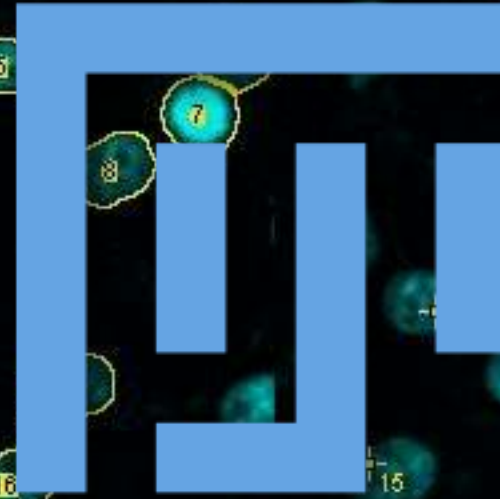




ImageJ



Fiji

y

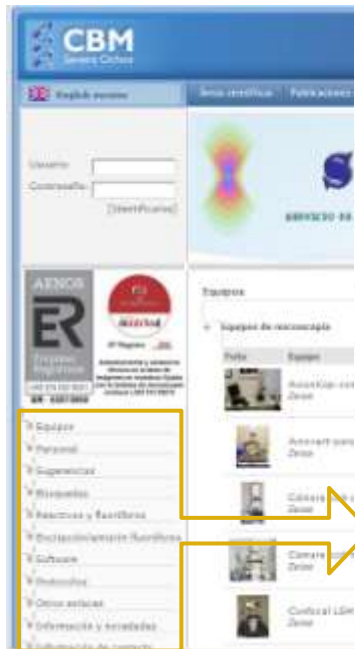
Herramientas contaje partículas

¿POR QUÉ USAR IMAGEJ O FIJI?

- **Gratuito**
- **Multiplataforma**
- **Conjunto de herramientas muy completo**
- **Plugins**
- **Macros**



¿DÓNDE BAJARLO?



- Equipos
- Personal
- Sugerencias
- Búsquedas
- Reactivos y fluoróforos
- Excitación/emisión fluoróforos
- Software**
- Protocolos
- Otros enlaces
- Información y novedades
- Información de contacto
- English version
- UPDATED 5-7-10
- Mapa Web
- Documentos

Software

- Enlaces
- Programas
- Deconvolución
- MetaMorph
- ImageJ y Fiji**
- Image Tool Kit, Adobe photoshop
- Ética y reglas en el procesar
- Colocalización y Bioestadíst

ImageJ y Fiji

OS RECOMENDAMOS LA INSTALACIÓN DE "EJJI" COMO ALTERNATIVA A IMAGEJ

VERSIÓN Y PÁGINAS OFICIALES

- ImageJ
- ImageJ E-mail list
- ImageJ: user and developer conference

OTRAS VERSIONES ADAPTADAS

- Fiji: una versión adaptada de ImageJ
- Una versión de ImageJ adaptada para Biología (Wright Cell Imaging Facility)
- Una versión de ImageJ adaptada a Microscopia (MacBioPhotonics)
- IQM (procesamiento de stacks. Basado en Java e ImageJ)
- Scion image beta 4.03

MANUALES

- Documentos y tutoriales oficiales
- Portal de manuales y ayuda de este programa
- Manual "on-line" ImageJ
- Manuales Fiji
- Tutoriales "online" ImageJ
- Manual en formato PDF de ImageJ

ARTICULOS

- Artículo sobre el módulo ElyRET y página oficial.
- FRET and colocalization analyzer y un artículo referente a este módulo.
- Colocalización y el artículo relacionado
- Rosner and Yamada, (2004). What's in a picture? The temptation of image manipulation.
- Eneko, et al. (2008). Automated analysis of NeuroJ tracing data. Cytometry Part A. Volume 75A Issue 4, Pages 371 - 376.
- Svedlow, et al. (2009). Bioimage Informatics for Experimental Biology. Annu. Rev. Biophys. 38, 327-48.
- Svedlow and Eickert, (2009). Open source bioimage informatics for cell biology. Trends in Cell Biology. 19, 658-660.
- Walter, et al. (2010) Visualization of image data from cells to organisms. Nature Methods. 7, 526-541.
- Erik Heijering, (2010). Neuro tracing in perspective. Cytometry Part A.
- Sean R. Callahan (2010) Neural Tracta Detection and Analysis with Tracta2

ImageJ



>> Software

ImageJ y Fiji

VERSIÓN Y PÁGINAS OFICIALES

- **ImageJ**
- **ImageJ E-mail list**
- **ImageJ: user and developer conference**



[home](#) | [news](#) | [docs](#) | [download](#) | [plugins](#) | [macros/dev](#) | [list](#) | [links](#)

ImageJ

Image Processing and Analysis in Java

- [Features](#)
- [News](#)
- [Documentation](#)
- **[Download](#)**
- [Plugins](#)
- [Developer Resources](#)
- [Applets/Web Start](#)
- [Mailing List](#)
- [Links](#)
- [ImageJ Conference \(Oct. 27-29\)](#) New

Download

Platform Independent

To install ImageJ 1.43 on a computer with Java pre-installed, or to upgrade to the latest full distribution (including macros, plugins and LUTs), download [ij143.zip](#) (3MB) and extract the ImageJ directory. Use the *Help>Update ImageJ* command to upgrade to the latest pre-release version.

Mac OS X

Download [ImageJ 1.43](#) (5.4MB) as a double-clickable Mac OS X application. Includes ImageJ64, which uses Java 1.6 in 64-bit mode on Intel Macs running OS X 10.5 or later. ([Instructions](#))

Linux

Download ImageJ 1.43 [bundled with 32-bit Java](#) (42MB) or with [64-bit Java](#) (35MB). Both versions include Java 1.6.0_10 from Sun and the ImageJ source code. ([Instructions](#))

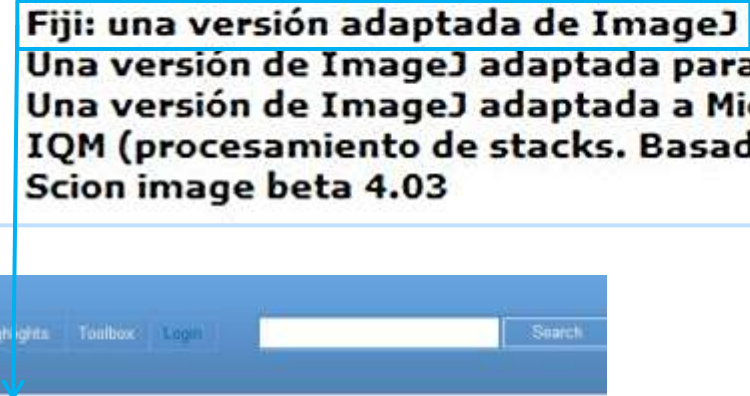
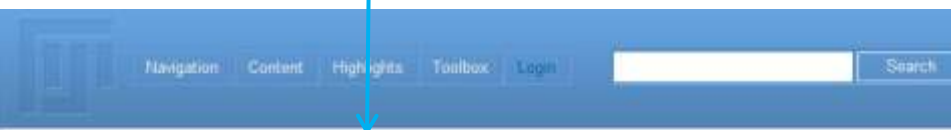
Windows

Download ImageJ 1.43 [bundled with 32-bit Java 1.6.0_10](#) (25MB), with [64-bit Java 1.6.0_12](#) (21MB; requires XP x64 or Vista 64-bit) or [without Java](#) (3MB). On Vista and Windows 7, ImageJ must be installed in a directory that the user can write to (e.g., "Documents"). ([Instructions](#))



OTRAS VERSIONES ADAPTADAS

- **Fiji: una versión adaptada de ImageJ**
- **Una versión de ImageJ adaptada para Biología (Wright Cell Imaging)**
- **Una versión de ImageJ adaptada a Microscopía (MacBiophotonics)**
- **IQM (procesamiento de stacks. Basado en Java e ImageJ)**
- **Scion image beta 4.03**

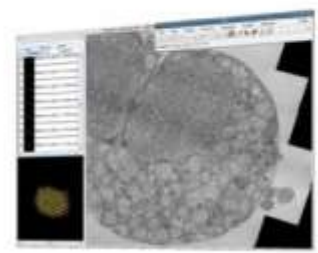


Fiji Is Just ImageJ

Fiji is an image processing package based on ImageJ.

For users, Fiji is easy to install and update, bundles a set of plugins in a coherent menu structure (and updatable), along with comprehensive documentation.

For developers, Fiji as an open source project is hosted on a Git source version control repository, with access to the source code of all internals, libraries and plugins, and eases the development and scripting of plugins.



Download Fiji now

- #### News
- 2010-03-01 - Fiji featured in Nature Methods review on visualization
 - 2010-02-04 - Web Statistics and Fiji usage map
 - 2010-01-21 - The Fiji Wiki got a new look
 - 2009-12-17 - New Plugin: RATS (Robust Automatic Threshold Selection)
 - 2009-12-04 - Updated TrakEM2 to version 0.7m
- Browse the news archive.

TrakEM2 is an ImageJ plugin for morphological data mining, three-dimensional modeling and image stitching, registration, editing and annotation.

Documentation

- #### Using Fiji
- What you need to know about scientific image processing
 - Installing Fiji
 - Getting started with Fiji

You can download the current version of Fiji

- Linux
 - Linux (64-bit)
 - Windows
 - Windows (64-bit)
 - MacOSX
- Critical:** if you update and Fiji does not
 Note: PPC (G4/G5) Macs are no longer
- All platforms (includes all JREs)
 - All platforms (does not include JREs)



DOCUMENTACIÓN

MANUALES

- **Documentos y tutoriales oficiales**
- **Portal de manuales y ayuda de este programa**
- **Manual "on-line" ImageJ**
- **Manuales Fiji**
- **Tutoriales "online" ImageJ**
- **Manual en formato PDF de ImageJ**



navigation

- [FAQ](#)
- [GUI Commands](#)
- [Keyboard Shortcuts](#)
- [Plugins](#)
- [How Tos](#)
- [Tutorials](#)
- [Known Problems](#)
- [Links](#)
- [Libraries](#)
- [Macros](#)
- [Diverse](#)
- [Wishlist](#)
- [Video Tutorials](#)
- [Create New Content](#)
- [Events](#)

McMaster Biophotonics Facility
www.macbiophotonics.ca

Recent Updates: Dec 09

- Manual Home
- MacBiophotonics Home
- About this Manual
- Installation
- Importing Image Files ▶
- Saving and Exporting
- Intensity v Time analysis ▶
- Particle Analysis ▶
- Colocalisation Analysis ▶
- Intensity Processing ▶
- Colour Image Processing▶
- Stack-slice manipulations▶
- Z-functions ▶
- T-functions ▶
- Deconvolution
- Annotating Images ▶
- Appendix ▶

home | news | docs | download | plugins | m

Documentation

- o Introduction
- o Basic Concepts
- o Installation
- o Menu Commands
 - o File
 - o Edit
 - o Image
 - o Process
 - o Analyze
 - o Plugins
 - o Window
 - o Help
- o Tools
- o Keyboard Shortcuts

- o **ImageJ User Guide (8MB PDF or online) itw**
- o Tutorials and Examples
- o ImageJ Documentation Wiki
- o *ImageJ for Microscopy* Manual
- o ImageJ on Wikipedia
- o Frequently Asked Questions
- o Macro Language (download PDF)
- o Planned Features
- o Complete Release Notes (300K)



DOCUMENTACIÓN

MANUALES

- Documentos y tutoriales oficiales
- Portal de manuales y ayuda de este programa
- Manual "on-line" ImageJ
- **Manuales Fiji**
- Tutoriales "online" ImageJ

Manual en formato PDF de ImageJ



Navigation Content Highlights Toolbox Login

Documentation

Using Fiji

- What you need to know about scientific image processing
- Installing Fiji
- Getting started with Fiji
- Tutorials
- Find contact information, mailing list, IRC (chat) and help
- Frequently Asked Questions
- more

Advanced Fiji usage

- Registering 3D images
- Segmenting images
- Useful keyboard shortcuts
- Scripting: with Macros, in Javascript, in JRuby, in Jython, in Clojure (see a)
- Some ImageJ tricks
- Links
- more...

Navigation Content Highlights Toolbox Login

Search

Category: Tutorials

Tutorials focused on Fiji usage.

Pages in category "Tutorials"

The following 37 pages are in this category, out of 37 total.

2

- 2009-07-10 - Fiji presentation from ELMi2009 ImageJ Tutorial

C

- Colocalization Analysis
- Correcting drift in FRAP experiments

D

- Detect Information Loss

I cont.

- Install Fiji on Windows
- Installation
- Installing 3rd party plugins
- Introduction into Macro Programming

N

- Nuclei Watershed Separation

R

T cont.

- TrakEM2 add more sections/layers tutorial
- TrakEM2 align sections tutorial
- TrakEM2 basics tutorial
- TrakEM2 measurements tutorial
- TrakEM2 saving project tutorial
- TrakEM2 segmentation modes tutorial
- TrakEM2 semi-automatic segmentation tutorial
- TrakEM2 tutorials

UTILIDADES

PLUGINS Y UTILIDADES

- **Utilidades y opciones de ImageJ (Plugins)**
- **Macros ImageJ en la sección Documentos/ Software**
- **Acceso en los menús a las opciones más comunes**
- **MicroManager-control de adquisición de imágenes en ImageJ**



home | news | docs | download | plugins | macros/dev | list | links

Plugins

Contents

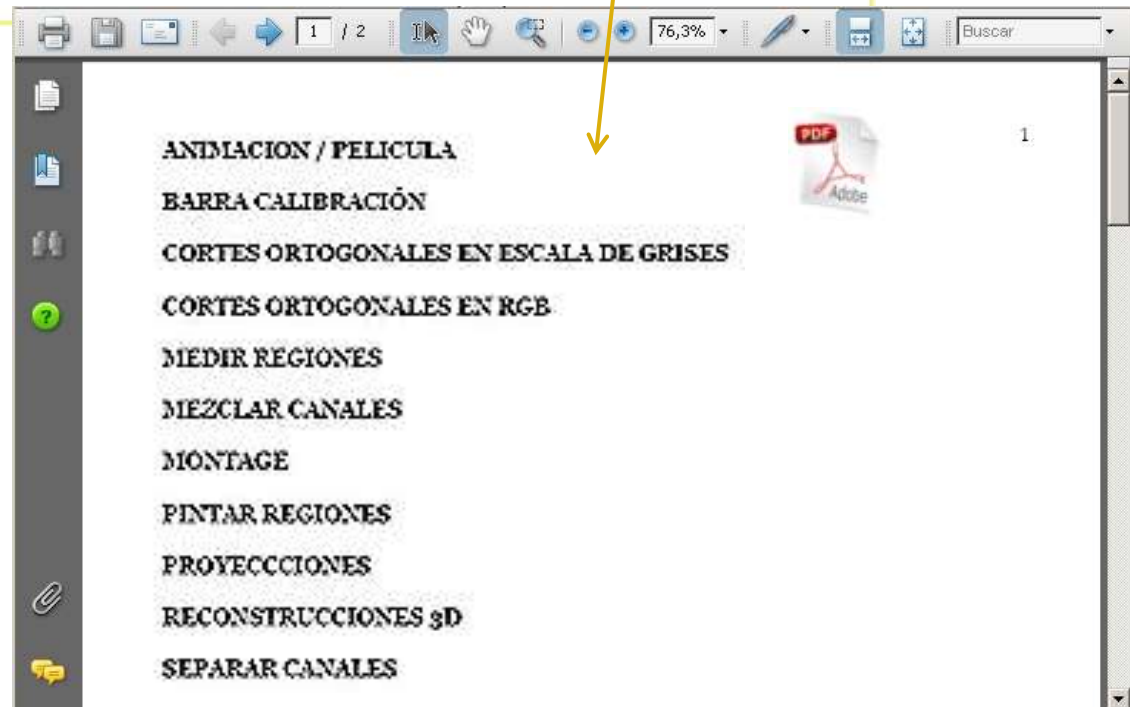
Acquisition
Analysis
Collections
Color
Filters
Segmentation
Graphics
Input/Output
Programming Examples
Stacks
Utilities
Links to External Sites

Acquisition [top]

Hamamatsu Orca 12-bit Camera
Shading Corrector
QuickTime Capture (Capture images using QuickTime) **Updated**
TWAIN
JTwin
Twain Scan **new**
SensiCam Long Exposure Camera
Video Capture Macro Tool (Video for Windows via VirtualDub) **New**
Capturing plugin (Captures images on Windows using JMF) **new**

www.scioncorp.com: Scion Frame Grabbers and Firewire Cameras
www.qimaging.com: QImaging Firewire Cameras
ScionFGAkiz: Scion full-frame-rate capture
FWCamAkiz: Mac OS X Firewire Cameras
www.pixelsmart.com: PixelSmart Frame Grabbers

es destacados



UTILIDADES

PLUGINS Y UTILIDADES

- **Utilidades y opciones de ImageJ (Plugins)**
- **Macros ImageJ en la sección Documentos/ Software**
- **Acceso en los menús a las opciones más comunes**
- **MicroManager-control de adquisición de imágenes en ImageJ**



ns y utilidades destacados



foros

Excitación/emisión fluo

Software

Protocolos

Otros enlaces

Información y novedades

Información de contacto

English version

UPDATED 5-7-10

Mapa Web

Documentos

Manuales SMOC (5)

Software (4)

> Software

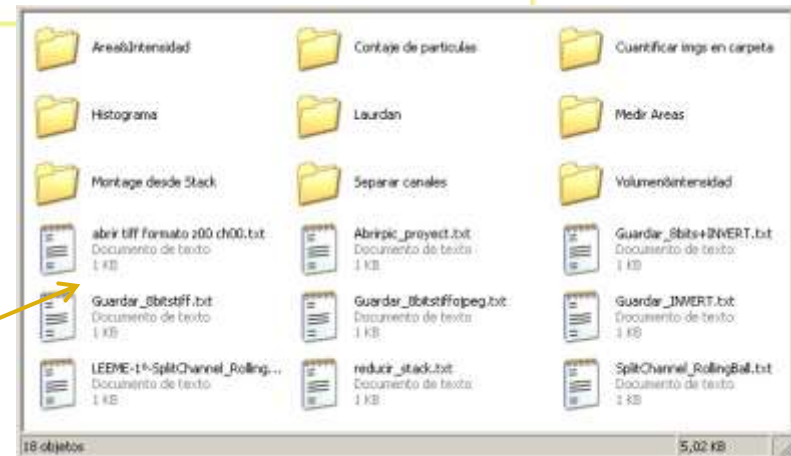


Macros

Manejo de los diferentes formatos de imagen

Tablas resumen de formatos de Huygens

Utilidades y formatos en Huygens



18 objetos

5,02 KB

UTILIDADES



PLUGINS Y UTILIDADES

- **Utilidades y opciones de ImageJ (Plugins)**
- **Macros ImageJ en la sección Documentos/ Software**
- **Acceso en los menús a las opciones más comunes**
- **MicroManager-control de adquisición de imágenes en ImageJ**

Algunas utilidades destacadas

Grupos de plugins

[ImageJ](#)

[Wiki](#)

[Landini](#)

[Parker](#)

[3D Filtering](#)

Formatos y visualización de imágenes

[LOCI BioFormats](#) (abrir cualquier formato de imagen)

[Batch converter](#) (convertir varios archivos)

[LSM reader](#) (para archivos "*.lsm" de Zeiss)

[LSM toolbox](#) (para archivos "*.lsm" de Zeiss)

[Image5D](#) (abrir imágenes complejas)

[View 5D](#) (visualizar imágenes complejas)

[RGB to CMYK](#) (para impresión)

Stacks

[Stack combiner](#) (montajes de stacks)

[Stack Alignment](#)

TimeLapse

[Image Stabilizer](#) (para evitar las vibraciones)

[Time Stamper](#) (para colocar los tiempos)

[TimeSeries Analyzer](#)

Mediciones

[Auto Threshold](#)

[MultiThresholder](#)

[Background correction](#)

[Shading corrector](#)

[Multimeasure](#) (ROI manager)

[SIOX](#) (Segmentación)

[Trainable Segmentation](#)

Colocalización, FRET, FRAP

[Colocalization](#)

[Colocalization Finder](#)

[Co-localization \(JACoP\)](#)

[FRET and Colocalization Analyzer](#)

[FRET acceptor photobleaching](#)

[Stitching](#) (ensamblaje de imágenes)

[Mosaic J](#) (ensamblaje de imágenes)

[Stack normalizer](#) (ecualizador de stacks)

[Stack Reg](#) (alineamiento de stacks)

[Interactive 3D surface Plot](#) y [Volume J](#)
(visualización de superficies)

[3D Viewer](#) (visualización de volúmenes y superficies en 3D)

[Xuv Tools](#) (montaje de imágenes 3D)

[Stephan Preibisch](#) (montaje de imágenes 2D y otros)

[Measure Stack](#) (mediciones en stacks)

[Voxel counter](#) (mediciones en stacks)

[TrakEM2](#) (numerosas funciones para stacks)

[Extended Depth of Field](#) (obtención de una imagen enfocada a partir de secciones)

[Depth from focus](#) (imagen enfocada a partir de secciones)

[Deconvolución](#) (Piotr Wendykier)

[Deconvolución](#) (Biomedical Imagin Group-Lausanne)

[PixFRET](#)

[FRET calc](#)

[FRET Stoichiometry ImageJ plugin \(PFID\)](#)

[FCalc](#) (FRAP/FLIP)

[FRAP Analysis](#)

Seguimiento de partículas y trazado de trayectorias

[MTrackJ](#)

[TrakEM2](#)

[Particle Tracker](#)

[Particle counter and analyzer](#)

[Manual Tracking](#)

[Chemotaxis and migration tool](#) (Tracking)

[FociPicker3D 3D and 2D particle counter](#)

[Neuron Morpho](#)

[NeuronJ](#) (Neurite tracing and quantification)

[Simple neurite tracer](#)

[Simple neurite tracer - versión para Fiji](#)

¿DÓNDE PREGUNTAR?

VERSIÓN Y PÁGINAS OFICIALES

- ImageJ
- **ImageJ E-mail list**
- ImageJ: user and developer conference



[home](#) | [news](#) | [docs](#) | [download](#) | [plugins](#) | [macros/dev](#) | [list](#) | [links](#)

ImageJ Mailing List

The **ImageJ mailing list** is a discussion group for ImageJ users and developers.

Subscribing

To subscribe, send the command

```
subscribe imagej yourfirstname yourlastname
```

in the body of an email message to listserv@list.nih.gov. Or join the list at list.nih.gov/archives/imagej.html.

Sending Messages

To send a message to all the people subscribed to the list, send mail to imagej@list.nih.gov. Commands (e.g., "UNSUBSCRIBE IMAGEJ") should be sent to listserv@list.nih.gov.

List Archives

Messages sent to this list are archived and made available on the Web at list.nih.gov/archives/imagej.html. The ImageJ list is also archived at nabble.com and news.gmane.org.

Leaving the List

You may leave the list at any time by sending a "UNSUBSCRIBE IMAGEJ" command to listserv@list.nih.gov. Or leave the list at list.nih.gov/archives/imagej.html.

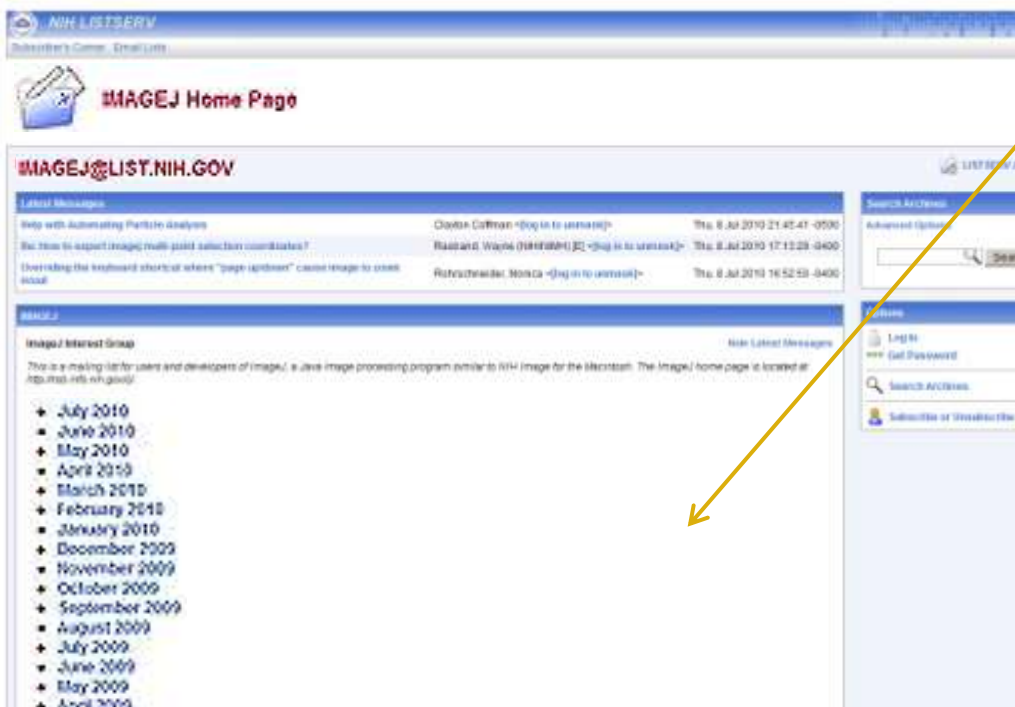
Digest Form

To receive a digested version of the postings, send a "SET IMAGEJ DIGEST" command to listserv@list.nih.gov.

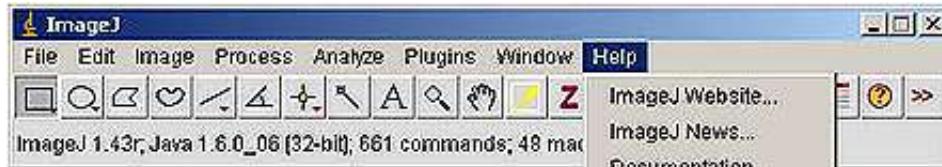
Privacy

Please note that it is presently possible for other people to determine that you are signed up to the list through the use of the "REVIEW" command, which returns the e-mail address and name of all the subscribers. If you do not want your name to be visible, just issue a "SET IMAGEJ CONCEAL" command.

[top](#) | [home](#) | [news](#) | [docs](#) | [download](#) | [plugins](#) | [dev](#) | [list](#) | [links](#)



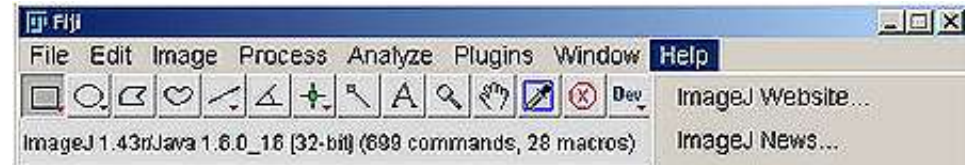
¿CÓMO ACTUALIZAR?



ImageJ



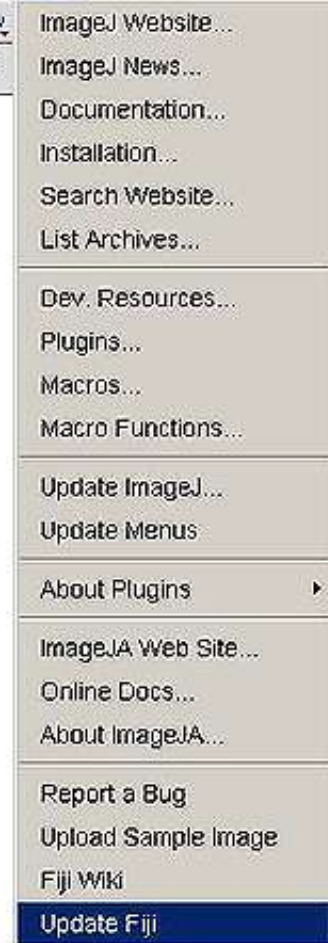
Help/ Update ImageJ



Fiji



Help/ Update Fiji



PRÁCTICA CONTAJE

Tinción doble:

Yoduro Propidio (rojo)

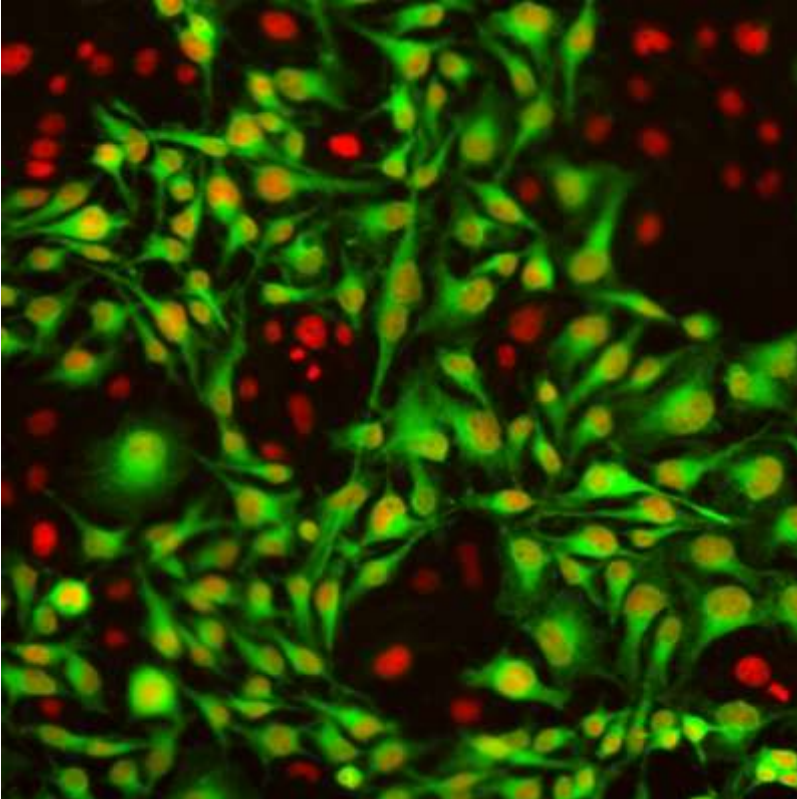
Gfp (verde)

Métodos de contaje:

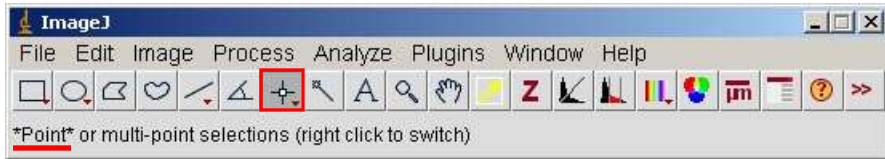
Herramienta Multi-Point

Cell Counter

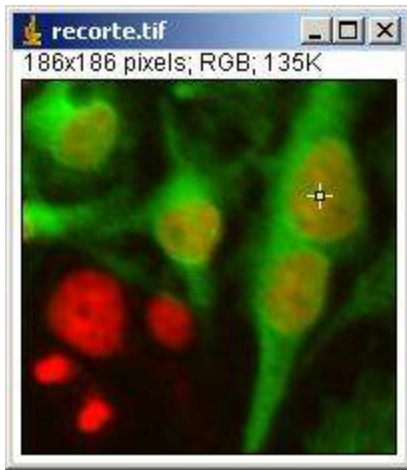
Analyze Particles



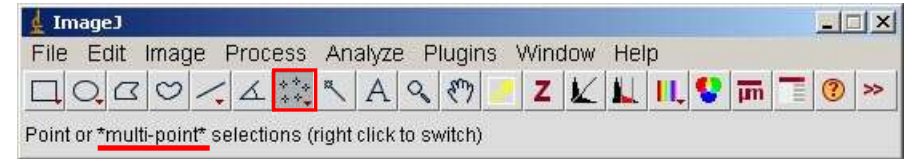
HERRAMIENTA POINT Y MULTI-POINT



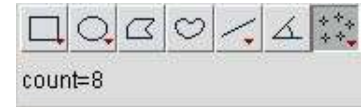
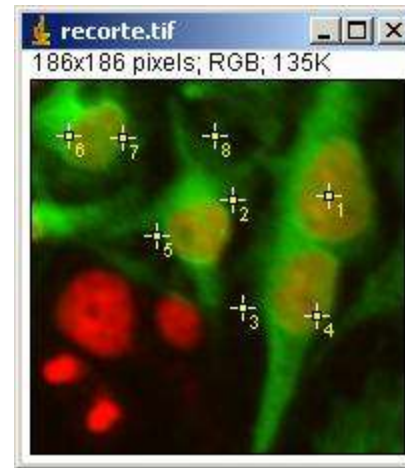
Crea un punto de selección



Borrar puntos: Presionando tecla "Alt"



Crea puntos de selección y los numera



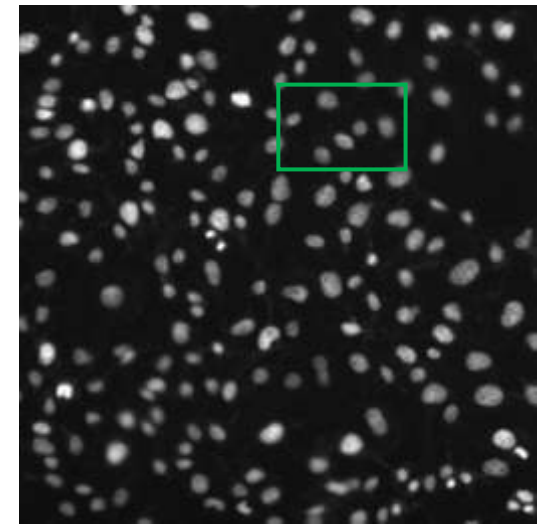
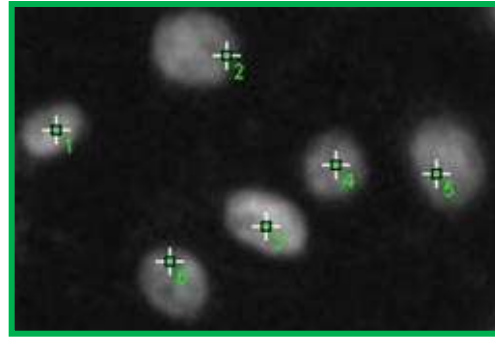
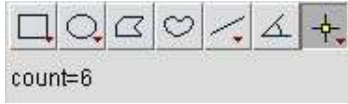
Mover puntos: Presionando tecla "Control"

Cambiar entre herramienta Point y Multi-point, botón derecho sobre la **herramienta** que esté seleccionada en ese momento y selección de la nueva



HERRAMIENTA POINT + SHIFT ↑

La herramienta Point se comporta igual que la herramienta Multi-point si se deja presionado el Shift ↑



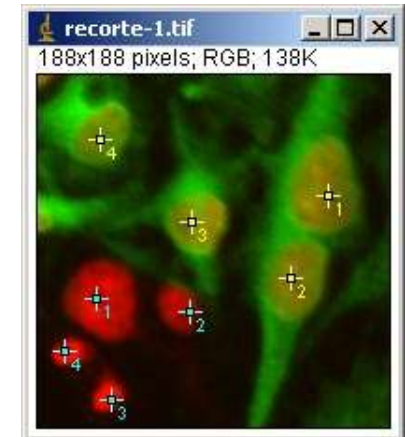
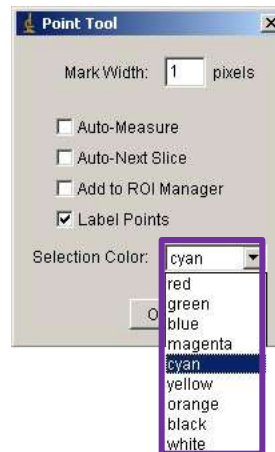
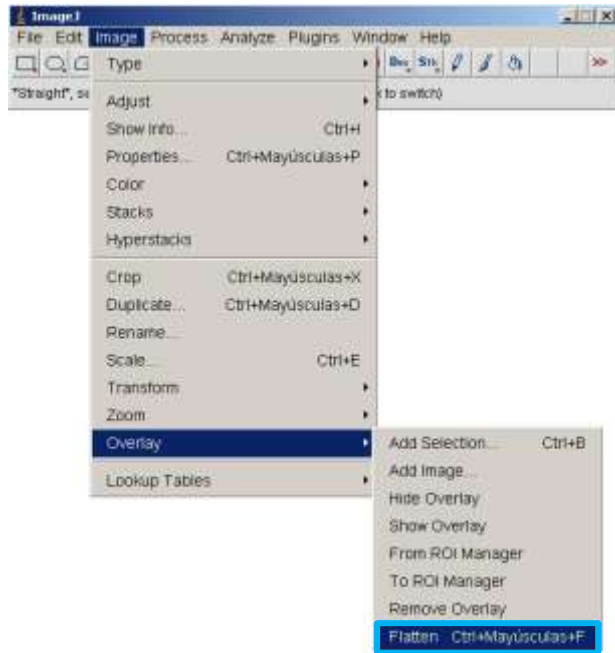
GUARDAR LA IMAGEN CON LOS NÚMEROS DIBUJADOS

1º - Utilizar herramienta "point" o "multi-point "

2º - Seleccionar **Image/ Overlay/ Flatten** (duplica la imagen con los valores dibujados).

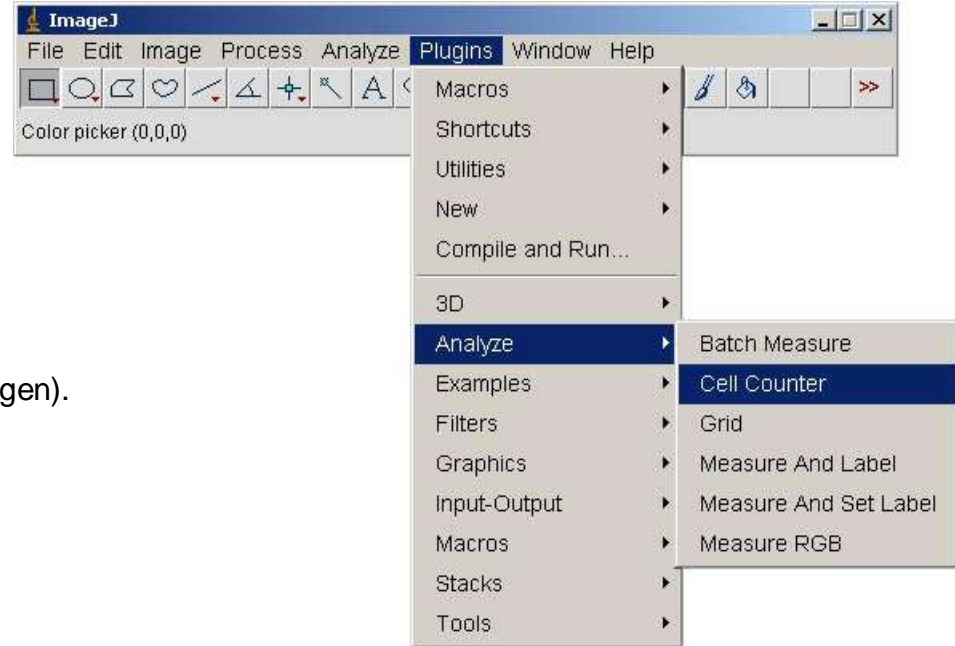
3º - Para contar con otro color otro tipo de células, cambiar el **color** en "Point Tool"

4º - Volver a repetir el punto 2.

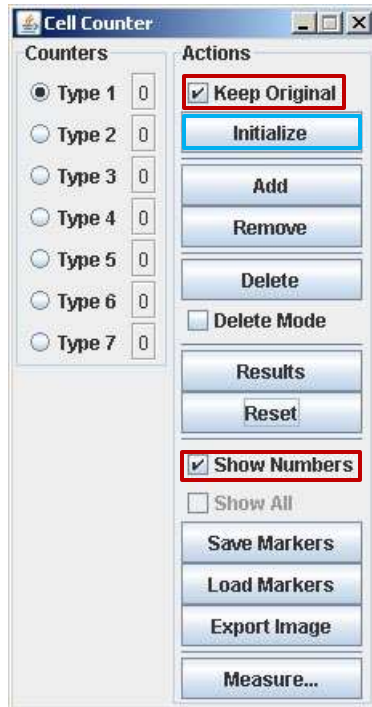


PLUGIN CELL COUNTER (CONTAR VARIOS TIPOS DE CÉLULAS)

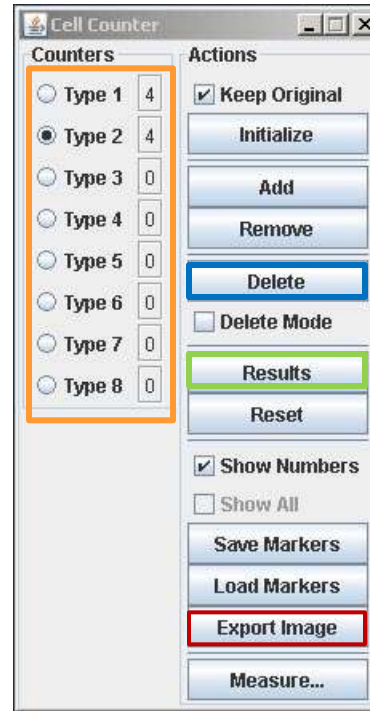
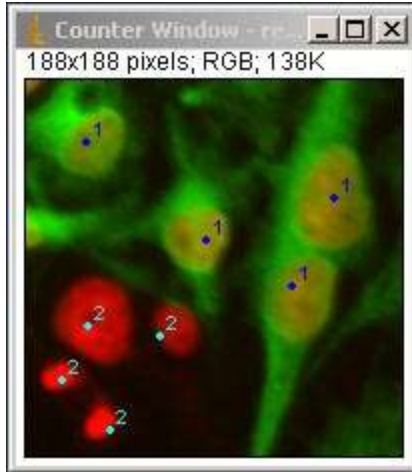
Plugin: <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>



- 1º - Seleccionar “**Keep Original**” y “**Show Numbers**”.
- 2º - Presionar “**Initialize**” (crea un duplicado de la imagen).



- 3º - Seleccionar el **Tipo** (1, 2, 3, ...)
- 4º - Pinchar sobre la célula que se quiera contar.
- 5º - Repetir los pasos 3 y 4 tantas veces como haga falta.



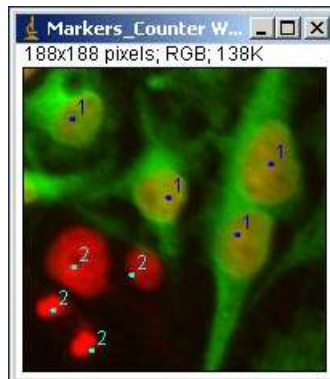
Cada tipo tiene asignado un color::

- Type 1: Azul
- Type 2: cyan
- Type 3: verde
- Type 4: magenta
- Type 5: naranja
- Type 6: rosa
- Type 7: rojo
- Type 8: amarillo



Delete, elimina el último valor añadido y lo borra de la imagen

6º - **Export Image**, para guardar la imagen con los números dibujados.



7º - **Results**, para que muestre el recuento.

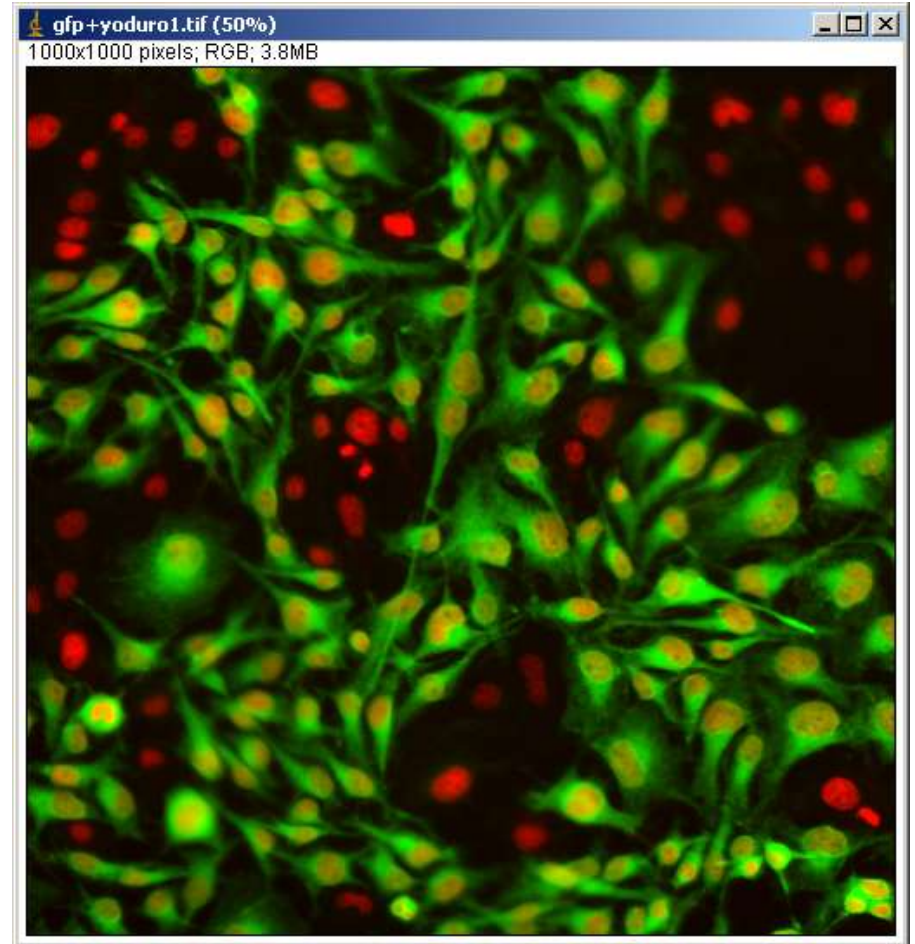
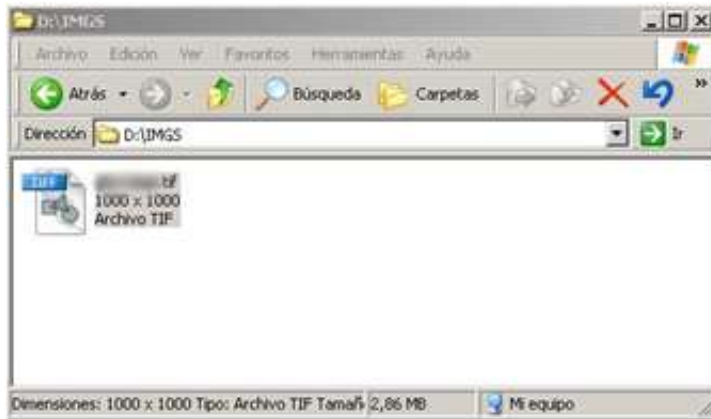
Results									
File Edit Font									
Slice	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	Type 6	Type 7	Type 8	
Total	4	4	0	0	0	0	0	0	

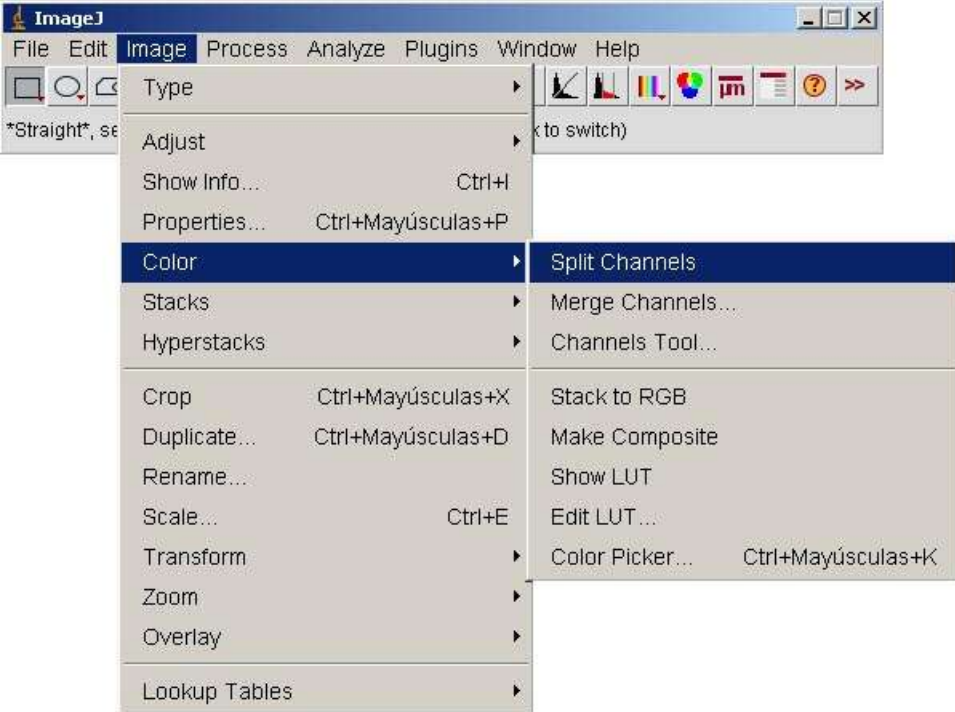
CONTAJE MÁS AUTOMATIZADO CON ANALYZE PARTICLES



PARA ABRIR LA IMAGEN

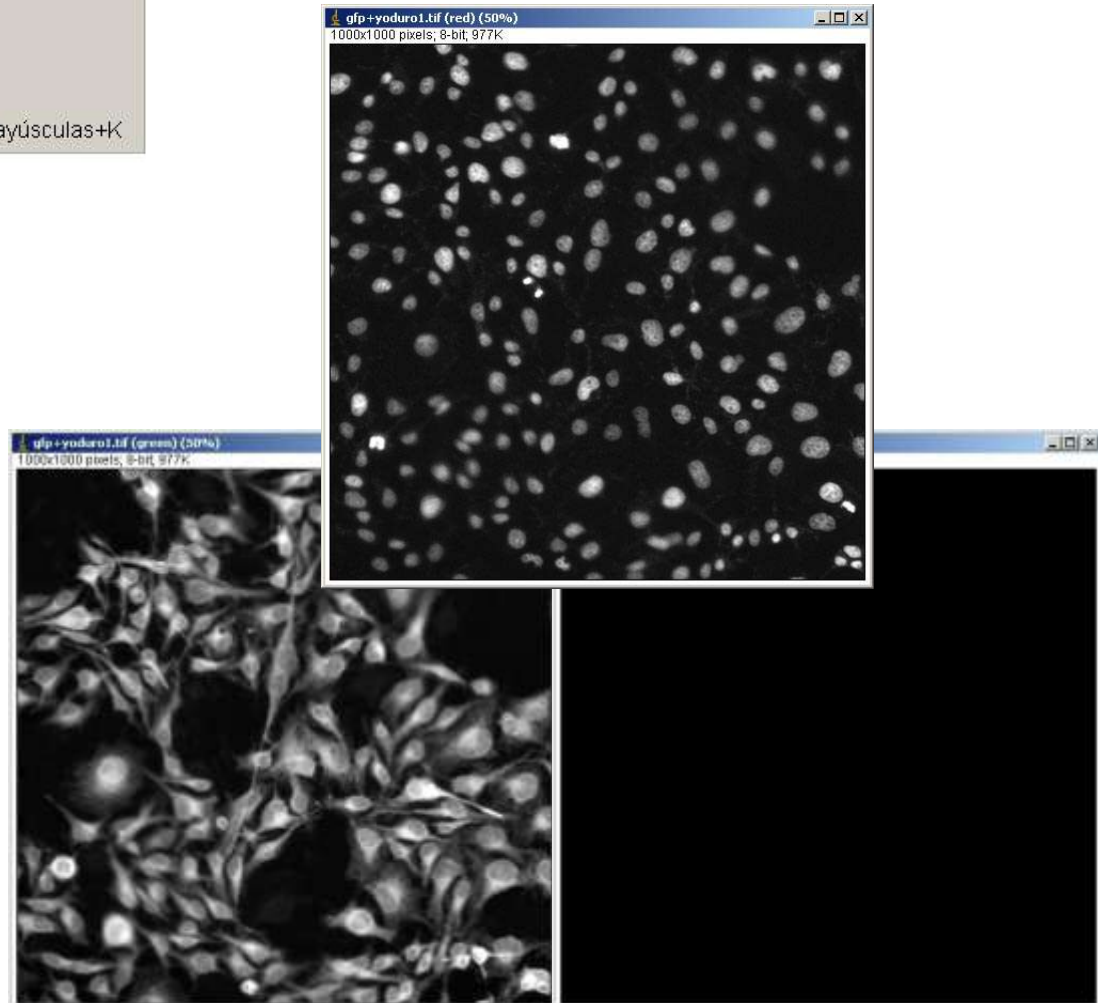
Arrastrar la imagen al programa

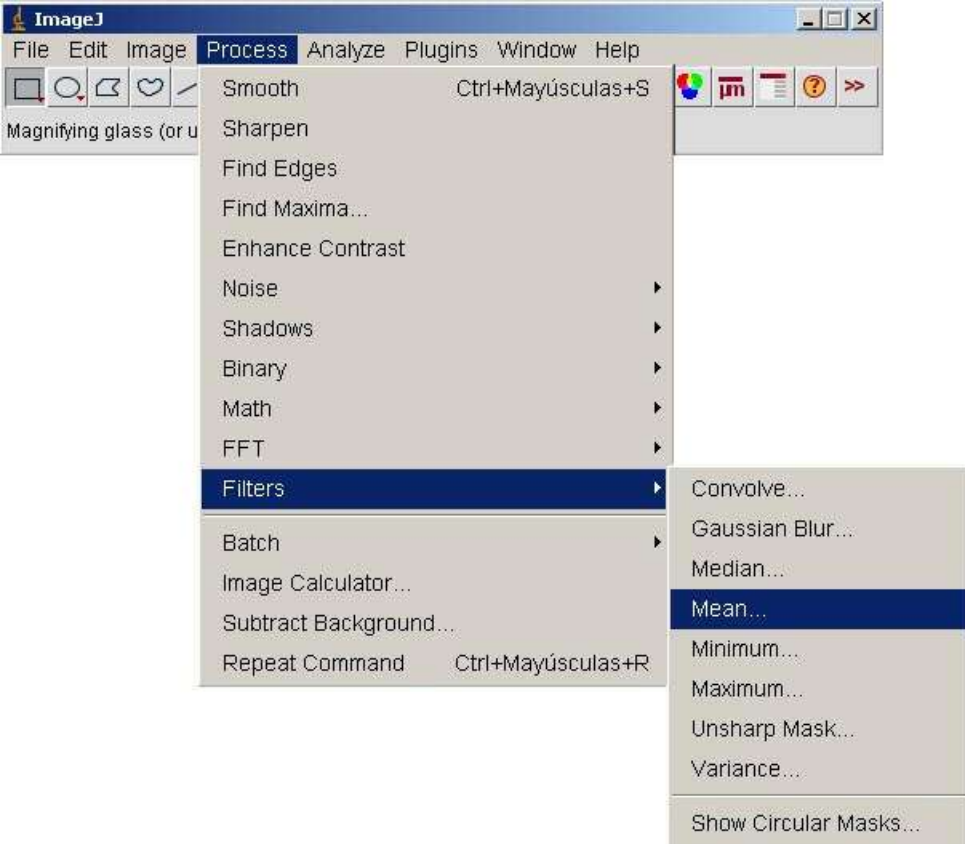




SEPARAR CANALES

Image/ Color/ Split Channels.

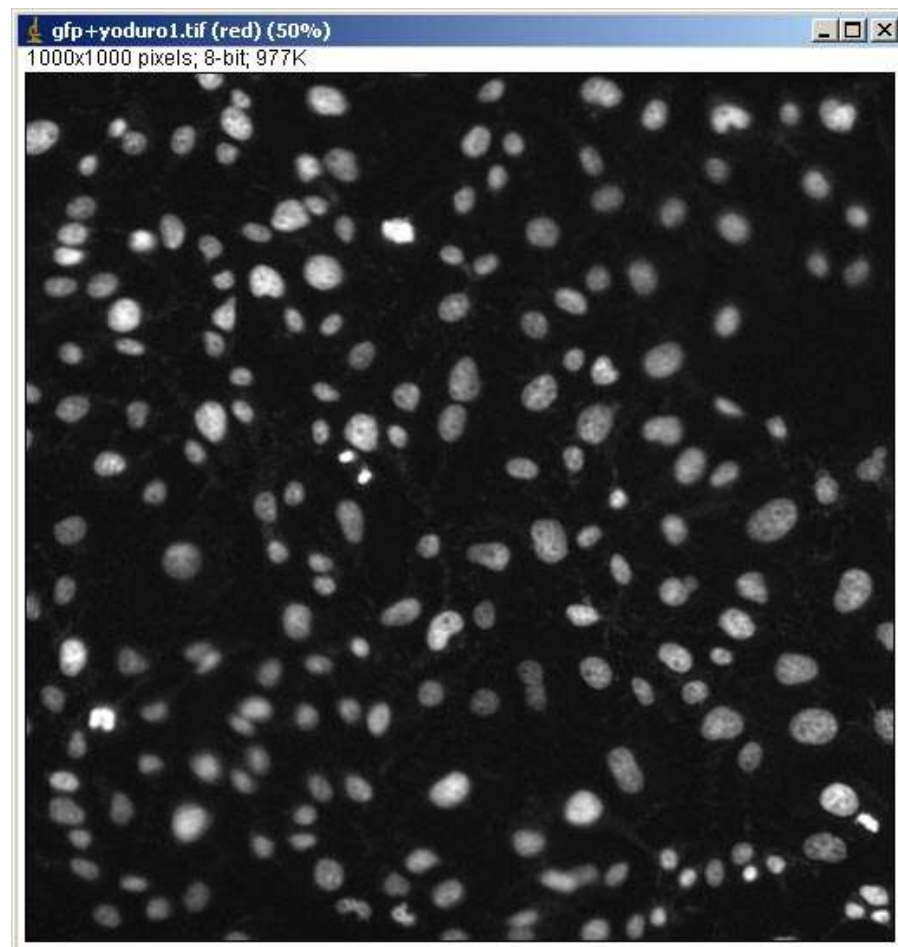
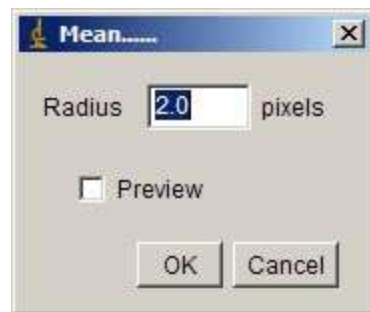


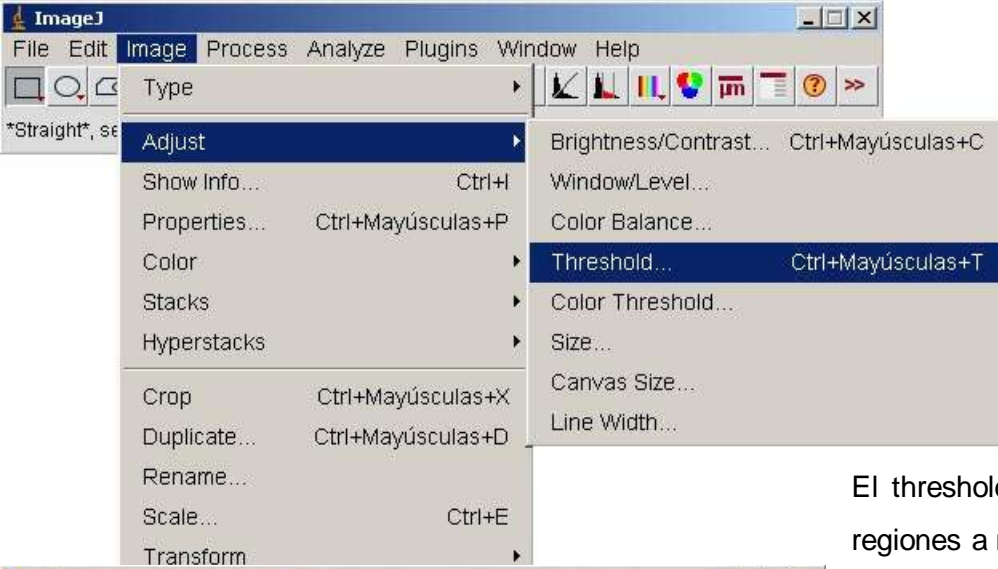


SOBRE LA IMAGEN DE YODURO

1º - Hacer un filtro de suavizado

Process/ Filters/ Mean (2.0 pixels)





2º - Hacer **selección automática** con el “threshold”
Image/ Adjust/ Threshold
Seleccionar “**Dark Background**” si marca el fondo rojo

3º - **Aplicar** el threshold seleccionado

El threshold selecciona los núcleos de forma automática sin tener que pintar regiones a mano.

Se suele recomendar la selección “Auto”, cualquier algoritmo “Li, Huang...” o fijar unos rangos en “Set”, para poder mantener siempre los mismos valores.

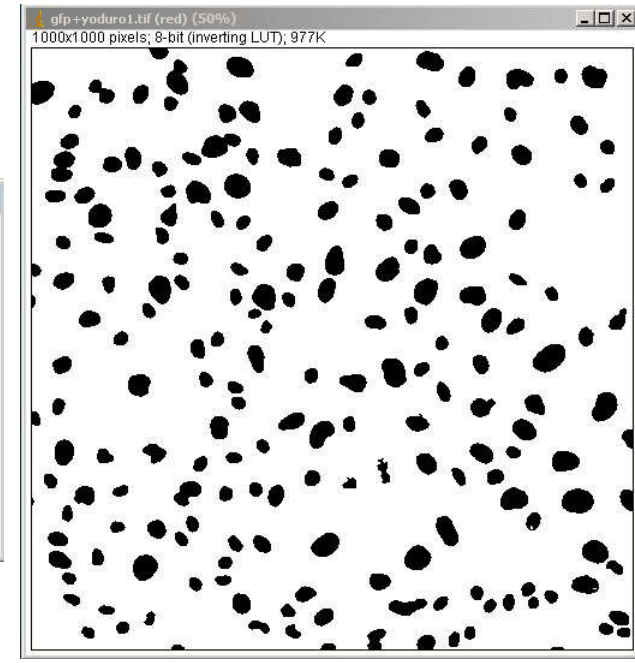
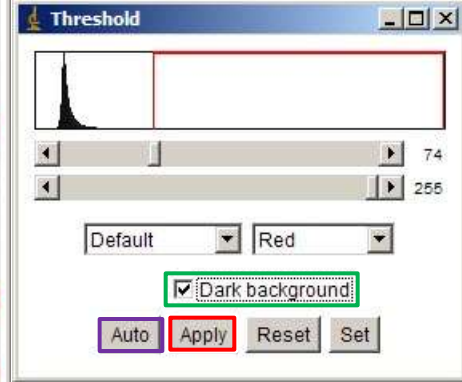
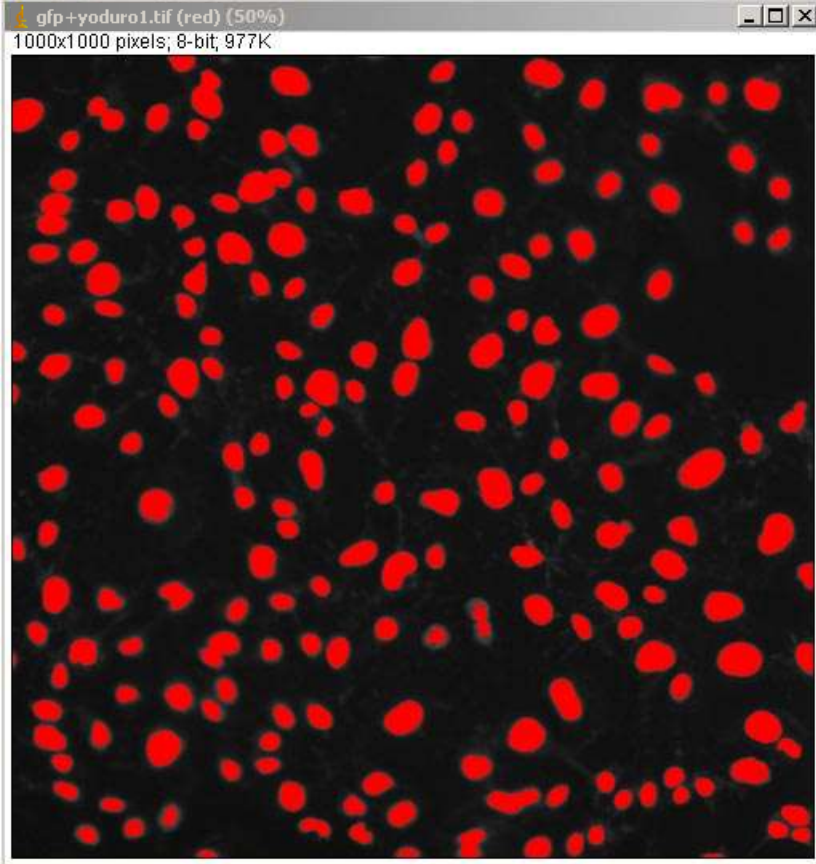
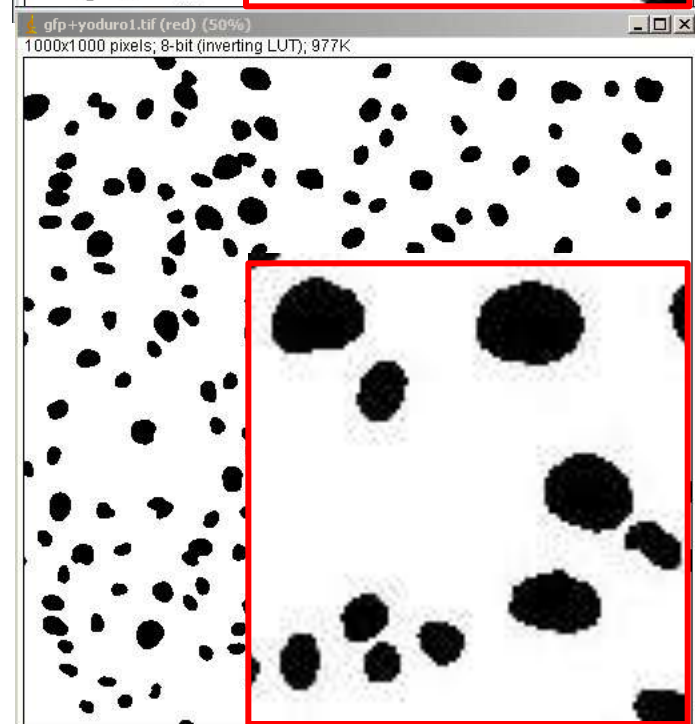
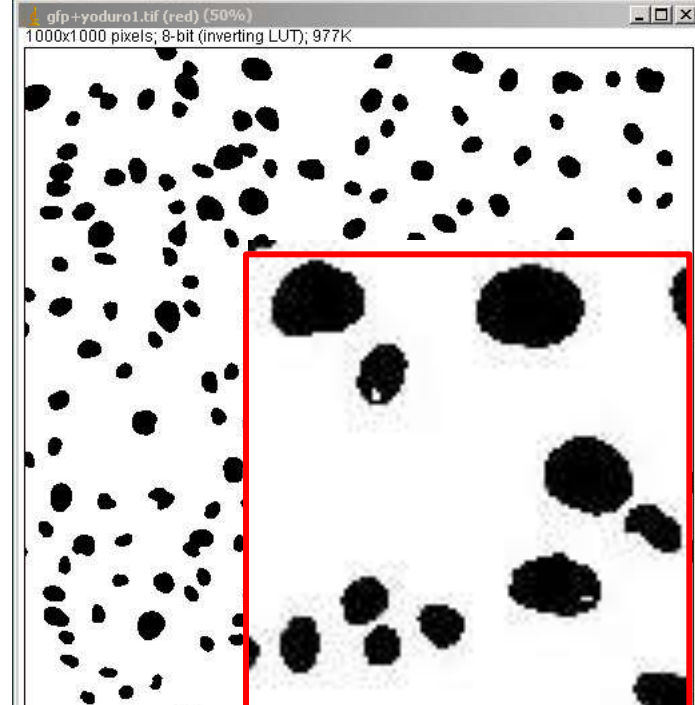
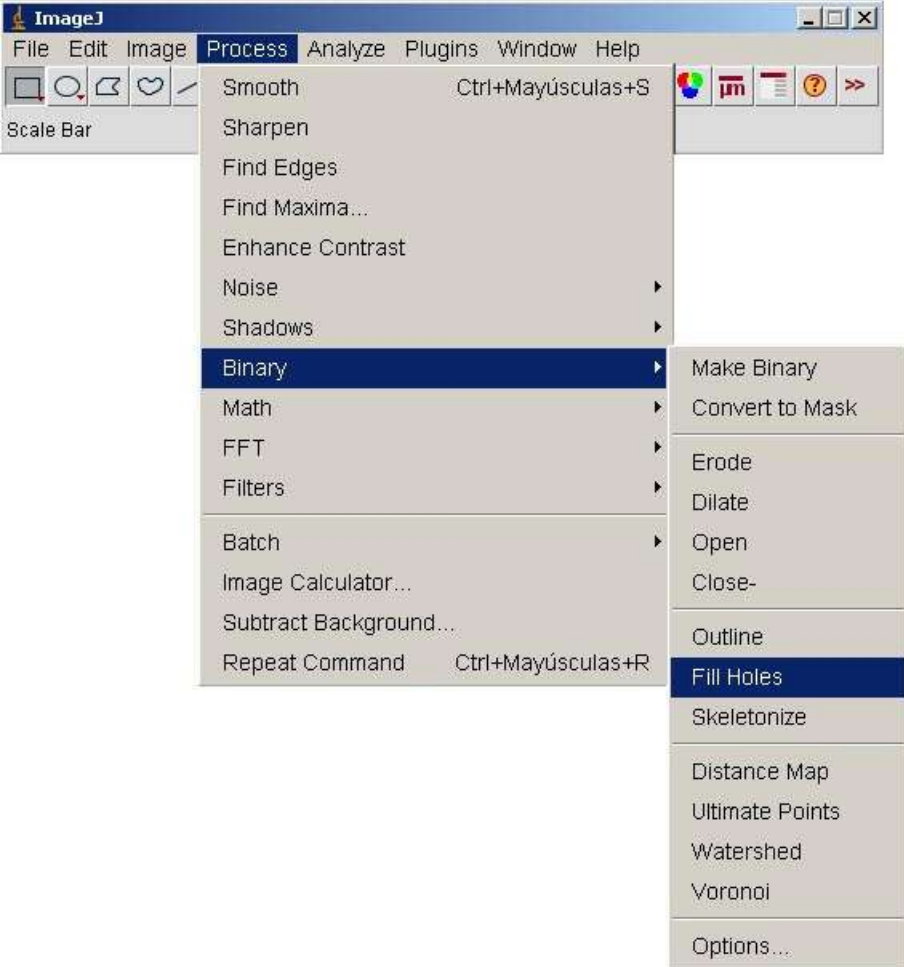
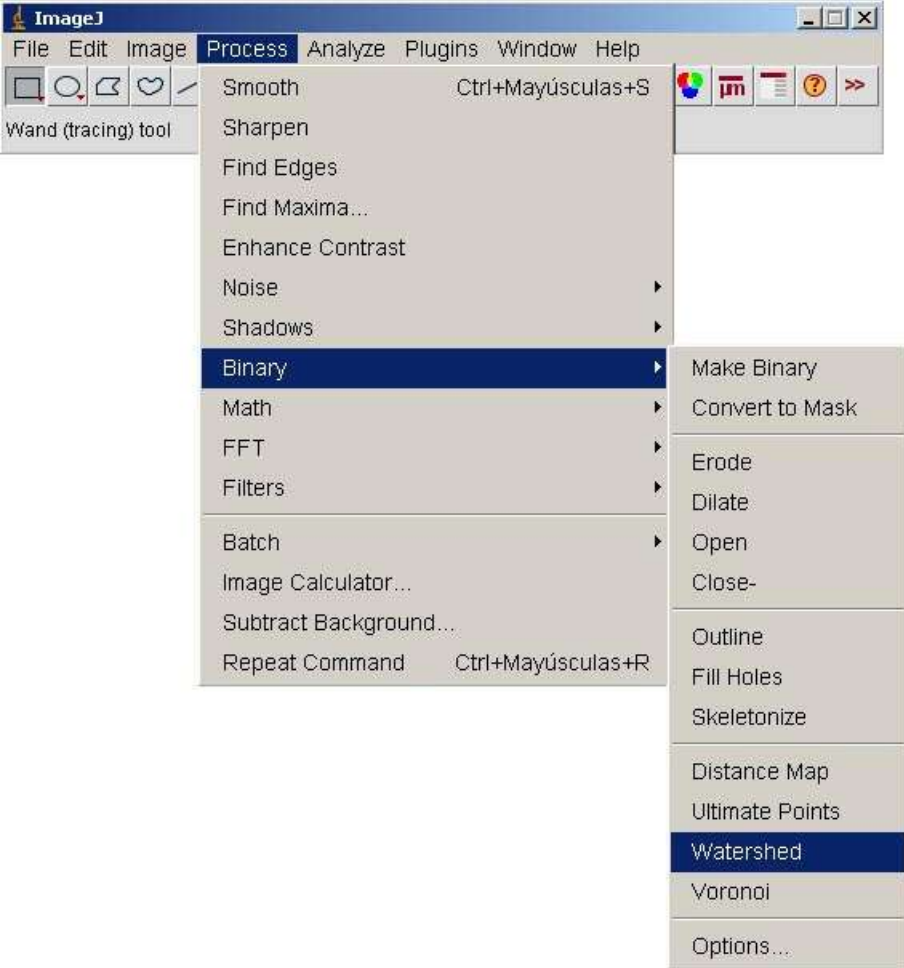


IMAGEN BINARIA



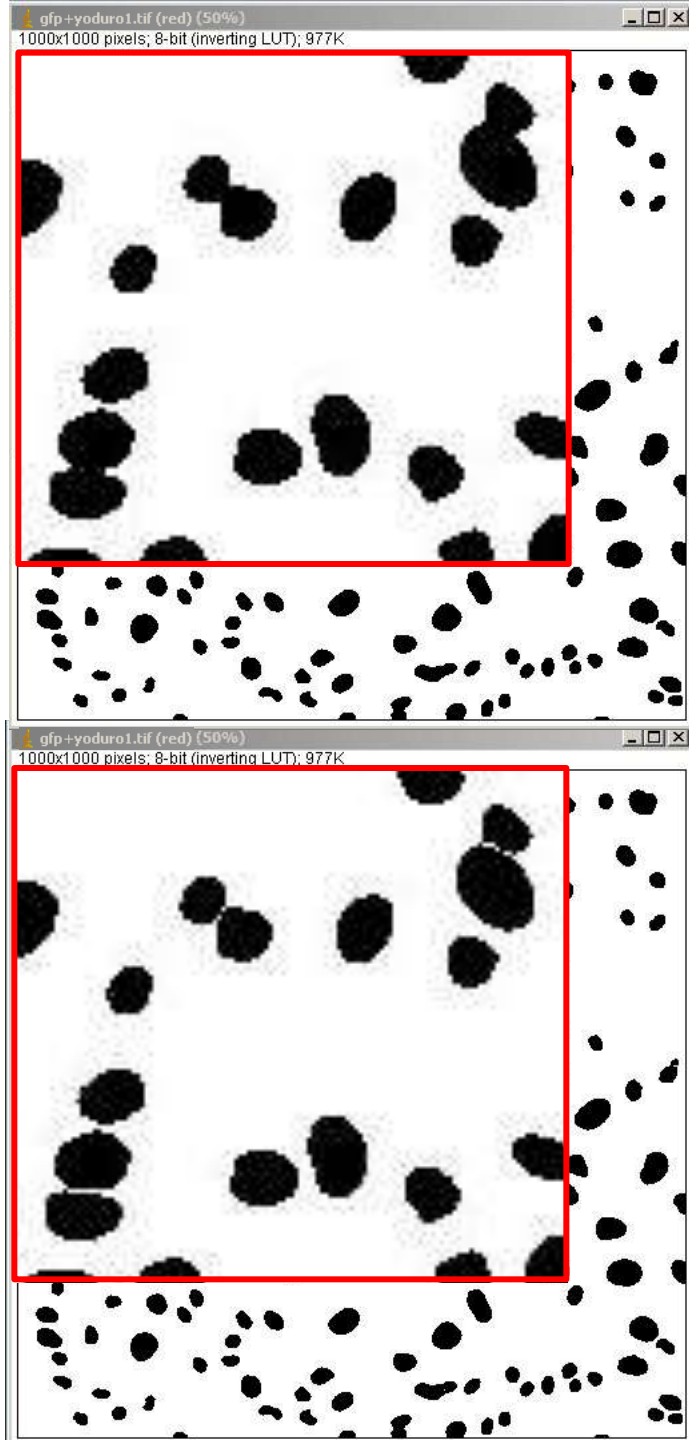
4º - Rellenar los posibles huecos que hayan quedado

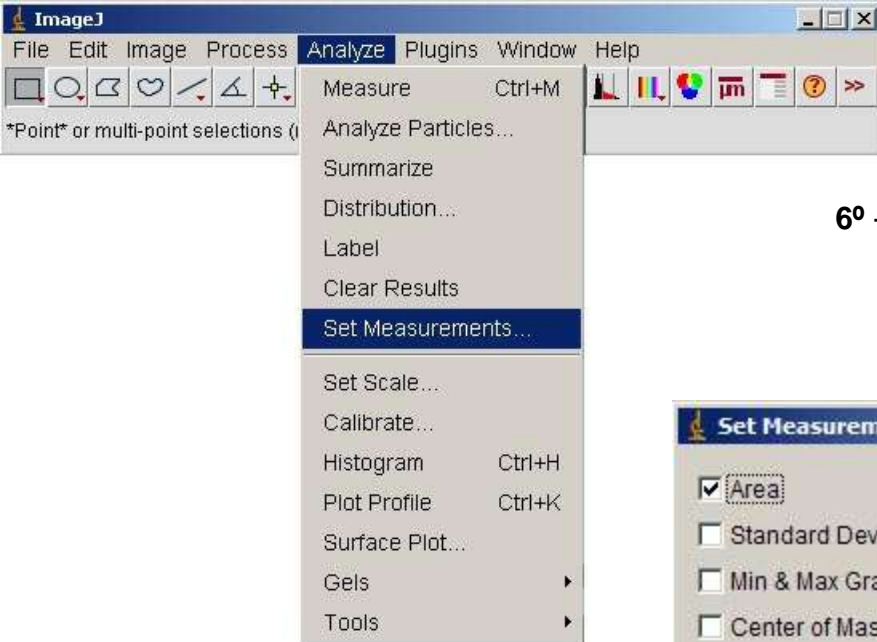
Process/ Binary/ Fill Holes



5º - Separar los núcleos que estén juntos.

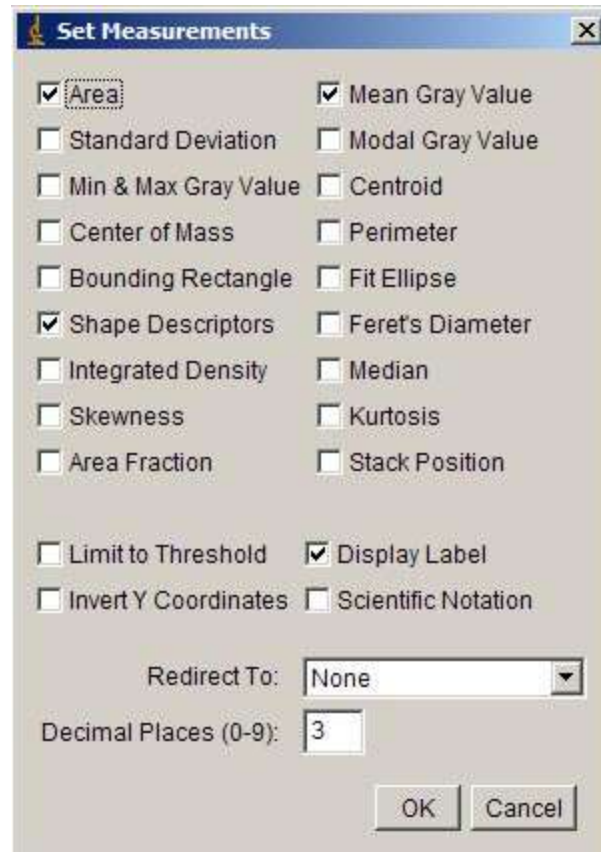
Process/ Binary/ Watershed





6º - Seleccionar parámetros a medir.

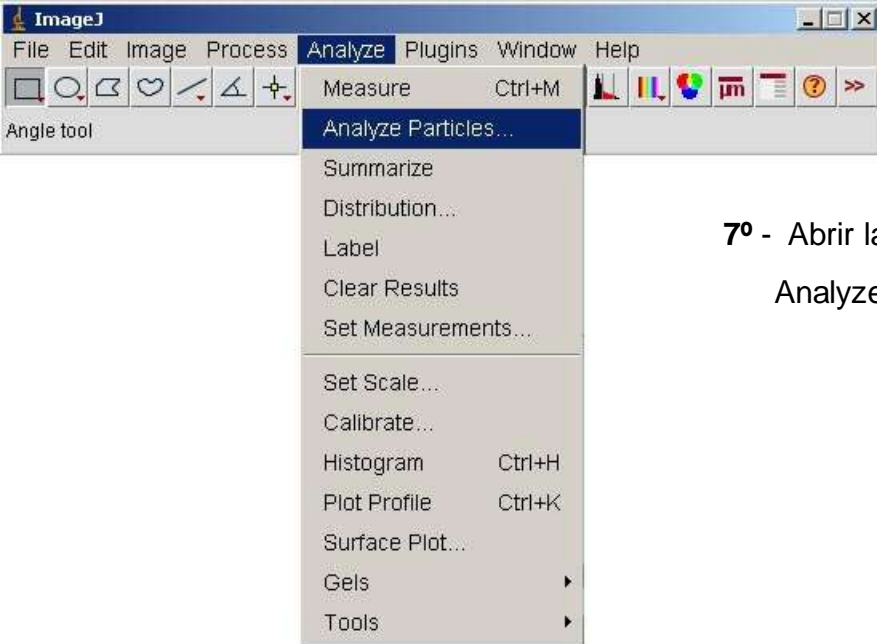
Analyze/ Set Measurements



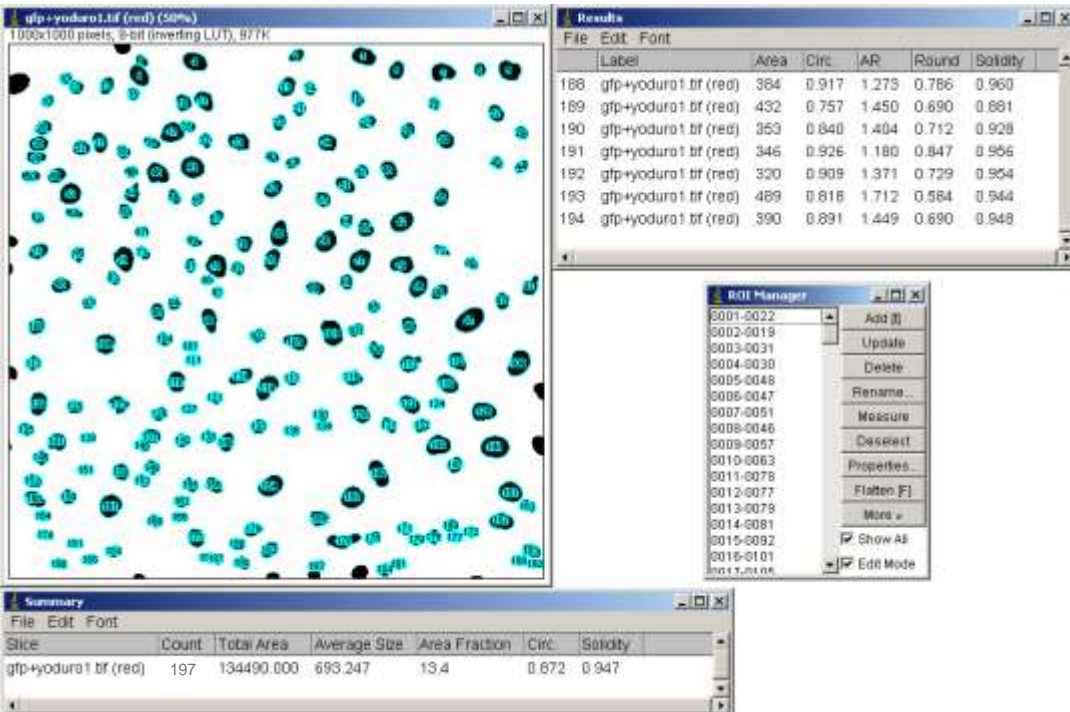
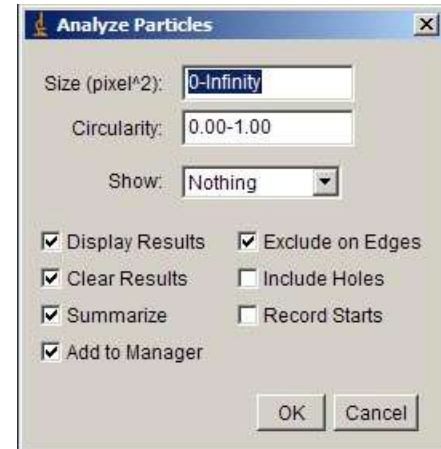
Para fijar las condiciones de medida, nos interesa discriminar posibles artefactos de la imagen.

Para ello, seleccionar “Area” y “Shape Descriptors”. Para restringir por tamaño y forma.

Además siempre es útil seleccionar “Display Label” que muestra el nombre de la imagen medida.



7º - Abrir la aplicación para contar
Analyze/ Analyze Particles



Por ahora:

- No restringir en tamaño
- No restringir en circularidad
- Que muestre los resultados
- Que los borre cuando calcule unos nuevos
- Que muestre el sumatorio
- Añadir regiones al "ROI Manager"
- Que NO cuente los núcleos que toquen el borde de la imagen
- El resto no hace falta seleccionarlo

Guardar los resultados como “.xls”

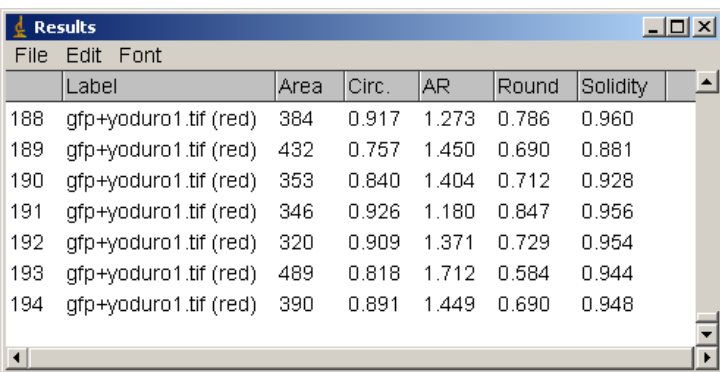
Abrir el archivo y revisar primero el área, para poder limitar por tamaño y después la circ para poder limitar por circularidad.

Al revisar el archivo, vemos valores de área de 2 y 106, mientras que lo más común suele ser valores por encima de 220. Al revisar los núcleos con estos valores (2 y 106) comprobamos que no son núcleos, por lo que podemos limitar el tamaño.

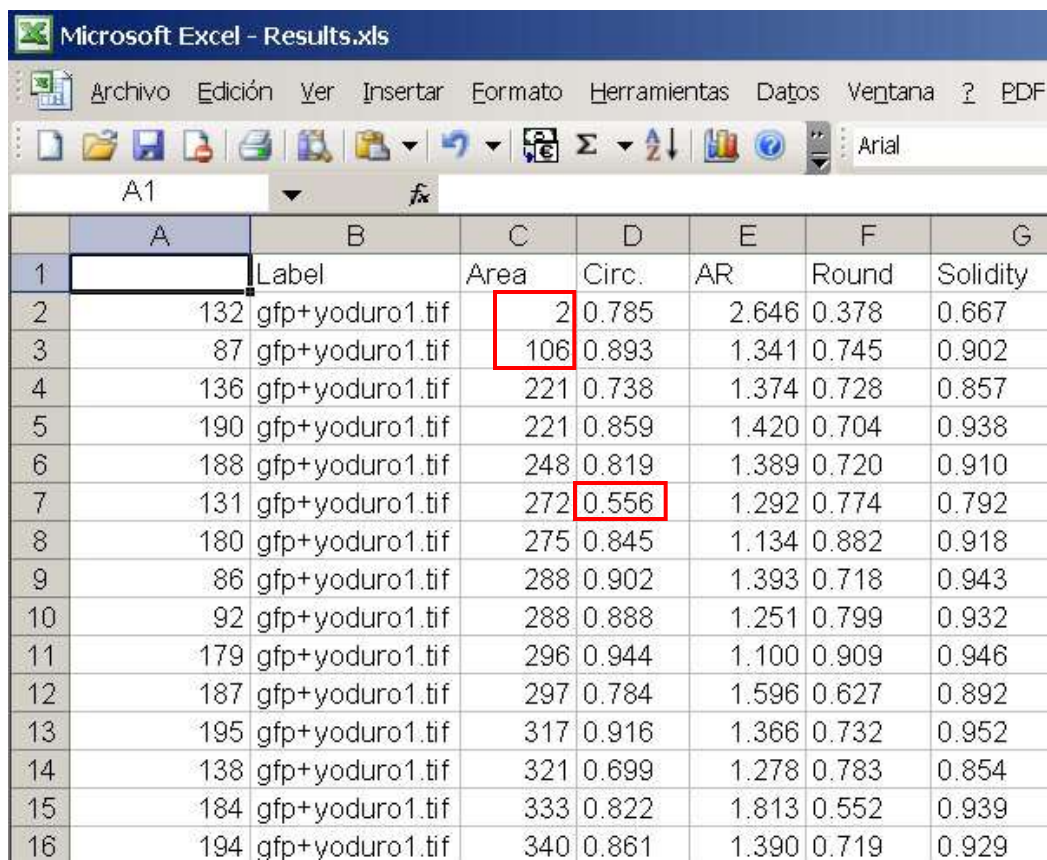
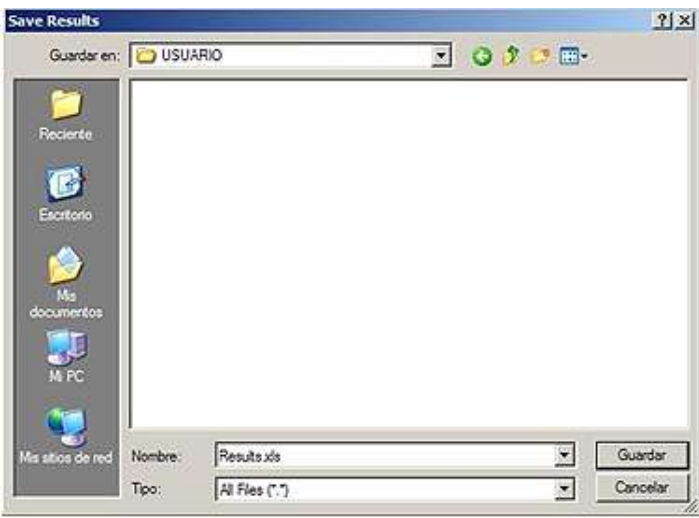
Por forma, la circularidad más pequeña es de 0.55.

Las nuevas restricciones: Area > 220 y Circularidad > 0.55

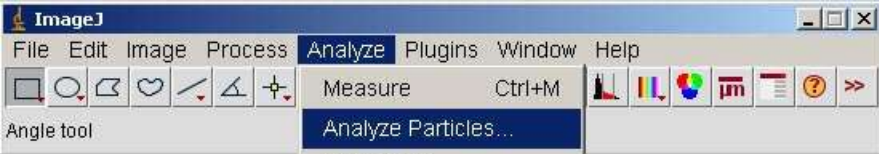
Es conveniente que sobre la primera medición se revise que se han contado sólo núcleos y no restos u otros artefactos de la imagen para saber cuanto hay que restringir para medir solo lo que nos interese, sobre todo si se quieren medir con las mismas condiciones varias imágenes.



	Label	Area	Circ.	AR	Round	Solidity
188	gfp+yoduro1.tif (red)	384	0.917	1.273	0.786	0.960
189	gfp+yoduro1.tif (red)	432	0.757	1.450	0.690	0.881
190	gfp+yoduro1.tif (red)	353	0.840	1.404	0.712	0.928
191	gfp+yoduro1.tif (red)	346	0.926	1.180	0.847	0.956
192	gfp+yoduro1.tif (red)	320	0.909	1.371	0.729	0.954
193	gfp+yoduro1.tif (red)	489	0.818	1.712	0.584	0.944
194	gfp+yoduro1.tif (red)	390	0.891	1.449	0.690	0.948

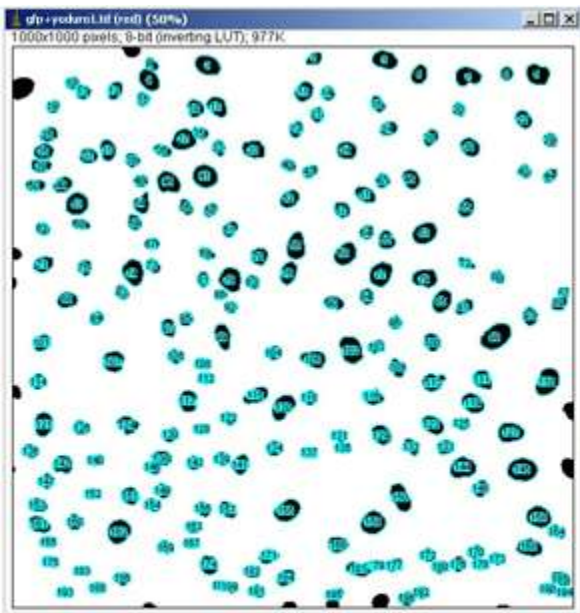


	A	B	C	D	E	F	G
		Label	Area	Circ.	AR	Round	Solidity
2	132	gfp+yoduro1.tif	2	0.785	2.646	0.378	0.667
3	87	gfp+yoduro1.tif	106	0.893	1.341	0.745	0.902
4	136	gfp+yoduro1.tif	221	0.738	1.374	0.728	0.857
5	190	gfp+yoduro1.tif	221	0.859	1.420	0.704	0.938
6	188	gfp+yoduro1.tif	248	0.819	1.389	0.720	0.910
7	131	gfp+yoduro1.tif	272	0.556	1.292	0.774	0.792
8	180	gfp+yoduro1.tif	275	0.845	1.134	0.882	0.918
9	86	gfp+yoduro1.tif	288	0.902	1.393	0.718	0.943
10	92	gfp+yoduro1.tif	288	0.888	1.251	0.799	0.932
11	179	gfp+yoduro1.tif	296	0.944	1.100	0.909	0.946
12	187	gfp+yoduro1.tif	297	0.784	1.596	0.627	0.892
13	195	gfp+yoduro1.tif	317	0.916	1.366	0.732	0.952
14	138	gfp+yoduro1.tif	321	0.699	1.278	0.783	0.854
15	184	gfp+yoduro1.tif	333	0.822	1.813	0.552	0.939
16	194	gfp+yoduro1.tif	340	0.861	1.390	0.719	0.929



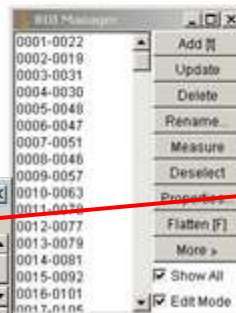
8º - Cerrar todos los paneles (results, Summary y Roi Manager)

9º - Volver a medir, con restricciones nuevas. Analyze/ Analyze Particles



	Label	Area	Circ.	AR	Round	Solidity
188	gfp+yoduro1.tif (red)	384	0.917	1.273	0.786	0.960
189	gfp+yoduro1.tif (red)	432	0.757	1.450	0.690	0.881
190	gfp+yoduro1.tif (red)	353	0.840	1.404	0.712	0.928
191	gfp+yoduro1.tif (red)	346	0.926	1.180	0.847	0.956
192	gfp+yoduro1.tif (red)	320	0.909	1.371	0.729	0.954
193	gfp+yoduro1.tif (red)	489	0.818	1.712	0.584	0.944
194	gfp+yoduro1.tif (red)	390	0.891	1.449	0.690	0.948

Slice	Count	Total Area	Average Size	Area Fraction	Mean	Circ.	Solidity
gfp+yoduro1.tif (red)	195	132903.000	681.554	13.3	255	0.873	0.947



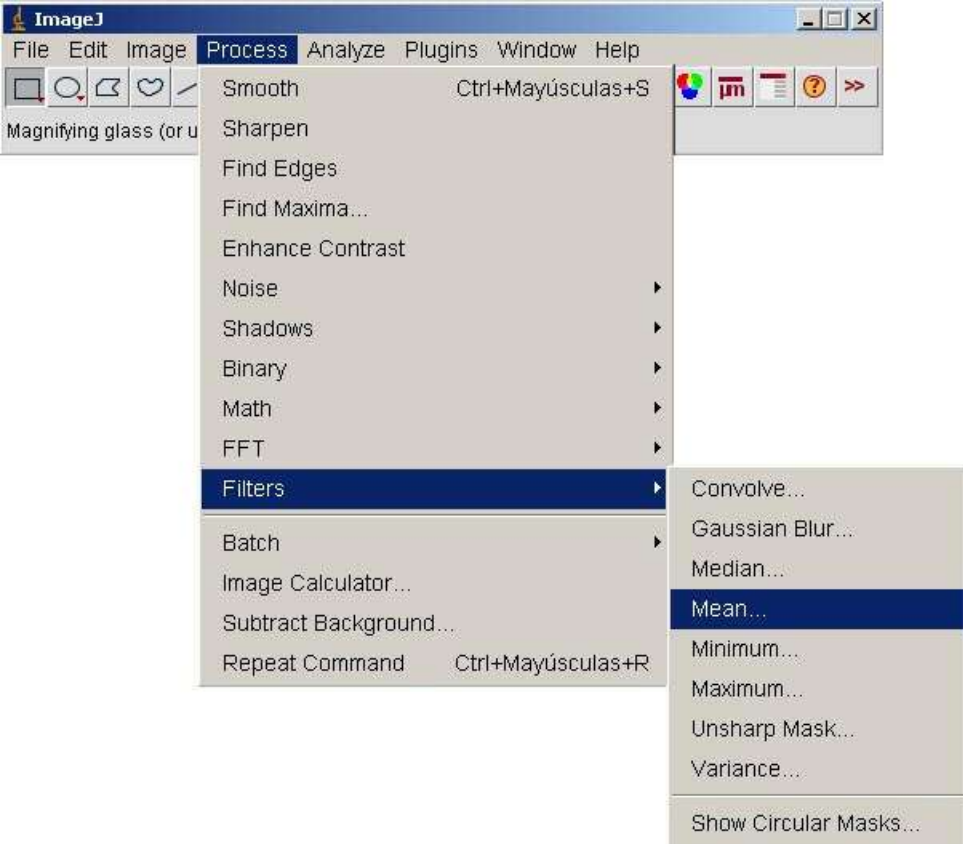
Slice	Count
gfp+yoduro1.tif (red)	195

Ya tenemos contados los núcleos, 195, con lo que sabemos el número de células que hay en el campo, aproximadamente.

Ahora vamos a comprobar cuantas de estas células son verdes y cuantas no.

Para poder trabajar con la imagen verde y compararla con la imagen de yoduro, necesitamos que esté en el mismo formato, es decir, en binario.

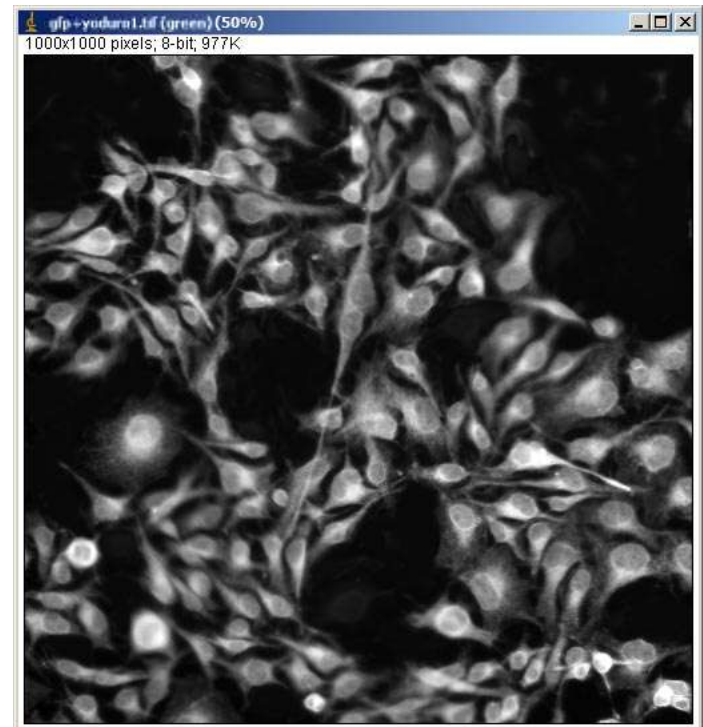
Con esto podemos conseguir una imagen nueva donde solo aparezcan los núcleos que a la vez tienen marcaje en verde o una imagen nueva en la que solo aparezcan los núcleos de las células que no son verdes.

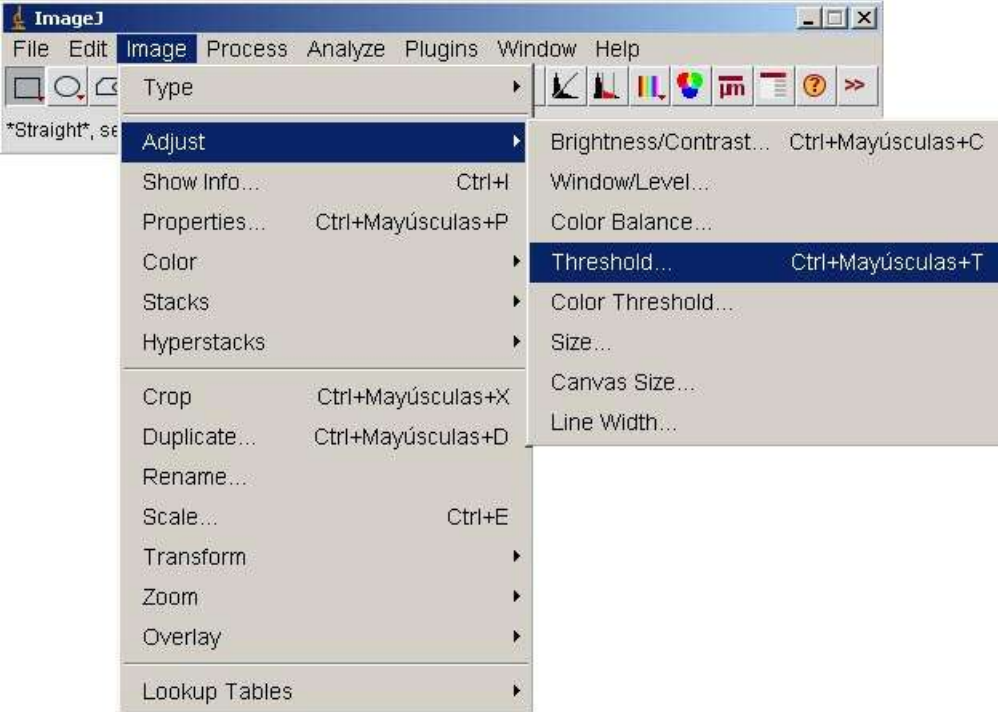


SOBRE LA IMAGEN DE GFP

10º - Hacer un filtro de suavizado

Process/ Filters/ Mean (2.0 pixels)



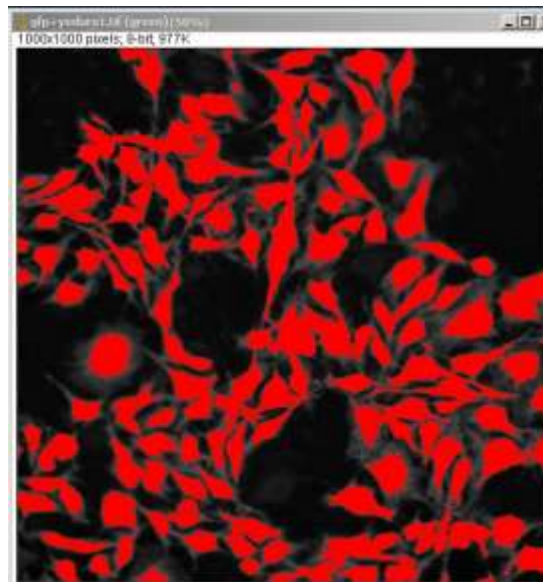
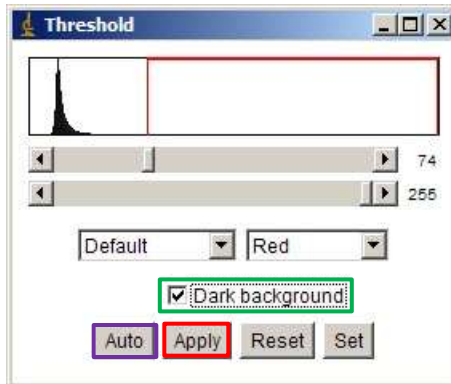


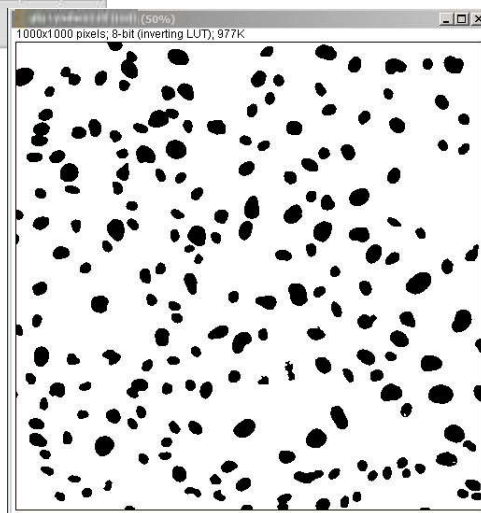
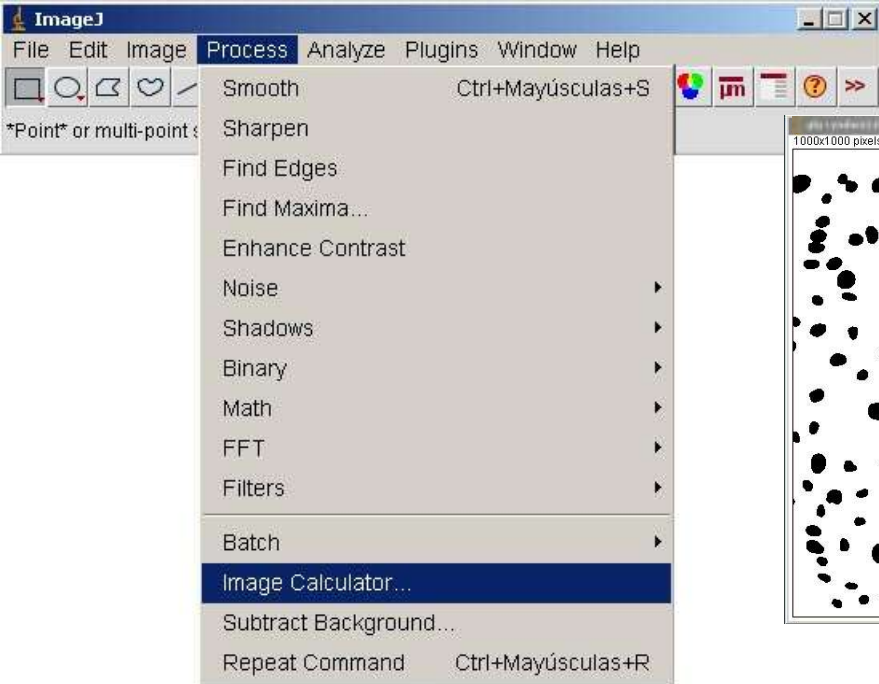
2º - Hacer la selección automática con el “threshold”

Image/ Adjust/ Threshold

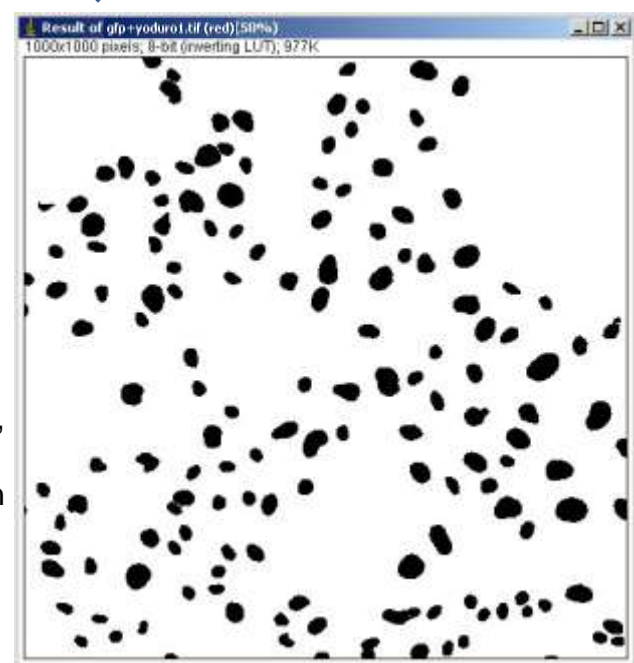
Seleccionar “Dark Background” si nos marca el fondo rojo

3º - Aplicamos el threshold seleccionado





AND
Lo que
tienen
en
común



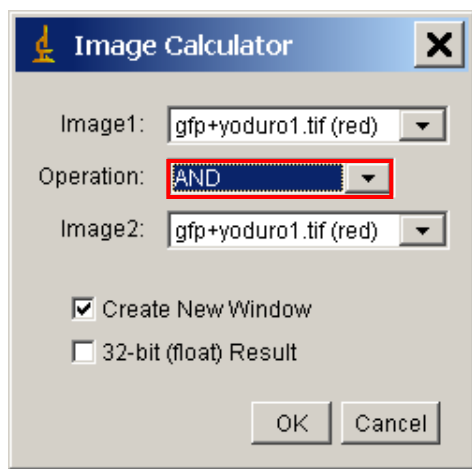
4º - Hacer cálculo entre imágenes,

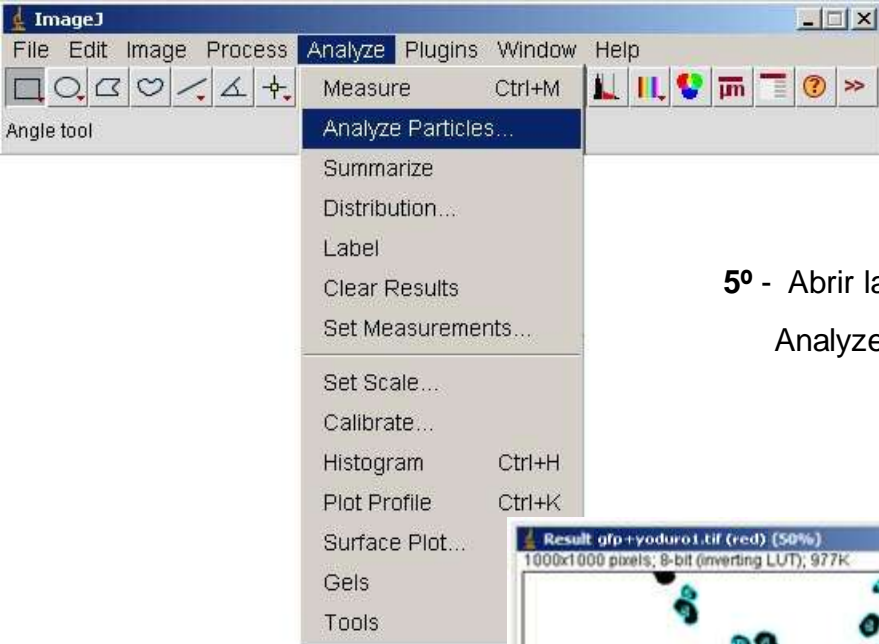
Process/ Image Calculator:

“Gfp+yoduro (red)” (AND) “Gfp+yoduro (green)”

Que es lo mismo que [Yoduro (AND) Gfp]

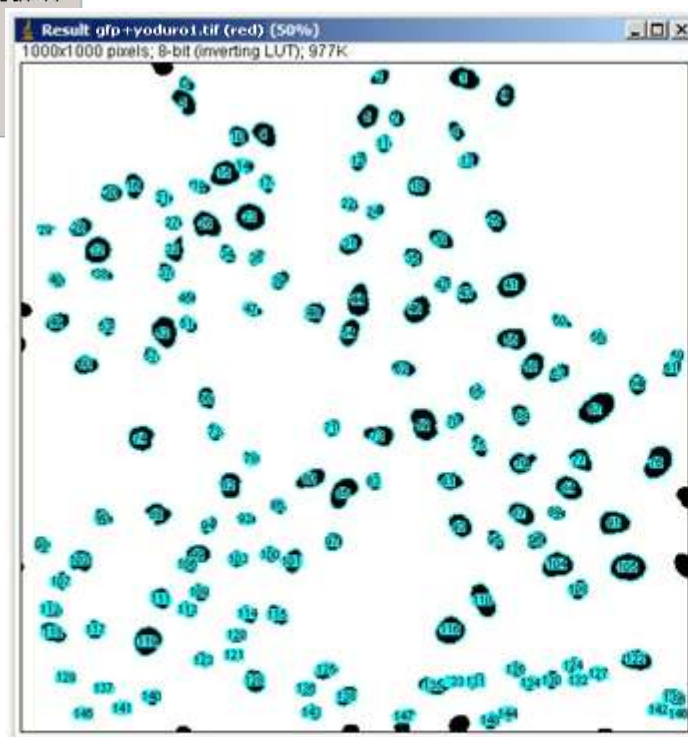
Una imagen nueva con lo que tienen en común,
es decir, solo los núcleos que tienen marcaje en
gfp.





5º - Abrir la aplicación para contar

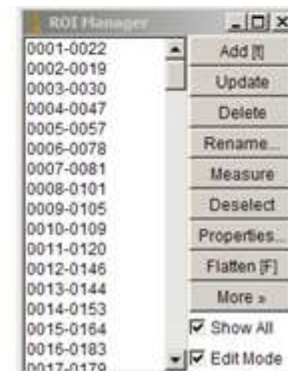
Analyze/ Analyze Particles, con las restricciones fijadas anteriormente.

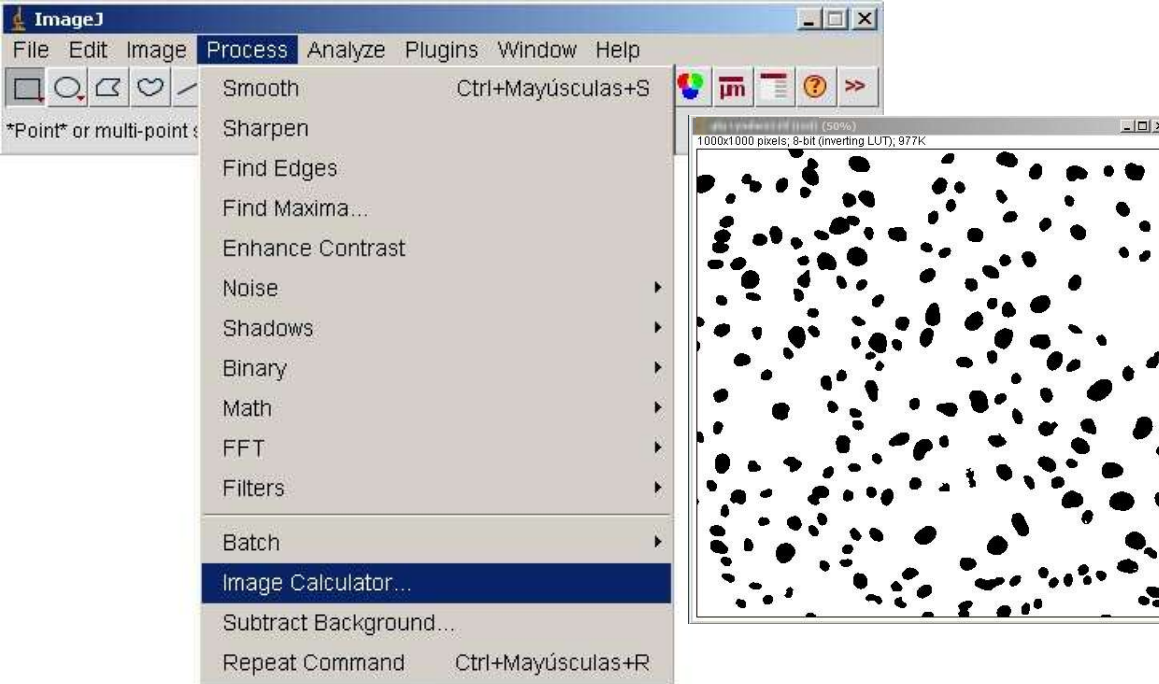


File	Edit	Font					
	Label	Area	Circ.	AR	Round	Solidity	
188	gfp+yoduro1.tif (red)	384	0.917	1.273	0.786	0.960	
189	gfp+yoduro1.tif (red)	432	0.757	1.450	0.690	0.881	
190	gfp+yoduro1.tif (red)	353	0.840	1.404	0.712	0.928	
191	gfp+yoduro1.tif (red)	346	0.926	1.180	0.847	0.956	
192	gfp+yoduro1.tif (red)	320	0.909	1.371	0.729	0.954	
193	gfp+yoduro1.tif (red)	489	0.818	1.712	0.584	0.944	
194	gfp+yoduro1.tif (red)	390	0.891	1.449	0.690	0.948	

Summary	
File	Count
gfp+yoduro1.tif (red)	195
AND	147

Summary							
File	Count	Total Area	Average Size	Area Fraction	Mean	Circ.	Solidity
gfp+yoduro1.tif (red)	195	132903.000	681.554	13.3	255	0.873	0.947
AND	147	101757.000	692.224	10.2	255	0.871	0.948





SUBTRACT

Lo que está
en la imagen
de yoduro
pero no en la
de gfp



6º - Hacer cálculo entre imágenes,

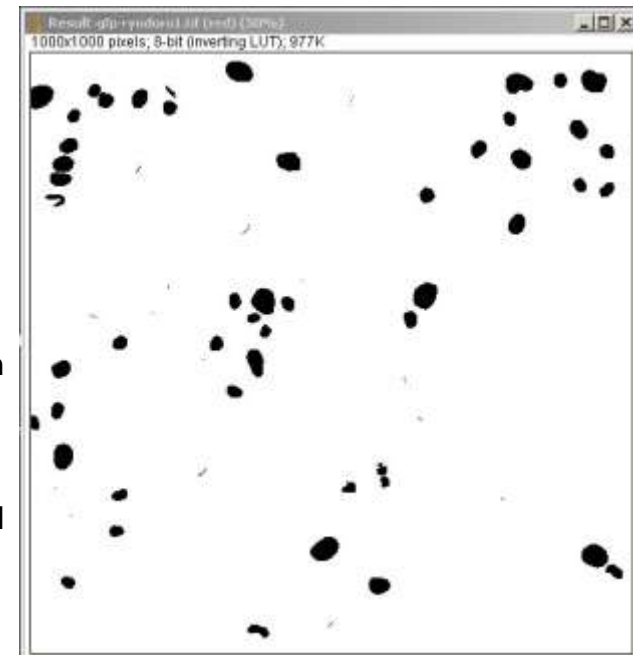
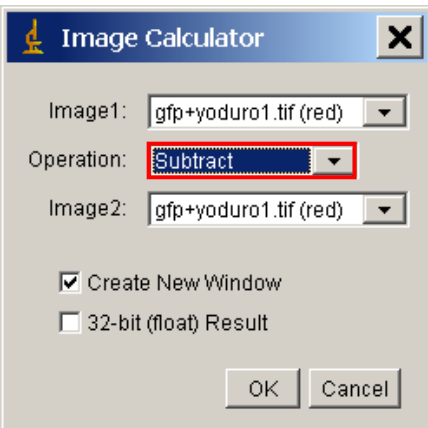
Process/ Image Calculator:

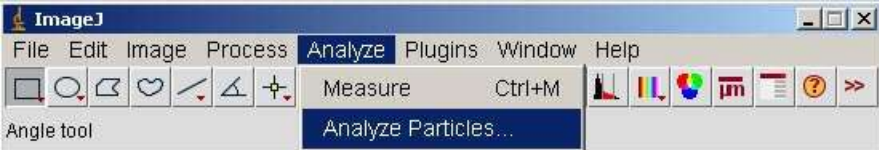
“Gfp+yoduro (red)” (SUBTRACT) “Gfp+yoduro (green)”

Que es lo mismo que [yoduro (SUBTRACT) Gfp]

Una imagen nueva solo con los núcleos que NO tienen
marcaje en gfp.

Este cálculo se puede hacer para comprobar que el
contaje nos lo está haciendo bien.

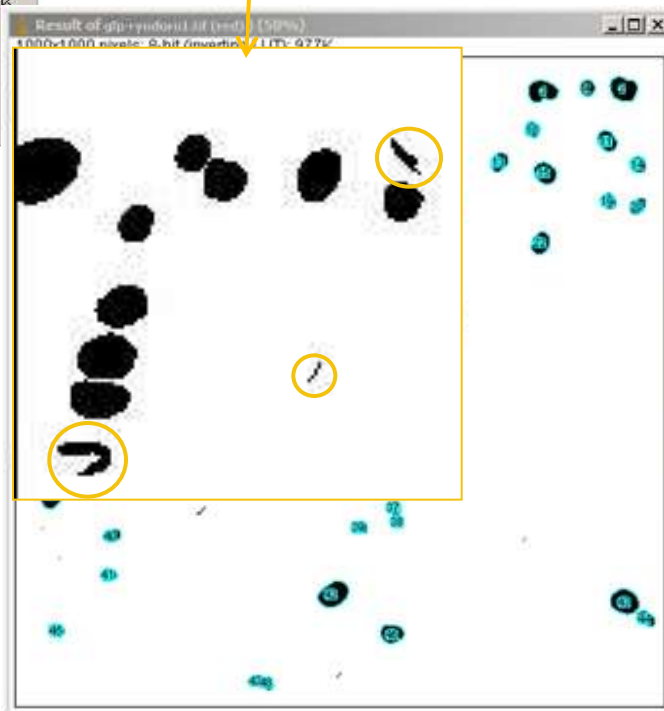




7º - Abrir la aplicación para contar

Analyze/ Analyze Particles, con las restricciones fijadas anteriormente.

NOTA: Aquí son muy importantes las restricciones porque si no las tuviésemos contaría más núcleos de los que hay.



File	Edit	Font				
	Label	Area	Circ.	AR	Round	Solidity
188	gfp+yoduro1.tif (red)	384	0.917	1.273	0.786	0.960
189	gfp+yoduro1.tif (red)	432	0.757	1.450	0.690	0.881
190	gfp+yoduro1.tif (red)	353	0.840	1.404	0.712	0.928
191	gfp+yoduro1.tif (red)	346	0.926	1.180	0.847	0.956
192	gfp+yoduro1.tif (red)	320	0.909	1.371	0.729	0.954
193	gfp+yoduro1.tif (red)	489	0.818	1.712	0.584	0.944
194	gfp+yoduro1.tif (red)	390	0.891	1.449	0.690	0.948

Summary	
Slice	Count
gfp+yoduro1.tif (red)	195
AND	147
SUBTRACT	48

Summary							
File	Edit	Font					
Slice	Count	Total Area	Average Size	Area Fraction	Mean	Circ.	Solidity
gfp+yoduro1.tif (red)	195	132903.000	681.554	13.3	255	0.873	0.947
AND	147	101757.000	692.224	10.2	255	0.871	0.948
SUBTRACT	48	30471.000	634.812	3.0	255	0.870	0.942

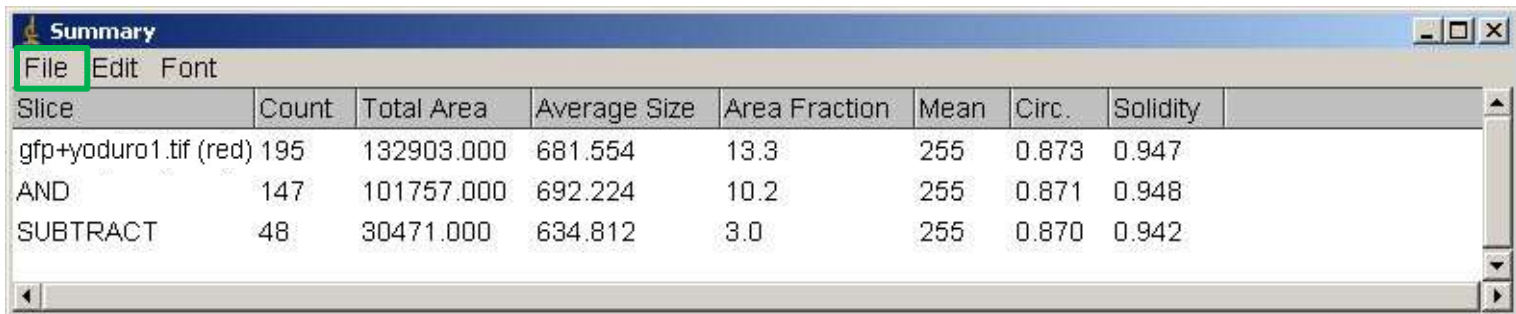
ROI Manager	
0001-0031	Add [I]
0002-0048	Update
0003-0051	Delete
0004-0046	Rename...
0005-0063	Measure
0006-0077	Deselect
0007-0079	Properties...
0008-0092	Flatten [F]
0009-0105	More >
0010-0110	<input checked="" type="checkbox"/> Show All
0011-0128	<input checked="" type="checkbox"/> Edit Mode
0012-0155	
0013-0161	
0014-0165	
0015-0178	
0016-0182	
0017-0195	

Contajes hechos:

Imagen de yoduro (todos los núcleos)	195 células
Imagen AND (células positivas, es decir, núcleos que tienen gfp),	147 células
Imagen SUBTRACT (células negativas, es decir, núcleos que NO coinciden con una célula gfp)	48 células

Para contar el número total de células por campo y las que si tienen gfp, nos basta con el cálculo total más una de las dos opciones o bien el AND o bien el SUBTRACT.

Para guardar los cálculos, en el panel Summary, seleccionar **“File/Save as”** y grabar el archivo como “.xls” para poder abrirlo desde el excel.



Slice	Count	Total Area	Average Size	Area Fraction	Mean	Circ.	Solidity
gfp+yoduro1.tif (red)	195	132903.000	681.554	13.3	255	0.873	0.947
AND	147	101757.000	692.224	10.2	255	0.871	0.948
SUBTRACT	48	30471.000	634.812	3.0	255	0.870	0.942

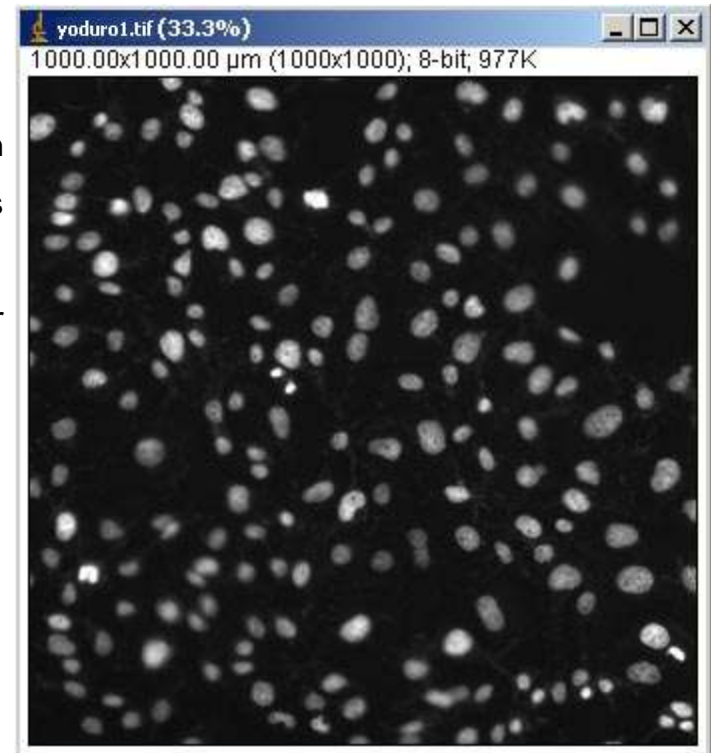
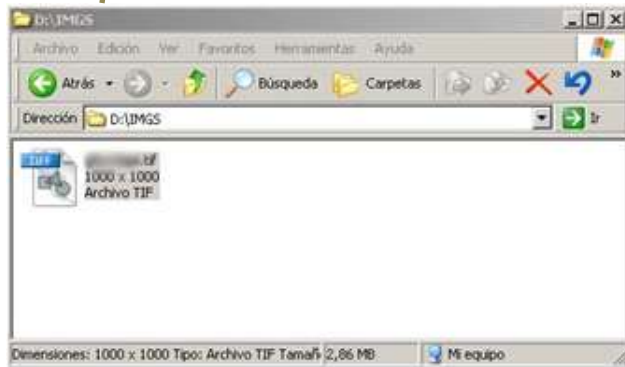
Para repetir el mismo proceso de forma rápida y sencilla, se puede crear un macro.

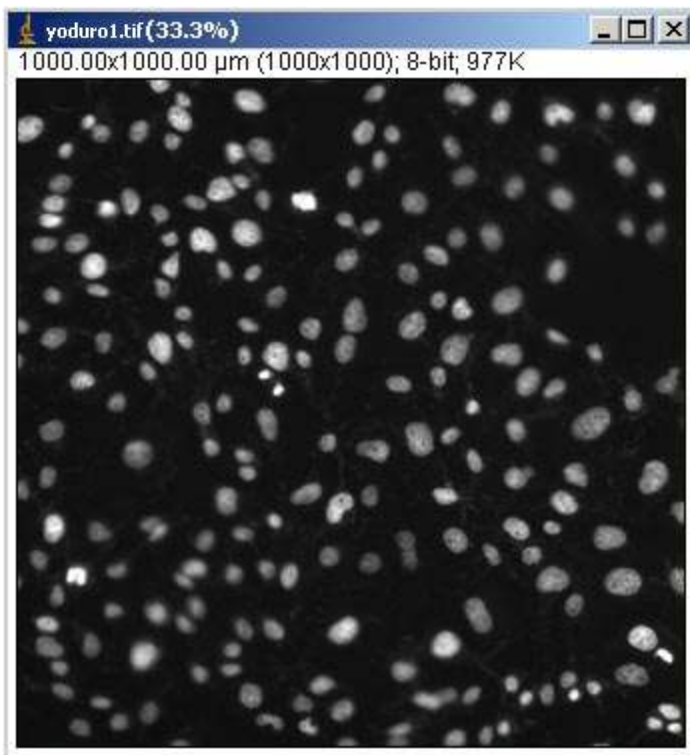
Grabar los pasos en una imagen y guardarlos para aplicarlos a el resto de imágenes.



1º - Abrir la imagen

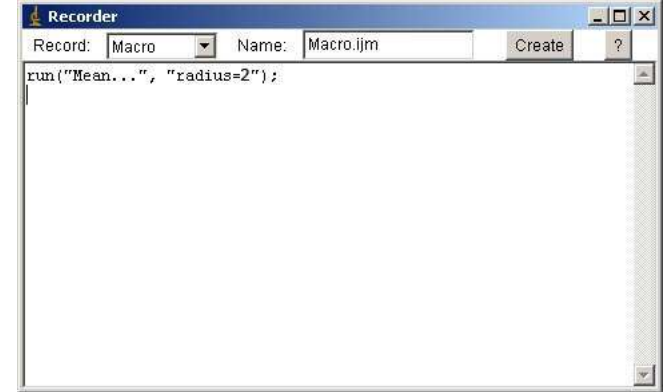
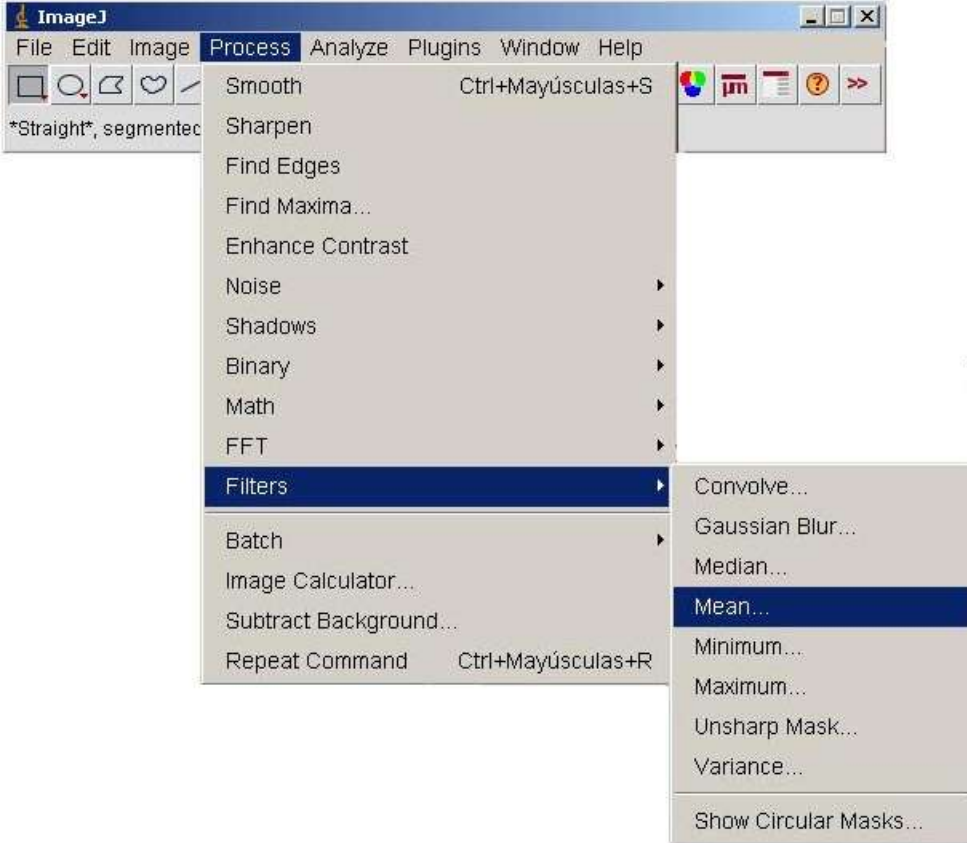
NOTA: A veces es conveniente renombrar la imagen antes de grabar el macro, para que todas las acciones que se realicen las grabe sobre ese nuevo nombre. Suele ser útil cuando hay que separar canales, hacer duplicados de imágenes, etc.





2º - Seleccionar Plugins/ Macros/ Record...

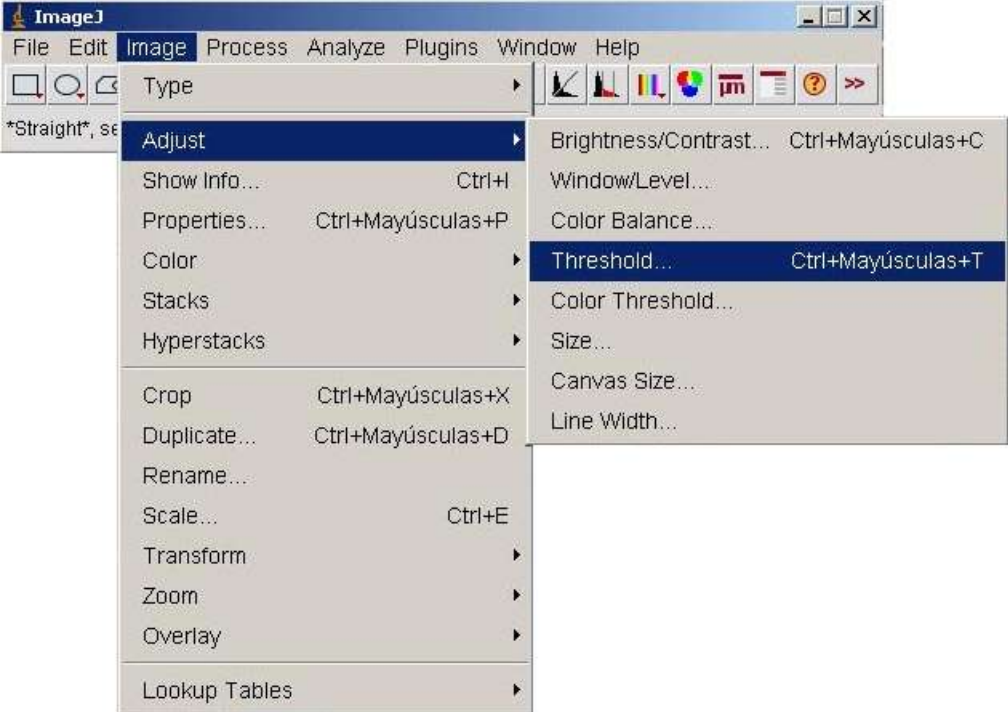
Se abre una ventana donde se graba todo lo que se hace dentro del programa



3º - Hacer los pasos que se quieran grabar.



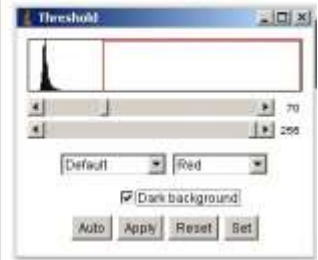
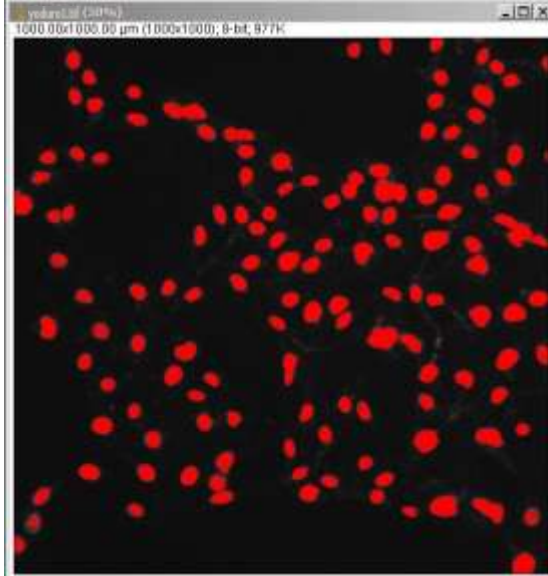
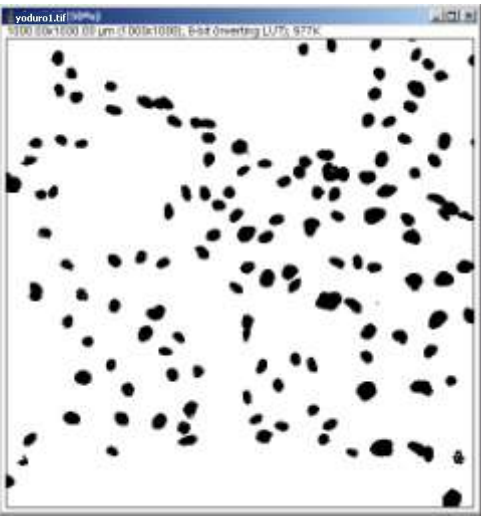
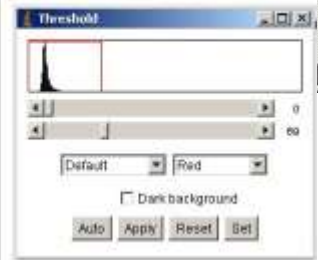
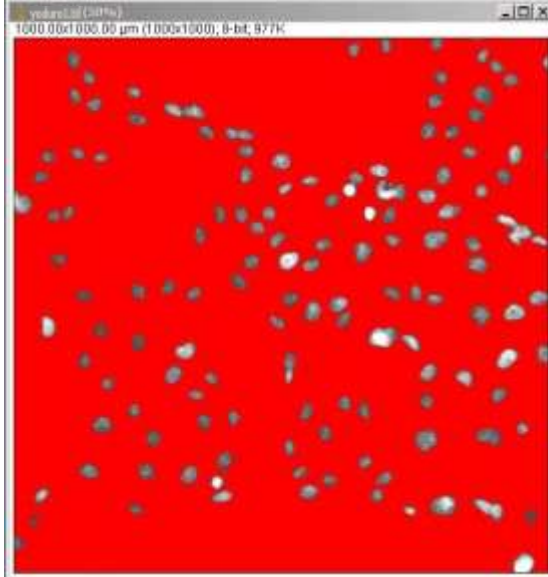
En el ejemplo se repiten los mismos pasos que en el caso anterior, pero se puede grabar lo que se necesite.

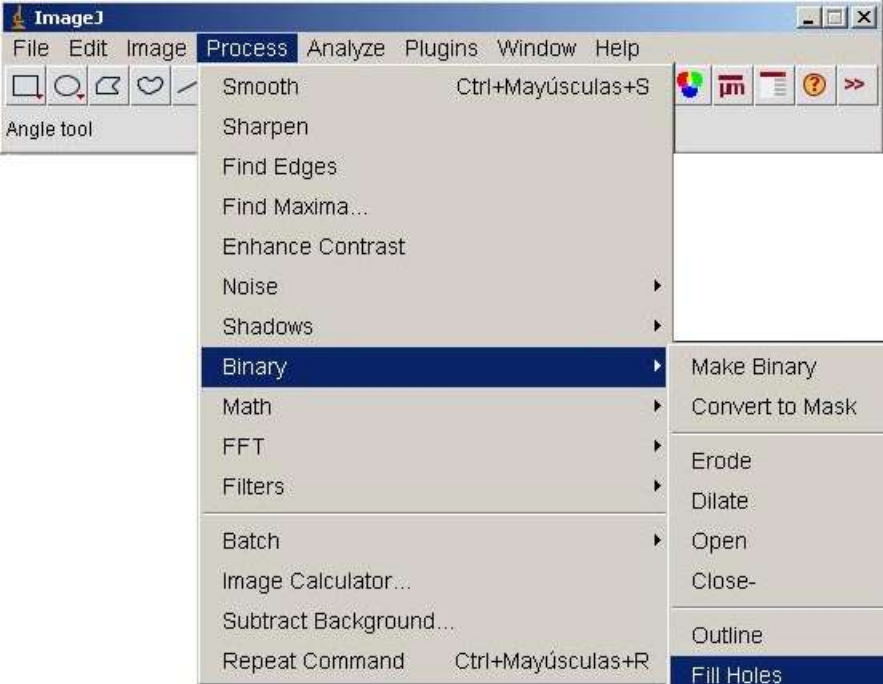


```

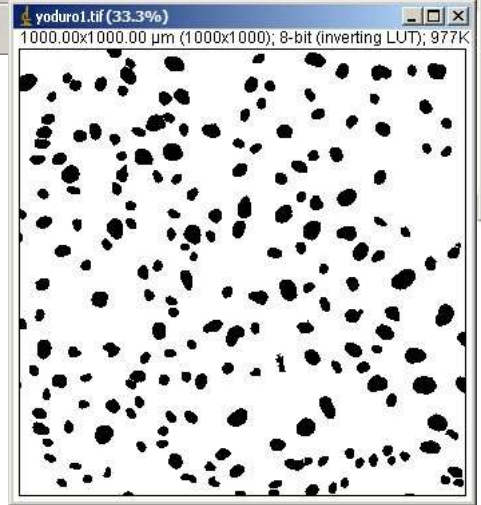
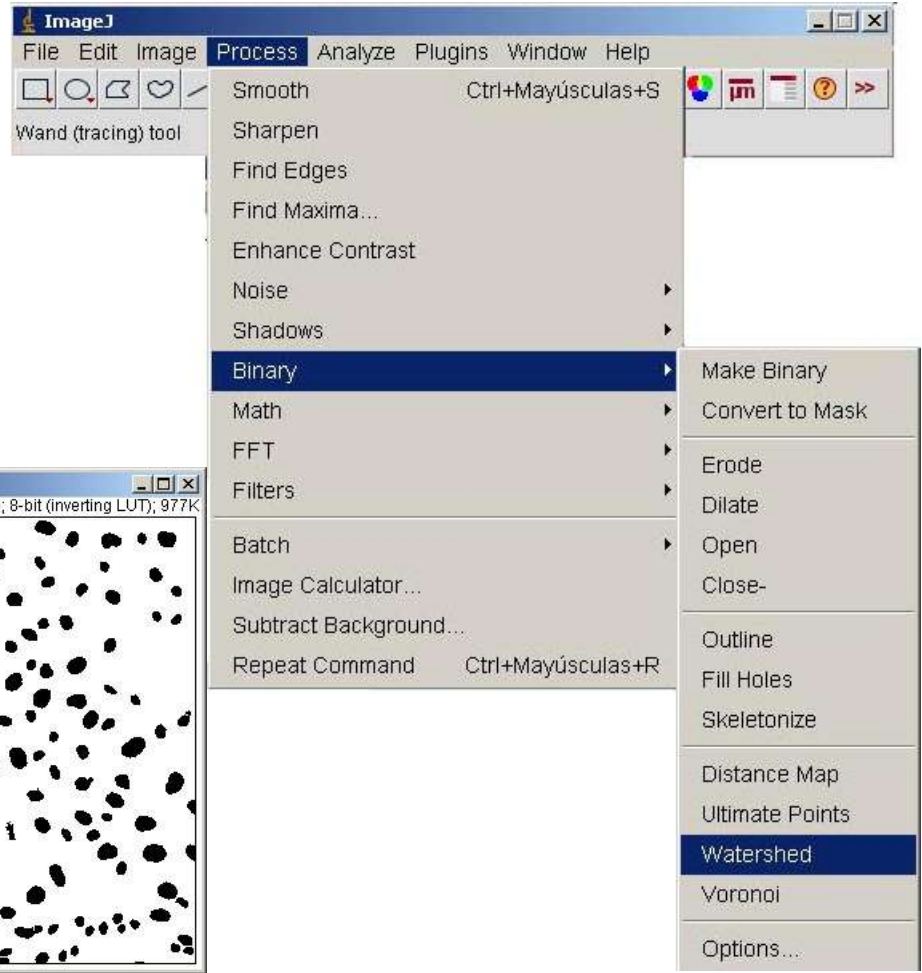
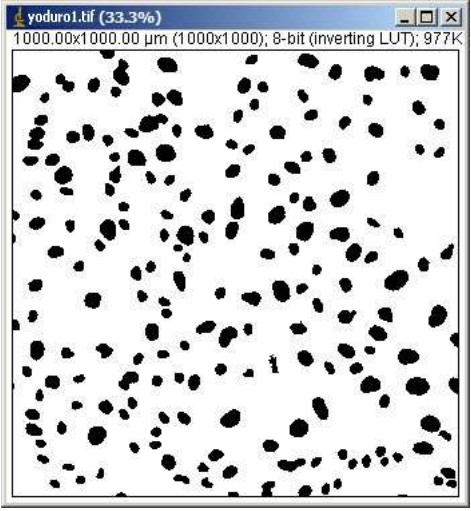
Recorder
Record: Macro Name: Macro.ijm Create ?
run("Mean...", "radius=2");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
setThreshold(40, 255);
run("Convert to Mask");

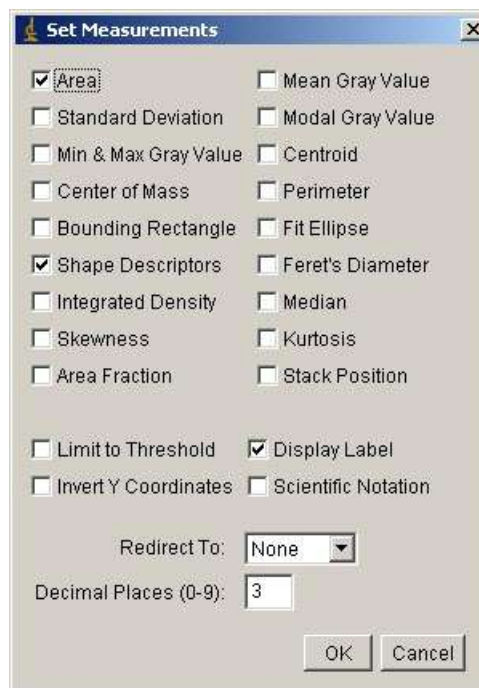
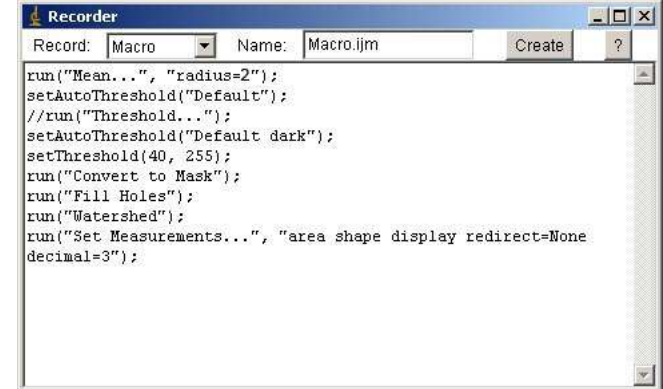
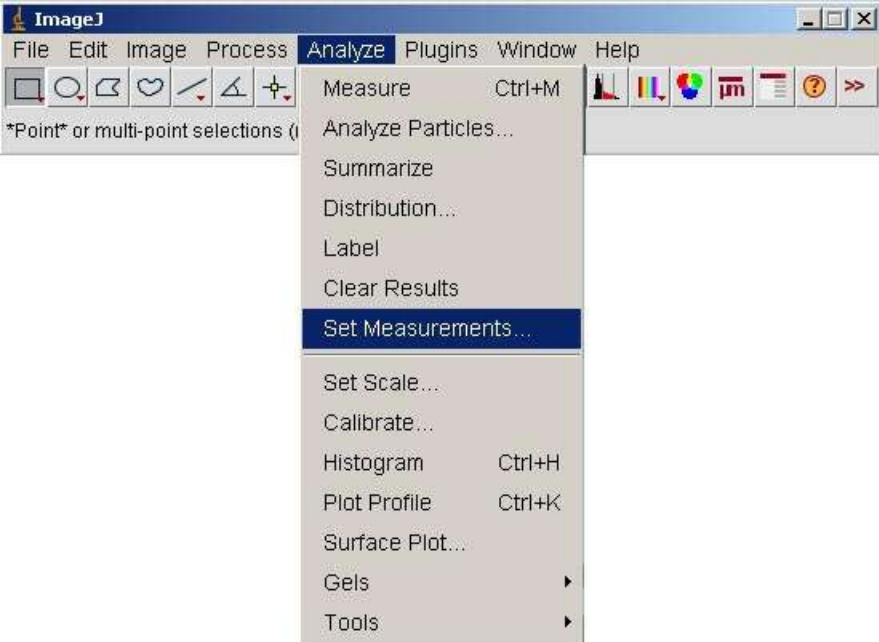
```

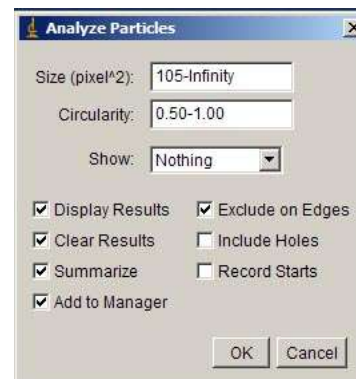
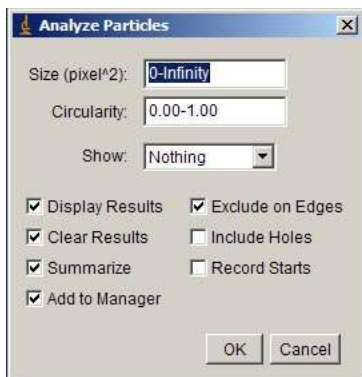
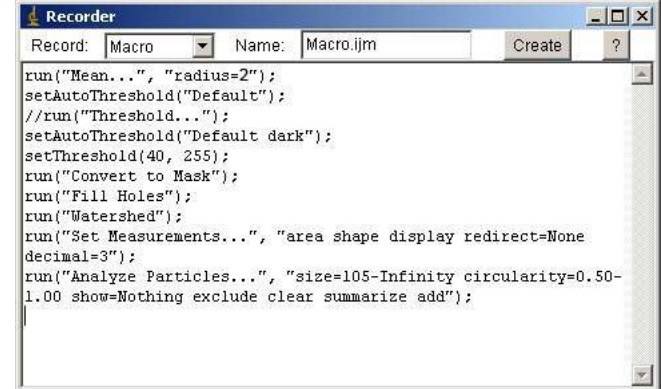
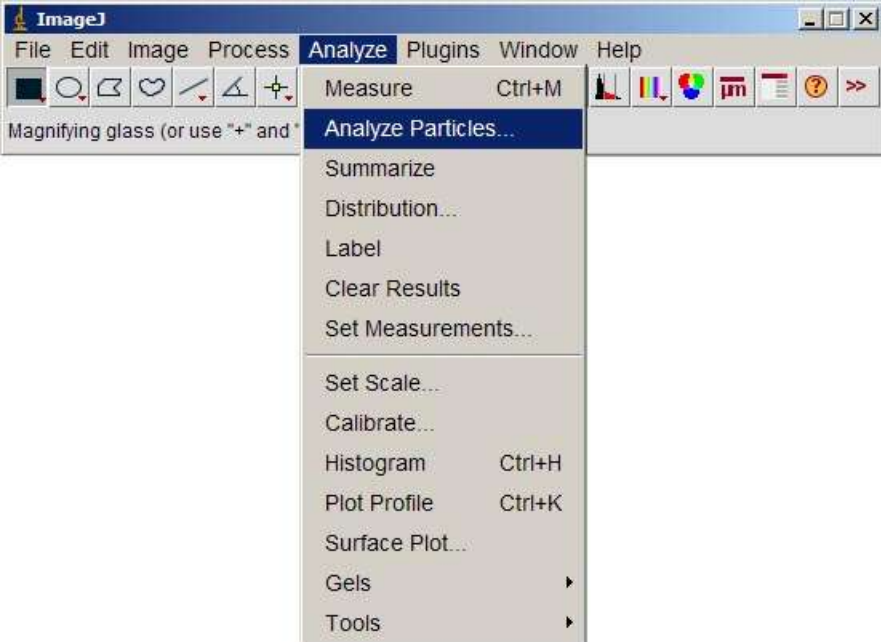


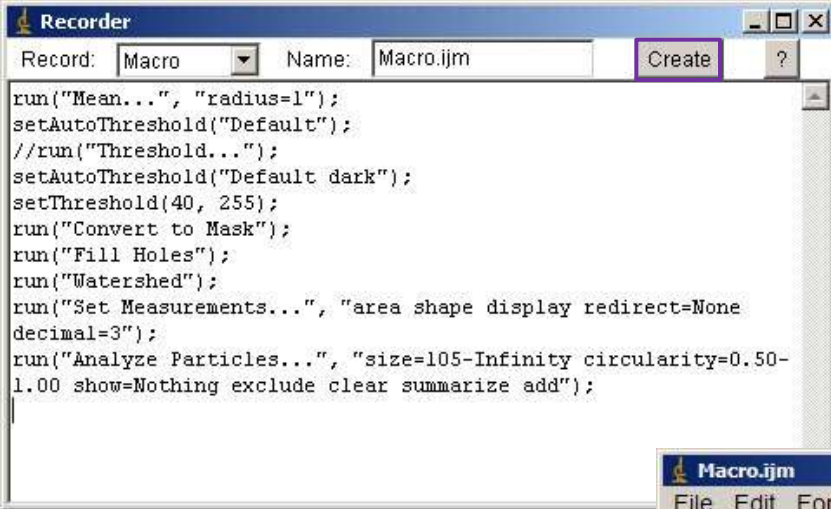


```
Recorder
Record: Macro Name: Macro.ijm Create ?
run("Mean...", "radius=2");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
setThreshold(40, 255);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
```





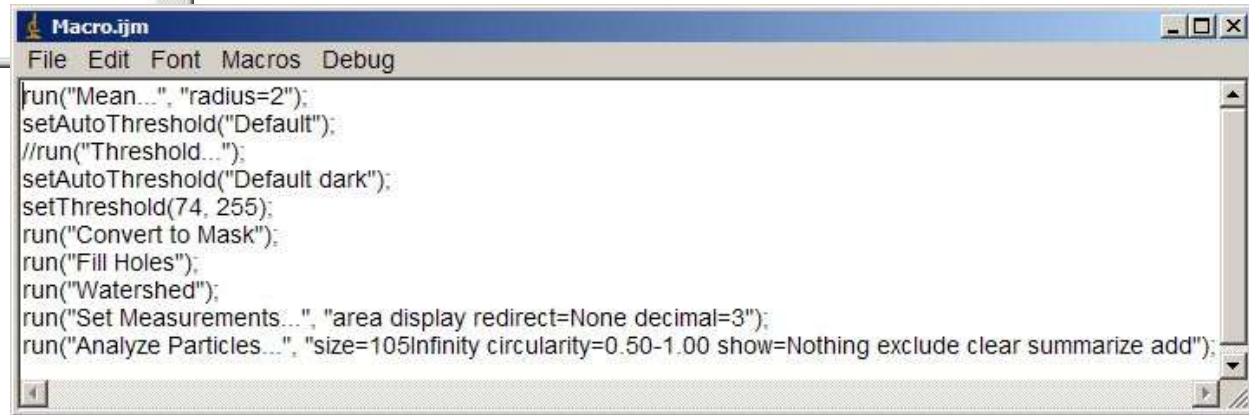




Al acabar

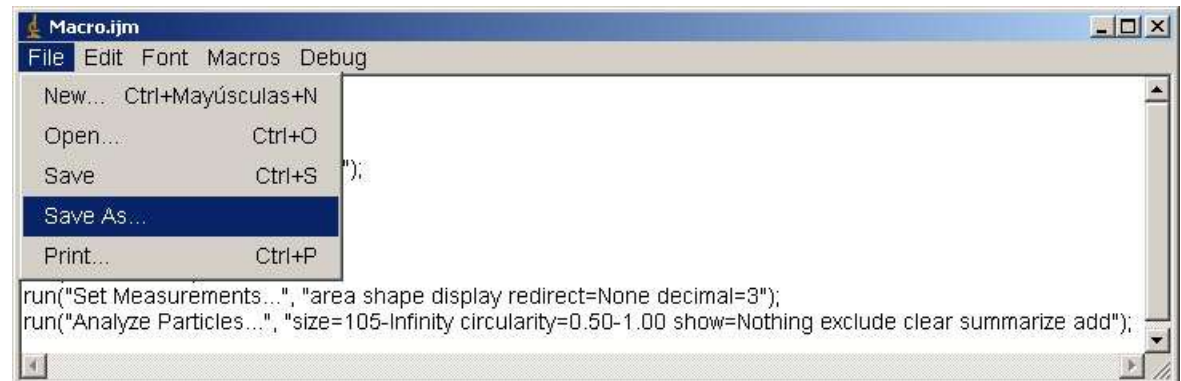
4º - Seleccionar en la ventana "Recorder", **Create**

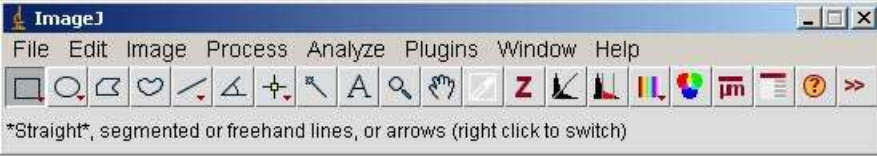
Genera una ventana de texto con el macro.



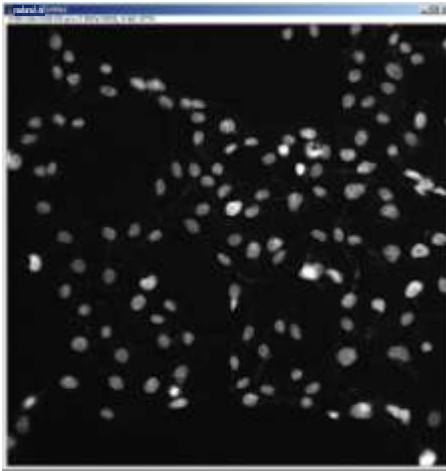
5º - Guardar la ventana "Macro.ijm".

Se puede grabar como .txt, por si se quiere modificar más adelante



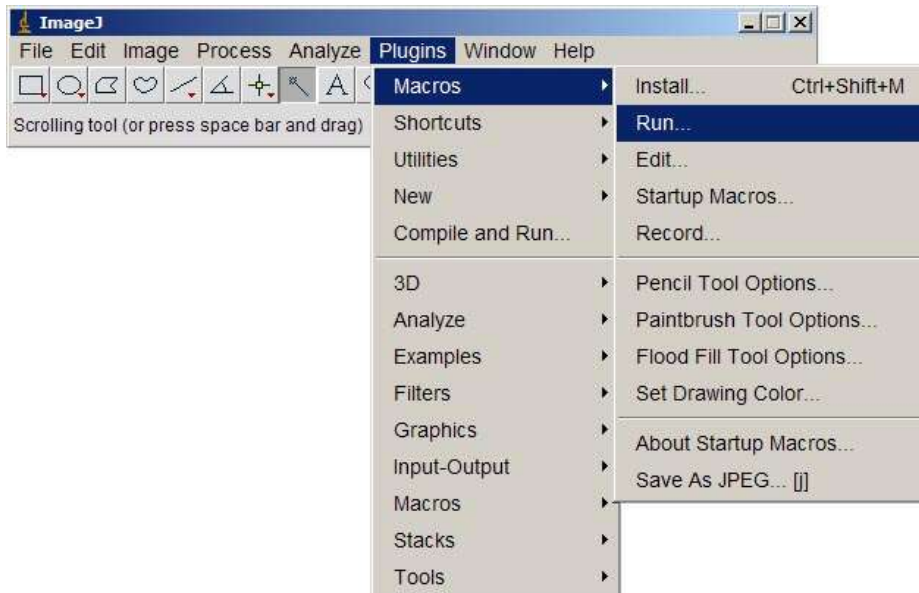


Para probar el macro.



6º - Abrir una nueva imagen

Si la renombramos antes al principio, volver a hacerlo.



7º - Seleccionar Plugins/ Macros/ Run

8º - Abrir el macro

