

Fluorescent solid-plate imaging

Seong-Kun Bak (sanekun@gmail.com)

2022 7 11

```
knitr::opts_chunk$set(echo=FALSE, eval = FALSE, tidy=TRUE)
```

Introduce

High-throughput part characterization을 위한 solid-plate Imaging 논문에서 자세히 설명하지 못한 이미지 촬영법과 Exposure time 설정법, 그리고 분석법을 기술하였다.

Imaging

촬영 조건

1. 촬영은 NIS element AR(v4.0)을 이용하여 수행 되었다.
2. 촬영 전 Bright Field에서 Zoom을 최대로 하여 초점을 맞추었다.
3. 촬영은 scan large image 를 사용 하여 9 cm plate가 모두 들어오도록 하였으며 multichannel scan 을 사용하여 sfGFP (GFP), td.tomato (RFP) 이미지를 동시에 촬영하였다.
 - 각 형광 단백질에 맞는 Exposure time은 아래 **Exposure time** 에서 설명한 방법대로 결정하여 사용하였다.
 - 사용한 Filter, Exposure time은 아래 표에 표시되어 있다.

	Excitation (nm)	Emission (nm)	Exposure time (s)
sfGFP (GFP)	520	220	0.3
td.tomato (RFP)	0	0	2.0

Exposure time 설정

1. 측정 하고자 하는 전체 Part library를 도말하여 콜로니 획득
2. 전체 콜로니 중 가장 낮은 형광과 가장 높은 형광의 콜로니 확인 (정확하지 않아도 됨)
3. 두 콜로니를 single culture 하여 새로운 plate로 옮긴 후 Exposure time에 따른 형광 세기 측정 (OpenCFU)
4. 두 범위를 동시에 촬영 가능한 Exposure time 설정
 - 동시에 촬영이 불가능 할 경우 아래와 같이 HDR method 사용

HDR Image generation

가장 낮은 형광과 가장 높은 형광 값이 동시에 측정 불가능 할 경우 (카메라의 Dynamic range 부족) Exposure time에 대한 Modeling, HDR method로 해결 가능하다.

1. 낮은 형광과 높은 형광을 적절한 세기로 촬영 가능한 2 개의 Exposure time 설정.
 - 2-1. 촬영된 두 이미지를 활용하여 HDR image 제작 (NIS element AR의 HDR method 사용 또는 공개된 Web program 사용 ex) HDRmerger
 - 3-1. 완성된 HDR image를 분석에 사용.

```
> 2-2. Standard      Exposure time      Intensity      ( 1:1      )
>
> 3-2.                exposure time      exposure time
```

Computational analysis

1. OpenCFU program을 사용하여 각 콜로니별 position, size, Green channel mean, Red channel mean 확인
 - Bilateral : 0 parameter 사용.
2. Using python script(/script/opencfu.py) with colony position in GFP, RFP images, 두 이미지의 콜로니정보를 하나로 합침 (GFP colony 기준)
3. Relative Fluorescent Unit (RFU) 계산.

\$\$

$$\text{RFU} = (\text{Green channel value} * \text{Green channel size}) / (\text{Red channel value} * \text{Red channel size})$$

\$\$