DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.015

[2] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992. 50-56.
[3] 曾际斌, 石肖原, 谷秀彬, 等. 一种简易的制备感受态大肠杆菌细胞的新技术[J]. 白求恩医科大学学报, 1993, 19(3): 306-307.
[4] Leopold R A, Hughes K J, DeVault J D. Using electroporation and a slot cuvette to deliver plasmid DNA to insect embryos[J]. Genet Anal, 1996, 12(5-6): 197-200.
[5] Lefrancois J, Sicard A M. Electrotransformation of Streptococcus pneumoniae: evidence for restriction of DNA on entry[J]. Microbiology, 1997, 143(Pt 2): 523-526.
[6] Doran K S, Helinski D R, Konieczny I. Host-dependent requirement for specific DnaA boxes for plasmid RK2 replication[J]. Mol Microbiol, 1999, 33(3): 490-498.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2001)07-0785-01

个案与短篇

光密度的有效测定及其影响因素的分析

Effective measurement of optical density and analysis on its influencing factors

张 钢[1], 夏志坚[2] ([1]第三军医大学高原军事医学系病理生理学教研室, 重庆 400038; [2]重庆大学 ICT 研究中心, 重庆 400044)

在细胞生物学中, 获取与细胞功能相关的定量信息尤为重要。以往对反应物的量常用灰度来表示, 这只是粗略地测量物体由白→黑的深浅程度, 因此, 目前定量研究中更多地用光密度来表示, 但如何准确有效地测量光密度? 对此, 我们进行了有效的探讨。

1 原理与方法

1.1 测量原理

光密度测量中物体对光的吸收程度与其浓度的关系符合朗伯-比尔(Lamber-Beer)定律[1]:

$A = \mathrm{Log}(I_{in}/I_{out}) = KCb$

A: 光密度; I_{in}: 入射光强度; I_{out}: 出射光强度; K: 吸光系数; C: 被测物浓度; b: 被测物厚度。

对图像而言应表示为:

$A(x, y) = \mathrm{Log}[I_{in}(x, y)/I_{out}(x, y)] = \mathrm{Log}[L_{in}(x, y)/L_{out}(x, y)] = K(x, y)C(x, y)b(x, y)$

L为灰度(x, y): 显微图像中测量像素点的空间位置

图像分析系统上直接测得的是灰度, 光密度是通过一定关系转换过来的, 但直接利用朗伯-比尔定律会带来严重的非线性误差。同时显微镜的光场不可能绝对均匀, 载、盖玻片对背景光强度的影响及切片染色的不一致都会对测量带来误差。

针对以上问题, 我们作了以下改进。

1.1.1 将图像传感器和图像采集卡作特殊设计, 将 Lamber-Beer 定律中的对数计算由传感器和采集卡共同完成, 使图像灰度与光强度之间呈准确的对数关系。这样灰度L与光强度I之间的关系为 $L = C\,\mathrm{Log}(I)$, Lamber-Beer 定律就成了简便的代数运算:

$A(x, y) = \mathrm{Log}[I_{in}(x, y)/I_{out}(x, y)] = \mathrm{Log}\,I_{in}(x, y) - \mathrm{Log}I_{out}(x, y) = C[L_{in}(x, y) - L_{out}(x, y)]$, C 为转换系数

1.1.2 透射图像与背景图像在同一空间位置进行点对点密度转换, 消除背景光强度分布的不均匀, 具体操作步骤如下: ①确定系统设置; ②系统调零: 稳定显微镜亮度, 人眼聚焦图像, 然后移开载有目标的载片, 光源直射至显微镜物镜上, 启动系统"调零"; ③记录全透图: 将待测目标所在载体空白处(包括载玻片和盖玻片)置于视场中, 重新"调零", 摄取灰度图像; ④灰度图像转换成密度图像; ⑤光密度计算。

1.2 免疫组化实验

选择 Anti-Actin、Anti-β-tubulin (Boehringer mannheim biochemica Co)两种鼠单抗, 用抗生物素-生物素法研究了正常肝细胞和肝癌细胞的微丝和微管结构, 具体操作参见文献[2]。

2 结果

癌细胞微丝、微管平均光密度(0.374±0.021, 0.401±0.065)明显小于正常肝细胞(0.923±0.071, 0.894±0.052), 两者差异非常显著($P < 0.01$)。

3 讨论

光密度是客观、可重复、有可比性地度量物体吸收光强弱的标尺。我们认为准确测量光密度必须满足下列条件: ①灰度与光密度实现线性转换, 消除非线性误差; ②在恒定的光源种类和物镜倍率, 一定的亮度范围内进行测量; ③消除背景光强度分布的不均匀, 透射图像与背景图像在同一空间位置进行密度转换; ④根据目标细胞的大小和密度, 选择适当的物镜倍率; ⑤利用人眼灵敏度聚焦清晰图像。

关键词: 光密度; 计算机图像分析; 免疫细胞化学
中图法分类号: Q-331 文献标识码: B

参考文献:

[1] 汤耀法. 光密度的由来及其物理意义[J]. 中国医学物理学杂志, 1997, 14(3): 179.
[2] 蔡文琴, 王伯祥云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 121-123.

作者简介: 张 钢(1968-), 男, 湖南省湘潭市人, 博士研究生, 讲师, 主要从事细胞流变学方面的研究, 发表论文5篇. 电话: (023)68752339
收稿日期: 2000-01-10; 修回日期: 2000-11-03

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net