






Bioimaging Center Biomedical Core Facility

The Ruth & Bruce Rappaport Faculty of Medicine
Technion-Israel Institute of Technology

תרגול תוכנת IMARIS

תרגיל 1: תצוגת Arena - מאפשרת לנהל ולארגן את ה-Data בצורה פשוטה ונוחה.

- צור ניסוי חדש על ידי בחירה ב- Assay .
- צור 2 קבוצות חדשות על ידי בחירה ב- Group , קרא לקבוצות group1 ו-group2.
- בחר ב-group1 והוסף לקבוצה זו את התמונות Coloc.lsm ו-SurfaceAndSpot.lsm מתיקיה מס' 1 על ידי בחירה ב- Image .
- בחר ב-group2 והוסף לקבוצה זו את התמונות Cell.lsm ו-Track.lsm מתיקיה מס' 2.
- כנס ל-group1, בחר בתמונה SurfaceAndSpot.lsm על ידי לחיצה כפולה עליה ← התמונה נפתחה בתצוגת Surpass.

* Hagar Katzir / Sara Selig Group

Cells: primary fibroblasts from skin punch of an Immunodeficiency Centromere Instability (ICF) syndrome patient.

Green: FITC conjugated anti mouse anti phospho-histone H2A.x monoclonal antibody.

Red: Cy3 conjugated telomeric PNA probe.

Blue: DAPI.

תרגיל 2: מעבר בין התצוגות השונות - 3D View, Slice, Section, Gallery & Easy 3D.

- תצוגת 3D View זו התצוגה העיקרית באימריס והיא מאפשרת לצפות ולבצע אנליזה על התמונה התלת-מימדית.
- שים לב כי בצד ימין למעלה, תחת הכותרת "Pointer" מסומנת האופציה Navigate, המאפשרת לנו שליטה מרחבית בתמונה (סיבוב, הגדלה, הקטנה).
- סובב את התמונה באמצעות העכבר, התקרב והתרחק מהתמונה באמצעות גלגלת העכבר.
- חזר את התמונה למצבה המקורי על ידי בחירה ב-Reset (בצד ימין למטה).

- עבור לתצוגת Slice המאפשרת צפייה בחתכי Z וביצוע מדידות מורפולוגיות פשוטות ומדידות עומק.
- ביצוע מדידת אורך פשוטה:
 - מדוד את קוטר הגרעין על ידי לחיצה בקצה אחד של הגרעין ולחיצה נוספת בקצה השני שלו.
 - שים לב כי המרחק הנמדד מופיע בצד ימין של המסך תחת הכותרת "Measure".
- ביצוע מדידת עומק:
 - מדוד את "גובה" הגרעין על ידי מעבר ל-slice התחתון (בעזרת הגלגלת בצד שמאל) ולחיצה באמצע הגרעין, לאחר מכן, עבור ל-slice העליון וגם כן לחץ באמצע הגרעין.
- עבור לתצוגת Section (בקבוצה של Slice) המאפשרת לצפות ב-Data ב-3 צירים: ציר XY, ציר XZ וציר YZ.
- עבור לתצוגת Gallery המציגה גלריה של כל החתכים.
- עבור לתצוגת Easy 3D המאפשרת להציג את המידע באמצעות-MIP (Maximum Intensity Projection along Z) או באמצעות Blend (המאפשר התמצאות במרחב ומראה מה נמצא קדימה יותר).

תרגיל 3: חלון הערוצים.

- באמצעות ctrl+D ניתן להפעיל ולהעלים את חלון הערוצים.
- באמצעות הזזת החצים הצדדיים של כל ערוץ, שנה את ה-brightness/contrast של הערוצים כך שהנתונים יוצגו בצורה המיטבית.
- באמצעות כפתור Reset בחלון הערוצים, ניתן להחזיר את ה-brightness/contrast למצבו ההתחלתי.

*שים לב כי שינוי ה-brightness/contrast אינו משפיע על ה-data והוא משמש רק לויזואליזציה!

תרגיל 4: יצירת Surface.

- חזור לתצוגת Surpass העיקרית (3D View).
- הצג רק את הערוץ הכחול על ידי הורדת ה-V משאר הערוצים בחלון הערוצים.
- בחלון Properties בצד ימין בחר באייקון המתאים ליצירת Surface (🌐).

- נפתח wizard ליצירת ה-Surface ← עבור לשלב הבא על ידי לחיצה על Next (▶).
- בחר את הערוץ המתאים (הערוץ הכחול).
- smooth קובע האם יתבצע פילטר Gaussian למידע, והוא בדרך כלל משמש להורדת רעש. במידה ובוחרים באופציה זו, יש להזין ערך המגדיר כמה החלקה תתבצע על המידע. נהוג להזין ערך של כ-10% מגודל האובייקט אשר לו עושים את המודליזציה.
 - כדי למצוא את גודל האובייקט, עבור לתצוגת Slice ובצע מדידה מורפולוגית פשוטה לקוטר האובייקט.
 - הזן ב-smooth ערך של כ-10% מהערך שמדדת.
- ב-Thresholding אנו קובעים את האלגוריתם שלפיו יחושב ה-intensity ולפיו יקבע על איזה מידע תתבצע המודליזציה:
 - Absolute Intensity - ערך סף כלשהו שכל מה שמעליו יעבור מודליזציה.
 - Background Subtraction - מחפש עבור כל אזור מקסימה מקומי ומכניס למודליזציה את הערכים שמעל ערך זה.
 - בחר בשיטת Absolute Intensity ולחץ על Next.
- הגדר את ערך הסף של ה-intensity שיוכלל במודליזציה, לחץ על Next.
- מסך פילטור המאפשר סינון של המידע מה-surface על פי פרמטרים שונים לפי הצורך (למשל, שימושי במידה וסומנו בקביעת ערך הסף אובייקטים קטנים נוספים שאינם קשורים). לחיצה על Finish ▶▶ לסיום.

תרגיל 5: שימוש ב-Surface של הערוץ הכחול ליצירת Mask לערוצים האחרים (קביעת כל מה שבתוך ה-surface כ-Data ומחיקת כל שאר הנתונים).

- עבור לטאב Edit (✏) ובחר ב-Mask All... .
- נפתח חלון חדש ליצירת ה-Mask.
- ב-Channel Selection בחר בערוץ האדום.
- על מנת שה-Mask שיווצר לא ידרוס את הערוץ המקורי, סמן ב-V את Duplicate channel before applying mask.
- סמן ב-V את Set voxels outside surface to (כך, עבור הערוץ האדום, כל מה שמחוץ לגרעין ימחק ואילו כל מה שבתוך הגרעין ישמר).
- נוצר ערוץ אדום חדש.

- בצע את אותן פעולות עבור הערוץ הירוק:
- עבור לטאב Edit (🍷) ובחר ב-Mask All.
- נפתח חלון חדש ליצירת ה-Mask.
- ב-Channel Selection בחר בערוץ הירוק.
- סמן ב-V את Duplicate channel before applying mask.
- סמן ב-V את Set voxels outside surface to והזן את הערך אפס.


תרגיל 6: יצירת Spots.

- על מנת שה-Surface לא יפריע להמשך האנליזה, הסתר אותו בחלון ה-Properties על ידי הורדת ה-V.
- הצג רק את הערוץ האדום החדש (Masked) על ידי הורדת ה-V משאר הערוצים בחלון הערוצים.
- בחר באייקון המתאים ליצירת Spots (🍷).
- נפתח wizard ליצירת ה-spots ← עבור לשלב הבא על ידי לחיצה על Next (▶).
- בחר את הערוץ המתאים (Masked red channel).
- ב-Estimated XY Diameter יש להזין את קוטרו של האובייקט המבוקש.
 - כדי למצוא את קוטר האובייקט, עבור לתצוגת Slice ובצע מדידה מורפולוגית פשוטה לקוטר האובייקט.
 - הזן ב-Estimated XY Diameter את הערך שמדדת ולחץ על Next.
- הגדר את ערך הסף של ה-intensity שיוכלל במודליזציה, לחיצה על Finish (🟢) לסיום.
- בצע את אותן פעולות עבור הערוץ הירוק:
- הצג רק את הערוץ הירוק החדש על ידי הורדת ה-V משאר הערוצים בחלון הערוצים.
- בחר באייקון המתאים ליצירת Spots.
- נפתח wizard ליצירת ה-spots ← עבור לשלב הבא על ידי לחיצה על Next.
- בחר את הערוץ המתאים (Masked green channel).
- הזן ב-Estimated XY Diameter את קוטר האובייקט שמדדת בתצוגת Slice ולחץ על Next.
- הגדר את ערך הסף של ה-intensity שיוכלל במודליזציה, לחיצה על Finish לסיום.

תרגיל 7: שימוש ב-Colocalize Spot

- עבור לטאב Tools () ובחר בפונקציה "Colocalize Spot".
- בחלון שנפתח סמן את ה-Spots שיצרת לערוץ האדום ולערוץ הירוק.
- הפונקציה "Colocalize Spot" פועלת לפי ערך סף של מרחק- המשתמש קובע את ערך הסף (את המרחק) אשר ערכים קטנים או שווים לו ייחשבו כמגע בין ה-Spots האדומים לירוקים, ואילו ערכים גדולים ממנו ייחשבו כאי מגע.
 - הזן את ערך הסף הרצוי.
- נוצרה תיקייה חדשה (תיקיית Coloc) אשר מכילה רק את ה-Spots האדומים והירוקים אשר המרחק ביניהם קטן יותר מערך הסף שהזנת בפונקציה.
- בחר את ה-Spots האדומים שנוצרו בפונקציה.
- עבור לטאב Statistics () ורשום את מספר ה-Spots שהתקבלו (Total Number of Spots).
- בחר את ה-Spots הירוקים שנוצרו בפונקציה.
- עבור לטאב Statistics () ורשום את מספר ה-Spots שהתקבלו (Total Number of Spots).

תרגיל 8: ביצוע Snapshot

- מכיוון שקבצי אימריס נפתחים רק בתוכנת אימריס, לשם הצגתם בתוכנות אחרות או במאמרים, ניתן ליצור קובץ tiff עם הערוצים והמודליזציה הרצויה.
- בחר את הערוצים שברצונך להציג על ידי סימונם ב-V בחלון הערוצים.
- בחר את המודליזציה שברצונך להציג על ידי סימון ב-V של האובייקטים הרצויים (למשל הצגת ה-Spots האדומים והירוקים אשר המרחק ביניהם קטן יותר מערך הסף שהזנת בפונקציה "Colocalize Spot").
- לחץ על Snapshot המופיע בסרגל הכלים העליון.
- נפתח תפריט צדדי חדש.
- ב-Image Size בחר במימדים הרצויים.
- ב-Image Output בחר ב-Save to file, וקבע היכן לשמור את הקבצים על ידי לחיצה על כפתור ה-Browse ().
- לסיום, לחץ על Do Snapshot!

תרגיל 9: אופציות שמירה שונות

- שים לב כי קיימות 3 אופציות שמירה שונות:
 1. Store – דורס את התמונה ושומר את כל השינויים על אותו שם (מקביל ל-Save).
הנתונים נשמרים על התמונה שמופיעה בתצוגת Arena.
 2. Store as – מאפשר לשמור את השינויים על שם אחר. הנתונים נשמרים בשם הרצוי בתצוגת Arena.
 3. Export – מקביל ל-Save as. מאפשר לשמור את הנתונים והשינויים בתיקייה רצויה שאנו בוחרים.
- לחץ על Store לשמירת התמונה בתצוגת Arena.

תרגיל 10: ביצוע Colocalization.

- עבור לתצוגת Arena.
- כנס ל-group1, בחר בתמונה Coloc.lsm על ידי לחיצה כפולה עליה ← התמונה נפתחה בתצוגת Surpass.

* Sharon Aviram / Ami Aronheim Lab

Cells: Hap1

Green: mouse monoclonal Y tubulin, anti mouse -Cy2 (Marker for centrosomes).

Red: rabbit polyclonal anti MLK3, anti Rabbit -RRX (protein of interest).

Purple: Goat anti TIA, anti goat -Cy5 (TIA marker for stress granules).

Blue: dapi.

- לחץ על Coloc המופיע בסרגל הכלים העליון.
- ב-Channel A בחר את הערוץ הראשון באמצעותו תרצה להגדיר threshold ← Ch2-T1.
- ב-Channel B בחר את הערוץ השני באמצעותו תרצה להגדיר threshold ← Ch1-T3.
- על מנת להגדיר את ה-threshold של הערוץ הראשון, לחץ עם העכבר על הסיגנל המתאים בתמונה:

- הלחיצה משמשת כ-wand.
- לחיצה ממושכת והזזת העכבר מרחיבים את ה-threshold.

- על מנת להגדיר את ה-threshold של הערוץ השני, לחץ Shift + קליק שמאל בעכבר על הסיגנל המתאים בתמונה.
 - אזורים שנצבעים בלבן בתמונה אלו אזורים שמייצגים את הקולוקוליזציה עבור ערכי הסף הנתונים.
 - לבניית ערוץ חדש המייצג את הקולוקוליזציה, לחץ על Build Coloc Channel (בצד ימין).
 - עבור לתצוגת 3D View.
 - הצג רק את ערוץ הקולוקוליזציה שיצרת על ידי הורדת ה-V משאר הערוצים בחלון הערוצים.
 - לחישוב נפח הקולוקוליזציה, צור Surface לערוץ (כפי שביצעת בתרגיל 4).
 - עבור לטאב Statistic ובדוק מהו ה-volume שחושב.
 - שמור את התמונה באמצעות כפתור Store as.
- תרגיל 11: יצירת Cell ובחינת הקשרים הקיימים בתא.
- עבור לתצוגת Arena.
 - כנס ל-group2, בחר בתמונה Cell.ism על ידי לחיצה כפולה עליה ← התמונה נפתחה בתצוגת Surpass.



* Yoav Binenbaum / Gil Ziv Lab


Cells: murine pancreatic cancer, K989

Green: pkh67 labelled exosomes.

Red: pkh26 stains pancreatic cell membrane.


Blue: dapi.

- בחר באייקון המתאים ליצירת Cell (.
- נפתח wizard ליצירת ה-cell.
- ב-Select Detection Type, המשמש לקביעת האלמנטים בתא אשר להם תבוצע המודליזציה, בחר בסוג שמכיל את הציטופלסמה, את הגרעין ואת הוזיקולות (). לחץ על Next.
- שים לב כי כעת אתה מאתר את הגרעין-
 - בחר את הערוץ המתאים (Blue channel).
 - הזן ב-Nucleus Diameter את קוטר הגרעין שמדדת בתצוגת Slice ולחץ על Next.

- בדוק שהגרעינים זהו בצורה נכונה מבחינה כמותית (שלא זהו יותר מידי או פחות מידי גרעינים), שנה את ערך הסף במידה והזיהוי אינו מדויק. לחץ על Next.
- הגדר את ערך הסף של ה-intensity שיוכלל במודליזציה של הגרעין, לחץ על Next.
- מסך פילטור המאפשר סינון של המידע מה-surface של הגרעין על פי פרמטרים שונים לפי הצורך (למשל, שימושי במידה וסומנו בקביעת ערך הסף אובייקטים קטנים נוספים שאינם קשורים). לחץ על Next.
- שים לב כי כעת אתה מאתר את התא-
 - יש שתי שיטות לזיהוי התא- זיהוי לפי הציטופלסמה וזיהוי לפי הממברנה. בחר באופציה של זיהוי לפי ציטופלסמה ().
 - בחר את הערוץ המתאים (Red channel).
 - הזן ב-smooth ערך שערכו 10% מהערך של קוטר התא (שמדדת בתצוגת Slice). לחץ על Next.
 - הגדר את ערך הסף של ה-intensity שיוכלל במודליזציה של התא.
 - Split Touching Cells מכיל 3 אופציות:
 1. Don't Split – תאים שחוברו בתהליך המודליזציה ייחשבו כתא אחד ולא יפוצלו.
 2. One Nucleus per Cell – במידה ושני גרעינים (או יותר) זהו ואותה ציטופלסמה מקיפה אותם, רק גרעין אחד יחשב כגרעין של התא.
 3. Split by Seed Points – מאפשר ליצור הפרדה בין תאים מחוברים.
 - בחר באופציה One Nucleus per Cell
 - Nuclei Option מכיל 2 אופציות:
 1. Expand Cell on Nuclei – במידה והגרעין בולט "מחוץ" לגבולות התא, התא "יתפשט" גם מסביב לגרעין.
 2. Erase Nuclei outside Cell – במידה והגרעין בולט "מחוץ" לגבולות התא, החלק שבולט החוצה ימחק ולא יחשב כחלק מהתא.
 - בחר באחת מן האופציות האפשריות ב-Nuclei Options. לחץ על Next.
 - מסך פילטור המאפשר סינון של המידע מה-surface של התא על פי פרמטרים שונים לפי הצורך (למשל, שימושי במידה וסומנו בקביעת ערך הסף אובייקטים קטנים נוספים שאינם קשורים). לחץ על Next.
- שים לב כי כעת אתה מאתר את הוזיקולות-
 - בחר את הערוץ המתאים (Green channel).

- הזן ב-Nucleus Diameter את קוטר הוזיקולות שמדדת בתצוגת Slice ולחץ על Next.
- הגדר את ערך הסף של ה-intensity שיוכלל במודליזציה של הוזיקולות, לחיצה על Finish  לסיים.
- סמן את אחד התאים שיצרת.
- שים לב כי בצד ימין, תחת הכותרת "Pointer" מסומנת האופציה Navigate, שנה זאת לאופציה Select.
- עבור לטאב Statistics  (ובדוק מהו נפח התא המסומן, מהו מספר הוזיקולות בתא, מהו מרחק הוזיקולות מגרעין התא וממברנת התא.
- שים לב כי את באמצעות כפתור ה-configuration  אתה יכול לבחור שיוצגו רק הפרמטרים הרצויים.
- ייצא את הנתונים לאקסל באמצעות לחיצה על כפתור השמירה  שנמצא בטאב ה-Statistics.

תרגיל 12: יצירת Tracks.

- עבור לתצוגת Arena.
- כנס ל-group2, בחר בתמונה Track.lsm על ידי לחיצה כפולה עליה ← התמונה נפתחה בתצוגת Surpass.
- בחר באייקון המתאים ליצירת Spots .
- נפתח wizard ליצירת ה-Spots.
- ב-Algorithm Settings סמן ב-V את האופציה Track Spots (over Time), ולחץ על Next.
- בחר את הערוץ המתאים (Green channel).
- הזן ב-Estimated XY Diameter את קוטר האובייקט שמדדת בתצוגת Slice ולחץ על Next.
- הגדר את ערך הסף של ה-intensity שיוכלל במודליזציה, ולחץ על Next.
- שלב זה ב-wizard מאפשר עריכה ידנית של Spots- ניתן להוסיף Spots שלא זוהו על ידי ה-threshold בשלב הקודם או למחוק Spots מיותרים.
- שים לב כי בצד ימין, תחת הכותרת "Pointer" מסומנת האופציה Navigate, שנה זאת לאופציה Select.
- להוספת Spot נוסף (שלא זוהה)- לחיצה עם Shift + קליק שמאל בעכבר על האובייקט שלא זוהה.

- למחיקת Spot מיותר- לחיצה עם Shift + קליק שמאל בעכבר על האובייקט המיותר.
- בסיום, זכור להחזיר את ה-pointer למצב Navigate.
- עבור לשלב הבא על ידי לחיצה על Next.
- בחירת אלגוריתם- קיימים 4 אלגוריתמים אפשריים: Browaian Motion, Autoregressive Motion, Autoregressive Motion Expert, Connected Components.
- בחר את אלגוריתם Autoregressive Motion (בהמשך תוכל לנסות אלגוריתמים אחרים ולהשוות ביניהם).
- הגדר את הפרמטרים הרצויים:
 - Max Distance קובע מהו המרחק המקסימלי שיחשב כצעד לגיטימי בין נקודת זמן אחת ל נקודת זמן השניה. כלומר, מרחק שיהיה גדול יותר מהערך המוזן לא יחשב כתנועה של אותו האובייקט.
 - Max Gap Size קובע מהו המרווח האפשרי בין הופעת האובייקט בנקודת זמן אחת לנקודת זמן כלשהי. כלומר, אי הופעת האובייקט ביותר פריימים מהערך המוזן לא תחשב כתנועה של אותו האובייקט.
- עבור לשלב הבא על ידי לחיצה על Next.
- הגדר את ערך הסף של ה-Track Duration שיוכלל במודליזציה, לחיצה על Finish » לסיום.
- עבור לטאב Edit Tracks (🍷) המשמש לעריכת ה-Tracks:
 - חבר כמה Tracks ל-Track אחד: בחר באמצעות Ctrl + קליק שמאל בעכבר כמה מן המסלולים ולחץ על Connect.
 - פצל Track: בחר נקודה כלשהי ב-Track שבה אתה רוצה ליצור את הפיצול, ולחץ על Disconnect.
 - מחק Tracks: בחר Track כלשהו, עבור לטאב Edit (🍷) ולחץ על Delete.
- שמור את התמונה באמצעות כפתור Export.