

ПРИЛОЖЕНИЕ BIODECOD ДЛЯ ДНК-ЦИТОМЕТРИИ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ

Колтунова А.М., Панарин Р.Н., Скапцов М.В., Уварова О.В., Куцев М.Г.

Южно-Сибирский ботанический сад, г. Барнаул, Россия.

e-mail asya-kolt@mail.ru

Аннотация. Проточная цитометрия – является важным цитогенетическим методом исследования в современной ботанике. Метод позволяет оценить уровни пloidности и размер генома у растений, а также выявить процессы полиплоидии, апомиксиса, аллополиплоидии. Альтернативным вариантом исследования содержания ДНК в ядрах клеток является цитометрия статичных изображений. В данной статье приводятся краткое описание приложения «BioDecod», которое позволяет анализировать изображения флуоресцентно меченных ядер растений и производить статистическую обработку данных.

Цитогенетические исследования становятся все более важными и перспективными инструментами в современной ботанике. Современные методы исследования – проточная цитометрия и цитометрия изображений позволяют объективно рассчитать относительное содержание ДНК и сделать выводы о размере генома.

Информация о размере генома в систематике приравнивается по значимости к морфологическим и анатомическим характеристикам (Скапцов, 2014). Сравнение размеров генома растений одного вида или близкородственных, произрастающих на разных территориях, возможность выявления таких процессов как полиплоидия, апомиксис, аллополиплоидия – все это помогает ученым делать выводы о ходе эволюционных процессов и прогнозировать будущие эволюционные изменения (Salameh, 2014).

В настоящее время в цитогенетических исследованиях произошел большой прогресс в области окрашивания клеток и последующей детекции. Для этого применяют, как флуоресцентные световые микроскопы, так и проточные цитометры. Цель анализа данных состоит в идентификации и подсчете сигналов, которые отражают покрашенные ядра растений флуоресцентными красителями для определения уровня пloidности и размера генома. Обычные программы для анализа изображений не всегда подходят для работы с биологическими данными. В связи с этим встает проблема поиска существующих или создания новых качественных программ для анализа изображений в цитогенетических исследованиях.

Нами использованием языка программирования TypeScript разработано приложение BioDecod, которое обеспечивает автоматическое обнаружение и подсчет параметров флуоресценции клеточных ядер и может быть использовано для ДНК-цитометрии растений. В данной статье приводятся основные характеристики бета-версии приложения. Основная цель BioDecod — обнаружить и подсчитать все ядра на изображении, оценить параметры их флуоресценции и экспортировать файл данных, содержащий количественные результаты.

BioDecod разработан для Microsoft Windows, при этом анализ можно выполнять с использованием меньшего количества параметров и меньшего количества вводимых пользователем данных по сравнению с существующим аналогичным программным обеспечением. BioDecod был разработан в сотрудничестве с конечными пользователями продукта, что позволило сделать программный пакет более удобным и ориентированным на пользователя. Кроме того, чтобы минимизировать количество входных параметров в программном обеспечении, все параметры обсуждались вместе со специалистами-цитогенетиками до начала проекта. Таким образом, мы смогли оптимизировать минимальное количество входных параметров, что сделало программное обеспечение более простым и быстрым в изучении и запуске.

Первый шаг анализа — сегментация всех ядер клеток на изображении. Для отделения ядер клеток от фона изображения используется метод пороговой обработки, который минимизирует дисперсию переднего плана и фона. В качестве тестовой модели нами

использованы изображения стандартных флуоресцентных частиц GRE-fluo Microspheres (Yuanbiotech), полученные с помощью флуоресцентного микроскопа. Первоначально пользователем производится ввод пороговых данных - минимальных яркости, цветности и площади объекта на изображении (Рис. 1 а). На основании этих параметров производится оконтуривание объектов.

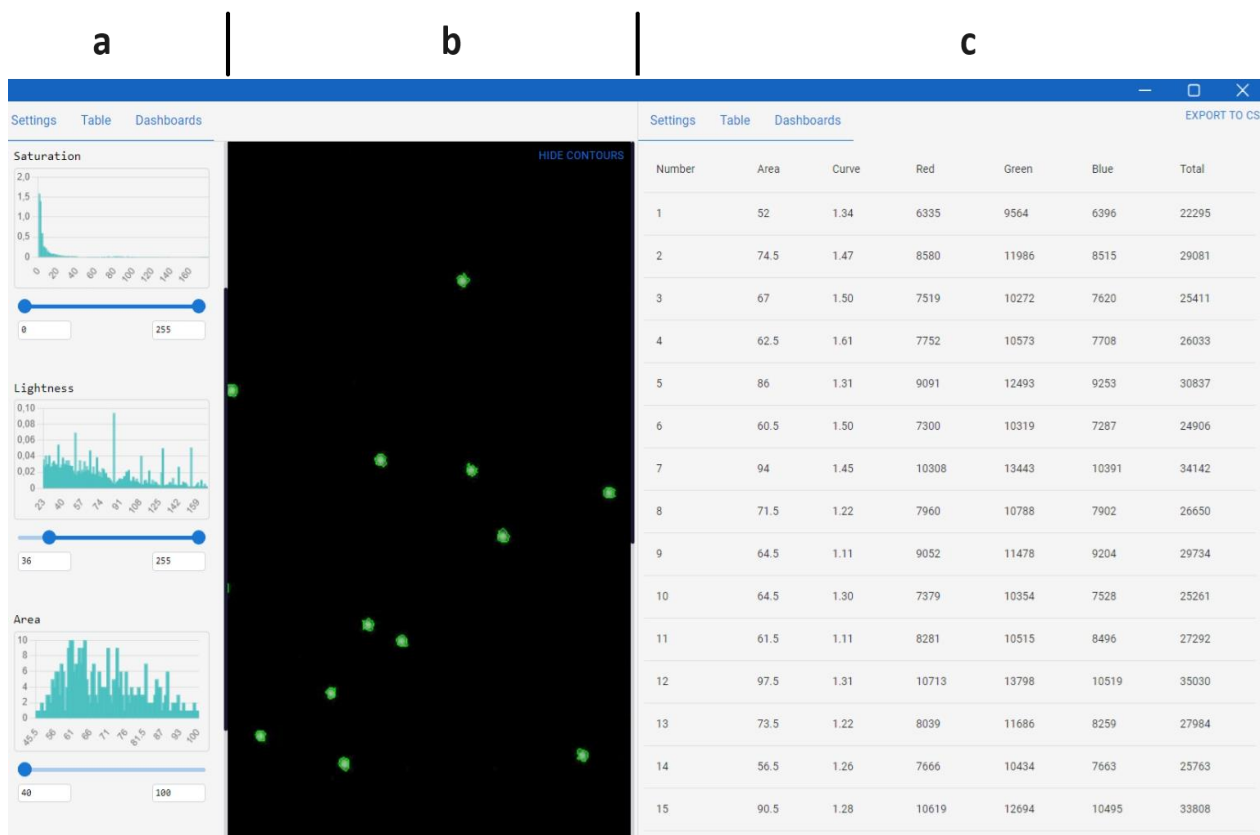


Рисунок 1 – Этапы первичной обработки данных в BioDecod.

После того как каждое ядро клетки помечено соответствующим образом, следующим шагом является обнаружение и назначение уровня яркости конкретному ядру. Этап предварительной обработки состоит из фильтрации изображений ядер по определенному размеру, определяемому пользователем для отсеки накладывающихся изображений, а также артефактов (Рис. 1 б). Все пороговые значения могут быть оптимизированы пользователем в реальном времени при настройке параметров конфигурации.

На следующем этапе анализа подсчитываются интегральные параметры флуоресценции внутри каждого локального изображения ядра. Выполняется два измерения сигналов: подсчет пикселей и измерение их интенсивности. Суммирование интенсивностей дает интегральную яркость объекта, при этом отображение данных ведется в 4х каналах - синем, зеленом, красном и суммарная яркость. Эта информация собирается и экспортируется в файл Excel для возможности дальнейшей обработки в стороннем ПО (рис. 1 с). Табличный файл можно легко импортировать в любое статистическое программное обеспечение для дальнейшего анализа.



Рисунок 2 – Результаты анализа стандартных частиц с помощью BioDecod.

Дальнейшая обработка данных включает построение точечной диаграммы, при этом возможно выбрать любое соотношение по осям X и Y из всего набора данных - площади и периметра объекта, его интегральной яркости по каналам RGB или суммарной яркости объекта (Рис. 2 а). На основе полученных данных строится столбчатая гистограмма, отображающая распределение уровней флуоресценции объектов, при этом пользователь может выделить интересующую область и получить результаты статистической обработки - среднее значение уровня флуоресценции, стандартное отклонение, коэффициент вариации и количество проанализированных объектов (рис. 2 б).

В дальнейшем нами проведено сравнение данных анализа BioDecod стандартных флуоресцентных частиц с данными, полученными на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter) (Рис. 3.). Сравнительный анализ показал, что количество проанализированных объектов с помощью BioDecod составило 298, а с помощью CytoFlex - 13765, что характерно для цитометрии изображений и проточной цитометрии. Коэффициент вариации CV составил для BioDecod – 7%, для CytoFlex – 8,26%, что является соизмеримым показателем и достаточно хорошим для цитометрии изображений.

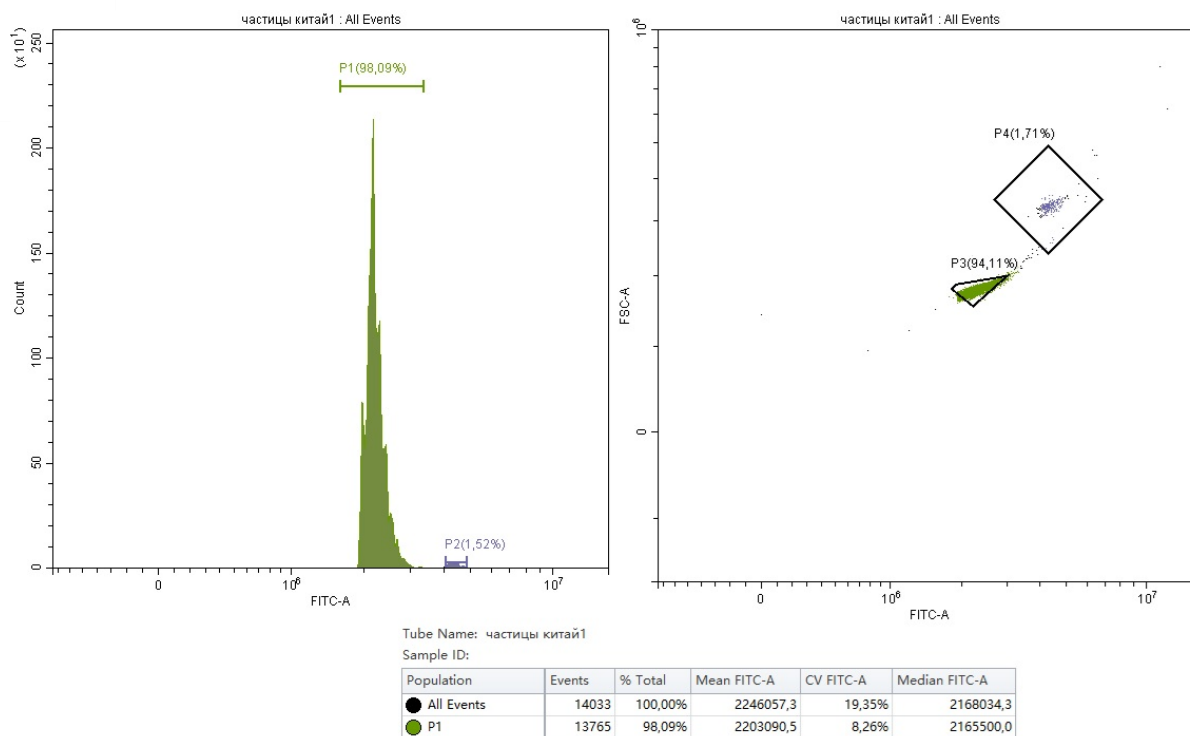


Рисунок 3 – Результаты анализа стандартных частиц с помощью CytoFlex.

В статье была представлена бета-версия программы. В дальнейшем планируется улучшение программного обеспечения и разработка оборудования для получения флуоресцентных изображений.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ «Метод и устройство на основе ДНК-цитометрии изображений для анализа плоидности сельскохозяйственных растений и растений естественной флоры», № 24-26-20100.

Список литературы

- Allalou A., Wahlby C. BlobFinder, a tool for fluorescence microscopy image cytometry // Computer methods and programs in Biomedicine, 2009. – Vol.94, № 1. – P. 58-65. DOI: 10.1016/j.cmpb.2008.08.006
- Salameh N.M. Flow cytometric analysis of nuclear DNA between okra landraces (*Abelmoschus esculentus* L.) // American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 2014. – Vol. 9, № 2. – P. 245–250. DOI: 10.3844/ajabssp.2014.245.250
- Скапцов М.В., Смирнов С.В., Куцев М.Г. Содержание ядерной ДНК в некоторых сортах растений, используемых в качестве внешних стандартов в проточной цитометрии// Turczaninowia, 2014. – Т.17, вып. 3. – С. 72–78. DOI: 10.14258/turczaninowia.17.3.8
- Скапцов М.В., Смирнов С.В., Куцев М.Г., Шмаков А.И. Проблемы стандартизации в проточной цитометрии растений. Turczaninowia, 2016. – Т.19, вып. 3. – С. 120–122. DOI: 10.14258/turczaninowia.19.3.9