文章编号 1674-2915(2009)05-0426-06

白蛋白酸致变性的动态激光散斑研究

李新忠,甄志强,李立本,陈庆东
(河南科技大学 理学院,河南 洛阳 471003)

摘要:利用动态激光散斑法研究了白蛋白的酸致变性过程。基于动态散斑理论模拟生成了动态散斑序列图;利用模拟和实验散斑图生成的时间序列散斑图及其灰度共生矩阵对白蛋白的酸致变性过程进行了分析;最后用灰度共生矩阵的惯性矩和不同阶段的4幅散斑图的平均对比度图分析了不同阶段白蛋白胶体溶液中微粒数量和尺寸的变化。理论模拟和实验研究显示,在白蛋白酸致变性过程中,胶体溶液中的蛋白质微粒的运动由剧烈逐渐变得缓慢;同时,微粒数量减少而微粒尺寸增加。研究结果表明,动态激光散斑法是一种实时、快速、有效地研究白蛋白变性过程的新型检测手段。

关 键 词:白蛋白;酸致变性;激光散斑法;动态测量
中图分类号:TN249; TB94 **文献标识码**:A

Investigation of acid induced denaturation of albumin by dynamic laser speckle method

LI Xin-zhong, ZHEN Zhi-qiang, LI Li-ben, CHEN Qing-dong

(*School of Science*, *Henan University of Science & Technlogy*, *Luoyang* 471003, *China*)

Abstract: The process of the acid-induced denaturation of albumin was studied by using a dynamic laser speckle method in this paper. The dynamic speckle pattern sequences were generated based on the dynamic speckle theory, then the acid induced denaturation process of the albumin was analyzed with the Time History Speckle Patterns(THSP) and its Gray Level Co-occurrence Matrix(GLCM) obtained from simulation and experiments. Furthermore, this denaturation-induced process was investigated by using the inertia moment of the GLCM and the mean contrast methods. The theoretical simulation and the experiment results inducate that the protein particle movement changes from high activity to low activity gradually in the colloid solution during the denaturation process, meanwhile, the quantity of the protein particles decreases while its size increases. These results show that the dynamic laser speckle method is a real-time, quick and effective method to study the acid-induced denaturation of the albumin.

Key words: albumin; acid-induced denaturation; laser speckle method; dynamic measurement

收稿日期:2009-04-21;**修订日期**:2009-08-19

1　引　言

蛋白质分子易受外界因素(温度、变性剂等)影响而发生构象变化,丧失生物活性,引起物理化学性质的异常变化,这一过程称为蛋白质变性。白蛋白是蛋白质中最重要的一种,是维持人体正常生理机能的重要物质。白蛋白含量可作为疾病诊断指标,也是食物加工的重要成分[1]。研究白蛋白组分的稳定性及在外界条件改变时的变性过程具有重要的科学价值,酸致变性是白蛋白变性中最常见的一类现象。在蛋白质的结构和变性研究中传统检测方法有 OCT 光谱[2]、X 射线散射[3]、电泳[4]等手段,但这些手段大都存在花费高、实时性差的缺点。

近年来,动态散斑法在医学生物学中获得了大量的应用[5~10],如大豆种子发育能力研究[5,6]、水果擦伤研究[7]、溶液微粒及血小板凝聚过程研究[8~10]等。尽管动态散斑在生物学中的研究众多,但尚没有见到利用动态散斑法对白蛋白的酸致变性过程进行研究的相关报道。

本文利用动态激光散斑法实现了对白蛋白酸致变性过程的动态实时检测。利用该方法对白蛋白酸致变性过程进行了理论模拟及实验研究,初步获得了白蛋白酸致变性过程中蛋白质分子的絮结信息图像,为研究白蛋白的变性提供了一种新的检测方法。

2　理论基础

2.1　动态散斑序列的模拟生成

动态散斑序列的模拟基于 4f 光学成像系统,动态散斑序列图中每幅散斑图的光强由下式生成[11,12]:

$$I(m,n,k) = |F^{-1}[HF[\exp(\mathrm{i}\phi(m,n,k))]]|^2, \tag{1}$$

其中 $m=n=0,1,\cdots,N-1$ 为 CCD 探测器的像素坐标。$k=0,1,2,\cdots,K-1$ 为散斑图序列的标号,共 K 幅。$\phi(m,n,k)$ 是一个代表粗糙面散射光相位分布的 $N\times N$ 矩阵;i 为虚数单位;F、F^{-1} 分别为傅里叶变换及其逆变换;H 为傅氏平面内半径为 r 的圆形低通滤波器,代表相机透镜的通光孔径。

生成散斑尺寸的平均大小由滤波器的半径决定:

$$s = \frac{N}{2r}. \tag{2}$$

为模拟粗糙平面运动的散斑图,设散斑图序列第 0 幅的相位 $\phi(m,n,0)$ 均匀分布在区间 $(-\pi,\pi)$,其后散斑图的相位为该初始相位加上一个相位差

$$\phi(m,n,k) = \phi(m,n,k-1) + G(m,n,k)\sigma[\Delta\phi(m,n,k-1,k)]$$
$$k = 1,2,\cdots,K-1, \tag{3}$$

其中 $\sigma[\Delta\phi(m,n,k-1,k)]$ 是相位 $\phi(m,n,k-1)$ 和 $\phi(m,n,k)$ 的标准偏差,$G(m,n,k)$ 是均值 $\mu=0$,标准偏差 $\sigma=1$ 符合高斯分布的 $N\times N$ 随机矩阵。(3)式经过一系列变换后,由统计独立可得:

$$-\ln[c(k)] = -\ln[c(k-1)] + \sigma^2[\Delta\phi(k-1,k)], \tag{4}$$

其中 $c(k)$ 为散斑图序列中第 k 幅与第 0 幅图间的相关系数。假设散斑符合正态分布,则有

$$c(k) = \exp(-\sigma^2[\Delta\phi]), \tag{5}$$

由(4)式可以看出,相邻两幅散斑图间的相位差可由其与第 0 幅图的相关系数确定,则第 k 幅图的相位可由下式求出,

$$\phi(m,n,k) = \phi(m,n,k-1) + G(m,n,k)\times\sqrt{\ln c(k-1) - \ln c(k)}, \tag{6}$$

由此可以看出,只要确定相关系数 $c(k)$,即可生成动态散斑序列。

2.2　时间序列散斑图

在动态散斑实验中,获得的散斑图像为 256 pixel×256 pixel 的灰度图,每 256 幅为一组。对每组的散斑图依次抽取出它们的中间一列的光强值重新组成一幅新图像,称为时间序列散斑图(Time History Speckle Pattern, THSP)[13]。具体过程为:抽取第一幅散斑图中的第 128 列元素的光强值作为新图像的第一列;然后,抽取第二幅散斑图第 128 列元素的光强值作为新图像的第二列,依次类推,直到抽取第 256 幅散斑图的第 128 列元素的光强值作为新图像的最后一列。

由一组动态散斑图序列生成的时间序列散斑图,大小也为 256 pixel × 256 pixel。由以上生成过程可知,时间序列散斑图的行代表原散斑图上不同的点,列代表一定时间间隔的同一点光强的变化。样品动态变化将导致时间序列散斑图水平方向(即沿行的方向)的光强变化。当样品变化较慢时,动态散斑图光强变化也较慢,这使得时间序列散斑图在行方向拉伸,形成平行状条纹。若样品变化较快,则动态散斑图光强值变化剧烈,时间序列散斑图样杂乱无章,如通常空域散斑图样。

由于生成的时间序列散斑图具有纹理结构,可以利用灰度共生矩阵(Gray Level Co-occurrence Matrix,GLCM)的方法[14]来定量研究。灰度共生矩阵定义为

$$\boldsymbol{P}(i,j) = [N_{ij}], \tag{7}$$

其中 N_{ij} 的意义为沿水平方向,两个相邻像素光强值中有一个取 i 值、另一个取 j 值的点对数。本文中设纹理方向为水平方向,如果纹理结构简单,则矩阵不为零的元素将集中分布于主对角线附近,如果纹理结构复杂,不为零元素的分布比较分散。

当动态散斑图的光强值随时间变化较慢时,其时间序列散斑图的灰度共生矩阵非零元素主要集中在主对角线附近;反之,非零元素在主对角线附近弥散,呈云状。

为进行定量测量,本文利用灰度共生矩阵的惯性矩进行计算。在特征提取前,首先对灰度共生矩阵做正规化处理,每一行有 $2(N-1)$ 个水平相邻对点,共有 N 行,因此总共有 $2N(N-1)$ 个相邻点对(本文中的所有图像为 $N \times N$ 矩阵),所以其归一化矩阵为

$$\boldsymbol{p}_{ij} = \boldsymbol{P}(i,j)/2N(N-1). \tag{8}$$

灰度共生矩阵的惯性矩(Inertia Moment,为IM)定义为

$$\mathrm{IM} = \sum_i \sum_j (i-j)^2 \boldsymbol{p}_{ij}. \tag{9}$$

从惯性矩的数学定义可以发现,惯性矩不仅与像素的灰度值有关,而且与像素的位置有关。惯性矩的值越大,时间序列散斑图中沿水平方向的相邻像素对的灰度差越大,图像水平方向的纹理越模糊,表明动态散斑运动越剧烈;反之,惯性矩的值越小,水平方向相邻像素对的灰度差也越小;此时,时间序列散斑图水平方向的纹理较清晰,表明动态散斑的运动较平缓。

3 实 验

在研究过程中制备了两种样品,一种是白蛋白溶液,另一种是浓度为 36% 的盐酸溶液。研究白蛋白酸致变性的动态散斑测量原理图如图 1 所示。采用功率为 10 mW、波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光器作为光源。白蛋白置于一微型样品池中,样品池宽度 L 为 1.5 cm。光路离溶液表面的高度 $h_2 = 3$ cm,而盐酸溶液滴下时距液面 h_1 为 1 mm左右,以尽量减少盐酸滴下时对白蛋白溶液的扰动。CCD 相机置于样品池后与光轴成 $\theta = 5°$ 的夹角,目的是避免相机直接接收透射激光束引起 CCD 的饱和。

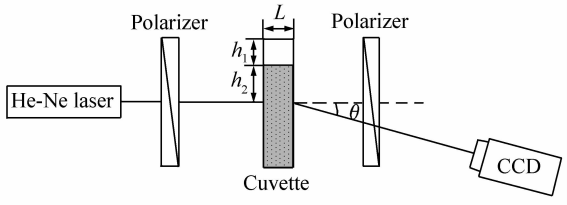

图 1 白蛋白酸致变性动态散斑测量原理图

Fig. 1 Experimental setup of albumin acid-induced denaturation

在实验过程中,He-Ne 激光器发出的激光束经过偏振器件后变为线偏振光,然后垂直照射在样品池的前表面。经过样品池中的白蛋白胶体溶液散射,在像空间利用 CCD 相机接收白蛋白在酸致变性过程中形成的动态散斑图像,图像经过采集卡存储进计算机进行后处理。

4 结果与讨论

图 2 和图 3 分别为白蛋白在酸致变性过程中利用模拟动态散斑图和实验动态散斑图生成的时间序列散斑图及其对应的灰度共生矩阵图。理论模拟结果与实验结果对比可知,白蛋白酸致变性的理论模拟与实验结果符合得较好。实验得到的 THSP 图形存在光强跳跃现象,这可能由于光源的光强不稳定所致。

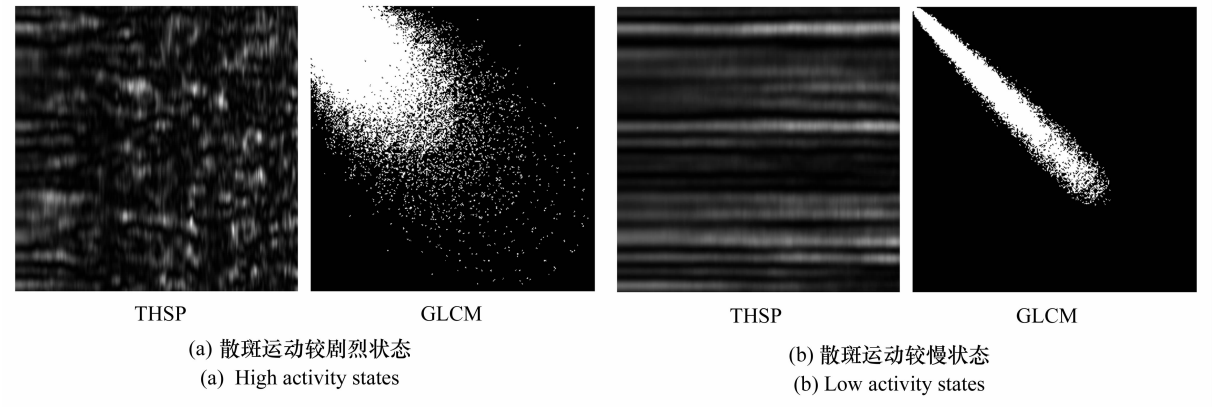

图 2　模拟散斑图的时间序列散斑图及其灰度共生矩阵图

Fig. 2　Simulated THSP and its GLCM

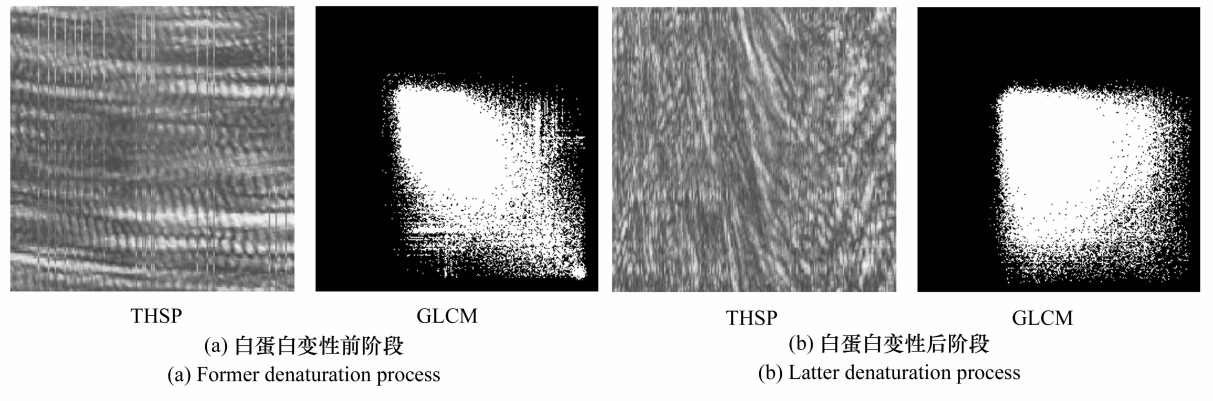

图 3　实验散斑图的时间序列散斑图及其灰度共生矩阵图

Fig. 3　Experimental THSP and its GLCM

图 2、图 3 中,(a)为白蛋白酸致变性过程的前阶段,可以看出,该阶段的时间序列散斑图的纹理较乱,与普通空域散斑图相似,其灰度共生矩阵非零元素沿主对角线向四周弥散;即动态散斑光强值变化很快,说明这一阶段蛋白质分子在盐酸的作用下快速絮结,胶体溶液中的蛋白质微粒布朗运动较剧烈。(b)为白蛋白酸致变性后阶段,可以看出,时间序列散斑图呈水平干涉条纹状,且其灰度共生矩阵非零元素主要沿主对角线方向分布,说明随着酸溶液的增加白蛋白的变性过程逐渐完成,形成的动态散斑图光强值的变化较慢,这是蛋白质分子絮结后体积变大、布朗运动趋缓造成的。

为定量研究白蛋白在酸致变性过程中磁蛋白质微粒的统计特性,进一步计算了 GLCM 的惯性矩,结果如图 4 所示。图 4 中实心方块为模拟值,空心方块为实验值,理论模拟结果与实验计算结

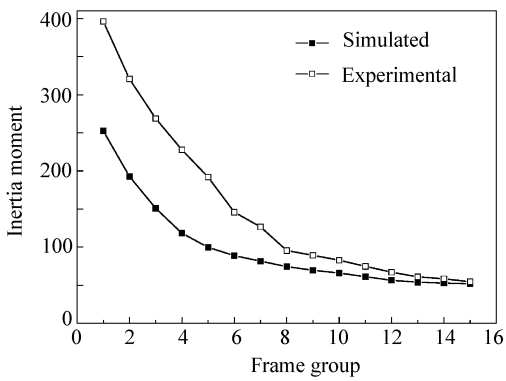

图 4　惯性矩的变化图

Fig. 4　Evolution of inertia moments in simulation

果的变化趋势基本相符。从图4可以看出,在变性过程前阶段,惯性矩的值较大,模拟值在250左右,实验值在400左右;随着白蛋白变性过程的进行,其惯性矩的值也逐渐减小,最后基本不变,模拟值和实验值均在65左右。与此相对应,散斑运动从剧烈逐渐平缓直至不变,说明蛋白质微粒的布朗运动越来越慢,待蛋白质完全变性后,微粒的布朗运动非常缓慢。

此外,在利用激光散斑研究胶体溶液时,散斑图平均对比度与微粒数量和尺寸存在以下规律:当微粒尺寸小于波长时,散斑图的平均对比度与溶液中微粒数量成反比而与微粒尺寸成正比[15]。为进一步研究白蛋白酸致变性过程中微粒数量与尺寸的变化,从动态激光散斑序列图中抽取了不同阶段的4幅散斑图来研究其对比度值的变化,方法如下:对抽取的4幅散斑图像取64 pixel × 64 pixel的子区,计算平均对比度值,然后以4个像素为增量移动子区,遍历整幅散斑图,最后将得到的二维对比度值矩阵灰度图像化,如图5所示。图5中,白色表示低对比度值,黑色表示高对比度值。由图5可以看出,在白蛋白酸致变性的过程中,散斑对比度值由低变高,这说明蛋白质微粒的数量越来越少、尺寸越来越大,分析认为这主要是变性后蛋白质微粒凝聚、絮化所致,与前面的分析结果一致。

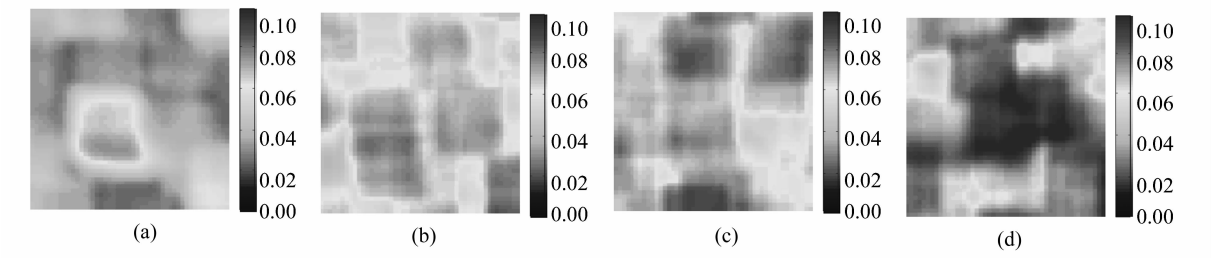

图5 不同阶段4幅散斑图的对比度图

Fig. 5 Contrast ratio images of four speckle patterns in different stages

5 结 论

本文利用动态激光散斑法对白蛋白的酸致变性过程进行了定性分析和定量研究。利用理论模拟和实验产生的动态散斑序列散斑图,生成了时间序列散斑图及其灰度共生矩阵图;分析了GLCM惯性矩的变化趋势;进而利用浑浊介质的散斑对比度方法分析了不同阶段白蛋白胶体溶液中微粒数量和尺寸的变化。研究表明,白蛋白在酸致变性过程中,微粒的运动由剧烈逐渐变得缓慢;而微粒的数量逐渐增多,尺寸逐渐变大。该方法可用于对白蛋白变性的快速、实时、定性检测。

参考文献:

[1] MINE Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality [J]. *Trends Food Sci. Technol.*, 1995, 6(7): 225-232.

[2] MCNALLY K M, SORG B S, BHAVARAJU N C, *et al.*. Optical and thermal characterization of albumin protein solders [J]. *Appl. Opt.*, 1999, 38(31): 6661-6672.

[3] WEIJERS M, de HOOGA E H A, STUART M A C, *et al.*. Heat-induced formation of ordered structures of ovalbumin at low ionic strength studied by small angle X-ray scattering[J]. *Colloids Surface A*, 2005, 270(1-3): 301-308.

[4] MATSUDOMI N, TAKAHASHI H, MIYATA T. Some structural properties of ovalbumin heated at 80 ℃ in the dry state [J]. *Food Res. Int.*, 2001, 34(2-3): 229-235.

[5] BRAGA Jr R A, FABBRO I M D, BOREM F M, *et al.*. Assessment of seed viability by laser speckle techniques[J]. *Biosystems Eng.*, 2003, 86(3): 287-294.

[6] ROMERO G G, MARTINEZ C C, ALANÍS E E, *et. al.*. Bio-speckle activity applied to the assessment of tomato fruit ripe-

ning[J]. *Biosystems Eng.*,2009,103(1):116-119.

[7] PAJUELOA M,BALDWINA G,RABAL H,*et al.*. Bio-speckle assessment of bruising in fruits[J]. *Opt. Lasers Eng.*, 2003,40(1-2):13-24.

[8] PIEDERRIRE Y,CARIOU J,GUERN Y,*et al.*. Scattering through fluids:speckle size measurement and Monte Carlo simulations close to and into the multiple scattering[J]. *Opt. Exp.*,2004,12(1):176-188.

[9] PIEDEIIERE Y,MEUR J L,CARIOU J. Particle aggregation monitoring by speckle size measurement:application to blood platelets aggregation[J]. *Opt. Exp.*,2004,12(19):4596-4601.

[10] PIEDERRIRE Y,BOULVERT F,CARIOU J,*et al.*. Backscattered speckle size as a function of polarization: influence of particle-size and -concentration[J]. *Opt. Exp.*,2005,13(13):5030-5039.

[11] DAVILA A,KAUFMANN G H,KERR D. Digital processing of electronic speckle pattern interferometry addition fringes [J]. *Appl. Opt.*,1994,33(25):5964-5969.

[12] FEDERICO A,KAUFMANN G H,GALIZZI G E,*et al.*. Simulation of dynamic speckle sequences and its application to the analysis of transient processes[J]. *Opt. Commu.*,2006,260(2):493-499.

[13] ALLAM S,ADEL M,REFREGIER P. Fast algorithm for texture discrimination by use of a separable orthonormal decomposition of the co-occurrence matrix[J]. *Appl. Opt.*,1997,36(32):8313-8321.

[14] ARIZAGA R,TRIVI M,RABAL H. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis[J]. *Opt. Laser Technol.*,1999,31(2):163-169.

[15] AYERS M R,HUNT A J. Observation of the aggregation behavior of silica sols using laser speckle contrast measurements [J]. *J. Non-Cryst. Solids*[J],2001,290:122-128.

作者简介:李新忠(1979—),男,山东邹平人,博士,副教授。主要从事光电信息及其图像处理技术方面的研究。
E-mail: lixinzhong7922@163.com