

# 计算机数字图像分析系统在医学分子生物学研究中的应用

周俊岭 赵青 王泽仿 杨德立  
(广州第一军医大学中心实验室 510515)

**摘要** 利用计算机数字图像分析系统 (CDAS), 定量分析医学分子生物学研究中的图像资料。其鉴别准确、光密度定量精确、质量参数控制准确性好、可信度高、批间差异小。能简化研究操作步骤、缩短研究过程、并较好地解决了以往医学分子生物学研究中图像资料定量困难的难题。用 CDAS 跟踪控制基因工程药物的生产, 能减少生产步骤, 优化了提纯工艺。能有效严格的控制产品质量。

**关键词** 计算机数字图像分析 光密度定量 分子生物学

## 一、前言

计算机数字图像分析系统 (Computer Documentation Analysis System, CDAS) 是综合了高分辨率电子耦合数字成像装置 (Charge Coupled Device, CCD) 和计算机逻辑分析技术再辅以先进精密的光学系统, 能对医学分子生物学研究领域或其它研究领域中产生的图像、图形资料进行光密度分析处理、定性定量、结果输出一完整配套的仪器系统<sup>[1]</sup>。具有性能综合, 一机多用的特点。是医学分子生物学研究工作中一崭新的综合性工具。鉴于篇幅限制, 此文仅将 CDAS 的典型应用作一介绍。

## 二、仪器原理及结构和性能指标

### (一) CDAS 框图结构及工作原理

CDAS 是通过高分辨率 CCD 摄像装置将置于系统光路中 (可以是各种光源) 医学分子生物学研究或其它研究领域中产生的图像、图形资料 (也可以是其它素材的图像或照片) 以最好清晰度 (可监视、可调整) 摄取, 再将所摄取到的这幅图像以 NTSC 制式满屏逐行扫描分割成 768 × 494 个光学像素分辨点阵 (Pixels) 传输给图像处理装置 (ImageStore), 图像处理装置再以 256 级黑白灰度指标从上而下从左至右地逐点分析点阵中每点的灰度值 (或以 24bit 彩色度还原) 成像在监视器上, 此时我们在监视器上所看到的图像则是经灰度分析处理过 (或经彩色还原) 以点阵灰度值还原的数字式图像 (模/数转换)<sup>[1]</sup>。这个数字

式图像便可以传输到计算机分析系统中, 进而计算机对图像的灰度值进行用户自定义区域的分析测定、定量结果输出等一系列的处理工作。也可以将这个数字式图像存储在软磁盘中以备将来应用。如果用户只希望得到图像照片而不分析光密度值, 此系统在图像处理装置上还配有一台高灵敏度的 256 级黑白灰度照片打印机, 可以将照片打印出来, (如果配置的是彩色图片打印机, 便可以打印出精美的彩色图片)。图 1 是 CDAS 的工作原理示意图。

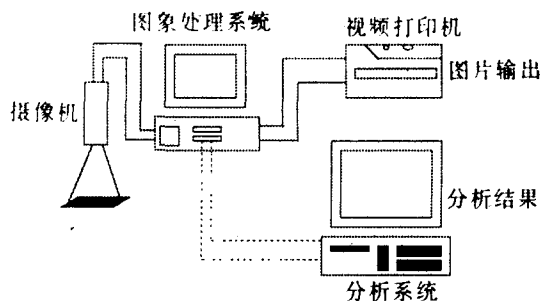


图 1 CDAS 工作原理示意图

### (二) CDAS 系统组成及部件性能指标

计算机数字图像分析系统; 紫外光/可见光/背景光源 (UVP LTD U.K.); 高分辨率电子耦合数字摄像装置 (SONY LTD, JAPAN), 8 ~ 48mm 无级变焦镜头, 光学像素分辨率 NTSC 768 × 494, 敏感度 0.06Lux/pt; ImageStore 7500 快速影像模/数转换存储装置 (UVP LTD U.K.); 彩色影像监视器 (SONY LTD, JAPAN), 分辨率 0.25mm, 1280 × 1024 逐行扫描模式; 256 级灰度感光黑白视频照片打印机 (SONY LTD, JAPAN); PC 486/66 单机工作站, Windows 3.2

平台; GBase/GBlot/GExcel/GSQ 套装分析软件包 (UVP LTD U.K.)。

### 三、应用研究

#### (一) 凝胶蛋白电泳图谱的直接分析测定

凝胶蛋白电泳技术是医学分子生物学研究中最普遍采用也是最基本的应用技术之一。利用凝胶电泳技术可以将一混合性蛋白质样品按其蛋白分子量大小排列顺序分离成单一的着色谱带。谱带的电泳迁移速度与蛋白分子量成反比, 着色的程度与蛋白浓度成正比<sup>[2]</sup>。在以往的研究中凝胶蛋白电泳图谱只作为工作

参照和资料备查, 并不能作定量分析。利用 CDAS 便可对凝胶蛋白电泳图谱进行诸如目标蛋白分子量确定、相对含量分析、绝对含量测定等定量性质的工作。作者利用 CDAS 综合分析、鉴定、跟踪控制基因工程药物——重组人粒细胞集落刺激因子 (Recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF) 的研制和生产过程。目标蛋白表达量测定准确, 跟踪优化了产品提纯工艺, 较好地控制了产品质量, 使 rhG-CSF 产品含量达到 >98%, 批间差异控制在 <0.15%。表 1 是 CDAS 对不同纯化阶段 rhG-CSF 产品质量跟踪分析结果<sup>[3]</sup>。

表 1 CDAS 光密度分析报告表

斑点 NO	B [1]		B [2]		B [3]		B [4]	
	AREA	(%)	AREA	(%)	AREA	(%)	AREA	(%)
1	43668.29	4.39						
2	53442.78	5.37						
3	51918.05	5.22						
4	47178.28	4.47						
5	69108.93	6.95						
6	43768.65	4.40						
7	60888.94	6.12	7232.54	1.70				
8	94158.55	9.46	7242.93	1.70				
9	29413.90	2.96	16541.27	3.89	866.68	0.21		
10	34423.25	3.46	13654.47	3.21	9170.40	2.27	643.90	0.23
11	47560.64	4.78	11959.61	2.81	6630.00	1.64	551.01	0.03
12	68548.46	6.89	5153.34	1.21	7622.00	1.89	1411.01	0.59
13	307372.9	* 30.89	347143.6	* 81.70	364330.3	* 90.23	386656.4	* 98.91
14	43618.38	4.38	15989.67	3.76	15153.34	3.75		

注: \* 标记项为不同纯化阶段 rhG-CSF 产品百分比含量。B [1] 为载体蛋白表达量光密度分析; B [2] 为初纯产品密度分析; B [3] 再纯产品光密度分析; B [4] 最终成品光密度分析。

作者为了验证 CDAS 定量准确性, 除应用 CDAS 对凝胶电泳结果进行分析定量外, 同时还应用 HPLC 同步对产品进行测定<sup>[3]</sup>, 两者测定结果基本一致。这说明利用 CDAS 对凝胶电泳进行定量是准确的, 测定结果是可信的。

#### (二) 基因研究中 DNA 硷基序列分析及指纹对照

利用 CDAS 结合实验室常规的 DNA 序列展开装置, 不但可以完成目标 DNA 硷基测序工作, 还能将两组同时展开的 DNA 硷基序列进行指纹比较。或从计算机基因指纹库中提取 DNA 硷基序列进行比较, CDAS 能辨别出硷基排列顺序及有变异的位点。CDAS 虽然不能象 DNA 自动测序仪那样能省却样品处理的麻烦但其低价位高性能的特点 (价格仅是 DNA 自动测序仪的 1/10) 同样决定了它依然不失为分子生物学研究工作中 DNA 序列分析崭新的优异工具。表 2 是我们利用 CDAS 对凝胶电泳展开的 DNA 片段核苷

酸序列分析及指纹对照的结果。

CDAS 测序采用的依然是较大多数研究者所采用传统 Sanger 或 Maxium-Gilbert 方法<sup>[4]</sup>, 但它要比这些传统方法有更明显的优点, 因为 CDAS 能在紫外光下直接扫描阅读具有荧光的硷基斑点, 所以在进行测序酶标记反应时可以采用荧光标记物而不必采用有放射性污染的同位素。这样就克服了放射自显影操作中同位素所造成的环境污染。

#### (三) 参照标准蛋白及 DNA 分子量的计算机拟合

CDAS 能在无对照外标的情况下利用参照标准, 根据相同条件下相同分子量电泳迁移率相同的理论<sup>[5]</sup>, 精确拟合计算出凝胶电泳所分离的目标蛋白或 DNA 的分子量。这也是 CDAS 非常突出的特点功能之一。凝胶电泳成像后, CDAS 可根据用户需要对参照标准电泳区带和目标物电泳区带进行区域跟踪, 确定统一起始点后逐个 Pixels 地精确测量每一斑点迁移

率, 通过 CDAS 的 GelBase/GelExcel 软件精确计算描绘出参照标准区带的斑点迁移率曲线。然后使用曲线

回归逐点拟合方式, 求出回归方程, 进而拟合计算出目标物的分子量。

表 2 CDAS 测序分析结果报告

** PRINT OUT COMPARISON OF SEQUENCE FILES **				
<i>File # 1: compare1. vid</i>				
AGCTCGAGCA	TGGCCCTAGG	AGATCTCAGC	TGGACGTCCG	TACGTTCGAA
GGACCACCGG	CATGCCCTA	GCTTGGGCGC	TGGAACCGCA	ATAGTCGTGG
TGCGAGATTG	GTTGACTGA	TTGCCCGGAT	ATCACTCAGC	ATAA
<i>File # 2: compare2. vid</i>				
AGCTCGAGCA	TGGCCCTAGG	AGATCTCAGC	TGGACGTCCG	TACGTTCGAA
GGACCACCGG	CTAGGCCCTA	GCTTGGGCGC	TGGAACCGCA	ATAGTCGTGG
TCGAGATTGG	TTGACTCGAT	TGGCCGATA	TCAGCTCAGC	ATAA
<i>Comparison :</i>				
AGCTCGAGCA	TGGCCCTAGG	AGATCTCAGC	TGGACGTCCG	TACGTTCGAA
AGCTCGAGCA	TGGCCCTAGG	AGATCTCAGC	TGGACGTCCA	TACGTTCGAA
	AT			
GGACCACCGG	C GCCCCTA	GCTTGGGCGC	TGGAACCGCA	ATAGTCGTGG
GGACCACCGG	C GCCCCTA	GCTTGGGCGC	TGGAACCGCG	ATAGTCGTGG
	TA			
G				
T CGAGATTG	GTTGACTCGA	TTGCCCGGAT	ATCA CTCAG	CATAA
T CGAGATTG	GTTGACTCGA	TTGCCCGGAT	ATCA CTCAG	CATAA
			G	

(四) 图像中不规则图形光密度定量分析

在分子生物学研究中特别是在疾病的基因诊断中, PCR 结合同位素标记的寡核苷酸探针检测技术 (PCR-ASO) 多被用于检测目标 DNA 碱基序列突变情况。是基因诊断疾病的一重要方法<sup>[4]</sup>。准确计算 PCR-ASO 结果硝酸纤维素膜或尼龙膜印迹斑点的光密度值, 一直是困扰着研究者的问题之一。CDAS 的应用可圆满解决此问题。

CDAS 可将 PCR-ASO 印迹斑点进行 CCD 成像, 然后按用户的需要对指定斑点进行光密度值分析、对照 (用户指定区域可以是任意形状), 进而 CDAS 可根据用户的要求进行结果计算、输出; 在基因工程药物研制中等电聚焦电泳是用来鉴定蛋白纯度的一种方法<sup>[5]</sup>。等电聚焦电泳所得结果并不像凝胶电泳结果那样有区带规律, 它只有大概区域内的斑点。这些斑点的光密度分析 CDAS 也同样能非常容易的进行分析定量处理。CDAS 的这一功能还可以应用到显微镜或电镜成像的细胞内某一部位光密度的定量分析。

(五) 讨论

CDAS 是近年来才应用于分子生物学研究领域的新技术, 它将光学成像系统与计算机工作站及强大的集成分析软件有机的结合在一套系统中, 对凝胶电泳产生的分离结果进行一次性扫描成像, 通过计算机的分析逐个确定区带斑点的光密度值, 进行阅读、对照、定性、定量分析, 最低感度可达到蛋白 0.02ng, DNA0.05ng。克服了凝胶电泳结果分析中定量难、

DNA 碱基序列分析阅读对照难的缺点, 使凝胶电泳分析达到了一个新的水平。

CDAS 的综合性设计、一机多用、量化指标的突出特点给从事分子生物学研究工作的人员提供了很大帮助。纵观 CDAS 的性能及用途, 其较为突出的特点功能有 5: (1) 凝胶电泳快速成像及电泳区带斑点光密度定量分析; (2) 凝胶电泳展开 DNA 碱基序列的快速成像、阅读和指纹对照; (3) 标准蛋白电泳迁移率曲线制作及目标蛋白的分子量拟合计算; (4) 对照标准下蛋白或 DNA 的准确定量测定; (5) 不规则图形光密度定量分析。另外, 经 CDAS 处理产生的图像和分析结果均能做到计算机的多向兼容, 这样就为使用人员提供了计算机直接引用等诸多方面的方便。根据作者在实际工作中对 CDAS 上述特点功能逐项印证的情况。作者认为: CDAS 作为分子生物学研究中一种综合性应用工具有其十分优秀的特点。尤其是 CDAS 的强大计算机工作站不但能满足 CDAS 的使用, 而且能用于像处理文字、网络交流、图像处理、科研管理等诸类方面的工作。

实验中作者用基因工程药物 rhG-CSF 进行了 HPLC 层析法与 CDAS 分析法的对照比较, 比较结果 CDAS 分析法较 HPLC 法略微偏低  $0.05 \pm 0.03$ , T 检验结果没有明显差异。所以说, CDAS 作为基因工程药物生产中产物鉴定及质量控制, 方法先进、操作简便、结果准确。用 CDAS 阅读、对照凝胶电泳 DHA

(下转 40 页)

低压电源 +5V 和  $\pm 12V$  是否正常, 在低压电源正常后, 用示波器分别逐级测试 AD 518 和 AD 533 的输入、输出信号的波形和频率, 通过比较其输入和输出信号的波形和频率, 即可准确确定故障点。如果是器件损坏, 更换相同型号的器件。如果上述测试均正常, 就进行第二步检查。

第二步: 检查控制信号, 测试电子开关电路。首先启动仪器 (不开高压) 将仪器的测试状态调至 PC 探测器测量, 这时各开关电路正确的控制信号应是: 晶体选择为低电平, PC/SC 选择为低电平, 2nd/1st 为高电平, D/S 选择为高电平, 确认控制信号正常后, 从最后一级开关电路开始取下该电路上 MC 14016 的短接线, 同时观察计数管的计数情况, 如出现计数状况与故障现象一致, 即为故障点, 并进一步确定是元器件损坏还是其它原因, 针对不同的情况进行相应的处理。

第三步: 经过前两步的检查和处理后, 就可保证 ALC 单元工作正常。之后, 我们用一标准物质对 PC 探测器和 SC 探测器各自测量时的计数精度进行校正后, 仪器就可进行正常的样品测试。

以上对 PC 探测器和 ALC 运算放大单元故障的诊断和处理, 是我们在工作中的体会。当仪器出现故障时, 为了准确查出故障原因, 应反复分析故障现象, 认真研究和理解电路原理, 做好现场记录, 才能以较为合理的方法和步骤来诊断故障和排除故障。

#### 参 考 文 献

- [1] X-RAY FLUORESCENCE SPECTROMETER INSTRUCTION MANUAL.
- [2] 美国莫托洛拉公司 CMOS 集成电路特性与应用手册。

## Trouble Analysis and Maintenance of XRF Spectrometer

Yao Xiangdong Chang Jianping Li Yinxiang

(Wuhan University Technology Testing center 430070)

**Abstract** The principle and construction of 3063 XRF - Spectrometer's PC detector and ALC unit circuit are introduced. The trouble of analysis and maintenance in the two parts are described.

**Key words** detector electronic switch

(上接 38)

展开硷基序列与有经验的硷基阅读对照人员所得结果完全一致, 而 CDAS 则更快速、更准确。这说明 CDAS 同样也是基因研究工作中不可多得优秀工具之一。CDAS 的凝胶电泳分子量拟合确定和不规则图像资料的分析则更能为分子生物学研究增加活力。

#### 参 考 文 献

- [1] 周俊岭, 方向东, 马骊等. 《凝胶图像光密度分析系统控制基因工程药物质量的应用研究》. 第一军医大学学报,

1997, 17 (1), 59—60

- [2] 孙志贤, 汲言山, 王升启等主编. 《现代生物化学理论与研究技术》. 北京: 军事医学科学出版社, 1995, 399—404
- [3] 周俊岭, 方向东, 马骊等. 《重组人粒细胞集落刺激因子生产中质量控制方法的研究》. 中国生化药物杂志. 1997, 18, (6) 1—4
- [4] 伍新尧, 罗超权, 杨英浩编著. 《基因诊断原理与临床》. 广州: 中山大学出版社, 1995, 8—55
- [5] 吴梧桐, 丁锡申, 刘景晶编著. 《基因工程药物—基础与临床》. 北京: 人民卫生出版社, 1996, 23—28

## Application in Medical Molecular Biology by Computer Documentation Analysis System

Zhou Junling Zhao Qing Wang Zefang Yang Deli

(Center Laboratory, The First Military Medical University Guangzhou 510515)

**Abstract** We have used the method quantitative analysis documentation in Medical molecular biology by CDAS (Computer Documentation Analysis System). The results discriminate was accurate.

**Key words** CDAS density analysis molecular biology