

ImageJ를 이용하여 특정 세포영역의 형광 signal 정량

ImageJ는 미국 국립보건원(NIH)와 위스콘신 대학교 LOCI (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation)에서 제작 배포한 Java-based image processing program입니다. ImageJ는 immunofluorescence (IF)로 염색된 images의 channel별 분리 및 region measurement (MetaMorph 대비 image raw data에 저장된 parameters의 활용도가 떨어짐 but case by case). ImageJ를 활용하는 방법 중, 세포(cell) 전체영역에서 핵(nucleus)만 오려내어 핵 내에 위치하는 target protein의 fluorescent signal을 정량하거나, 핵을 제외한 cytosol부분만 filtering하여 cytosol에 존재하는 target protein의 fluorescent signal을 정량화 할 수 있습니다. 또한, region of interest (ROI) 영역 설정을 통해 개별 세포, 세포질, 핵의 면적, 형광 intensity (mean value) 등을 계산하여 수치로 확인할 수 있습니다. ImageJ로 분석 algorithm 또는 building block을 직접 제작하기 어려운 경우에는, 세포체학실험실에 보유중인 MetaMorph 또는 Imaris를 사용하여 분석한다면, 여러모로 손쉽게 분석을 할 수 있습니다.

Image J 를 이용해서 cytosol 에 존재하는 green signal 과 nucleus 에 존재하는 green signal 을 염색된 fluorescence 의 intensity 를 기준으로 분석하는 방법은 아래와 같습니다.

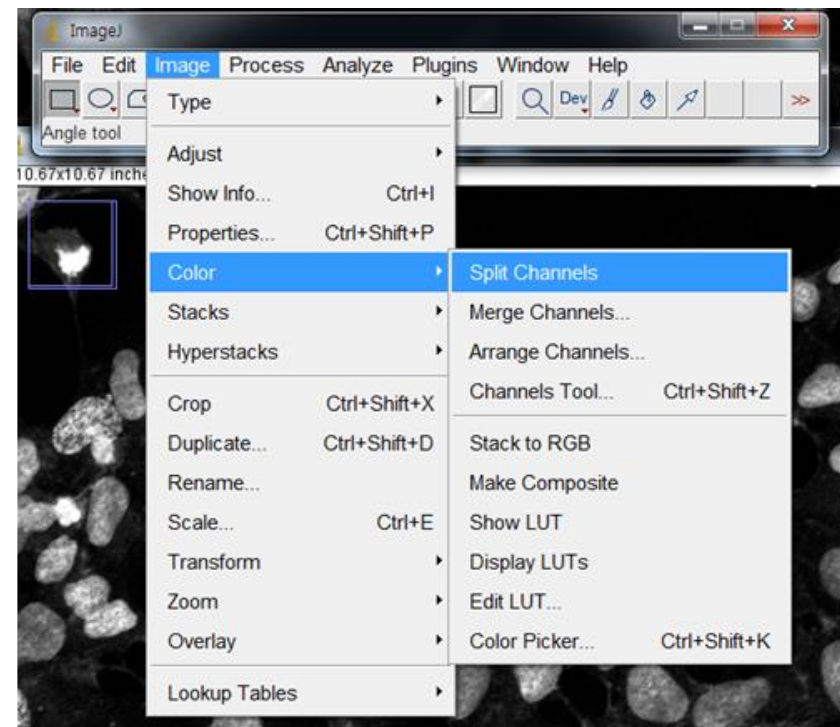
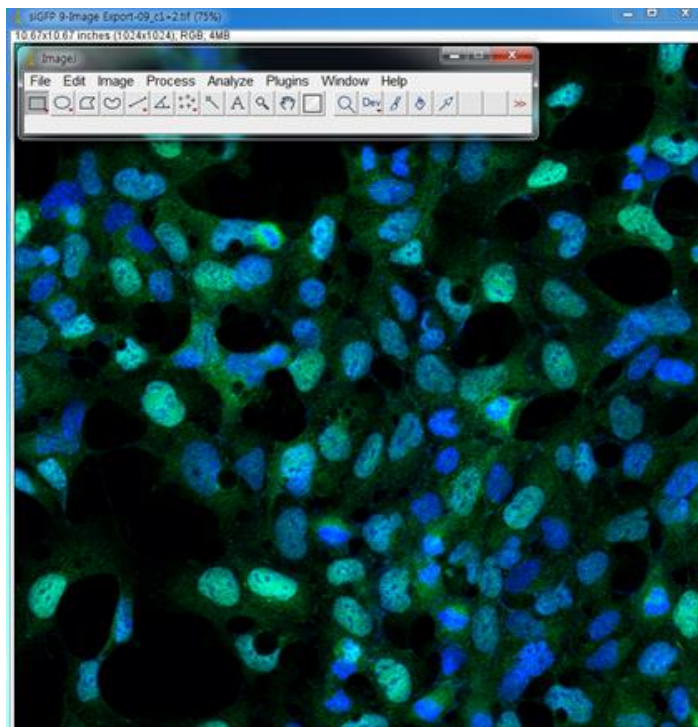
1. Image J -> Open image 를 해서 merge 된 image 를 엽니다.
2. Image tab 에서 color 를 선택하고 -> split channel 을 합니다 -> 이렇게 하면 green 과 dapi image 로 분리가 됩니다.
3. Dapi image 를 클릭한 다음, 상단의 Image tab 에서 -> Adjustment -> Threshold 를 선택하면, 2 개의 조절 bar 가 생기는데, 그 중, 위에 것을 마우스를 이용하여 nucleus 만 masking 되도록 조절합니다(이때 모든 image 를 동일한 조건에서 분석하고자 하기 때문에 수치로 기입해주고, 이후 다른 image 들도 동일한 수치로 threshold 를 주면 됩니다).
4. 상단의 Analyze tab 에서 Analyze Particles 로 들어갑니다. -> default 설정 또는 아래 check 박스를 모두 check 한 다음 measure 를 클릭합니다.

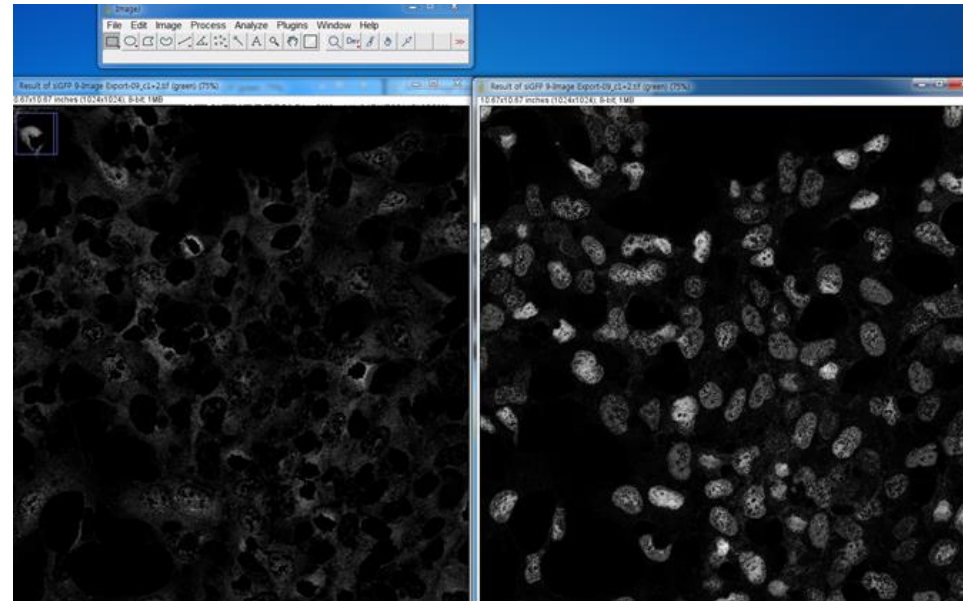
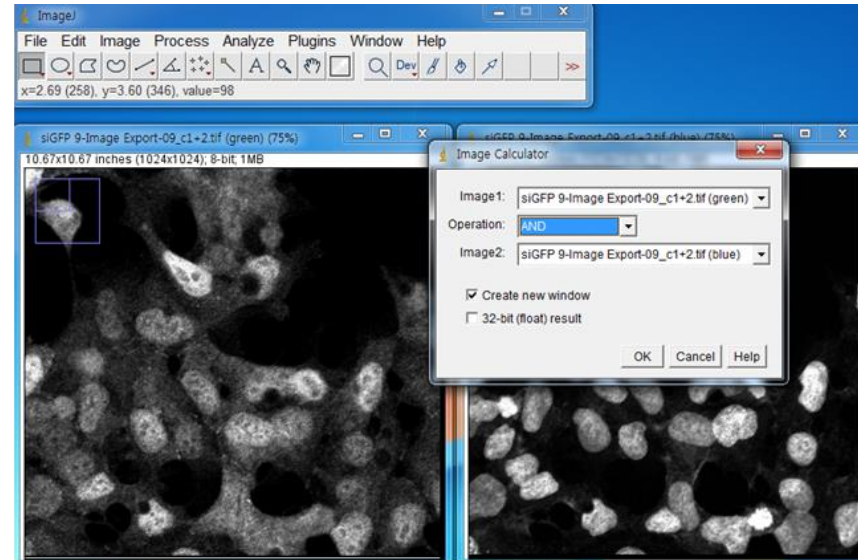
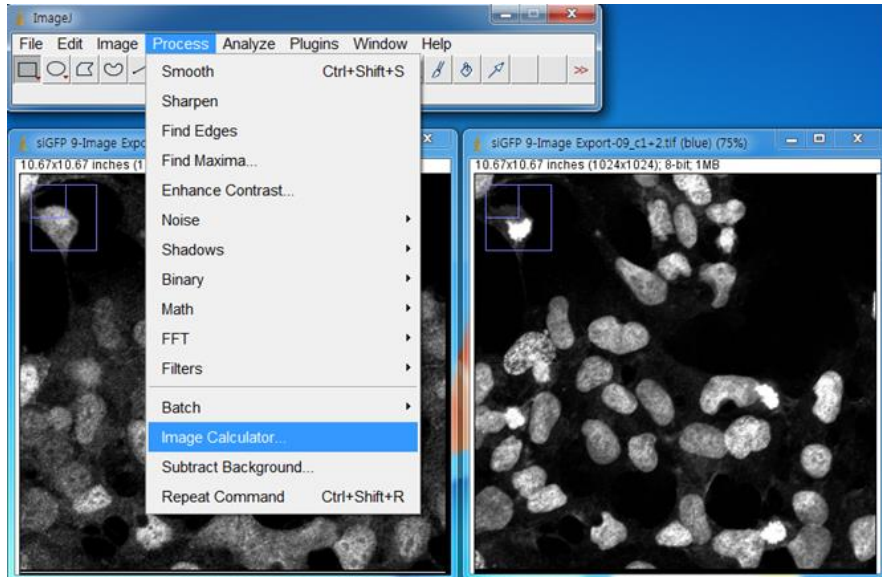
이렇게 하면, nucleus counting 과 함께 각각의 핵에 염색된 Dapi fluorescence 의 intensity 의 mean gray value 값을 얻을 수 있습니다.

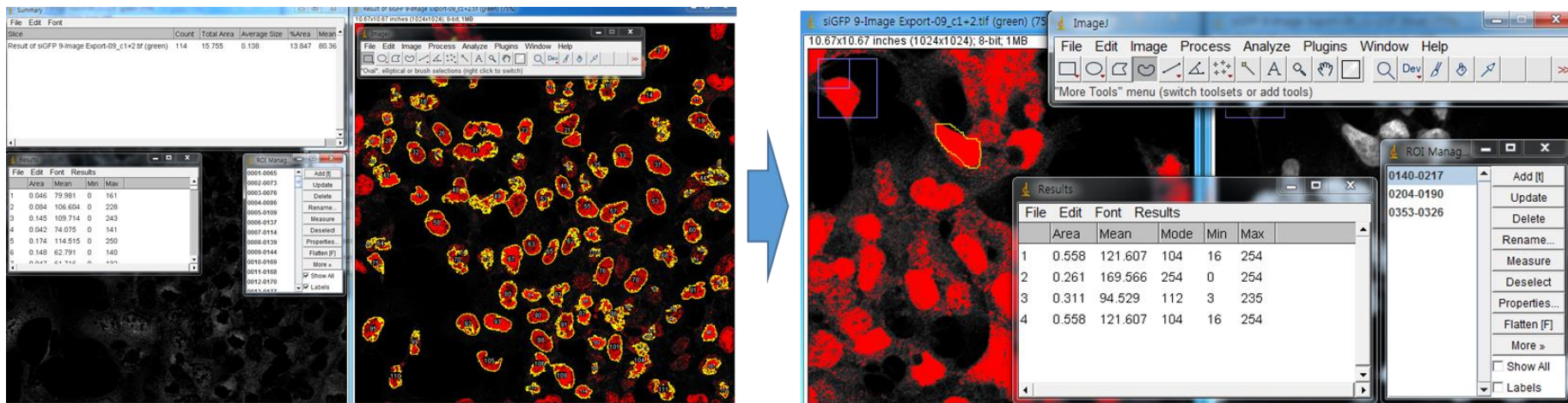
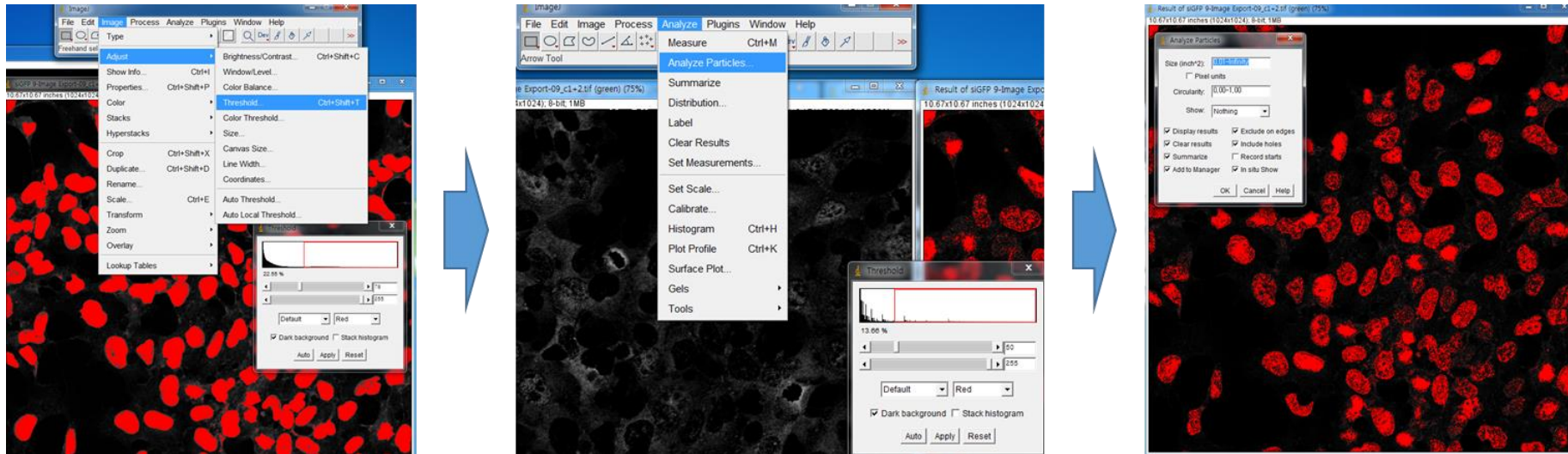
(여기서 질문! 왜 mean gray 나 하면, 우리가 형광현미경에서 사용하는 카메라(CCD/sCMOS)는 흑백이기 때문입니다. 결과물 image 에서 다양한 color (RGB)가 보이는 이유는, 여기서 얻어진 signal 에 우리가 알고 있는 염색된 파장의 실제 color 를 overlap 해주기 때문에 그렇습니다. 실제 형광 현미경에서 얻어지는 signal 은 모두 흑백입니다.)

5. 각각의 nucleus counting 이나 개별 intensity 가 필요 없고 전체 핵의 intensity 가 필요하다면, Analyze tab 에서 -> Measure 를 클릭하면 됩니다.

여기까지는 기본적인 cell counting 및 개별 intensity 구하기 입니다. 자, 다음부터는 Green Cell 에서 핵 부분만 오려내는 순서입니다.







☞ 세포체학실험실에서 Image J 를 이용하여 세포의 특정영역 형광 signal 정량하는 protocol 은 아래와 같습니다.

1. Image J -> Open image 를 해서 merge 된 image 를 엽니다.
2. Image tab 에서 color 를 선택하고 -> split channel 을 합니다 -> 이렇게 하면 green 과 dapi image 로 분리가 됩니다.
3. Process tab 에서 -> Image calculator 로 들어가서 -> 첫 번째에 칸에 green image 를 선택하고 "And" 선택한 다음 -> 아래 칸에 Dapi image 선택하고 OK 하면 핵에 염색된 green 만 분리됩니다.
4. 상단의 Image tab 에서 -> Adjustment -> Threshold 를 선택하면, 2 개의 조절 bar 가 생기는데, 그 중, 위에 것을 마우스로 이용하여 background 를 제거하고 real signal 만 선택되도록 합니다.
5. 상단의 Analyze tab 에서 Analyze Particles 로 들어갑니다. -> default 설정 또는 아래 check 박스를 모두 check 한 다음 measure 를 클릭합니다.
(조건: 0.01 - infinity; unit 이 inch 일 경우)

이렇게 하면, cell number counting 과 함께 각각의 핵에 염색된 green fluorescence 의 intensity 의 mean gray value 값을 얻을 수 있습니다.

6. cytosol 의 경우, counting 이 필요 없으므로 Analyze tab 에서 Analyze particle 이 아닌, measure 로 들어가서 전체 green 의 fluorescent signal 을 읽습니다.

마지막으로, ImageJ 와 MetaMorph 를 비교한다면, software 완성도는 MetaMorph 가 우수합니다. 반면에, 3D image rendering 또는 3D image quantification 은 Oxford 社의 IMARIS 를 사용하시기를 추천 드립니다.