

IMAGE-PRO

Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού (Quantification of fluorescence intensity)

- Διπλό κλικ στο **image-pro plus** στο desktop
- File → open → ανοίγουμε την εικόνα. **Προσοχή:** πρέπει πάντα η εικόνα να έχει scale bar:

➤ Εάν έχουμε πάρει την εικόνα από το confocal, πρέπει να είναι snapshot (raw) ώστε να έχει scale bar. Για μία εικόνα από το confocal με format 1024x1024, το αντίστοιχο snapshot της (αν δεν είναι raw) είναι 528x464 pixels. Οπότε, πρέπει στο photoshop, να κάνουμε αρχικά crop το snapshot, ώστε να αφαιρέσουμε τις 2 μαύρες περιοχές δεξιά και αριστερά και στη συνέχεια να μετατρέψουμε την εικόνα του snapshot σε 1024x1024 pixels.



➤ Εάν έχουμε πάρει την εικόνα από το Olympus time-lapse, πρέπει να έχουμε φροντίσει να βάλουμε το scale bar (από την επιλογή: image → scale bar → show in viewport).

Στη συνέχεια, πρέπει να κάνουμε calibration στην εικόνα για να δούμε εάν το scale bar είναι σωστά βαθμονομημένο. Π.χ. ανοίγουμε μία εικόνα με scale bar 16 μm. Για το calibration, κάνουμε ως εξής: confocal → manual calibration 3 → continue → yes → select a start point of calibration line (εκεί, ορίζουμε το αρχικό και τελικό σημείο του scale bar) → enter number of units (στην περίπτωση μας, πληκτρολογούμε 16) → ok.

Στη συνέχεια, πηγαίνουμε στην κανονική ρουτίνα.

- **Pasteur** → **fluro single channel RGB** → **activate** → **load/next** → ανοίγουμε την εικόνα → **activate spatial calibration** → **επιλέγω manual cal 3** → **ok** → **continue**

- Κάνουμε zoom στην εικόνα για να βλέπουμε καλύτερα το scale bar.

- Στη συνέχεια, για να επιβεβαιώσουμε ότι έχουμε τη σωστή βαθμονόμηση του scale bar, μπορούμε να επιλέξουμε το εικονίδιο με τον χάρακα  και να ανοίξουμε το παράθυρο 'measurements'. Εκεί, διαλέγουμε το εικονίδιο  και ορίζουμε την αρχή και το τέλος του scale bar. Εμφανίζεται μία τιμή, η οποία εάν είναι σωστή η

βαθμονόμηση, θα πρέπει να είναι πολύ κοντά στην τιμή που είχαμε αρχικά ορίσει το scale bar με το calibration. Κλείνουμε το παράθυρο 'measurements'.

- Πηγαίνουμε στο **fluro single channel RGB** → image 1 → set color → μετακινούμε τις μπάρες του **histogram**, με αποτέλεσμα να γίνεται κίτρινη ή επιθυμητή περιοχή → **continue** → το πρόγραμμα δημιουργεί κάποιες προεπιλεγμένες περιοχές → **delete** (σβήνουμε τις προεπιλεγμένες περιοχές) → **draw/merge** → σχεδιάζουμε τις περιοχές που θέλουμε (συγκεκριμένα, σε κάθε κύτταρο σχεδιάζουμε μία περιοχή που με ενδιαφέρει και μία περιοχή control) → ok → αριθμούνται οι περιοχές → **accept** → **save data** → **ok**. Ανοίγουμε το **excel**. Στο **excel**, οι τιμές που μας ενδιαφέρουν είναι στις στήλες **J (area)**, **W (density red)**, **X (density green)**.

- Στη συνέχεια, υπολογίζουμε το λόγο : **density green/ area** για τα control και για τις επιθυμητές περιοχές. Ο λόγος αυτός εκφράζεται σε μονάδες: ποσότητα φθορισμού/ μm^2 .

- Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η ρουτίνα: **Pasteur** → **fluro single channel** → **activate** → **load/next** → ανοίγω την εικόνα → **set region** → **σχεδιάζω** την περιοχή που με ενδιαφέρει → **continue** → **set color** → **detect** → **accept** → **save data**.