

**ImageJ** ist ein plattformübergreifendes *Bildbearbeitungsprogramm* und vor allem auch ein *Bildverarbeitungsprogramm*: Nach der Bildbearbeitung (z.B. Kontrasterhöhung der Farben) kann man die Daten des Bildes quantitativ auswerten (z.B. die Summe der roten Flächen bestimmen, Länge von Strukturen bestimmen etc.). Es wird vielfach für medizinische und wissenschaftliche Bildanalyse genutzt, zum Beispiel das Vermessen von Strukturen auf Mikroskopaufnahmen. Die Funktionalität des Programms kann durch Hunderte von Plug-ins erweitert werden. Das Programm und der Quelltext sind **\*frei** (*public domain*, Open Source) und dürfen daher frei kopiert und von jedermann verändert oder durch Plugins erweitert werden. Die Version **Fiji** von ImageJ (= **Fiji is just ImageJ**) wurde initiiert, um möglichst viele Werkzeuge für die Analyse von Bildern biologischer Proben in einer Software zu vereinen. Dazu wurde ImageJ um eine Vielzahl von Plug-ins erweitert. So kann man z.B. auch Kuvenanpassungen mit einer beliebig einstellbaren Näherungsfunktion mit diesem Programm durchführen. [www.wikipedia.de/ImageJ](http://www.wikipedia.de/ImageJ) (*verändert*)

Download, entpacken und auf dem USB-Stick überall hin mitnehmen

Sie können *Fiji* unter <https://imagej.net> herunterladen. ImageJ/Fiji ist **portabel**: Das Programm durchläuft also keine Installationsroutine o.ä. Man muss die zip-Datei nur entpacken, z.B. auf einen USB-Stick. So hat man das Programm überall mit dabei (**Stickware**). Am besten gemeinsam mit LibreOffice auf denselben Massenspeicher packen. So ist man voll ausgestattet und jederzeit einsatzbereit ;-)

**VORSICHT:** Legen Sie ImageJ/Fiji nicht in „C:\Programme“ oder einer anderen Systempartition ab, weil dann die .exe-Datei aufgrund der Sicherheitsrichtlinien keine Schreibrechte erhält und so z.B. ein Update nicht möglich ist.

1. Übung: Fläche eines größeren Objektes bestimmen. Fotosynthetisch aktive (=grüne) Fläche eines Efeublattes

1. Laden Sie die Datei <http://laborberufe.de/sonstiges/blatt.jpg> herunter und öffnen Sie diese in ImageJ/Fiji.

2. Bild in ein Graustufenbild umwandeln: → Image → Type → 8-bit

3. Maßstab festlegen. Hierfür wird das Lineal am oberen Rand genutzt. Zeichnen Sie mit dem Linien-Werkzeug (5. Button von links) dort einen 50 mm (= 5 cm) langen Strich. Öffnen Sie dann → Analyse → Set Scale und geben Sie bei *Known Distance* 50 und bei *Unit* mm ein. Setzen Sie auch ein Häkchen unter „Global“.



4. Machen Sie eine automatische Schwellenwert-Festlegung, d.h. legen Sie fest, welche der Farben/Graustufen nachher als Fläche erfasst wird.: Process → Binary → Make Binary. Nur die vormals grünen Flächen sollten jetzt weiß hervorgehoben sein. Alle anderen Flächen sind schwarz.



5. Fläche ermitteln: Mit Rechteckauswahl-Werkzeug (1. Button von links) gesamtes Blatt einkästeln. Dann unter → Analyse → Analyze Particles... bei *Particle Size* 50- eintragen. Damit wird festgelegt, dass nur Partikel (=Objekte) gewählt werden, die mindestens 50 mm<sup>2</sup> groß sind. Hierdurch wird erreicht, dass wirklich nur das gesamte Blatt als 1 Objekt angesehen wird. *Show* auf *Outlines* festlegen, d.h. nachher soll die Kontur angezeigt werden. Zum Schluss *Display results* mit Haken auswählen, damit die Ergebnisse angezeigt werden und *OK* anklicken. Im Results-Fenster sollte ungefähr die Fläche des grünen Bereichs angezeigt werden, um die 2000 mm<sup>2</sup>. Fläche notieren!

6. Nun muss noch die Gesamtblattfläche bestimmt werden. Hierfür nochmal das original-Bild öffnen und in 8-bit-Fartife umwandelt (siehe oben). Nun mit → Image → Adjust → Threshold so die Schieber positionieren, dass die nun vollständige, d.h. die gesamte Blattfläche rot hervorgehoben ist und das Threshold-Fenster mit „x“ schließen. Nun geht es wieder weiter wie bei Schritt 5. Die Gesamtfläche des Blattes sollte rund um 2500 - 2700 liegen.

7. Jetzt können Sie die prozentuale Grünfläche bestimmen.

## 2. Übung: Partikelanalyse (Anzahl und Fläche)

2.1 Führen Sie die im youtube-Video <https://youtu.be/9oMMcu-I3BY> „Bildanalyse-Video-Kurs mit ImageJ und GIMP - 6/7 (Beispiel 1)“ (12 min) gezeigten Inhalte mit dem dort verwendeten Bild selber durch! Das Bild finden Sie unter <http://laborberufe.de/sonstiges/wachsteile.jpg> .



Damit Sie nicht ständig hin und her klicken müssen, hier die Schritte stichwortartig:

1. Bilddatei Wachsteile.jpg in ImageJ öffnen (→ File → Open....). Farbtyp reduzieren: → Image → Type → 8bit
2. Maßstablänge mit Linienwerkzeug nachzeichnen. Danach → Analyze → Set Scale... *Known Distance* (=1) und *Unit of length* die Einheit (cm) angeben.
3. Analysebereich mit Rechteckauswahl-Werkzeug festlegen. Bereich mit einem klein Rechteck rund um die Maßstabsangabe davon abziehen lassen, durch gleichzeitige Benutzung der ALT-Taste
4. Schwellenwert (Threshold) festlegen: → Image → Adjust → Threshold → Alle zu berücksichtigenden Strukturen sollen kontrastreich und vollständig in rot zu erkennen sein. „Auto“ hilft für eine erste Grobeinstellung! Mit „x“ Threshold-Fenster schließen.
5. Ausgabeparameter einstellen. → Analyze → Set Measurements... → Nur Fläche (*Area*) auswählen.
6. Testlauf: → Analyze → Analyze Particles.... → Show: Outline. Bei *Clear Results*, *Summarize* und *Display results* Haken setzen und mit OK bestätigen.
7. Anzahl der registrierten Objekte ablesen und mit original-Bild vergleichen. Vergleich der Konturdarstellung mit dem Bild um zu prüfen, ob gerade die Objekte die registriert werden sollten, auch berücksichtigt wurden.
8. Wenn die registrierte Objektanzahl noch nicht zufriedenstellend (=34) ist, alle Result- und Summary-Fenster schließen. Noch mal → Analyze → Analyze Particles auswählen um jetzt hier die Mindestgröße der zu registrierenden Objekte zu erhöhen. *Pixel Units* anklicken, da wir diese Einheit wählen (und nicht cm). Bei *Size* z.B. 20– eingeben (d.h. Mindestgröße der Objekte: 20 Pixels). Liefert das auch noch nicht ganz das gewünschte Ergebnis *Threshold* nachbessern (siehe 4.) nachbessern.
9. Wenn Analyseergebnis zufriedenstellen (34 Objekte) mit → Analyze → Distribution ein Säulendiagramm mit der Flächenverteilung erzeugen (z.B. 10 Säulen = bins). Bei *Range* den Größenbereich auswählen. siehe Result-Fenster. z.B. 0 – 1.9.
10. Inhalt des Results-Fenster über File → Save as... abspeichern. Speicherformat: \*.csv (comma separated values).
11. CSV-Datei mit LibreOffice Calc importieren, so dass eine zweispaltige Tabelle (Laufnummer und Fläche in cm<sup>2</sup>) entsteht.
12. In LibreOffice die Werte nach Größe sortieren. Daneben Klassen anlegen. Siehe Video ab Minute 7. Mit der Funktion „Häufigkeit“ sich die Anzahl der Objekte der jeweiligen Klasse anzeigen lassen. Danach Säulendiagramm erstellen.

## 3. Übung: Wie 2. Übung nur diesmal mit wirklich vielen Zellen

- Öffnen Sie das Bild <http://laborberufe.de/sonstiges/zellkolonie.jpg> und analysieren Sie Größe und Anzahl der Zellen mit den Methoden aus der vorangegangenen Übung.

## 4. Übung: Manuelles Zählen von Zellen an einem Differentialblutbild und einem Fiji-Plug-in

- Öffnen Sie das Bild <http://laborberufe.de/sonstiges/differentialblutbild.jpg>
- Starten Sie: Plugins → Analyze → Cell counter. Drücken Sie zuerst *Initialize* und zählen Sie die verschiedenen Zellen (aufgeschlüsselt nach unterschiedlichen Typen!) indem Sie unterschiedliche Counter nutzen. Lassen Sie sich nachher die *Results* anzeigen.

## 5. Übung: Proteingelelektrophresen halbquantitativ auswerten

- Zuerst folgende Lernvideo („Using ImageJ to quantify protein bands on a PAGE gel“) anschauen: <https://youtu.be/JIR5v-DsTds>
- Dann mit dem Bild [http://laborberufe.de/sonstiges/gel\\_fuer\\_imagej.jpg](http://laborberufe.de/sonstiges/gel_fuer_imagej.jpg) durchführen.