

MetaMorph を使用した drebrin cluster の計測法

2012 H. Shimizu (群馬大学神経薬理)

1. drebrin の染色像写真の他に、細胞の外形が見える蛍光染色の写真を用意する。
2. MetaMorph を立ち上げる。
3. GFP 等により細胞の外形が見える写真を開き、Measure の中の Calibrate Distance で 63 倍のものを選んで Apply ボタンを押す。(生化学の部屋の暗室のカメラでは $1 \text{ pixel} \approx 0.1063 \mu\text{m}$)
4. 解析を行うエリアを Region Tools の Multi-Line で $50 \mu\text{m}$ ある dendrite を決定し、Trace Region でその $50 \mu\text{m}$ の範囲の dendrite を囲む。この時、選ぶ dendrite は細胞体から $10 \mu\text{m}$ ほど距離を取ってから $50 \mu\text{m}$ 測る。
5. 囲んだエリアは Regions の中の Save Regions で保存する。(ファイル名例: 001_region A.rgn)
6. drebrin を蛍光染色した画像に Load Region で 5 で保存した Region を呼び出す。
7. 囲んである Region をクリックしてアクティブにして Edit の中の Duplicate から Image を選んで拡大する。
8. 拡大画像で Region Tools の Multi-Line を使って dendrite の中心に沿うように線を引いていく。
9. 引かれた線の上で右クリックをして Copy Region し、そのまま Paste Region を 2 回行う。
10. 中心に 3 本の線が重なった状態になるので、2 本の線を中心から対称に少しずらす。この時、線が dendrite の外に出てしまわないように注意する。3 本の線の配置が完了したら、Save region で名前をつけて保存する。(ファイル名例: 001_region B.rgn)
11. Measure の中の Region Measurements の Open log ボタンを押すと、どんな形式でエクスポートするか聞かれるので、Dynamic Data Exchange にチェックを入れてから OK を押す。
12. Application に Microsoft Excel が入っていることを確認し、Sheet Name に dendrite と入力し OK を押す。
13. Microsoft Excel が起動するので、MetaMorph の Region Measurements で F9: Log Data を押すと dendrite に引いた 3 本の線それぞれの平均輝度などのデータがエクスポートされる。
14. Excel 上で 3 本の線の平均輝度の平均を計算し、その 2 倍の値を求める。
15. dendrite の平均輝度の 2 倍の数値が出たら、その数値をコピーし、MetaMorph の Measure の中の Threshold Image の Low のところに数値を貼り付け、Threshold state の Inclusive を選択する。
16. 画像の中に複数のオレンジ色の領域が作られるので、右クリックの Delete All regions で 3 本の線を削除してから、Measure の中の Integrated Morphometry Analysis で Measure ボタンを押し、Object data タブを開くとクラスターのデータの計測値を見ることができる。
17. Open Log ボタンを押し Dynamic Data Exchange にチェックを入れて OK を押し、Sheet Name に drebrin cluster と入れ OK を押すと、Excel が立ち上がるので Integrated Morphometry Analysis で F9: Log Data のボタンを押すと、クラスターのデータが Excel にエクスポートされる。
18. Object # の最大値がクラスターの個数なので、その値を dendrite に引いた 3 本の線の長さで割り、 $100 \mu\text{m}$ をかけると $100 \mu\text{m}$ あたりのドレブリンクラスターの個数を求めることができる。