

УДК 621.397.13

Н.П.Корнышев

ТЕЛЕВИЗИОННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ДНК ПО ИЗОБРАЖЕНИЯМ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ ПРОДУКТОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ГЕЛЯХ

Новгородский государственный университет им. Ярослава Мудрого

In the article it is considered the possibility of increase of evaluation precision of conditional volume of a three-dimensional figure which borders are defined by the form of the video signal received at scanning of the image by the analyzing aperture of the transferring device of television system. It is shown, that increase of accuracy of estimate can be reached by the account of a part of the three-dimensional figure which is being below a threshold of quantization on the basis of a volumes similarity principle.

Одной из наиболее важных задач при молекулярно-биологических исследованиях с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) является оценка количества ДНК, содержащейся в люминесцирующих фрагментах, полученных в результате электрофоретического разделения продуктов ПЦР в гелях [1]. Для этого может быть использован известный телевизионный метод определения условного объема вещества [2]. В соответствии с ним количество ДНК M пропорционально интенсивности J свечения фрагмента и определяется выражением

$$M = f\left(\sum_{k=1}^n J_k\right),$$

где n — количество пикселей во фрагменте, а J_k — интенсивность пикселя. Ниже рассматривается возможность повышения точности оценки условного объема трехмерной фигуры, границы которой определяются формой видеосигнала, получаемого при сканировании изображения анализирующей апертурой передающего устройства телевизионной системы.

Рассмотрим переходную характеристику передающего устройства телевизионной системы [3,4].

На рис.1 показано нарастание сигнала на выходе передающего устройства при перепаде освещенности $(E - E_\Phi)$.

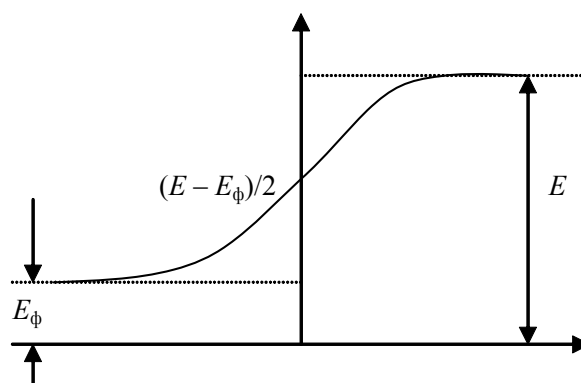


Рис.1. Переходная характеристика передающего устройства

Аналитическое выражение для переходной характеристики $h(x)$ передающего устройства имеет следующий вид [3]:

$$h(x) = (1 - h_\Phi) h(x)_{h_\Phi=0} + h_\Phi,$$

где h_Φ — относительная освещенность фона. При этом

$$h(x)_{h_\Phi=0} = 1/2 \left[1 + 2/P \int_0^x R(x) dx \right],$$

где $P = i_{\max}/\epsilon E$, ($i_{\max}$ — максимум сигнала, ϵ — чув-

ствительность датчика), $R(x) = \int_{-r_x}^{r_x} \rho(x, y) dy$, $\rho(x, y)$ —

распределение энергии в апертуре передающего устройства (рис.2).

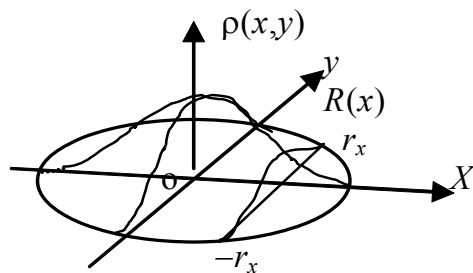


Рис.2. Форма апертуры передающего устройства

Максимальная крутизна характеристики определяется как

$$S_{\max} = dh(x)/dx|_{x=0} = (1 - h_{\phi})R(0)/P = (1 - h_{\phi})S,$$

где $S = R(0)/P$. Соответствующее нарастание сигнала

$$i(x) = \varepsilon EP(x)$$

где $P(x) = \iint_{\Delta S} \rho(x,y) dx dy$, ΔS — апертура элемента разложения.

Пусть m и n — соответственно горизонтальный и вертикальный размеры люминесцирующего фрагмента. Тогда горизонтальное и вертикальное сечения фрагмента определяются следующим образом:

$$A_m = \int_{-m/2}^{m/2} \rho(x,y) dx = 2 \int_0^{n/2} \rho(x,y) dx,$$

$$A_n = \int_{-n/2}^{n/2} \rho(x,y) dy = 2 \int_0^{m/2} \rho(x,y) dy,$$

а интересующий нас условный объем фрагмента (количество ДНК)

$$P(x) = 2 \int_0^{m/2} \int_{-rx}^{rx} \rho(x,y) dx dy = 2 \int_0^{m/2} R(x) dx.$$

С учетом переходной характеристики системы $R(x) = P[dh(x)/dx]$ [3].

В силу симметричности распределения энергии сигнала в пятне его сечение может быть представлено в виде, показанном на рис.3.

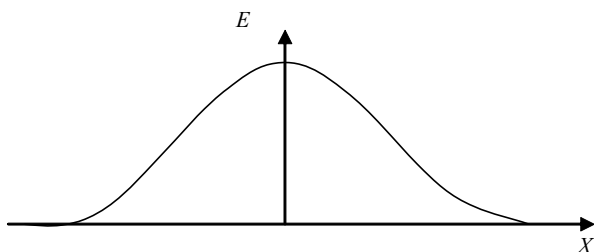


Рис.3. Распределение энергии сигнала в пятне, соответствующем люминесцирующему фрагменту ДНК

Рассмотренные теоретические представления соответствуют реально получаемому телевизионному сигналу от люминесцирующих фрагментов ДНК.

На рис.4 приведена трехмерная модель части изображения геля, содержащего реальные пробы ДНК с различными интенсивностями свечения, отображаемыми по вертикальной координате модели.

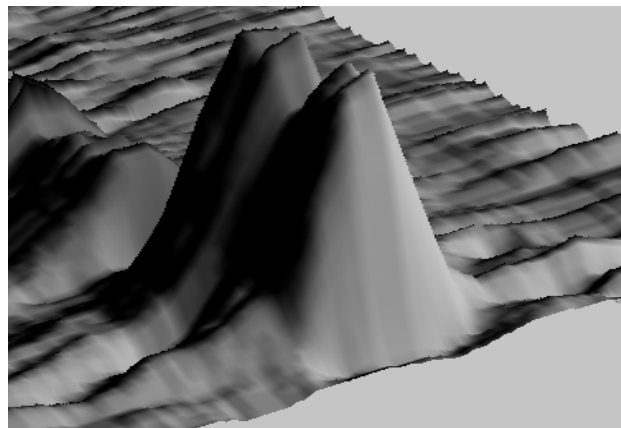


Рис.4. Трехмерная модель части изображения геля, полученного с помощью телевизионной системы

Определение условного объема и пропорционального ему количества ДНК, содержащегося в люминесцирующем фрагменте, осуществляется либо путем суммирования отсчетов яркости, превышающих заданный порог, либо путем суммирования отсчетов яркости, попавших в измерительную рамку. Ошибка оценки связана в первом случае с отсутствием учета отсчетов яркости, находящихся в пределах от уровня фона до уровня, задаваемого порогом бинаризации, а во втором — с учетом отсчетов яркости, не принадлежащих фрагменту, но попадающих в измерительную рамку.

Сущность предлагаемого способа повышения точности оценки условного объема поясняется на рис.5-6 и заключается в следующем.

Рассмотрим случай квантования с порогом бинаризации, равным половине амплитуды видеоимпульса: $\Pi = 0,5 J_{\max}$.

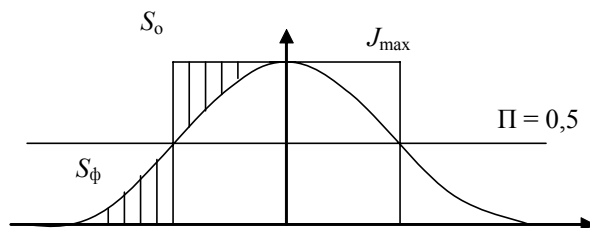


Рис.5. Уточненное определение условного объема при адаптивном квантовании с порогом 0,5

Как видно из рис.5, площадь заштрихованной фигуры S_{ϕ} , являющаяся частью видеоимпульса, лежащего ниже порога квантования, равна площади заштрихованной фигуры S_0 , дополняющей часть видеоимпульса, находящуюся выше порога бинаризации, до прямоугольника ($S_{\phi} = S_0$). Соответственно сумма площадей S_{ϕ} и S_0 множества сечений видеоимпульса образуют дополняющие объемы V_{ϕ} и V_0 .

Таким образом, условный объем фрагмента с учетом части, находящейся ниже уровня квантования, может быть определен выражением

$$V = S_{\Pi} J_{\max},$$

где S_{Π} — площадь, образованная сечением фрагмента пороговой плоскостью.

Рассмотрим случаи квантования с порогом бинаризации, отличающимся от $\Pi = 0,5 J_{\max}$.

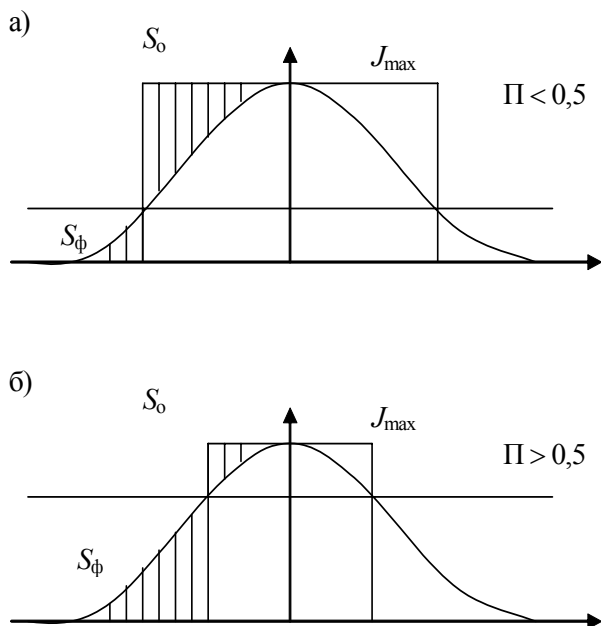


Рис.6. Уточненное определение условного объема при квантовании с фиксированным порогом: а) порог меньше 0,5; б) порог больше 0,5

Как видно из рис.6, с учетом подобия фигур S_{ϕ}

и S_0 , а следовательно, и объемов V_{ϕ} и V_0 можно считать $S_0/S_{\phi} = V_0/V_{\phi} = J_{\max}/\Pi = K$. Тогда полный условный объем фрагмента

$$V = V_1 + V_{\phi},$$

где V_1 — сумма отсчетов яркости, равных или превышающих порог Π , а $V_{\phi} = K (S_{\Pi} J_{\max} - V_1)$.

Для более точного определения значения $J_{\max}$ целесообразно брать усредненное значение отсчетов в окрестности центра тяжести фрагмента.

Выводы

1. Количество ДНК в люминесцирующем фрагменте изображения геля определяется суммой значений пикселей фрагмента.

2. Суммарный объем трехмерной фигуры, образуемой формой видеосигнала, зависит от апертуры, переходной характеристики телевизионной системы и уровня квантования.

3. Повышение точности определения условного объема может быть достигнуто путем учета части трехмерной фигуры, находящейся ниже порога квантования, на основе принципа подобия объемов.

1. ПЦР: основы метода, применение ПЦР для диагностики инфекционных заболеваний, организация ПЦР-лаборатории, проведение ПЦР-анализа / Метод. пособие НПФ «Литех». М., 2001. С.15.
2. Быков Р.Е., Коркунов Ю.Ф. Телевидение в биологии и медицине. Энергия, 1968. С.223.
3. Рыфтин Я.А. Телевизионная система. Теория. М.: Сов. радио, 1967. С.270.
4. Рыфтин Я.А. // Техника кино и телевидения. 1983. №9. С.48-53.