

## 数字化图像技术测量凝胶电泳蛋白质含量的三种方法比较

吴建春\* 雷国华\*\* 李俊诗\*\* 马安德\*\*

(\*南方医院儿科,\*\*中心实验室,第一军医大学 广州 510515)

**摘要** 本文基于光密度测量原理,在考虑了凝胶电泳图像数字化过程中照射光源强度、凝胶背景、摄像机等参量对蛋白质含量计算结果的影响后,提出了凝胶电泳蛋白定量测量的改进公式和实验方法,并与目前使用较多的灰度积分法、灰度积分拟合法进行了实验比较。结果显示,改进公式所得结果更接近真实值、标准差更小、且不受凝胶背景变化的影响。

**关键词** 凝胶电泳 光密度 定量分析 数字图像

## 1 前言

生物大分子的定量分析是生物医学领域的一项重要技术。电泳由于其操作简单而广泛应用于蛋白、核酸物质的检验。通常电泳是根据染色后所显示的区带来判断所检测的物质是否存在。随着光电检测技术、计算机技术和图像处理数字化技术发展普及,通过数字化电泳图像分析电泳物质的含量的方法已逐渐得到应用。很多商业电泳仪增加了电泳定量分析的内容<sup>1,2,3</sup>。凝胶蛋白电泳分析是最普遍的一种实验方法。但由于蛋白质染色后,常有一些染料滞留于凝胶中形成背景着色。因此,在定量分析过程中,如何去除背景的影响,对于定量分析结果的准确性有重要意义。本文从凝胶电泳定量分析的基本原理出发,在考虑了照射光源强度、凝胶背景、电荷耦合器(CCD)等因素后,提出通过数字化图像分析凝胶电泳蛋白质含量的改进公式和实验方法,并通过实验比较了目前几种不同处理方法的测量结果。

## 2 材料和方法

## 2.1 材料

SDS-PAGE 凝胶(浓缩胶、分离胶浓度分别为5%、15%、胶厚 1.0mm)、考马斯亮蓝 R-250(Sigma, USA),染色及脱色程度参照文献<sup>1</sup>;牛血清白蛋白(Sigma, USA)分别配制浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4mg/ml 液体,同一块凝胶的每孔均加样 20 $\mu$ l;恒流电泳仪:300Xi,200/2.0, Mini2-D 垂直凝胶电泳槽(Bio-Rad, USA),浓缩胶电流为 20mA,分离胶电流 25mA。凝胶电泳图像数字化仪为 GDS7500(UVPInc., Eng-

land), SONY CCD 摄像机,256 灰度级,分辨率 600 $\times$ 480,可见光源,所有图像的获取均在 CCD 前加设 595nm 带通滤波片(带宽 30nm)<sup>3</sup>。

## 2.2 凝胶图像分析方法

## 2.2.1 积分灰度值方法

目前国内使用较多的凝胶电泳测量仪器为英国 UVP 公司 GDS7500(或 8000 型),其定量分析软件考虑了凝胶背景对计算的影响,采用如图 1 所示的人工操作确定背景基线方法,根据凝胶中不同区带蛋白的积分灰度值 IPI(Integrate Pixel Intensity)面积,比较各个区带的蛋白含量(Q),如已知  $Q_1$  和  $IPI_1$ 、 $IPI_2$

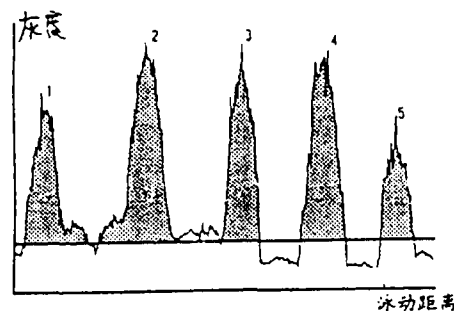


图 1 直接灰度积分法去背景示意图

图中所标记的数字代表各个区带,阴影区域为灰度积分面积

(待测蛋白积分灰度值),则  $Q_2 = IPI_1 \times Q_1 / IPI_2$ 。

## 2.2.2 积分灰度拟合法

美国国立卫生研究院(U.S National Institutes of Health, NIH)开发的图像软件 NIH Image(Version1.67)考虑了不同区带的背景差异,而采用区带电泳背景渐进去除法(图 2 所示)。它所采取的定量方法是根据已知蛋白质质量及其对应的凝胶电泳积分灰度值,给出了一个拟合方程(通常为曲线方程),然后把待测蛋白区带的积分灰度值带入拟合方程,得出蛋白

• 作者简介:吴建春,女,1965 生,第一军医大学南方医院儿科讲师、主治、细胞生物学博士。

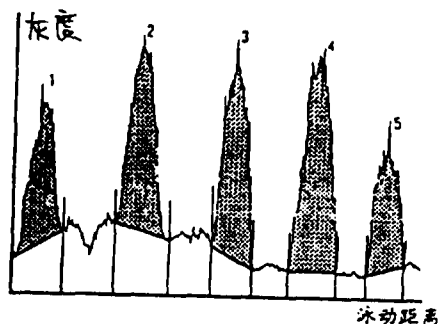


图2 拟合灰度积分法去背景示意图  
阴影区域为灰度积分面积

的含量。2.2.3 本文提出改进公式

在不考虑凝胶电泳背景的情况下,通常的蛋白质含量计算采用积分光密度法,通过测量蛋白质区域的透射光和光源强度,计算出蛋白质的IOD(Integrated Optical Density)<sup>3,4,5</sup>,其计算公式为:

$$IOD = \int OD ds = \int \lg \frac{I^0}{I_p} ds = \int \lg \frac{G_0}{G_p} ds \quad (1)$$

公式中的S代表蛋白质区域, $I^0$ 、 $G_0$ 为光源强度及相应的灰度值, $I_p$ 、 $G_p$ 为蛋白质区域的透射光强及相应的灰度值。当考虑凝胶背景后,需要对该公式进行修下。

我们定义空白条件下(光源直接照射)摄像机CCD所获得的数字图像的某一点的灰度值为 $G_0$ (对应光源强度 $I_0$ );无凝胶吸收时,蛋白质的透射光强为 $I_p$ 。

由于凝胶电泳样品中的凝胶对入射光有吸收作用(主要来源于凝胶中的未结合的染料)。因此,蛋白质区域的透射光强度与蛋白质区域内的蛋白质吸收和凝胶吸收有关。假设凝胶电泳图像的背景(不含蛋白质的凝胶区域)灰度值为 $G_B$ (对应背景透射光强 $I_B$ ),电泳蛋白质区带上某一点的灰度值为 $G_C$ (对应该点的透射光强 $I_C$ )。根据光吸收定律,凝胶中蛋白质区域的吸收光=蛋白质吸收光+凝胶吸收光,因此有: $I_0 - I_C = (I_0 - I_p) + (I_0 - I_B)$ ,则 $I_p = I_0 + I_C - I_B$ ,通常摄像机CCD把光信号转变成电信号时(灰度G),两者成线性正比关系<sup>4</sup>,则有 $G_p = G_0 + G_C - G_B$ ,把该关系代入公式(1)可得:

$$IOD = \int \lg \frac{G_0}{G_0 + G_C - G_B} ds \quad (2)$$

公式(2)即为去除凝胶背景后的蛋白质相对含量的计算公式。应用该公式要求拍摄凝胶电泳图像时,稍微扩大一些成像视野,使凝胶以外的空白区域(光源)进入摄像范围,以获得 $G_0$ 值。每一区带的背景 $G_B$ 取靠近该区带的空白区域的平均灰度值。

### 3. 结果

积分灰度方法:在一块电泳中加入 $2\mu\text{g}$ 的牛血清白蛋白,以获得其积分灰度值。然后在另一块电泳中加入待测牛血清白蛋白( $3\mu\text{g}$ ),并以根据 $2\mu\text{g}$ 的蛋白电泳灰度值,按前述式计算出结果。共测量5块相同蛋白含量凝胶图像。积分灰度拟合法:在一块凝胶中的不同泳道中加入含量2、4、6、8 $\mu\text{g}$ 的牛血清白蛋白。按前述方法中去除背景,获得蛋白含量与积分灰度积分值的拟合曲线(二次曲线拟合),然后在另一块电泳上分别加入待测的牛血清白蛋白( $3\mu\text{g}$ ),通过拟合曲线换算出测量结果。选取与积分灰度值法相同的5块凝胶测量。改进公式:在一块电泳中加入 $2\mu\text{g}$ 的牛血清白蛋白,然后在另一块电泳中分别加入待测牛血清白蛋白( $3\mu\text{g}$ ),并根据 $2\mu\text{g}$ 的蛋白电泳灰度值,按公式(2)计算所测结果。选取与积分灰度值法相同的5块凝胶测量。

表1为三种方法的测量结果。从表中数据可以看出,随着凝胶背景强度的增加,测量结果与真值相比有增大的趋势,5次测量平均值为 $2.52\mu\text{g}$ ,平均相对误差16%[相对误差=(真值-测量平均值)/真值];积分灰度拟合法所得的测量值随着背景灰度增加而测量误差逐渐增大,这是因为拟合曲线的测量条件是在背景很小的情况下取得的,当待测样品的背景较大时,测量结果误差较大,5次实验的平均值 $2.80\mu\text{g}$ ,平均相对误差6.7%;改进方法所得到的结果与实际值最接近,且受凝胶背景变化的影响较小,5次实验的平均值为 $3.00\mu\text{g}$ ,平均相对误差1.3%。

表1 三种测量方法的比较  
(待测蛋白含量 $3\mu\text{g}$ )

| 平均背景 | 三种测量方法结果( $\mu\text{g}$ ) |       |       |
|------|---------------------------|-------|-------|
|      | 灰度积分法                     | 拟合曲线法 | 改进方法  |
| 20   | 2.54                      | 2.95  | 3.06  |
| 26   | 2.43                      | 2.80  | 2.90  |
| 30   | 2.35                      | 2.76  | 2.84  |
| 34   | 2.42                      | 2.70  | 3.15  |
| 38   | 2.32                      | 2.68  | 3.07  |
|      | 2.41*                     | 2.78* | 3.00* |

### 4 讨论

凝胶背景是凝胶染色过程中不可避免的,它主要来源于凝胶中的滞留蛋白质以及凝胶本身对光的吸收,因此,影响基于光强测量的蛋白质定量

分析结果。

UVP 公司的软件处理方法直接以灰度计算物质含量。但图像的灰度值与入射光强和染料物质本身对光的吸收有关,因此需要考虑这两方面的因素。灰度积分法只能定性地给出物质含量的判断。例如,同一凝胶中某一区带的灰度积分值为另一区带的二倍,只可以说前者泳带的蛋白比后者多,而不能得出前者质量即是后者的二倍的结论。此外,采用用统一基线去除背景,只有背景均一的情况下才适合,而当背景强度不均匀的情况下,这种去除背景的方法会产生较大的误差。

NIH Image 所采用的方法与实际情况符合较好,但其适用范围受到限制。由于它所得到的拟合曲线方程是在特定的光源条件下获得的,因此,只有所检测的样品电泳图像在与得到拟合曲线的条件一致才有意义。否则,必须根据不同的实验条件重新获得拟合曲线。因此,这种方法限制了不同凝胶电泳仪所获得图像的测量结果的比较。

本文所提出的修正公式中,包含有光源强度、凝胶背景、凝胶区带灰度,因此,该公式对于同一凝胶样品使用不同仪器(或仪器参数)所测量结果是一样的,具有普遍的应用性。例如,当光源强度(或摄像机光圈)增加一倍的情况,所测量的光源强度  $G_0$ 、凝胶背景强度  $G_B$ 、电泳区带强度  $G_C$  均增加一倍,根据公式

$$\begin{aligned} IOD &= \int \lg \frac{2G_0}{2G_0 + 2G_C - 2G_B} ds \\ &= \int \lg \frac{G_0}{G_0 + G_C - G_B} ds \end{aligned}$$

两者结果相同。此外当凝胶对入射光没有吸收时(即无吸收时),  $I_B = I_0 (G_B = G_0)$ , 公式(2)可还原

成公式(1)。

凝胶电泳的染色物质很多,大致可分为两类,一类是普通的化学染料,如考马斯亮蓝、银染、铜染;另一类为荧光染料。这两类染料的染色原理不同,前者是染料与电泳物质结合,而导致所染色的电泳物质光密度发生变化,通过测量凝胶高密度获得电泳物质含量;后者是通过染料与电泳物质结合,但染料本身的发光性质不改变,所测量的是染料的荧光强度,同一凝胶中的不同电泳区带的质量与其灰度积分值成正比<sup>6</sup>。如 EB 染色的 DNA 电泳区带,可以直接用区带电泳灰度值来表示。因为,核酸的量与染色的电泳的染料质量成正比,而在一定染料浓度范围内,染料发射的荧光强度与染料质量成正比,  $I = I_0 kdc$  ( $c$  为核酸浓度)。在灰度与入射光强成正比的情况下,有  $m = G_0 kdc$ , 因此,两种 DNA 区带的灰度积分值之比等于其质量之比 ( $m_1 : m_2 = G_1 kdc_1 : G_2 kdc_2 = C_1 : C_2$ )。

#### 参考文献

1. 郭尧君. 蛋白电泳实验室技术. 北京: 科学出版社, 1999年, 第一版, P105
2. B. D. KP 哈密斯, D. 李克伍德. 蛋白质的凝胶电泳: 实践方法, 北京: 科学出版社, 1986, 18~35
3. 王广忠等. 激光光密度扫描仪的研制. 中国医疗器械杂志, 1996. 20(3): 149,
4. Kendrick NC, Jonanson JJ, Lee Pr et al. Optimization of an HP scanjet for quantification of protein electro-phoresis gels. Analytical Biochemistry, 1994, 219: 297
5. 汤耀法. 光密度测定的稳定性以及有关参数的综合测定. 上海医科大学学报, 1997, 24(1): 75~76
6. Haselgrove JC, et al. A rapid, inexpensive, quantitative, general-purpose densitometer and its application to one-dimensional gel electrophoretograms. Analytical Biochemistry, 1985, 150(2): 449

### Comparison of three methods in quantitative protein analysis with gel electrophoresis digital images

Wu Jianchun\* Lei Guohua\*\* Li Junshi\*\* Ma Ande\*\*

(\* Department of Pediatrics, Nafang Hospital, \*\* Central Laboratory, First Military Medical University Guangzhou 510515)

**Abstract** On the basis of the principle of optical density, and considering of the influence of intensity of light source, background of gel and parameters of CCD, we propose a modified formula and an experimental method for quantitative protein analysis of digital images of gel electrophoresis. The three methods(integrated pixel method, fitting curve integrated pixel method and modified background method) were compared in analysis experimental electrophoresis images, and the modified method was better than the other methods.

**Key words** Gel electrophoresis Optical density Quantitative analysis Digital image