

Medición de la PSF – imágenes de microesferas fluorescentes

Calcular el diámetro de las partículas, o el diámetro de la PSF (según el tamaño de las partículas)

Protocolo de análisis en FIJI (que es una versión avanzada de ImageJ: Fiji Is Just ImageJ)

Abrir la imagen de las microesferas.

Para calcular el diámetro de las partículas, primero **definimos la escala**. Necesitamos el tamaño del píxel! Entonces vamos a **Analyze - Set scale**, y ahí ponemos

Distance in pixels: 1

Known distance: el tamaño del píxel

Pixel aspect ratio: 1

Unit of length: nm (o la unidad en que tienen el tamaño del píxel)

Una vez definida la escala, vamos a **hacer un perfil xy**.

Seleccionamos una microesfera en la imagen y trazamos una recta que pase por su centro (seleccionamos la ROI para rectas).

Vamos a **Analyze - Plot profile**. Así generamos el perfil.

Análisis del perfil de intensidades.

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

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.**

Otra opción (más precisa) para determinar el ancho a mitad altura, es ajustar el perfil por una gaussiana. Para ello exportar los datos al Origin y realizar el ajuste.

