

Mikroskopické techniky rostlinných pletiv



(cv06) Pořizování digitálních výstupů z mikroskopických pozorování



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018

Osnova této prezentace

- Nastavení měřítka (teorie)
- Přístrojová technika pro digitalizaci obrazu z mikroskopu
- Vlastní postup digitalizace
- Další nastavení digitalizace
- Zpracování obrazových výstupů

Nastavení měřítka (teorie)

Nastavení měřítka (teorie)

4

- pro měření rozměrů na vyfocených snímcích je nutno znát měřítko (kalibrační konstantu), tj. počet $\mu\text{m}/\text{pixel}$ nebo naopak $\text{pixelů}/\mu\text{m}$
- měřítko je vždy platné pro celý soubor komponent mikroskopické techniky:
 - mikroskop
 - objektiv
 - C-mount
 - kamera
 - rozlišení snímku (zvolené při zachytávání snímku)
- pokud změníme jednu komponentu (např. objektiv nebo rozlišení ukládaného snímku), bude i jiná hodnota měřítka

Nastavení měřítka (teorie)

5

- ukázka hodnot měřítka pro různé objektivy mikroskopu Leica DM2000 a kamery Leica DFC295

Leica DM2000, DFC295 [2048 × 1536]

C-mount 0.55

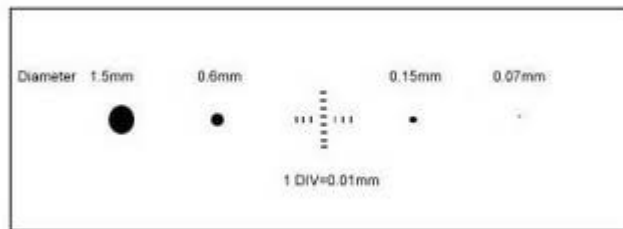
objektiv	5×	10×	20×	40×	2.5×
distance in pixels	430	343	688	684	215
known distance [um]	500	200	200	100	500
scale px/um	0,860	1,715	3,440	6,840	0,430
PastLite (dpi)	2 184	4 356	8 738	17 374	1 092

Nastavení měřítka (teorie)

6

- měřítko zjistíme pomocí kalibračního sklíčka
- na kalibračním sklíčku jsou objekty přesně definovaných rozměrů
- jejich změřením (v pixelech) zjistíme měřítko (kalibrační konstantu)

kalibrační sklíčko



Přístrojová technika pro digitalizaci obrazu z mikroskopu

Přístrojová technika pro digitalizaci

8

Technika pro digitalizaci dostupná v laboratoři ÚND

- digitální kamera **Leica DFC295** – technická specifikace

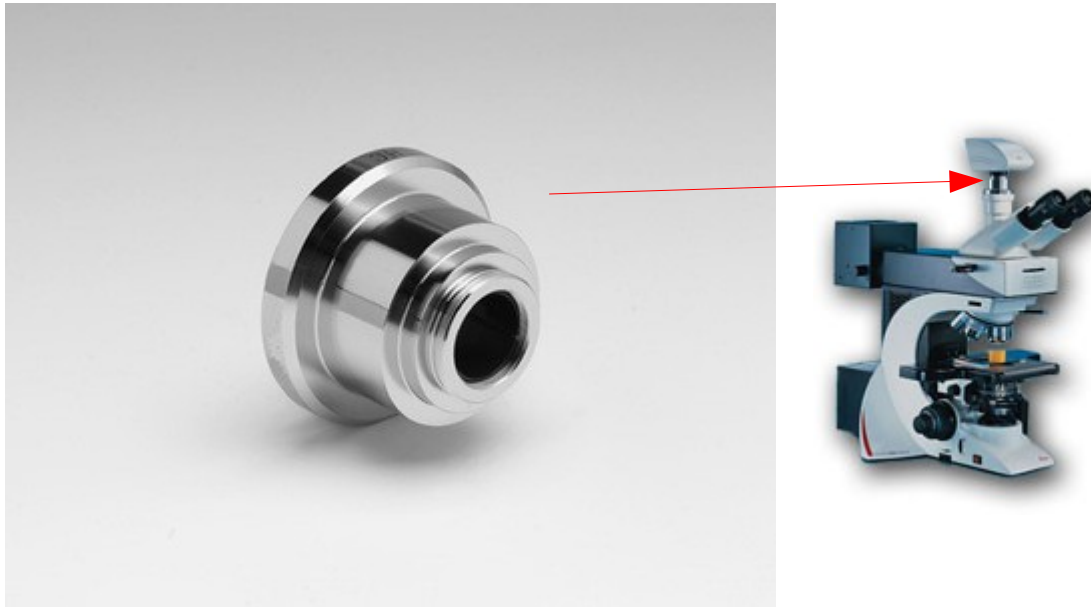
DIGITAL CAMERA	LEICA DFC295
Camera type	Digital camera for microscopy with control software
Sensor	Progressive Scan CMOS, Micron (MT9T001)
Sensor grade/size	6.55 mm × 4.92 mm (type 1/2)
Color filter	RGB Bayer mosaic
Protective color filter	Hoya CM500S (IR cut-coating filter at 650 nm)
Shutter control	Electronic rolling shutter
Number of pixels	3 Megapixel, 2048 × 1536
Max. scalable resolution (only PC)	7 Megapixel, 3072 × 2304
Pixel size	3.2 μm × 3.2 μm
Color depth	30 bit
A/D converter	10 bit
Dynamic range	> 55dB / 600:1
Readout noise	$\sigma < 1.8$ LSB (10 bit) typical
Exposure time	0.1 msec – 2 sec
Gain control / Gain	1× – 4× / 0 – 12 dB
Shading correction	Yes, stored for all formats
Region of interest	Freely adjustable in 2-pixel steps from 2 × 2 up to full resolution

Přístrojová technika pro digitalizaci

9

C-mount

- vkládá se mezi kameru a mikroskop
- různé typy dle zvětšení (0,70×, 0,55×)



Vlastní postup digitalizace

Vlastní postup

11

Spuštění TWAIN rozhraní kamery

Z libovolného programu, který podporuje skenování přes TWAIN ovladač spustíme grafické rozhraní kamery:

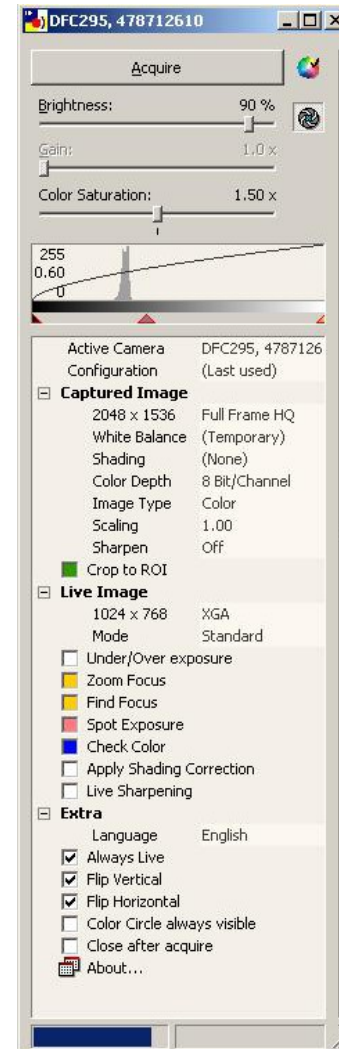
- v Irfanview: *Soubor -- Získat / Dávkové skenování...*
- v ImageJ: *Plugins – Input/Output – Scan*

Poznámka: Pokud je v PC nainstalováno více ovladačů pro různé kamery/skenery, je nutné poprvé vybrat, který chceme použít (*Vybrat TWAIN zdroj, Select TWAIN source*)

Vlastní postup

12

TWAIN rozhraní kamery Leica DFC295



Vlastní postup

13

Automatický režim

- 1) Zapneme automatické vyvážení bílé provedeme kliknutím na tříbarevnou ikonu vedle tlačítka *Acquire*.
- 2) Kliknutím na ikonu závěrky objektivu zapneme autoexpozici – program nastaví nejvhodnější dobu expozice.

U tohoto režimu lze nastavit pouze jas (*Brightness*).

Vlastní postup

14

Manuální režim

- 1) Přepneme ikonu závěrky objektivu do stavu vypnuto (nezamáčknuto). Tím vypneme autoexpozici – máme možnost manuálně nastavit expoziční čas v milisekundách.
- 2) Nastavíme vyvážení bílé
 - 1) Na místo pro vzorek vložíme bílý objekt (bílý papír)
 - 2) Při stlačení levém tlačítku myši na živém obraze roztáhneme na nejsvětlejším místě papíru rámeček (nezáleží na tvaru), po kterém se zobrazí nabídka a po kliknutí na *White Balance* se nastaví barvy.
Pokud se objeví chybové hlášení, je obraz přepálen. V tomto případě je nutné snížit úroveň osvětlení a postup opakovat.

Vlastní postup

15

Nastavení barev

- 1) Na místo pro vzorek vložíme bílý objekt (bílý papír)
- 2) Při stlačení levém tlačítku myši na živém obraze roztáhneme na nejsvětlejším místě papíru rámeček (nezáleží na tvaru), po kterém se zobrazí nabídka a po kliknutí na *White Balance* se nastaví barvy.

Pokud se objeví chybové hlášení, je obraz přepálen. V tomto případě je nutné snížit úroveň osvětlení a postup opakovat.

Další nastavení digitalizace

Další nastavení digitalizace

17

- **WHITE BALANCE:** uložení nastavení vyvážení bílé
 - zjištěné vyvážení bílé lze uložit a opětovně použít
- **COLOR DEPTH:** změna hloubky barev
- **IMAGE TYPE:** barevný nebo černobílý obraz.
- **IMAGE SIZE:** nastavení rozlišení uloženého obrazu.
- **SCALING:**interpolace tzn. dopočítávání informací o jednotlivých barvách tzn. zvýšení rozlišení.
- **SHARPEN:** po získání obrázku, program vygeneruje ostrý obraz
- **CROP TO ROI:** označení části obrazu, která bude focena
- **FORMAT:** rozlišení (pozor na měřítko!)
- **MODE:** zobrazení v okně, na celou obrazovku nebo profi obraz.
- **UNDER/OVER EXPOSURE:** při zapnutí se na obrázku ukáže, zda-li je podsvícen (modrá) nebo přesvícen (červená) – tato funkce má význam spíše u manuálního režimu.

Další nastavení digitalizace

18

- **FIND FOCUS:** program nám ukáže, jak správně je zaostřen obrázek, čím vyšší jsou hodnoty (žlutý sloupek), tím lépe je zaostřen objekt.
- aktivní.
- **FLIP VERTICAL:** otočení obrazu vertikálně.
- **FLIP HORIZONTAL:** otočení obrazu horizontálně.
- **COLOR CIRCLE ALWAYS VISIBLE:** po každém zapnutí živého obrazu se ukáže spektrum barev.
- **CLOSE AFTER ACQUIRE:** zavření živého módu po vyfocení.
- **ABOUT:** informace o programu.

Další nastavení digitalizace

19

- **SHADING:** tato funkce umožní správné rozprostření světla.
 1. Kameru odmontujeme, přidáme krytku a stiskneme „*Get Black Reference*“. Poté nás program bude informovat o výsledku, zda-li byla nastavena „tma“, pokud ne, je nutno proces opakovat.
 2. Vrátime kameru zpět a můžeme nastavit světlo a to tak, že klikneme na „*Get White Reference*“ – na ploše nesmí být žádný objekt. Jestliže proces proběhl správně, můžeme si toto nastavení uložit a vyvolávat dle potřeby.

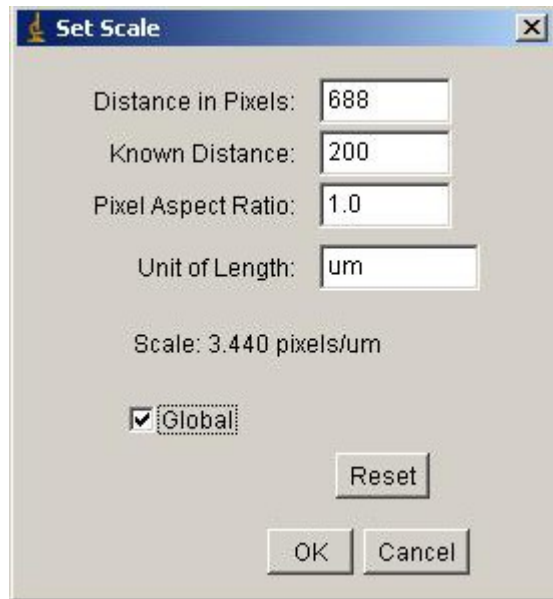
Zpracování obrazových výstupů

Zpracování obrazových výstupů

21

Nastavení měřítka (kalibrace) v programu ImageJ

- hodnoty jsou k dispozici v anatomické laboratoři ÚND
- zatržením políčka *Global* bude měřítko platit i pro další otevřené obrázky
- Tlačítkem *Reset* se kalibrace zruší

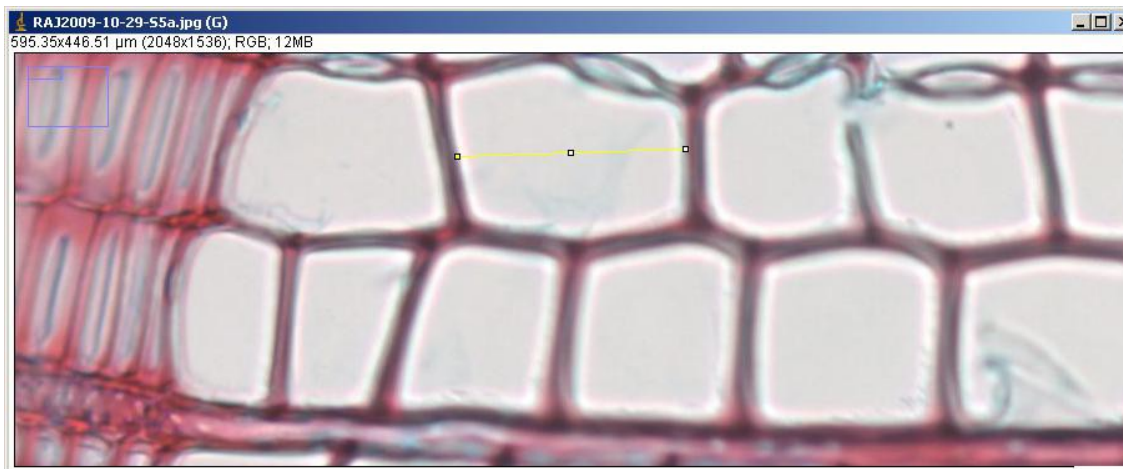


*Nastavení měřítka
pro měření*

Zpracování obrazových výstupů

22

- **ImageJ** (zdarma)
 - měření objektů na snímcích (lineární rozměry, plocha ...)
 - vložení měřítka pro účely publikování (*Analyze – Tools – Scale bar...*)
 - spojování více snímků do jednoho dlouhého (plugin MosaicJ a Turboreg)

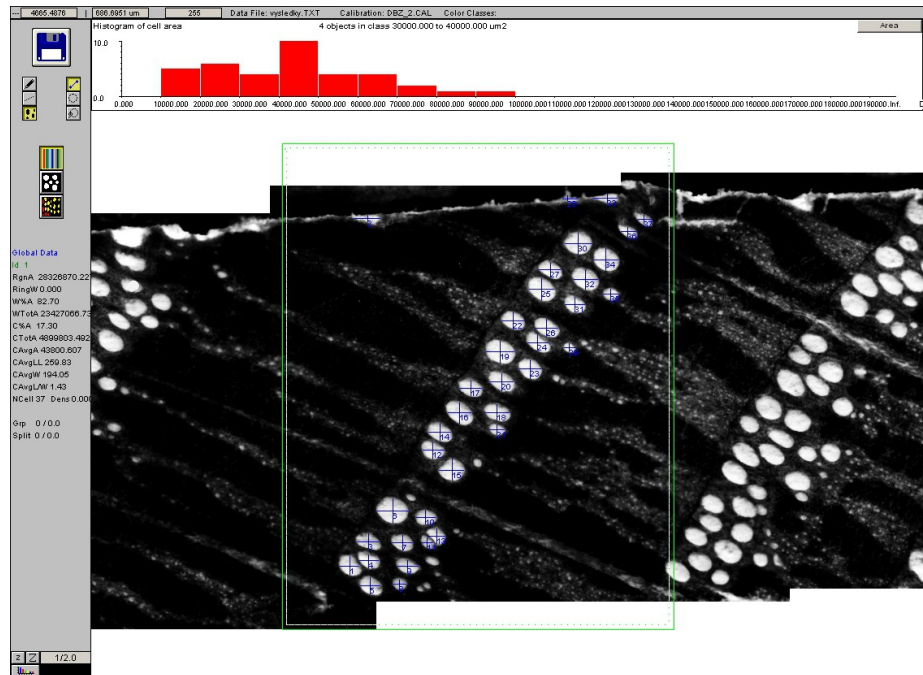


měření lumenu tracheidy na příčném řezu

Zpracování obrazových výstupů

23

- **WinCELL** (komerční aplikace)
 - specializován na měření anatomických elementů dřeva
 - automatické měření tracheid, cév



*měření rozměrů
cév na příčném
řezu*