

광학 현미경용 조직학 및 슬라이드 스캐닝

응용 개요서



목차

서론	3
조직학 우수 사례	4
시료 전처리	4
검출	6
기기	8
조직학, 조직 마이크로어레이 및 슬라이드 스캔에 대한 컬러 명시야 및 형광 이미징 응용 분야	9
Hematoxylin 및 Eosin 염색 조직	9
조직의 컬러 이미징 자동화	15
자동화된 조직 마이크로어레이(TMA) 이미징으로 입증된 현미경 검사에서 향상된 처리량 옵션을 위한 응용 로봇 공학	22
참고 문헌	30

서론

오늘날 조직학 및 미세해부학 연구는 병원성 모델의 표적 설계, 절편화 기능 및 염색 선택성뿐만 아니라 시료 수집 및 분석을 위한 자동화 및 연산 분석법에서도 계속 발전하고 있습니다. 조직 전처리 및 염색 분석법의 다양성과 유연성을 통해 연구자는 프로토콜을 최적화하고 사용 가능한 기기 및 이미징 리소스에 맞게 조정할 수 있습니다. 고정된 시료의 비색, 발색 또는 형광 라벨링을 활용하는 이러한 염색 기술은 각각 조직 구성요소 및 생화학적 프로세스에 대한 고유한 통찰력을 제공할 수 있습니다.

연구자들은 일반적으로 조직학에 대한 일반적인 관행을 따르지만, 많은 연구자들은 관심 조직에 가장 적합하도록 기술과 프로토콜을 수정합니다. 재현성을 보장하기 위해서는 전체 프로토콜에서 시료 간의 변동성을 최소화하기 위해 일관된 조치를 취해야 합니다. 조직학 워크플로 전반에 걸쳐 불규칙한 처리로 인해 염색된 시료 간에 차이가 발생할 가능성이 높습니다. 또한 시료 간의 염색 정도 차이를 수동으로 평가하는 것은 시간이 많이 소모되거나 부정확한 결과 또는 의도치 않게 편향될 수 있습니다. 대신, 자동화된 이미징과 정의된 파라미터는 일관된 결과와 분석을 위해 정확한 비교를 제공할 수 있습니다.

광학 현미경 검사를 위한 조직학적 표본의 고정부터 염색까지의 분석법은 다양한 옵션으로 제공됩니다. 그러나 가장 성공적인 연구자들은 어떤 분석법이 반복적인 면역조직화학적 분석을 가능하게 하는 일관된 결과를 제공하는지 먼저 확인합니다. 또한 이미지 획득 및 정량 기술은 고배율 현미경 검사에 최적화될 수 있습니다. Agilent BioTek Lionheart 자동화 현미경과 Agilent BioTek Cytation 세포 이미징 멀티모드 리더 제품군을 포함한 Agilent BioTek 이미징 시스템은 슬라이드의 이미지 획득을 쉽게 자동화하고 재현성 있는 분석 절차를 위한 프로토콜을 생성하는 기능을 제공합니다.

이 응용 개요서는 Agilent BioTek의 고배율 이미징 기기와 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 조직학적 절편과 시료의 염색 발현의 특성을 규명하는 다양한 이미징 어세이를 소개합니다.

또한 이 개요서는 절편화, 염색, 이미징 및 분석과 같은 모범 사례를 통해 시료 간의 어세이 편차를 줄이기 위해 최적화된 조직학적 워크플로에 대한 통찰력을 제공합니다. 대형 조직 이미징은 단일 합성 이미지를 생성하는 지정된 배율의 타일 몽타주 컬렉션을 사용하여 이루어지며, 다양한 조직 시료를 효율적으로 비교할 수 있습니다. 자동화된 이미지 분석을 위하여 Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어에서 다양한 데이터 파라미터를 이용합니다. Gen5 내에서는 다양한 판독값(예: 크기, 면적, 모양)이 생성되고 조직 절편 영역 내 시그널(픽셀 강도) 측정을 통해 시료 간의 발현 정도를 평가할 수 있습니다.

조직학 우수 사례

시료 전처리

조직학적 시료 처리는 기증자 또는 연구 동물로부터 적합한 시료를 수집하는 것으로 시작됩니다. 연구용 시료를 보존하기 위해 검체는 일반적으로 화학적 고정제로 처리되어 단백질을 비가역적으로 가교 결합하여 조직을 경화시켜 세포 구조를 보존합니다. 고정제는 일반적으로 사용되는 포름알데히드 용액의 포르말린과 같은 다양한 알데히드 제제로 구성됩니다. 실험실 동물을 고정하는 일반적인 분석법에는 방혈 및 식염수 처리 후 고정액을 관류하여 전체 장기를 신속하게 고정하거나 해부 후 고정액 확산을 위해 용액에 담그는 분석법이 있습니다.¹ 조직의 두께에 따라 고정액이 완전히 침투하는 데 더 오랜 시간이 필요할 수 있습니다. 조직학 워크플로에서 실행 가능한 다운스트림 조직 처리를 위해서는 충분한 고정 시간뿐만 아니라 시료의 과도한 고정을 방지하는 것이 중요합니다. 이러한 프로세스를 완료하면 일반적으로 수 센티미터의 작은 포매 카세트 경계에 맞게 조직을 더 작은 절편으로 분할하여 절편화 효율을 기대하고 장기 내 관심 영역을 노출시킬 수 있습니다.

조직학을 위한 조직 처리는 시료와 면역 염색 응용의 목표에 따라 두 가지 분석법 중 하나로 진행될 수 있습니다. 더 높은 온도에서 천천히 처리할 수 있는 조직의 경우 포르말린-고정 파라핀 포매 시료 또는 FFPE로 알려진 파라핀 포매가 최적의 선택입니다.² 조직 시료가 시간에 민감하고 비단백질 성분을 검사하는 것이 목적이거나 효소 검출이 존재하는 경우, 따뜻한 온도에서 포매하는 대신 급속 냉동할 수 있습니다.

FFPE 표본은 절편화를 위해 물을 대체하여 파라핀이 조직에 침투할 수 있도록 탈수 과정을 거쳐야 합니다. 일반적으로 탈수 절차에서는 에탄올 농도를 70%에서 100% EtOH까지 단계적으로 높인 후 자일렌과 같은 용매를 여러 차례 사용하여 포매 배지가 조직 시료에 침투할 수 있도록 합니다. 면역조직화학(IHC)에 이용하는 왁스로는 파라핀이 포매 프로세스에 가장 일반적으로 사용되지만, 시료가 깨지기 쉽거나 적절한 강성이 없는 경우 몇 가지 다른 대안을 이용할 수 있습니다. 또한 항체 라벨링이 필요한 경우 레진이 유용할 수 있습니다. 조직 시료는 절편화를 위해 마이크로톰의 블록을 최소한으로 조정할 수 있도록 유리한 위치로 가장 우수하게 맞춰집니다.

인체 조직 시료는 일반적으로 채취 후 냉동 상태로 보관되며, 이는 조직병리학 검사를 위해 준비된 조직의 경우에 특히 그렇습니다. 연구 동물의 조직과 장기를 냉동 포매용으로 전처리할 수도 있습니다. 냉동 절편화될 조직은 탈수 과정을 거치지 않지만 포매 전에 일련의 수크로스/글리세롤 농도에 노출됩니다. 이 극저온 절차에서는 고정된 조직을 수 밀리미터 깊이로 다듬어 플라스틱 몰드 안에 젤과 같은 물질로 포매하는 경우가 많습니다. 최적 절단 온도 화합물(OCT)은 폴리에틸렌 글리콜과 폴리비닐 알코올로 구성된 편리한 배지이며 일반적으로 냉동 시료를 포매하는 데 사용됩니다. 실온에서는 겔로 존재하여 진공에 의해 OCT 시료의 배지 내 기포 제거를 촉진하여 마모와 다운스트림 절편화 불량을 최소화합니다. OCT 화합물이 -20°C 미만의 온도에 노출되면 배지가 굳어져 포매된 조직을 둘러쌉니다.

절편화를 위해 FFPE 또는 냉동 표본을 전처리하려면 블록을 마이크로톰 또는 저온 유지 장치에 고정하기 전과 후에 약간의 조정이 필요합니다. 냉동 시료의 경우 마이크로톰은 저온 유지 장치 내부에 내장되어 있으며 저온 절편화를 위한 온도 제어 환경을 유지합니다. 포매된 블록을 90도 각도로 조심스럽게 다듬고 블록 표면에서 카세트 홀더까지 경사를 만들어 피라미드와 유사하게 만들면 블록의 엣지가 마이크로블레이드의 길이와 평행하게 놓이게 됩니다. 마이크로톰 또는 저온 유지 장치의 시료 홀더를 약간 조정하면 절편화할 조직의 표면이 있는 블록의 면이 정확한 방향에 위치하여 블레이드가 파라핀 절편의 경우 리본 형태의 연속적인 절편을 생성할 수 있도록 보장합니다. 그런 다음 조직 절편을 선호하는 마이크론 두께(일반적인 3-8 μ m)로 절단하고 슬라이드에 장착합니다. 일반적으로 시료를 염색하고 검출하기 전에 조직 절편에서 포매 배지를 제거해야 합니다.

검출

시료가 절편화되어 슬라이드에 장착되면 생물학적 구성요소 또는 프로세스에 대한 염색이 수행됩니다. 연구의 목적, 조직 및 사용 가능한 시약에 따라 다양한 검출 분석법이 있습니다.

비색 염색은 가장 오래된 과학적 분석법 중 하나이며 일반적으로 사용되는 조직학적 어세이로 남아 있습니다. 다양한 염색약과 염료는 각각의 조직과 세포에 대한 특이성을 가지고 있어, 관심 있는 특징과 세포의 대조를 높이는 데 사용됩니다. Hematoxylin 및 Eosin(H&E) 염색은 핵이 hematoxylin으로 파란색으로 염색되어 세포 위치를 제공하고 다른 세포 및 조직 구조가 Eosin에서 분홍색으로 표시되기 때문에 조직학에 가장 일반적으로 사용되는 라벨 중 하나입니다(그림 1A).³ H&E 염색에 대한 자세한 설명은 이 개요서 뒷부분의 응용 자료 "Hematoxylin 및 Eosin 염색 조직"에 설명되어 있습니다.

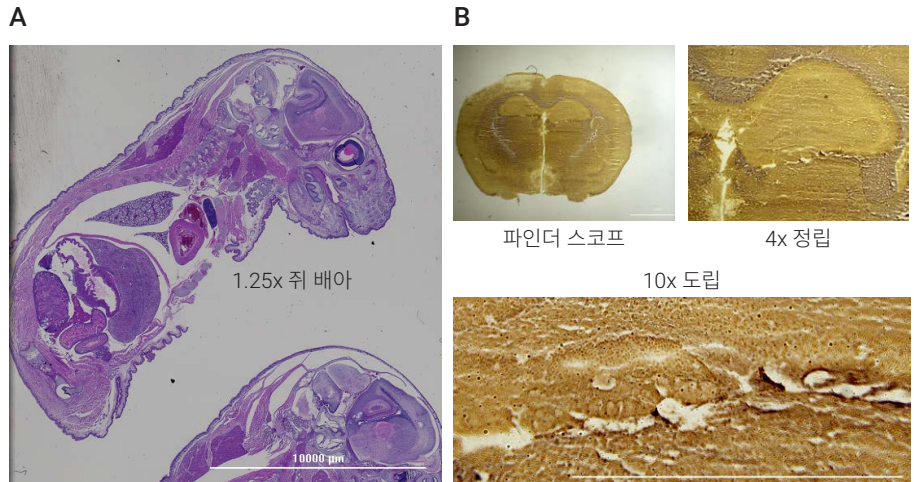


그림 1. 비색 염색된 조직. (A) 1.25x 컬러 명시야(NIH Bethesda, MD)에서 쥐 배아의 H&E 염색. (B) 정립 핀인더 스코프를 이용한 4x 쥐 뇌 절편의 염색 및 도립 현미경(BioTek - Agilent Technologies, Inc.의 자회사)을 이용한 10x 쥐 뇌 절편의 DAB 염색.

개별 형광 염료는 조직 및 세포 위치에 결합하는 선택적 능력을 갖고 있으며 명확하게 정량 가능한 신호를 제공합니다. 고정 조직에 대한 가장 일반적인 형광 핵 염색은 DAPI인 반면 Hoechst 염색은 라이브셀에 일반적입니다. 이러한 염색은 세포 수를 식별하는 것뿐만 아니라 DNA 함량 및 세포 주기 단계를 정량하는 데에도 사용됩니다. 핵 염색은 세포 생존력을 다루는 데에도 활용될 수 있습니다. Propidium iodide(PI)은 살아있는 세포의 세포막을 통과할 수 없지만 생존력이 상실되고 세포막이 투과성이 있게 되면 핵산에 표지되고 형광을 발합니다. Ethidium bromide(EB)는 사멸된 세포 중에 세포막이 투과성이 있게 될 때만 핵을 표지하는 또 다른 염색입니다. Acridine orange(AO)는 살아있는 세포의 핵산을 염색할 수 있으며 생존력을 평가하기 위해 EB와 함께 사용됩니다. Fluorescein, rhodamine 등과 같은 형광 염료를 사용하여 조직 구조를 차별적으로 표지할 수 있습니다.

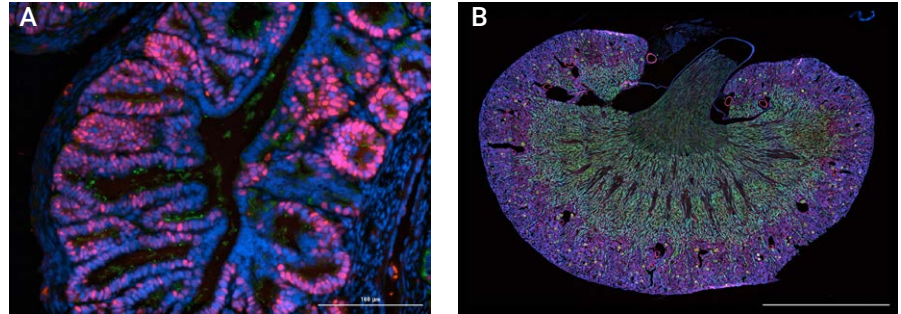


그림 2. 형광 염색된 조직. (A) 난소암 모델의 쥐 생식 난관(나팔관에 해당)의 형광 염색, 상피 세포에서 T 항원 발현(빨간색) GFP로 표지된 섬모 상피 세포(녹색) 및 DAPI로 염색된 핵(파란색); Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경으로 이미지화됨. (펜실베이니아주 필라델피아 폭스체이스 암센터). (B) 쥐 신장 - Agilent BioTek Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더에서 몽타주 캡처를 사용하여 4x로 이미지화한 FluoCells 전처리 슬라이드 #3(Alexa Fluor 488 WGA, Alexa Fluor 568 Phalloidin 및 DAPI, Thermo Fisher Scientific을 이용한 쥐 신장 절편).

조직, 세포 구조 및 생화학적 프로세스를 보다 정확하게 검출하기 위해 면역조직화학 및 면역형광에 특정 항체가 사용됩니다. 추적할 라벨은 1차 항체 또는 2차 항체에 부착되어 신호를 증가시킬 수 있습니다.

면역조직화학은 horseradish peroxidase(HRP), alkaline phosphatase(AP) 또는 beta-galactosidase(BGAL)와 같은 효소에 접합된 항체를 사용하여 발색 리포터의 활성을 관심 표적에 국한시킵니다. HRP와 같은 접합 항체를 사용하면 과산화수소 존재 하에서 DAB와 같은 적절한 기질 시스템과 반응하고 DAB는 산화되어 표적을 식별하는 갈색 침전물을 생성합니다(그림 1B). 비오틴이 HRP와 접합된 단백질인 최대 4개의 avidin 또는 streptavidin과 결합하는 비오틴화된 2차 항체를 사용하면 단백질 신호가 증폭될 수 있습니다. 기존에는 hematoxylin을 DAB 염색과 함께 핵 검출을 위한 대비염색으로 정기적으로 사용했습니다. 고정 및 처리된 IHC 슬라이드는 안정적이며 컬러 염색을 무기한 유지합니다. 자세한 내용은 아래 응용 자료 "조직의 자동 컬러 이미징"에서 제공됩니다.

면역형광은 FITC 또는 Alexa Fluors와 같은 형광단과 접합된 2차 항체를 활용하여 표적 단백질에 국한된 형광 신호를 생성합니다(그림 2B). 최적의 이미징 필터 큐브로 측정 가능한 2차 항체의 유연성과 범위를 통해 형광 신호는 더 큰 정량 가능한 측정 범위와 단백질 발현 식별을 제공할 수 있으나, 장기적으로 안정성이 떨어지는 경향이 있습니다. 자동화된 형광 슬라이드 스캔의 예는 TMA 프로토타입 애플리케이션으로 자동 조직 마이크로어레이(TMA) 이미징을 통해 입증된 응용 자료 "현미경 검사에서 처리량 옵션을 향상하기 위한 응용 로봇공학"에서 찾을 수 있습니다.

이 응용 개요서에서는 Agilent BioTek Cytation 및 Lionheart 이미징 시스템을 사용하여 형광 및 컬러 명시야 조직학 절편의 몇 가지 예시를 제시합니다. 특정 어세이 분석법, 이미지 및 정량에 대한 정확한 설명은 아래 응용 자료에 설명되어 있습니다.

기기

시료가 전처리되어 슬라이드에 장착되면 광학 현미경을 사용하여 결과를 검사합니다. 조직학 슬라이드는 일반적으로 커버슬립 아래에 고정되므로 정립(Cytation 7) 및 도립(Cytation 5, 7 또는 Lionheart) 현미경 검사를 모두 적용할 수 있습니다. 그러나 도립 현미경의 작동 거리가 짧을수록 일반적으로 더 높은 배율의 대물렌즈에 대해 더 나은 해상도를 얻을 수 있습니다. Agilent BioTek 현미경에는 적절한 기능을 사용하여 시료를 이미지화할 수 있도록 보장하는 여러 가지 이미징 방식이 있습니다.

Agilent BioTek Cytation 세포 이미징 멀티모드 리더



Agilent BioTek Cytation 5 및 Agilent BioTek Cytation 7은 자동화된 디지털 현미경과 기존 마이크로플레이트 검출을 자동화 친화적인 업그레이드 가능한 모듈식 플랫폼에 결합할 수 있습니다. 도립 현미경 모듈은 형광, 명시야, 고대비 명시야, 컬러 명시야에서 최대 60x 배율을 제공합니다. Cytation 5에는 위상차 이미징의 추가 옵션이 있는 반면 Cytation 7의 정립 카메라는 낮은 배율의 컬러 이미징을 위해 반사광과 투과광을 모두 제공하며 슬라이드 스캔에 최적화될 수 있습니다. Cytation 7은 복합 이미징 장비로, 정립 이미징 컬러 카메라를 통해 관심 영역(region of interest, ROI) 선택과 빠른 획득 속도를 제공합니다. 이를 통해 사용자는 결과적으로 얻어진 합성 이미지에서 각 개별 RGB 채널을 검사할 수 있습니다.



Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경

Agilent BioTek Lionheart FX 자동화 현미경은 형광, 명시야, 컬러 명시야 및 위상차 채널을 위한 개방형 스테이지를 갖춘 컴팩트하고 포괄적인 현미경 시스템으로 응용 범위가 매우 넓습니다. 1.25x에서 60x에 이르는 대물렌즈와 추가로 60x 및 100x 오일 이멀전을 통해 다양한 이미징 워크플로를 이미지링할 수 있습니다.



Agilent BioTek BioStack 마이크로플레이트 스택커

Agilent BioTek BioStack 마이크로플레이트 스택커는 Agilent BioTek 워셔, 디스펜서, 리더 및 이미징 시스템과 호환되는 컴팩트한 크기의 다용도 마이크로플레이트 스택커입니다. Agilent BioTek Gen5 소프트웨어에 자동화된 이미징 및 획득 프로토콜을 설정하면 매우 간단하게 처리량을 단계적으로 업그레이드할 수 있습니다. BioTek은 Agilent BioTek Cytation 현미경 제품군에 마이크로플레이트와 어댑터를 모두 공급할 수 있는 강력하고 사용하기 쉬운 자동화 제품을 이용하는 것으로 널리 알려져 있습니다. Agilent BioStack의 신속한 플레이트 및 어댑터 교환 속도는 어댑터에 여러 슬라이드를 수용하여 처리량을 높이고 생산성을 향상시킵니다. 이를 통해 Gen5 소프트웨어 내에서 자동화된 분석을 위해 이미지 수집을 통해 많은 슬라이드를 스캔할 수 있습니다.

조직학, 조직 마이크로어레이 및 슬라이드 스캔에 대한 컬러 명시야 및 형광 이미징 응용 분야

Hematoxylin 및 Eosin 염색 조직

어세이 소개

발색법으로 염색된 조직 분석은 거의 한 세기 동안 병리학 및 암 연구의 특징이었습니다. 고정된 조직 시료는 정기적으로 파라핀에 포매되어 장기 데이터 저장 분석법으로 사용됩니다. 조직의 얇은 조각을 파라핀 블록에서 잘라내어 슬라이드에 고정한 다음 일반적으로 hematoxylin과 Eosin으로 염색하고 커버 슬립으로 밀봉합니다. 조직학 슬라이드를 검사하려면 관찰을 위해 다용도 현미경을 사용해야 합니다. 검사 후 파라핀 포매 조직과 함께 슬라이드를 정기적으로 보관합니다. 재검사가 필요한 경우 슬라이드를 회수하거나 파라핀 조직 블록을 재처리하여 관찰용 새로운 슬라이드를 생성할 수 있습니다(그림 3). 최근 디지털 이미징 및 데이터 저장 기술의 발전으로 컬러 이미지가 점점 더 선호되고 있습니다.

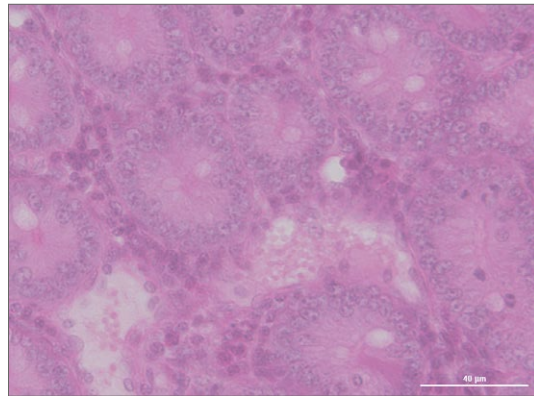


그림 3. Hematoxylin 및 Eosin 염색된 정상적인 인간 소장 조직.

Hematoxylin, 더 정확하게는 산화된 형태의 hematin은 매염제(일반적으로 Al^{3+})와 결합하여 세포 내 DNA를 염색합니다. 이는 DNA를 구성하는 음전하를 띠는 인산기와 결합한 다음 복잡한 조정 또는 접합을 거쳐 핵의 영구적인 염색이 되는 것으로 알려져 있습니다. Al^{3+} 매염제와 함께, 염료는 중성 내지 염기성 조건에서 파란색을 생성합니다(그림 4).

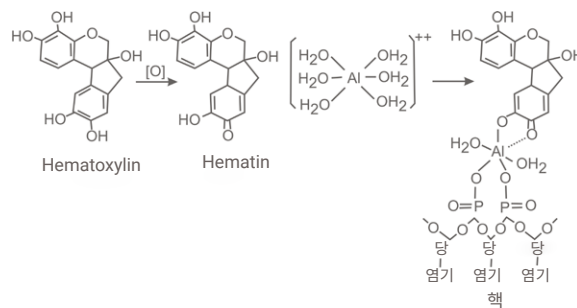


그림 4. 세포핵의 DNA에 결합하는 hematoxylin (hematin).

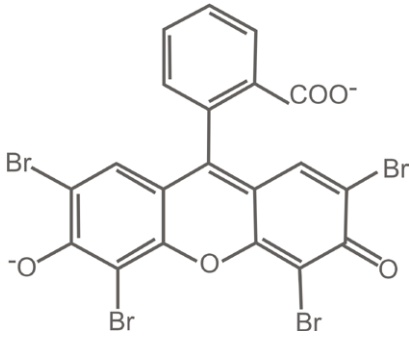


그림 5. H&E 염색에 사용되는 이음이온, Eosin Y의 구조.

반대로, 음이온성 Eosin Y는 아미노기와 같은 단백질의 양전하를 띤 기와 결합합니다. 예를 들어 리신 잔기는 pKa가 10 범위의 ε-아미노 그룹을 갖고 있어 염색 과정 전반에 걸쳐 양이온으로 유지됩니다(그림 5).

세포와 조직 절편을 염색하기 위한 다른 염색법과 프로토콜이 개발되었지만 거의 140년 전에 개발된 기존 분석법은 상대적으로 변하지 않았습니다. Hematoxylin은 합성으로 생산되지 않고 대신 로그우드 나무에서 추출됩니다. 그럼에도 불구하고 H&E 염색은 조직학 응용 분야에서 가장 일반적인 염색 프로토콜로 남아 있습니다.

이 응용 자료는 H&E 염색된 조직 절편의 이미징을 위한 새로운 자동 디지털 현미경의 유용성을 보여줍니다. 2.5x에서 60x까지의 범위의 현미경 대물렌즈를 소프트웨어로 제어하여 선택함으로써 절편의 저배율에서 고배율까지 제공합니다. 초점 및 노출 설정이 모두 자동화되어 있어 조작이 간단합니다. 실시간 이미지는 컴퓨터 모니터에서 볼 수 있으며 원하는 이미지를 TIF 및 PNG를 포함한 다양한 데이터 파일을 저장 및 다운로드하여 데이터 공유가 간단합니다.

재료 및 분석법

시중에서 구입 가능한 정상적인 인간 장과 신장뿐만 아니라 만성 신장염이 있는 인간 신장의 고정 및 염색된 조직 조각을 Konus에서 구입했습니다. 슬라이드는 Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더를 사용하여 이미지화되었습니다.

Gen5의 기능이 있는 몽타주 어레이는 여러 실시야(FOV) 또는 단일 이미지 프레임 FOV보다 더 넓은 영역을 캡처할 수 있습니다. 이미지를 서로 분리할 때 어레이를 사용하여 슬라이드의 여러 영역에서 개별 타일을 얻을 수 있으며 각 타일을 별도로 검사하고 분석합니다. 또는 약간 오버랩되는 경우 개별 이미지를 결합하여 훨씬 더 큰 연속 합성 이미지를 만들 수 있습니다. 배율을 높이면 비록 영역이 작아지지만 더 많은 정보를 얻을 수 있습니다. 검사된 슬라이드 영역의 양은 사용된 배율에 따라 달라집니다. 몽타주 간격 오버랩은 Gen5 소프트웨어의 스티칭에 대한 기본값으로 설정되었습니다. 컬러 명시야 몽타주(12 x 8)를 위해 캡처된 개별 이미지 타일은 각 타일의 오버랩되는 부분을 따라 직선 블렌드를 사용하여 함께 스티칭되었습니다. 스티칭을 위해 선택한 등록 채널이 빨간색 채널에 적용되었으며, 결과 파일은 최대 크기의 25%로 축소되었습니다.

결과 및 토의

Cytation 5으로 H&E 염색 조직 조각을 명시야 이미지 및 컬러 명시야 방법으로 측정하여 정상 신장과 질병이 있는 신장을 비교하는 그림 6에 나와 있습니다. 60x 대물렌즈 몽타주를 사용하여 슬라이드 이미지를 캡처하고 기록했으며 개별 이미지 타일을 스티칭하여 각 슬라이드에 대해 하나의 연속 이미지 파일을 형성했습니다. 세포 사이에 림프구로 인한 현저한 침윤은 hematoxylin의 진한 파란색 염색으로 확인됩니다. 사구체의 유리질화는 Bowman 캡슐의 무정형 분홍색 Eosin 염색으로 나타납니다. 정상적인 신장 조직 사구체에는 열린 Bowman 공간이 있고 염증 세포는 없습니다.

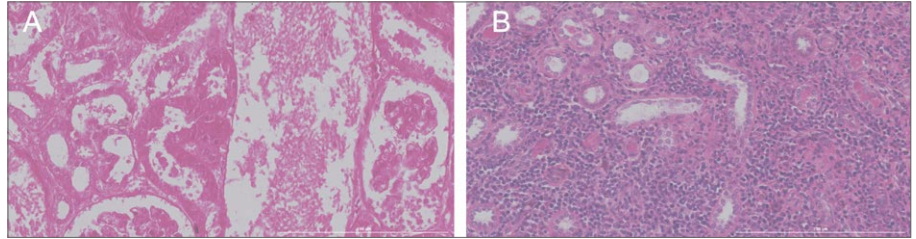


그림 6. 정상 인간 신장과 질병이 있는 인간 신장의 비교. Hematoxylin 및 Eosin 염색 (A) 정상 신장 및 (B) 만성 신장염 신장의 조직. 이미지는 60x 대물렌즈를 사용하여 스티칭한 12 x 8 몽타주를 나타냅니다. 스케일 바는 200 μ m를 나타냅니다.

그림 7은 2.5x 및 60x 대물렌즈를 사용하여 인간의 장벽 조직 슬라이스를 몽타주한 이미지로, Cytation 5가 슬라이드의 특정 영역을 확대할 수 있는 정도를 보여줍니다. 2.5x 대물렌즈 몽타주는 전체 조직 슬라이스를 전체 이미지의 작은 부분으로 묘사합니다. 둥근 커버슬립의 엷지도 식별됩니다. 슬라이드의 이미징 FOV는 Gen5 소프트웨어의 도식 표현 내에서 십자선으로 표시됩니다. 60x 대물렌즈 몽타주는 2.5x 이미지의 매우 작은 하위 섹션입니다. 전체 조직 슬라이스 관련 맥락에서 이 이미지의 위치가 슬라이드의 훨씬 작은 영역과 함께 표시됩니다.

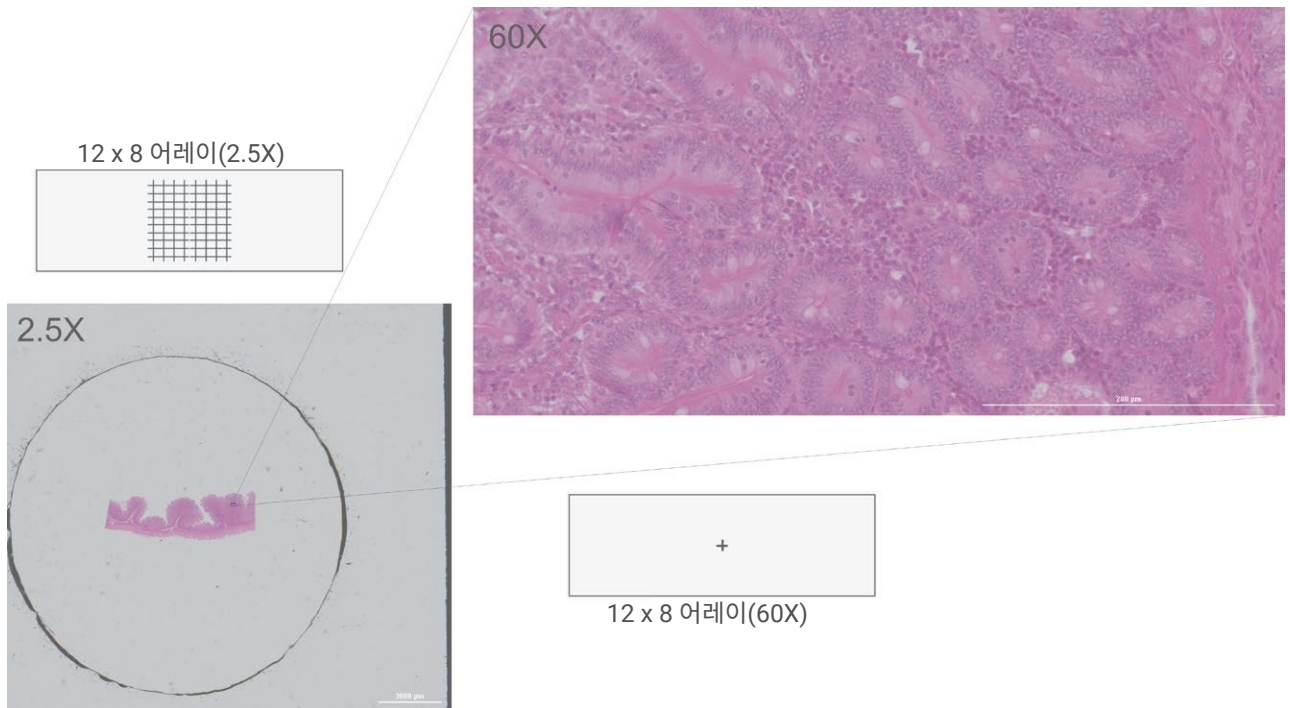


그림 7. Agilent BioTek Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더를 사용한 최대 배율. 1" x 3" 슬라이드에 고정된 인간 장벽의 고정 및 염색된 조직 조각을 2.5x 및 60x 대물렌즈로 이미지화하여 12 x 8 몽타주를 생성했습니다. 60x 대물렌즈로 확대된 2.5x 이미지의 조직 영역과 슬라이드 도식이 있는 각 몽타주로 이미지화된 슬라이드 영역이 표시됩니다.

Cytation 5의 다중 대물렌즈 터렛 시스템의 편리함은 그림 8에 나와 있습니다. 질병이 있는 인간 신장 조직의 동일한 조직 슬라이드는 6가지 다른 배율(2.5x-60x)의 컬러 명시야 몽타주(12 x 8)를 사용하여 이미지화되었습니다. 확대된 배율에 따라 이미지화된 영역이 각 이미지에 대해 식별됩니다. Cytation 5는 6개 위치 터렛 시스템을 사용하기 때문에 사용자 개입 없이 자동 위치 지정, 초점 및 이미징을 위해 슬라이드 영역에 대해 다양한 배율 단계를 프로그래밍할 수 있습니다. 그림 7과 마찬가지로 전체 조직 슬라이스를 낮은 배율로 캡처할 수 있습니다. 배율이 증가함에 따라 미세한 세부 사항에 대한 해상도가 높아집니다. 스티칭된 이미지를 본 후 후속 분석을 위한 최상의 배율을 선택할 수 있습니다.

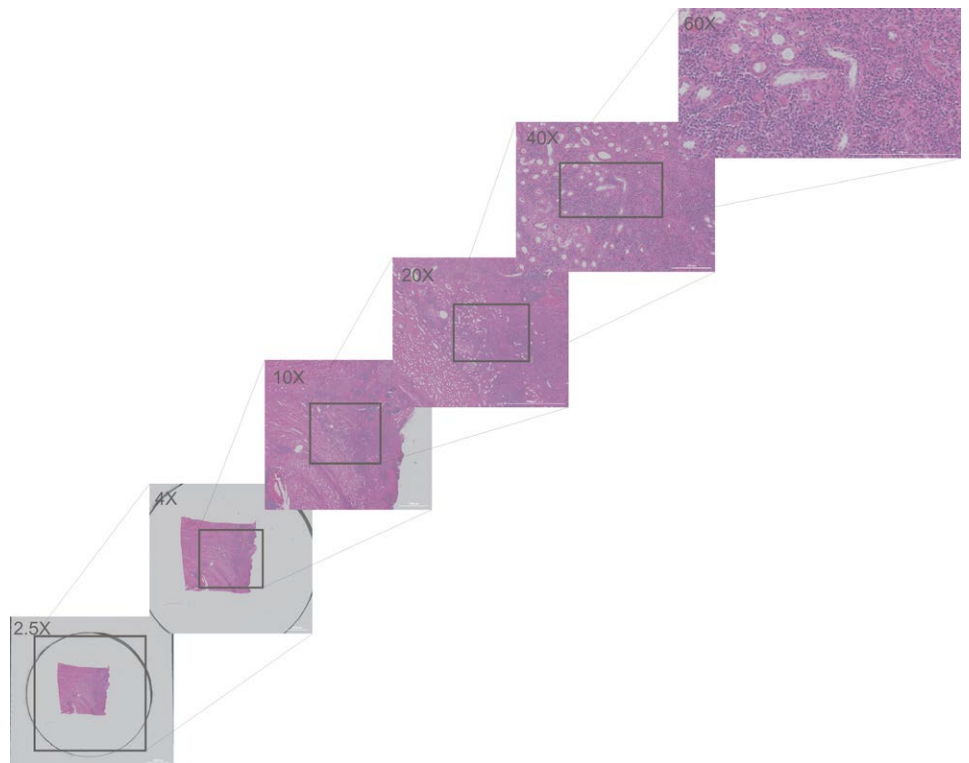


그림 8. 인간 만성 신장염 신장 조직의 거시적 및 미세적 구조. 동일한 조직 슬라이스에서 배율이 증가하는 일련의 몽타주(12 x 8) 이미지를 기록하고 스티칭했습니다. 박스 표시된 영역은 다음으로 높은 배율 이미지에서 이미지화된 영역을 나타냅니다. 각 몽타주에는 대물렌즈 배율과 스케일 바가 표시됩니다.

결과 및 토의

Gen5 소프트웨어와 결합된 Cytation 세포 이미징 멀티모드 리더는 염색된 조직 슬라이드의 수동 및 자동 이미징을 지원하는 여러 기능을 갖추고 있습니다. 수동 이미징을 통해 연구자는 Gen5 소프트웨어 제어 또는 외부 조이스틱을 사용하여 리더 내부에 있는 캐리어 x, y 위치를 완벽하게 제어할 수 있습니다. 이미징 영역이 식별되면 단일 또는 몽타주 컬러 명시야 이미지를 Gen5 수동 모드 세션 내에서 캡처, 스티칭 및 분석할 수 있습니다. 또는 자동화된 루틴을 사용하여 슬라이드를 이미지화할 수 있습니다. 슬라이드 위치, 배울 대물렌즈 및 몽타주 어레이(최대 15 x 15 매트릭스)는 이미징 전에 모두 프로그래밍할 수 있습니다. 또한 Gen5 3.08 이상으로 Beacon 또는 사용자 ROI 윤곽을 설정하여 다양한 대물렌즈 및/또는 동일한 실험 내에서 이미지화할 슬라이드의 특정 영역을 활용하기 위해 여러 이미징 단계를 구현할 수 있습니다.

컬러 명시야의 중요한 속성은 화이트 밸런싱입니다. 화이트 밸런싱은 흰색 개체가 이미지에서 흰색으로 렌더링되도록 원치 않는 색의 퍼짐현상을 제거하는 프로세스입니다. 정확한 밸런싱은 컬러 "온도" 또는 광원의 상대적인 따뜻함이나 차가움을 고려합니다. 인간의 눈은 다양한 조명 조건에서 흰색을 판단하는 데 디지털 센서보다 훨씬 더 능숙하므로 컬러 명시야 이미징 중에 정확한 컬러 렌디션을 얻으려면 자동으로 균형을 맞추는 것이 중요합니다. 컬러 밸런싱은 실제 시료와 별개로 세 가지 컬러 명시야 채널의 출력을 측정하고 조정하여 동일한지 확인함으로써 달성됩니다. 이 프로세스는 포착된 세 가지 컬러 이미지 세트마다 Gen5에 의해 자동으로 수행됩니다. 화이트 밸런싱이 수행되면 조명 수준은 판독 단계에서 고정되고 변경되지 않습니다.

2.5x 및 4x와 같은 저배율 대물렌즈는 심도가 깊습니다. 컬러 명시야 이미징 몽타주에 이러한 대물렌즈를 사용하는 경우 Cytation 5는 첫 번째 이미지 이전에만 자동 초점을 사용하여 큰 몽타주에서 상당한 시간을 절약합니다. 심도가 훨씬 짧은 고배율 대물렌즈는 슬라이드 평탄도 또는 표본 두께의 작은 편차로 인해 초점이 맞지 않는 이미지가 발생할 수 있으므로 각 이미지에 자동 초점이 필요합니다. 표본을 수동으로 이미징할 때 사용자는 이미지를 움직일 때마다 자연스럽게 초점을 조정합니다. 반대로, 무인 작동의 경우 기기는 추가 분석에 필요한 우수한 이미지를 얻기 위해 개입 없이 초점을 조정할 수 있어야 합니다. 형광 현미경과 컬러 명시야 현미경의 자동 초점 프로세스는 다릅니다.

형광 기반 자동 초점 기능은 최적의 초점을 결정하기 위해 인접 픽셀 간의 표준 편차 및/또는 상관 관계를 측정하여 대비를 평가하는 이미지 기반 통계 알고리즘을 사용합니다.⁴ 기기가 초점 포인트에 접근하면 실제 이미지와 배경 픽셀 사이의 신호 차이가 급격히 증가하여 모든 픽셀의 표준 편차가 증가합니다. 픽셀 표준 편차와 z축 높이의 플롯은 초점 포인트에서 날카로운 피크를 나타냅니다.⁵ 표준편차와 같은 통계 알고리즘을 사용하면 성능이 광범위해진다는 이점이 있습니다. 이미지의 대비가 초점에서 멀어지기 시작하여 검색 결과가 최적화된 최대 대비를 찾는 데 성공하는 범위가 더 넓어집니다.^{5,6}

형광 이미징은 배경과 이미지 사이에 매우 뚜렷한 차이가 있는 반면, 컬러 명시야 자동 초점은 자동 초점에 대한 고유한 문제를 제시합니다. 명시야 이미징은 전반적인 대비가 상당히 낮을 뿐만 아니라 반사, 메니스커스 및 두꺼운 시료로 인해 표적 엣지와 여러 초점면이 명확하게 정의되지 않습니다. 컬러 명시야 이미징을 사용하면 표준 편차 대 z축 대물렌즈 높이를 스캔하면 시료 두께가 심도를 초과할 때 이중 피크가 드러납니다. 이는 10x 이상의 대물렌즈에서 흔히 발생합니다. 균일한 이미지를 보장하려면 동일한 피크를 선택해야 합니다. Cytation 5는 "이중 피크" 알고리즘을 사용하여 오른쪽 더 높은 z축 피크의 더 높은 초점면을 선택합니다. 간단히 말해서, 대비 또는 엣지 검출을 사용하여 스캔이 수행됩니다. 스캔의 미분값이 계산되고 두 피크 사이의 최저점에 해당하는 제로 크로싱이 선택됩니다. 이제 알고리즘은 제로 크로싱 오른쪽에서 피크 "엣지 검출" 값을 찾습니다. 그런 다음 이미지는 엣지 검출 계산의 더 높은 z축 최대값에서 포착됩니다. 이 절차를 통해 후속 이미지에 항상 동일한 초점 포인트가 사용되어 초점이 선명하고 반복 가능해집니다.

조직의 자동 컬러 이미징

어세이 원리

일반적으로 조직과 같이 발색적으로 염색된 시료는 광학 현미경이 발명된 순간부터 거의 연구용 현미경의 중심이 되어 왔습니다. 대비를 향상시키기 위해 검사 전에 시료를 처리하기 위한 구별 염료가 개발되었습니다. 시간이 지남에 따라 명시야 현미경으로 얻은 이미지 기록은 손으로 그리는 것에서 사진 자료로, 그리고 최근에는 디지털 이미지로 발전했습니다. 이러한 모든 기술에서 기록은 처음에는 흑백(예: 그레이스케일)이었으며 기술이 발전함에 따라 컬러로 기록되었습니다. 검정 잉크 드로잉이 다색 잉크로 대체된 것처럼, 실버 환원 기반의 흑백 필름은 다층 컬러 처리로 대체되어 표적을 그대로 재현합니다. 컬러 현미경 슬라이드의 검사 및 데이터 기록을 위해 디지털 그레이스케일 명시야 이미지가 컬러 명시야로 대체된 디지털 현미경에서도 마찬가지입니다.

명시야 현미경은 대비 형성을 위한 기본 메커니즘으로 표본의 백색광 흡수를 사용합니다. 일부 시료에는 상당한 양의 색원체(예: 식물)가 포함되어 있지만 동물 세포는 대부분 투명하며 현미경을 사용하는 사람의 눈으로 미세한 세포 구조를 관찰할 수 있을 만큼 충분한 대비를 제공할 수 없습니다. 이로 인해 세포 물질의 시각화에 사용되는 염색이 개발되었습니다. 가장 일반적으로 사용되는 염색 중 하나는 hematoxylin 및 Eosin(H&E 염색)입니다. 주요 용도는 조직 형태를 인식하는 것입니다.³ Hematoxylin으로 효과적인 세포 염색을 하려면 산화 및 매염제의 복합 과정이 필요합니다. 적절하게 처리가 되면 염료는 핵산을 진한 청자색으로 염색하는 반면, Eosin은 분홍색을 띠고 단백질을 비특이적으로 염색합니다. 일반적인 조직에서 핵은 파란색으로 염색되는 반면, 세포질과 세포외 기질은 다양한 정도의 분홍색으로 염색됩니다. 항원, 주로 단백질 에피토프에 특이적인 항체가 사용되는 면역조직화학을 사용하여 조직 내에서 특정 단백질을 식별할 수도 있습니다. 항체-항원 상호작용을 시각화하는 방법은 여러 가지가 있으며, 가장 일반적인 방법은 항체-효소 접합체를 사용하는 것입니다. 일반적으로 horseradish peroxidase(HRP) 또는 alkaline phosphatase인 이 효소는 적절한 화학 기질과 함께 배양하면 컬러 생성 반응을 촉매할 수 있습니다. 관심 있는 에피토프는 접합된 1차 단일클론 항체로 직접 표지되거나 더 일반적으로 1차 항체에 대한 2차 항체 접합체로 표지됩니다.

명시야 이미지를 이미지화하고 디지털 방식으로 기록하기 위해 본질적으로 두 가지 유형의 디지털 카메라(컬러, 그레이스케일)가 개발되었습니다. 디지털 그레이스케일 카메라에서 센서의 각 픽셀은 파장에 관계없이 센서에 닿는 빛의 강도에 관한 정보를 캡처합니다. 각 픽셀은 0(검은색)부터 최대값(흰색)까지의 숫자 값을 기록하며, 중간 숫자는 극단 사이의 회색 범위 또는 스케일을 나타냅니다. 컬러 디지털 카메라는 동일한 픽셀 세트를 사용하지만 각 픽셀 앞에 빨간색, 녹색 또는 파란색 컬러 필터가 있어 특정 파장의 강도에 대한 강도 측정만 기록됩니다(그림 9). 필터(빨간색, 녹색 및 파란색)는 특정 파장의 빛만 센서 어레이 픽셀을 통과하도록 허용하여 별도의 픽셀에서 기본 컬러의 강도를 측정합니다.

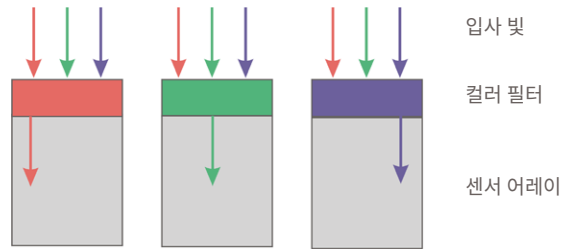


그림 9. 디지털 컬러 센서의 개별 픽셀의 도식적 단면. 특정 컬러 필터를 사용하면 특정 파장의 강도만 센서 어레이로 통과할 수 있습니다.

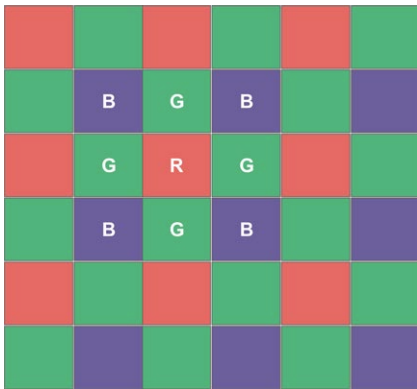


그림 10. 그레이스케일 센서의 픽셀 배열로 구성된 Bayer 컬러 필터 어레이. 각 픽셀은 단일 기본 컬러이며 나머지 두 컬러는 인접한 4개 픽셀의 평균으로 계산됩니다. 이 예에서는 빨간색 픽셀 (R)의 녹색 값은 4개의 녹색 픽셀(G)의 평균이고, 동일한 빨간색 픽셀의 파란색 값은 인접한 파란색 픽셀(B)의 평균입니다.

가장 일반적인 어레이 배열은 녹색에 대한 눈의 증가된 민감도를 보상하기 위한 수단으로 파란색이나 빨간색보다 녹색 픽셀이 두 배 많은 Bayer 패턴(그림 10)입니다. 이 배열을 사용하면 픽셀 수는 그레이스케일 카메라와 동일하게 유지되지만 각 컬러는 전체에서 나누어집니다. 원본 카메라 해상도와 동일한 해상도의 출력 이미지를 재구성하기 위해 디모자이킹(demosaicing)이라는 프로세스가 사용됩니다. 기본적으로 이 프로세스는 해당 컬러에 대한 인접 픽셀 값을 확인하여 누락된 각 픽셀의 두 컬러 값을 보간합니다. 다양한 보간 알고리즘이 있지만 가장 간단한 것 중 하나가 이중 선형 보간입니다. 이 분석법에서는 인접 픽셀을 사용하여 CFA에서 필터링한 광 강도를 보간합니다. 예를 들어, 그림 10에서 R로 표시된 빨간색 픽셀을 고려할 수 있습니다. CFA는 빨간색 파장의 빛만 해당 픽셀의 그레이스케일 카메라로 전송되도록 허용합니다. 해당 R 픽셀 위치의 파란색 강도는 R 픽셀 모서리에 있는 인접한 B 픽셀 4개의 평균 강도로부터 계산됩니다. 마찬가지로 R 픽셀의 녹색 강도는 R 픽셀의 측면에 있는 인접한 G 픽셀 4개의 평균 강도로부터 계산됩니다.

이 두 기술 간의 주요 절충점은 공간 해상도와 컬러 해상도 중 하나이며, 공간 해상도는 그레이스케일이, 컬러 해상도는 컬러 디지털 카메라가 더 우수합니다. Cytation 5는 이 두 가지 기술을 혼합하여 디모자이킹 처리 없이 전체 공간 해상도를 갖춘 컬러 명시야 이미징을 제공합니다. Cytation 5는 CFA를 사용하여 디지털 카메라의 각 픽셀에 대한 색광 노출을 제한하는 대신 기본 컬러(빨간색, 녹색, 파란색)로 구성된 세 가지 다른 광원으로 시료와 카메라 센서를 빠르게 연속적으로 비춰 각 컬러가 개별적으로 전체 해상도 이미지를 생성합니다. 그런 다음 세 개의 이미지가 서로 중첩되어 합성 컬러 명시야 이미지가 생성됩니다(그림 11).

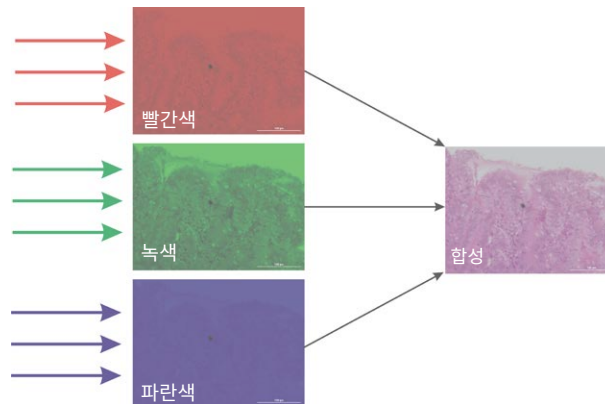


그림 11. 3개의 별도 RGB 필터링된 명시야 이미지의 합성 오버레이 이미지. 다양한 컬러 프로필(빨간색, 녹색, 파란색)을 가진 LED 광원을 사용하여 전체 디지털 센서 어레이를 빠르게 연속적으로 비춥니다. 그런 다음 세 개의 이미지를 결합하여 합성 컬러 명시야 이미지를 생성합니다.

컬러 명시야 판독 선택은 컬러에 대한 풀다운 메뉴를 사용하여 이미징 판독 단계 화면에서 이루어집니다(그림 12). 컬러 명시야의 선택은 판독 중 광 조명에 대한 Cytation 5의 빨간색, 녹색 및 파란색 방출 LED를 활성화합니다.

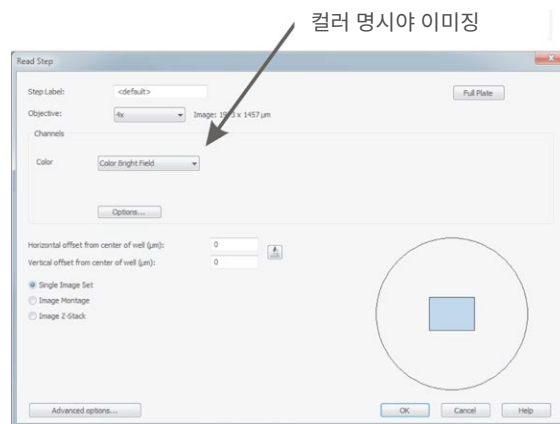


그림 12. 컬러 명시야 이미징을 식별하는 Gen5 판독 단계. 이미지는 이미징 컬러로 선택된 컬러 명시야가 있는 4x 대물렌즈를 사용하여 수집됩니다.

컬러 명시야를 이미징 컬러로 선택하면 "옵션" 버튼 아래에서 볼 수 있는 다양한 기본 기능이 활성화됩니다. 화이트 컬러 밸런스는 조명 보정의 일부로 컬러 명시야 이미징을 통해 자동으로 활성화되며 옵션 화면에서 선택을 취소할 수 없습니다(그림 13). 또한 자동 초점을 위한 이중 피크 분석법이 자동으로 기본값으로 선택됩니다(그림 13).

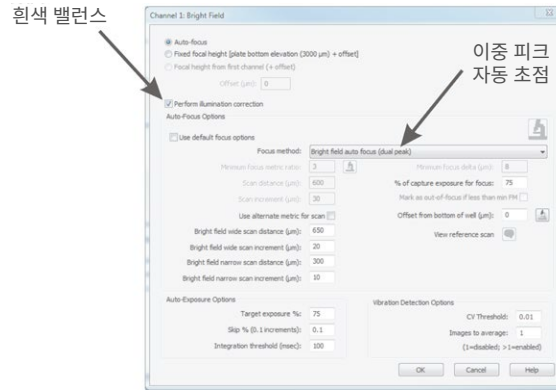


그림 13. 컬러 명시야 사용 Gen5 이미징 옵션 필드. 화이트 컬러 밸런스 및 이중 피크 자동 초점 기본값 식별.

컬러 명시야 현미경으로 검사하는 시료는 특히 고배율에서 대물렌즈의 실시야를 초과할 수 있습니다. 전체 영역을 이미지화하기 위해 전체 시료를 포함하는 일련의 이미지 또는 몽타주를 포착합니다. 예를 들어, 일반적인 고정 및 염색된 조직 절편의 면적은 4x 대물렌즈로 포착한 단일 이미지보다 훨씬 큼니다. 그러나 여러 개의 오버랩된 이미지의 몽타주는 전체 절편을 포함합니다. 심지어 조직 절편은 조직과 세포 구조를 포착하기 위해 다양한 배율의 몽타주 시리즈를 사용하여 가장 우수하게 평가되는 총체적이고 미세한 구조를 가지고 있습니다. 몽타주는 전체 그림을 만드는 데 필요한 행과 열의 수를 수용하기 위해 일련의 이미지 또는 타일을 구불구불한 모양으로 생성한 다음 Gen5 소프트웨어를 사용하여 함께 스티칭합니다.

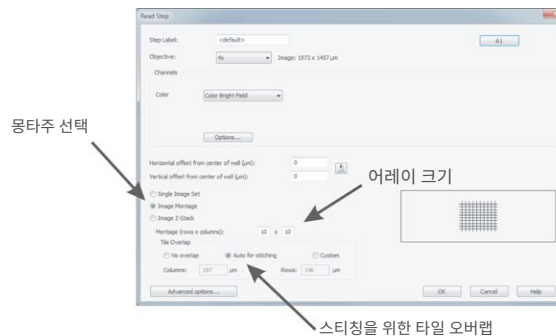


그림 14. 몽타주 이미지를 식별하는 Gen5 판독 단계. 컬러 명시야 미지는 이미지 몽타주를 선택한 상태에서 4x 대물렌즈를 사용하고 스티칭을 위해 타일 오버랩을 자동으로 설정한 10 x 10 어레이를 사용하여 수집합니다.

몽타주 이미징은 Gen 5의 판독 단계 화면에서 선택됩니다. 컬러와 슬라이드 위치를 선택한 후 "이미지 몽타주" 방사형 버튼이 선택됩니다. 그러면 이미지 어레이의 행 및 열 수와 타일 오버랩에 관한 몽타주 파라미터가 활성화됩니다(그림 14). 몽타주를 함께 스티칭하는 데 관심이 없는 경우 "오버랩 없음"을 선택하면 이미지 타일이 서로 바로 옆에 있는 최대 이미지 영역을 포함하는 일련의 이미지가 생성되고 모든 이미지 타일이 별도로 분석됩니다. 그러나 이미지를 단일 이미지 파일로 분석하거나 저장할 수 있는

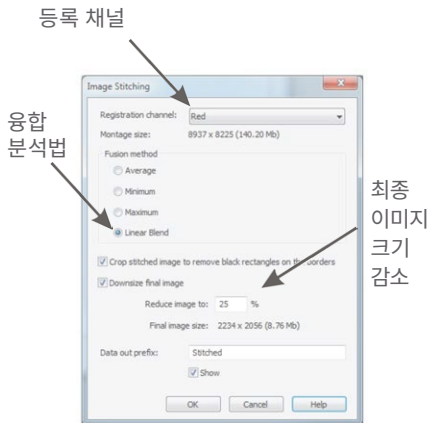


그림 15. Gen5 이미지 스티칭 데이터 감소 단계. 사용할 융합 분석법에 따라 등록 채널(빨간색, 녹색 또는 파란색)이 선택됩니다. 디스크 저장 공간을 절약하기 위해 최종 이미지 크기를 줄일 수 있습니다.

단일 몽타주 파일로 스티칭하려는 경우 적절하게 등록하고 함께 융합하려면 각 디지털 이미지에 일부 오버랩이 필요합니다(그림 14). 이미지에 특이한 특징이 없으면 기본 오버랩이 제안됩니다. 사용자가 이미지 타일 오버랩 양을 늘리거나 줄일 수 있는 사용자 지정 오버랩을 선택할 수 있습니다. 스티칭 융합 분석법을 선택해야 하며 일반적으로 직선 블렌드가 가장 좋은 옵션입니다(그림 15). 최적의 이미지 융합을 위해 등록 채널을 사용하려면 가장 복잡한 채널을 선택하는 것이 가장 좋습니다. 이미지 복잡성으로 인해 입도가 증가하면 스티칭 프로세스 중에 이미지 타일을 더 쉽게 정렬할 수 있습니다. 엄청난 파일 크기가 있을 수 있으므로 Gen5 소프트웨어를 사용하면 최종 파일을 보다 관리하기 쉬운 크기 수준으로 압축할 수 있습니다. 분석을 위해 최대 세부 사항에 관심이 있는 경우 전체 이미지 크기와 해상도를 유지할 수 있는 반면, 더 작은 합성 이미지에 관심이 있는 경우 이미지 해상도를 크게 줄이는 것을 선택할 수 있습니다. 파일이 하나만 생성되는 경우 기본 이름인 '스티칭'을 사용할 수 있지만, 보다 정확한 의미를 가진 대체 이름을 입력할 수도 있습니다(그림 15).

믿을 수 있는 컬러 렌디션은 컬러 명시야 이미징의 핵심 요소입니다. 현재 디지털 카메라의 컬러 출력이 '보정'할 수 있는 공식적인 컬러 표준은 존재하지 않습니다. 따라서 다양한 컬러를 신뢰할 수 있게 렌더링하는 능력이 중요합니다. Cytation 5는 자동으로 활성화되는 조명 보정의 일부로 화이트 컬러 밸런스 절차를 사용합니다. 많은 조직 슬라이스는 핵과 단백질을 식별하기 위해 hematoxylin 및 Eosin(H&E 염색)으로 염색하지만, 다른 염색이나 시료의 자연스러운 색도 현미경으로 시각화할 수 있습니다. 그림 16에서 볼 수 있듯이 식물 앞에 존재하는 엽록소의 선명한 녹색이나 성장하는 식물 뿌리 단면의 맥관 구조도 이미지화할 수 있습니다.

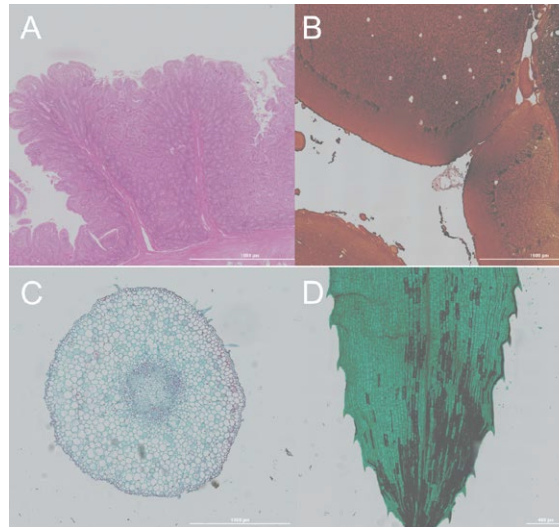


그림 16. 다양한 조직에서 얻은 일련의 컬러 명시야 이미지. (A) 20x 현미경 대물렌즈로 이미지화한 H&E 염색 인간 장벽; (B) 20x 현미경 대물렌즈로 이미지화한 인간 소뇌 조직; (C) 20x 현미경 대물렌즈로 이미지화한 어린 콩 뿌리 단면; (D) 20x 현미경 대물렌즈로 이미지화한 *Hydrilla verticillata* 수생 식물 잎. 모든 이미지는 스티칭된 몽타주 합성 이미지입니다.

조직 조각은 대비를 높이기 위해 염색되거나 다양한 분석법을 사용하여 특정 세포 단백질을 식별할 수 있습니다. 항체 기반 분석법은 일반적으로 horseradish peroxidase 또는 alkaline phosphatase와 같은 반응성 효소에 접합된 특정 항체를 사용합니다. 이들 효소는 제공된 기질과 반응하여 항체가 결합된 조직을 염색하는 발색 화합물을 형성하여 항원의 공간 및 발현 수준 정보를 생성합니다. Horseradish peroxidase 접합체는 기질 3, 3' diaminobenzine(DAB)을 변환하여 검정색에서 갈색 생성물을 형성하고, alkaline phosphatase는 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)을 변환하여 분홍색 음영 생성물을 형성합니다. 그림 17은 HRP 접합 항체를 사용하여 염색하고 DAB 기질과 반응하여 갈색으로 염색된 폐 실질 조직을 생성한 쥐 폐 조직을 보여줍니다. 마찬가지로, alkaline phosphatase 접합 항체는 분홍색 염색을 유발합니다. 익숙한 H&E 염색과의 비교도 표시됩니다.

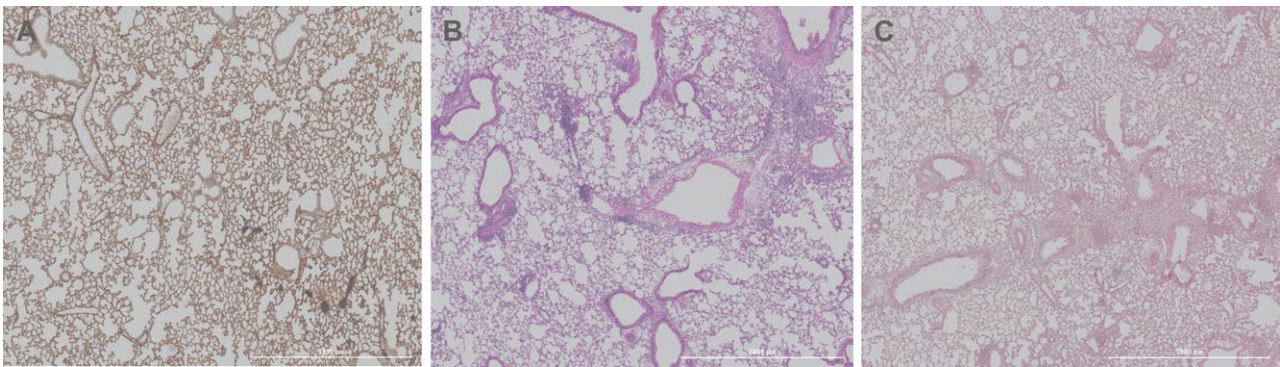
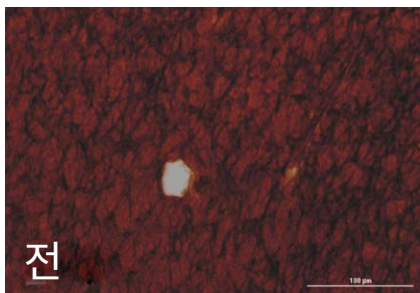
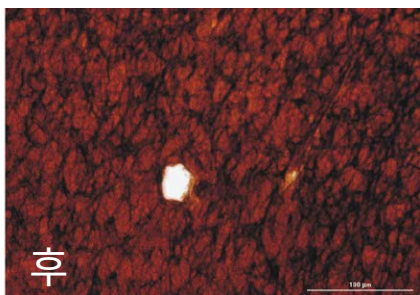


그림 17. 다양한 분석법을 사용하여 염색된 쥐 폐 조직. 폐 조직은 (A) DAB와 반응하여 갈색 리포터 컬러를 형성하는 HRP 항체 접합체; (B) H&E 염료; (C) AEC와 반응하여 분홍색 생성물을 형성하는 alkaline phosphatase 접합체를 사용하여 염색되었습니다.



전



후

그림 18. 이미지 품질을 향상시키기 위한 컬러 대비 및 밝기 조정 사용. 대비 및 밝기 조정 전후의 인간 뇌 조직의 컬러 명시야 이미지(20x). 이미지는 오버랩된 빨간색, 녹색, 파란색 컬러 이미지를 나타냅니다.

각 컬러의 밝기와 대비를 서로 별도로 변경하여 개별 이미지를 개선할 수 있습니다. 디지털 카메라 센서와 비교하여 인간의 눈 인식 차이로 인해, 특히 녹색 컬러의 경우 이미지의 밝기 및/또는 대비를 약간 조정하면 이미지가 더 선명해 보일 수 있습니다. 특히 배율이 높을수록 더욱 선명해 보일 수 있습니다. 그림 18에서 볼 수 있듯이 녹색 대비가 증가하면 이미지가 더 선명해집니다.

결과 및 토의

Cytation 5는 광학 현미경 및 PMT 기반 형광 검출을 수행할 수 있는 세포 이미징 멀티모드 리더입니다. 현미경 구성요소는 조명용 LED, 필터 큐브, 현미경 대물렌즈 (1.25x-60x) 및 그레이스케일 CCD 카메라로 구성된 디지털 기반입니다. 대부분의 현미경 구성요소는 기존 마이크로플레이트 리더의 PMT 기반 광학장치와 동일한 상단 공간에 있는 위상차 조명을 제외하고 Cytation 5의 하단 절반에 위치합니다. 또한 디자인은 모듈식이므로 원하는 대로 현미경 및/또는 마이크로플레이트 리더 광학

장치를 선택할 수 있습니다. 현미경 슬라이드, 광범위한 마이크로플레이트 밀도 (6-384웰), 페트리 디시(35, 60 및 100mm) 및 조직 배양 플라스크(T-25cm²)를 포함한 다양한 시료 용기를 현미경 모듈과 함께 사용할 수 있습니다.

Cytation 5 세포 이미징 리더는 Gen5 소프트웨어와 상호 작용하여 선택한 판독 방식에 따라 최적의 결과를 제공합니다. 컬러 명시야 이미징의 경우 Cytation 5 내의 다색 LED 조명은 일반적으로 컬러 디지털 카메라에서 볼 수 있는 컬러 기능을 갖춘 고성능 그레이스케일 디지털 카메라 센서의 해상도를 제공합니다. 정확한 컬러 렌디션에 중요한 정확한 컬러 조정은 사용자 개입 없이 컬러 명시야를 선택하면 소프트웨어에서 자동으로 활성화됩니다. 몽타주 컬러 명시야 이미징은 정교한 자동 초점 소프트웨어 알고리즘을 활용하여 이미지 초점을 최적화합니다. 자동 초점 루틴은 모든 대물렌즈에 대한 몽타주 시작 시 자동으로 수행되며 더 높은 배율의 대물렌즈(10x-60x)의 각 이미지에서 반복됩니다. 더 큰 심도를 갖는 낮은 배율 대물렌즈(2.5x 및 4x)는 몽타주 판독 중에 반복적으로 초점을 다시 맞추는 필요가 없으며 자동 초점은 이미지 단계가 시작될 때만 수행되어 몽타주 이미징 중에 시간을 절약합니다.

이미지 수집, 처리 및 분석은 Cytation 5와 함께 제공되는 Gen5 소프트웨어로 수행됩니다. 이 소프트웨어는 선명하고 유용한 이미지를 렌더링하는 데 있어 Cytation 5 하드웨어와 함께 중요한 구성요소입니다. 가장 일반적으로 이미지화되는 슬라이드 영역은 단일 캡처보다 큼니다. 이러한 경우 검사할 영역을 포함하는 몽타주로 여러 이미지를 포착합니다. 일련의 이미지를 신뢰할 수 있게 정렬하거나 분석하려면 스티칭이라는 프로세스를 통해 하나의 연속 이미지로 결합해야 합니다. 디지털 이미지는 가장 기본적인 수준인 숫자 값의 배열이기 때문에 수학적 알고리즘을 활용하여 개별 파일을 결합할 수 있습니다. 별도의 타일이나 이미지는 사용자가 선택할 수 있는 다양한 분석법(선형, 평균, 최소, 최대)을 사용하여 오버랩 되는 영역에서 융합됩니다. 일반적으로 직선 블렌드 분석법이 최상의 결과를 제공합니다. 이는 계산된 평균이며, 각 포인트는 가장 가까운 경계까지의 거리에 따라 가중치가 부여됩니다. 분석법은 종종 하나의 이미지 타일에서 다른 이미지 타일로 가장 부드러운 전환을 생성합니다. 다른 분석법은 이름에서 알 수 있듯이 오버랩 되는 영역의 평균, 최소 또는 최대 강도 값을 출력에 사용합니다.

감사문

염색된 조직 슬라이드를 기증해 주신 버몬트 대학교(University of Vermont) 의과대학 병리학과의 Yvonne Janssen-Heninger 박사와 Doug Taatjes 박사에게 감사드립니다.

자동화된 조직 마이크로어레이(TMA) 이미징으로 입증된 현미경 검사에서 향상된 처리량 옵션을 위한 응용 로봇 공학

어세이 소개

지금까지 현미경 검사는 시료 처리에서 더 높은 처리량 옵션을 제한할 수 있는 수작업 분석법이었습니다. 최근에는 자동화된 디지털 현미경의 도입과 마이크로플레이트 또는 기타 처리량이 높은 형식의 이미징에 대한 현미경 슬라이드 기술의 적용에서 현미경 검사의 시료 처리 옵션이 확장되었습니다. 이러한 적응의 한 예로, 직경 0.6mm, 두께 2-5 μ m의 수백 개의 개별 조직 코어를 하나의 현미경 슬라이드에 배열하여 여러 일반적인 조직학 절차에서 처리량을 높일 수 있는 기술인 조직 마이크로어레이(TMA)를 들 수 있습니다. TMA(그림 19)는 바이오 बैं킹, 생검 및 기타 조직 시료 보관; 질병 상태 검사, 분류 및 등급화; 품질 관리; 어세이 개발 중 항체 및 염색 최적화⁷와 같은 많은 응용 분야에서 유용한 것으로 입증되었습니다.

높은 처리량으로 TMA를 자동화하는 데 따르는 어려움을 극복하기 위해 설계된 최적의 이미지 획득 설정을 입증하기 위해 2개의 H&E 염색 1.5mm 72-코어 TMA 슬라이드와 6개의 H&E 염색 1.5mm 24-코어 TMA 슬라이드를 4개의 Agilent BioTek 현미경 슬라이드 홀더에 로드하고(그림 19A) BioStack 4 공급 타워 내에 수직으로 쌓아 올렸습니다(그림 19B). Gen5 소프트웨어는 각 슬라이드 홀더를 BioStack에서 Cytation 5 이미지로 순차적으로 로드하고 각 이미징 세션 후에 슬라이드 어댑터를 BioStack 수신 타워로 반환하도록 프로그래밍되었습니다. TMA와 개별 코어를 2.5x, 4x, 10x, 20x, 40x의 컬러 명시야에서 이미지화하여 각 대물렌즈에 대한 최적의 초점 높이, x,y 오프셋 값, 몽타주 크기 및 스티칭 오버랩 설정에 대한 정보를 알아냈습니다(그림 19C에 한 세트 표시). 비교를 위해, 동일한 기기에서 독립적으로 얻은 TMA의 형광 이미지를 설명하기 위해 지역 조직학 실험실에서 기증한 DAPI 염색된 폐기된 프로토타입 TMA의 이미지가 포함되어 있습니다.



그림 19. 마이크로어레이 슬라이드. (A) 두 개의 TMA 슬라이드는 멀티모드 이미징 리더에 대한 로봇 인터페이스와 호환되는 슬라이드 홀더에 배치됩니다. (B) 소프트웨어는 로봇에서 이미지로 각 슬라이드 홀더를 순차적으로 로드하도록 사전 프로그래밍된 후 자동 몽타주 및 스티칭 기능을 사용하여 각 슬라이드의 15 x 15 이미지를 캡처하여 최종 어레이(C)를 4x로 TMA 중 하나에 표시하도록 했습니다. (D) 두 개의 9 x 8 조직 마이크로어레이(TMA)는 현미경 슬라이드에 서로 다른 오프셋 위치로 표시됩니다. 슬라이드 하단에 있는 마커 코어는 여러 어레이에서 제어 역할을 하며 패널 위치를 식별하는 데 도움이 될 뿐만 아니라 어레이 간의 비대칭 위치 지정에 추가되기도 합니다. Agilent BioTek의 Gen5 소프트웨어에서 사용할 수 있는 맞춤형 x, y 오프셋과 몽타주 및 스티칭 옵션을 사용하여 Agilent BioTek Cytation 5에서 이미징하는 동안 이러한 기하학적 이상 현상을 보정할 수 있으므로 Agilent BioTek BioStack 4 마이크로플레이트 스택을 통해 혼합 크기의 TMA를 더 높은 처리량으로 함께 실행할 수 있습니다.

TMA는 독특한 기하학적 구조와 장착 기술로 인해 높은 처리량에서 몽타주 및 스티칭 이미지 최적화를 입증하기 위한 모델로 선택되었습니다. 마이크로톰 절편화 후 파라핀 처리된 TMA 슬라이스를 물에 넣고 현미경 슬라이드를 시트 아래에 담근 다음 수조에서 들어 올려 어레이를 캡처합니다. TMA를 슬라이드에 재배치할 수 있는 시간 차이가 있지만 이 기술을 사용하면 코어 수와 크기가 같은 패널이라도 현미경 슬라이드에 동일한 중심 오프셋으로 장착되지 않을 수 있습니다(그림 19D). 또한 일부 TMA에는 나머지 코어에서 오프셋될 수 있는 마커 코어가 있을 수도 있고 없을 수도 있습니다. 또한 Agilent BioTek 현미경 슬라이드 어댑터는 표준 25 x 75 x 1mm 현미경 슬라이드용으로 설계되었지만 로봇 이송 및/또는 이미지 캐리어 위치 지정 시 발생할 수 있는 슬라이드 이동을 보정하기 위해 이미징을 위한 x,y 오프셋을 보정할 때 약간의 허용 오차를 포함해야 합니다.

재료 및 분석법

재료

- 1 세트 FDA 인간 정상 장기 조직, US Biomax, Inc.
(p/n DA802 H&E 염색, 마이크로어레이 패널) 및 코어 사양 시트:
www.biomax.us/tissue-arrays/Multiple_Organ/FDA802
- Qty 6 상위 4가지 유형의 암 검사 조직, US Biomax, Inc.
(p/n TP242 H&E 염색, 마이크로어레이 패널) 그림 25에 표시.
코어 사양 시트: www.biomax.us/tissue-arrays/Multiple_Organ/TP242
- 지역 조직학 실험실에서 기증한 폐기된 프로토타입 DAPI 염색 TMA 슬라이드
(갑상선암 및 선종 조직 어레이, US Biomax, Inc. p/n TH641 무염색)
- Agilent BioTek 슬라이드 어댑터(p/n 1220548)
- Cytation 5용 Agilent BioTek 통합 키트 – BioStack 4 인터페이스(p/n 7310053)

분석법

TMA 이미징을 자동화하기 위한 최적의 이미지 수집 설정은 H&E 염색된 72-코어 TMA를 사용하여 결정되었습니다. TMA를 슬라이드 어댑터에 배치한 다음 Gen5 소프트웨어의 프로토콜 정의 인터페이스 내에서 수동 모드를 사용하여 컬러 명시야에서 4x 배율로 x, y 오프셋 및 몽타주 파라미터를 설정했습니다. 두 번째 72-코어 TMA가 홀더에 배치되었으며 두 슬라이드 모두 정의된 파라미터로 이미지화되었습니다. 이미징 세션 후 TMA 중 하나는 약간 오프셋되었고 다른 하나는 중앙에 위치했습니다. x,y 오프셋 최적화는 두 번째 슬라이드에서 수행되었습니다(그림 20). 그런 다음 모든 TMA가 두 개의 서로 다른 기하학적 구성이 되도록 두 개의 판독 단계가 프로토콜에 프로그래밍되었습니다. 6개의 H&E 염색 1.5mm 24-코어 TMA 슬라이드를 3개의 추가 Agilent BioTek 현미경 슬라이드 홀더에 로드하고 4개의 홀더를 모두 BioStack 4 공급 타워 내에 수직으로 쌓아 놓았습니다. Gen5 소프트웨어는 각 슬라이드 홀더를 로봇에서 Cytation 5 이미지로 순차적으로 로드하고 각 이미징 세션 후에 슬라이드 어댑터를 스택커 수신 타워로

반환하도록 프로그래밍되었습니다. TMA와 개별 코어는 정의된 프로토콜을 사용하여 이미지화되었습니다. 실행 후 빨간색 채널의 직선 블렌드 몽타주 분석법을 사용하여 이미지를 처리하고 이미지 크기를 7.35%로 축소했습니다. 동일한 프로세스를 사용하여 3개의 TMA에서 선택 코어를 20x 및 40x에서 이미지화했습니다. 비교를 위해 지역 조직학 실험실에서 기증한 DAPI 염색된 폐기된 프로토타입 TMA도 형광 이미징 채널에서 4x에서 동일한 절차를 사용하여 최적화했으며, TMA의 형광 이미징을 설명하기 위해 포함했습니다. 이 경우 BioStack 4가 계속 사용되었지만 동일한 Cytation 5 이미저와의 단일 슬라이드 전송을 통해 무인 이미징이 가능했습니다.

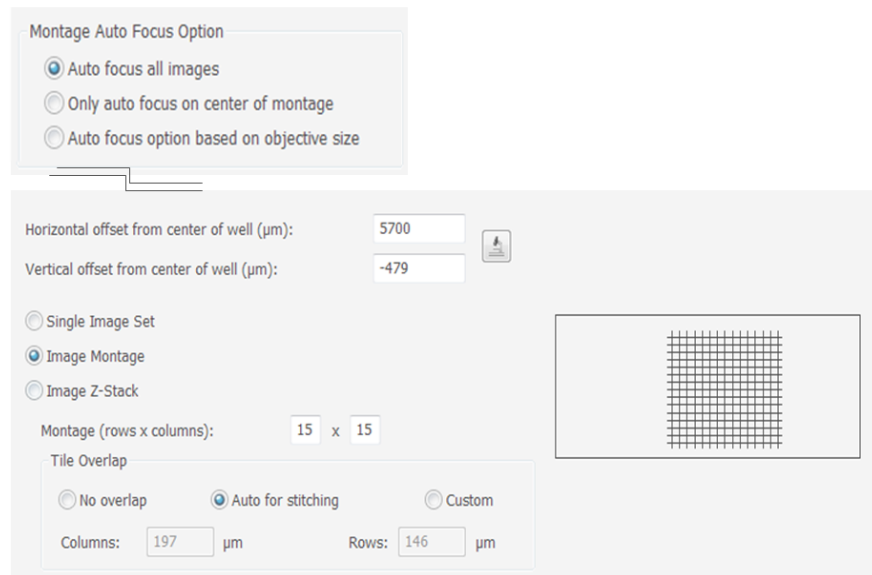


그림 20. Agilent BioTek Gen5 캡처 절차 파라미터. Agilent BioTek Cytation 5의 컬러 명시야에서 두 가지 패널 크기가 다른 8개의 TMA를 4x로 순차적으로 이미지화하는 데 사용된 x,y 오프셋, 초점 설정, 몽타주 및 스티칭 옵션의 예. Agilent BioStack 4를 사용하여 슬라이드를 이미저로 앞뒤로 옮겼습니다.

결과 및 토의

H&E 염색된 TMA를 이미지화하는 Cytation 5의 능력은 다음 그림에서 확인할 수 있습니다. Cytation 5 현미경 모듈은 도립 현미경 방향을 사용하므로 TMA 패널에서 정확한 코어 식별을 보장하려면 TMA 바닥을 통해 TMA를 이미지화해야 합니다. 따라서 슬라이드는 라벨이 위로 향하도록 홀더 방향으로 배치되었습니다. 그림 21은 24-코어 시료 TMA를 보여주었고, 그림 22는 4x 대물렌즈를 갖춘 저해상도 현미경을 사용하여 72-코어 시료 TMA를 이미지화하는 기능을 보여줍니다.

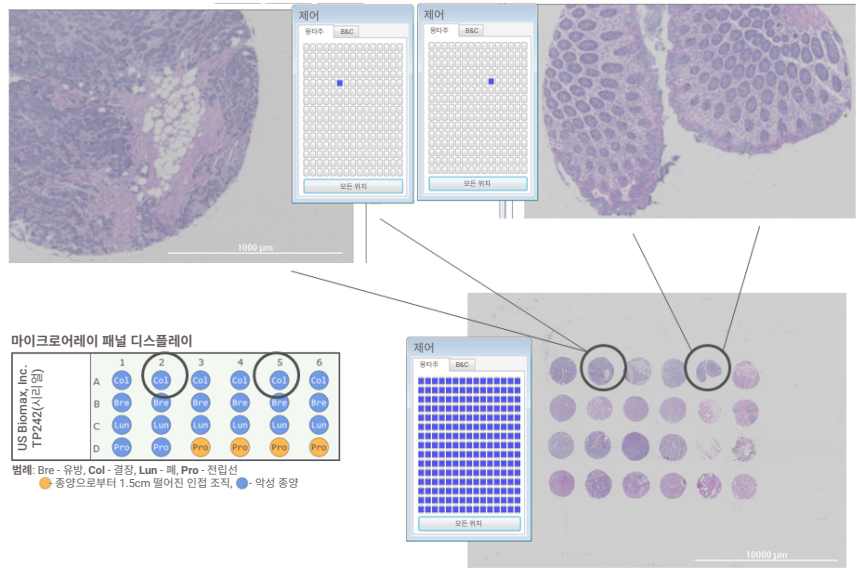


그림 21. 24-코어 조직 마이크로어레이. Agilent BioTek Gen5 소프트웨어에서 사용할 수 있는 몽타주 및 스티칭 옵션을 사용하여 Agilent BioTek Cytation 5에서 4x로 이미징되었습니다. 이 슬라이드는 Agilent BioTek BioStack 4를 사용하여 8개의 혼합 크기 TMA 배치로 실행되었습니다. 오른쪽 하단 이미지는 모든 타일을 보기 위해 몽타주 인터페이스 옵션을 사용하여 표시되는 전체 어레이를 보여줍니다(모든 위치 모드). 상단에는 단일 타일 보기에 표시된 어레이와 다른 두 개의 코어가 있습니다. 왼쪽 사례는 81세 여성의 악성 대장점액선암 III등급으로 진단된 사례이고, 오른쪽 사례는 35세 남성의 악성 대장조직형 인접암으로 진단된 사례입니다. Cytation 5는 아래쪽에서 이미지를 포착하기 때문에 슬라이드 홀더에 슬라이드를 정확한 방향으로 배치하면 조직 식별이 쉬워져 최종 이미지가 TMA 패넬(왼쪽 아래)과 일치합니다. 이 경우 슬라이드는 라벨이 위로 향하도록 홀더 방향으로 배치되었습니다.

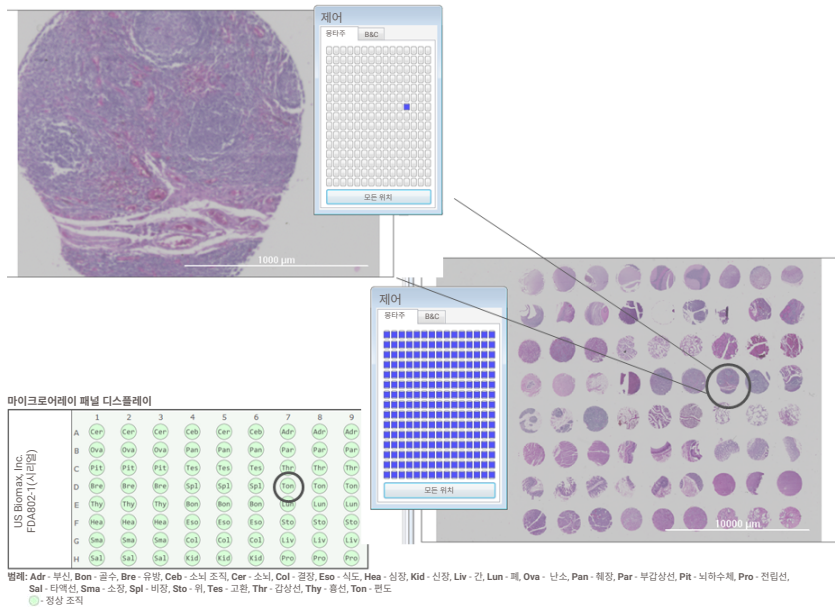


그림 22. 인간 정상 기관 조직의 72-코어 조직 마이크로어레이. Agilent BioTek Gen5 소프트웨어에서 사용할 수 있는 몽타주 및 스티칭 옵션을 사용하여 Agilent BioTek Cytation 5에서 4x로 이미징되었습니다. 이 슬라이드는 그림 21의 어레이와 동일한 설정을 사용하여 8개의 혼합 크기 TMA로 구성된 동일한 배치에서 실행되었습니다. 상단에는 몽타주 모든 위치 보기를 사용하여 전체 어레이가 표시됩니다. 정상적인 편도선 조직의 코어는 단일 타일 보기에 표시되며 몽타주 제어 패넬에서 개별 타일을 클릭하거나 몽타주 이미지를 직접 두 번 클릭하여 선택됩니다.

몇몇 TMA 예는 Cytation 5 이미지를 사용하여 이미지화되었으며, 이는 조직 검사를 가능하게 하기 위해 더 높은 해상도의 현미경 검사를 수행할 수 있는 능력을 보여줍니다. 이미지 획득 전에 선택한 기본 또는 사용자 지정 오버랩 설정을 사용하면 최적화된 스티칭 파라미터를 수정하여 분석을 위한 최종 이미지를 제공할 수 있습니다(그림 23).

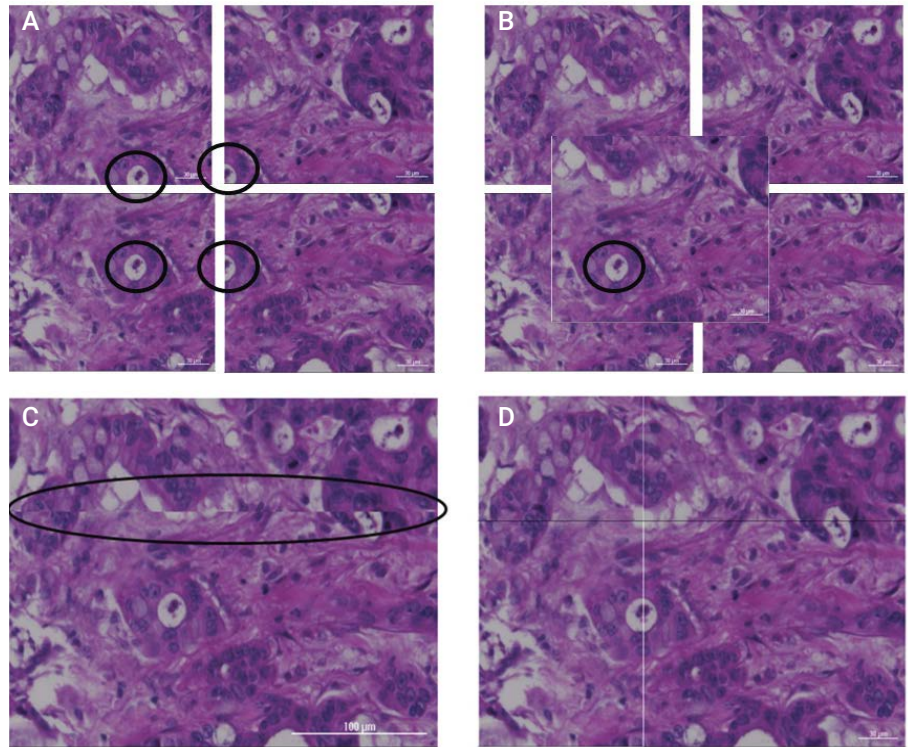


그림 23. (A) TMA 코어에서 가져온 40x의 2 x 2 몽타주의 개별 타일 이미지. 원은 조직의 구별 가능한 마커를 사용하여 각 타일이 다른 타일과 관련하여 이미지화되는 위치를 보여줍니다. (B) 왼쪽에 표시된 4개의 타일에 중첩된 40x의 몽타주와 동일한 중심 오프셋을 사용하는 단일 이미지. 이미지는 몽타주를 사용하여 4개의 개별 타일 이미지에서 동일한 비율로 증가된 전체 표면적을 얻을 수 있음을 보여주기 위해 왼쪽 하단 타일(원 표시)의 마커 중앙에 배치되었습니다. (C) 기본 스티치 오버랩 설정은 가로 행(원 표시)을 따라 비대칭입니다. 타일 오버랩 값을 사용자 지정하여 이 문제를 해결할 수 있습니다. 수직(열) 오프셋이 정확하게 정렬되어 있습니다. (D) 40x에서 스티칭을 위한 최적의 2 x 2 몽타주 타일 오버랩 그림.

마지막으로 그림 24는 연구자의 해석을 위해 정상 조직과 질병이 있는 조직을 비교할 때 TMA의 예를 보여 주며, 그림 25는 Cytation 5를 사용하여 TMA에 형광 현미경 검사를 수행할 수 있는 기능을 보여줍니다.

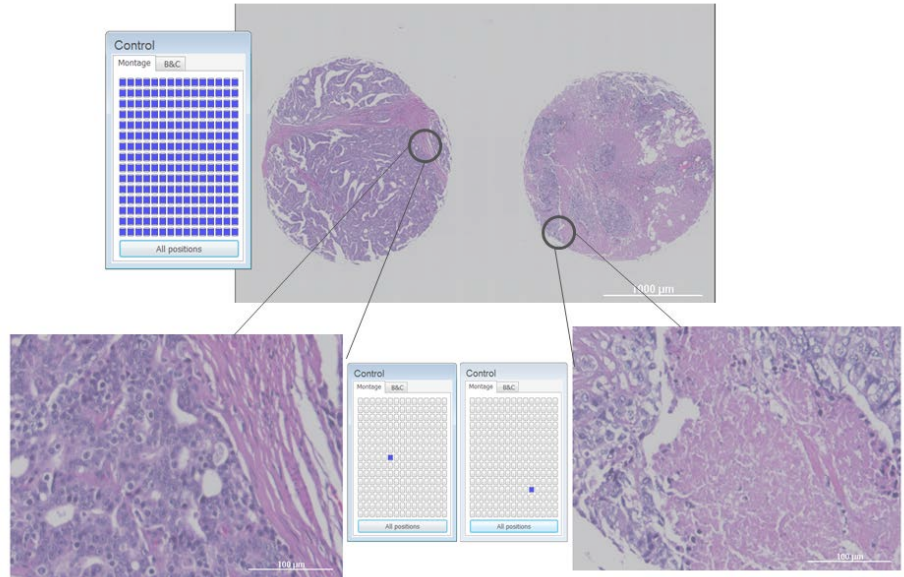


그림 24. 전립선 조직. 개별 타일의 세부 영역이 표시된 20x 몽타주(상단 중앙). 왼쪽 아래 조직은 악성 전립선 중앙, 오른쪽 아래는 중앙에서 1.5cm 떨어진 전립선 인접 조직입니다. 이 코어는 두 가지 다른 사례에서 나온 것입니다.

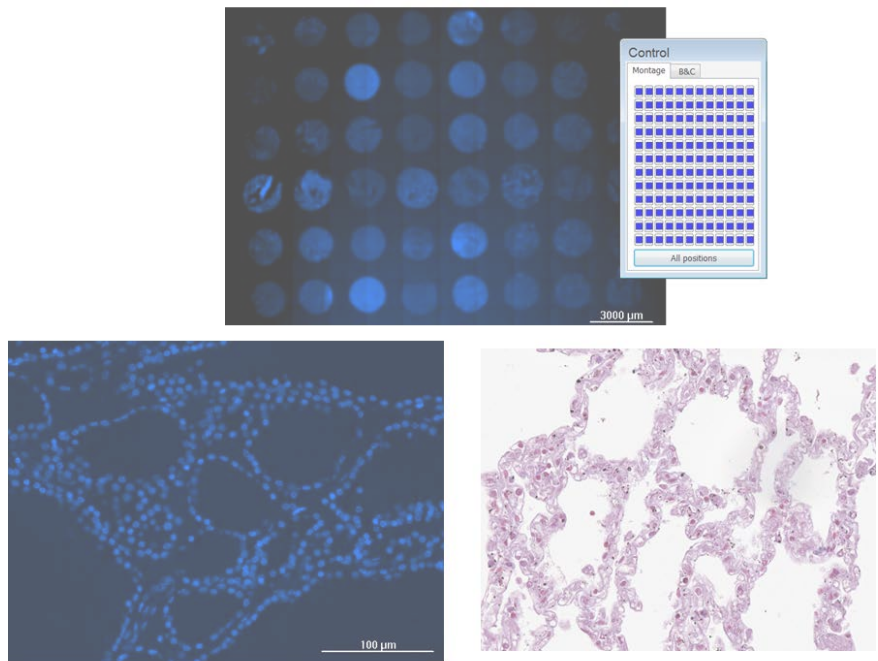


그림 25. 폐기된 프로토타입 TMA. DAPI로 염색되어 지역 조직학 실험실에서 기증되었으며 Agilent BioTek Gen5 소프트웨어의 몽타주 및 스티칭을 사용하여 Agilent BioTek Cytation 5에서 4x로 이미지화되었습니다(상단). 배경 희부연 부분은 불완전한 탈파라핀화로 인한 것일 수 있습니다. 왼쪽 하단은 동일한 어레이에서 20x로 포착한 단일 이미지이고, 오른쪽 하단은 비교를 위해 독립적인 소스에서 다른 현미경으로 이미지화한 동일한 어레이의 다른 슬라이스에서 20x로 H&E 염색된 정상 폐 조직입니다(US Biomax p/n TH641).

결론

높은 처리량의 조직학 응용 분야를 위해 H&E 염색된 TMA를 이미징하기 위한 워크플로 자동화를 위한 Agilent BioTek Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더와 Agilent BioTek BioStack 4 마이크로플레이트 스택커의 기능이 이 응용 자료에서 입증되었습니다. 분석 및 해석을 위한 이상적인 이미지에 맞게 최적화할 수 있는 몇 가지 주요 파라미터가 있습니다. TMA 어세이의 경우 슬라이드 아래에서 Cytation 5 이미지를 확인해야 하므로 조직 식별을 용이하게 하려면 슬라이드 어댑터에서 슬라이드의 라벨 방향이 위로 향하도록 해야 하며 슬라이드 홀더에 놓았을 때 슬라이드의 위쪽이 마이크로어레이 패널의 기하학적 ID와 일치해야 한다는 점을 주의해야 합니다.

Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더와 이미지 소프트웨어에 내장된 스티칭 및 몽타주 알고리즘은 모든 처리량에서 컬러 명시야 및 형광 모드로 조직 마이크로어레이를 이미징하는 데 이상적으로 적합합니다. 몽타주 크기, 타일 오버랩 크기, x, y 오프셋 및 초점 옵션을 최적화하면 동일하거나 다른 크기의 어레이를 단일 배치에서 실행하는 데 유용한 사용자 지정 이미지 수집이 향상됩니다. 몽타주 제어 패널을 사용하면 전체 스티칭된 이미지 또는 몽타주의 각 개별 타일을 클로즈업하여 염색된 조직 코어를 보다 자세히 검사할 수 있습니다. 몽타주 '모든 위치' 보기에서 관심 영역을 직접 두 번 클릭하여 개별 타일을 표시할 수도 있습니다.

필요한 경우 단일 프로토콜 내에 여러 판독 단계를 포함하는 기능을 사용하면 여러 배율 또는 기하학적 구성에서 "병렬 몽타주"가 가능하므로 특히 더 높은 배율에서 더 넓은 표면적의 이미지가 필요한 경우, 더 높은 처리량에서 다양한 크기 또는 다른 x,y 오프셋을 가진 이미징 어레이의 문제를 극복할 수 있습니다. 각 이미지에 자동 초점이 있는 15 x 15 몽타주 그리드와 가장 큰 어레이로 구성된 사용자 지정 x,y 오프셋을 사용하는 4x 이미징은 72 및 24 1.5mm TMA의 모든 코어를 캡처하는 데 가장 유리한 것으로 나타났습니다. 고밀도 어레이의 경우 단일 스티칭된 몽타주 이미지에서 모든 코어를 캡처하려면 2.5x 배율이 필요할 수 있습니다. 20x에서 15 x 15 몽타주는 1.5mm 코어 쌍을 이미징하는 데 가장 적합한 것으로 나타났으며, 예를 들어 악성 조직 코어와 종양에서 1.5cm 떨어진 인접 조직이 있는 코어를 나란히 이미지화하는 데 유용한 넓은 실시야를 통해 향상된 세부 정보를 제공합니다. 40x의 더 높은 배율을 사용하면 2 x 2 몽타주는 하나의 1.5mm 코어 시료 부분에서 동일한 배율의 단일 이미지보다 더 넓은 실시야를 포괄하는 4개의 타일을 제공합니다. 40x 몽타주에서 최종 스티칭된 이미지를 원하는 경우 타일 오버랩 정렬을 최적화하기 위해 사용자 지정 타일 오프셋이 필요할 수 있습니다.

명시야, 컬러 명시야, 위상차, 디지털 위상차, 형광 등 Cytation 5에서 제공되는 멀티모드 이미징 옵션을 사용하여 고정된 인간 또는 동물 세포주, 단일 조직 슬라이스, 부분 또는 전체 시편 마운트, 박테리아 및 효모 도말 등 다양한 현미경 슬라이드 응용을 통해 본문에 표시된 기술을 수행할 수 있습니다.

조직학적 절편은 일반적으로 구조적 식별을 위해 H&E로 염색됩니다. 조직학 및 조직 절편 응용 분야의 컬러 명시야 이미징에 BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물은 다음과 같습니다.

1. Becker, W., Nagarkatti, M., and Nagarkatti P.S., miR-466a Targeting of TGF- β 2 Contributes to FoxP3+ Regulatory T Cell Differentiation in a Murine Model of Allogeneic Transplantation. *Front. Immunol.* 9, 688, **2018**.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00688>
2. Randolph, G.J., Bala, S., Rahier, J-F., Johnson, M.W., Wang, P.L., Nalbantoglu, I., Dubuquoy, L., Chau, A., Pariente, B., Kartheuser, A., Zinselmeyer, B.H., and Colombel, J-F., Lymphoid Aggregates Remodel Lymphatic Collecting Vessels that Serve Mesenteric Lymph Nodes in Crohn Disease. *American J Path.* 186, 12; 3066-3073, **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.026>

모든 Agilent BioTek 이미저에는 형광 염색 및 면역형광으로 전처리된 슬라이드를 수집하고 정량할 수 있는 형광 현미경 기능이 있습니다. 또한 20개 이상의 다양한 사전 설정 필터 큐브와 최적화된 LED 커플링을 선택하고 필터 세트를 맞춤 제작할 수 있는 기능을 통해 이미징 요구 사항에 맞게 다양한 형광단을 선택할 수 있습니다. 다양한 형광단 및 면역형광 라벨링을 사용한 멀티플렉싱을 위해 각 판독 단계에서 4채널 이미지를 수집할 수 있습니다. 형광 검출을 위해 Agilent BioTek 도립 현미경을 사용한 문헌은 다음과 같습니다.

1. Antes, T.J., Middleton, R.C., Luther, K.M., Ijichi, T., Peck, K.A., Liu, W.J., Valle, J., Echavez, A.K., and Marbán, E., Targeting extracellular vesicles to injured tissue using membrane cloaking and surface display. *J. Nanobiotechnol.* 16:61, **2018**.
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0388-4>
2. Randolph, G.J., Bala, S., Rahier, J-F., Johnson, M.W., Wang, P.L., Nalbantoglu, I., Dubuquoy, L., Chau, A., Pariente, B., Kartheuser, A., Zinselmeyer, B.H., and Colombel, J-F., Lymphoid Aggregates Remodel Lymphatic Collecting Vessels that Serve Mesenteric Lymph Nodes in Crohn Disease. *American J Path.* 186, 12; 3066-3073, **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.026>

참고 문헌

1. Gage, G.J., Kipke, D.R., Shain, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.* (65), e3564
2. Shi S., Shi Y., Taylor C.R., Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Review and Future Prospects in Research and Diagnosis over Two Decades. *J. Histo & Chem.* 59(1), **2011**
3. Fischer A. H., Jacobson K.A., Rose J., Zeller R. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harb Protoc.*, **2014**
4. Sun ,Y., Duthaler, S. Nelson, B.J., Autofocusing in Computer Microscopy: Selecting the Optimal Focus Algorithm. *Microsc. Res. Tech.* 65, 139-149, **2004**
5. Groen, F. Young, I.T. & Lignart, G., A Comparison of Different Focus Functions for Use in Autofocus Algorithms, *Cytometry* 6, 81-91, **1985**
6. Yeo, T., Jayasooriah, R., Autofocusing for Tissue Microscopy. *Image Vis. Comput.* 11, 629-639, **1993**
7. www.biomax.us

더 알아보기:

www.agilent.com/lifesciences/biotek

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한 해답을 얻고
리소스에 액세스하세요:

community.agilent.com

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지할 수 없습니다.
RA44207.5998148148

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 2월 1일, 한국에서 발행
5994-3068KO
AG020321_01

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

