



中山大學中山眼科中心
ZHONGSHAN OPHTHALMIC CENTER, SUN YAT-SEN UNIVERSITY

免疫荧光定量分析专题研讨

ImageJ 功能介绍与实用教程

刘轲莉

张峰课题组

20201230



This is a read-only version of imagej.net, available during the transition to a new site.
Please direct any questions or issues to [this Image.sc Forum thread](#).
Thank you for your patience as we improve the website!



ImageJ/Fiji

- ImageJ
- Fiji



软件安装

- 软件下载
- 软件与插件安装



功能介绍

- 功能应用
- 常用程序



➤ 实操培训

- 细胞计数
- 面积测量
- 共定位分析
- 荧光强度分析

1 | ImageJ与Fiji



ImageJ



Fiji



Fiji Is Just ImageJ

- ❑ 基于Java，由NIH开发的图像处理软件；
- ❑ Fiji自动包含插件，而ImageJ需要手动安装；
- ❑ 特点：Open / Reproducible / Interoperable；
- ❑ 功能：显示、编辑、分析、处理、保存和打印

2 | 软件下载与安装

下载

- ❑ [Fiji/Downloads](https://imagej.net/Fiji/Downloads) (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>)
- ❑ [ImageJ/Downloads](https://imagej.net/Download) (<https://imagej.net/Download>)

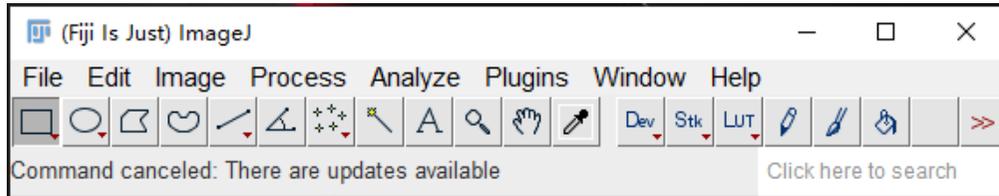
软件安装

- ❑ 无需安装，解压后即可使用；
- ❑ 存储路径建议放非系统盘，存储目录不含中文（例如：D:\Fiji.app）；
- ❑ 需要Java环境，注意更新Java版本；首次打开软件自动升级。

插件安装

- ❑ 插件下载地址 (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/>)；
- ❑ 安装：将.jar插件放置Plugin文件夹，重启软件即可

3.1 | 面板常用工具介绍



- ❑ **File** ▸ 基本的文件操作（打开、保存、创建新的图片）。
- ❑ **Edit** ▸ 编辑以及绘制操作，同时进行全局设置。
- ❑ **Image** ▸ 图像显示，包括图像格式的转化、怎样显示等。
- ❑ **Process** ▸ 图片处理，包括点操作、过滤器以及算法操作。
- ❑ **Analyze** ▸ 图像分析，统计测量、直方图绘制和其他与图像分析有关的操作。
- ❑ **Plugins** ▸ 用于创建、编辑以及管理添加进来的附件，存储在ImageJ/plugins/目录下的宏、脚本、插件。
- ❑ **Window** ▸ 已打开窗口的选择和管理。
- ❑ **Help** ▸ 更新、文档资源以及版本信息。

3.2 | Tips

图片 类型

- ❑ 8-bit / 16-bit / 32-bit / RGB color
- ❑ I (image, 单张照片) 和 S (stacks, 堆栈)

Nr. bits	range	
1	2	
2	4	
4	16	
8	256	

常用 概念

- ❑ ROI (Region of interests)
- ❑ Threshold
- ❑ Scale bar

4.1 | 细胞计数

➤ 手动计数

Multi-point

- ❑ 适合单一细胞类型;
- ❑ Multi-point;
- ❑ Measure

Cell counter (Plugin)

- ❑ 适合多种类型细胞分析;
- ❑ Plugins ->Analyze ->
- ❑ Cell Counter;

➤ 自动计数 - - - 利用Analyze Particles

图片类型转换

- ❑ Image->
- ❑ Type->
- ❑ 8-bit

阈值设定

- ❑ Image->
- ❑ Adjust->
- ❑ Threshold
- ❑ Apply

填补空洞

- ❑ Process->
- ❑ Binary->
- ❑ Fill Holes

黏连细胞处理

- ❑ Process->
- ❑ Binary->
- ❑ Watershed

自动计数分析

- ❑ Analyze->
- ❑ Analyze Particles

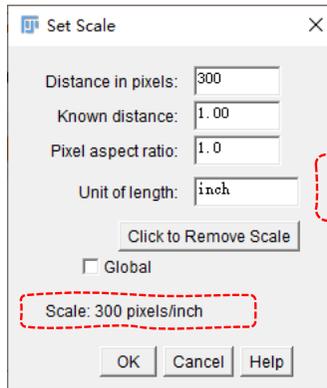
4.2 | 面积测量

面积测量

Scale bar



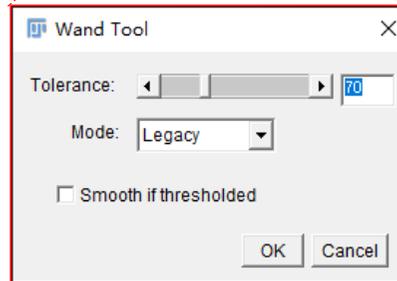
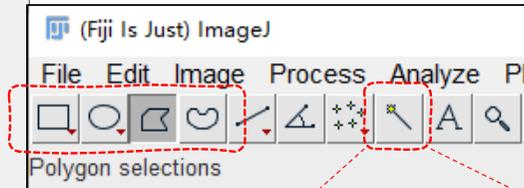
- ❑ Analyze ->
- ❑ Set scale ->



Selection



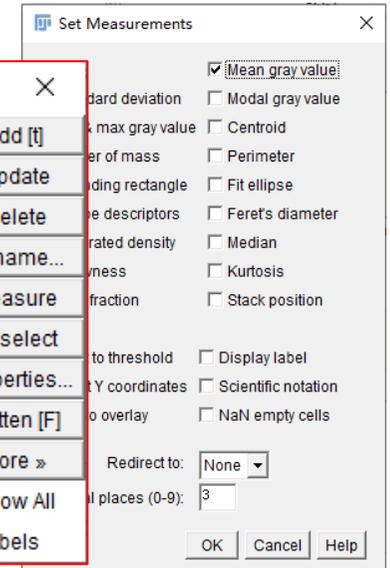
- ❑ 手动 Selection
- ❑ 半自动 Wand
- ❑ 半自动 Threshold / Color Threshold



Measure

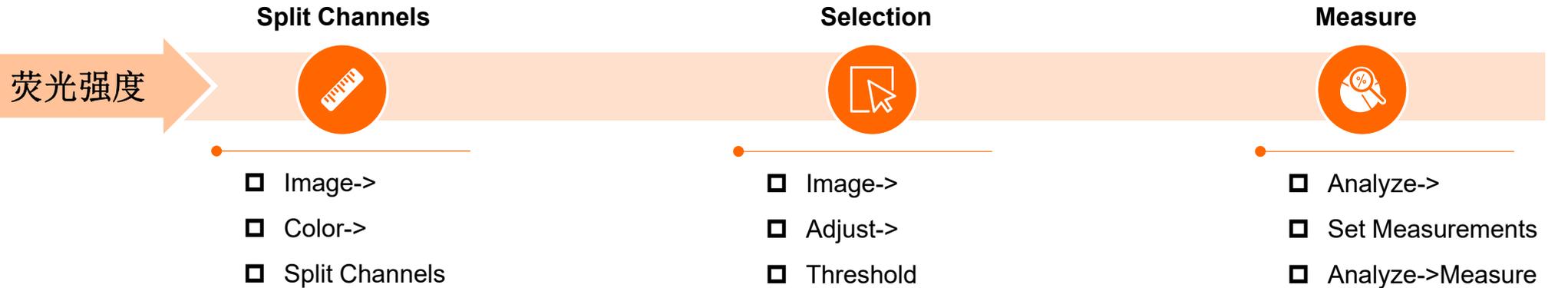


- ❑ Analyze ->
- ❑ Set Measurements ->

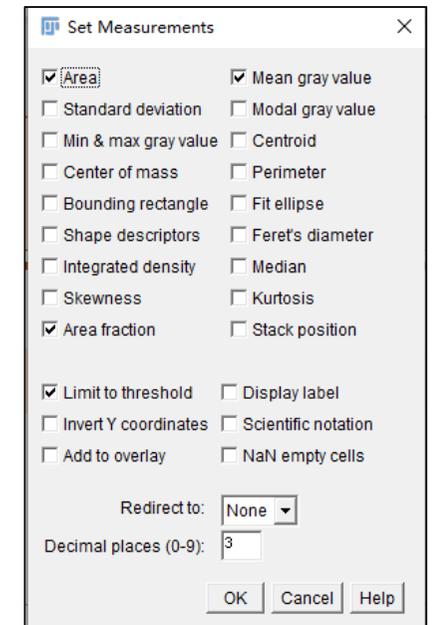


注意：Selection是选区而非绘图，描边用Edit->Draw；
选区后Ctrl+顶点（删减顶点）；Shift+顶点（添加区域）

4.3 | 荧光强度分析

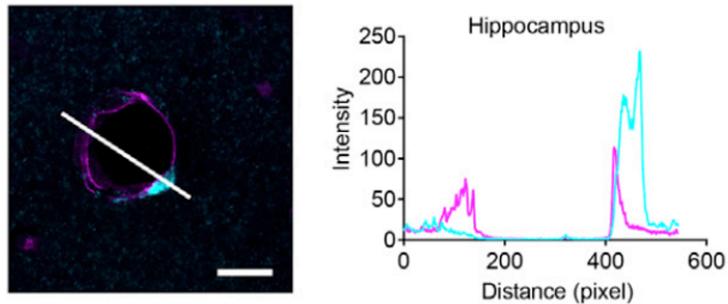


- 平均荧光强度(Mean) = 该区域荧光强度总和(IntDen) / 该区域面积(Area)
- Mean: Mean gray value
- IntDen: Integrated Density



4.4 | 共定位分析---定性分析 (Plot Profile)

共定位分析 (Plot Profile)



Neuron. 2018 Oct 10;100(1):183-200.e8.

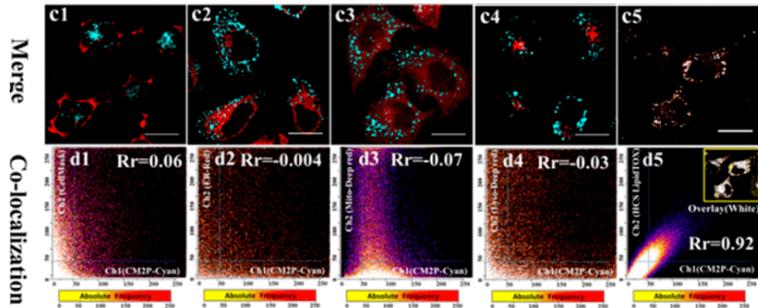
- 横轴代表线上各像素点，纵轴为各点对应的灰度值；
- 此图像代表了灰度的变化趋势。

- Image -> Color -> Split channels (拆分通道);
- Image -> Stacks -> Images to stack (创建堆栈);
- Line / Rectangle (选择ROI);
- Analyze > Plot profile (显示灰度变化趋势);
- 点击live使结果图与图像栈中的图像相对应;

- 过曝/荧光强度过低会导致原本可能存在差异的灰度信息丢失;
- 当图像过曝时，灰度值的峰会超过最大值灰度值255。

4.4 | 共定位分析---半定量分析

共定位分析 (Plugins)



Anal Chem. 2019 Jan 2;91(1):977-982.

1、皮尔森相关系数——Pearson's correlation coefficient (PCC)

$$PCC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

PCC是最常用的定量描述共定位的相关系数，取值在-1到1之间。1表示完美相关（有蛋白A的地方必有蛋白B）；-1表示完全排除（有蛋白A地方必定没有蛋白B），零表示随机关系（蛋白A和蛋白B随机分布，无联系）。

2、曼德斯共定位系数——Manders' Colocalization Coefficients (MCC)

$$M_1 = \frac{\sum_i R_{i,colocal}}{\sum_i R_i}$$

$$M_2 = \frac{\sum_i G_{i,colocal}}{\sum_i G_i}$$

M1、M2代表一种蛋白质与另一种蛋白质共定位的部分，占这种蛋白总量的比例。相当于重叠比例。

- ❑ Image -> Color -> Split channels (拆分通道);
- ❑ Image -> Color -> Channel tools (添加伪彩);

- ❑ Analysis with Plugins --- Coloc 2 (Analyze -> Colocalization)
- ❑ MCC需要进行背景校正 (Process -> Substrate background)

- ❑ 可以先选择ROI再进行共定位分析，去掉背景干扰信息

谢谢!

更多教程

- Treasure琛 (知乎)
- 弟球嗑学
- 亓欣波

致谢

- 指导老师：张峰教授
- 实验室小伙伴们
- 中山眼科中心公共平台