

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G06F 19/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510111594.4

[43] 公开日 2006年6月28日

[11] 公开号 CN 1793862A

[22] 申请日 2005.12.16

[21] 申请号 200510111594.4

[71] 申请人 中国科学院上海光学精密机械研究所
地址 201800 上海市 800-211 邮政信箱

[72] 发明人 王琛 刘力 余琴 王桂英
徐至展

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司
代理人 张泽纯

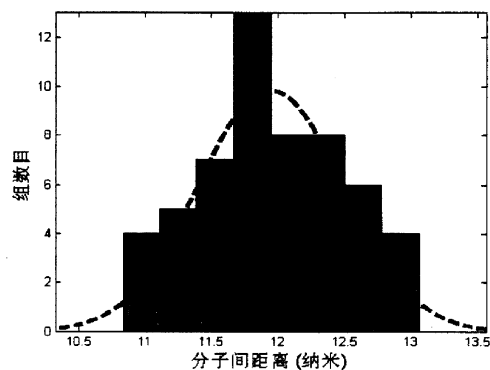
权利要求书 4 页 说明书 10 页 附图 6 页

[54] 发明名称

膜蛋白分子相互作用的光学探测方法

[57] 摘要

一种膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法，其特征在于该方法包括下列步骤：采用全内反射荧光成像系统探测细胞膜，在细胞膜的不同区域获取多组目标膜蛋白分子的图像，每组图像对应细胞膜的一个区域，每组图像包含多幅膜蛋白分子的序列图片；利用计算机进行数据处理，绘制荧光强度与时间的关系曲线图，采用荧光强度与时间的关系曲线的淬灭次数判断图像中所含聚合的膜蛋白的分子数目；采用中心定位法确定聚合的膜蛋白中每个分子的位置，由此确定膜蛋白的分子之间的间距；重复第二步和第三步对每组图像逐一进行数据处理，绘制淬灭步骤统计图和分子间距统计图，以获得膜蛋白的聚合程度和分子间距的统计结果。



1、一种膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

第一步采用全内反射荧光成像系统探测细胞膜，在细胞膜的不同区域获取多组目标膜蛋白分子的图像，每组图像对应细胞膜的一个区域，每组图像包含多幅膜蛋白分子的序列图片；

第二步利用计算机进行数据处理，绘制荧光强度与时间的关系曲线图，采用荧光强度与时间的关系曲线的淬灭次数判断图像中所含膜蛋白分子的数目；

第三步采用中心定位法确定聚合的膜蛋白中每个分子的位置，由此确定膜蛋白的之间的间距；

第四步重复第二步和第三步对每组图像逐一进行数据处理，绘制淬灭步骤统计图和分子间距统计图，以获得膜蛋白的聚合程度和分子间距的统计结果。

2、根据权利要求1所述的膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法，其特征在于所述的第一步的具体步骤如下：

①为了进行荧光探测，对待测的目标膜蛋白分子的活细胞做荧光标记；

②将具有荧光标记的目标膜蛋白分子的活细胞置于全内反射荧光成像系统中，用高灵敏度 CCD 对细胞的不同区域拍摄多组膜蛋白分子的图像，每组图像对应一个区域，每组图像包含多幅分子序列图片。

3、根据权利要求1所述的膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法，其特征在于所述的第二步的数据处理的过程如下：

①对一组图像中的每一幅图片进行测量，得到荧光强度最大值或荧光强度平均值，绘制荧光强度与时间的关系曲线图，简称荧光强度图；

②分析荧光强度图，该图中的荧光强度随时间的关系曲线呈现阶梯下降，荧光强度的第一次下降突变称为第一步淬灭，第二次下降突变称为第二步淬灭，第三次下降突变称为第三步淬灭，如此类推；该荧光强度曲线中，第一

步淬灭之前的区域称为 a 区间，第一步淬灭和第二步淬灭之间称为 b 区间，第三步淬灭与第二步淬灭之间称为 c 区间，……；根据荧光强度图的淬灭次数判断目标膜蛋白的聚合程度：一步淬灭说明没有发生蛋白的聚合，二步淬灭代表图片中含有两个分子，称为蛋白的二聚化，三步淬灭表明有三个分子，发生了蛋白的三聚化，以此类推。

4、根据权利要求 1 所述的膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法，其特征在于所述的中心定位法是一种数据处理方法，对两个分子膜蛋白的数据处理过程如下：

①将某一组目标膜蛋白图像的处于 b 区间的某一单个图片读入计算机，即获得一 10x10 的二维强度矩阵，称为原矩阵 I_1 ，该矩阵 I_1 包含有分子 1 的荧光强度分布；

②对原矩阵 I_1 做统计直方图，该图中荧光强度分界值设定为图像的背景值 B；

③对原矩阵 I_1 的荧光强度减去背景值 B 并进行插值处理，形成 100x100 的新矩阵 I_1' ；

④以下列公式 (1) 为曲线方程， I_1' 中的矩阵元为数据点，利用最小二乘法对图像进行拟合，得到图像的中心点，即为分子 1 的位置坐标 (x_1, y_1) ，

$$N_{xy} = N_{00} \cdot \exp \left[-\frac{(x-x_1)^2 + (y-y_1)^2}{2S^2} \right] \quad (1)$$

式中： (x_1, y_1) 即点物体的中心位置； N_{xy}, N_{00} 分别是像素 (x, y) 处和中心位置 (x_1, y_1) 处的成像强度值； S 是点扩散函数的半高全宽；

⑤将 a 区间的某一图片读入计算机，即获得一 10x10 的二维强度矩阵，称为原矩阵 I_2 ，该矩阵 I_2 包含有分子 1 和分子 2 的荧光强度分布；

⑥将矩阵 I_2 减矩阵 I_1 ，得到分子 2 的荧光强度分布矩阵并进行插值处理，形成分子 2 的 100x100 荧光强度分布新矩阵 I_2' ；

⑦按上述步骤④进行数据处理，得到分子 2 的位置坐标 (x_2, y_2) ；

⑧计算分子 1 和分子 2 之间的距离：

$$d(2,1)_x = |x_2 - x_1|; \quad d(2,1)_y = |y_2 - y_1|。$$

5、根据权利要求1所述的膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法，其特征在于所述的中心定位法是一种数据处理方法，对三分子膜蛋白的数据处理过程如下：

①将某一组目标膜蛋白图像的处于c区间的某一单个图片读入计算机，获得一10x10的二维强度矩阵，称为原矩阵 I_1 ，该矩阵 I_1 包含有分子1的荧光强度分布；

②对原矩阵 I_1 做统计直方图，该图中荧光强度分界值设定为图像的背景值B；

③将原矩阵 I_1 的荧光强度减去背景值B并进行插值处理，形成100x100的新矩阵 I_1' ；

④以下列公式(1)为曲线方程， I_1' 中的矩阵元为数据点，利用最小二乘法对图像进行拟合，得到图像的中心点即为分子1的位置坐标 (x_1, y_1) ，

$$N_{xy} = N_{00} \cdot \exp\left[-\frac{(x-x_1)^2 + (y-y_1)^2}{2S^2}\right] \quad (1)$$

式中： (x_1, y_1) 即点物体的中心位置； N_{xy}, N_{00} 分别是像素 (x, y) 处和中心位置 (x_1, y_1) 处的成像强度值； S 是点扩散函数的半高全宽；

⑤将b区间的某一图片读入计算机，获得一10x10的二维强度矩阵，称为原矩阵 I_2 ，该矩阵 I_2 包含有分子1和分子2的荧光强度分布；

⑥将矩阵 I_2 减矩阵 I_1 ，得到分子2的荧光强度分布矩阵并进行插值处理，形成分子2的100x100荧光强度分布新矩阵 I_2' ；

⑦按上述步骤④进行数据处理，得到分子2的位置坐标 (x_2, y_2) ；

⑧将a区间的某一图片读入计算机，获得一10x10的二维强度矩阵，称为原矩阵 I_3 ，该矩阵 I_3 包含有分子1、分子2和分子3的荧光强度分布；从原矩阵 I_3 减去矩阵 I_2 ，得到分子3的荧光强度分布矩阵并进行插值处理，形成分子3的100x100荧光强度分布新矩阵 I_3' 按上述步骤④进行数据处理，得到分子3的位置坐标 (x_3, y_3) ；

⑨计算分子 1、分子 2 和分子 3 之间的距离：

分子 1、分子 2 之间的距离：

$$d(2,1)_x = |x_2 - x_1|$$

$$d(2,1)_y = |y_2 - y_1|;$$

分子 1、分子 3 之间的距离：

$$d(3,1)_x = |x_3 - x_1|$$

$$d(3,1)_y = |y_3 - y_1|;$$

分子 2、分子 3 之间的距离：

$$d(3,2)_x = |x_3 - x_2|$$

$$d(3,2)_y = |y_3 - y_2|。$$

膜蛋白分子相互作用的光学探测方法

技术领域

本发明涉及生物学蛋白质，特别是一种膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法。

背景技术

蛋白质是细胞功能的主要执行者，细胞功能的实现实质上是细胞内或细胞间各种蛋白质分子相互作用的结果，因此研究蛋白质之间的相互作用是理解细胞生命活动过程中化学机械运转的关键，是生物学领域中的重大课题。尤其是在人类基因组测序工作完成之后，生命科学进入了后基因组学时代，在分子水平上研究蛋白质和蛋白质之间相互作用，揭示生物在体状态下的生命活动过程成为生命科学、信息科学共同面临的机遇和挑战。

但是迄今为止，研究蛋白质分子之间相互作用的手段是很有限的。已知的生物化学技术，如免疫共沉淀 (Robin. L, J.Virology, Vol.71, 9803~9807, 1997)、化学交联 (Jean. D. G, PNAS, Vol.86, 4007~4011, 1989)、片段层析 (Pedro. C, PNAS, Vol.61, 636~643, 1968) 等方法结合基因操作产生蛋白质突变以及蛋白质晶体结构的分析，筛选了许多重要蛋白质的相互作用并对其结构基础有所了解，给我们带来了丰富的信息。然而，这些生化信息都是离体 (*in vitro*) 研究的结果，并不能反应生理状况下的情况，无法回答在活细胞内蛋白质分子之间相互作用的动力学问题。

酵母双杂交技术是目前广泛采用的在体 (*in vivo*) 条件下研究蛋白质相互作用的方法，它能快速检测蛋白质相互作用，包括相应的结构域和基因编码 (Fields S, Nature, Vol.340, 245~246, 1989; Chien C.T, PNAS, Vol.88, 9578~9582, 1991; Bai C, Methods Enzymol, Vol.283, 141~156, 1996)。但是该方法也有固有的缺陷：①它只是个筛选系统，并不能直接将蛋白质相互作用与特定的细胞功能联系起来；②而且它只能检测细胞核内的蛋白质相互作用，对研究膜蛋白的相互作用则很困难；③在某些情况下会导致假阳性的错误信息 (Rossi F, PNAS,

Vol.94, 8405~8410, 1997)。

光学显微成像方法可以实现蛋白质相互作用的在体探测，但是单一的成像的空间分辨率受衍射极限的限制，无法突破 200nm，无法在更深入的层次上诠释生命活动的细节信息 (Georgiou G.N, FEBS. Lett, Vol.250, 487-492, 1989)。近场光学成像方法虽然可以实现 nm 级的空间分辨率，但是由于其固有探测原理的限制，很难实现在体探测 (沈玉民、朱星, 物理, Vol.29,13, 2000)。

上世纪 90 年代发展起来的荧光共振能量转移技术 (以下简称 FRET)，以不同于传统手段的全新原理大大促进了生物分子之间相互作用的研究，它的出现使我们对 1~10nm 范围内的相互作用探测成为可能，并且可以用于在体环境 (Truong K, Curr. Opin. Struct. Biol, Vol.11, 573~578, 2001; Sorkin. A, Curr. Biol, Vol.10, 1395~1398, 2000)。但是 FRET 方法依然面临着很多问题，例如它需要合适的供体-受体分子对 (Pollok B A, Trends. Cell. Biol, Vol.9, 57~60, 1999; Sekar R B, J. Cell. Biol, Vol.160, 629~633, 2003); 而且要从 FRET 效率中得到分子的距离信息，还必须取得分子对之间的 R_0 (Forster 半径, FRET 的效率为 50% 时的供体、受体之间的距离) 和分子偶极子取向因子 κ^2 的可靠信息，否则就无法利用 FRET 效率进行精确的距离计算 (Siegel R M, Sci STKE, Vol.38, PL1, 2000; Dietrich A, Biotechnology, Vol.82, 211~231, 2002)。另一方面由于目前绝大多数的 FRET 技术依然是应用在整体细胞的水平，得到的是系综平均的结果，这掩盖了来自单个分子对的独特信息。因此，生命科学的发展迫切需要提供新的方法和手段，来解决分子之间相互作用的检测问题。

发明内容

本发明针对上述在先技术对分子之间相互作用探测方面的不足，尤其是在体条件下探测的不足，提出一种在活细胞内关于膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法，以获得膜蛋白分子的相互作用的情况。

本发明的技术解决方案如下：

一种膜蛋白分子之间相互作用的光学探测方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

第一步采用全内反射荧光成像系统探测细胞膜，对目标膜蛋白的不同区域获取多组膜蛋白的图像，每组图像对应细胞膜的一个区域，每组图像包含多幅分子序列图片；

第二步利用计算机进行数据处理，绘制荧光强度与时间的关系曲线图，采用荧光强度与时间的关系曲线的淬灭次数判断图像中所含膜蛋白分子的数目；

第三步采用中心定位法确定膜蛋白中每个分子的位置；

第四步重复第二步和第三步对每组图像逐一进行数据处理，绘制淬灭步骤统计图和分子间距统计图，以获得膜蛋白的聚合程度和分子间距的统计结果。

所述的第一步的具体步骤如下：

①为了进行荧光探测，对待测的目标膜蛋白分子做荧光标记；

②将具有荧光标记的目标膜蛋白分子的活细胞置于全内反射荧光成像系统中，用高灵敏度 CCD 对细胞的不同区域拍摄多组膜蛋白分子的图像，每组图像对应一个区域，每组图像包含多幅分子序列图片；

所述的第二步的数据处理的过程如下：

①对一组图像中的每一幅图片进行测量，得到荧光强度最大值或荧光强度平均值，绘制荧光强度与时间的关系曲线图，简称荧光强度图；

②分析荧光强度图，该图中的荧光强度随时间的关系曲线呈现阶梯状的下降，荧光强度的第一次下降突变称为第一步淬灭，第二次下降突变称为第二步淬灭，第三次下降突变称为第三步淬灭，如此类推；该荧光强度曲线中，第一步淬灭之前的区域称为 a 区间，第一步淬灭和第二步淬灭之间称为 b 区间，第二步淬灭与第三步淬灭之间称为 c 区间，……；根据荧光强度图的淬灭次数判断目标膜蛋白细胞的聚合程度：一步淬灭说明没有发生蛋白的聚合，二步淬灭代表图片中含有两个分子，称为蛋白的二聚化，三步淬灭表明有三个分子，发生了蛋白的二聚化，以此类推。

所述的中心定位法是一种数据处理方法，对两分子的膜蛋白的数据处理

过程如下：

①将某一组目标膜蛋白图像的处于 b 区间的某一单个图片读入计算机，即获得一 10x10 的二维强度矩阵，称为原矩阵 I_1 ，该矩阵 I_1 包含有分子 1 的荧光强度分布；

②对原矩阵 I_1 做统计直方图，该图中荧光强度分界值设定为图像的背景值 B；

③对原矩阵 I_1 的荧光强度减去背景值 B 并进行插值处理，形成 100x100 的新矩阵 I_1' ；

④以下列公式 (1) 为曲线方程， I_1' 中的矩阵元为数据点，利用最小二乘法对图像进行拟合，得到图像的中心点即为分子 1 的位置坐标 (x_1, y_1) ，

$$N_{xy} = N_{00} \cdot \exp\left[-\frac{(x-x_1)^2 + (y-y_1)^2}{2S^2}\right] \quad (1)$$

式中： (x_1, y_1) 即点物体的中心位置； N_{xy}, N_{00} 分别是像素 (x, y) 处和中心位置 (x_1, y_1) 处的成像强度值； S 是点扩散函数的半高全宽；

⑤将 a 区间的某一图片读入计算机，即获得一 10x10 的二维强度矩阵，称为原矩阵 I_2 ，该矩阵 I_2 包含有分子 1 和分子 2 的荧光强度分布；

⑥将矩阵 I_2 减矩阵 I_1 ，得到分子 2 的荧光强度分布矩阵并进行插值处理，形成分子 2 的 100x100 荧光强度分布新矩阵 I_2' ；

⑦按上述步骤④进行数据处理，得到分子 2 的位置坐标 (x_2, y_2) ；

⑧计算分子 1 和分子 2 之间的距离：

$$d(2,1)_x = |x_2 - x_1|; \quad d(2,1)_y = |y_2 - y_1|。$$

所述的中心定位法是一种数据处理方法，对三分子膜蛋白的数据处理过程如下：

①将某一组目标膜蛋白图像的处于 c 区间的某一单个图片读入计算机，即获得一 10x10 的二维强度矩阵，称为原矩阵 I_1 ，该矩阵 I_1 包含有分子 1 的荧光强度分布；

②对原矩阵 I_1 做统计直方图，该图中荧光强度分界值设定为图像的背景

值 B;

③对原矩阵 I_1 的荧光强度进行插值处理, 形成 100×100 的新矩阵 I_1' ;

④以下列公式 (1) 为曲线方程, I_1' 中的矩阵元为数据点, 利用最小二乘法对图像进行拟合, 得到图像的中心点即为分子 1 的位置坐标 (x_1, y_1) ,

$$N_{xy} = N_{00} \cdot \exp\left[-\frac{(x-x_1)^2 + (y-y_1)^2}{2S^2}\right] \quad (1)$$

式中: (x_1, y_1) 即点物体的中心位置; N_{xy}, N_{00} 分别是像素 (x, y) 处和中心位置 (x_1, y_1) 处的成像强度值; S 是点扩散函数的半高全宽;

⑤将 b 区间的某一图片读入计算机, 即获得一 10×10 的二维强度矩阵, 称为原矩阵 I_2 , 该矩阵 I_2 包含有分子 1 和分子 2 的荧光强度分布;

⑥将矩阵 I_2 减矩阵 I_1 , 得到分子 2 的荧光强度分布矩阵并进行插值处理, 形成分子 2 的 100×100 荧光强度分布新矩阵 I_2' ;

⑦按上述步骤④进行数据处理, 得到分子 2 的位置坐标 (x_2, y_2) ;

⑧将 a 区间的某一图片读入计算机, 即获得一 10×10 的二维强度矩阵, 称为原矩阵 I_3 , 该矩阵 I_3 包含有分子 1、分子 2 和分子 3 的荧光强度分布; 从原矩阵 I_3 减去矩阵 I_2 , 得到分子 3 的荧光强度分布矩阵并进行插值处理, 形成分子 3 的 100×100 荧光强度分布新矩阵 I_3' 按上述步骤④进行数据处理, 得到分子 3 的位置坐标 (x_3, y_3) ;

⑨计算分子 1、分子 2 和分子 3 之间的距离:

分子 1、分子 2 之间的距离:

$$d(2,1)_x = |x_2 - x_1|$$

$$d(2,1)_y = |y_2 - y_1|;$$

分子 1、分子 3 之间的距离:

$$d(3,1)_x = |x_3 - x_1|$$

$$d(3,1)_y = |y_3 - y_1|;$$

分子 2、分子 3 之间的距离:

$$d(3,2)_x = |x_3 - x_2|$$

$$d(3,2)_y = |y_3 - y_2|。$$

关于单分子的荧光强度随时间的突然变化，可用统计理论来解释。对于分子而言，光淬灭事件是一个泊松过程，它遵从指数分布

$$P(t) = \frac{1}{\tau} e^{-t/\tau}$$

式中， $P(t)$ 是在时刻 t 荧光分子淬灭的几率； τ 是光淬灭的时间常数，它依赖于分子的吸收截面、系间过渡时间等光物理参数以及外部环境。如果两个或两个以上分子聚集在一起，由于不同分子的光淬灭时间常数不同，就会表现出荧光强度突然多次改变的现象，即多步淬灭，淬灭的步数等于聚集分子的数目。

单分子的精确定位是基于这样一个事实：虽然由于衍射极限的限制，成像系统无法分辨物体的尺寸，但是根据物体所成的光斑，可以对物体的中心位置进行无限精确的恢复，这就是所谓的中心定位法。M.K Cheezum (Biophys. J.Vol.81, 2378-2388, 2001)及 R.E Thompson (Biophys. J.Vol.82, 2775-2783, 2002) 等人研究指出，对于低信噪比成像，中心定位法采用二维高斯函数对物体的衍射极限光斑图像进行拟合，可得到最佳的定位结果。

二维高斯函数的表达式为

$$N_{xy} = B + N_{00} \cdot \exp \left[-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{2S^2} \right] \quad (1)$$

式中， (x_0, y_0) 即点物体的中心位置； N_{xy}, N_{00} 分别是像素 (x, y) 处和中心位置 (x_0, y_0) 处的成像强度值； S 是点扩散函数的半高全宽； B 是背景，它包括 CCD 的读出噪音、暗电流以及光子散射噪音。

同时中心定位法所能达到的精确度与成像系统的参数有关，具体表达式为

$$\sigma = \sqrt{\frac{S^2}{N} + \frac{a^2}{12} + \frac{8\pi S^4 b^2}{a^2 N^2}} \quad (2)$$

N 是图像中信号强度值之和； a 是探测器的像素尺寸； b 是噪音的标准偏

差。

显然，本发明的特点在于可以定量获取两个或多个分子之间的相对距离，并可以获取相对距离随时间的变化。该方法弥补了 FRET 技术只能对 1~10nm 的分子间距离进行探测的缺点，同时也突破了光学显微镜（远场）分辨率大于 200nm 的限制，是一种对膜蛋白分子之间相互作用进行探测的光学新方法。

本发明的优点在于：

- 1、在体膜蛋白相互作用的无损探测。
- 2、大大突破远场光学成像的衍射极限分辨率。
- 3、发生相互作用的分子之间距离的精确确定。

附图说明

图 1 是分子荧光强度与时间的关系曲线图的三步淬灭示意图

图 2 是本发明实施例的一组膜蛋白分子序列图片

图 3 是本发明实施例膜蛋白分子荧光强度与时间的关系曲线图的两步淬灭示意图

图 4 是图 2 中第 25 幅分子图片

图 5 是图 4 分子图像原矩阵 I_1 统计直方图

图 6 是图像处理流程图

图 7 是图 4 分子图片拟合的三维荧光强度显示图

图 8 是图 2 中第 10 幅分子图片

图 9 是第 10 幅分子图片拟合的三维荧光强度显示图

图 10 为本发明实施例淬灭步骤的统计图

图 11 为本发明实施例分子间距的统计图

具体实施方式

下面结合实施例和附图对本发明作进一步说明，但不应以此限制本发明

的保护范围。

请参阅图 2、3、4、5、6、7、8、9 和图 10，图 2 至图 10 是本发明膜蛋白相互作用的光学探测方法实施例的各阶段的主要示意图，本实施例的过程如下：

<1> 对待测活细胞中的目标膜蛋白做荧光标记。本实施例中先构建膜蛋白与荧光蛋白的融合质粒，然后将其转染到细胞中，完成待测样品的荧光标记。由于是单分子探测，必须控制使转染后蛋白表达的浓度很低。

<2> 在全内反射荧光成像系统中，用高灵敏度 CCD 在细胞膜的不同区域拍摄多组目标膜蛋白单细胞图像，共拍摄 100 组，每组对应一个区域，每组内含有 60 幅单细胞序列图片，见图 2。本发明采用具体参数为：物镜 $NA=1.45$ ，放大倍率为 $100\times$ ； $\lambda=570nm$ ，CCD 尺寸为 $0.06\mu m/pixel$ （ $pixel$ 即像素），这样 CCD 的每个像素对应成像空间的物理距离为 $60nm$ ；每个区域的大小为 10×10 像素；一组内每幅图片的曝光时间为 $200ms$ ，图片之间的拍摄延迟时间为 0，每组拍摄的总时间为 $12s$ 。

<3> 对第一组图像进行分析，其中含有 60 幅图片。从每幅单细胞图片中得到强度最大值或强度平均值，本实施例经测量取荧光强度最大值，共 60 个数据，数据如下表 1 所示：

表 1

图片编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
强度最大值(任意单位)	300	202	206	205	209	208	205	200	208	204
图片编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
强度最大值(任意单位)	206	208	209	207	202	204	209	209	204	209
图片编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
强度最大值(任意单位)	102	102	106	103	102	100	107	104	109	105
图片编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

强度最大值(任意单位)	104	108	105	102	107	108	100	107	104	108
图片编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
强度最大值(任意单位)	2	7	3	5	2	7	4	9	9	6
图片编号	51	52	53	55	55	56	57	58	59	60
强度最大值(任意单位)	5	9	8	6	8	7	3	3	4	5

根据表 1 的数据绘制荧光强度最大值与时间的关系曲线图, 简称荧光强度图, 见图 3。从图中可以看到, 分子点的荧光强度呈现两步淬灭, 说明图像中含有两个分子。

<5> 在图 3 的区间 b 中任意选择一幅分子图片, 本实施例选取第 25 幅图片, 见图 4。将图片输入计算机进行处理, 流程图见图 6, 具体处理步骤如下:

①读入图像, 在计算机中图像显示为一个二维荧光强度矩阵 I_1 , 见表 2。此矩阵称为原矩阵, 大小为 10×10 , 单位为任意单位:

②对原矩阵 I_1 做统计直方图, 见图 5。直方图中的强度分界值即为背景噪声和信号光的分界值, 将此分界值设定为图像的背景值, 即为式(1)中的 B 值, $B = 20$ 。

③对二维荧光强度矩阵 I_1 的荧光强度减去背景值 B 值做插值处理, 得到一新矩阵 I_1' , 其大小为 100×100 ;

④以公式(1)为曲线方程, I_1 中的矩阵元为数据点, 进行最小二乘法的曲线拟合。拟合结果见图 7。

⑤得到分子 1 的位置坐标 $(x_1, y_1) = (5.4309, 5.2499) \text{ pixel}$ 。

表 2

15.291	16.747	16.019	16.747	20.388	13.106	22.572	26.941	13.835	15.291
21.844	18.203	24.028	12.378	18.203	24.756	11.65	13.835	18.203	18.203
25.485	19.66	17.475	21.116	17.475	16.019	19.66	16.747	20.388	18.931

14.563	21.844	21.116	56.604	87.242	82.079	48.565	17.475	15.291	17.475
17.475	24.028	17.475	63.979	96.46	95.467	51.254	16.019	19.66	21.116
24.028	24.756	22.572	65.159	97.677	102	66.342	21.116	19.66	24.028
18.931	18.203	23.3	33.352	44.577	42.364	30.233	12.378	18.931	24.028
18.203	18.931	14.563	19.66	17.475	16.747	18.931	18.203	15.291	21.844
21.844	18.931	20.388	14.563	19.66	21.116	21.844	21.116	12.378	16.019
16.747	21.116	16.019	20.388	12.378	17.475	14.563	18.931	18.203	11.65

在图 3 的 a 区间中任意选择一幅分子图片，本实施例选取第 10 幅图片，见图 8，输入计算机进行处理，处理流程如下：

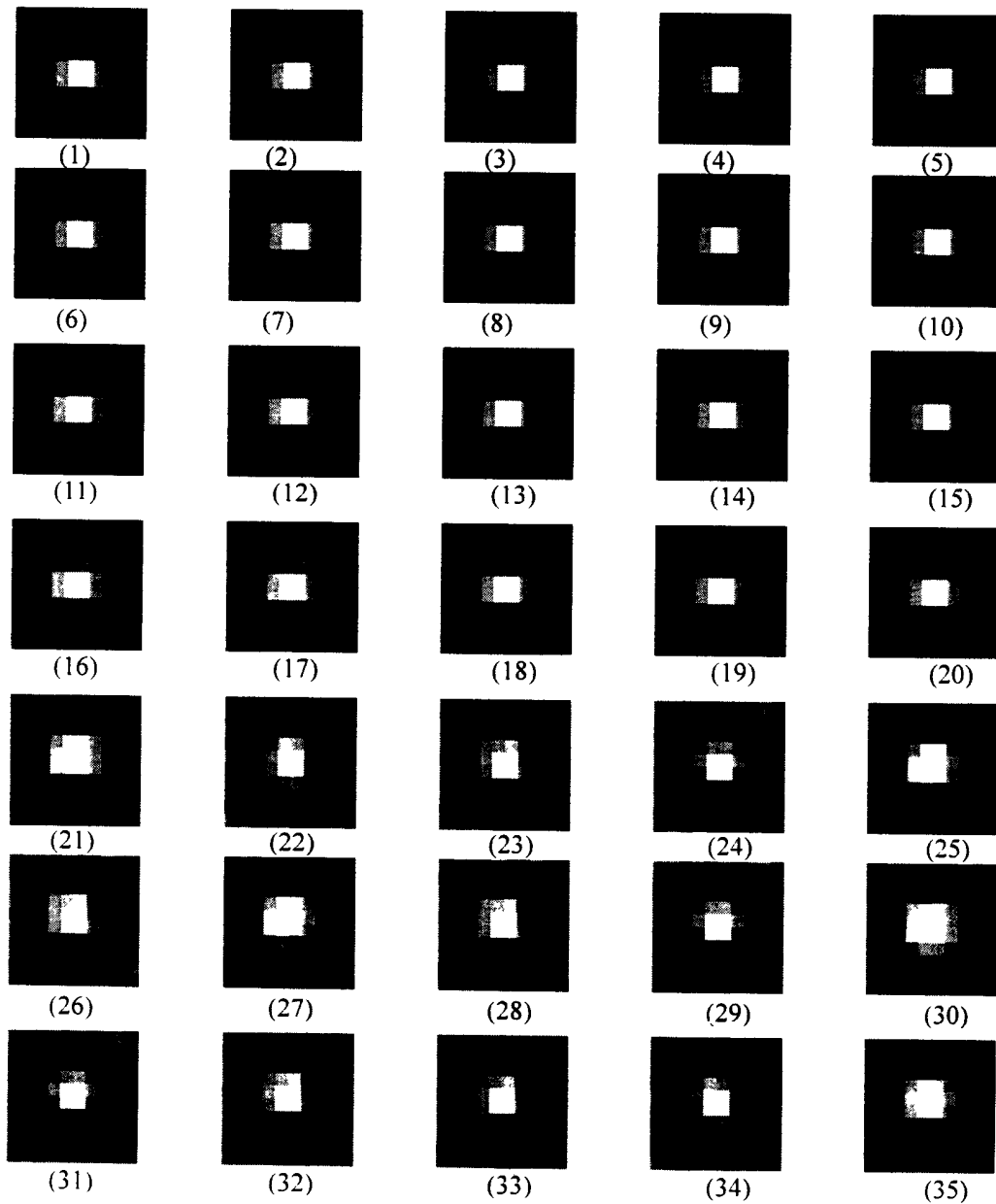
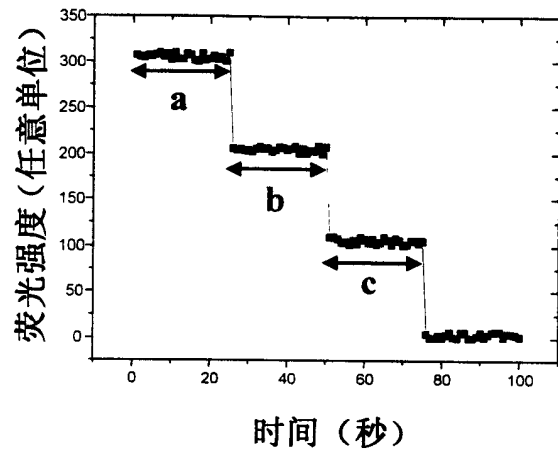
⑥读入该图片，得到另一二维强度矩阵，称为原矩阵 I_2 。此矩阵中包括分子 1 和分子 2 的荧光强度分布；

⑦将矩阵 I_2 与矩阵 I_1 相减，即得到分子 2 的强度分布；

⑧重复上述处理流程的第④步骤，拟合结果见图 9，得到分子 2 的位置坐标 $(x_2, y_2) = (5.4287, 5.4577) \text{ pixel}$ 。

⑨计算出分子 1 和分子 2 的之间的距离为 $d_x = 0.2 \text{ nm}, d_y = 12.5 \text{ nm}$ 。

⑩对余下的 99 组图像重复以上分析并作统计，得到淬灭步骤的统计图，见图 10。大多数分子 (55/100) 的荧光强度呈现二步淬灭，说明目标膜蛋白之间的相互作用表现为二聚化。从 55 组表现为二聚化的图像中计算得到 55 组分子间距离，作分子间距离的统计图，见图 11，分子之间的距离分布呈现中心值为 12nm 的正态分布，进一步说明蛋白分子不是随机碰撞在一起，而是发生了相互作用。



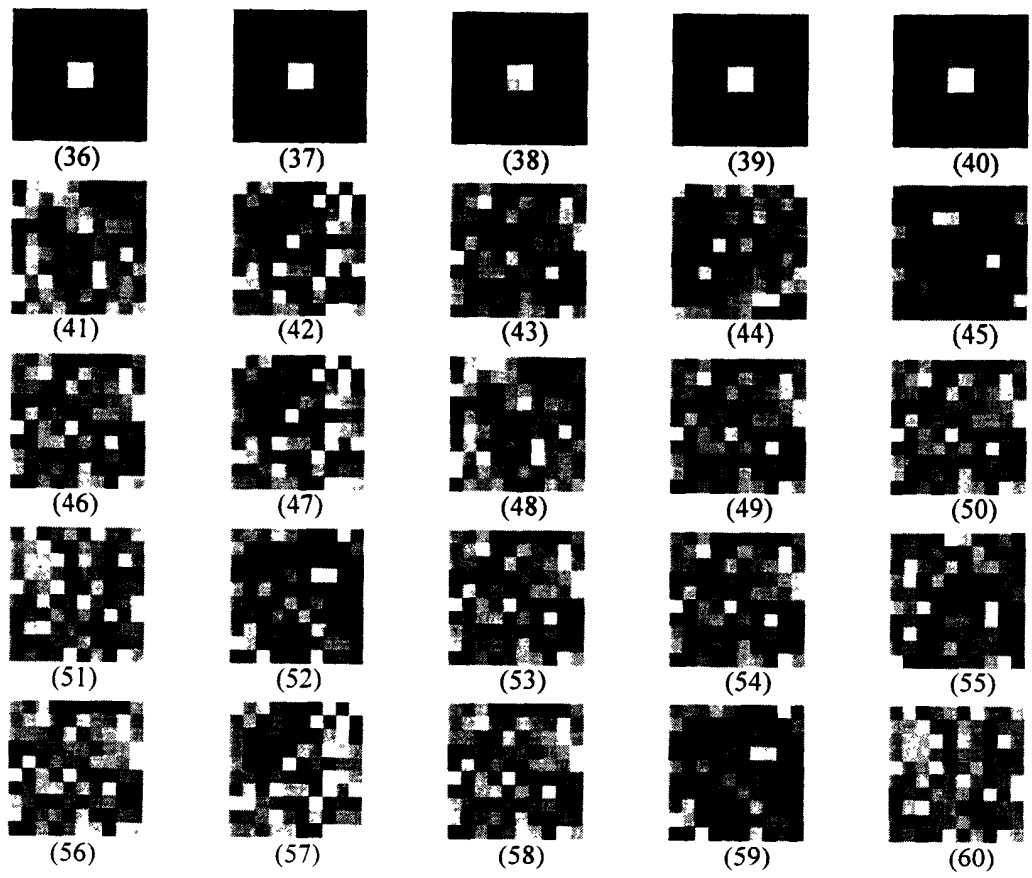


图 2

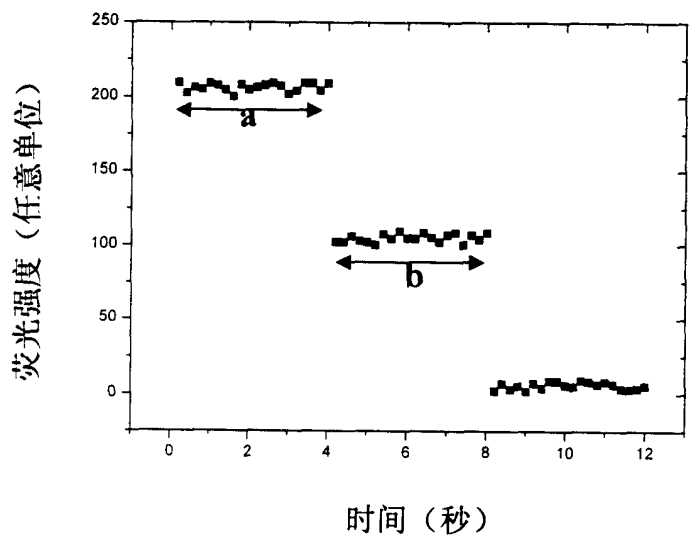


图 3

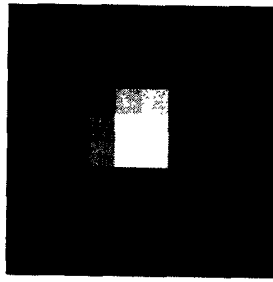


图 4

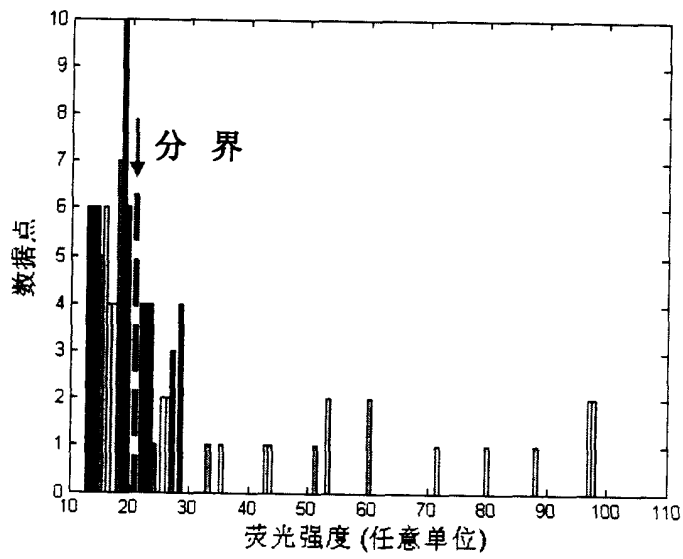


图 5

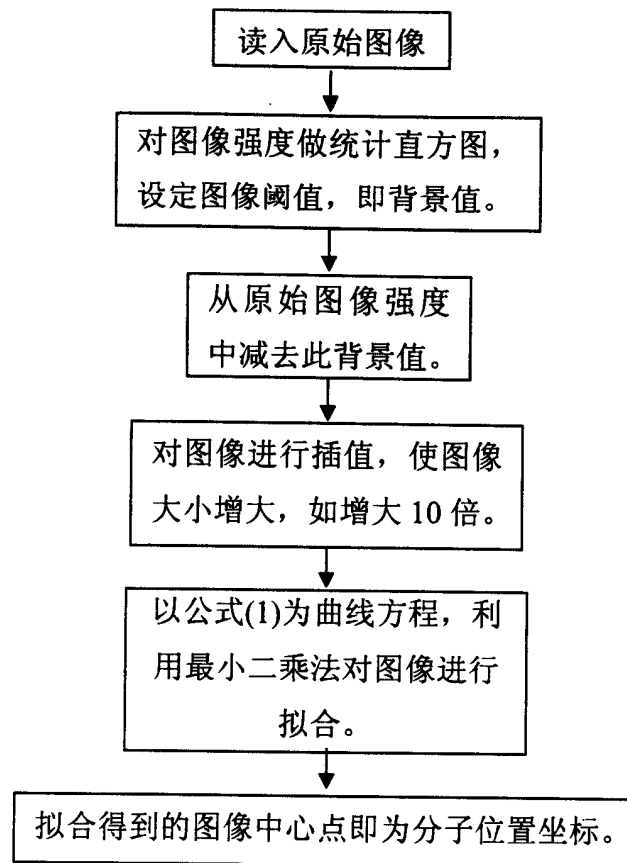


图 6

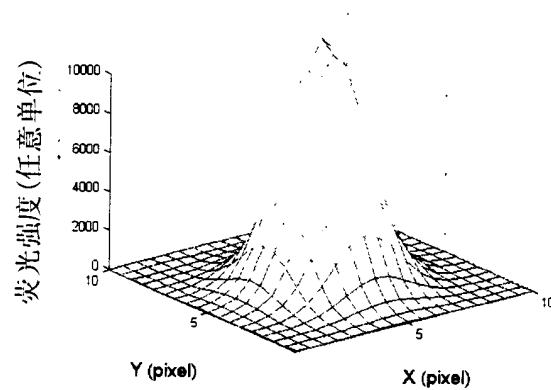


图 7

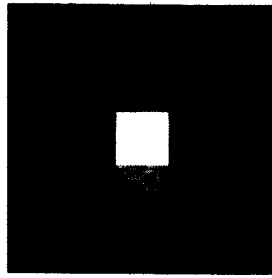


图 8

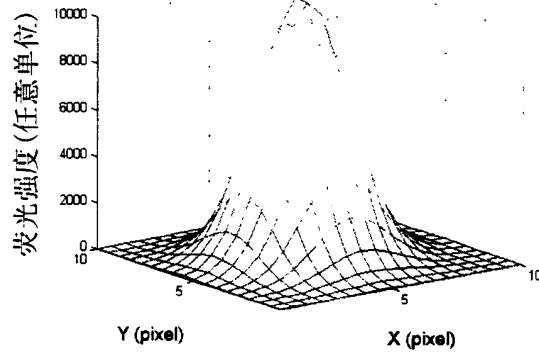


图 9

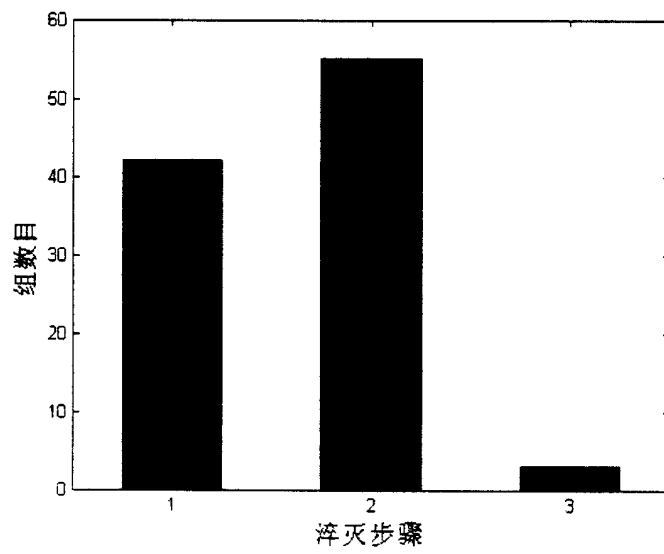


图 10

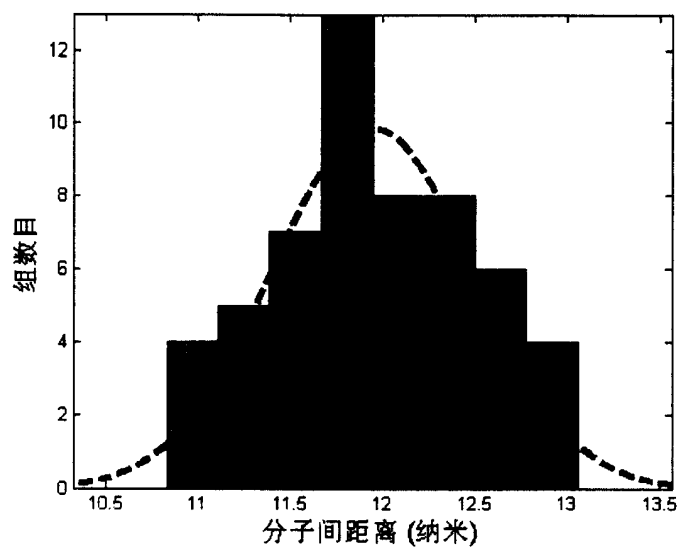


图 11