤ Hiding Region Labels

Draw region label을 클릭마크로 label의 유무를 결정할 수 있음

Adjusting Region Transparency and Color



1. Measure panel에서 **Transparency slider**로 image 뒤에 있는 다른 image 을 block 하는 양을 조절함.
2. 만약 transparent의 색상을 바꾸고 싶으면 **Transparency Color drop down box**에서 선택함.

Understanding Region Measurements

Selected	ROI Number	Cube ID	Avg Signal	Avg Signal/Exp.(ms)	Total Signal	Total Signal/Exp.(ms)	Max Signal	Area (Pbvals)	Area (mm ²)	Major Axis	Minor Axis
<input checked="" type="checkbox"/>	1		921.63	Unknown Exp.	427635.88	Unknown Exp.	1185.74	464.00	3.15	24.07	2.4
<input checked="" type="checkbox"/>	2		606.16	Unknown Exp.	248526.50	Unknown Exp.	1136.08	410.00	2.78	30.78	2.4
<input checked="" type="checkbox"/>	3		563.34	Unknown Exp.	171255.44	Unknown Exp.	1020.91	304.00	2.06	24.97	1.1

- **Selected**- 어떤 measurement regions이 display 되는지를 나타냄. Check box을 clear 하면 image 에서 그 region이 없어짐.
- **ROI Number**- 각각의 measurement region에 해당하는 번호가 정해진 region 중간에 표시됨
- **Cube ID**-cube을 acquire할 때 Fluorescence panel에 정해진 sample ID.
- **Average Signal**- pixel 의 평균값
- **Standard Deviation**- signal의 변화량을 표시함.
- **Total Signal**-모든 pixel의 value 의 총량.
- **Max Signal**-Maximum pixel value.

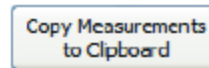
- **Area(Pixels)**-region 안에 있는 number of pixel.
- **Area(μm^2)**- region 의 사이즈.
- **Major Axis**- bounding box 에서 가장 짧은 세로의 길이.
- **Minor Axis**-bounding box 에서 가장 폭이 작은 가로 길이.
- **X Location**- x 축의 중심.
- **Y Location**-Y 축의 중심.
- **Spectrum ID**- unmix 할 때 사용했던 spectrum ID.
- **Cube Time Stamp**- cube이 만들어진 시간을 나타냄.

➤ Hiding Measurement Columns

Measurement row에서 마우스의 오른쪽을 클릭함. Pop-up menu가 모든 column에 check 마크가 되어서 display되고, check 마크를 clear 함으로써 column을 숨길수있음.

➤ Copying Measurement Data to the Clipboard

1. Copy하고 싶은 region이 measurements data page 에 있는지 확인.
2. Measure panel에서 **Copy Measurement to Clipboard**을 클릭함.



3. 다른 프로그램으로 switch 할 수 있음

➤ Saving measurement Data as a Text File

1. Save 하고 싶은 region이 measurements data page 에 있는지 확인.
2. **File>Save Measurements- Choose Measurement File** 을 선택함.
3. location을 선택한 후 text file 명을 정함. **Save** 버튼을 클릭하여 저장함.

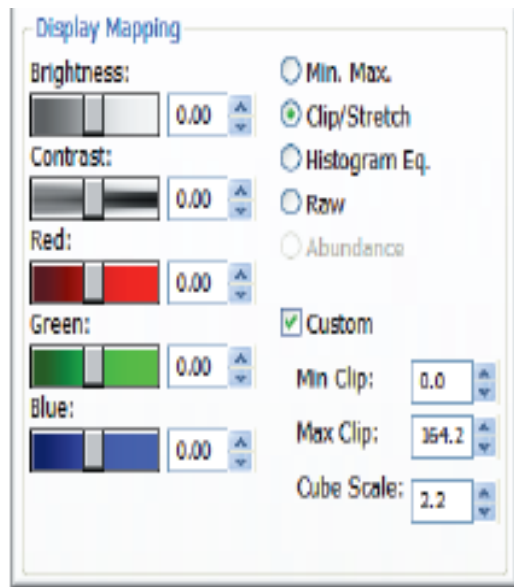
➤ Appending Measurement Data

1. 추가해 저장하고 싶은 region이 measurements data page 에 있는지 확인.
2. **File>Append Measurements- Choose Measurement File** dialog box을 open 함.
3. file을 선택한 후 저장함.

Customizing Spectral Displays

- **Adjusting Brightness and Contrast Levels**
- **Applying Overlays**
- **Adjusting a Cube's RGB Mapping**
- **Changing Components in composite Image**
- **Advanced Display Controls**
- **Displaying the Intensity Legend**

Adjusting Brightness and Contrast Levels



Display panel 안에 있는 display Mapping 으로 brightness와 contrast levels 을 조절 할 수 있음.

✓5가지 slider로 조정할 수 있음.

Brightness ,Contrast, Red, Green
Blue

✓ **Min.Max**

Minimum value(0)과 maximum value(255) 사이의 linearly interpolate한 지점. 어두운 signal을 stretch 시켜 보이게 함.

✓ **Clip/Stretch**

낮게는 0.01% pixel에 0에서 부터 높게는 0.01% 225 value 까지 linearly interpolate 하는 지점. Display가 뺄어지는것을 방지.

✓ **Histogram Eq.**

각각의 bin에 비슷한 pixel이 들어가도록 하는 기능. 어둡거나 밝은 signal에 전체적인 dynamic range의 display을 줌.

✓ **Raw**

no scaling to the data 옵션.

✓ **Abundance**

image 상 가장 밝은 상태를 얻을 수 있음.

✓ **Enhance Contrast**

모니터에 보이는 image의 brightness 와 contrast을 조절.

✓ **Custom**

Applying Overlays

➤ Saturation Mask

Saturated pixels는 unmixing과 quantitation result의 정확성을 떨어트림. Saturation이 일어나면 **Display panel**에서 **Saturation Mask** 을 이용하여 줄이거나 없애 수 있는 기능.

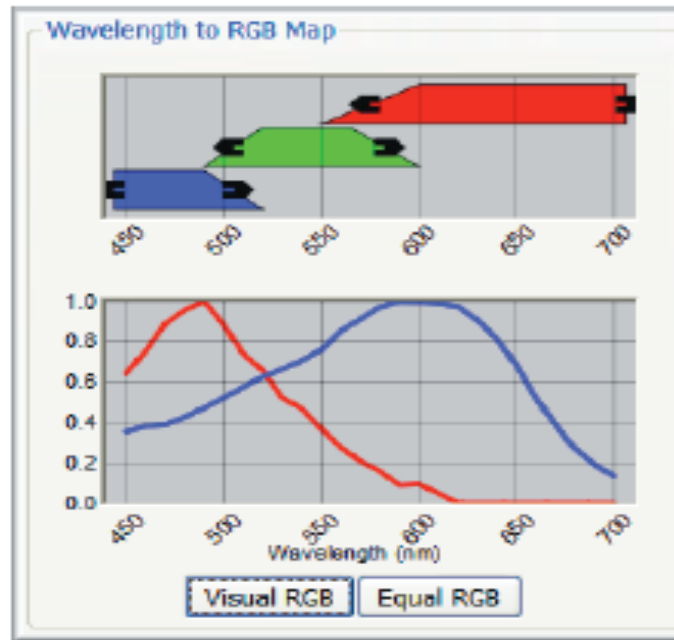
✓To Apply a Saturation Mask

1. Saturation mask을 적용하고싶은 image 을 선택함.
2. saturated pixel 색상과 match 되는 색상을 선택함.
3. Display check box을 클릭하여, saturation mask을 apply함.

✓Live Overlay

Live Overlay 옵션은 전의 image 와 현재 live view을 겹쳐서 저장할 수 있는 기능. Overlay하고 싶은 image을 오픈 하고 마우스의 오른쪽을 클릭하여 Set As live Image Overlay을 선택함. Display Panel에서 Display을 선택하여, image 을 없애거나 보이게 할 수 있음. Transparency slider을 이용하여 overlay의 Transparency을 조절할 수 있음.

Adjusting a Cube's RGB Mapping



Wavelength to RGB Map

Computer는 빨강색, 녹색 그리고 파랑 색의 intensities 로 색상을 나타냄. 더 많은 색상 plan이 필요한 Image cube 을 display하기 위해서 Nuance 는 모든 색상을 red, green and blue의 planes 으로 나타냄.

현재 사용되고 있는 cube일 경우 display panel 에서 Wavelength to RGA Map 으로 나타남.

➤ To View Visual RGB

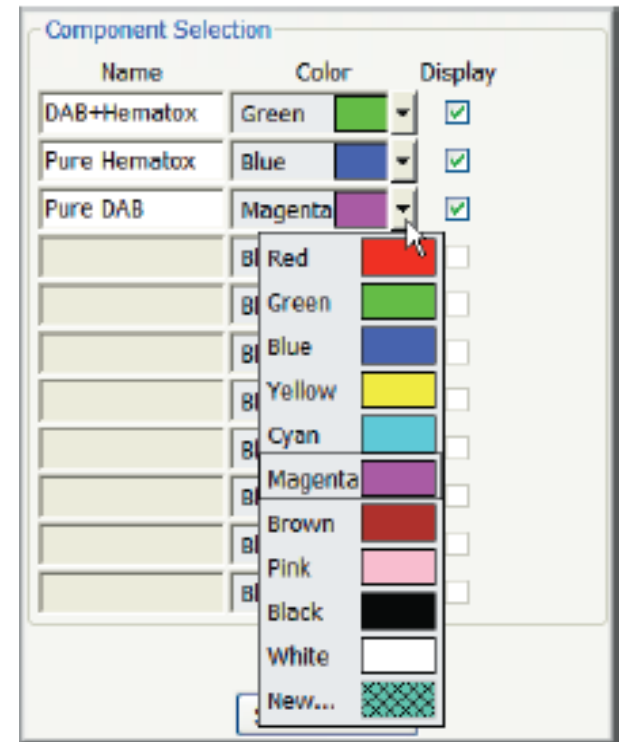
Visual RGB버튼 클릭하면 , 사람 눈에 보는 것도 비슷하게 bar가 정해짐.

➤ To View Equal RGB

Equal RGB을 클릭하면, red, green and blue의 plane과 함께 cube의 wavelength range에 똑같이 나누어지도록 bar가 정해짐.

Changing Components in a Composite Image

Display column 으로 composite image을 control 할 수 있음. **Color Drop box** 을 이용하여 색상을 바꿀 수 있음. 이 기능은 fluorophore signal을 강조할때 좋음.



Advanced Display Controls

- ✓ **To open the Display Control utility**



Display control 버튼을 클릭함. Display panel에서 보았던 **Display mapping** 과 **scaling**을 찾을수있음. Brightness와 contrast을 조절할수있음.

- ✓ **To link the Display control utility**

show Crosshairs 을 클릭함. 두 개의 slider들을 어떤 position 이던 원하는 데로 intersection이 가능함.

➤ Adjusting Composite Display Setting Display Control

- ✓ To include or exclude layers

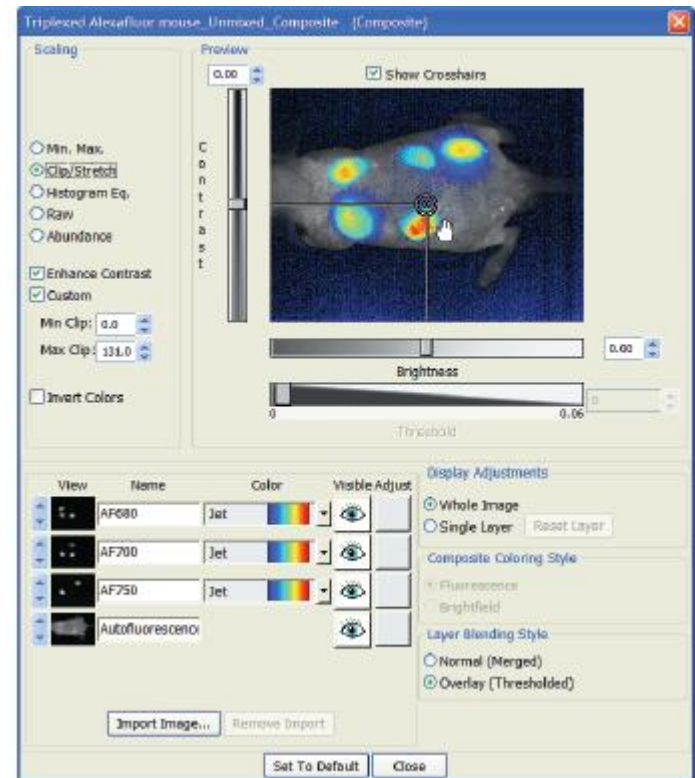
view  버튼을 클릭하여 포함하거나 **Hide**  버튼을 클릭하여 배제시킴.

- ✓ To adjust a layer's brightness or contrast

Adjust 버튼을 클릭하고 **Brightness**와 **Contrast** sliders을 조절함.

- ✓ To view images in fluorescence or brightfield

Composite coloring style
옵션을 선택함.



- ✓ **To create a composite image by blending its component signals**
Layer Blending Style 그룹에서 **normal(merged)**을 선택함.
- ✓ **To create a composite image by overlaying its component signals**
Layer Blending Style에서 **Overlay**을 선택함.
새로운 component image 을 base layer로 사용하고 싶을 시,
Import Image 버튼을 클릭하여 원하는 image을 import 함.

➤ **Returning to the Default Display Setting**

하나의 layer을 보거나 editing 할 때, **Reset Layer** 버튼을 클릭하면 default state으로 돌아감. 전체의 image을 볼때, **Set To Default** 버튼을 클릭 하면 모든 layer들을 default state으로 돌아감.

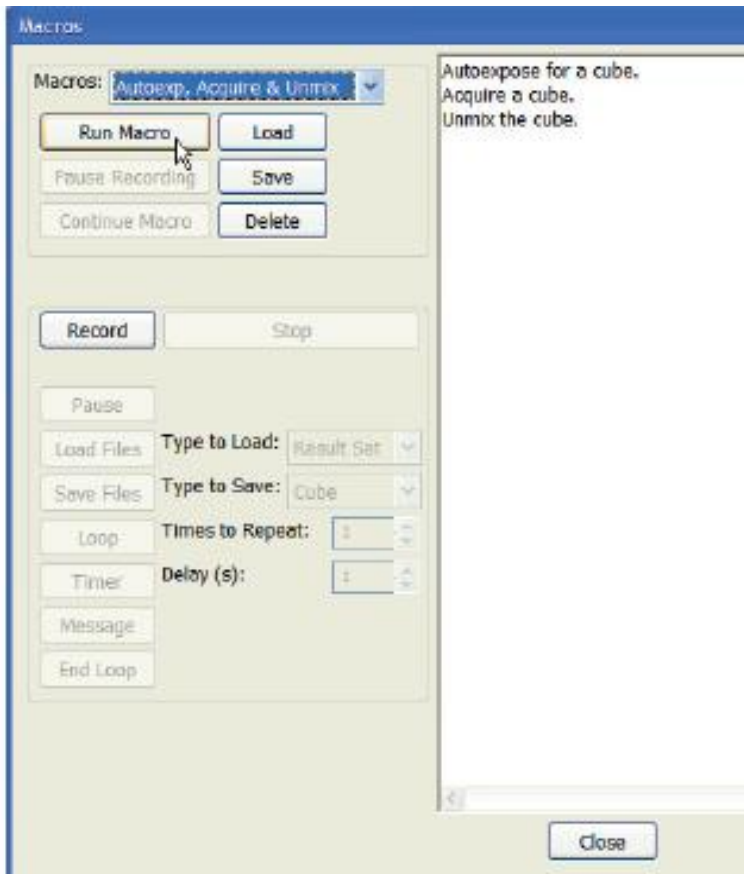
Displaying the Intensity Legend

- ✓ Component에서 마우스의 오른쪽을 클릭하여 **Display Intensity Legend** 을 선택함. Legend(intensity에 관한 설명)이 image 오른쪽 아래에 뜸. Component 은 항상 grayscale 표시됨.
- ✓ Composite image는 **Display Control**을 열어, **Overlay layer blending style**을 선택함. **Display Control**을 닫고, image에서 마우스의 오른쪽을 클릭하여 **Display Intensity Legend** 을 선택함. Composite image는 color scheme 으로 표시됨.
- ✓ legend 의 title 은 처음 cube 가 acquire 될 때 정해졌던 Measurement Pixel Unit으로 표시됨 .
 - "Raw Counts"(TIFT stack), "Count", "Scaled Counts/Sec"
 - cube가 optical density 로 전환 되었을 때 "Optical Density"을 title이 표시됨

Macros

- **Overview of the Macros Dialog Box**
sequence of action을 위한 shortcut.

Overview of the Macro Dialog Box



Macros Dialog Box

➤ **Macros>Define Macro**-Macros dialog box 가 열림.

- **Macros** drop down box에서 macro로 선택함. 선택된 macro는 step들이 window에 display됨.
- **Run Macro** 버튼을 클릭하여,시작함.
- **Pause Recording** 버튼은 pause 모드로 전환.
- **Continue Macro** 버튼은 다시 running 시킴.
- **Load** 버튼은 macro file(.rcd)로 import 시킴.
- **Save** 버튼은 새로운 Macro file들을 저장함. Save버튼을 클릭하지 않고 nuance software을 close하면 macro file 은 저장되지 않음.

- **Record** 버튼을 클릭하여 macro recorder 을 시작함. 모든 키보드작업과 마우스의 클릭 등등의 command dl record 됨.

- **Stop**

- **Pause** 버튼을 클릭하여 Spectral library을 만들거나, reference image 을 acquiring 는 등등의 액션을 위해 recording 을 정지할 수 있음.

Pause 하기 전 Macro에 message 을 add해 놓으면, user가 Continue macro 버튼을 클릭하기 전, 어떤 것을 했었는지 알 수 있음.

✓ **To insert commands into the new macro;**

- **Load Files** 버튼은 Macro Command에서 사용아가될 파일을 load 할 수 있음. 이 버튼을 클릭하기 전에 **Type to load drop down box**을 이용하여 파일의 종류를 선택함(cube, result set, protocol, spectral library, image or composite)

- **Save Files** 버튼은 Macro에서 만들어지거나 edit 한 file을 자동으로 저장하게 함. 이 버튼을 클릭하기 전 **Type to load drop box**을 이용하여 저장할 파일 종류를 선택함

- **Loop** 버튼을 통해 command 의 반복횟수 정함. 먼저 Times to Repeat 을 선택하여 Loop 버튼을 클릭함. 그리고 반복하고 싶은 command을 add 함.

- **Timer** 버튼을 통해 macro의 delay 되는 시간을 정함. Delay 시간을 초단위로 정하고 timer 버튼을 클릭함.

- **Message** 버튼을 통해 macro을 사용하는 동안 message을 넣을 수 있음.
- **End Loop** 버튼은 loop cycle 을 끝나게 함.

Co-localization Staining Detection

- Opening a Dataset for Co-localization Analysis
- Adjusting Threshold Mask Values
- Selecting Markers for Co-localization
- Saving and Loading Co-localization Settings
- Interpreting the Statistics
- Customizing the Statistics Display
- Drawing Regions of Interest
- Customizing the Composite Image Display
- Copying Images and Data
- Exporting Images and Data

b. The spectral components of the result set are listed here.

c. The thresholding values for each component can be adjusted here.

d. The markers and counterstains for co-localization can be selected here.

The screenshot shows the 'Co-localization' software interface. At the top, there's a 'Components' table with columns for Spectral Name, Marker, Color, and Visibility. Below it is a 'Thresholding' section with four rows, each for a marker (AF680, AF700, AF750, Autofluor...), including fields for Minimum Pixels, Peak Color, and a Threshold slider. The 'Co-localization' section at the bottom has checkboxes for 'Co-loc. Label', 'Show Co-loc.', 'Show All', 'Mask Color', and 'Visibility', along with two columns of checkboxes for 'Markers for Co-localization' and 'Denominator(Counterstain)'. On the right side, there's a 'Zoom' panel with buttons for 'Full Image', 'Fit', 'Red ROI', 'Area ROI', 'Cross ROI', and 'Clear ROIs'. A large image of a mouse is displayed in the center-right, with several colored spots (red, green, blue, yellow, white) overlaid on its body. A text box 'a. The 'Unmixed_Composite' image from the result set displays here.' points to this image. At the bottom right, there are buttons for 'Copy Data', 'Export Data', 'Copy Image', 'Export Image', and 'Close'. A text box 'e. Co-localization percentages for the selected markers and counterstains will display here.' points to the 'Statistics' area, which is currently empty. Another text box 'f. Use these buttons to copy and export data and images.' points to the bottom buttons.

Spectral Name	Marker	Color	Visibility
AF680	AF680	Red	<input type="checkbox"/>
AF700	AF700	Green	<input type="checkbox"/>
AF750	AF750	Blue	<input type="checkbox"/>
Autofluor...	Autofluor...	White	<input type="checkbox"/>

Marker Name	Minimum Pixels	Peak Color	Visibility
AF680	20	Red	<input type="checkbox"/>
Threshold			0.8000
AF700	20	Green	<input type="checkbox"/>
Threshold			0.8000
AF750	20	Blue	<input type="checkbox"/>
Threshold			0.8000
Autofluor...	20	White	<input type="checkbox"/>
Threshold			0.8000

Co-loc. Label	Show Co-loc.	Show All	Mask Color	Visibility
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Markers for Co-localization	Denominator(Counterstain)
<input type="checkbox"/> AF680	<input type="checkbox"/> AF680
<input type="checkbox"/> AF700	<input type="checkbox"/> AF700
<input type="checkbox"/> AF750	<input type="checkbox"/> AF750
<input type="checkbox"/> Autofluor...	<input type="checkbox"/> Autofluor...
	<input checked="" type="checkbox"/> All Image Pixels

Adjusting Threshold Mask Values



1. 맨 위쪽 components을 제외한 모든 component의 **Visibility**을 off시킴.
2. Threshold mask의 **visible marker**을 on and off 을 여러 번 클릭하여, pixel을 확인함.
3. **Threshold slider** 나 **scroll box**을 이용하여 threshold을 조정함.
4. 이 procedure을 다른 marker 에게도 적용함.
5. **Minimum Pixel value**을 확인함.

Selecting Markers for Co-localization

marker와 counterstains 을 선택하면, **Statistic**에 percentage가 계산됨.

The screenshot shows the 'Co-localization' software interface. The 'Components' section lists markers: AP500 (Red), AP700 (Green), AP750 (Blue), and Autofluor... (White). The 'Thresholding' section shows sliders for each marker's threshold. The 'Co-localization' section shows 'Overlap' as the label and 'yellow' as the mask color. The 'Statistics' section contains two tables.

	% Co-loc.	% Positivity AP500	% Positivity AP700	% Positivity AP750
PERCENT (%)	3.11%	9.66%	6.80%	6.50%

	% Positivity AP500	% Positivity AP700	% Positivity AP750
Within AP500	—	61.07%	24.93%
Within AP700	69.50%	—	28.52%
Within AP750	44.40%	50.16%	—

Saving and Loading Co-localization Settings

➤ Saving Co-localization Settings

현재 사용되고 있는 co-localization display와 configuration setting을 저장할 때, Co-localization setting file 로 저장함. 이 file 은 component settings, Thresholding setting and value, co-localization Marker selection 과 Statistic and Display options과 같이 저장됨.

✓ To Save a Co-localization setting file

- 1.co-localization window을 열어둔 채, **File>Save Co-localization**
2. save 버튼을 클릭함.

➤ Loading Co-localization Settings

✓ To load a settings file

1. File>Open Co-localization

2. 원하는 setting file을 선택한 후, **open** 버튼을 클릭함.

3. 선택된 settings file은 Setting box에 display됨.

✓ **Co-localization settings must be compatible:**

Co-localization tool이 setting file을 load하기 전, setting file이 result set과 같은 spectra 수를 가지고 있는지 확인.

만약 result set이 같은 수를 가지고 있지 않을 경우, *"The Current result set is incompatible with the selected co-localization setting."* 이라는 notice가 뜬다. Matching 되는 setting file을 load하거나 새로운 setting file을 만들.

Interpreting the Statistics

Statistics

	% Co-loc.	% Positivity: AF680	% Positivity: AF700	% Positivity: AF750	Denominator
Percent (%)	a 3.11%	b 9.66%	c 8.86%	d 6.85%	
Pixel Count	4638	14391	13195	10208	148922

	% Positivity: AF680	% Positivity: AF700	% Positivity: AF750	Pixel Count
Within AF680	e --	61.07%	34.40%	14391
Within AF700	66.60%	--	38.82%	13195
Within AF750	48.49%	50.18%	--	10208

	ROI Number	Marker Area (pixels)	Total Signal (counts)	Total Signal (scaled counts/μ)	Avg Signal (counts)	Avg Signal (scaled counts/μ)	Max Signal (counts)	Max Signal (scaled counts/μ)
AF680	f Overlap	4638	340378.19	29.10	73.39	0.00628	139.53	0.0119
AF680	Full Image	14391	1579186.88	135.03	4.36	0.000373	180.32	0.0154
AF700	Overlap	4638	375131.28	32.08	80.88	0.00692	146.45	0.0125
AF700	Full Image	13195	1337325.88	114.35	3.70	0.000316	162.67	0.0139
AF750	Overlap	4638	208150.08	17.80	44.88	0.00384	74.00	0.00624
AF750	Full Image	10208	943201.06	80.65	2.61	0.000223	314.24	0.0269
AutoFluor...	Overlap	4638	957427.94	81.86	206.43	0.0177	424.75	0.0363
AutoFluor...	Full Image	148922	22637338.00	1935.59	62.55	0.00535	775.07	0.0663

- 현재의 Dataset에서 AF680,AF700과 AF750 의 Co-localization은 3.11임- 모든 Autofluorescence signal(denominator로 선택된)중 3.11%만이 AF680,AF700, AF750 co-localization이 일어난 부분임. 4,638pixel에서 co-localization이 일어남.
- Autofluorescence 중 positivity AF680 labeled이 9.66%임. (14,391 pixels)
- Autofluorescence 중 positivity AF700 labeled이 8.86%임. (13,195 pixels)
- Autofluorescence 중 positivity AF750 labeled이 6,85%임. (10,206pixels)

- e. 14,391 AF 680 labeled pixel중에 61,07%가 AF700을 가지고있고, 34.40%가 AF 750을 가지고있음.
- f. **Component Statistic** rows 에 Statistics tab 의 모든 component 가 display됨.
- overlap row에는 area와 signal statistics 이 display됨
- Full Image ROI 가 표시됨(set as default). ROI 을 선택하면 새로운 줄이 component Statistic으로 add 됨.

Customizing the Statistics Display

Statistics tab을 선택함. Percentage 와 pixel Count 그리고 Component Statistic의 display 여부를 선택할 수 있음.

The screenshot shows a software window titled 'Co-localization' with a 'Statistics' tab selected. The main window displays a grayscale image of a mouse with several colored regions (red, green, blue) overlaid. The left sidebar contains settings for components (AF680, AF750, AF750, Autofluor...) and checkboxes for displaying Co-localization, Peak Intensity/Area, In-Channel, and Component Statistics. The bottom right corner features buttons for 'Copy Data', 'Export Data', 'Copy Image', 'Export Image', and 'Close'.

Statistics Panel Data:

	% Co-loc.	% Positivity: AF680	% Positivity: AF750	% Positivity: AF750	Denominator
Percent (%)	3.11%	9.66%	6.66%	6.67%	
Pixel Count	1528	13191	13195	10306	148922

	% Positivity: AF680	% Positivity: AF750	% Positivity: AF750	Pixel Count
Within AF680	—	61.07%	34.40%	34391
Within AF750	66.60%	—	30.82%	13195
Within AF750	48.49%	50.10%	—	10306

	RDE Number	Marker Area (pixels)	Total Signal (counts)	Total Signal (scaled counts/a)	Avg Signal (counts)	Avg Signal (scaled counts/a)	Max Signal (counts)	Max Signal (scaled counts/a)
AF680	Overlap	4536	340070.19	25.10	73.39	0.00628	139.53	0.0119
AF680	I	14391	1578186.88	105.05	43.36	0.000773	180.32	0.0154
AF750	Overlap	4536	375131.29	22.08	80.88	0.00092	146.45	0.0125
AF750	I	13195	1337325.88	114.58	2.70	0.00016	162.87	0.0139
AF750	Overlap	4536	208159.98	17.88	44.88	0.00384	74.09	0.00634
AF750	I	10306	942001.05	80.65	2.61	0.00023	214.34	0.0269
Autofluor...	Overlap	4536	957427.04	61.86	206.43	0.0177	424.75	0.0363
Autofluor...	I	148922	22837338.00	1538.59	62.55	0.00335	775.07	0.0663

Drawing Regions of interest

Image의 특정한 부분을 선택하고 싶을시, Image 왼쪽 위치한 ROI 버튼을 클릭하여 마우스를 이용하여, ROI 을 선택함. ROI region이 add되고 난 후엔 denominator(counterstain) list가 All ROI Pixels 로 바뀐다. Statistics은 자동으로 updated 됨.

➤ Cloning, Moving, Deleting ROIs

Image에서 오른쪽을 클릭하여 원하는 action을 drop down menu 에서 선택함

➤ Applying Regions from a Saved ROI file

저장된 ROI file을, composite image에 apply 할 수 있음. Image 에서 오른쪽을 클릭하여 Load User Region을 선택함. Dialog box 에서 ROI을 선택함

➤ Saving Regions

현재 사용하고 있는 ROI을 저장할 시, image에서 오른쪽을 클릭하여 Save User Regions을 선택함. ROI file 명과 저장장소를 선택한 후, save 을 클릭함.

Customizing the Composite Image Display

Display Tab을 클릭하여 Display control을 보이게함

- Fluorescence나 brightfield 에서 image 을 볼 때, **Composite Coloring style option**을 이용함. (원래의 image cube 을 acquired 되었던 mode 을 선택함)
- **Display Adjustments** 와 **component selector**을 이용하여, 전체 image을 조절할 것인지 선택된 layer 만 조절할 것인지 선택함.
- **Brightness and contrast slider**을 이용하여, 이미지의 Brightness와 contrast을 조절함. 만약, single Layer가 표시되어있으면, 그 layer의 밝기와 명암을 조절됨.
- **Min. Max option** 은 minimum value 0부터 maximum value 255까지와 이 값들의 linearly interpolates을 나타냄. (어두운 signal을 보일 수 있게 함)
- **Clip/Stretch Option**은 display scale을 default함. 밝기와 saturated 되는 것을 막음.

- **Histogram Eq. Option**은 pixel을 나타내며 histogram의 pixel이 각각의 bin에 똑같은 pixel이 들어가도록함.
- Raw option 은 no scaling을 data에 apply하게함
- **Abundance option**은 composite image 에 있는 모든 pixel을 가장 밝은 pixel과 255 value의 비율로 scale함. 조금 더 밝은 사진을 얻을 수 있음.
- Region은 가장 넓은부분부터 순차적으로 번호가 매겨짐. Show Region Labels 클릭하여 사용할 수 있음 .
- **Show Markers and Co-localization Masks option**는 setting panel 에 서 선택되었던 mask setting 을 빠르게 on/off 할 수 있음.

Copying Images and Data

➤ Copying Images

Image을 Window Clipboard로 복사할 경우, **Copy Image** 버튼을 클릭함. 사용하고자 하는 software program에서 **paste**버튼을 클릭하여 옮김.

➤ Copying Data

display 된 data을 Excel 로 복사할 경우, **Copy Data** 버튼을 클릭하고 Excel에서 **Paste** 을 클릭하여 옮김.

Exporting Images and Data

➤ Exporting Images

Image을 JPG, TIFF RGB file로 export해서 저장.

Export Image 버튼을 클릭하고 **Choose RGB File dialog box**에 파일명과 파일 저장장소를 정하여 **save** 을 클릭함

➤ Exporting Data

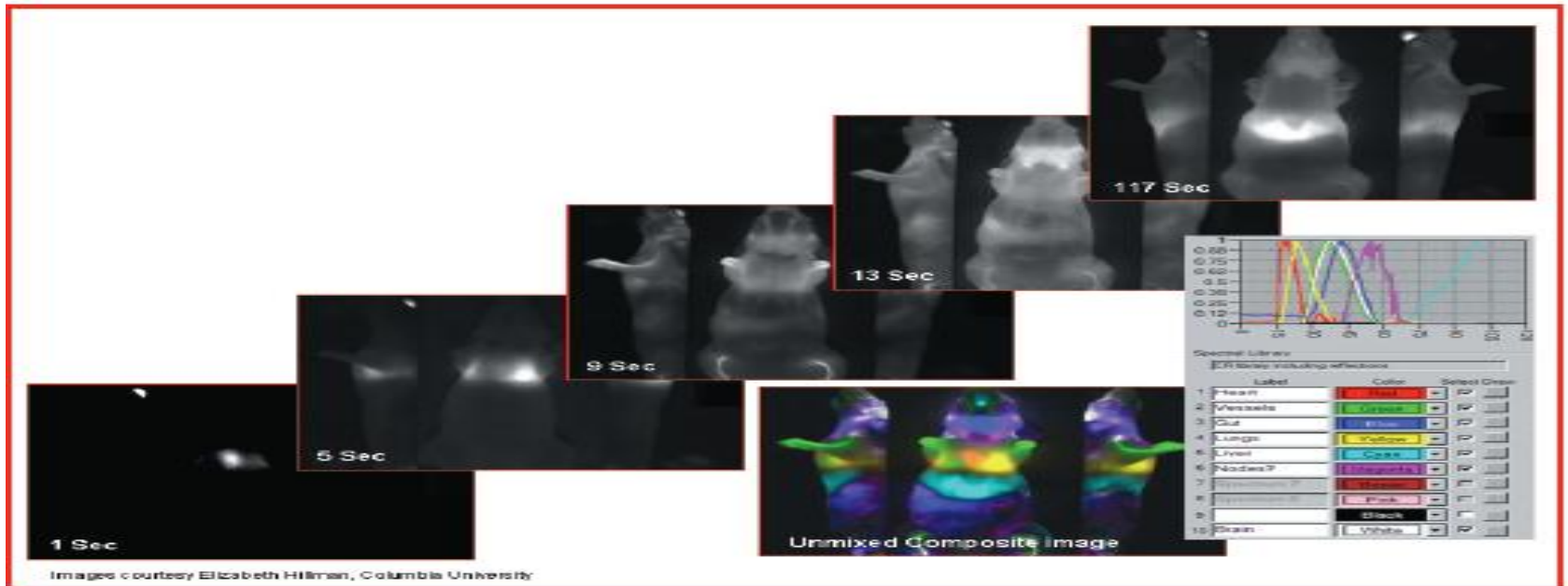
display된 data을 TXT file로 export하고 싶을경우, **Export Data** 버튼을 클릭하고 **Choose Measurement File dialog box** 에 서 file명과 저장장소를 선택하여 **Save** 버튼을 클릭함.

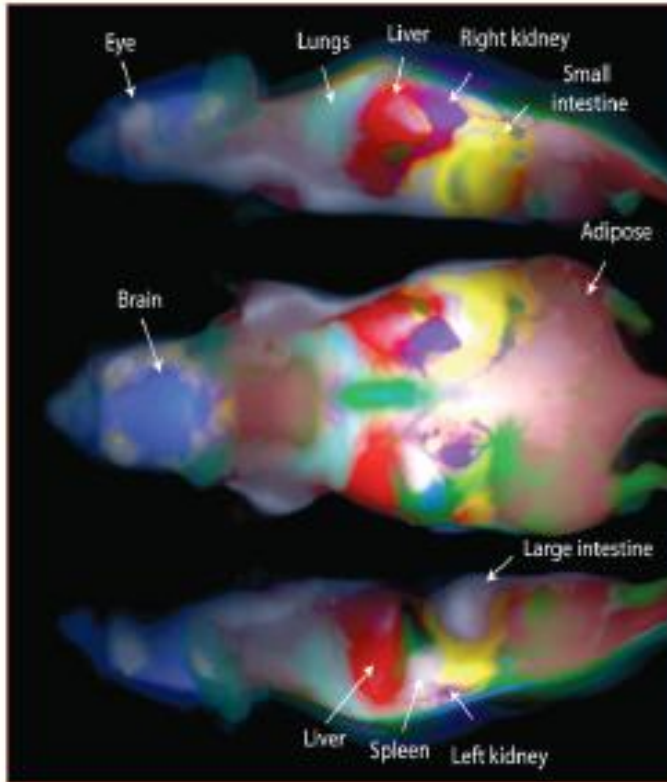
Dynamic Contrast Enhancement(Dyce)

- **How Dyce Works**
- **Preparing for Dyce imaging**
- **Acquiring a Monochrome Dyce Dataset**
- **Acquiring a Multispectral Dyce Dataset**
- **Recalling/Opening a Saved Dyce Cube Sequence**
- **Creating a Dyce Time Series**
- **Displaying/Playing Dyce Dataset**

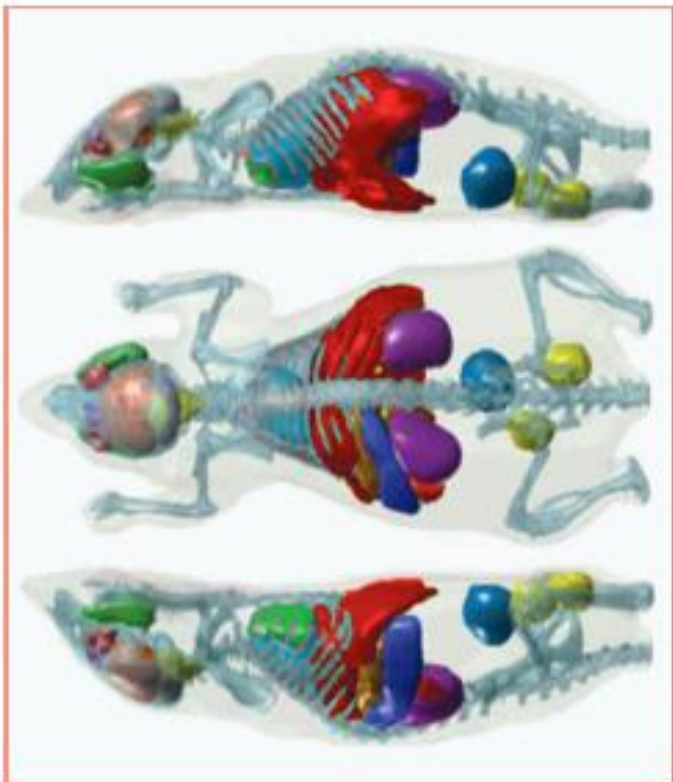
How Dyce Works

1. Inject a bolus of NIR dye*Indocyanine Green(ICG)을 권장함
2. Dynamic series of image 사진을 찍음
3. Unmix





Dyce



CT mouse atlas for comparison

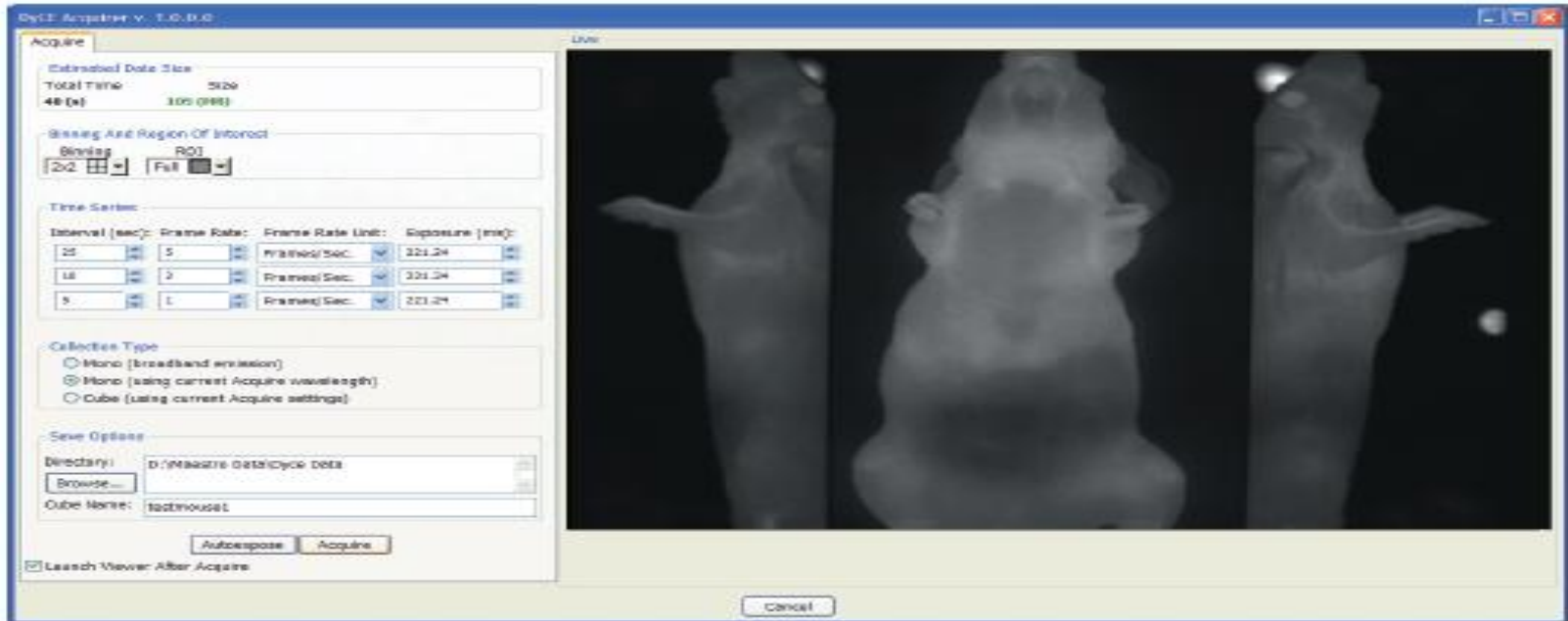
Images courtesy Elizabeth Hillman, Columbia University

Dyce을 이용하여 organ의 위치를 정확하게 알수있음

Preparing for Dyce Imaging

➤ System Setup

1. Hardware Status가 "ready" 상태인지 확인.
2. multiview platform을 install함
3. **live Stream window**가 나오있는지 확인.
4. **Acquire > Fluorescence**에서 camera setting, a filter set, acquisition parameter을 정함
5. dye에 맞는 light 과 chamber stage의 알맞은 온도를 확인
6. **Acquire Dyce** 버튼을 클릭하거나 **Tools > Acquire Dyce**



➤ Selecting Binning and ROI

Binning과 ROI을 선택함.

➤ Selecting a Collection Type

- **Mono(broadband emission)**-monochrome image을 정해진 time interval 로 acquire함
- **Mono(using current Acquire wavelength)**
- **Cube(using Current Acquire settings)**

➤ Selecting Save Options

Acquiring a Monochrome Dyce Dataset

1. Mono(broadband emission) or Mono(using current acquire wavelength) 중 선택함
2. Time Series을 정함
3. Save Options box에서 Browse을 버튼을 클릭하여 저장장소를 정함
4. 마우스를 platform에 올려놓.
5. Bolus injection을 준비함
6. Auto expose을 클릭하여 optimum exposure setting을 얻음
7. 준비가 다 되면 injection 하고 바로 Acquire 버튼을 클릭함
8. 얻어진 image들은 RGB cube로 저장됨

Acquiring a multispectral Dyce Dataset

Time Series

Interval (sec):	Frame Rate:	Frame Rate Unit:	Exposure (ms):
20	5	Sec./Frame	58.428
120	30	Sec./Frame	58.428
300	60	Sec./Frame	58.428

Collection Type

Mono (broadband emission)
 Mono (using current Acquire wavelength)
 Cube (using current Acquire settings)

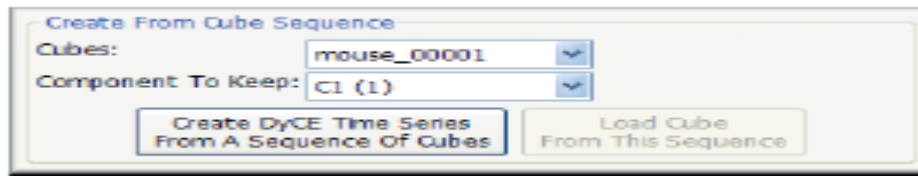
1. Cube(using current acquire setting)을 선택함
2. 각각의 time interval에 exposure setting 선택함
3. Save option box에서 browse을 선택하여 저장 장소를 정함
4. 마우스를 platform에 올려놓
5. Bolus injection을 준비함
6. **Auto expose**을 클릭하여 optimum exposure setting을 얻음
7. 준비가 다 되면 injection 하고 바로 **Acquire** 버튼을 클릭함
8. 얻어진 image들은 RGB cube로 저장됨

Recalling/Opening a Saved Dyce Cube Sequence

1. Lord Cube버튼을 클릭함
2. Choose Cube dialog에서 cube sequence을 저장 장소를 정함
3. Dyce time series을 만들고싶은 cube을 open 함
4. Color palette을 사용하여 spectral component을 선택함
5. Tools> Explore Dyce

Creating a Dyce Time Series

1. Cubes drop down box 에서 cube을 선택함.
2. Spectra panel 로 바꿈. Library color palette을 이용하여 spectra component 의 sample을 얻음. Spectra ID 는 component to Keep drop down box 에 저장됨
3. Drop down box에서 keep 하고 싶은 component을 선택함



4. Create Dyce Time Series From A sequence of Cube 버튼을 클릭함.
 - Reloading a Time Series' Parent Cube Sequence
 1. Dyce time series cube을 열어놓채, Load Cube From This Sequence 버튼 클릭함
 2. Choose Cube in Sequence dialog에서 cube을 오픈함

Displaying/Playing Dyce Datasets

DyCE datasets을 동영상화 시키는 기능

➤ Opening Dyce Datasets

1. **Load Cube** 버튼을 클릭하여 dataset 을 load함
2. **Tools>Explore Dyce**

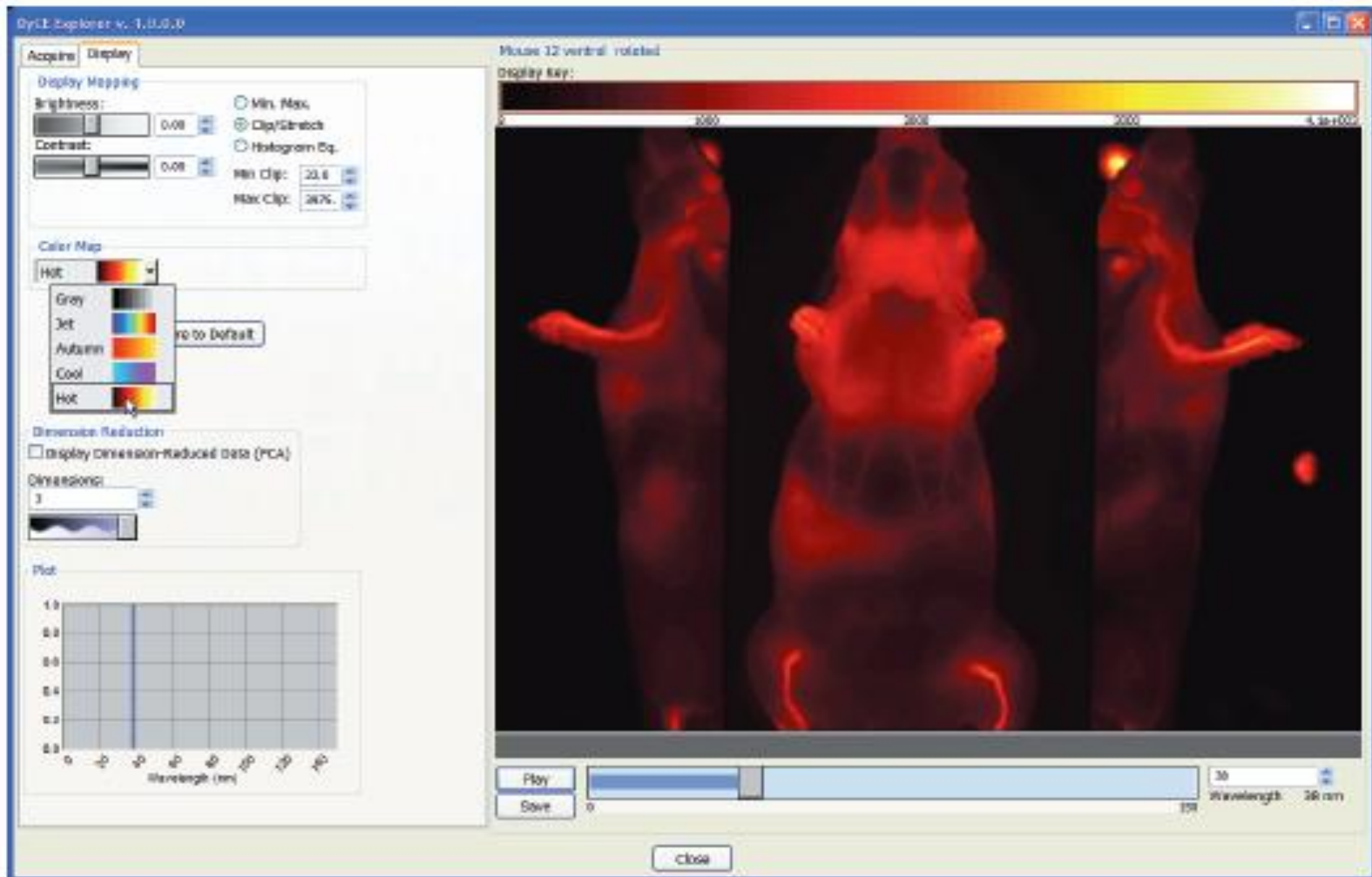
➤ Playing Dyce Datasets

1. play 버튼을 클릭함. Play bar는 현재 frame과 총 frame 수의 값을 보여줌.
2. Plot graph는 현재 frame 의 시간을 나타냄

➤ Saving Dyce Datasets as AVI Movies

➤ Changing the Display Mapping

➤ Selecting a Color Map



➤ Displaying Dimension-Reduced Data

