

文章编号: 0258-7025(2008)12-2060-05

基于小波熵的白蛋白热变性动态散斑研究

李新忠¹ 台玉萍² 甄志强¹ 郭先红¹ 汤正新¹

(河南科技大学¹ 理学院; ² 化工与制药学院, 河南 洛阳 471003)

摘要 利用基于小波熵的动态散斑方法研究了白蛋白的热变性过程。采用 CCD 相机得到了白蛋白热变性过程中的动态散斑图序列;用动态散斑图序列生成了时序散斑图(THSP),再以小波熵为参数,将 THSP 的每一行分为 8 个时间窗口,利用 db4 正交小波对每个窗口进行了三级小波分解,得到了 $256 \times 256 \times 8$ 的三维小波熵值矩阵。对小波熵值矩阵图像化为 8 幅 256×256 的灰度图,直观分析了动态散斑信号的变化规律,进而分析了白蛋白热变性过程中蛋白质分子系综的运动特性。结果表明,利用基于小波熵的动态散斑方法,能对白蛋白热变性过程中蛋白质分子的运动及凝聚过程进行初步的定量分析和研究。该方法是研究溶液中微粒运动的有力手段。

关键词 医用光学与生物技术;白蛋白;热变性;动态散斑;小波熵

中图分类号 TN249;TB94 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20083512.2060

Investigation of Thermal Denaturation of Albumin Using Dynamic Speckle Based on Wavelet Entropy

Li Xinzhong¹ Tai Yuping² Zhen Zhiqiang¹ Guo Xianhong¹ Tang Zhengxin¹

(¹Department of Mathematics & Physics; ²Chemical Engineering & Pharmaceuticals College,)
Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract The process of thermal denaturation of the albumin was studied using dynamic speckle method based on wavelet entropy. At first, the dynamic speckle pattern sequences generated by albumin colloid during denaturing were acquired using charge-coupled device (CCD) camera. Using the speckle sequences, the time history of speckle patterns (THSP) were generated. And then, with the wavelet entropy as a parameter, each row of THSP was separated into eight time windows which were decomposed by db4 orthogonal wavelet family into three levels. Thus a three-dimensional matrix of $256 \times 256 \times 8$ of wavelet entropy was generated. Finally, this matrix was grayed into eight 256×256 patterns, which made the change of dynamic speckle signals visualized. According to the patterns, the movement properties of the protein molecule ensemble were analyzed during thermal denaturation of the albumin. The results show that this method is effective to analyze the process of movement and aggregation of protein molecules quantitatively. Experimental results prove that this method is a useful tool to investigate the motion of particles in solution.

Key words medical optics and biotechnology; albumin; thermal-denaturation; dynamic speckle; wavelet entropy

1 引言

白蛋白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,是食品加工的重要成分^[1]。在蛋白质的结构和变性^[2]研究中主要通过光学相干层析成像(OCT)光谱^[3]、X 射线散

射^[4]、电泳^[5]、超声^[6]等手段进行分析,大都存在花费高、实时性差的缺点。

散斑测试技术作为一种无损测量方法在许多方面得到了广泛的应用^[7~10]。而当测试样品随时间动态变化时,产生的散斑图也随时间动态变化,称为

收稿日期:2008-04-15;收到修改稿日期:2008-07-15

基金项目:河南科技大学博士科研启动基金资助项目。

作者简介:李新忠(1979-),男,山东人,博士,副教授,主要从事光电信息及其图像处理技术的研究。

E-mail: lixinzhong7922@yahoo.com.cn

动态散斑^[11~19]。应用主要集中在两个方面:一是利用动态散斑的时序散斑图及其灰度共生矩阵方法进行研究,如:大豆种子发育能力研究^[12]、水果擦伤研究^[13]、溶液微粒及血小板凝聚过程研究^[14~16]等;二是利用散斑图平均对比度方法进行研究,如:毛细血流动监测^[17]、心脏内微位移测量^[18]、肺组织局部分析^[19]等。

本文试利用动态散斑的方法来实现对白蛋白热变性过程的实时动态检测。对白蛋白热变性过程中获得的动态散斑序列图进行处理,得到时序散斑(THSP)图像;然后,利用小波熵分析方法,对白蛋白热变性的动态变化信息及其规律进行了初步研究。

2 测量原理

小波变换作为图像处理的工具已被应用在很多领域^[20],通过小波函数的伸缩和平移可以实现对信号的局部细节及整体概貌的多分辨率分析。小波分析方法是选择合适的小波基获得振幅分布。如果小波基函数是正交的,时间函数就能被唯一地分解,而且这种分解是可逆的。假设有一信号 $S(t)$,其小波变换是通过它与小波基函数的内积来实现的^[21,22],

$$C_j(k) = \langle S, \Psi_{j,k} \rangle, \quad (1)$$

然后,再通过唯一可容性小波母函数的伸缩和平移得到小波族 $\Psi_{a,b}$,

$$\Psi_{a,b}(t) = |a|^{-1/2} \Psi\left(\frac{t-b}{a}\right), \quad (2)$$

式中 $a, b \in \mathbb{R}$, $a \neq 0$, 分别代表小波尺度和平移参数, t 为时间因子。由方程(2)可以看出,小波族是通过小波母函数的尺度函数的伸缩和平移得到的。小波变换具有多分辨率的特性,能够对某一感兴趣的区域进行放大分析,被誉为数学显微镜。小波母函数 $\{\Psi_{a,b}(t)\}$ 是空间 $L^2(\mathbb{R})$ 上的正交基,每一采样时间的小波系数由方程(1)给定。小波能量借用了傅里叶频谱理论中的能量概念,小波分解的每一级的能量定义为其相应的细节分辨率。

将一组动态散斑序列图生成的 THSP 的行分成长度为 L 的时间窗口,每个时间窗口的编号 i ($i = 1, \dots, N_w$, 其中 $N_w = \text{信号长度}/L$)。利用下面的表达式

$$E_j^{(i)} = \frac{1}{N_j} \sum_{k=0}^{(L/2^j)-1} |C_{k,j,i}|^2, i = 1, \dots, N_w \quad (3)$$

来获得信号细节 j 在每一窗口 i 的平均小波能

量^[23]。式中 N_j 为时间窗口 i, j 分析的小波系数。因此,区间 i 的总能量可表示为

$$E_{\text{total}}^{(i)} = \sum_{j<0} E_j^{(i)}. \quad (4)$$

THSP 的行在窗口 i 的小波能量可表示为

$$p_j^{(i)} = \frac{E_j^{(i)}}{E_{\text{total}}^{(i)}}. \quad (5)$$

根据 Shannon 熵理论,信号 S 在时间窗口 i 的小波熵 W (Wavelet Entropy) 可定义为

$$S^{(i)} = - \sum_{j<0} p_j^{(i)} \cdot \ln(p_j^{(i)}). \quad (6)$$

由信息论可知,熵是动态系统有序和无序的相对度量。利用小波熵,不需要进行特殊分布的假设。信号越规律,其熵值越低。以小波变换为基础的熵不仅能表明信号的规律与不规律的程度,而且能提供与信号动态处理有关的额外信息。

3 实验

图 1 是白蛋白热变性动态散斑研究的测量原理图,采用功率为 10 mW,波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光器作为光源。在 I_0/e^2 光强处,光斑直径为 1.5 mm,其中, I_0 为最大激光强度;相干长度约为 50 cm。白蛋白置于一微型样品池中,样品池宽度 l 为 1.5 cm,样品池放在加热台上。CCD 相机放置在样品池后边,距样品池的距离 D 为 50 cm 且与光轴成一夹角 $\theta = 5^\circ$ 。目的是避免相机直接接收透射激光束。

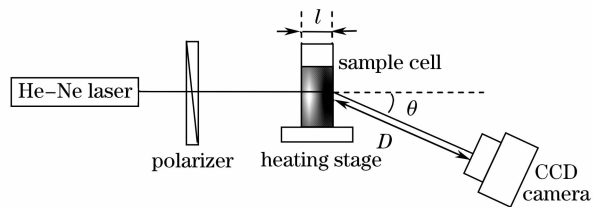


图 1 白蛋白热变性动态散斑测量原理图
Fig. 1 Experimental setup for studying albumin denaturation using dynamic speckle method

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态溶液散射,在像空间利用 CCD 相机接收白蛋白在热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续处理。

4 结果与讨论

在加热台对样品池开始加热的同时,CCD 相机

开始记录散斑图像,拍摄速度为 25 frame/s,每幅散斑图像大小为 256 pixel \times 256 pixel。

从动态散斑序列图中取出 256 幅进行分析,抽取出每幅图的中间一列组合生成 THSP 图像^[24,25]。然后利用小波熵的方法处理 THSP 图像,进而分析白蛋白胶态溶液中蛋白质分子系综的运动变化规律。

散斑图序列的 THSP 图及其灰度共生矩阵图 (GLCM: Gray Level Co-occurrence Matrix) 如图 2 (a),(b)所示。由图 2(a)可以看出 THSP 呈散斑颗粒状,只在右侧边缘出现部分条纹状,这说明散斑图序列初始的变化比较剧烈,然后逐渐平缓。说明蛋白质分子在加热过程中其运动从剧烈至平缓。原因是加热后,白蛋白胶态溶液中的蛋白质分子逐渐凝结,颗粒越来越大,其平均自由程和运动速率逐渐变小。图 2 (b)是与 (a)对应的灰度共生矩阵图, GLCM 图呈弥散状,说明散斑图像的变化剧烈。

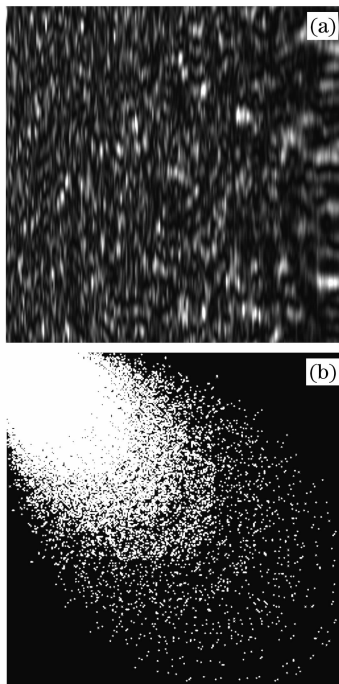


图 2 动态散斑图的 THSP 图(a)及其灰度共生矩阵图(b)

Fig. 2 THSP (a) and its GLCM (b) patterns generated by dynamic speckle pattern sequences

图 3 是 THSP 第 128 行的散斑信号光强曲线图及其 db4 小波 5 级分解尺度图。图中横坐标的像素数对应于产生 THSP 散斑图序列的拍摄时间,纵坐标的灰度级对应光强。与以上分析相对应,该行散斑光强在加热前阶段的起伏比较剧烈,即白蛋白胶态溶液中的蛋白质分子聚集、凝结、絮化过程急剧变化。在信号末端,信号的起伏趋于平缓,说明白蛋

白胶态溶液的变化缓慢。通过分析可知,随着加热的进行,蛋白质微粒运动呈规则性增强且运动逐渐变慢。

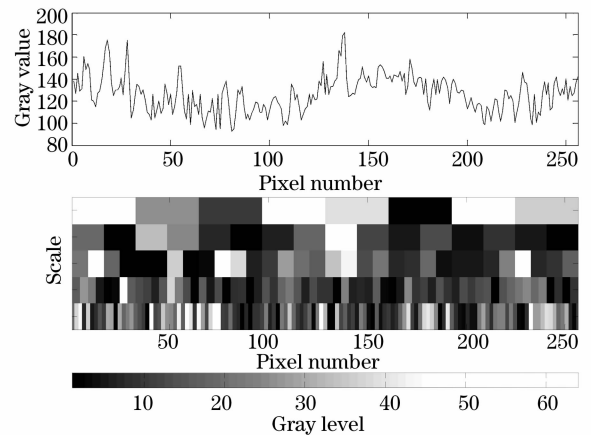


图 3 THSP 图第 128 行的散斑信号及其离散小波变换 (DWT) 分解

Fig. 3 Speckle signal evolution and its DWT decomposition at 128th row of THSP

将 THSP 的每一行分为 8 个时间窗口,利用 db4 正交小波母函数,对每个窗口进行三级小波分解。因此,每一细节的能量可以通过式(5)获得,其时间窗口的总熵可以通过式(6)得到。图 4 是 THSP 第 128 行 8 个窗口的小波熵值的变化曲线,从图中可以得知,小波熵值从最初的 0.8 左右逐步下降,呈单调递减趋势。相应地,白蛋白胶态体系中蛋白质分子的运动也逐渐由不规则变得规律,即微粒越来越大,限制作用越来越强。

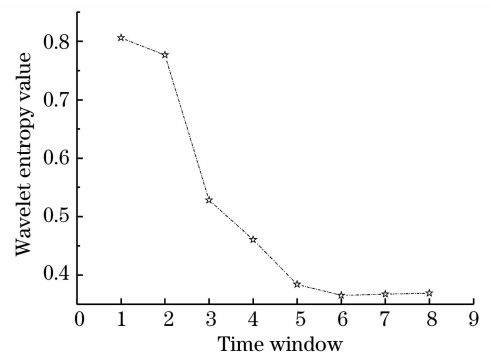


图 4 小波熵值随时间窗口的变化图

Fig. 4 Wavelet entropy values of different temporal windows

利用小波熵的方法对实验中获得的 256 幅散斑图进行处理,即将每个时间窗口下的小波熵值转化为灰度图进行分析。首先,从 256 幅散斑图中依次抽取出每一列组成 256 幅 THSP 图。然后,对 THSP 的每一行等分为 8 个窗口计算其熵值,得到

一个 256×8 矩阵, 当 256 幅 THSP 图处理完毕后, 得到一个 $256 \times 256 \times 8$ 的三维矩阵, 可以认为是 8 个二维小波熵值矩阵。最后, 将这 8 个二维矩阵灰度化, 如图 5 所示。

图 5 为 8 幅图像组合而成, 为便于识别, 图像之间用白线分割。图像中颜色越暗小波熵值越小, 颜色越亮小波熵值越大。

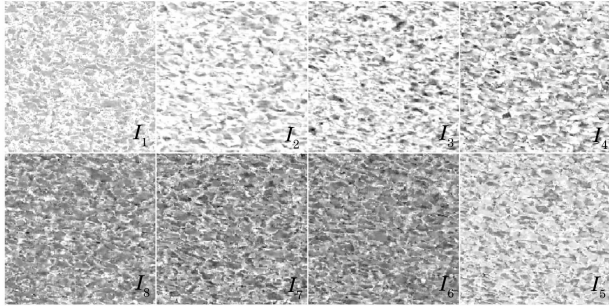


图 5 不同时间窗口下小波熵值的变化图

Fig. 5 Wavelet entropy images of different temporal windows

从图 5 可以看出, 256 幅散斑图在 8 个时间窗口下的变化趋势基本可以分为两个阶段: $I_1 \sim I_5$ 阶段; $I_6 \sim I_8$ 阶段。在白蛋白的加热前阶段 ($I_1 \sim I_5$), 图像亮度高且区域性非常明显, 这说明图像的小波熵值较大, 即在加热前, 随着水分的挥发, 白蛋白溶液中的蛋白质分子运动剧烈, 迅速凝聚和絮化, 且这一过程具有一定的定域特性, 即某一区域内的运动特性相似。而在加热后阶段 ($I_6 \sim I_8$), 图像的区域特性依然明显, 不同的是图像的亮度明显降低, 说明后三个时间窗口的小波熵值明显降低, 即信号的规律性增强。这可能由于随着加热的进行, 蛋白质分子系综分区凝絮化, 由于分子成块使其平均自由程变短, 运动越来越规律所致。

5 结 论

利用动态散斑的方法对白蛋白热变性过程中蛋白质分子系综的运动特性进行了分析研究。利用白蛋白胶态溶液在热变性过程中形成的动态散斑图, 生成了时序散斑图, 然后利用小波分析的手段进行了 db4 小波 5 级尺度分解分析、小波熵窗口熵值的变化研究及对分子系综的小波熵灰度图像化研究。初步得到了白蛋白热变性过程蛋白质分子系综的运动规律和特性。下一步的研究重点是分析白蛋白热变性对其生物功能的影响^[26,27]; 白蛋白热变性过程蛋白质分子构象的变化; 建立动态散斑图的演化规律与白蛋白分子运动间的映射关系。

参 考 文 献

- Yoshinod Mine. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1995, **6**: 225~232
- Sachurfu, Luo Liaofu. The research on the thermal denaturation process of protein [J]. *Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition)*, 2002, **31**(4): 337~342
- 萨楚尔夫, 罗辽复. 蛋白质热变性现象的研究 [J]. *内蒙古师范大学学报(自然科学(汉文)版)*, 2002, **31**(4): 337~342
- Karen M. McNally, Brian S. Sorg, Naresh C. Bhavaraju et al.. Optical and thermal characterization of albumin protein sorders [J]. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(31): 6661~6672
- Mireille Weijers, Els H. A. de Hooga, Martien A. Cohen Stuart et al.. Heat-induced formation of ordered structures of ovalbumin at low ionic strength studied by small angle X-ray scattering [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2005, **270**: 301~308
- Natoshi Matsudomi, Hidekazu Takahashi, Takeshi Miyata. Some structural properties of ovalbumin heated at 80 in the dry state [J]. *Food Research International*, 2001, **34**: 229~235
- B. N. Waris, U. Hasan, N. Srivastava. Stabilisation of ovalbumin by maltose [J]. *Thermochimica Acta*, 2001, **375**: 1~7
- Chen Fanxiu, He Xiaoyuan, Lin Baoping. Application of micro-digital speckle correlation technique to study mechanical property of advanced thin film material [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(8): 1104~1108
- 陈凡秀, 何小元, 林保平. 显微数字散斑相关测量新型薄膜的力学性能 [J]. *中国激光*, 2006, **33**(8): 1104~1108
- Yang Xia, Yu Qifeng, Fu Sihua. Adaptive window filter for electric speckle pattern interferometry fringe pattern [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(4): 625~630
- 杨 夏, 于起峰, 伏思华. 散斑条纹图的自适应窗口滤波方法 [J]. *光学学报*, 2007, **27**(4): 625~630
- Liu Haowen, Zhang Qingchuan, Wu Xiaoping et al.. Investigation on the three-dimensional deformation of local shearing band by digital speckle metrology technique [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(5): 898~902
- 刘颀文, 张青川, 伍小平等. 数字散斑法在局域剪切带三维变形研究中的应用 [J]. *光学学报*, 2007, **27**(5): 898~902
- Chen Bingquan. Defect measurement based on rotating aperture-stroboscopic speckle interferometry [J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(1): 76~79
- 陈炳泉. 旋转孔径频闪散斑干涉法用于缺陷检测 [J]. *中国激光*, 2007, **34**(1): 76~79
- Federico, Kaufmann G. H., Galizzi G. E.. Simulation of dynamic speckle sequences and its application to the analysis of transient processes [J]. *Opt. Commun.*, 2006, **260**(2): 493~499.
- Jr R. B., Fabbro I. M., Borem F. M. et al.. Assessment of seed viability by laser speckle techniques [J]. *Biosystems Engineering*, 2003, **86**(3): 287~294.
- M. Pajueloa, G. Baldwina, H. Rabal et al.. Bio-speckle assessment of bruising in fruits [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2003, **40**: 13~24
- Y. Piederrière, J. Cariou, Y. Guern et al.. Scattering through fluids: speckle size measurement and Monte Carlo simulations close to and into the multiple scattering [J]. *Opt. Express.*, 2004, **12**(1): 176~188
- Y. Piederrière, J. L. Meur, J. Cariou. Particle aggregation monitoring by speckle size measurement; application to blood platelets aggregation [J]. *Opt. Express.*, 2004, **12**(19): 4596~4601

- 16 Y. Piederrière, F. Boulvert, J. Cariou. *et al.*. Backscattered speckle size as a function of polarization; influence of particle-size and -concentration [J]. *Opt. Express.*, 2005, **13**(13): 5030~5039
- 17 J. D. Briers, G. Richards, X. W. He. Capillary blood flow monitoring using laser speckle contrast analysis(LASCA) [J]. *J. Biomed. Opt.*, 1999, **4**: 164~175
- 18 Damon J. Kelly, Evren U. Azeloglu, Paul V. Kochupura *et al.*. Accuracy and reproducibility of a subpixel extended phase correlation method to determine micron level displacements in the heart [J]. *Medical Engineering & Physics*, 2007, **29**: 154~162
- 19 M. J. Kitchen, D. Paganin, R. A. Lewis *et al.*. Analysis of speckle patterns in phase-contrast images of lung tissue [J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 2005, **548**: 240~246
- 20 Margarita Fernandez Limia, Adriana Mavilio Nunez, Hector Rabal *et al.*. Wavelet transform analysis of dynamic speckle patterns texture [J]. *Appl. Opt.*, 2002, **41**(32): 6745~6750
- 21 Osvaldo A. Rosso, Susana Blanco, Juliana Yordanova *et al.*. Wavelet entropy: a new tool for analysis of short duration brain electrical signals [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2001, **105**: 65~75
- 22 R. A. Braga, Jr., G. W. Horgan, A. M. Enes *et al.*. Biological feature isolation by wavelets in biospeckle laser images [J]. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2007, **58**(2): 123~132
- 23 I. Passoni, A. Dai Pra, H. Rabal *et al.*. Dynamic speckle processing using wavelets based entropy [J]. *Opt. Commun.*, 2005, **246**: 219~228
- 24 A. Federico, G. H. Kaufmann, G. E. Galizzi. *et al.*. Simulation of dynamic speckle sequences and its application to the analysis of transient processes [J]. *Opt Commun.*, 2006, **260**(2): 493~499.
- 25 Li Xinzhong, Dai Qin, Wang Xijun *et al.*. Dynamic speckle method for studying the drying process of magnetic fluid film [J]. *J. Optoelectronics • Laser*, 2007, **18**(8): 959~962.
李新忠, 岱 钦, 王希军 等. 用动态散斑法研究磁流体薄膜的干燥过程 [J]. *光电子 • 激光*, 2007, **18**(8): 959~962.
- 26 C. Guerin-Dubiard, M. Pasco, A. Hietanen *et al.*. Hen egg white fractionation by ion - exchange chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1090**: 58~67
- 27 James A. Huntington, Penelope E. Stein. Structure and properties of ovalbumin [J]. *Journal of Chromatography B*, 2001, **756**: 189~198