

STomics

显微镜评估参考手册

参考手册版本号：A5

版本历史

参考手册版本	软件版本	修订日期	修订内容摘要
A0	V1.0	2021 年 8 月	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 首次发布
A1	V1.0.6	2021 年 11 月	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 更新拼接大图说明 ◆ 修改 imageQC 未响应说明 ◆ 修改芯片号和实验人员填写说明 ◆ 增加 QC 时间过长的异常处理说明 ◆ 增加安装目录建议
A2	V1.0.7	2022 年 2 月	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 更新图片为 V1.0.7 软件截图 ◆ 增加安装模式选择说明 ◆ 删除 QC 时间过长说明 ◆ 增加结果界面 QC 出错提示说明 ◆ 更新 2.5 评估流程中芯片染色、荧光成像和图像 QC 说明 ◆ 新增芯片划痕和 track 线倾斜角过大图片示例
A3	V1.0.7	2022 年 4 月	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 重新组织文档，并进行修订 ◆ 修改组织覆盖芯片建议 ◆ 删除时空芯片规则说明
A4	V1.0.8	2022 年 7 月	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 新增大图 QC 接入 saw 流程 ◆ 更新图片为 V1.0.7 软件截图 ◆ 输出图像清晰度评估参考值（不参与 QC 成功失败的判断） ◆ 兼容芯片号短码 ◆ 兼容鼠脑和猕猴的 czi 数据，取消二通道的读取 ◆ rsync 上传成功后不删除本地 tar.gz 文件，不移动.json 文件 ◆ 评估流程新增 ImageQC 评分标准说明。
A5	V1.1.0	2022 年 8 月	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 新增大图拼接评估功能 ◆ 更新显微镜评估流程 ◆ 更新 S 芯片名称，更新为 Chip T(芯片大小*芯片大小) ◆ ssDNA 图取消旋转角度限制 ◆ 适配 czi 格式的各种通道 ◆ 清晰度得分和 track line 得分改为百分制 ◆ 把 QC 输出结果 excel、txt、json 文件里的信息保存到

ipr 文件中，且只上传 IPR 文件和源数据

提示：请下载最新版说明书，与相应版本的软件配套使用。

版权声明：

本说明书版权归深圳华大生命科学研究院所有。未经本机构书面许可，任何其他个人或组织不得以任何形式对本说明书中的各项内容进行复制、拷贝、编辑或翻译为其他语言。

目录

第一章 概况	- 1 -
第二章 成像指南	- 1 -
2.1 成像系统推荐	- 1 -
2.2 成像配置	- 1 -
2.3 图像配准的要求和输入文件	- 2 -
2.4 图片示例	- 3 -
第三章 显微镜评估	- 5 -
3.1 需求概览	- 5 -
3.2 评估准备	- 6 -
3.3 评估流程	- 7 -
3.4 拍照注意事项	- 10 -
第四章 QC 软件介绍	- 10 -
4.1 软件信息	- 10 -
4.2 安装说明	- 11 -
4.3 软件使用说明	- 18 -
4.4 异常情况说明	- 25 -
第五章 接口文档	- 34 -
5.1 介绍	- 34 -
5.2 显微镜API接口文件信息	- 35 -

第一章 概况

STomics 显微镜评估参考手册用于指导用户评估显微镜是否可以用于 STomics 时空转录组技术拍照，内容包含成像指南、显微镜评估和 Image QC 软件的使用方法。

第二章 成像指南

2.1 成像系统推荐

厂家	描述
Leica	Leica DM6-M Leica Thunder Leica DMI8
Zeiss	Zeiss Axio Scan Z1 Zeiss Axio Scan 7
Olympus	Olympus FV3000
Nikon	Nikon Eclipse Ni-E (DS-Qi2)

2.2 成像配置

具体成像配置推荐

明场配置（可用于 H&E 染色）：

落射明场
彩色相机 (3x8 bit)
白平衡
5 μm/pixel 最大像元尺寸
曝光时间 0.1~100ms

荧光配置：

光源波长范围 380-680 nm
黑白相机 (≥12 bit)
FITC filter cube (Excitation 470/40, Emission 525/50)

TRITC filter cube (Excitation 545/25, Emission 605/70)

5 μm/pixel 最大像元尺寸

曝光时间 1 ms~2 s

2.3 图像配准的要求和输入文件

SAW 中图像配准流程的输入文件会根据显微镜的不同存在差异，如图所示目前各个显微镜支持的配准流程文件输入如下：

显微镜描述	配准流程的输入文件
Zeiss Axio Scan Z1 Zeiss Axio Scan 7	czi 格式的原始文件
Leica DM6-M	TIFF/ PNG 格式的拼接图片
其它显微镜： (API 接口开发前) (API 接口开发后)	TIFF/ PNG 格式的拼接图片 小图 fov (TIFF/PNG) 或者原始图像文件

图像配准流程使用的图像是否满足下游流程的分析，需要通过 ImageQC 做图像质量的评估。ImageQC 软件评估图像的说明可参照 4.3 章节，ImageQC 输入文件的格式可参照上表所示。

通常情况下，高质量的图片一般满足如下特点：

- 1、高分辨率: ≥ 1800 像素(高度)和 ≥ 2000 像素(宽度)。
- 2、拍摄的组织清晰且在聚焦范围内。
- 3、拍摄芯片的 track 线清晰。
- 4、无拼接错误。
- 5、避免淬灭。
- 6、组织覆盖面积不超过芯片总面积的 80%。

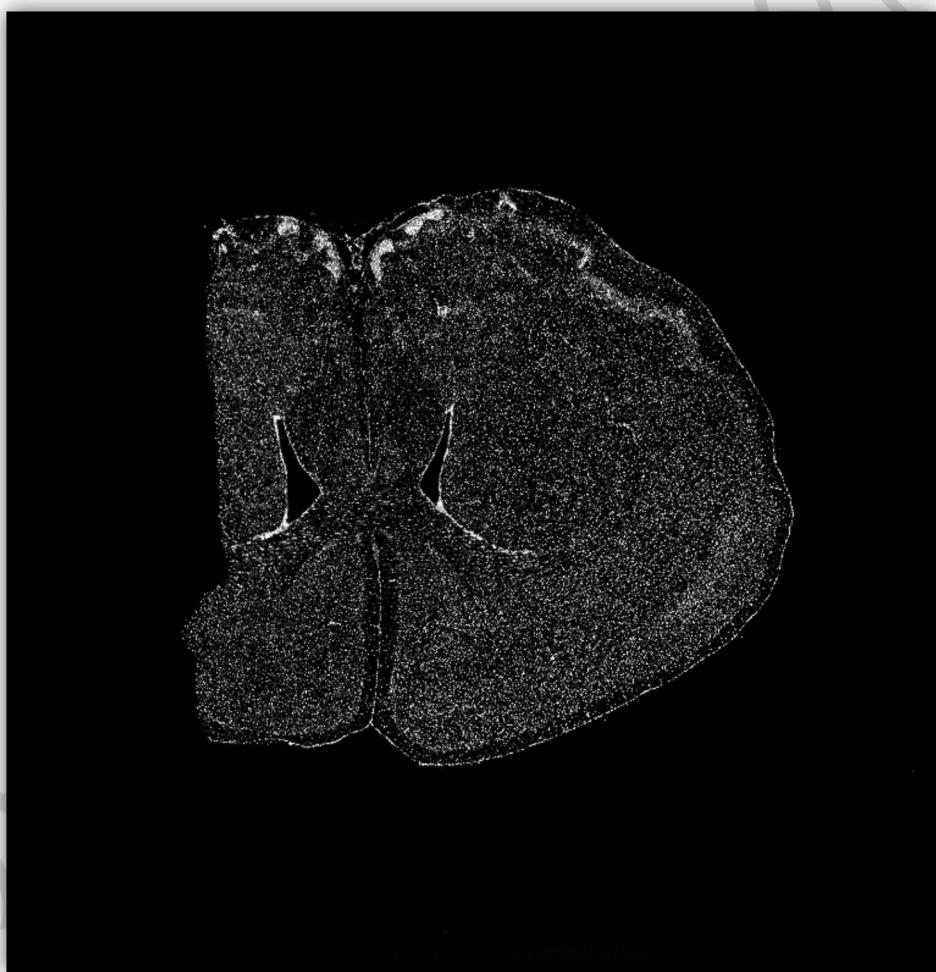
如图为 QC 通过的高质量鼠脑荧光图像示例。



序号 3 ~ 6 都会影响 ImageQC 中 track 线的得分，该评分范围为 0 ~ 100，评分最低要求为 60 分，分数越高，则说明图像配准越准确。此外，由于 Chip T(1*1)芯片上的大部分 track 线都被组织覆盖，因此测试芯片图像的 track 线 QC 得分通常要高于 Chip T(1*1)芯片图像。

2.4 图片示例

1、图像 QC 要求一个以上 FOV 区域检测到 track 线。为获得良好的分析效果，建议非组织区域面积占比大于 20% 的同时组织不覆盖芯片边缘及四个角，示例图如下：



2、以下提供部分图像示例供大家参考，以确保采集的图像质量能够通过 QC。

指标项	正确示例	错误示例
-----	------	------

网格线		
划痕		
拼接痕迹		
曝光		
对焦		
背景平衡		

细 胞 (ssDNA)		
拼接错位		
	相邻 FOV 精准拼接	由于拼接错误造成的重复

第三章 显微镜评估

3.1 需求概览

显微镜需求概览

指标/参数	描述
显微镜 XY 运动范围（行程）	扫描范围覆盖标准 25*75mm 载玻片
拍摄目标	STomics 测试芯片
明场	落射（反射）

对焦方式评估	预对焦地图，实时自动对焦
荧光通道	DAPI、FITC、TRITC、CY5
物镜	10X (NA≥0.3)
分辨率	相机分辨率匹配物镜理论分辨率，建议咨询显微镜供应商
相机和存图位深	16bits
背景平衡	功能具备，可设置打开
畸变校正	功能具备，可设置打开
Overlap 比例	可调，设置为 10%
图像格式	可查看和导出拼接大图和 FOV 原图，8bit/16bit、TIF/PNG、灰度
硬件配置需求	win10 x64 系统，内存 16G 及以上

3.2 评估准备

物料清单

STOmics 测试芯片（货号：1000029779）
Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937)
Staining reagent: Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212)
Power Dust remover (空气罐) (MATIN, M-6318)
Parafilm and dust-free paper
24-well plate and petri dish
Aluminum foil or paper box

成像要求

避免接触芯片正面

拍照前将芯片放置在载物台

拍照区域需要包括芯片四个角在内的所有区域

单张图像短边分辨率不低于 1800 pixels，长边分辨率不低于 2000 pixels

成像系统需要具备至少 10mm*10mm 区域自动扫描、清晰成像和图像拼接功能，且能查看和导出 TIFF/PNG 格式的 FOV (field of view) 原图和拼接大图。显微镜 PC 配置可处理大型图片 (>5G)，并且支持安装第三方的图像处理等软件 (如 ImageQC 软件) 。

3.3 评估流程

1、评估前

请联系并预约您使用的显微镜品牌的显微镜工程师，使用测试芯片拍完照并 QC 通过后，确认各项参数信息，在正式实验之前勿随意改动（比如 FOV 高度、FOV 宽度和图像比例等信息）。

2、评估中

(1) 芯片染色

- 取芯片：用镊子小心从运输盒中夹取芯片，置于 24 孔板中，注意芯片正反面，不要划到芯片正面，记录芯片号信息；
- 检查芯片表面无切片碎屑、无波纹状白色纹理（若有，用 400 μ L Nuclease free water 清洗两遍，吸弃芯片表面液体），保持芯片表面干燥或 37°C 烤干 1 min，即可进行芯片染色；
- 将芯片放在贴有封口膜的培养皿中，参考表 1 染色液配制方法，使用量为 100 μ L，室温避光染色 5 min。吸掉表面的染色液，用 150 μ L Nuclease free water 清洗一次，并用气瓶将芯片表面吹干，锡箔纸包裹孔板避光等待拍照。

表 1 染色液配制方法

组分	单个反应体积
Invitrogen ® Qubit ssDNA Buffer	99.5 μ L
Qubit ssDNA Reagent	0.5 μ L

Total	100 μ L
-------	-------------

(2) 通道选择：使用 10 倍物镜下 FITC 通道。

(3) 荧光成像：整个芯片区域都需要用荧光通道清晰成像，包括芯片四个角。

(4) 图像 QC

- 下载最新 QC 软件包，并参考第三章 QC 软件介绍使用；
- QC 软件可接收 2.1 中显微镜的原始下机小图路径或拼接大图。

若显微镜型号不为 2.1 中的推荐显微镜，可先用 TIFF/PNG 格式拼接大图 QC 评估。然后把显微镜拍图的原始下机文件，导出的 FOV TIFF/PNG 格式的小图原始文件并联系 FAS，以便开发对应的 QC 接口。若不能自动保存且不能手动导出 FOV 原图的情况，请联系 FAS 同事确认。

注意：请确保待 QC 的 tif 图未被压缩或者缩放，因压缩或者缩放的 tif 图会影响图像的 QC 和拼接效果，检查方法为肉眼确认。

3、评估后

(1) QC 评分标准

- Track 线清晰度评分：主要依据是否可找到模板 FOV 且 Good FOV 的数量占比。模板 FOV 的定义为（能检测到横竖各三条清晰 track 线）；Good FOV 定义为检测到 3 个 track 点的 FOV。简单来说就是只要找到一个模板 FOV 就可以通过 QC。图像能过 QC 表示算法能够找到模板 FOV。

说明	分数	QC 状态
未找到模板 FOV	低于 60 分	失败
找到模板 FOV 且找到大于 1 个的 good FOV	大于等于 60 分	成功
找到模板 FOV 且找到 good FOV, 找到 good FOV 的数量占总的 FOV 的比例为 82%	等于 80 分	成功
找到模板 FOV 且找到 good FOV, 找到 good	等于 100 分	成功

FOV 的数量占总的 FOV 的比例为 100%		
--------------------------	--	--

注意:若是肉眼可见三行三列的清晰 track 线,但是 QC 未通过,应及时反馈 FAS,针对该图片作进一步分析。

- 图像清晰度得分:运用训练好的深度学习模型对 FOV 进行切分,对每个切分好的图片的清晰度按照好、坏和无组织区域三个类型评分,计算整个 FOV 得分的平均值。好的标准为肉眼可辨别细胞的边界,计算公式为:好的 FOV/(好的 FOV+坏的 FOV),该评分显示了 Chip T 芯片上组织图像的清晰度,是细胞分割效果的预测,得分越高,组织图像质量越好。对于不包含组织的测试芯片图像,得分为零。

模型 FOV 计算平均分	图像清晰度分数
0~0.2	0 分~60 分
0.2~0.8	60 分~80 分
0.8~1.0	80 分~100 分

注意:图像清晰度评分不会影响最终的 QC 的评估结果,仅作为评估细胞分割可行性的参考。

(2) QC 未通过影响及解决方案

- 图像 QC 未通过,无法为 SAW 流程的 register 和 cellCut 模块提供有效图像数据,故无法根据 ssDNA 图进行组织和细胞分割。此场景下,SAW 依然可基于基因表达矩阵热图,通过运行 tissueCut 模块进行组织区域的识别和提取,最终输出标准分析报告。
- 若是图像 QC 软件算法误判引起的 QC 未通过,即肉眼可见三条横竖的 track 线,QC 未通过,请及时联系 FAS。
- 若是显微镜参数引起的图像 QC 未通过,请及时联系显微镜工程师协助处理,比如:重新调整参数拍照等。
- 若是实验人员因为不熟悉显微镜或者 ImageQC 软件引起的 QC 未通过,请及时联系 FAS。

3.4 拍照注意事项

- 1、请尽量保证组织大小在 0.9*0.9 范围内，贴片时，在芯片四周适当预留一定的空白，以露出足够的 track 线区域，用于后期配准。
- 2、染色后请尽量将染液完全吸干，再用 0.1x0.1SSC 清洗芯片，以防止过多盐渍附着于芯片表面，影响拍照效果；0.1x0.1SSC 也需要尽量吸干，可用无尘纸从芯片侧面吸取液体，再用气瓶轻轻吹干残余液体，注意防止翻片。
- 3、在甘油封片之前，请注意检查载玻片和盖玻片表面是否清洁，如有杂质，可用 75% 酒精擦拭，或者使用气瓶吹去杂质，请勿中途更换玻片。另外，请从芯片的一侧向对侧缓缓盖上载玻片，避免产生气泡。
- 4、请尽快快速完成拍照，请勿在同一位置长时间拍照，以免光照导致局部荧光淬灭。
- 5、拍照时，请调整拍照参数，确保组织区域的曝光度适宜，成像清晰，并且经后期调试后 track 线清晰，若有问题，请及时联系显微镜工程师调试。
- 6、拍照完成后，请立即使用 ImageQC 软件进行图片 QC，如果 QC 不通过，请及时重新拍照。

第四章 QC 软件介绍

4.1 软件信息

时空组学显微镜ImageQC软件用于评估时空组学项目中显微镜图像质量，以确保图像质量可以满足后续数据分析的需求，部分情况也支持QC成功后自动上传图像和结果数据到指定的存储上。目前评估指标有track线质量评估和图像清晰度评估；支持tif格式和png格式的大图QC，Motic华大定制版和Leica dm6b型号的小图QC，Zeiss Axio Scan.Z1的czi图像格式QC。

文件输出

ImageQC 文件输出为一个 tar.gz 压缩文件和一个 ipr 文件。若设置了上传，该 tar.gz 压缩文件和 ipr 文件将会被上传到指定的路径进行后续的数据处理分析流程。

名称	修改日期	类型	大小
SS200000116TL_F3_20220812_144417_1.1.0.ipr	2022/8/12 14:46	IntelliJ IDEA Project...	45 KB
SS200000116TL_F3_20220812_144417_1.1.0.tar.gz	2022/8/12 14:46	GZ 压缩文件	249,937 KB

对于只用 SAW 的用户手册更新为：适配的 SAW 版本为 5.1.0。

软件 logo



系统要求

硬件配置要求： 内存大于16G

系统软件需求： 操作系统为 windows 10 64bit

网络要求：如不需要上传功能则对网络无要求；若需要上传功能则详见此文档 4.2 安装说明第十步

ImageQC 下载地址

Github 地址：<https://github.com/BGIResearch/imageQC>

或者华大网盘地址：<https://pan.genomics.cn/ucdisk/s/Vf2yM3>

4.2 安装说明

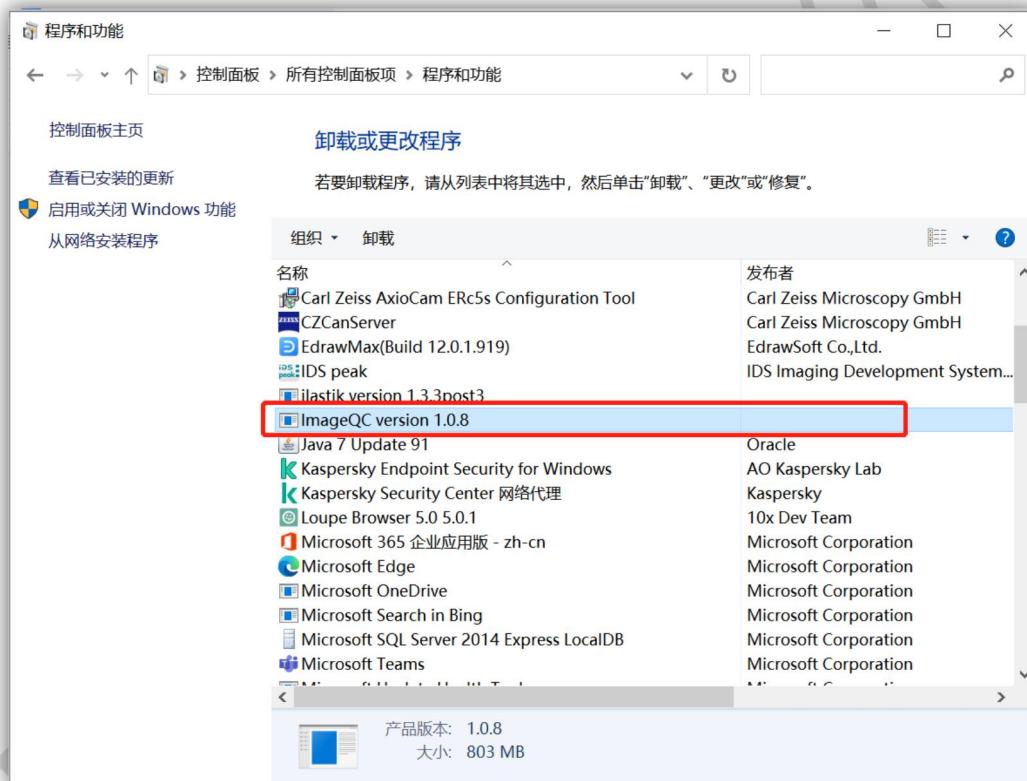
1、如之前安装过 v1.0.8 或更早的版本，已经卸载，请跳过步骤 2，直接执行步骤 3，否则按照顺序执行步骤 2。

2、请先将现有版本从控制面板或者程序所在文件夹的 unis000.exe 卸载（可保留最近的一个版本的安装包做备份），如提示程序被占用，请关闭打开的 QC 程序窗口。

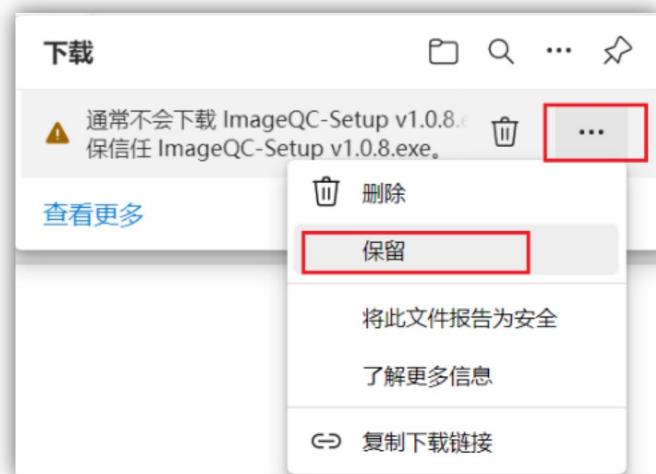
电脑 > 本地磁盘 (D:) > AutoUpload > ImageQC

名称	修改日期	类型	大小
sqlite3.dll	2021/11/8 15:11	应用程序扩展	1,156 KB
tcl86t.dll	2021/11/8 15:11	应用程序扩展	1,659 KB
tinyaes.cp36-win_amd64.pyd	2021/11/12 10:16	Python 扩展	40 KB
tk86t.dll	2021/11/8 15:11	应用程序扩展	1,919 KB
ucrbase.dll	2021/11/8 15:04	应用程序扩展	993 KB
unicodedata.pyd	2021/11/8 15:04	Python 扩展	878 KB
unins000.dat	2021/12/16 14:16	DAT 文件	610 KB
unins000.exe	2021/12/16 14:11	应用程序	3,323 KB
uploadConfig.ini	2021/12/8 16:59	配置设置	1 KB
VCOMP140.DLL	2021/11/8 15:11	应用程序扩展	181 KB
VCRUNTIME140.dll	2021/11/8 15:04	应用程序扩展	100 KB
VCRUNTIME140_1.dll	2021/12/16 10:26	应用程序扩展	44 KB
win32api.pyd	2021/11/8 15:11	Python 扩展	131 KB
win32evtlog.pyd	2021/11/8 16:04	Python 扩展	73 KB
win32pdh.pyd	2021/11/8 15:04	Python 扩展	34 KB

3.24 MB



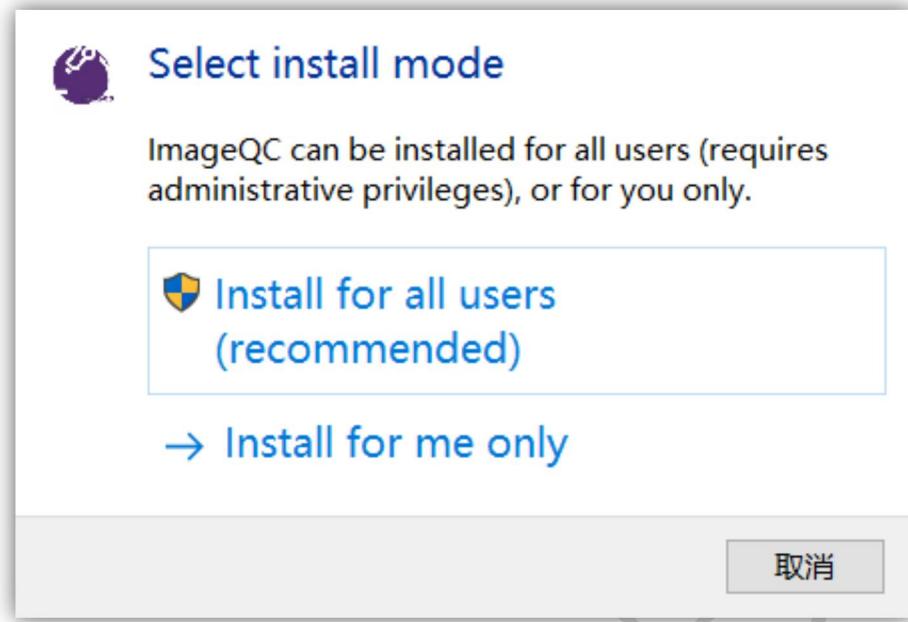
3、下载 ImageQC-Setup 1.1.0.exe 软件安装包，，下载过程中若是被操作系统拦截，点击 (...)保留，将安装包添加到信任中。



4、在 win10 x64 系统，内存 16G 及以上的环境中运行 ImageQC-Setup 1.1.0.exe。

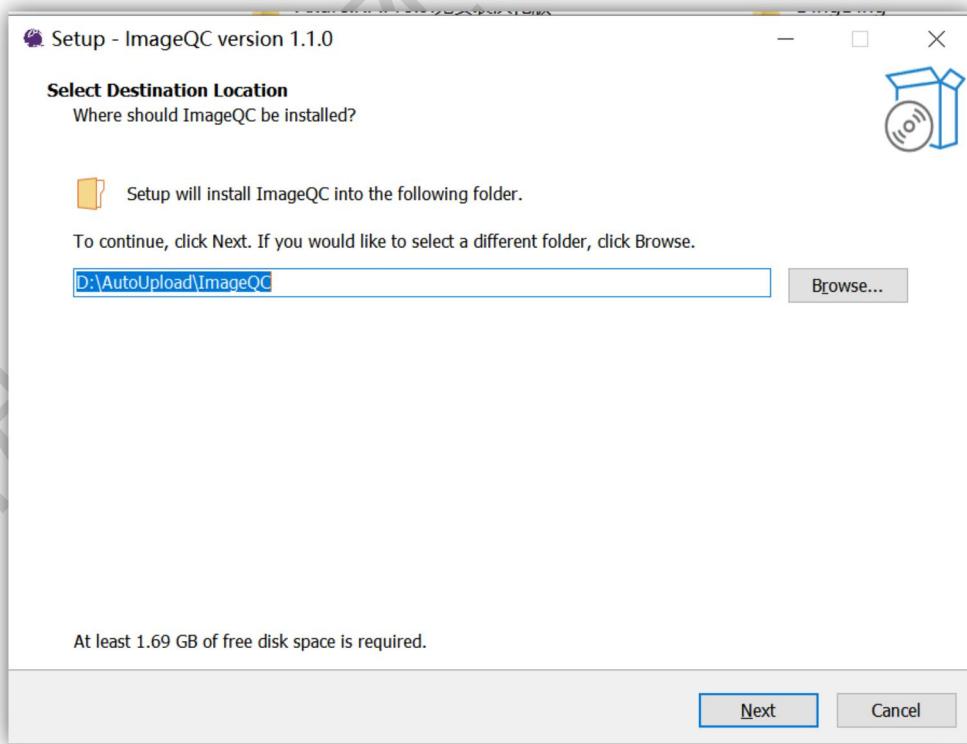


5、选择安装模式，建议选择第一个。

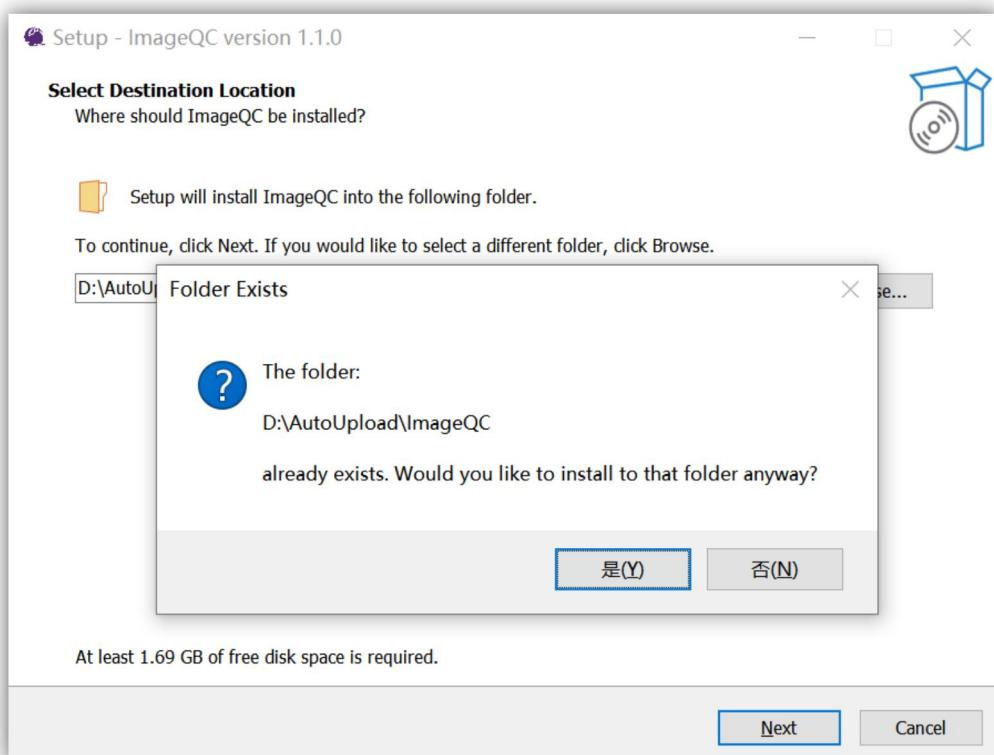


若是出现被杀毒软件拦截的情形，请将该软件添加到信任中，点击更多展开选项，然后点击仍要运行进行安装。

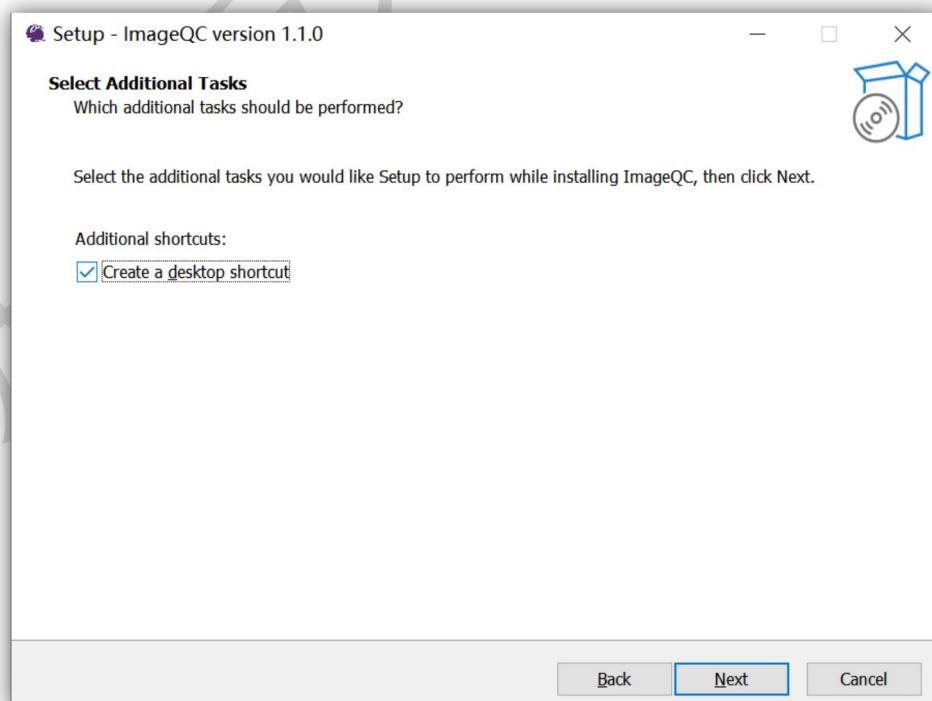
6、选择安装目录，建议安装在 D 盘(请确保 D 盘有足够的空间，推荐至少 20G 以上的存储)，安装在 C 盘可能会因为权限问题导致软件出错。

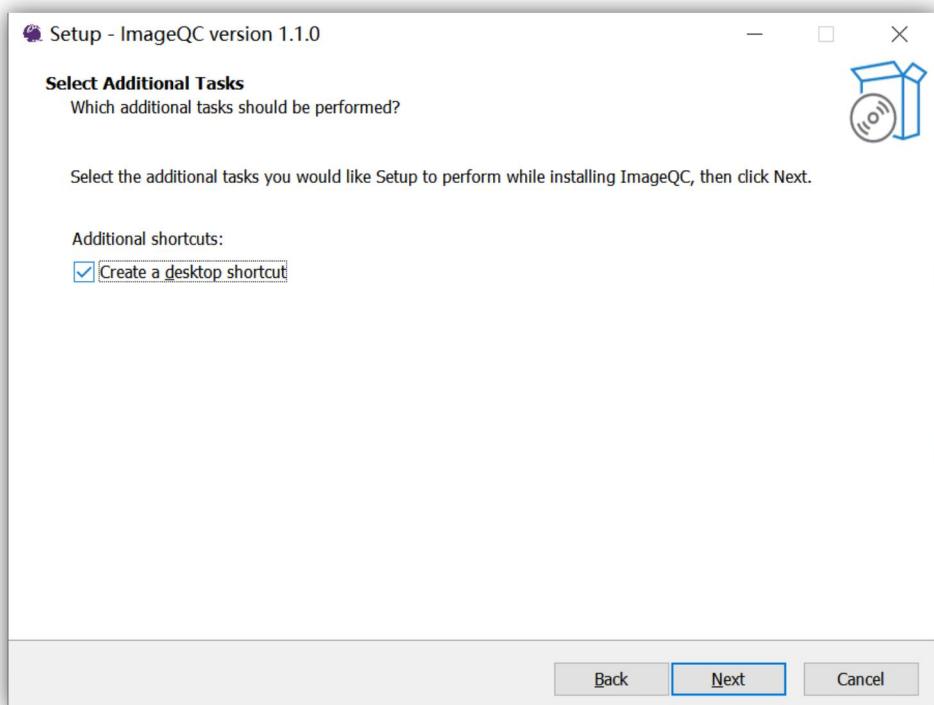


7、若之前已在该目录安装过 QC 程序，将提示是否安装，点击“是”即可。

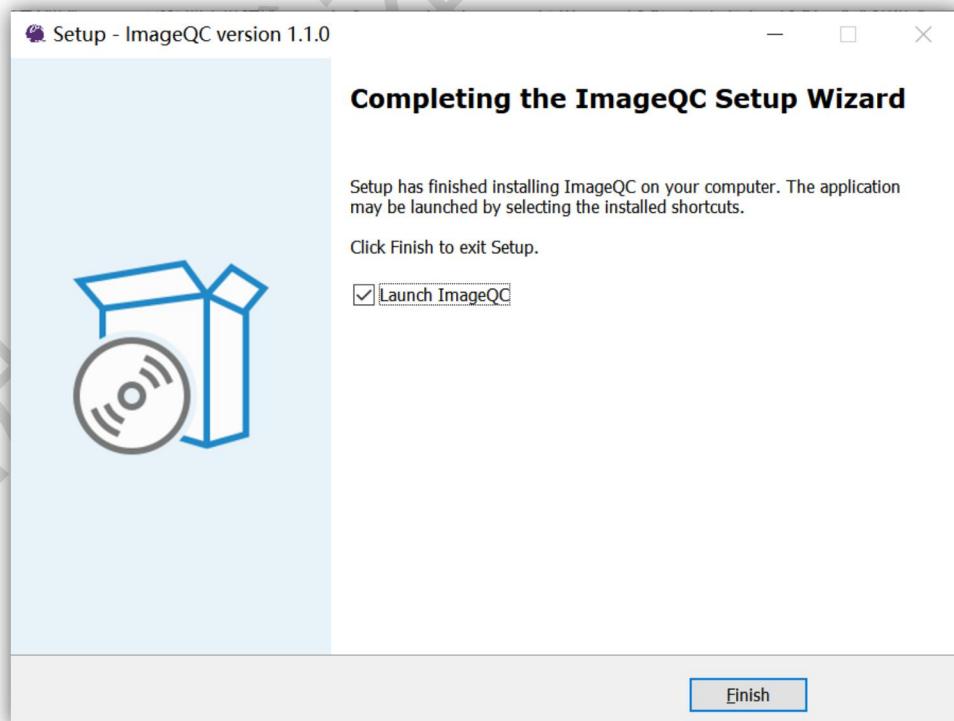


8、选择是否创建桌面快捷方式后点击“Install”进行安装。



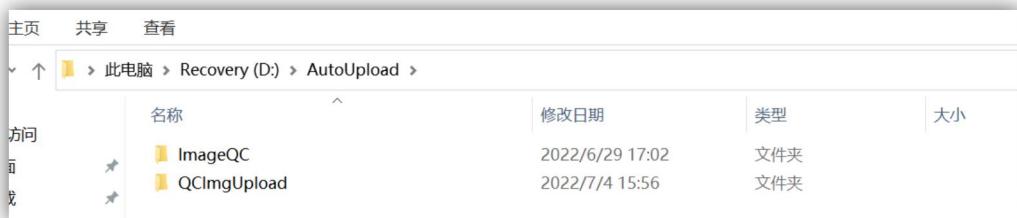


9、安装完成，勾选 Launch ImageQC 选项可直接启动 QC 程序。

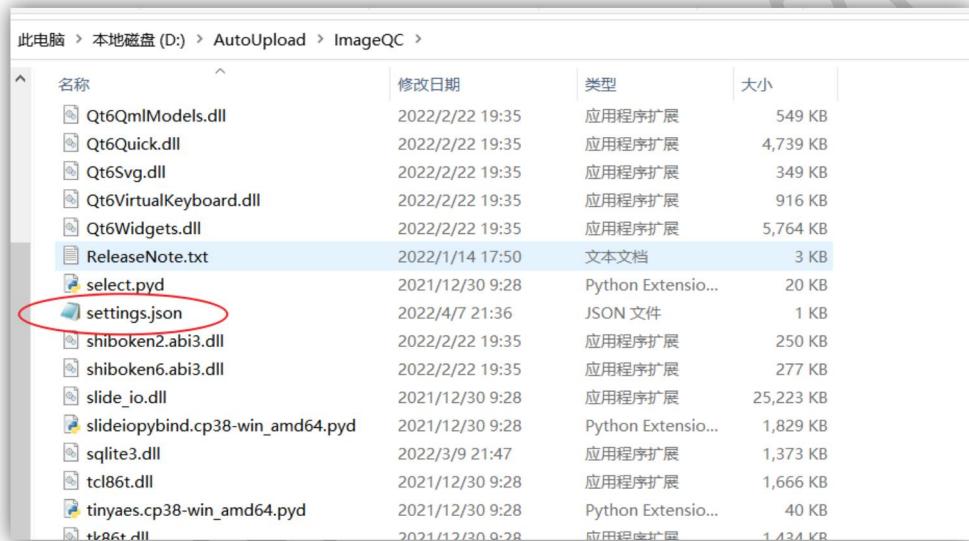


安装成功以后，在步骤 7 中选择的安装目标中将生成一个“ImageQC”文件夹，首次运行 ImageQC 软件

会自动生成“QCImgUpload”。



10、初次安装时或从 v1.0.8 及更早版本更新至 v1.1.0 或之后版本时，请检查 ImageQC 文件夹内是否存在 settings.json 文件，如不存在请先打开一次 QC 程序，将自动生成该文件：



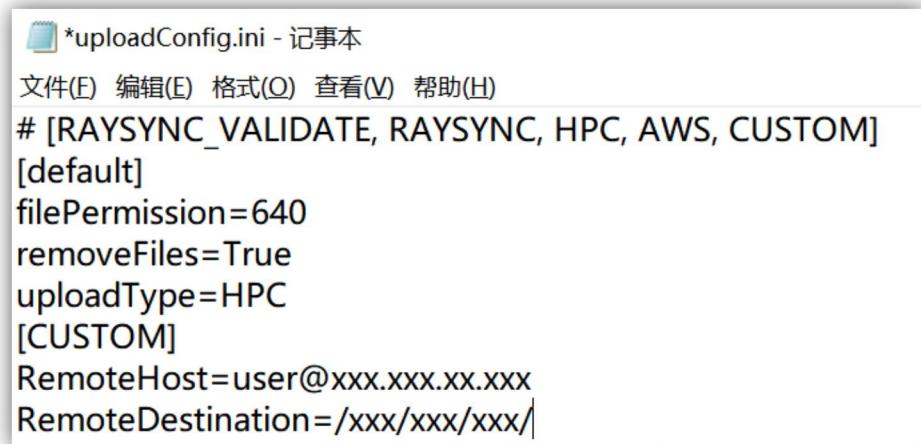
该文件为控制是否自动上传的配置文件，共四个条目，内容如下：

```
{  
    "qc_flag": true,  
    "upload_flag": false,  
    "language": "chn",  
    "cut_czi": false  
}
```

- **qc_flag**: 控制 QC 操作的条目，一般无需改动
- **upload_flag**: 控制自动上传的条目，默认为 true，即会自动上传；如不需要自动上传，请用记事本打开该文件，将该条目的 true 改为 false 即可。

- **language:** 程序界面语言，默认为 chn，即中文；需要英文界面可修改为 eng
- **cut_czi:** 控制 czi 文件处理方式的条目，一般无需改动。

11、安装完毕后请打开 ImageQC 文件夹内的 uploadConfig.ini 文件，检查上传方式。

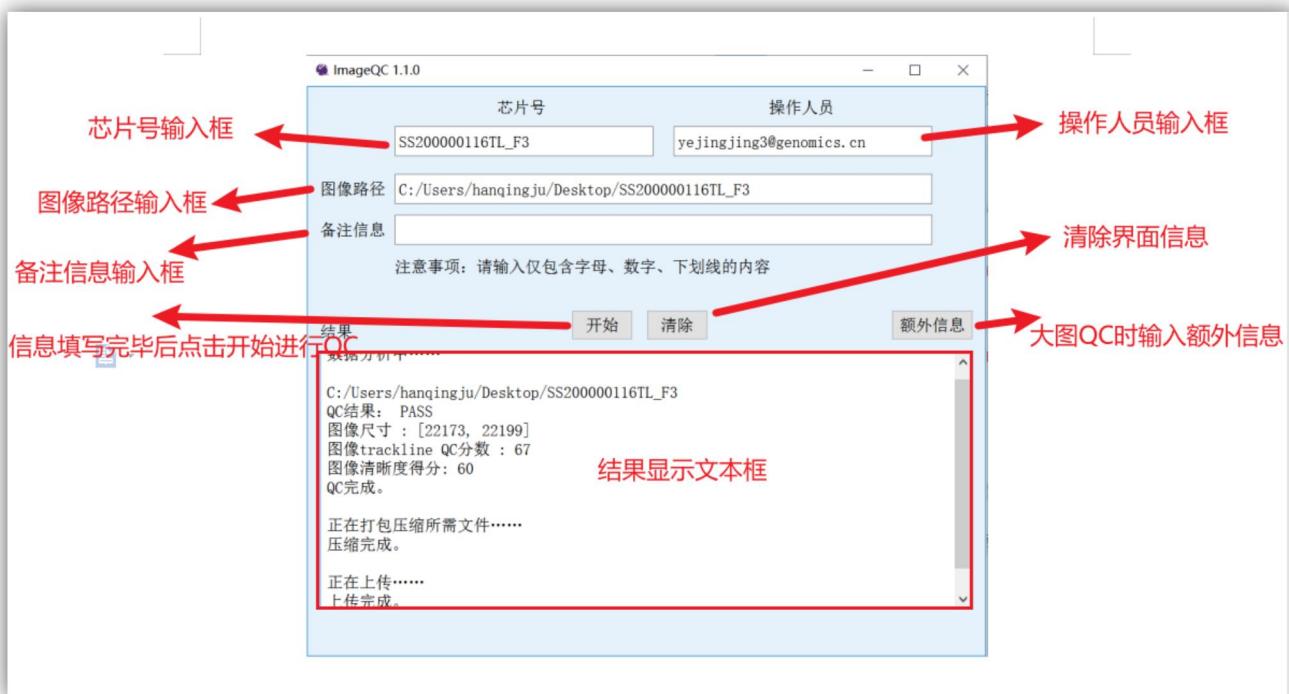


```
*uploadConfig.ini - 记事本
文件(E) 编辑(E) 格式(O) 查看(V) 帮助(H)
# [RAYSYNC_VALIDATE, RAYSYNC, HPC, AWS, CUSTOM]
[default]
filePermission=640
removeFiles=True
uploadType=HPC
[CUSTOM]
RemoteHost=user@xxx.xxx.xx.xxx
RemoteDestination=/xxx/xxx/xxx/
```

- **filePermission:** 文件上传到目标地点后的访问权限
- **removeFiles:** 是否删除本地 QC 的中间文件
- **uploadType:** 目前支持四种上传方式：
 - (1) HPC 为直接上传到华大深圳集群，需要联系交付的同事提前做好网络配置，适合华大内网使用；
 - (2) RAYSYNC 和 RAYSYNC_VALIDATE 均为镭速上传，连接互联网即可通过镭速上传到深圳集群而无需做其他配置，RAYSYNC_VALIDATE 为外部客户使用显微镜评估，当参数为 RAYSYNC_VALIDATE 并 QC 通过且上传成功时程序会将该参数改为 RAYSYNC；
 - (3) AWS 为亚马逊云上传方式，需要安装 Python 并配置账户密码，后续 ImageQC 版本中将会增加配置 AWS 路径功能。
 - (4) CUSTOM 为定制的 RSYNC 上传账号和路径，适用部署了自己的分析流程的片区，数据 QC 后是上传到自己的集群进行分析，比如目前的青岛片区。

4.3 软件使用说明

ImageQC 界面如下图所示



1、拍照完成后，打开 QC app（可建立桌面快捷方式，打开后可以一直不关闭）。



2、从外部拖入拍照图像文件至程序窗口（拖入窗口范围即可，无需精准拖入文本框）。

1) Motic 显微镜：拖入 mdsx 文件所在的文件夹。

(1) Zeiss Axio Scan Z1 or Axio Scan 7：拖入 czi 格式的原始文件。

(2) Leica DM6-M：拖入 TIFF/ PNG 格式的拼接图片。

(3) 其他显微镜 (API 接口开发前)：拖入 TIFF/ PNG 格式的拼接图片。

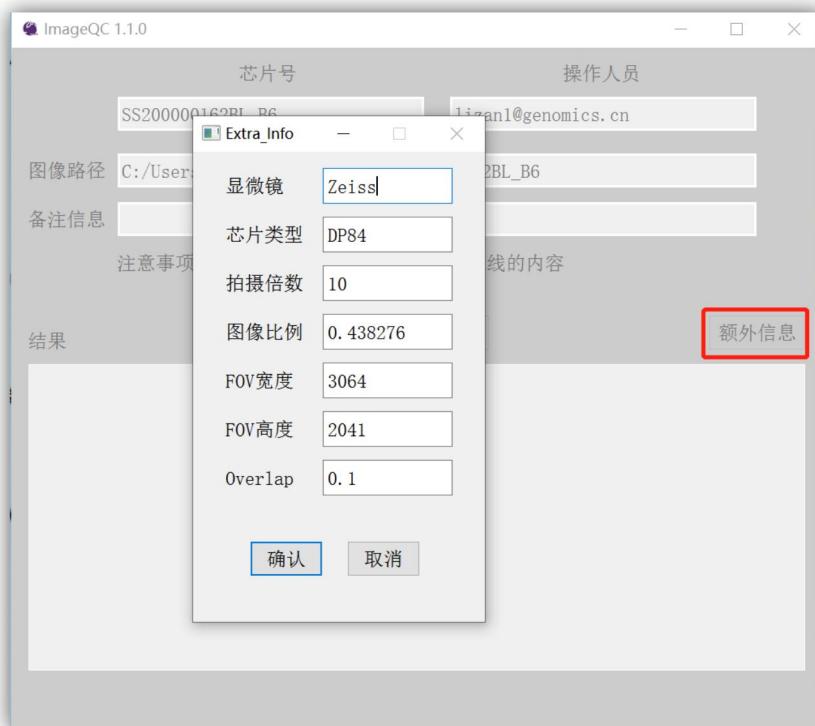
(4) 其他显微镜 (API 接口开发后)：

- 输入 TIFF/ PNG 格式小图 fov 的保存路径。

- 拖入显微镜生成的原始文件。

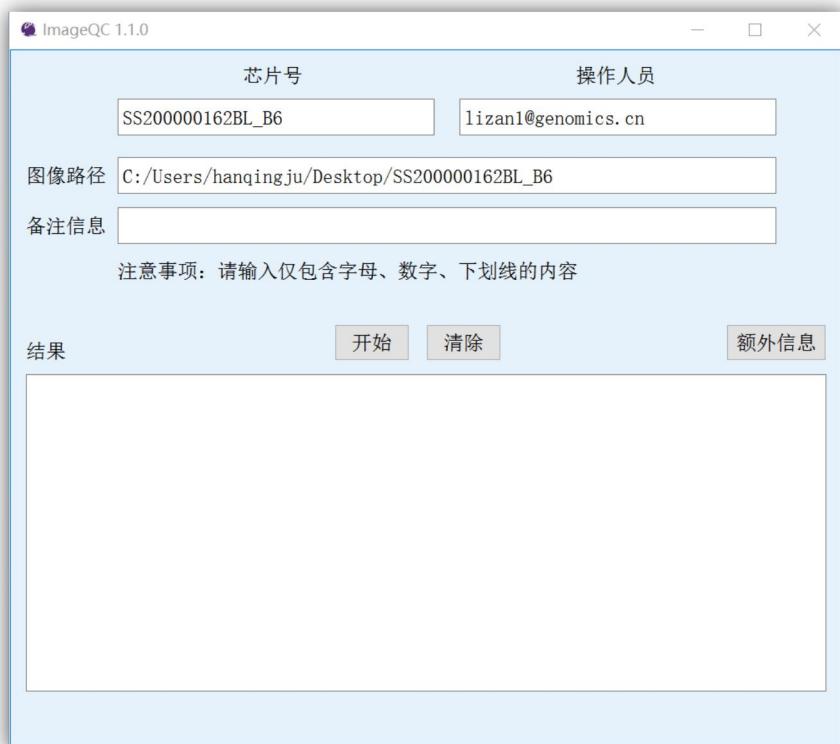
3、当拖入图片为拼接好的大图，如 czi 等格式没有图像参数信息时，软件会自动弹框如下图所示，用户需要根据弹窗手动先写如下入的图像参数信息。

说明：如果使用 TIFF/ PNG 格式的小图 FOV，则不需要这些参数。



- **显微镜**: 输入显微镜品牌英文名称，目前支持 Zeiss, Leica 和 Motic 等。
- **芯片类型**: 输入标准 STOmics 芯片型号，目前支持 (FP2, SS2, DP8, DP84)
- **拍摄倍数**: 输入拍摄时显微镜的放大倍数
- **图像比例**: 输入拍摄图像的比例，单位为 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ (微米每像素)，请至少输入三位小数
- **FOV 宽度, FOV 高度**: 输入拍摄时的一个 FOV 的尺寸。
- **Overlap**: 输入相邻两个 FOV 拍照时的重叠比例 (如果宽高的 overlap 不一样，取大的)

4、输入芯片号和操作人员邮箱。



芯片号: 输入拍摄图像的芯片号，目前仅支持标准 STOmics 芯片号

1) 时空芯片号长码规则如下：

A	B	C	D	SN#命名规则					示例(条码)	芯片ID	时空芯片
				起始符	特殊符 (Version相关)	8位流水号	尾号	SN#位数			
3	V1	V3.1(1x1)	CL	1	xxxxxxxx		11	CL100117265	CL100103624	CL1	
		V3.1(0.8x0.8)	CL	2	xxxxxxxx		11			CL2	
5	V2	V2.2(800nm pitch)	V	1	xxxxxxxx		10	V100000599		V1	
		V2.3(715nm pitch)	V	3	xxxxxxxx		10	V3000010004	V300001673	V3	
7	V0.1	V3.0	N	1	xxxxxxxx		10	N100001211		N1	
8	V0.2	V3.0(900nm pitch)	S	1	xxxxxxxx		10	S1000XXX		S1	
		715 FCL	S	2				S2000000001		S2	
		715 FCS	N	2				K2000000001		K2	
11	T7	V40.1(700nm pitch)	G	1	xxxxxxxx		10		G1000537	G1	
12	T7 RFID	V40.1(700nm pitch)	E	1	xxxxxxxx		10			E1	
13											
14											
5	DipT1	V8.1 (850nm pitch)	DP8		xxxxxxxx	TL/TR/BL/BR	13	DP800003862BL	DP800003791BL	DP8	
6		V8.4(715nm pitch)	DP8	4	xxxxxxxx	TL/TR/BL/BR	14	DP8400003767TL		DP84	SS84 21.06.09
7	DipT5	FP1(600nm pitch)	FP	1	xxxxxxxx	TL/TR/BL/BR	13	FP1000002848R		FP1	
8	DipT10-V8	FP2(500nm pitch)	FP	2	xxxxxxxx	TL/TR/BL/BR	13	FP200000001TL		FP2	
9	DipT10	FP2(500nm pitch)	FP	2	xxxxxxxx		11	FP2000000001		FP2	SS2
20	DipT7	V40.1(700nm pitch)	DP	40	xxxxxxxx	TL/TR/BL/BR	13	DP4000000001TL		DP40	
21	DipT20	FP2(500nm pitch)	FP	21	xxxxxxxx		12	FP2100000001		FP21	2020.01.21

Chip T(6*6)DipT10-V8 芯片：起始符 (SS/FP) + 版本相关(2) + 流水号(8 位数字) + 尾号

(TL/TR/BL/BR) + 区域号 (A1-F6, 两位或四位)

Chip T(6*6)DipT1 芯片: 起始符(DP8) + 版本相关(4 或空) + 流水号(8 位数字) + 尾号(TL/TR/BL/BR)

+ 区域号 (A1~F6, 两位或四位)

Chip T(13*13) DipT10 芯片: 起始符 (FP) + 版本相关(2) + 流水号(8 位数字) + 区域号 (A1~ND, 两
位或四位)

2) 时空芯片的短码规则如下:

第一位 (共 1 位) 由大写英文字母分别表示 (代表 Chip T(6*6) 芯片方向)

方向	TL T10	TR T10	BL T10	BR T10	T10
规格	Chip T(6*6)	Chip T(6*6)	Chip T(6*6)	Chip T(6*6)
代表字母	A	B	C	D	Y

第 2~6 位 (共 5 位) 由数字[0~9]标识时空芯片后 5 位数字编码。

第 7~10 位表示切割成小芯片编码:

若是 Chip T(1*1) 的小芯片, 则用 2 位表示。若是不切割则标识 00; Chip T(6*6) 中行用 A~F 表示, 列用 1~6 表示; Chip T(13*13) 中行用 A~H 及 J~N (为避免 I 和 1 混淆, 不用 I), 列用 1~9 及 A~D 表示。

例如: 长码芯片号 SS2000123456BR, Chip T(6*6) 切割为 B2 位 Chip T(1*1), 则编号为 D23456B2

长码芯片号 SS2000123456BR, Chip T(13*13) 切割为第 11 行第 12 列 Chip T(1*1), 则编号为 Y23456LC

若是非 Chip T(1*1) 芯片, 即 M*N 的芯片, 则用 4 位表示。Chip T(6*6) 中行用 A~F 表示, 列用 1~6 表示; Chip T(13*13) 中行用 A~H 及 J~N (为避免 I 和 1 混淆, 不用 I), 列用 1~9 及 A~D 表示。

例如: 长码芯片号 SS2000123456BR, Chip T(6*6) 切割为 A1B2 位 2*2 芯片, 则编号为 D23456A1B2

长码芯片号 SS2000123456BR, Chip T(13*13) 切割为 A1C2 位 2*3 芯片, 则编号为 Y23456A1C2

操作人员：输入拍图人员的邮箱前缀

注意：若拍照时已经输入芯片号和拍图人员邮箱，这两栏会自动读取芯片号和拍图人员并显示，如果在这两栏中输入内容，将覆盖拍照时输入的内容，用于修改拍照时可能出现的输入错误。

备注信息：输入图像的额外描述信息，用于记录各类不同情况

5、点击“开始”按钮开始 QC，程序将显示“数据分析中”，此时正进行 QC 操作，等待完成即可。



6、QC 完成后，程序将显示 QC 结果，第二行显示 PASS 表示 QC 通过，FAILED 表示未通过（如果未通过请检查图片、芯片号或重新扫描拍照，重新拍照仍然不过请联系 FAS）；最后一行显示“QC 完成”表示 QC 流程正常结束。

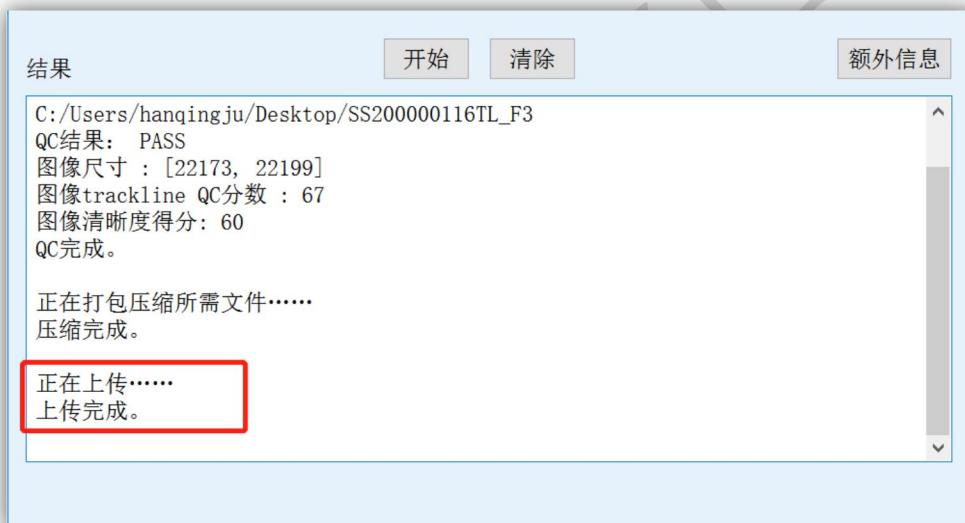


7、QC 结束后，程序将把需要的文件打包成压缩文件，此时程序将显示“正在打包压缩所需文件”，结束后将显示“压缩完成”。



如不需要上传，则图像 QC 至此完成，点击“清除”按钮清空程序窗口中内容后即可拖入下一张图像进行 QC。

如已配置自动上传功能，则压缩完毕后程序将继续进行上传操作，此时程序将显示“正在上传”，结束后将显示“上传完成”。



图像 QC 至此完成，可进行下一张芯片 QC 或结束程序。

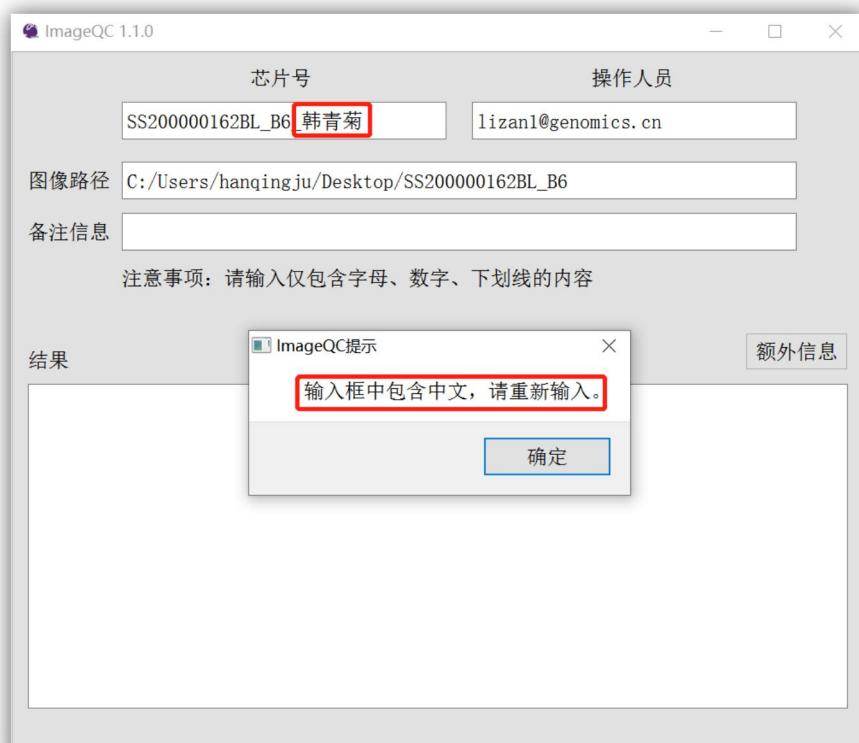
9、ImageQC 文件输出为一个 tar.gz 压缩文件和一个 ipr 文件。若设置了上传时，该 tar.gz 压缩文件和 ipr 文件将会被上传到指定的路径进行后续的数据处理分析流程。

名称	修改日期	类型	大小
SS200000116TL_F3_20220718_144245_1.1.0.ipr	2022/7/18 14:44	IPR 文件	45 KB
SS200000116TL_F3_20220718_144245_1.1.0.tar.gz	2022/7/18 14:44	GZ 压缩文件	249,937 KB

对于只用 SAW 的用户手册更新为：适配的 SAW 版本为 5.1.0

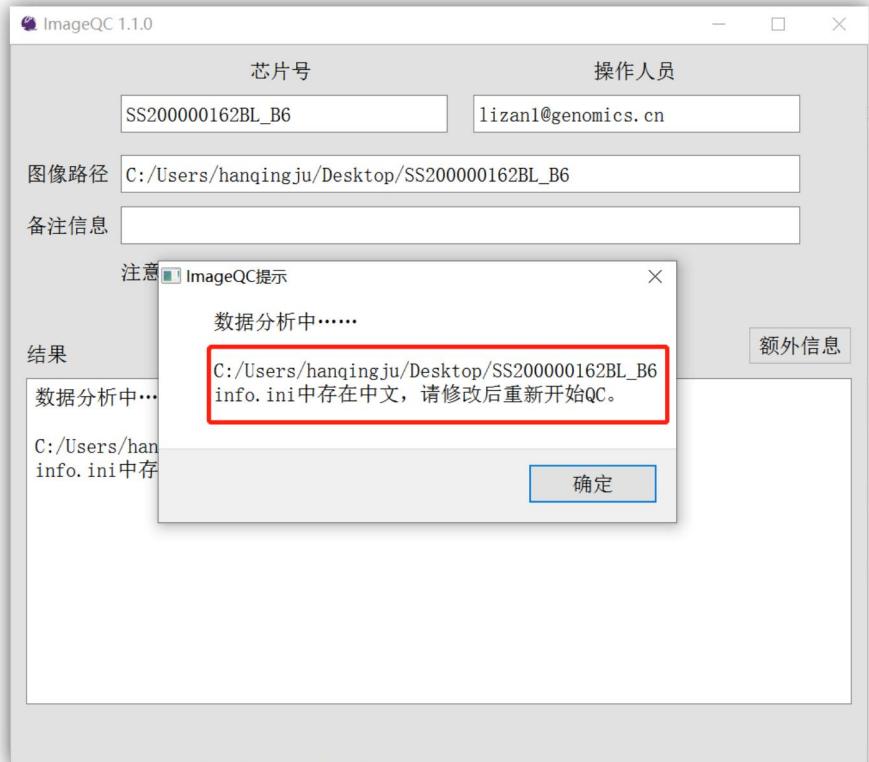
4.4 异常情况说明

(1) 如输入芯片号等信息时输入了中文，程序将弹出如下提示窗口：



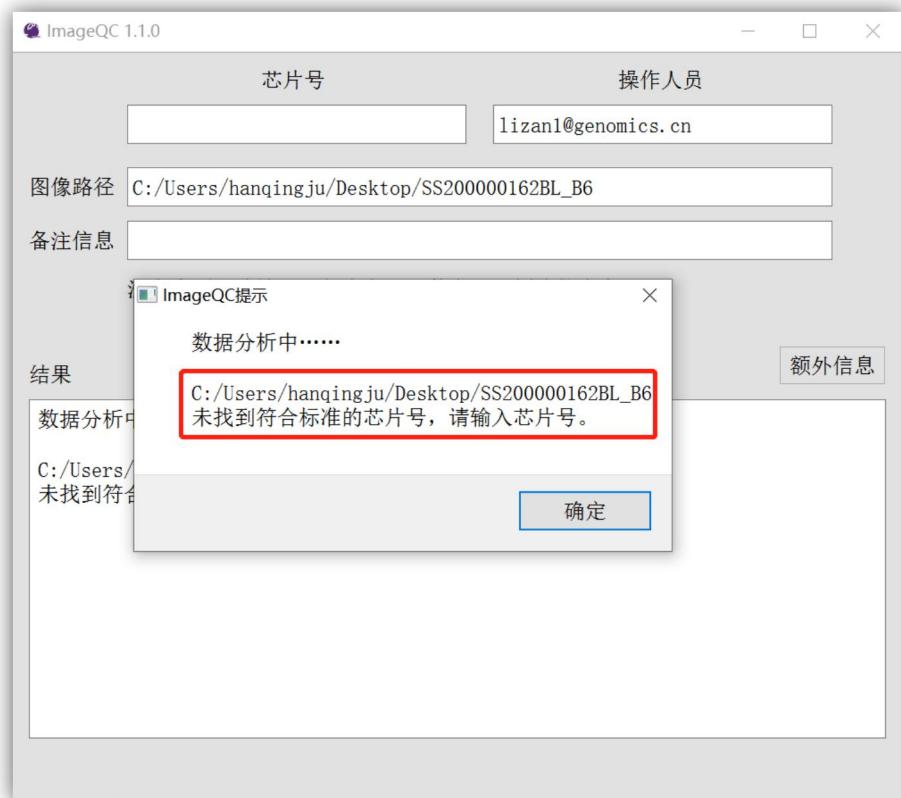
请确认输入的内容和图像路径不包含中文后重新开始 QC。

(2) Motic 错误：如显微镜输出的 info.ini 文件中存在中文，程序将弹出如下窗口：

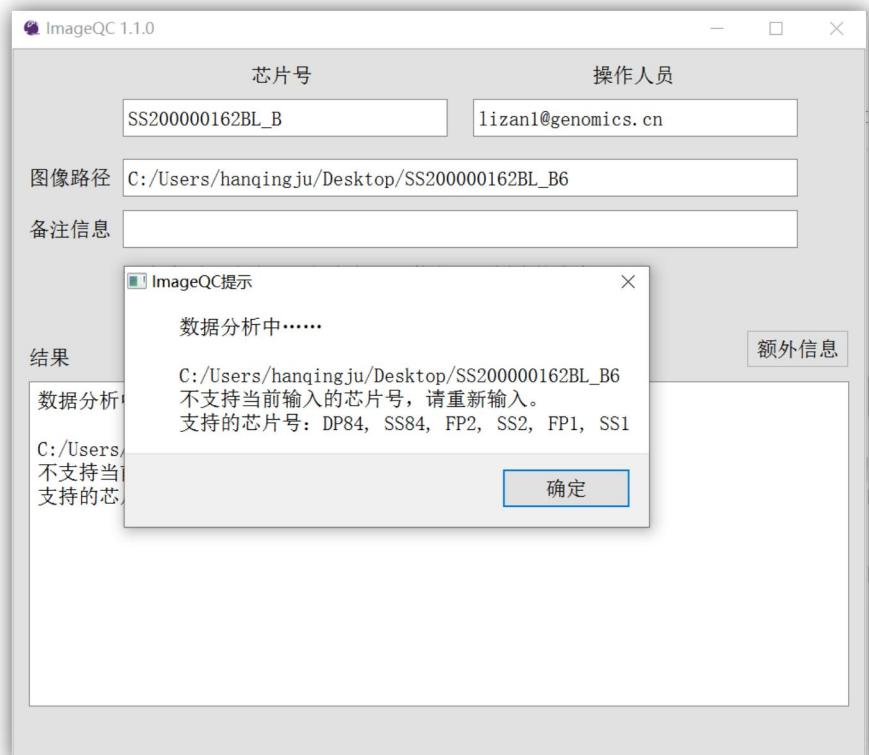


请检查并修改该文件中的内容后重新开始 QC。

(3) 若拍照时忘记填入芯片号、操作人员信息或填入不支持的芯片类型的芯片号，则 info 文件中相应信息将为空或错误；此时若 QC 中也没有输入芯片号，将弹出如下提示窗口：

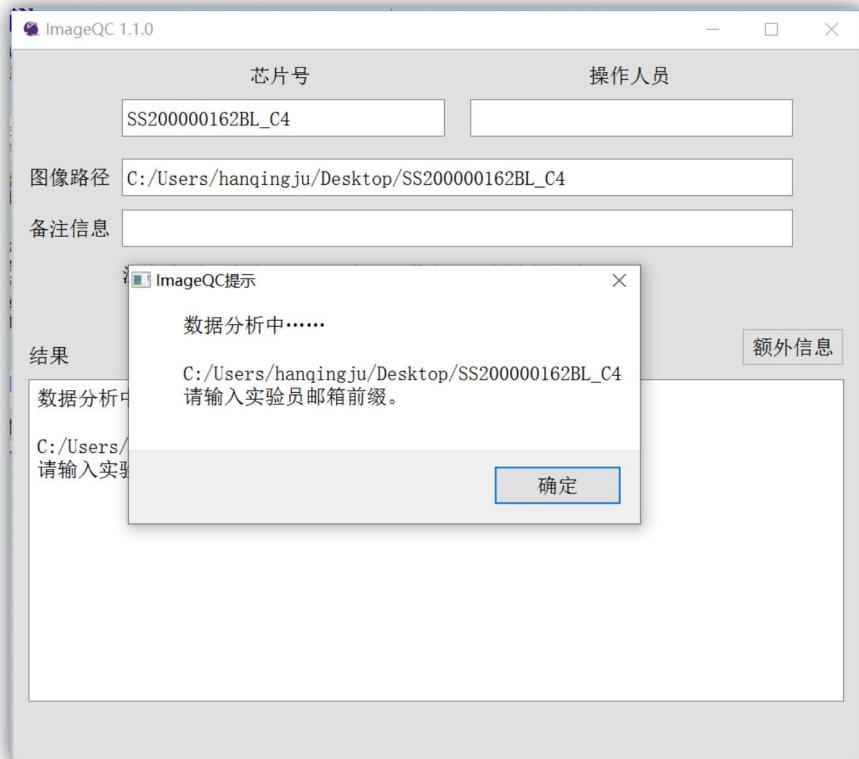


如输入了另一个错误的芯片号，将弹出如下提示窗口：



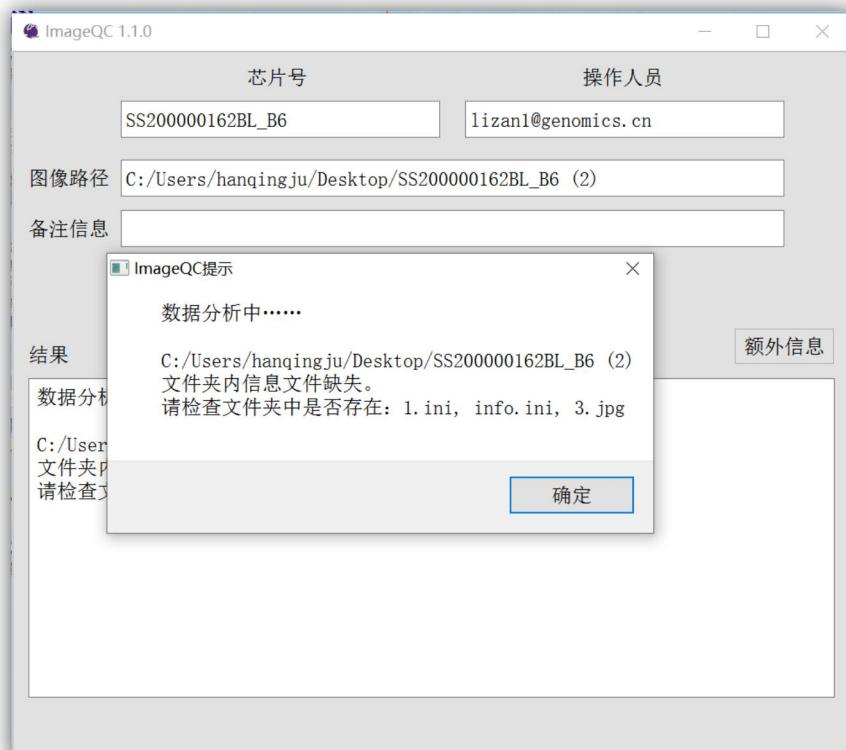
最后一行为支持的芯片类型。

(5) 若拍照时没有输入邮箱, QC 中也没有输入邮箱前缀, 将弹出如下提示窗口:

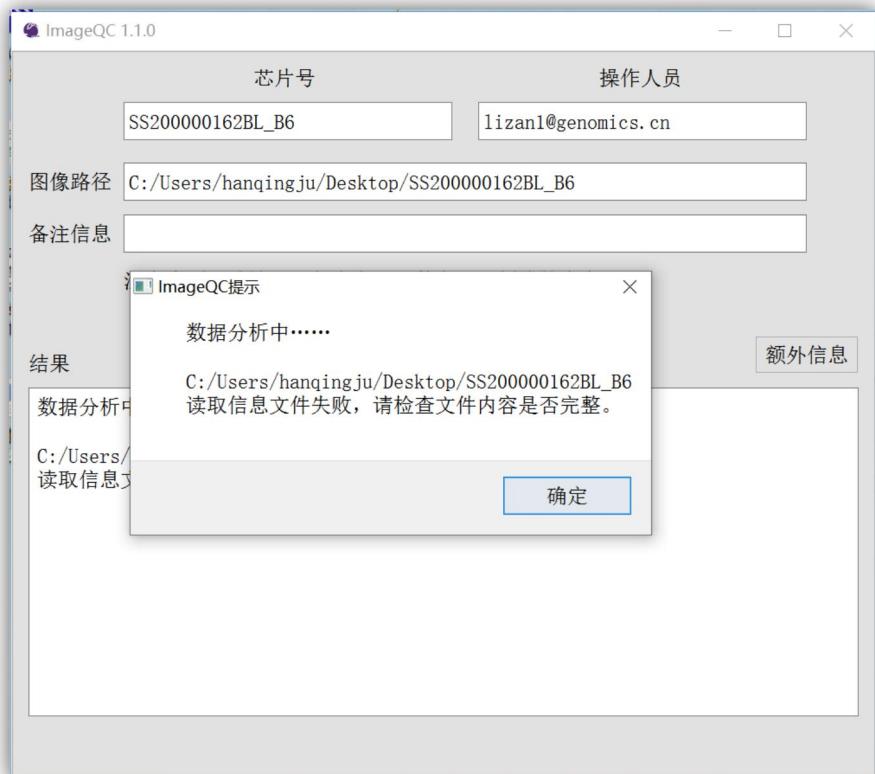


(6) Motic 错误:

如 Motic 图像文件夹内缺少必须文件或文件中内容不完整，将弹出如下提示窗口并中止 QC，此时请根据提示检查文件。如下图提示原因为 1.ini, info.ini 和 3.jpg 至少缺少一个，应为显微镜正常生成，如缺失需重新拍照，重新拍照依然存在此问题请联系 FAS。



如下图提示原因为读取 1.ini 或 info.ini 出错，主要可能性为 info.ini 中缺少 QC 程序读取的信息条目，如拍照时正常输入所有所需信息，则可能为显微镜输出错误或文件损坏，需重新拍照，重新拍照依然存在此问题请联系 FAS。



(7) 若 QC 结果显示图像尺寸为 [0 0], 原因为程序内部存在问题, 此时结果显示窗口将显示:

此时请记录对应图像并联系 FAS。

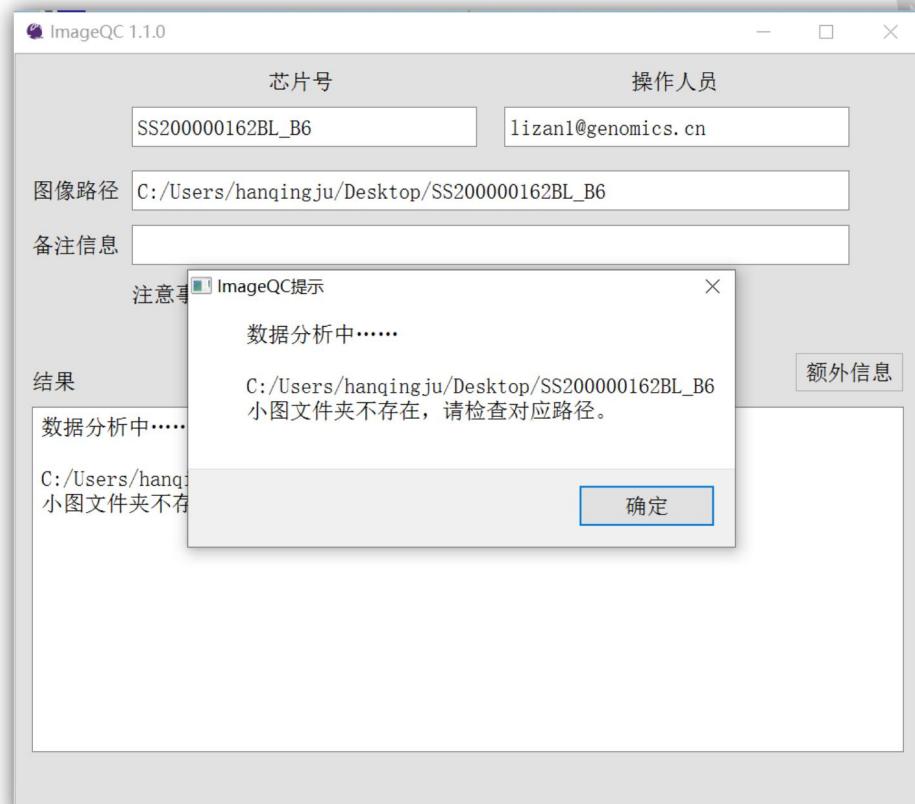


(8) 上传失败时, 结果显示框将给出如下提示:

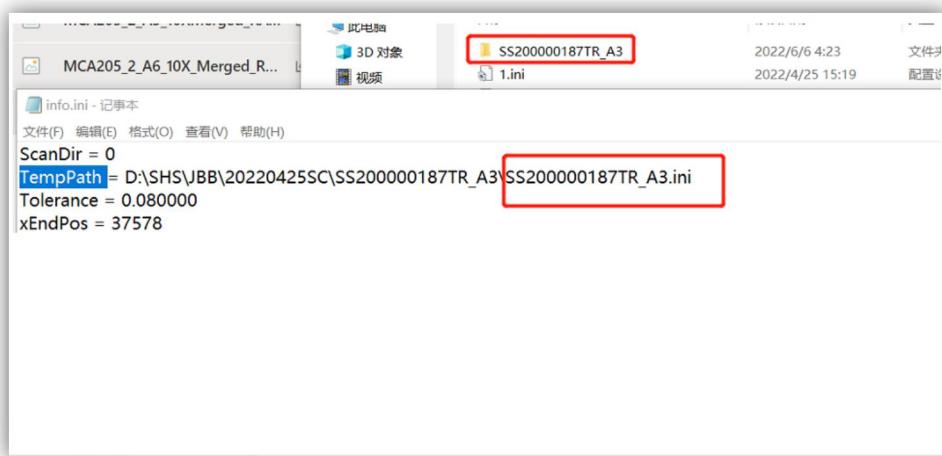


请根据提示检查网络配置和网络连接后重新上传，此时拖入同样的图像文件，输入同样的芯片号和操作人员后点击“开始”按钮，将进入上述 1) 中的情形，跳过 QC 检查步骤。

(9) 小图文件夹不存在异常。

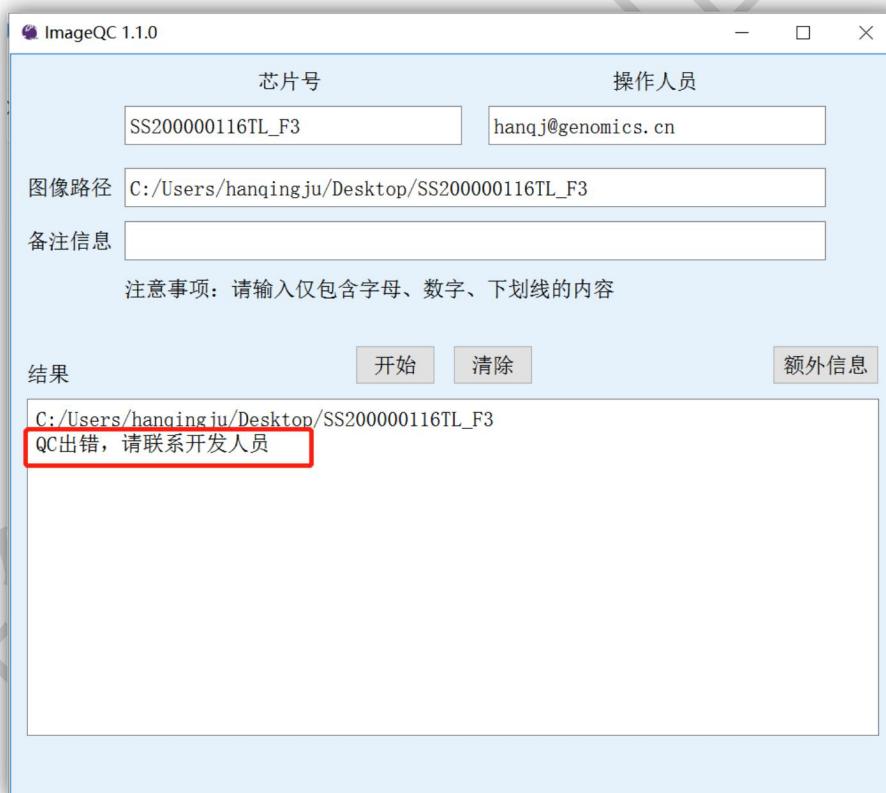


请检查该数据是否有小图文件夹，若有小图文件夹，则打开 info.ini 文件找到 TempPath，将路径中的文件名部分改为‘小图文件夹名+.ini’。



(10) 发生预料之外的错误时，界面如下显示：

请检查参数输入，若未能解决请将数据样本以及所填参数信息反馈给开发人员。



第五章 接口文档

5.1 介绍

通过拼接重叠的图片，自动显微镜可捕获比 FOV 更大的样本区域。在 STOmics 分析中，拼接的组织荧光染色图（ssDNA）可做转录组数据的可视化分析。因此，图像的拼接误差是影响转录组数据分析的关键因素，提高图像的拼接精度一直是该领域面临的挑战。

我们的算法是基于图像 track (源自 STOmics 芯片) 线重新拼接图像，在拼接过程中需要显微镜本机的拼接参数，该参数是每个显微镜特有的。所以，必须开发一个应用程序编程接口(API)来适配各个不同型号的显微镜以适应 SAW (STOmics 转录组分析流程软件包)。关于 API 开发需求，请参阅 5.2 节。一旦接口开发完成，通过成像矫正算法，可以显著提升 cellbin 效果。

备注：市面上大多数显微镜的拼接精度在 10 像素左右。然而，要实现单细胞分割(cell -bin)，需要≤5 像素的精度。

5.2 显微镜 API 接口文件信息

提供以下选项之一，可以帮助我们的研发团队从图像原始文件或导出的图像(TIFF/ PNG)检索足够的信息：

选项一：

- ① 用 python 编写的开源库。
- ② 图像原始文件格式(例如，Olympus VS200 的 vsi 格式)
- ③ 图像原始文件的参数如下表所示：

Parameter	Corresponding file name	Field name in the file
TempPath		
Manufacturer		
Scale		
BitDepth		
OverlapX		
OverlapY		
ScanRows		
ScanCols		
FOVHeight		
FOVWidth		
SlideInfo		
Channel		
Experimenter		
RemarkInfo		
ImagePath		
DeviceSN		
ControllerVer (Imaging Software)		
CameraID		
CameraName		
ComputerName		
AppBuildDate		
AppName		
AppFileVer		
GUID		
ScanTime		
ScanObjective		
ExposureTime		

RGBScale		
Brightness		
ColorEnhancement		
Contrast		
Gamma		
GammaShift		
Sharpness		
DistortionCorrection		
BackgroundBalance		

备注：表中加粗的参数是必须的，其他是可选参数。

选项二：

- ① 显微镜自动拼接的格式为 TIFF/ PNG 的大图
- ② 格式为 TIFF/ PNG 的小图 FOV，包含文件信息且参数如下表所示：

Parameter	Corresponding file name	Field name in the file
TempPath		
Manufacturer		
Scale		
BitDepth		
OverlapX		
OverlapY		
ScanRows		
ScanCols		
FOVHeight		
FOVWidth		
SlideInfo		
Channel		
Experimenter		
RemarkInfo		
ImagePath		
DeviceSN		
ControllerVer (Imaging Software)		
CameraID		
CameraName		
ComputerName		
AppBuildDate		
AppName		
AppFileVer		
GUID		
ScanTime		
ScanObjective		
ExposureTime		

RGBScale		
Brightness		
ColorEnhancement		
Contrast		
Gamma		
GammaShift		
Sharpness		
DistortionCorrection		
BackgroundBalance		

备注：表中加粗的参数是必须的，其他是可选参数。

拼接信息：

① 如何在显微镜生成的自动拼接大图中检索每个图像块(单个 FOV)的列和行位置。若没有分配给每个图像块的序列号，需要知道图像的排列模式(例如，从左到右线性排列，或以 Z 字形排列)。

② 如何检索自动拼接图像中每个图像块的原点(即左上角像素)的坐标，以及拼接背后的计算逻辑。可参考下表：

Individual image file path	FOV_X (stitched image)	FOV_Y (stitched image)