

Laboratorio de Electromagnetismo y Óptica (ByG)
2do cuat. 2021

TP Nº 5 – PARTE A - Análisis y procesamiento de imágenes

Determinación del diámetro de microesferas fluorescentes a partir de la imagen de fluorescencia, como parte de la determinación de la resolución del microscopio óptico. El procesamiento y análisis de las imágenes se efectuará en la plataforma abierta y gratuita FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*). Además se necesitará algún software de análisis de datos para realizar ajustes gaussianos.

Imágenes para procesar

- Empleando el objetivo 40X de AN 0.75 del microscopio, se adquirieron imágenes de microesferas de distintos diámetros (40 nm, 500 nm y 3000 nm)

microesferas_3000nm_40xNA075.tiff
microesferas_500nm_40xNA075.tiff
microesferas_40nm_40xNA075.tiff

- Además se adquirió una imagen de transmisión de una grilla de calibración (mínima división 10 μ m), para determinar el tamaño del píxel de las imágenes obtenidas empleando el objetivo 40X NA0.75 del microscopio.

40xNA075_Grilla_calibracion.tiff

Todas las imágenes fueron adquiridas empleando el mismo objetivo 40X NA0.75 y la misma configuración de adquisición de la cámara CCD.

Pasos para determinar el diámetro de las imágenes de las microesferas

Paso Previo – Calibración de la escala espacial

Abrir la imagen de la grilla de calibración (mínima división 10 μ m) con el software FIJI y calcular el tamaño del píxel de la imagen

Grilla_calibración__40x_NA075.tiff

Para medir el tamaño del píxel, en FIJI elegir la herramienta LINEA (ver figura 1) y trazar una línea sobre la imagen de una distancia conocida. Luego seleccione la función [Analyze/Measure](#). Una ventana aparecerá con los resultados de la medición, el valor en la columna LENGHT corresponde a la longitud de la línea trazada en píxeles.

Otra opción es, una vez trazada la línea, ir a [Analyze / Plot profile](#), el programa arrojará un gráfico del perfil de intensidades de la imagen sobre la línea trazada. Con este perfil, es posible medir el tamaño del píxel tomando los picos de intensidades como referencias (ver figura 2).

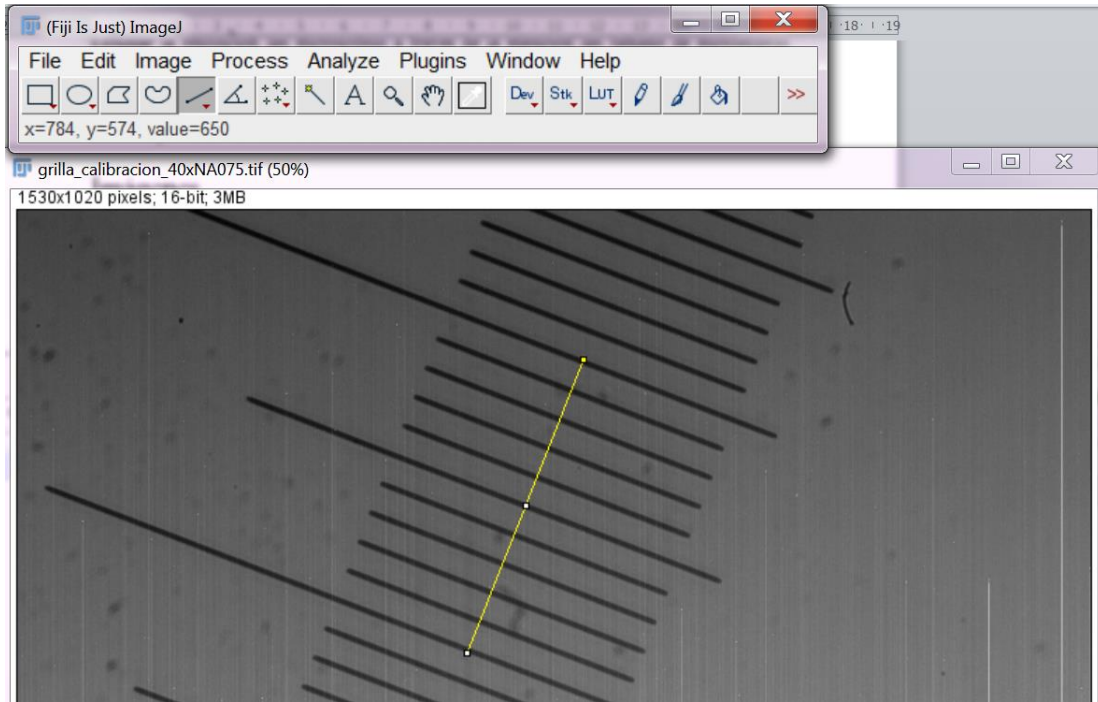


Figura1. Imagen capturada de la herramienta para la medición del tamaño del pixel con el software FIJI.

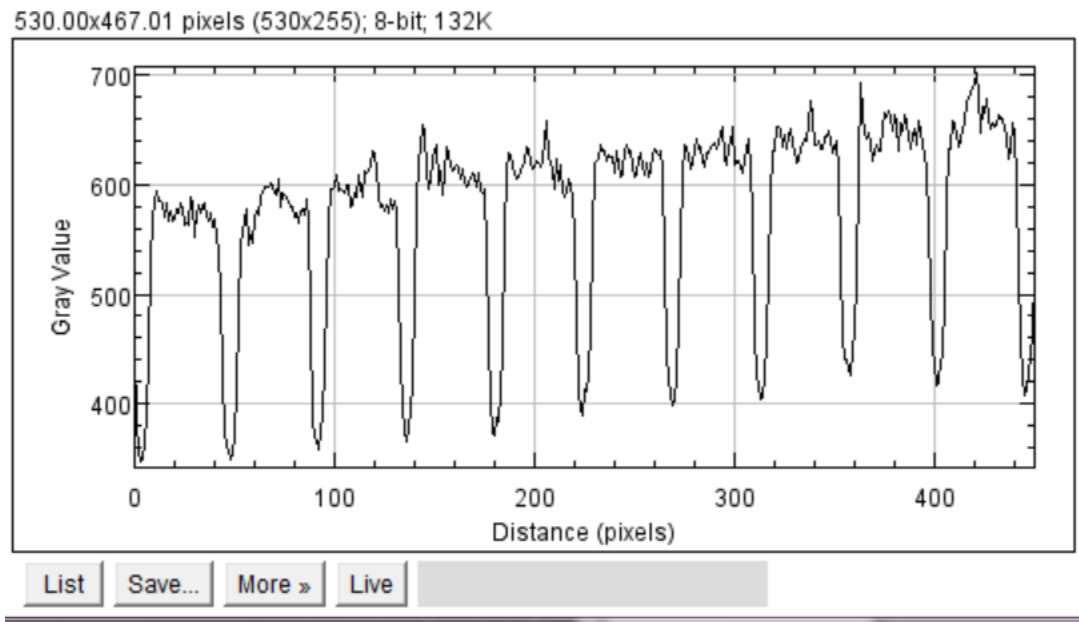


Figura2. Imagen capturada del perfil de intensidad obtenido con el software FIJI, sobre la línea trazada en la imagen.

Pasos para determinar el tamaño de la imagen de la microesfera

1. Abrir las imágenes de las microesferas de distintos diámetros (40, 500 y 3000 nm) tomadas con el objetivo de 40X, NA=0.75. Se puede arrastrar directamente el archivo tiff a la ventana del FIJI o abrir con el menú: **File – Open image** .

microesferas_3000nm_40xNA075.tiff
microesferas_500nm_40xNA075.tiff
microesferas_40nm_40xNA075.tiff

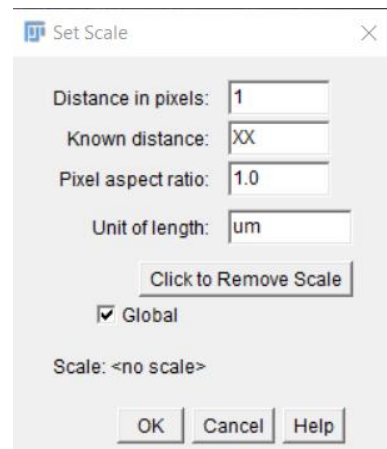
2. Definir la escala espacial de la imagen usando la calibración previa y el comando:

Analyze - Set scale.

Distance in pixels: 1 (o distancia conocida en pixeles)
Known distance: el tamaño del pixel (o distancia conocida en la escala de unidad elegida)

Pixel aspect ratio: 1
Unit of length: nm (o la unidad en que tienen el tamaño del pixel, m, cm, mm, nm etc... μm se anota como um)

Como todas las imágenes abiertas tienen la misma escala, se puede definir a la escala como **Global**, de esta manera se toma la escala establecida como la misma para todas las imágenes.



3. Confeccionar el perfil de intensidad

Para calcular el diámetro de las partículas se puede hacer un perfil de intensidades sobre la imagen. Para ello, seleccionamos una microesfera en la imagen, es importante seleccionar microesferas que estén en foco y que estén aisladas y trazamos una línea que pase por su centro. Luego, seleccionamos en el FIJI **Analyze – Plot profile** y aparecerá un gráfico del perfil de intensidad. Es conveniente hacer varios perfiles en distintas direcciones para poder informar como diámetro un promedio con su desviación.

4. Estimar el diámetro de la imagen de la microesfera

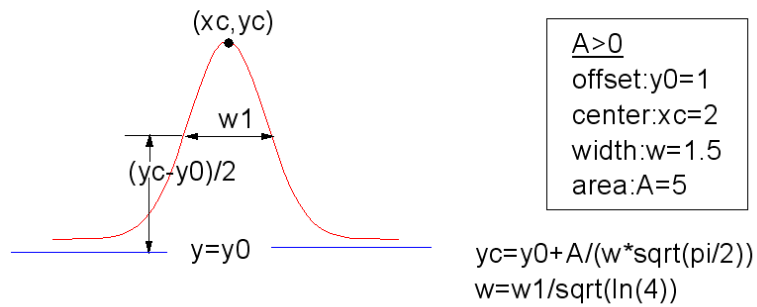
Una forma de estimar el diámetro de la imagen de la microesfera es determinar el ancho a mitad altura del perfil de intensidades. Para determinar el ancho a mitad altura a partir del perfil de intensidades:

Opción 1

En el perfil generado por FIJI, con el cursor podemos ver la altura. Luego nos paramos a mitad de altura y anotamos los valores laterales: la distancia entre ellos es el ancho a mitad de altura, que puede asociarse al diámetro de las esferas. Es conveniente hacer varios perfiles en distintas direcciones para poder informar como diámetro un promedio con su desviación.

Opción 2 - RECOMENDADO

Otra opción (más precisa) para determinar el ancho a mitad altura, es ajustar el perfil por una gaussiana (figura 3). Para ello exportar los datos y realizar el ajuste gaussiano empleando algún software de análisis de datos.



$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-\frac{2(x-x_c)^2}{w^2}}$$

Figura 3: Función Gaussiana para el ajuste de los perfiles de intensidad. En este caso, **w1** corresponde al ancho a mitad altura.

Lorena Sigaut, lorena@df.uba.ar