

分类号: _____

密级: _____
公开

UDC _____

学号: 2022023414

华南师范大学

South China Normal University

硕士 学位 论文

(专业学位)

FRET 双杂交分析数据处理软件的设计与开发

学位申请人: 魏智强

专业名称: 光电信息工程

研究方向: 荧光图像分析

所在院系: 光电科学与工程学院

导师姓名及职称: 胡敏 实验师

2025 年 3 月 23 日

FRET 双杂交分析数据处理软件的设计与开发

专业名称：光电信息工程

申请者：魏智强

导师：胡敏 实验师

摘要

福斯特共振能量转移 (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) 技术被广泛用于探究活细胞中生物大分子的动态相互作用过程，如生物大分子的构象变化、蛋白质相互作用、信号通路中蛋白质间的调节机制等，在研究生命科学基础问题、疾病的发生发展和药物研发等方面具有广阔的应用前景。FRET 双杂交分析不仅可以在活细胞内原位实时测量蛋白质间真实的相互作用，还能给出蛋白质结合的相对亲和力及化学计量比。目前主流的活细胞 FRET 双杂交分析方法是基于以供体 / 受体为中心的 FRET 效率 (E_D 或 E_A) 与自由受体 / 供体浓度 (A_{free} 或 D_{free}) 之间关系，即 E_D-A_{free} 或 E_A-D_{free} 进行朗缪尔拟合的方法 (L-FRET)，但是其鲁棒性较差，对细胞样本制备和数据分析的要求极为苛刻。为此，有团队发展了基于 FRET 效率与受供体浓度比 (R_C)，即 E_D-R_c 或 E_A-1/R_C 线性分离的方法 (DC-FRET)。

然而，FRET 双杂交分析技术的数据处理仍然是一个繁琐且耗时的过程。数据处理过程需要借助 Zeiss ZEN、HCImage、MATLAB 或 Excel 等多种专业软件，频繁切换软件界面和数据导入导出，操作繁琐，易出错。ROI 标注依赖人工手动

标注，数据处理过程中存在较大的主观性和不确定性，且数据处理过程中的数据量大、操作复杂，容易出现错误。为了解决现有 FRET 双杂交分析数据处理流程繁琐、人工操作依赖性强等问题，需要设计一款规范化、自动化的数据处理软件，并开发对应的 FRET 图像处理算法，以实现 FRET 双杂交分析数据处理的规范化、自动化。

针对活细胞 FRET 双杂交分析数据处理流程繁琐、人工操作依赖性强等问题，本文设计并开发了一款全自动数据处理软件 Fretha，实现了从原始图像到化学计量比结果的全流程自动化处理。本文的主要工作和创新点如下：

- (1) 首次设计并实现了 FRET 双杂交分析数据处理软件 Fretha，该软件基于分层架构（表现层、业务层、数据访问层和数据层）构建，支持 E-FRET、 3^3 -FRET、L-FRET 和 DC-FRET 等多模态分析方法，集成了成像参数设置、数据校验、自动 ROI 选取、FRET 定量计算及双杂交拟合等核心功能。通过封装 FRET 计算器、图像分析库和双杂交求解器，实现了从原始图像到化学计量比结果的全流程自动化处理，显著减少了人工干预步骤，提升了数据处理效率。软件采用 Qt 5.15.2 开发，支持跨平台部署，并通过 OpenCV 和 Dlib 库实现图像处理与优化计算，确保了算法的高效性和可扩展性。
- (2) 首次研发了基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法 (LURS)，该算法通过多通道自适应阈值分割、变异系数均匀性评估和连通区域分析，实现了荧光图像中高信噪比区域的精准识别。算法创新性地结合亮度 (Luminance) 和均匀度 (Uniformity) 双指标筛选 ROI，通过高斯平滑预处理和三通道掩码合并，有效排除低亮度背景和灰度突变区域。实验表明，LURS 在标准质粒 C4Y/C10Y/C40Y/C80Y 的 E-FRET 测量中， E_A 与 E_D 值与文献报道误差小于 5%， R_C 偏差不超过 0.05，且处理速度较人工操作提升 80% 以上。结合 DC-FRET 方法的自动数据范围选取策略，成功实现了 FRET 双杂交分析的全

流程自动化。

(3) 对 Fretha 软件进行了系统性测试与评估，功能测试表明，软件支持多参数动态更新、异常数据隔离和结果可视化，数据处理精度与文献值高度吻合。算法性能对比显示，LURS 在 1.4GB 数据集上单 ROI 处理时间仅 6.6ms，内存占用 800MB，显著优于 ilastik (35.2ms/1.8GB) 和 SAM-Med2D (50.7ms/14GB)。稳定性测试显示，软件在 48 小时连续运行和高频操作下保持稳定，资源占用无显著波动，适用于高通量药物筛选等场景。

Fretha 的推出为活细胞 FRET 双杂交分析提供了标准化、自动化的解决方案，有望推动该技术在精准医疗和药物研发中的大规模应用。

关键词：FRET；FRET 定量分析；荧光图像；FRET 双杂交分析；自动数据处理

Design and Development of Data Processing Software for FRET Two-Hybrid Analysis

Major: Optoelectronic Information Engineering

Name: Zhiqiang Wei

Supervisor: Min Hu

ABSTRACT

Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technology is widely used to study the dynamic interactions of biomolecules in living cells, such as conformational changes of biomolecules, protein-protein interactions, and regulatory mechanisms between proteins in signaling pathways. It has broad application prospects in the study of basic issues in life sciences, the occurrence and development of diseases, and drug development. FRET two-hybrid analysis can not only measure the real interaction between proteins in living cells *in situ* in real time, but also provide the relative affinity and stoichiometry of protein binding. The mainstream method for analyzing FRET two-hybrid analysis in living cells is based on the relationship between FRET efficiency (E_D or E_A) and the free acceptor/donor concentration (A_{free} or D_{free}), i.e., E_D-A_{free} or E_A-D_{free} , which is fitted by Langmuir fitting method (L-FRET). However, its robustness is poor, and it has extremely strict requirements for cell sample preparation and data analysis. To this end, some teams have developed a method based on the linear separation of FRET efficiency and the acceptor/donor concentration ratio (R_C), i.e., E_D-R_c or E_A-1/R_C (DC-FRET).

However, the data processing of FRET two-hybrid analysis technology is still a cumbersome and time-consuming process. The data processing process requires the use of a variety of professional software such as Zeiss ZEN, HCImage, MATLAB, or Excel, frequent switching of software interfaces and data import and export, cumbersome operation, and easy errors. ROI labeling depends on manual labeling, and there is a large subjectivity and uncertainty in the data processing process, and the data volume is large and the operation is complex, which is prone to errors. In order to solve the problems of the cumbersome data processing flow and strong dependence on manual operation in the existing FRET two-hybrid analysis data processing flow, it is necessary to design a standardized and automated data processing software and develop corresponding FRET image processing algorithms to achieve FRET two-hybrid analysis data processing Standardization and automation.

Aiming at the problems of cumbersome data processing flow and strong dependence on manual operation in living cell FRET two-hybrid analysis, this paper designs and develops a fully automatic data processing software Fretha, which realizes the full-process automation processing from original image to stoichiometry results. The main work and innovations of this paper are as follows:

- (1) For the first time, the FRET two-hybrid analysis data processing software Fretha was designed and implemented. The software is built based on a layered architecture (presentation layer, business layer, data access layer, and data layer), supports multiple analysis methods such as E-FRET, 3³-FRET, L-FRET, and DC-FRET, and integrates imaging parameter setting, data verification, automatic ROI selection, FRET quantitative calculation, and two-hybrid fitting. Core functions such as. By encapsulating the FRET calculator, image analysis library, and two-hybrid solver, the full-process

automation processing from the original image to the stoichiometry result is realized, significantly reducing manual intervention steps and improving data processing efficiency. The software is developed using Qt 5.15.2, supports cross-platform deployment, and uses OpenCV and Dlib libraries to implement image processing and optimization calculations, ensuring the high efficiency and scalability of the algorithm.

- (2) For the first time, an automatic ROI selection algorithm (LURS) based on luminance and uniformity was developed. The algorithm accurately identifies high signal-to-noise ratio regions in fluorescence images through multi-channel adaptive threshold segmentation, coefficient of variation uniformity evaluation, and connected region analysis. The algorithm innovatively combines luminance and uniformity double indicators to screen ROIs, effectively eliminates low-luminance backgrounds and grayscale abrupt regions through Gaussian smoothing preprocessing and three-channel mask merging. Experiments show that in the E-FRET measurement of standard plasmids C4Y/C10Y/C40Y/C80Y, the E_A and E_D values are less than 5% of the reported errors, and the R_C deviation does not exceed 0.05, and the processing speed is more than 80% higher than manual operation. Combined with the automatic data range selection strategy of the DC-FRET method, the full-process automation of FRET two-hybrid analysis was successfully realized.
- (3) Systematic testing and evaluation of the Fretha software were carried out. Functional tests show that the software supports dynamic updates of multiple parameters, isolation of abnormal data, and result visualization, and the data processing accuracy is highly consistent with the literature values. Algorithm performance comparison shows that LURS processes a single ROI in 6.6ms on a 1.4GB dataset, with a mem-

ory footprint of 800MB, significantly better than ilastik (35.2ms/1.8GB) and SAM-Med2D (50.7ms/14GB). Stability tests show that the software remains stable under continuous operation for 48 hours and high-frequency operation, with no significant fluctuations in resource usage, suitable for high-throughput drug screening and other scenarios.

The launch of Fretha provides a standardized and automated solution for living cell FRET two-hybrid analysis, which is expected to promote the large-scale application of this technology in precision medicine and drug development.

KEY WORDS: FRET, FRET quantitative analysis, FRET two-hybrid assay, Automated data processing

目 录

摘要	I
ABSTRACT	V
1 绪论	1
1.1 福斯特共振能量转移 (FRET)	1
1.1.1 FRET 原理概述	1
1.1.2 FRET 在生物学中的应用	2
1.1.3 基于受体敏化发射的 FRET 定量测量方法 (E-FRET)	3
1.2 FRET 双杂交分析	5
1.2.1 基于 Langmuir 模型曲线拟合的 FRET 双杂交分析 (L-FRET)	5
1.2.2 基于 FRET 效率 E_D 和受供体浓度比 R_C 线性分离的 FRET 双杂交分析 (DC-FRET)	7
1.3 FRET 图像处理方法现状	9
1.3.1 传统的图像处理方法	9
1.3.2 基于深度学习的 FRET 图像分析方法	10
1.4 本文的工作内容和意义	11
1.5 本文的章节安排	12
2 Fretha 的设计和开发	15
2.1 引言	15
2.2 需求分析和总体设计	15
2.2.1 需求分析	15
2.2.2 模块划分和界面设计	16
2.2.3 软件总体框架	19
2.2.4 开发技术选型	21
2.3 FRET 算法和后台接口	22
2.3.1 FRET 定量计算器	22

2.3.2 FRET 图像处理器	23
2.3.3 FRET 双杂交求解器	24
2.4 功能模块的实现	29
2.4.1 成像参数设置模块	29
2.4.2 数据检验模块	30
2.4.3 FRET 图像处理模块	33
2.4.4 数据管理模块	36
2.4.5 结果可视化模块	39
2.5 本章小结	41
3 自动 FRET 双杂交分析数据处理算法	43
3.1 引言	43
3.2 材料与方法	43
3.2.1 细胞培养和转染	43
3.2.2 FRET 成像系统	44
3.2.3 基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法 (LURS)	44
3.2.4 DC-FRET 方法的数据范围选取	48
3.3 实验结果	49
3.3.1 标准质粒验证实验	49
3.3.2 模型质粒验证实验	50
3.3.3 活细胞中 Bcl-xL-Bak 化学计量比的自动分析	51
3.4 本章小结	53
4 Fretha 的测试	55
4.1 引言	55
4.2 Fretha 功能测试	55
4.2.1 成像参数设置模块测试	55
4.2.2 数据检验模块测试	56
4.2.3 FRET 图像处理模块测试	57
4.2.4 数据管理模块测试	60
4.2.5 结果可视化模块测试	60

4.3 自动算法性能分析	61
4.4 Fretha 稳定性测试	64
4.5 本章小结	65
5 总结与展望	67
5.1 本文的主要内容和总结	67
5.2 未来发展展望	67
参考文献	69

表 目 录

表 2.1 FRET 图像处理库算法接口	25
表 2.2 FRET 成像参数	29
表 2.3 FRET 图像视图类型	34
表 2.4 FRET 圈点状态栏显示内容	35
表 2.5 FretDataPiece 数据类型	37
表 2.6 结果保存生成文件	40
表 3.1 FRET 成像系统参数	44
表 3.2 对标准质粒进行 3^3 -FRET 和 E-FRET 测量的结果	50
表 3.3 模型质粒的 FRET 双杂交分析结果	51
表 3.4 活细胞中 Bcl-xL-Bak 化学计量比的自动分析方法对比	53
表 4.1 切换参数对 C32V 质粒和 C4Y 质粒的 E-FRET 分析结果	56
表 4.2 Fretha 数据检验模块测试结果	57
表 4.3 ROI 绘制功能测试结果	59
表 4.4 ROI 状态栏功能测试结果	59
表 4.5 数据管理模块测试结果	61
表 4.6 不同算法的性能对比	64
表 4.7 Fretha 软件稳定性测试结果	65

图 目 录

图 1.1 FRET 过程示意图	1
图 2.1 FRET 双杂交分析数据处理流程	16
图 2.2 Fretha 开始页界面	18
图 2.3 Fretha 参数设置页界面	18
图 2.4 Fretha 数据处理页界面及模块划分	19
图 2.5 Fretha 结果可视化模块界面	19
图 2.6 Fretha 软件总体架构	20
图 2.7 Fretha 数据层实体关联关系图	21
图 2.8 FretCalculator 计算步骤	23
图 2.9 参数设置模块业务流程	31
图 2.10 FRETscopeII 数据文件结构	32
图 2.11 Fretha 数据检验业务主流程图	32
图 2.12 Fretha 图像处理模块界面	33
图 2.13 Fretha 自动圈点模块流程	36
图 2.14 Fretha DC-FRET 视图	40
图 3.1 LURS 算法流程图	48
图 3.2 模型质粒验证实验结果	51
图 3.3 活细胞中 Bcl-xL-Bak 化学计量比的自动分析方法对比	52
图 4.1 Fretha 图像处理视图切换测试结果	58
图 4.2 Fretha L-FRET 视图测试结果	62
图 4.3 Fretha DC-FRET 视图测试结果。	63
图 4.4 Fretha 结果保存测试结果	63

1 緒論

1.1 福斯特共振能量转移 (FRET)

1.1.1 FRET 原理概述

1948 年, Förster 首次阐述了福斯特共振能量转移 (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) 理论^[1]。FRET 是指处于激发态的供体分子 (Donor) 通过偶极子间相互作用将一部分能量以非辐射的形式转移给邻近处于基态的受体 (Acceptor) 分子 (供受体之间的距离 R 在 0 至 10 nm)^[2]。FRET 的发生会使得供体的荧光淬灭和受体的荧光增强, 其中由于发生 FRET 而增强受体荧光称为敏化发射荧光。FRET 技术突破传统观测局限, 精准解析分子间相互作用与距离。在细胞生物学微观环境里, FRET 技术如同精密“分子尺”, 捕捉纳米尺度生物分子动态, 助力剖析分子结构与功能。因而, FRET 技术在细胞生物学多领域, 如细胞信号转导、蛋白质相互作用探测等广泛应用。

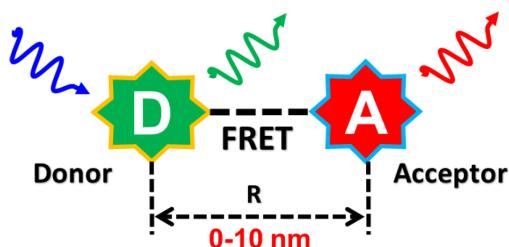


图 1.1 FRET 过程示意图

理论和实验证明, 当供受体荧光分子的距离为 r 时, 它们之间的能量转移速率由下式给出:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6, \quad (1.1)$$

其中 τ_D 是供体荧光寿命, R_0 为 Förster 半径, 由下式表示:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-5} (n^{-4} Q_D J(\lambda) \kappa^2), \quad (1.2)$$

上式中, n 表示介质的折射率, Q_D 表示供体的量子产率, $J(\lambda)$ 是光谱重叠积分, κ^2 是方向因子, 表示供、受体偶极子的相对方向, 一般在自由状态下取 $\kappa^2 = 2/3$ 。FRET 发生需要满足三个条件: (1) r 的数值在 R_0 附近, 约 0-10nm; (2) 供体的发射谱与受体的吸收谱有超过 30% 的重叠; (3) 供、受体偶极子方向不互相垂直。

FRET 效率 (E) 定义为供体转移给受体的能量与供体发射的总能量的比例, 是用来衡量 FRET 程度的指标, 其主要和分子间距和荧光团光谱的重叠度有关。光谱有部分重叠的供受体分子间距越小, 能量转移就越高效。其计算式为:

$$E = \frac{k_T(r)}{k_T(r) + \tau_D^{-1}}, \quad (1.3)$$

将公式 1.1 代入, 可以看出 E 与 r 的六次方成反比的关系:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}. \quad (1.4)$$

1.1.2 FRET 在生物学中的应用

FRET 技术作为一项强大的工具, 在生物学领域展现出了广泛且关键的应用价值。FRET 发生的条件是供、受体分子之间的距离 r 在 0-10nm 之间, 这使得 FRET 技术成为一种“纳米尺”, 能够有效地测量纳米级的分子间距, 使的 FRET 技术在研究生物蛋白相互作用、大分子构象变化、信号通路中的蛋白质调节机制等方面得到了广泛的应用^[3-5]。

在细胞生物学层面, FRET 为研究细胞内蛋白质等大分子相互作用提供了独特视角。2016 年, Ben-Johny 等人利用 FRET 双杂交分析算法研究了钙离子通道

钙离子通道与钙调蛋白之间的结合。研究发现当细胞内钙离子浓度较低时，一个钙调蛋白与一个钙离子通道结合；当细胞内钙离子浓度较高时，一个钙离子通道可以同时结合两个钙调蛋白^[6]。

在疾病诊断方面，FRET 技术除了在癌症早期检测中有突出表现，在药物疗效评估等方面同样具有重要意义。2014 年，Bozza 等人通过设计特定的 FRET 生物传感器，能够直接反映癌症药物诱导癌细胞凋亡的效果，为药物的研发和筛选提供了有力的工具^[7]。相较于传统的细胞生存力测定法（Viability Assay），这种基于 FRET 的检测方法能更准确地体现药物对癌细胞的杀伤作用，避免了因无法区分细胞死亡和生长抑制而导致的结果偏差。

荧光蛋白的发展使得 FRET 技术进一步应用到各种生物研究中^[8]。1962 年，第一种绿色荧光蛋白（Green Fluorescent Protein, GFP）在维多利亚水母中被发现，由于荧光蛋白的无毒性以及稳定遗传性，可以利用基因转导技术将荧光蛋白接到感兴趣的蛋白质分子上，借助显微成像技术实时观察活细胞中目标蛋白的转位以及信号传递等生物问题^[9]。随着基因技术的发展，最先发现的 GFP 蛋白被改造出了多种 GFP 突变体，多种荧光蛋白的出现为同时追踪多个蛋白质分子间的相互作用和多种蛋白质的共定位等复杂的生物问题提供了必要条件，使得基于 FRET 显微成像技术在分子生物学和以及生物物理学的活细胞在体研究得到了广泛的应用^[10]。

1.1.3 基于受体敏化发射的 FRET 定量测量方法（E-FRET）

基于受体敏化发射的通道方法（E-FRET）具有测量速度快、无损伤的特性，被公认是最适合用于活细胞动态监测的 FRET 定量检测技术。E-FRET 方法需要对实验系统响应和荧光团的光学性质进行严格的校准，一般通过提前测量多个参照样本，然后保持在整个实验过程中系统的稳定和实验条件的一致。E-FRET 方法需要 3 个 Cube 组成的 3 个通道，分别实现供体激发供体收集（DD 通道）、供体

激发受体收集 (DA 通道) 和受体激发受体收集 (AA 通道)。受体的敏化荧光从 DA 通道测得 (I_{DA} 图像)，但实际上 I_{DA} 图像包含有受体的敏化荧光、直接激发受体的荧光和供体的发射荧光这 3 个部分。为了消除后两部分串扰是 FRET 指标不依赖于荧光强度，额外的 2 个通道的光图像 I_{AA} 和 I_{DD} 需要收集。通过减掉串扰得到敏化荧光 F_C ，由如下公式得到：

$$F_C = I_{DA} - a(I_{AA} - cI_{DD}) - d(I_{DD} - bI_{AA}). \quad (1.5)$$

其中 a, b, c, d 是串扰系数，由单转的供体样本和单转的受体样本得到，其计算公式如下：

$$a = \frac{I_{DA}(A)}{I_{AA}(A)}, \quad (1.6)$$

$$b = \frac{I_{DD}(A)}{I_{AA}(A)}, \quad (1.7)$$

$$c = \frac{I_{AA}(D)}{I_{DD}(D)}, \quad (1.8)$$

$$d = \frac{I_{DA}(D)}{I_{DD}(D)}. \quad (1.9)$$

其中， $I_{DA}(A)$ 表示单转受体 (A) 样本在 DA 通道测得的荧光强度，其他参量意义类似。

E-FRET 还需要测量得到荧光强度由 DD 通道转换为 DA 通道的转换因子 G ，在仪器系统参数保持不变时， G 因子可以通过敏化发射荧光 F_C 在受体光漂白后荧光减少与受体光漂白后供体在 DD 通道的荧光恢复的比值确定，其定义如下：

$$G = \frac{F_C - F_C^{post}}{I_{DD}^{post} - I_{DD}}. \quad (1.10)$$

其中 I_{DD}^{post} 是受体光漂白后受体敏化发射的荧光强度， I_{DD}^{post} 是受体光漂白后供体的荧光强度。获得敏化淬灭转化因子 G 和敏化发射荧光强度 F_C 后，供体角度的

FRET 效率 E_D 可以通过如下公式计算：

$$E_D = \frac{F_C}{F_C + G \cdot I_{DD}}. \quad (1.11)$$

为了确定待测样本中受体与供体的浓度比例，需要首先通过测量受体与供体比例为 1:1 的 FRET 固定质粒样本来确定发生 FRET 时相等浓度的供体荧光和受体荧光的比例：

$$k = \frac{I_{DD} + F_C/G}{I_{AA}}. \quad (1.12)$$

然后使用 k 测量待测样本中的受供体浓度比 R_C ，计算方式为：

$$R_C = \frac{[A]}{[D]} = \frac{k \cdot I_{AA}}{I_{DD} + F_C/G}. \quad (1.13)$$

1.2 FRET 双杂交分析

1.2.1 基于 Langmiur 模型曲线拟合的 FRET 双杂交分析 (L-FRET)

蛋白质之间相互作用的化学计量比是阐明蛋白质间相互作用机制的重要参数，确定化学计量比能够进一步评估蛋白质间的生物相关性，并且能够确定其病理角色。传统的体外生化方法往往都需要从细胞中分离并且提纯大分子复合物才能进行测量，这类体外实验方法无法在活细胞中获得结果，而且一些大分子的复合物不容易进行分离提纯或者体外重建，这就限制了这些体外方法的应用。FRET 双杂交分析则可以揭示细胞内大分子复合物的化学计量比。

FRET 过程改变了供受体复合物荧光发射谱的两个方面：(1) 供体荧光淬灭；(2) 受体荧光增强。从这两个方面出发，FRET 效率也可以从两种方式进行测量：(1) 通过 E-FRET 方法从供体角度测量的 FRET 效率 E_D ，即供体转移给受体的能量占供体总能量的比例；(2) 通过 3^3 -FRET 方法从受体角度测量的 FRET

效率 E_A , 即受体敏化发射的荧光量占所有供体能量转移给受体时受体的荧光发射总量的比例。 3^3 -FRET 方法中, E_A 可由如下公式给出:

$$E_A = \frac{F_C}{a \cdot I_{AA}} \frac{\varepsilon_A(\lambda)}{\varepsilon_D(\lambda)}. \quad (1.14)$$

其中, $\varepsilon_A(\lambda)/\varepsilon_D(\lambda)$ 是受体和供体的摩尔消光系数之比, a 是光谱串扰系数, 由公式 1.6 确定。

FRET 双杂交分析是目前唯一可以在活细胞内进行生物大分子结合“滴定”实验的技术。FRET 双杂交分析实验中, 通过不断增加受体的浓度使得每个供体都结合有受体, 从而测出饱和结合时供体角度探测的最大 E_D ($E_{D,max}$)。同样的方法, 通过不断增加供体的浓度使得每个受体都结合有供体, 从而测出饱和结合时受体角度探测的最大 E_A ($E_{A,max}$)。在存在自由供体、自由受体和以 $N_D : N_A$ 比例结合的受供体复合物 ($N_D D - N_A A$, N_D 和 N_A 是供体和受体在复合物中的数量), 当所有供体都被受体结合时, 每个供体预期的能量转移效率为

$$E_{D,max} = \frac{1}{N_D} \sum_{i=1}^{N_D} \sum_{j=1}^{N_A} E_{ij}, \quad (1.15)$$

当所有受体都被供体结合时, 每个受体预期的能量转移效率为

$$E_{A,max} = \frac{1}{N_A} \sum_{i=1}^{N_D} \sum_{j=1}^{N_A} E_{ij}. \quad (1.16)$$

于是, $E_{A,max}$ 与 $E_{D,max}$ 的比值即为供受体的化学计量比:

$$\nu = \frac{N_D}{N_A} = \frac{E_{A,max}}{E_{D,max}}. \quad (1.17)$$

2016 年, Elisabeth S Butz 等人提出将 FRET 效率和自由受供体浓度按照 Langmuir 模型进行拟合的 FRET 双杂交分析方法。对于包含自由供体、自由受体

和供受体复合物中, E_D 和 E_A 可分别与自由受体浓度、自由供体浓度相关联:

$$E_A = E_{A,max} \frac{D_{free}}{D_{free} + K_{d,EFF}}, \quad (1.18)$$

$$E_D = E_{D,max} \frac{A_{free}}{A_{free} + K_{d,EFF}}. \quad (1.19)$$

其中, $K_{d,EFF}$ 为相对解离常数, D_{free} 是自由供体的浓度, A_{free} 是自由受体的浓度。从公式 1.18 和公式 1.19 可以看出, 与体外滴定实验类似, 用 3^3 -FRET 法可得到 E_A 随自由供体浓度变化的动态滴定曲线, 并得到 $E_{A,max}$, 用 E-FRET 方法也可以得到 E_D 随自由受体浓度变化的动态滴定曲线, 并得到 $E_{D,max}$ 。供受体复合物的化学计量比计算与公式 1.17 相同。

1.2.2 基于 FRET 效率 E_D 和受供体浓度比 R_C 线性分离的 FRET 双杂交分析 (DC-FRET)

传统的 L-FRET 方法存在一定的局限性。从实验条件上来看, L-FRET 需要得到 FRET 效率与自由供体 / 自由受体间的饱和滴定曲线, 这意味着实验人员需要精心准备不同供受体浓度比的样本, 并且这些样本的供受体浓度分布要尽可能均匀。例如, 在实际操作中, 可能需要配置一系列不同比例的供体和受体溶液, 然后分别对其进行检测和分析, 这增加了实验样本的数量。同时, 在实验数据处理时, 需要对每一个样本进行细致的处理和测量, 这极大地增加了实验人员的工作量和操作难度。另一方面, 从公式 1.18 和 1.19 来看, A_{free} 和 D_{free} 是拟合过程中更新的中间量, 在实际的计算分析过程中, 由于这些中间量的不确定性以及数据的复杂性, 很容易出现拟合失败的情况。一旦拟合失败, 就需要重新进行实验或者调整参数, 进一步增加了实验成本。

为了解决这些问题, 在 2018 年, 本研究小组的杜孟艳等人创新性地发展了基于 FRET 效率 (E_D) 和受供体浓度比 (R_C) 线性分离的 FRET 双杂交分析方法,

简称为线性拟合方法或 Du-Chen-FRET (DC-FRET)。DC-FRET 只关注分析供体饱和结合和受体饱和结合的数据。当供体完全饱和时，即 $D_{free} \gg K_d$ ，此时受体被完全结合，以下公式成立：

$$E_A = E_{A,max}, \quad (1.20)$$

$$E_D = E_{A,max} \cdot R_C. \quad (1.21)$$

此时 E_D 与 R_C 成正比，且斜率为 $E_{A,max}$ 。当受体饱和时，即 $A_{free} \gg K_d$ ，此时供体被完全结合，以下公式成立：

$$E_D = E_{D,max}, \quad (1.22)$$

$$E_A = E_{D,max} \cdot 1/R_C. \quad (1.23)$$

此时 E_D 与 R_C 成正比，且斜率为 $E_{A,max}$ 。求得 $E_{A,max}$ 和 $E_{D,max}$ 后，供受体复合物中的化学计量比计算同公式 1.17。

DC-FRET 方法相比 L-FRET 方法有着显著的优势。L-FRET 由于数据来源的不确定性以及拟合过程的复杂性，可能会导致拟合结果的偏差较大。在 DC-FRET 方法中，实验人员只需要准备 R_C 比较大的样本和 R_C 比较小的样本即可，无需像 L-FRET 那样准备处于中间分布的大量样本。这样的样本选择方式极大地简化了实验流程，减少了样本的制备和处理时间，从而大大减少了实验人员的工作量。在 DC-FRET 中，用于线性拟合的 E_D 和 R_C 数据是由 E-FRET 方法定量测量得到的。E-FRET 方法具有较高的准确性和稳定性，能够提供可靠的数据，通过这种方式得到的数据进行线性拟合，其结果也更加稳定可靠。

1.3 FRET 图像处理方法现状

1.3.1 传统的图像处理方法

传统 FRET 双杂交数据处理过程操作复杂^[11]，操作较为费时。科研人员总共需要经过图像分析、FRET 定量计算、FRET 双杂交分析处理等步骤，且每一步处理均较为费时。FRET 双杂交图像分析依赖人工处理图像，需要人工选取上百个左右的典型荧光区域作为 ROI，再计算每个 ROI 的灰度值得到荧光信号值和背景值等信息，耗时 1 - 3 h；根据标定的灰度值进行异常值滤去和确定 FRET 效率需要经历 5 个步骤，耗时约 30 min - 1 h；使用 Excel 的规划求解对测得的 FRET 数据拟合 Langmuir 模型需要经历 14 个步骤，耗时约 30 min。

传统的数据处理需要在多种不同的科研软件工具之间频繁进行数据转移，增加了科研人员的学习成本。在图像处理和人工标记荧光区域时，研究人员一般使用显微镜公司提供的图像处理软件如蔡司 ZEN、滨松 HCImage 等；在 FRET 定量计算时，需要从图像处理软件中导出来自 FRET 三通道的荧光强度等数据，再通过 Excel 进行公式设定完成批量 FRET 定量计算；在双杂交分析计算中，工作人员使用 Excel 的规划求解功能，设定好数据拟合的误差评估函数以及约束条件，从而使用规划求解功能进行数据拟合，更新迭代参数减小误差，通过 Matlab 或 Python 等语言编写解析来自 Excel 的数据，然后使用优化函数进行数据拟合。

在 FRET 计算中，工作人员使用 Excel 预定各个单元格的计算公式，在手动圈点采集前景和背景荧光强度之后，输入数据到 Excel 表格中，后续单元格会按照绑定的计算公式自动计算敏化发射荧光和 FRET 效率等数据。此外，人工处理尤其是手动圈点步骤的操作标准规范相对模糊，不同科研人员在操作过程中因为主观因素影响到数据的可复现性。人工数据处理也无法对原始图片充分挖掘数据信息，同一样本可能需要多个拍摄多个视野才能保证数据量满足后续数据处理分析需求。

传统的 FRET 双杂交分析计算依赖 Excel 等专业数据处理软件，这类软件功能丰富强大，但是没有针对 FRET 双杂交技术数据处理而简化或优化，往往要求科研人员拥有丰富的数据处理经验，增加了科研人员的学习成本和处理时间，限制了 FRET 双杂交分析的应用和推广。

1.3.2 基于深度学习的 FRET 图像分析方法

近年来，随着机器学习不断发展，越来越多的研究者着手将此类方法应用于 FRET 数据分析，以求提升荧光强度提取的准确性与效率。

Ge 等人研发出一种基于 U-Net^[12] 模型的深度学习方法进行高效 FRET 分析，该模型基于一个包含 230 个手动标注的兴趣区域（ROIs）的数据集展开训练，随后通过旋转操作将数据集扩充，最终得到 2760 个样本^[13]。U-Net 模型是图像分割领域广泛运用的卷积神经网络架构，它能够有效捕捉荧光图像的特征，精准地提取 ROIs 的荧光强度信息。通过手动标注一定数量的 ROIs，再利用旋转等数据增强手段扩充数据集，如此便能让模型得到更充分的训练，进而提升其在荧光强度提取方面的泛化能力与准确性。

Feldmann 等人则采用了 ilastik^[14] 这一用于生物医学图像分析的开源交互式工具，以极少的标注工作量来描绘细胞及背景区域。ilastik 提供了直观的图形用户界面，使用户能以相对简易的操作交互式地标注并分割图像。它将机器学习算法与用户交互相结合，不但能减轻手动标注的工作量，还能让分割结果更为精准可靠，从而更出色地提取目标区域的荧光强度。

然而，这些由机器学习驱动的算法存在一定的局限性。其一，它们的效能取决于数据集的规模与质量，而这在很大程度上依赖于手动标注。规模更大、质量更高的数据集可为模型训练提供更充裕的信息，使模型更好地捕捉数据的特征与模式，进而提升荧光强度提取的性能。但手动标注既耗时又费力，在实际应用中往往难以获取大量精准标注的数据集。数据不足可能引发模型过拟合等问题，致

使模型的泛化能力与准确性下滑。其二，就可解释性而言，这些算法通常较为晦涩。源于机器学习的神经网络模型常常捕捉到特定数据集的细微差别，却未能提供清晰的数学框架来阐释这些模式。尽管这些模型在荧光强度提取方面能够达成良好效果，但用户很难理解模型是怎样依据输入数据做出决策与预测的。神经网络的内部结构与运行机制繁杂，不存在直观、明晰的数学公式或规则用以解释输入与输出之间的关联，这给模型的深入理解与进一步优化带来了一定困难。

1.4 本文的工作内容和意义

本文根据 FRET 显微镜的数据特点，设计编写了一款专门用于 FRET 双杂交分析数据处理软件（Fretha），可以显著提高 FRET 双杂交数据处理工作的效率和准确性，推广 FRET 双杂交分析技术的应用。FRET 双杂交数据处理软件专门针对 FRET 双杂交数据处理而开发，内嵌了完整的 FRET 双杂交计算算法，因此用户不需要使用其他数据处理软件提供的数据处理功能，可以一键式导入数据，计算出 FRET 双杂交分析的结果，提高数据处理的工作效率。使用全自动数据处理功能则可以一键式完成由拍摄得到数据到最后得到计算结果的全部数据处理工作，包括图像预处理、自动背景选取、自动 ROI 选取、FRET 定量计算、FRET 双杂交分析计算等。手动数据处理引入的人为因素使得数据处理的计算结果相对缺乏稳定，这一缺陷在采集荧光信号时尤为明显。使用图像处理等程序算法构建荧光信号的评价函数，能够定量评价荧光信号的质量，并以此为根据发展自动信号采集算法。使用我们的软件能够为不同批次实验提供定量规范的信号采集和数据计算功能，从而大大提高了 FRET 双杂交实验数据分析的定量程度和可复现性。我们还会丰富数据计算结果的输出形式，加强数据的可视化输出和数据的兼容性，方便对软件计算的结果数据进行对比分析。

面对海量样本数据的活细胞高通量药物筛选应用，自动化的 FRET 双杂交分析是必然的选择。当前的 FRET 双杂交分析方法主要依赖于人工处理，只能处理

少量的数据，且处理速度较慢，无法满足高通量药物筛选的需求。高通量药物筛选数据量庞大，且对数据处理速度要求更高，人工手动数据处理远远无法满足要求。通过计算机强大的数据处理能力，高度自动化的 FRET 双杂交数据处理软件能够快速计算得到科学家们关心的参数指标，大大提高实验速度，从而提高整套系统的效率。自动化程度高、计算速度快的 FRET 双杂交数据处理能力能够计算产生大量的生物学数据指标，为药物筛选系统后续建立完备的数据库提供充足的数据量，进一步丰富了药物筛选数据分析的可能性。

针对实验室搭建的用于活细胞高通量药物筛选的 FRET 双杂交分析系统研发专用的数据处理软件，能够提供提高 FRET 显微术的应用效率，推动 FRET 双杂交技术的应用和推广，为活细胞高通量药物筛选提供技术支持。在该系统拥有灵敏快速的检测仪器和强大的计算机控制系统等硬件设备，进而将 FRET 双杂交实验流程高度实现自动化，实验仪器的自动化要求相配套的数据处理自动化程度的提高。为了提高 FRET 双杂交分析技术的数据处理效率和准确性，本文提出了一种基于计算机视觉的自动化数据处理方法，该方法构造了荧光信号的评价函数，可以快速地从原始图像中提取出 FRET 信号，并对其进行校正和归一化，从而得到可靠的 FRET 效率值。通过供体中心的 FRET 效率和受体中心的 FRET 效率，我们组还对数据特点进行分析，发展出了基于数据预处理的 FRET 双杂交分析和基于 FRET 效率 E_D 受供体浓度比 R_C 线性分离的 FRET 双杂交分析等多种方法，从而比较验证得到稳定可靠的化学计量比、相对亲和力常数等重要参数，提高了 FRET 双杂交分析的稳定性。

1.5 本文的章节安排

第一章，绪论。本章简要概述了定量 FRET 技术和 FRET 双杂交分析技术的理论基础和发展，然后介绍了 FRET 数据分析处理方法的研究现状。同时介绍了本文的工作内容和结构安排。

第二章，FRET 双杂交分析数据处理软件的设计和开发。本章基于 FRET 双杂交分析数据处理流程和 FRET 多模态显微成像系统的特点进行需求分析，然后设计了 Fretha 软件的总体架构和模块划分，最后详细介绍了各个模块的开发实现。

第三章，自动 FRET 双杂交分析数据处理算法。本章分析了 FRET 双杂交分析时的痛点，提出了基于明度和均匀度的自动 ROI 选择算法，并结合 DC-FRET 方法实现了全自动的 FRET 双杂交分析数据处理算法，在标准质粒和模型质粒上进行了验证实验。然后，我们还应用自动化数据处理算法分析了加药处理前后的 Bcl-xL-Bak 在活细胞内的相互作用。

第四章，软件的应用和测试。本章应用 Fretha 进行高通量药物筛选应用实验，成功快速地测量了在 MCF-7 细胞中加药后 Bcl-XL 和 Bak 结合比例的下降，并与其他几种数据处理方法进行比较。同时，对软件的性能指标进行了测试和分析。

第五章，总结与展望。本章总结了本文的工作内容和在相关领域的贡献，对后续研究内容和方法进行展望。

2 Fretha 的设计和开发

2.1 引言

在现代生物医学研究中，FRET 双杂交分析作为一种关键技术，用于检测生物分子间的相互作用，为揭示生物过程的分子机制提供了重要手段。然而，传统的 FRET 双杂交分析数据处理过程繁琐且效率低下，严重依赖人工操作，容易引入误差。开发专门针对 FRET 双杂交分析数据处理的配套软件，能够实现数据的自动化采集、标准化处理以及高效的分析统计，对于提升研究效率和准确性具有重要意义。本章节首先根据我们组自研的用于高通量药物筛选的 FRET 显微成像系统（FRETscopeII）的硬件参数和 FRET 数据处理及 FRET 双杂交分析数据处理功能进行深入的需求分析。基于此需求分析，对软件按照功能进行科学合理的模块划分和总体框架设计。接着，详细介绍软件的开发技术选型以及每个模块的具体实现方式，旨在全面展示 Fretha 软件从设计构思到开发实现的全过程。

2.2 需求分析和总体设计

2.2.1 需求分析

FRETscopeII 是本课题组自研的适用于 3^3 -FRET、E-FRET、Pb-FRET 等多种定量 FRET 分析方法的 FRET 多模态显微成像系统。该系统具备高分辨率成像、多通道同步采集等先进特性，能够获取高质量的 FRET 三通道图像数据。

使用 FRETscopeII 对制备好的样本进行图像采集得到若干视野的 FRET 三通道图像后，通过 FRET 双杂交分析方法定量计算细胞中的生物大分子结合作用的 FRET 饱和效率、化学计量比、相对亲和力等信息。FRET 双杂交分析的数据处理需要如下步骤：首先需要对 FRET 数据进行数据完整性校验，确保每个视野下存

在完整的三通道图像和文件完整可读，然后对每个视野进行荧光信号提取，通过在图像上绘制 ROI 并计算其灰度均值作为 FRET 分析计算重要的荧光信号；根据 E-FRET 和 3^3 -FRET 方法将上述荧光信号代入对应的计算公式求取 E_A 、 E_D 、 R_C 等 FRET 数据；对这些数据进一步依据物理含义或者数据分析进行异常值去除等数据预处理；最后是通过优化算法拟合 Langmiur 模型或者线性模型计算相关的参数。具体流程如图 2.1 所示。

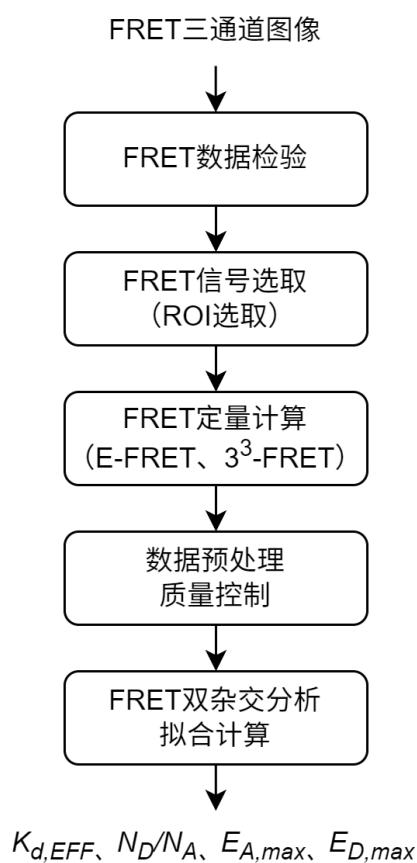


图 2.1 FRET 双杂交分析数据处理流程

2.2.2 模块划分和界面设计

结合 FRET 双杂交分析的数据处理流程与功能逻辑，Fretha 软件主要划分为以下核心模块：

- (1) 成像参数设置模块：负责设置 FRET 成像过程中的关键参数，确保成像数据

的准确性和一致性。该模块允许用户输入和保存成像参数，如曝光时间、光学参数等，并提供参数校验功能，确保输入的参数在合理范围内，避免因参数设置错误导致的数据分析问题。成像参数一般比较稳定，通常 2 到 3 个月才需要重新测量，因此需要持久化到本地，以供多次处理数据时使用。

- (2) **数据检验模块**：对输入数据进行严格的完整性和合法性检验，避免异常数据导致的分析错误。该模块会检查每个视野的三通道图像文件是否完整，并对文件格式和内容进行验证，确保数据的可靠性。通过数据完备性检验，可以避免异常数据导致的分析错误，提高数据处理的准确性。
- (3) **FRET 图像处理模块**：支持手动图像处理和 ROI 选取，满足用户对数据的精细化处理需求。用户可以在图像上手动圈选感兴趣区域（ROI），并进行图像增强、滤波等处理操作。该模块提供多种图像处理工具，帮助用户提高图像质量和分析精度。手动选取感兴趣区域 ROI 是一个基础且关键的操作，它能帮助分析人员聚焦于细胞中荧光质量较高的区域，进行更精确的数据处理与分析。结合 LURS (Luminance-Uniformity-based ROI Selection) 算法实现自动 ROI 选取，减少人工操作，提高处理速度和一致性。
- (4) **数据管理模块**：数据处理模块用于增删数据、筛选数据、导入导出、开始计算等功能，还可以根据记录表中的数据项在 FRET 图像处理模块定位所选数据的 ROI。
- (5) **结果可视化模块**：将分析结果以直观的图表形式展示，并提供数据保存功能，方便用户进一步分析和应用。该模块支持多种图表类型，如趋势线图、散点图等，用户可以根据需要选择合适的图表进行数据展示和分析。通过结果可视化，用户可以更直观地理解分析结果，比如分析 FRET 双杂交分析结果的相关性、拟合程度等，从而确保数据处理的准确性和可靠性。结果可视化模块还可以将分析结果保存为图片或数据文件，方便用户进行后续数据处理和

报告撰写。

在界面设计上，根据软件使用需求和模块功能，主要分为：开始页、参数设置页、数据处理页、结果页。在软件开始页提供了跳转参数设置页或数据处理页的按钮，如图 2.2 所示；参数设置页面包括成像参数设置模块，其界面如图 2.3 所示；数据处理页包括数据检验模块的检验结果、FRET 图像处理模块、数据管理模

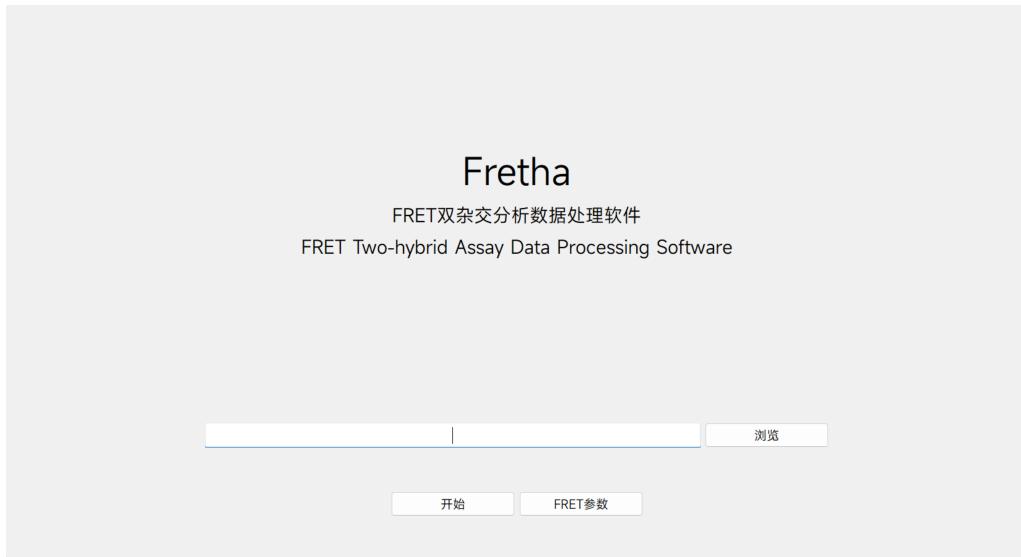


图 2.2 Fretha 开始页界面

The screenshot shows the 'Parameter Settings' (参数设置) page of the Fretha software. It includes sections for 'Serial Coefficients' (串扰系数), 'Correction Factors' (校正因子), 'Extinction Coefficient Ratio' (消光系数比), and 'Exposure Time' (曝光时间). Each section contains input fields for numerical values. A 'Confirm' (确认) button is located at the bottom left.

图 2.3 Fretha 参数设置页界面

块，其界面和模块划分如图 2.4 所示；结果页展示结果可视化模块中 FRET 双杂

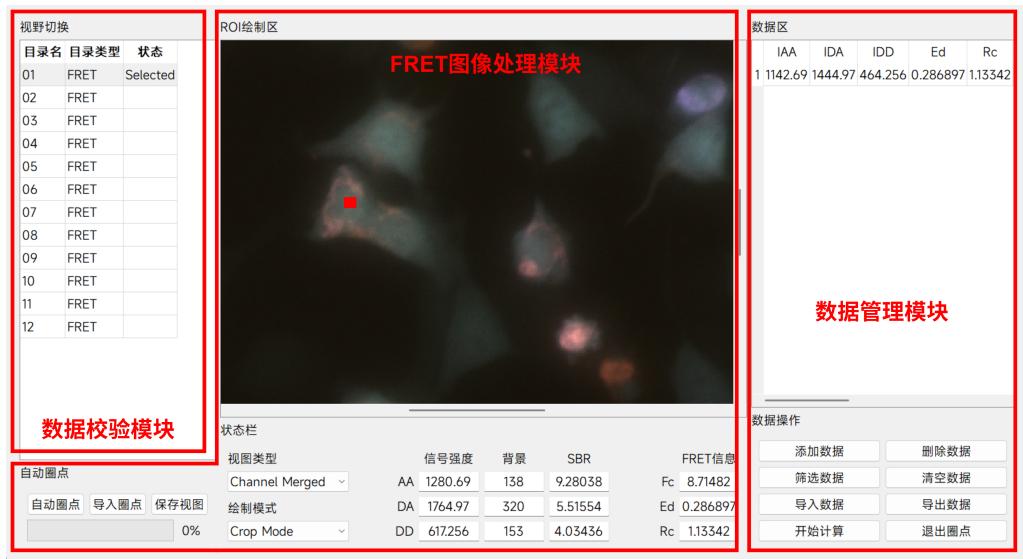


图 2.4 Fretha 数据处理页界面及模块划分

交数据处理的图像视图结果，界面如图 2.5 所示。

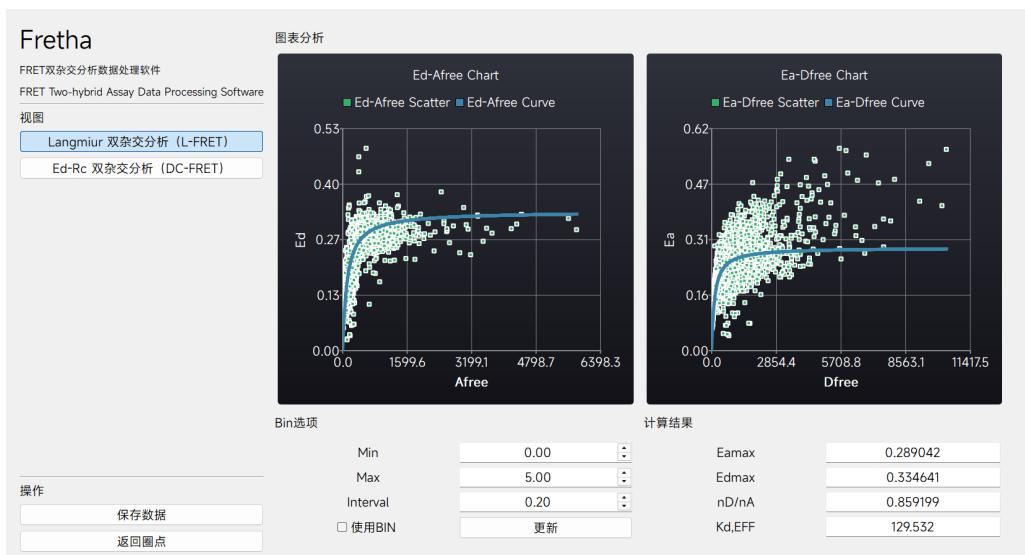


图 2.5 Fretha 结果可视化模块界面

2.2.3 软件总体框架

Fretha 架构采用分层设计，由顶层向下依次分别为：表现层、业务层、数据访问层和数据层，如图 2.6 所示。

表现层（Presentation Layer）处于整个架构的最外层，直接面向用户，是用户



图 2.6 Fretha 软件总体架构

与系统进行交互的主要界面。它负责接收用户输入的各种指令和数据，并以直观、友好的方式展示系统的处理结果。Fretha 的表现层主要包括开始界面、参数设置界面、FRET 图像处理界面、结果可视化界面等，用户能够通过表现层的软件界面与系统进行交互，完成 FRET 双杂交分析的数据处理操作。

业务层 (Business Logic Layer) 是整个架构的核心逻辑处理部分，承担着对系统业务规则和流程的实现。它接收来自表现层的请求，根据预设的业务逻辑对数据进行处理和转换。Fretha 的业务层封装了包括参数读 / 写业务、数据检验业务、自动 ROI 选取业务、数据导入 / 导出业务、FRET 双杂交分析业务、可视化绘图业务等。

数据访问层 (Data Access Layer) 实现对数据的访问和操作，它将业务层与数据层进行隔离。数据访问层提供了统一的数据访问接口，业务层通过调用这些接口来获取和存储数据，而无需关心数据的具体存储方式和位置。通过设置数据访问层，能够使得在复杂的业务处理时避免对数据的直接操作和影响，从而提高了

数据存储的安全性。Fretha 的数据访问包括 FRET 图像数据访问、FRET 数值数据访问和 FRET 双杂交数据访问的接口。特别地，在数据访问层还包括 FRET 定量计算器和 FRET 图像处理器、FRET 双杂交求解器等，它们除了可以作为数据访问层的接口，还可以完成 FRET 计算分析作为业务层的业务逻辑处理单元，这样的设计减少了业务层设计的复杂度，提高了系统的可维护性和可扩展性。

最后是数据层（Data Layer），作为架构的最底层，数据层负责存储系统的所有数据。Fretha 数据层包括系统静态数据、FretImage 类、FretDataPiece 类和 FretRecord 类。系统静态数据是在软件运行时的环境参数，只需要在指定步骤运行前设置好即可，如成像参数、文件目录等。FretImage 类、FretDataPiece 类和 FretRecord 类用来表示数据处理时的各种动态数据。在 FRET 双杂交分析数据处理中，一组 FRET 三通道图像中可以提取并计算出若干条 FRET 数据，由若干条 FRET 数据作为一个批次只能解析出一条 FRET 双杂交分析结果。因此，在设计上三种数据实体类型存在关联关系，FretImage 和 FretDataPiece 之间存在一对多的关系，FretDataPiece 和 FretRecord 之间存在一对多关系，如图 2.7 所示。

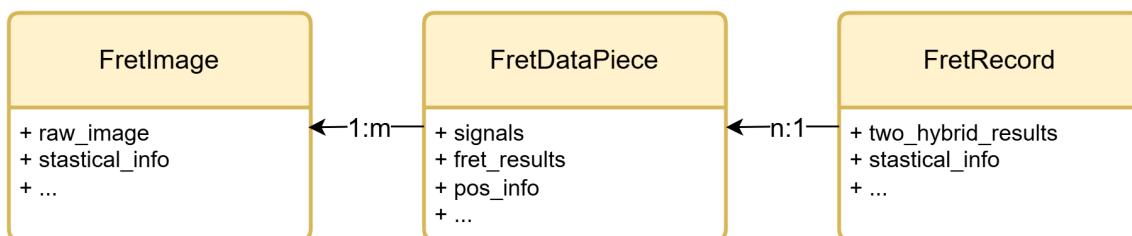


图 2.7 Fretha 数据层实体关联关系图

2.2.4 开发技术选型

Qt 5.15.2 是 Qt 官方发布的长期支持（LTS）版本，具有卓越的跨平台性能。该版本能够在 Windows、Linux、macOS 以及嵌入式系统等多种平台上稳定运行。开发者只需对一套代码进行简单配置，即可实现不同平台的适配，这种特性大幅降低了软件开发与维护的成本。FRETscopeII 的控制软件系统选择了 Qt 5.15.2 版

本作为技术选型。为了确保 Fretha 和 FRETscopeII 在开发过程中的一致性和可融合性，Fretha 同样选用该版本作为软件开发的基础技术。这一选择不仅有利于代码的共享、复用和维护，还能显著降低二次开发以及未来合并开发过程中的成本和风险。

在计算机视觉处理方面，Fretha 选用了 OpenCV (Open Source Computer Vision Library)。OpenCV 是一个开源的计算机视觉与机器学习软件库，具备强大的跨平台能力，可在 Windows、Linux、macOS、Android、iOS 等多种操作系统上运行。其功能丰富多样，广泛涵盖了图像和视频处理的各个方面，例如图像的读取、滤波、边缘检测等。在性能上，OpenCV 经过 SIMD 指令集优化以及多线程并行计算等技术的优化，处理效率得到了显著提升，能够充分满足实时性的需求。此外，OpenCV 拥有一个活跃的社区，汇聚了大量的开发者。社区中提供了丰富的算法、示例代码和实际案例，为开发者提供了有力的技术支持和学习借鉴的资源。基于以上诸多优势，OpenCV 完全契合本项目中计算机视觉任务的需求，因此被选定为本项目的重要技术工具。

在最优化计算方面，Fretha 选择了 C++ 库 Dlib。Dlib 库集成了基于梯度的优化算法，并采用了自适应学习率机制，能够实现快速且稳定的收敛，有效降低了陷入局部最优解的概率。该库还采用了牛顿法与拟牛顿法，在保证计算精度的同时兼顾了计算效率。此外，Dlib 在处理约束优化问题方面表现出色，例如可以运用内点法来解决资源分配中的约束难题，为研究工作提供了可靠的支持。

2.3 FRET 算法和后台接口

2.3.1 FRET 定量计算器

FRET 定量计算器 (FretCalculator) 用于处理 E-FRET 和 3^3 -FRET 定量计算。FRET 定量计算器定义了参数设置、数据加载、数据校正、数据计算和结果获取等

计算步骤，每个步骤需要按照顺序执行，并且在执行时记录运行状态，在获取结果数据之前进行检查来保证数据安全。

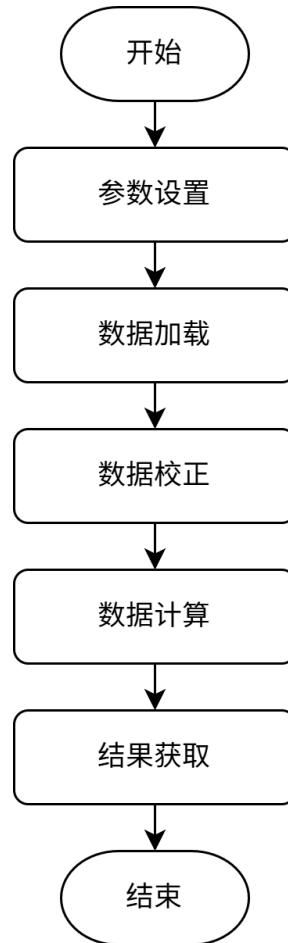


图 2.8 FretCalculator 计算步骤

2.3.2 FRET 图像处理器

FRET 图像处理器（FretImageProcessor）封装了对 FRET 图像进行计算分析的计算器类，还静态方法的形式提供了图像处理算法的一系列接口。首先按照 FRET 计算器的计算步骤对 FRET 图像数据进行处理，然后根据 FRET 图像数据的特点进行分析，完成逐像素的 FRET 计算，最后将计算结果保存到数据层中。与 FRET 定量计算器不同，FRET 图像分析时需要对每个像素点的荧光强度进行计算，因此需要对图像数据进行遍历处理。FRET 图像处理器采用 OpenCV 的 Mat 数据结

构来存储图像数据。OpenCV 提供的数据结构 Mat 是一个多维数组，可以方便地存储和处理图像数据，很适合存储逐像素的 FRET 图像数据。FRET 图像处理器的计算类 FretImageProcessor 的计算步骤和 FRET 定量计算器类似，如图 2.8 所示。

FRET 图像处理器以静态方法的形式提供了 FRET 图像处理时涉及的一系列算法接口，包括图像预处理、图像分割、特征提取、图像增强等。所有的算法接口如表 2.1 所示。运用这些算法，FRET 图像处理器支持了对 16 位原始数据的计算处理能力，以及可视化输出为伪彩图等功能。

2.3.3 FRET 双杂交求解器

FRET 双杂交求解器对采集到的 FRET 批数据 E_D 、 E_A 、 R_C 、 A_{est} 和 D_{est} 进行最优化计算，以获取使预测结果与测量结果之间误差最小的 $E_{A,max}$ 、 $E_{D,max}$ 、 N_D/N_A 、 $K_{d,EFF}$ 等参数。求解器从数据模型 FretRecord 中获取批量数据作为数据集，然后分别按照 DC-FRET 方法或 L-FRET 方法进行 FRET 双杂交分析求解。具体算法如下：

- (1) **DC-FRET 线性拟合算法的封装。**根据公式 1.20 和 1.22，DC-FRET 拟合斜率时截距项为 0。以参数 $E_{A,max}$ 的拟合过程为例，其线性方程形式为

$$E_D = E_{A,max} \cdot R_C, \quad (2.1)$$

其中， E_D 是自变量， R_C 是自变量， $E_{A,max}$ 是斜率。线性拟合的目标是找到合适的参数 $E_{A,max}$ ，使得方程预测的 E_D 值与实际观测到的 E_D 值之间的误差尽可能小。通常使用最小二乘法，其原理是最小化观测值与预测值之间的误差平方和，即

$$S = \sum_{i=1}^n (E_{D_i} - (E_{A,max} R_{C_i}))^2 \quad (2.2)$$

表 2.1 FRET 图像处理库算法接口

接口	参数	说明
morphologyClose	Mat: 二值化图像 int: 迭代次数	形态学闭运算
morphologyOpen	Mat: 二值化图像 int: 迭代次数	形态学开运算
medianFilter	Mat: 单通道图像 int: 核大小	图像中值滤波
meanFilter	Mat: 单通道图像 int: 核大小	图像均值滤波
gaussianFilter	Mat: 单通道图像 int: 核大小 double: 高斯标准差	图像高斯平滑
getBackgroundValue	Mat: 单通道图像	基于直方图的背景值估计
otsuThreshold	Mat: 输入图像	Otsu 自动阈值分割
adaptiveThreshold	Mat: 输入图像 int: 邻域大小 (奇数) double: 阈值偏移量	自适应局部阈值分割
applyPseudoColor	Mat: 单通道图像 (8 位)	伪彩色映射 (Jet 颜色表)
applyMask	Mat: 输入图像 Mat: 掩膜 (二值 / 同尺寸)	图像掩膜操作
minMaxNormalization	Mat: 输入图像	全局线性归一化
mergeChannels	Mat: R 通道 (8 位) Mat: G 通道 (8 位) Mat: B 通道 (8 位)	多通道图像合并

其中, n 是数据点的数量, R_{C_i} 和 E_{D_i} 分别是第 i 个数据点的自变量和因变量的值。为了找到 S 最小的 $E_{A,max}$ 值, 对 S 关于 $E_{A,max}$ 求偏导, 并令其等于 0。

首先，展开误差 S ：

$$S = \sum_{i=1}^n (E_{D_i}^2 - 2E_{A,max}R_{C_i}E_{D_i} + E_{A,max}^2R_{C_i}^2), \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial S}{\partial E_{A,max}} = \sum_{i=1}^n (-2R_{C_i}E_{D_i} + 2E_{A,max}R_{C_i}^2), \quad (2.4)$$

令 $\frac{\partial S}{\partial E_{A,max}} = 0$ ：

$$\sum_{i=1}^n (-2R_{C_i}E_{D_i} + 2E_{A,max}R_{C_i}^2) = 0, \quad (2.5)$$

$$-2 \sum_{i=1}^n R_{C_i}E_{D_i} + 2E_{A,max} \sum_{i=1}^n R_{C_i}^2 = 0, \quad (2.6)$$

最后求解 $E_{A,max}$ ：

$$E_{A,max} = \frac{\sum_{i=1}^n R_{C_i}E_{D_i}}{\sum_{i=1}^n R_{C_i}^2}. \quad (2.7)$$

公式 2.7 给出了线性拟合求解 $E_{A,max}$ 的解析公式，应用类似方法可直接计算斜率 $E_{A,max}$ 和 $E_{D,max}$ ，从而避免了基于迭代的线性拟合求解算法的消耗。

(2) **L-FRET Langmiur 模型拟合算法的封装。** Langmiur 模型具有模型的非线性和参数的复杂性，无法通过简单的解析式解析其求解公式。因此，我们引入 dlib 计算库进行复杂的参数拟合。

为完成拟合计算，需要设计专门的数据类型 ColumnVector 和 ExperimentalData，如代码 2.1 所示。ColumnVector 类型用于存储双精度浮点数的列向量，在后续的计算和优化过程中承载参数向量和中间计算结果。ExperimentalData 结构体用于存储来自实验采集到的数据集，该结构体包含四个 std::vector<double> 类型的成员变量：aest 存储 A_{est} 相关的数据数组，dest 存储 D_{est} 相关的数据数组，ea_corr 存储 E_A 预测值 ($E_{A,p}$) 与测量值 ($E_{A,o}$) 之间的误差，ed_corr 存储 E_D 预测值 ($E_{D,p}$) 与测量值 ($E_{D,o}$) 之间的误差。

代码 2.1 数据类型

```

1 // 定义列向量类型
2 typedef dlib::matrix<double, 0, 1> ColumnVector;
3
4 // 定义数据结构体, 用于存储实验数据
5 struct ExperimentalData {
6     std::vector<double> aest;
7     std::vector<double> dest;
8     std::vector<double> ea_corr;
9     std::vector<double> ed_corr;
10 };

```

如代码 2.2 所示, CalculateLoss 函数负责计算模型在整个数据集上的整体损失。对于给定的 ExperimentalData 实例 data 和参数向量 parameters, CalculateLoss 函数首先遍历数据集中的每个数据点, 计算出 E_A 或 E_D 预测值和与实际值之间的误差, 最后将误差累加到 total_error 中。

代码 2.2 误差计算函数

```

1 // 计算整体损失
2 double CalculateLoss(const ExperimentalData& data, const
3     ColumnVector& parameters) {
4     double total_error = 0.0;
5     for (size_t i = 0; i < data.aest.size(); ++i) {
6         double d_free = ((data.dest[i] - parameters(0) -
7             data.aest[i] * parameters(1)) + std::sqrt(std::
8                 pow(data.dest[i] - parameters(0) - data.aest[i] *
9                     parameters(1), 2) + 4 * parameters(0) * data.
10                    dest[i])) / 2;
11        double a_free = data.aest[i] - (data.dest[i] -
12            d_free) / parameters(1);
13        double ea_pred = parameters(2) * d_free / (d_free +
14            parameters(0));
15        double ed_pred = parameters(3) * a_free / (a_free +
16            parameters(0) / parameters(1));
17
18        total_error += CalculateError(data.ea_corr[i],
19            ea_pred) + CalculateError(data.ed_corr[i],
20            ed_pred);
21    }
22    return total_error;
23 }

```

TwoHybridSolver 是用来调用整个拟合过程的函数, 并向外提供调用接口, 如代码 2.3 所示。TwoHybridSolver 函数接受四个 std::vector<double> 类型的参数, 分别为 aest_data、dest_data、ea_corr_data 和 ed_corr_data, 返回

一个 ColumnVector 类型的对象，其中存储了经过拟合的结果参数。整个拟合过程如下：首先设置 $K_{d,EFF}$ 、 n_D/n_A 、 $E_{A,max}$ 和 $E_{D,max}$ 的拟合初值为 1、1、0.5 和 0.5，存储到 ColumnVector 对象 starting_point，作为参数拟合的起始点。创建一个 ExperimentalData 类型的对象 data，将传入的四个实验数据向量存储在该结构体中，以便后续目标函数使用。使用 dlib 库中的 find_min_using_approximate_derivatives 函数进行优化。在搜索策略算法上，求解器采用一种拟牛顿法 dlib::bfgs_search_strategy()，用于在参数空间中寻找目标函数的最小值，并使用 dlib::objective_delta_stop_strategy(1e - 7) 作为停止策略，当两次拟合后参数的变化小于 10^{-7} 时，认为此时的结果已收敛，停止优化过程。最后，函数返回 starting_point，此时 starting_point 存储的是经过优化后得到的拟合参数。

代码 2.3 双杂交求解器

```

1 // 双杂交求解器，进行参数拟合
2 ColumnVector TwoHybridSolver(const std::vector<double>&
3     aest_data, const std::vector<double>& dest_data,
4     const std::vector<double>& ea_corr_data, const std::vector<double>& ed_corr_data) {
5     // 初始化起始点
6     ColumnVector starting_point(4);
7     starting_point = 1, 1, 0.5, 0.5;
8
9     // 创建数据结构体
10    ExperimentalData data = {aest_data, dest_data,
11        ea_corr_data, ed_corr_data};
12
13    // 定义目标函数包装器
14    auto objective_wrapper = [&data](const ColumnVector&
15        parameters) {
16        return ObjectiveFunction(parameters, &data);
17    };
18
19    // 使用 dlib 进行优化
20    dlib::find_min_using_approximate_derivatives(dlib::
21        bfgs_search_strategy(), dlib::
22        objective_delta_stop_strategy(1e-7),
23        objective_wrapper, starting_point, -1, 0.01);
24
25    return starting_point;
26}

```

2.4 功能模块的实现

2.4.1 成像参数设置模块

FRET 定量分析中，在数据处理前需要设置好 FRET 定量计算过程中必须的参数，设置成像过程时的成像参数至关重要。成像参数设置模块的界面如图 2.3 所示，包括了 FRET 成像参数的设置和保存功能。

FRET 成像参数在 Fretha 中以静态参数保存在软件内存中，是数据处理时的环境参数。其中， a 、 b 、 c 、 d 、 G 、 k 和 Y 是 FRET 成像系统的光学参数，在前文中已介绍； $ExpTimeAA$ 、 $ExpTimeDD$ 和 $ExpTimeDA$ 是成像时三个探测通道的曝光时间，在 FRET 定量计算时需要根据曝光时间参数在各个通道归一化，然后才能进行计算。Fretha 中包括的所有成像参数如表 2.2 所示。

表 2.2 FRET 成像参数

参数	说明	意义范围	单位
a	供体激发时在 DA 通道的串扰系数	(0, 1)	无
b	所有的一切都在这里面。	(0, 1)	无
c	模板类文件。	(0, 1)	无
d	受体激发时在 DA 通道的串扰系数	(0, 1)	无
G	供体猝灭和受体荧光增强的比值	(0, $+\infty$)	无
k	受体浓度和供体浓度相同时的荧光比值	(0, $+\infty$)	无
Y	供受体在激发光条件下的消光系数之比，也记作 $\epsilon_{YFP}(\lambda)/\epsilon_{CFP}(\lambda)$	(0, $+\infty$)	无
$ExpTimeDD$	DD 通道下的成像曝光时间	(0, $+\infty$)	毫秒 (ms)
$ExpTimeDA$	DA 通道下的成像曝光时间	(0, $+\infty$)	毫秒 (ms)
$ExpTimeAA$	AA 通道下的成像曝光时间	(0, $+\infty$)	毫秒 (ms)

参数设置业务设计上遵循一定的原则。首先，设置时所有参数应一同更新，避免因参数不匹配导致的数据处理错误。其次，每个参数需要在其有意义的范围

内，避免无意义的值。因此，在点击“更新参数”按钮时，若无法从界面中的每个参数输入框都解析到合法的数字，那么本次更新参数就会失败。FRET 成像参数是一批参数，参数间存在依赖关系，如测量参数 G 、 k 、 Y 就依赖参数 a 、 b 、 c 、 d ，这是因为测定参数 G 、 k 、 Y 时需要计算敏化发射荧光 F_C ，根据公式 1.5 所示， F_C 的确定与 a 、 b 、 c 、 d 密切相关。强制所有参数一同更新可以避免用户单独设置某一参数而导致参数之间不匹配等问题。

FRET 成像参数一般比较稳定，一般 2 到 3 个月才需要重新测量，因此需要持久化到本地，以供多次处理数据时使用。Fretha 的本地参数文件保存为可执行程序同级目录下的“config.ini”中。在软件初始化阶段，会自动检测并应用本地配置文件中的参数。用户可通过保存多套配置文件，在使用时替换目标配置文件，快速进行参数配置的切换。

参数设置的主要业务流程如图 2.9 所示。

2.4.2 数据检验模块

FRET 双杂交分析需要处理一批 FRET 图像文件，因此需要对输入数据的完备性进行检验识别。该模块的作用有以下两个方面：一方面通过模式识别 FRET 合法数据，避免了异常输入导致的运行错误；另一方面，在这一模块会将 FRET 批数据的视野子文件夹进行解析和类型识别，为后续数据处理提供对子文件夹的不同操作。

Fretha 的数据识别检验模块匹配识别 FRETscopeII 的数据格式，从而保证数据处理能够正常开始。如图 2.10 所示，FRETscopeII 的数据结构由上层到下层依次为：

- (1) 批数据根目录：存放所有视野子目录和数据文件；
- (2) 视野子目录：存放一个视野的三通道图片和参数文件；
- (3) 图片数据和参数文件。

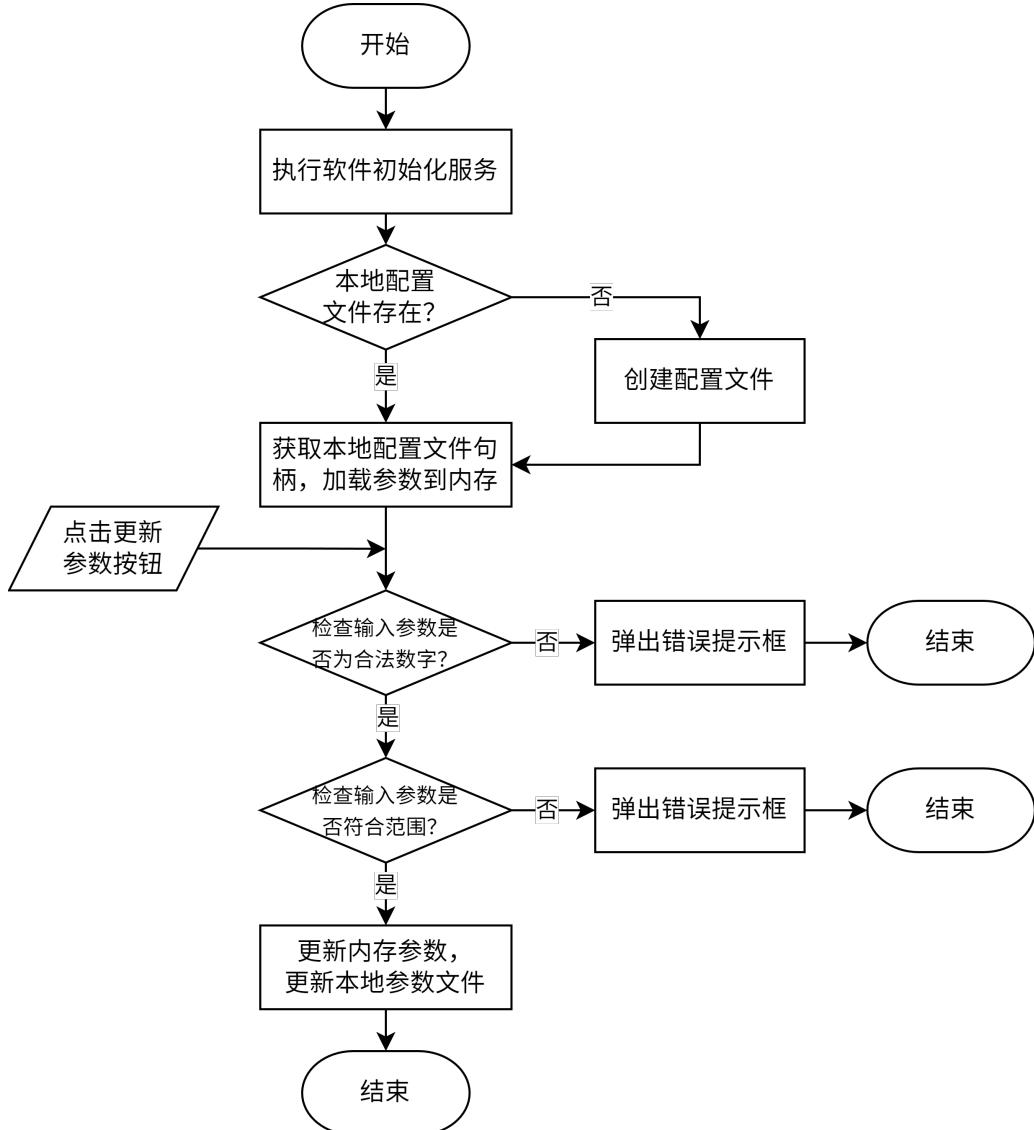


图 2.9 参数设置模块业务流程

数据检验业务的流程如图 2.11 所示。其中，检查子文件夹类型是通过图 2.10 进行匹配的，当且仅当子文件夹中同时存在“DA.tif”、“DD.tif”和“AA.tif”图片文件时，当前子文件夹会被识别为 FRET 视野，并在视野表格模型中记录。其他情况的子文件夹会被记作“Unknown”文件夹，在后续 FRET 图像处理或者自动处理中被跳过。这种检查还会对图像数据是否可读进行检查。

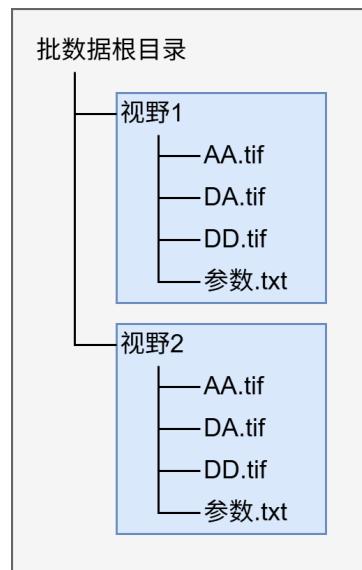


图 2.10 FRETscopeII 数据文件结构

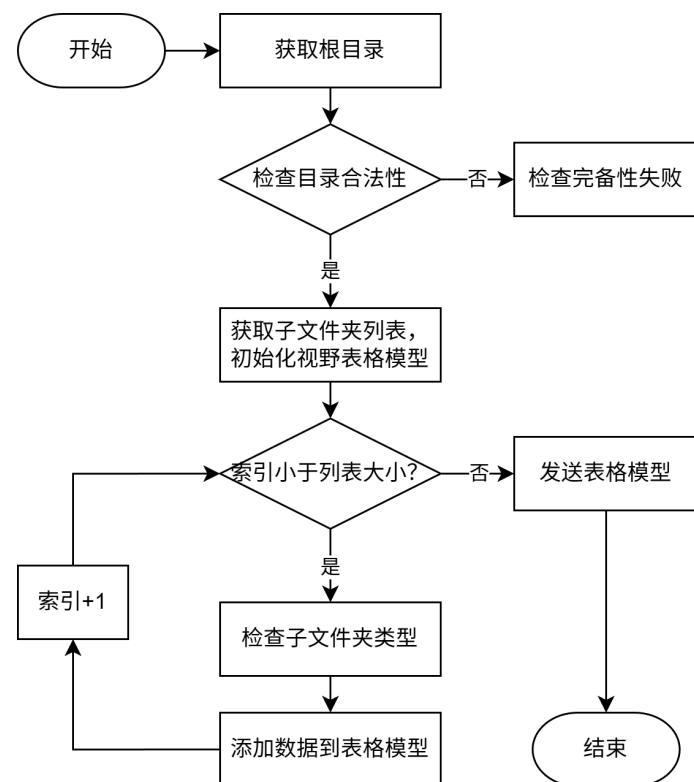


图 2.11 Fretha 数据检验业务主流程图

2.4.3 FRET 图像处理模块

FRET 图像处理模块是对 FRET 三通道图像进行 ROI 提取等图像处理分析的模块，包括手动 ROI 圈点和自动 ROI 圈点等。其界面如图 2.12 所示：在 FRET 图

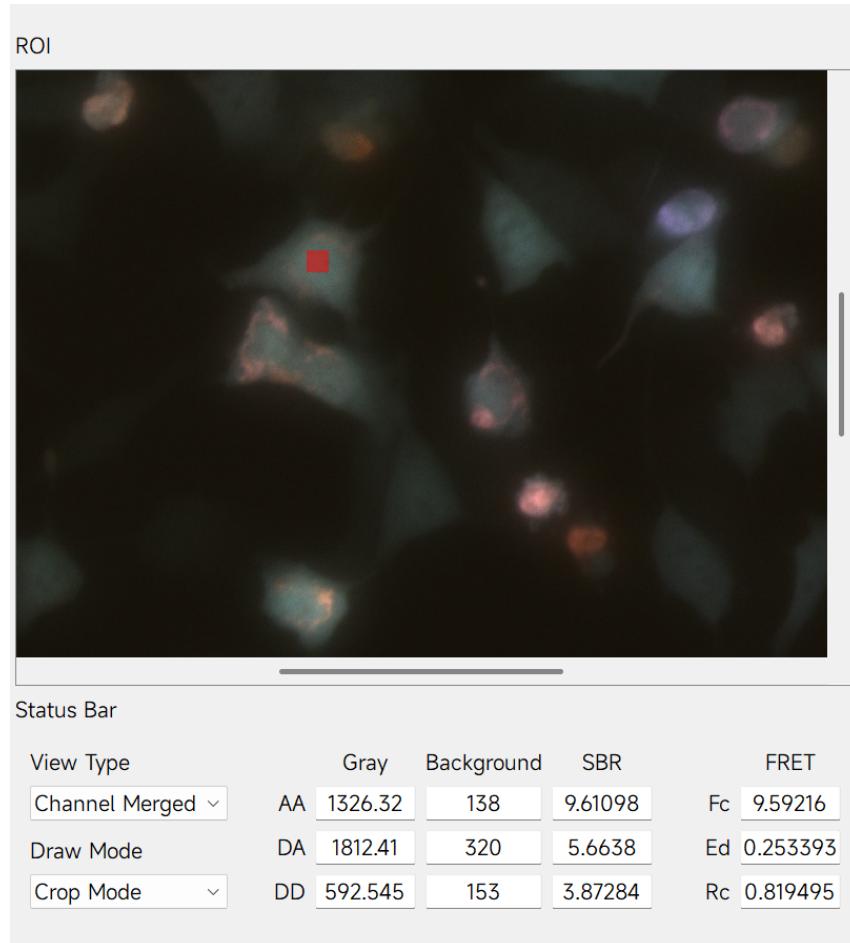


图 2.12 Fretha 图像处理模块界面

像处理工作里，手动选取感兴趣区域 ROI 是一个基础且关键的操作，它能帮助分析人员聚焦于特定区域，进行更精确的数据处理与分析。为实现图像处理过程中 ROI 的手动选取功能，Fretha 借助 Qt 框架提供的 QGraphicsView 类，开发了自定义的 FretGraphicsView 类。QGraphicsView 是 Qt 用于可视化和交互处理二维图形场景的重要类，具备丰富的功能和良好的可扩展性，为 FretGraphicsView 的实现提供了有力支撑。

FretGraphicsView 类中设计了一个基于 QRectItem 的 ROI 成员，它能够在视图中直观呈现 ROI 的大小和位置，方便用户确认所选区域。设定 ROI 的绘制模式为“Crop Mode”截取模式时，此时会根据鼠标和 ROI 边框的位置，变换 ROI 交互的功能，包括 ROI 的创建、移动、缩放等操作。切换绘制模式为“Stamp”邮戳模式，此时可以固定 ROI 的大小，从而快速圈选多个大小一致的 ROI。

Fretha 的状态栏中提供了视图类型切换选项，在数据处理中可以辅助圈点，支持的视图类型如表2.3所示。归一化增强图包括 DD、DA、AA 通道分别归一

表 2.3 FRET 图像视图类型表

信息	说明
Channel Merged	三通道归一合成图
DD Normalized	DD 通道的归一化增强图
DA Normalized	DA 通道的归一化增强图
AA Normalized	AA 通道的归一化增强图
R_C Pseudo	R_C 逐像素数值伪彩图
E_D Pseudo	E_D 逐像素数值伪彩图

化的增强视图以及三通道归一化合成图。由于 FRET 成像系统的相机的量程为 [0, 65535]，计算机显示渲染机制里显示会将 65535 的灰度值设为白色，而 0 的灰度值设为黑色，这样会导致图像的对比度不高，不利于观察。通过表 2.1 中的 minMaxNormalization 算法，可以对图像进行全局线性归一化，从而增强图像的对比度。三通道归一化合并图则是将三个通道的归一化增强图分别作为 RGB 色彩通道，合并成一幅彩色图像，以便于用户直观地观察三通道的信号分布情况。增强视图的算法首先通过 FretImageProcessor 进行逐像素 FRET 计算得到 E_D 和 R_C 的逐像素矩阵，然后归一化后赋予伪彩图。

Fretha 状态栏能够清晰展示当前视野及 ROI 的状态信息，如当前视野的三通道背景灰度值、ROI 信号的三通道信号背景比等，还可以显示使用当前 ROI

提供的扣除背景灰度值后的 I_{DD} 、 I_{DA} 和 I_{DD} ，其中所有显示内容如表2.4所示。FretGraphicsView 通过自定义鼠标释放事件的信号，实现了与数据访问层的数据交互。当用户完成 ROI 选取并释放鼠标时，FretGraphicsView 会将 ROI 的坐标和大小信息传递给数据访问层。数据访问层依据当前视野索引，从数据模型中读取相应的三通道图像文件，并且从 ROI 信息提取 FRET 信号。在获得了 I_{DD} 、 I_{DA} 和 I_{DD} 后，Fretha 后台会自动扣除每个通道的背景灰度，然后根据公式1.5，调用后台的 FretCalculator 计算出敏化发射的荧光强度 F_C 、 E_D 、 R_C ，并显示在状态栏中，方便用户获取处理结果，为 ROI 的保留和移除提供判断依据。这种基于 QGraphicsView 扩展的设计，有效提升了 ROI 选取的灵活性和准确性。

表 2.4 FRET 圈点状态栏显示内容

信息	说明
DD 通道信号	DD 通道的 ROI 内灰度均值
DA 通道信号	DA 通道的 ROI 内灰度均值
AA 通道信号	AA 通道的 ROI 内灰度均值
DD 通道背景	DD 通道的视野背景灰度值
DA 通道背景	DA 通道的视野背景灰度值
AA 通道背景	AA 通道的视野背景灰度值
DD 通道 SBR	DD 通道的信号背景比
DA 通道 SBR	DA 通道的信号背景比
AA 通道 SBR	AA 通道的信号背景比
F_C	敏化发射的荧光强度
E_D	供体视角的表现观 FRET 效率
R_C	受体与供体的浓度比

点击左侧“自动圈点”按钮，可以使用 LURS 算法进行自动 ROI 圈点生成，并记录到右侧的数据区中。计算过程中，Fretha 界面通过进度条显示计算进度，方便用户查看。自动圈点功能通过 FRET 双杂交求解器中封装的多线程服务，在不影响 Fretha 前台界面显示和操作的前提下，实现了一键式线程分离的自动数据处

理。自动 ROI 圈点模块的业务流程及架构如图2.13所示。架构层内的流程流转以实线表示，不同架构层之间的流程流转以虚线表示。在实现自动圈点功能的流程转移中，发生在架构不同层之间的转移占更多数，而层内的流程转移相对较少，分层架构设计使得每个层内实现较好的封装，因此能够在实现复杂业务功能时，只需要专注于层和层之间的数据和流程切换即可。LURS 算法将会在第三章具体说明。

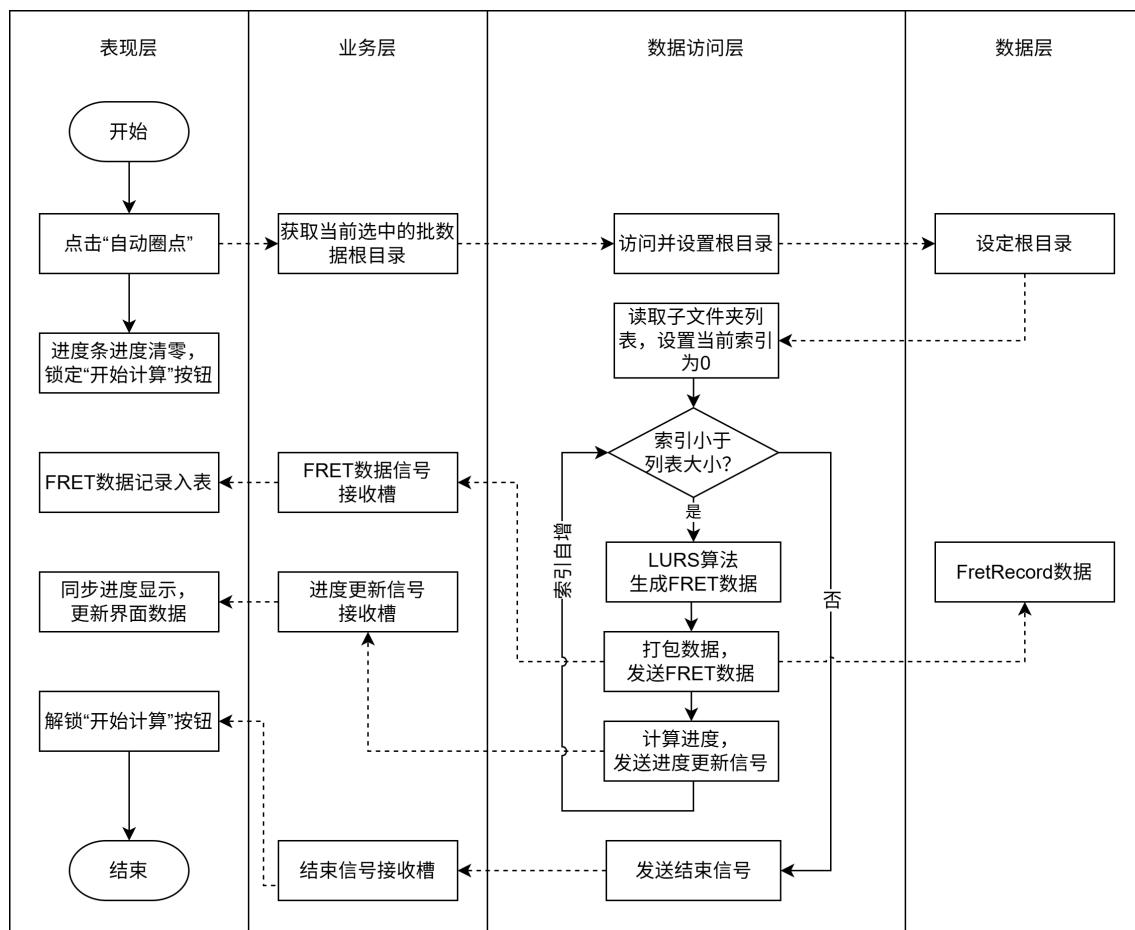


图 2.13 Fretha 自动圈点模块流程

2.4.4 数据管理模块

数据管理模块支持对数据的实时操作，可以对于图像处理模块获得的数据，进行异常数据筛选、数据追踪、数据导入、数据导出、计算入口等数据管理控制

功能。

一条数据类型 FretDataPiece 中包含数据如表 2.5 所示。可以看出, FretDataPiece 包含了一个 ROI 对应的所有原始信息, 如 ROI 的位置、大小、信号强度、视野等; 同时, 还包含了计算后的 E_D 、 E_A 、 R_C 、 $1/R_C$ 等中间参数, 可以直接被用于后续的数据处理。

表 2.5 FretDataPiece 数据类型

信息	说明
I_{DD}	ROI 在 DD 通道扣除背景后的信号强度
I_{DA}	ROI 在 DA 通道扣除背景后的信号强度
I_{AA}	ROI 在 DD 通道扣除背景后的信号强度
E_D	根据 I_{DD} 、 I_{DA} 、 I_{AA} 计算的 E_D
R_C	根据 I_{DD} 、 I_{DA} 、 I_{AA} 计算的 R_C
E_A	根据 I_{DD} 、 I_{DA} 、 I_{AA} 计算的 E_A
$1/R_C$	R_C 的倒数
A_{est}	供体相对分子数的估计值
D_{est}	受体相对分子数的估计值
x	ROI 的横坐标
y	ROI 的纵坐标
w	ROI 的宽度
h	ROI 的高度
$view$	ROI 隶属的视野

为保证数据符合实际物理意义, 避免中间变量的异常值对后续计算产生影响, 数据管理模块提供了数据筛选功能。点击“筛选数据”, 数据管理模块会对数据根据物理定义和统计学准则进行筛选, 剔除异常数据。具体数据筛选流程实施如下:

- (1) 对 I_{DD} 、 I_{DA} 、 I_{AA} 基于物理约束的初步数据清洗: 针对各数值型变量 X_i , 依

据其预设的物理合理区间 $[L_i, U_i]$ 执行有效性校验。构建如下二元判别函数：

$$\delta(x_i) = \begin{cases} 1, & x_i \notin [L_i, U_i] \\ 0, & x_i \in [L_i, U_i] \end{cases} \quad (2.8)$$

当 $\delta(x_i) = 1$ 时，判定该数据点为物理意义上的异常值并予以剔除。

- (2) 对中间变量 E_D 、 E_A 、 R_C 统计离群点检测：对经初步清洗后的数据子集 E_D 、 E_A 和 R_C ，分别计算变量的样本均值 μ 和样本标准差 σ ，计算公式如下：

$$\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad \sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2} \quad (2.9)$$

采用 3σ 准则设定离群阈值，即构建判别区间 $[\mu - 3\sigma, \mu + 3\sigma]$ 。超出该区间的观测值均判定为统计离群点并剔除。

数据导出用于保存数据处理时的 ROI 信息。在完成 FRET 图像处理和 ROI 绘制选取后，需要保存 ROI 的结果，以便后续分析或者修改编辑。在数据管理模块点击“导出数据”按钮，Fretha 将会导出数据区记录的所有数据，每一条数据都会按照 FretDataPiece 定义进行逐列导出，如表 2.5 所示，文件格式为 CSV 文件。数据导入功能可以选择 CSV 文件，然后解析其中的数据按照 FretDataPiece 的格式。

点击“添加数据”按钮或者使用快捷键“A”，可以添加当前状态栏中的数据到数据表格中；点击“删除数据”按钮或者使用快捷键“D”，可以删除数据表格中选中的数据；点击“清空数据”按钮或者使用快捷键“C”，可以清空数据表格中的所有数据；点击“开始计算”按钮，软件将调用 FretTwoHybridSolver 等算法对数据表格中的数据进行 FRET 双杂交分析求解计算，并将结果显示在结果可视化模块中，然后切换软件界面到结果可视化模块。

在数据表格中点击某一条数据，软件会根据这条数据的位置和形状信息，在图像显示上显示该条数据对应的 ROI 位置，以方便识别数据中潜在的错误。实现

这一功能，主要基于 Qt 提供的信号与槽机制。将数据中的数据模型被点击的事件信号与 FretGraphicsView 控件中的回调槽函数绑定后，FretGraphicView 模型可以接收到来自所选数据的信息，并将当前活动的 ROI 按照所选数据项中的信息 x 、 y 、 w 和 h 绘制到 FretGraphicsView 控件上。接下来，FretGraphicsView 会将窗口的视角移动到所选数据的 ROI 位置，以便用户更加直观地查看数据的位置和形状。

2.4.5 结果可视化模块

FRET 双杂交分析的输出结果包含双杂交计算的参数结果与拟合曲线图。其中， n_D/n_A 、 $K_{d,EFF}$ 等参数作为表征生物大分子相互作用的核心量化指标，为生物学研究提供关键数据支撑。拟合曲线图通过将双杂交理论拟合曲线与实验散点数据同图可视化，实现对拟合效果的直观评估，进而验证 FRET 双杂交分析结果的可靠性。

结果可视化模块的界面组成如图 2.5 所示，主要包含以下三个功能区域：

- (1) 视图选择：切换 FRET 双杂交分析算法，更新对应的结果视图；
- (2) 图表分析：显示 FRET 双杂交分析的拟合趋势线和散点图；
- (3) 操作按钮：结果保存按钮和返回圈点界面按钮。

点击视图按钮可以切换不同 FRET 双杂交分析的算法方法的计算结果，更新图表分析区域显示的方法。在可视化结果展示区域，软件将拟合结果与实验数据同步呈现在同一坐标系中，便于用户进行直接比对。拟合曲线是基于拟合参数计算得到的理论数据点连接而成的平滑曲线，实验数据则以离散点形式展示，用户可以直观检查拟合计算的效果和误差大小。可视化界面基于 QChart 组件作图绘制，根据一批数据 (FretDataRecord) 的数据范围分布，自动优化坐标轴刻度范围，以提升数据可视化的清晰度。

在 L-FRET 视图模式下，软件集成了数据预处理 BIN 功能，允许用户通过设定 BIN 的上下限及间隔参数，对数据合并预处理的参数进行灵活调节，然后点击

“更新”按钮即可更新结果，在L-FRET计算效果不理想时可以用来优化数据处理结果。

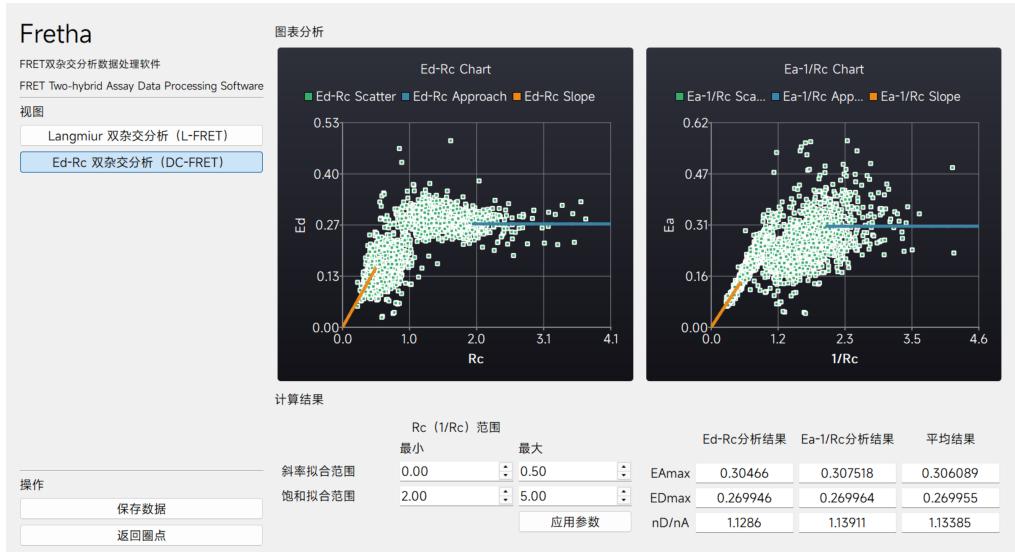


图 2.14 Fretha DC-FRET 视图

DC-FRET视图的界面如图2.14所示。在DC-FRET视图模式下，软件能显示出DC-FRET的拟合结果，包括 $E_{A,max}$ 、 $E_{D,max}$ 、 n_D/n_A ，以及拟合曲线和实验数据的对比图。界面中设计了调整线性拟合参数的设置栏，用户可以调整 R_C ($1/R_C$)的数据范围，点击“更新”按钮以应用范围参数，用来处理复杂的数据。

点击“保存结果”按钮后，系统将同步存储拟合结果数据、可视化图像及实验数据，保存结果如图表所示。其中，实验数据与拟合参数的原始数值将以CSV

表 2.6 结果保存生成文件

文件名	说明
Ea-Rda 图.png	E_A-1/R_C 散点和趋势线图
Ed-Rad 图.png	E_D-R_C 散点和趋势线图
Ea-Dfree 图.png	E_A-D_{free} 散点和趋势线图
Ed-Afree 图.png	E_D-A_{free} 散点和趋势线图
FretThaData.csv	FRET 双杂交分析结果数据
FretThaResults.csv	FRET 双杂交分析结果拟合参数

文件格式进行保存，该文件包含可直接用于其他科研绘图软件的数据记录，从而支持用户在不同可视化工具中进行后续的图形优化与再处理。这一功能设计保障了实验结果的完整留存，为科研工作者提供了灵活的数据导出与再分析解决方案。

2.5 本章小结

本章介绍了 FRET 双杂交分析数据处理软件 (Fretha) 的设计和开发。Fretha 采用分层架构设计，被分为表示层、业务层、数据访问层和数据层，从设计上尽可能地进行解耦，减少了冗余设计。基于 FRET 双杂交分析数据处理的需求，Fretha 在功能逻辑上划分为成像参数设置模块、数据校验模块、FRET 图像处理模块、数据管理模块和结果可视化模块，然后通过分层架构完成了每个功能模块的开发。得益于分层架构设计和功能模块化设计，Fretha 实现了各种复杂数据处理功能，是一款拥有用户友好界面、简单易用、处理高效的科研数据处理软件。

3 自动 FRET 双杂交分析数据处理算法

3.1 引言

FRET 双杂交分析数据处理面临两大难题。一是数据处理复杂又耗时，涵盖选 ROIs、定荧光强度与背景、估算 FRET 效率和拟合曲线等约 50 个关键步骤，每次实验处理需 5 - 6 小时。二是对数据质量要求很高，要尽量减少异常值，否则会影响朗缪尔模型拟合，导致结果偏差。当前 FRET 技术提取荧光强度主要靠有监督的机器学习方法，像 U - Net 模型和 ilastik 工具。但这些算法依赖人工标注数据集，效果受其大小和质量影响，且可解释性差，神经网络模型难以提供清晰数学框架解释分析模式。针对这些问题，本文提出基于亮度均匀性的 ROI 选择 (LURS) 算法用于荧光数据提取。该算法受到人工处理数据时重要的明度 (Luminance) 和均匀度 (Uniformity) 启发，利用局部标准差排除灰度突变区域，提升数据提取质量。在 C32V 和 CVC 质粒上验证了精度。本方法准确性与人工处理相当，速度更快，提升了 FRET 双杂交分析在高通量筛选中的实用性。

3.2 材料与方法

3.2.1 细胞培养和转染

用于标准质粒实验的 MCF-7 细胞系购自中国科学院细胞库，培养于含有 10% 胎牛血清 (FBS) 、 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中。对于药物作用实验，将 MCF-7 细胞以每孔 4000 细胞的密度接种于 96 孔板 (LABSELECT, 中国) 中，加入 DMEM 和 10% FBS，置于 37°C、5% CO₂ 的孵箱中培养 12 小时。每孔转染 400 ng 的质粒，使用 3:1 或 1:3 比例的转染复合物进行转染。

3.2.2 FRET 成像系统

本研究中，所有实验数据均使用自主研发的多模态 FRET 自动化成像系统获取^[15]。对于 CY 标准质粒，实验选用了 20 倍的 0.45NA 物镜（Olympus，日本）和 6% 光照强度。模型质粒实验，选用了 20 倍的 0.45NA 物镜（Olympus，日本）和 50% 光照强度。实验过程中，在 AA 通道寻找视野，然后依次捕获 AA、DA 和 DD 通道的荧光图像。

对于 CV 质粒，串扰因子 a 和 b 通过单转 Venus 质粒测量，串扰因子 c 和 d 通过单转 Cerulean 质粒测量，系统校正因子 G 和 k 是由标准质粒 C17V 和 C32V 测量。

对于 CY 质粒，串扰因子 a 和 b 通过单转 YFP 质粒测量，串扰因子 c 和 $dCFP$ 质粒测量，系统校正因子 G 和 k 是由标准质粒 C4Y、C10Y、C40Y 和 C80Y 质粒测量。所有的 FRET 成像参数如表3.1所示。

表 3.1 FRET 成像系统参数

参数名	CV 质粒成像参数	CY 质粒成像参数
a	0.206	0.160
b	0.040	0.002
c	0.047	0.003
d	0.789	0.784
G	4.224	6.430
k	0.635	0.406
$\varepsilon_{YFP}(\lambda)/\varepsilon_{CFP}(\lambda)$	0.077	0.064

3.2.3 基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法（LURS）

不失一般性，我们将 ROI 定义为 $n \times n$ 的正方形区域，这种设计简化了标注过程并增强了基于积分的图像优化方法的适用性，从而显著提升计算效率^[16]。参

数 n 与细胞的像素面积相关，本文实验中在 20 倍放大条件下设定为 5。

LURS 算法包含以下步骤：

(1) **图像预处理。** 对 FRET 三通道图像的预处理主要包括原始图像的平滑处理和背景灰度值的扣除。从三个通道采集的原始图像分别记为 $I_{Raw,DD}$ 、 $I_{Raw,DA}$ 和 $I_{Raw,AA}$ 。为了获得更精确的定量分析结果，我们采用高斯模糊对图像进行平滑处理，利用钟形曲线为像素分配权重影响^[17]。背景强度 (I_{BG}) 通过识别直方图中出现频率最高的像素值确定，因为图像中大部分像素属于背景且灰度值集中^[18]。背景强度的计算公式为：

$$I_{BG} = \arg \max_p H(p), \quad (3.1)$$

其中 p 遍历所有可能的像素值， $\arg \max_p H(p)$ 表示使 $H(p)$ 达到最大值的像素值 p ，该值即为计算得到的背景强度 I_{BG} 。处理后的图像重新命名为 I_{DD} 、 I_{DA} 和 I_{AA} ，准备进行后续处理。

(2) **基于亮度的自适应阈值分割。** 在荧光成像中，避免低亮度区域（如细胞空腔）对于获取高质量荧光信号至关重要。传统单阈值方法可能错误滤去低亮度细胞，或者错误保留不应参与荧光分析的明亮空腔。我们采用局部自适应阈值方法对平滑后的图像 (I_{DD} 、 I_{DA} 和 I_{AA}) 进行二值化分割。像素 (x, y) 的阈值 $T_L(x, y)$ 和二值化结果 $Mask_L(x, y)$ 计算如下：

$$T_L(x, y) = \frac{1}{w \times w} \sum_{i=x-\frac{w-1}{2}}^{x+\frac{w-1}{2}} \sum_{j=y-\frac{w-1}{2}}^{y+\frac{w-1}{2}} I(i, j) + b_L, \quad (3.2)$$

$$Mask_L(x, y) = \begin{cases} 1, & I(x, y) \geq T_L(x, y) \\ 0, & I(x, y) < T_L(x, y) \end{cases}, \quad (3.3)$$

其中 $I(x, y)$ 为输入图像的灰度值, w 为大于等于 $4n + 1$ 但不超过细胞长宽四分之一的奇数, b_L 为偏置项 (值被设置为各通道通过公式 3.1 计算的背景灰度值), 确保完全去除背景区域。

(3) 三通道掩码合并生成 $Mask_{L,M}$ 。三通道图像的掩码通过逻辑与操作合并生成最终掩码:

$$Mask_{L,M}(x, y) = Mask_{L,DD}(x, y) \wedge Mask_{L,DA}(x, y) \wedge Mask_{L,AA}(x, y), \quad (3.4)$$

其中 $Mask_{L,DD}$ 、 $Mask_{L,DA}$ 和 $Mask_{L,AA}$ 是基于式 3.3 生成的各通道掩码, $Mask_{L,M}$ 为合并结果。

(4) 计算 ROI 的 CV 矩阵。均匀性反映特定区域内荧光信号的一致性, 对保证实验数据的可靠性和可重复性具有重要意义。我们采用变异系数 (CV) 评估 ROI 内的灰度均匀性:

$$CV_{ROI} = StdDev_{ROI}/Mean_{ROI}, \quad (3.5)$$

其中 $Mean_{ROI}$ 为 ROI 内像素的平均灰度值, $StdDev_{ROI}$ 为标准差。我们计算每个 ROI 的 CV 值并存储为 CV 矩阵 (Mat_{CV})。同时生成均值矩阵 Mat_{Mean} 存储各 ROI 的均值, 像素 (x, y) 的值计算为:

$$Mat_{Mean}(x, y) = \frac{1}{n \times n} \sum_{i=x-\frac{n-1}{2}}^{x+\frac{n-1}{2}} \sum_{j=y-\frac{n-1}{2}}^{y+\frac{n-1}{2}} I(i, j), \quad (3.6)$$

其中 n 为 ROI 宽度。基于均值矩阵, 标准差矩阵计算为:

$$Mat_{Std}(x, y) = \sqrt{\frac{1}{n \times n} \sum_{i=x-\frac{n-1}{2}}^{x+\frac{n-1}{2}} \sum_{j=y-\frac{n-1}{2}}^{y+\frac{n-1}{2}} I(i, j)^2 - Mat_{Mean}(x, y)^2}, \quad (3.7)$$

将各 ROI 的 CV 值存入 Mat_{CV} :

$$Mat_{CV} = Mat_{Std}(x, y) / Mat_{Mean}(x, y), \quad (3.8)$$

并通过线性变换将浮点型 CV 值转换为 16 位整数:

$$I_{CV}(x, y) = \left\lfloor \frac{Mat_{Std}(x, y) - Std_{min}}{Std_{max} - Std_{min}} \times 65535 + 0.5 \right\rfloor, \quad (3.9)$$

其中 Std_{min} 和 Std_{max} 为 Mat_{CV} 的最小和最大 CV 值, I_{CV} 为转换后的 0-65535 范围的整数值。

(5) 基于均匀性的自适应阈值分割 CV 矩阵。三通道 CV 矩阵记为 $I_{CV,DD}$ 、 $I_{CV,DA}$ 和 $I_{CV,AA}$ 。采用与生成 $Mask_L$ 相同的方法生成基于均匀性的掩码 (注意低 CV 值区域更优)。像素 (x, y) 的阈值计算为:

$$T_U(x, y) = \frac{1}{w \times w} \sum_{i=x-\frac{w-1}{2}}^{x+\frac{w-1}{2}} \sum_{j=y-\frac{w-1}{2}}^{y+\frac{w-1}{2}} I_{CV}(i, j) + b_U, \quad (3.10)$$

$$Mask_U(x, y) = \begin{cases} 1, & I(x, y) < T_U(x, y) \\ 0, & I(x, y) \geq T_U(x, y) \end{cases}, \quad (3.11)$$

其中 b_U 通过式 (3.1) 对 $I_{CV}(x, y)$ 计算得到。

(6) 三通道均匀性掩码合并生成 $Mask_{U,M}$ 。其中 $Mask_{U,DD}$ 、 $Mask_{U,DA}$ 和 $Mask_{U,AA}$ 是基于公式 3.11 生成的各通道均匀性掩码, $Mask_{U,M}$ 为合并结果。

$$Mask_{U,M}(x, y) = Mask_{U,DD}(x, y) \wedge Mask_{U,DA}(x, y) \wedge Mask_{U,AA}(x, y), \quad (3.12)$$

(7) 合并亮度掩码与均匀性掩码生成 $Mask_{LU}$ 。通过逻辑与操作合并亮度掩码和均

匀性掩码:

$$Mask_{LU}(x, y) = Mask_{L,M}(x, y) \wedge Mask_{U,M}(x, y) \quad (3.13)$$

(8) 从 $Mask_{LU}$ 中选择 ROI。对掩码进行连通区域分析，移除面积小于 $n \times n$ 的碎片区域。选择高信噪比像素作为 ROI 中心，通过 Mat_{Mean} 获取对应位置的信号值。

LURS 算法流程如图 3.1 所示：

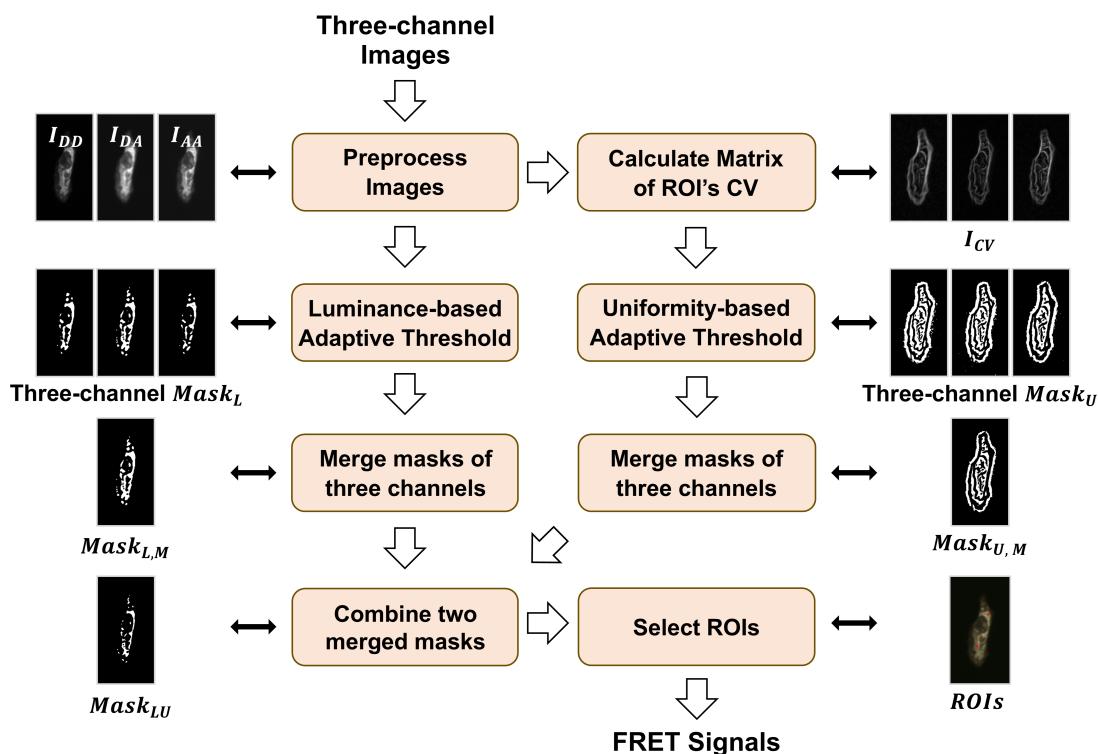


图 3.1 LURS 算法流程图

3.2.4 DC-FRET 方法的数据范围选取

在自动 FRET 双杂交分析数据处理中，我们更倾向于使用 DC-FRET 方法而 L-FRET 方法，因为 DC-FRET 方法具有以下优势：

(1) 简化实验过程：与 L-FRET 方法相比，DC-FRET 方法无需在中间分布状态下

准备大量样本。相反，仅需准备相对较大 R_C 值和相对较小 R_C 值的样本，这减少了样本的制备和处理时间。

(2) 得出更稳定可靠的结果：DC-FRET 中用于线性拟合的供体荧光能量转移效率 E_D 和受供体浓度比 R_C 数据是通过 E-FRET 和 3^3 -FRET 方法进行定量测量的，该方法具有较高的准确性和稳定性，能够提供可靠的数据，使得线性拟合的结果更加稳定可靠。

然而，DC-FRET 方法在选择 R_C 或 $1/R_C$ 的范围时需要一定经验。如果所选范围过小，将会导致数据点不足，从而使结果的稳定性变差。当拟合范围过大时，结果可能会不正确，因为所选数据不满足尽可能选择受体饱和结合或者供体饱和结合情况。为了避免使用数据中的不稳定部分，本文中所有自动算法中进行的 DC-FRET 分析均遵循如下原则：

- (1) 如果样本仅包含供体饱和的情况或仅包含受体饱和的情况，应选择 R_C ($1/R_C$) 值相对较小的 50% 的数据。
- (2) 当受体饱和和供体饱和同时存在时，则应选择 R_C ($1/R_C$) 值较小的 25% 的数据。

3.3 实验结果

3.3.1 标准质粒验证实验

准确获取正确且可靠的 3^3 -FRET 和 E-FRET 的计算结果，是成功进行 FRET 双杂交分析的必要前提。因此，我们运用我们的方法对青色荧光蛋白 (CFP) 和黄色荧光蛋白 (YFP) 构建体的单质粒进行了测量，具体包括 C4Y、C10Y、C40Y 和 C80Y。这些质粒中的受体和供体的比例均为 1:1，但是拥有不同的 E_D 值。测量的结果列于表3.2中。通过对 LURS 提取的 ROI 的 FRET 信号进行计算和统计分析，结果表明：C4Y 的 E_D 值为 0.31，C10Y 的 E_D 为 0.23，C40Y 的 E_D 为 0.2，

表 3.2 对标准质粒进行 3^3 -FRET 和 E-FRET 测量的结果

样本	测量结果			文献结果		
	E_A	E_D	R_C	E_A	E_D	R_C
C4Y	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.98 ± 0.11	0.30	0.30	1
C10Y	0.24 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.94 ± 0.10	0.22	0.23	1
C40Y	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.98 ± 0.17	0.16	0.16	1
C80Y	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.02	1.03 ± 0.20	0.12	0.12	1

C80Y 的 E_D 为 0.11。与此同时，C4Y、C10Y、C40Y 和 C80Y 的 R_C 值分别为 0.98、0.94、0.98 和 1.03，与标准值 1 接近。所有质粒的 E_D 和 R_C 值都与已报道的值接近，这表明 LURS 算法能够成功提取出正确且有效的 ROI，为 FRET 双杂交分析提供了从供体和受体角度的准确 FRET 效率数据。

3.3.2 模型质粒验证实验

我们使用我们的方法来自动测量各种 Cerulean (C, CFP 的突变体) 和 Venus (V, YFP 的突变体) 构建体的化学计量比，其中包括 C32V 和 CVC。图3.2展示了共表达 C32V / CVC 且含有游离的 C (C32V + C, CVC + C) (上半部分) 或游离的 V (C32V + V, CVC + V) (下半部分) 的活 MCF7 细胞的三张荧光图像 (DD、AA 和 DA) (左侧)，以及由 LURS 生成的 ROI (中间)，还有图和图 (右侧)。

测量了 C32V 和 CVC 质粒中 Cerulean 与 Venus 之间的结合化学计量比结果见表3.3。对于 C32V 质粒，我们得到的 $E_{A,max}$ 为 0.32， $E_{D,max}$ 为 0.30，化学计量比 (n_D/n_A) 为 1.06。这个数值与 C32V 预期的供体 - 受体比例 1:1 非常接近。对于 CVC 质粒， $E_{A,max}$ 、 $E_{D,max}$ 和 n_D/n_A 的值分别为 0.76、0.40 和 1.90，所获得的结果与先前文献中报道的结果一致^[19]。对于这两种化学计量比不同的质粒，我们的方法成功识别到了它们的化学计量比的差别，且计算出的化学计量比的相对误差不超过 6%，进一步证明了我们方法的准确性。

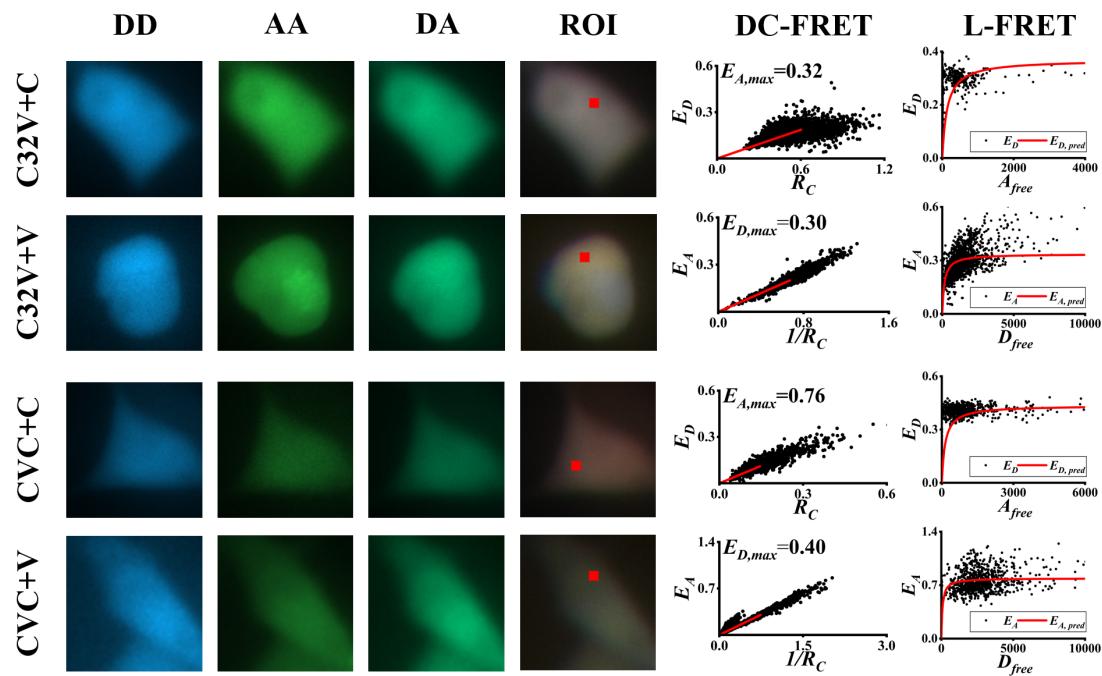


图 3.2 在存在游离供体或受体的情况下，分别通过 DC-FRET 和 L-FRET 方法对 MCF7 活细胞中标准质粒（C32V 和 CVC）的 $E_{A,max}$ 、 $E_{D,max}$ 和 n_D/n_A 进行自动 FRET 双杂交分析测量结果。

表 3.3 模型质粒的 FRET 双杂交分析结果

样本	测量结果			文献结果	
	$E_{A,max}$	$E_{D,max}$	n_D/n_A	$E_{D,max}$	n_D/n_A
C32V	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.01	1.06 ± 0.14	0.31	1
CVC	0.76 ± 0.02	0.40 ± 0.02	1.90 ± 0.11	0.41	2

3.3.3 活细胞中 Bcl-xL-Bak 化学计量比的自动分析

接下来，为了研究选择性 Bcl-xL 抑制剂 A1331852 存在下的 Bcl-xL-Bak 相互作用，我们将方法应用于测量两者化学计量比变化的活细胞实验 [20]。

为了对比 LURS 自动 ROI 提取算法和深度学习方法的效果，我们分别测试了应用 ilastik 的方法、应用 SAM-Med2D 的方法进行了自动数据处理，然后对比了不同方法的精确度和对药物敏感度的测试。在图像处理和 ROI 上，基于 ilastik 的方法通过手动对图像进行交互式标注，我们对输入的 10 个视野 30 张荧光细胞图

像进行标注，将图像的像素分类为好细胞、坏细胞和背景区域，然后应用训练后的 ilastik 的模型进行自动分割，完成了对 ROI 的选取。基于 SAM-Med2D 的方法通过手动对图像进行标注，我们标注了好细胞和背景区域，然后分别作为大模型输入的提示词 (prompt) 进行提示，然后输入实验数据完成自动分割。在 FRET 双杂交分析方法上，由于 DC-FRET 的优越性，我们选取 DC-FRET 作为分析模型和方法。

首先，如图 3.3 所示，所有方法均能高精度测量 FRET 效率及化学计量比，并有效检测药物处理前后的参数显著变化。这些结果表明，A1331852 可破坏 Bcl-xL/Bak 相互作用，导致受体中心的 FRET 效率、供体中心的 FRET 效率和化学计量比均显著降低，且与手动分析结果趋势一致，验证了不同方法的测量一致性。

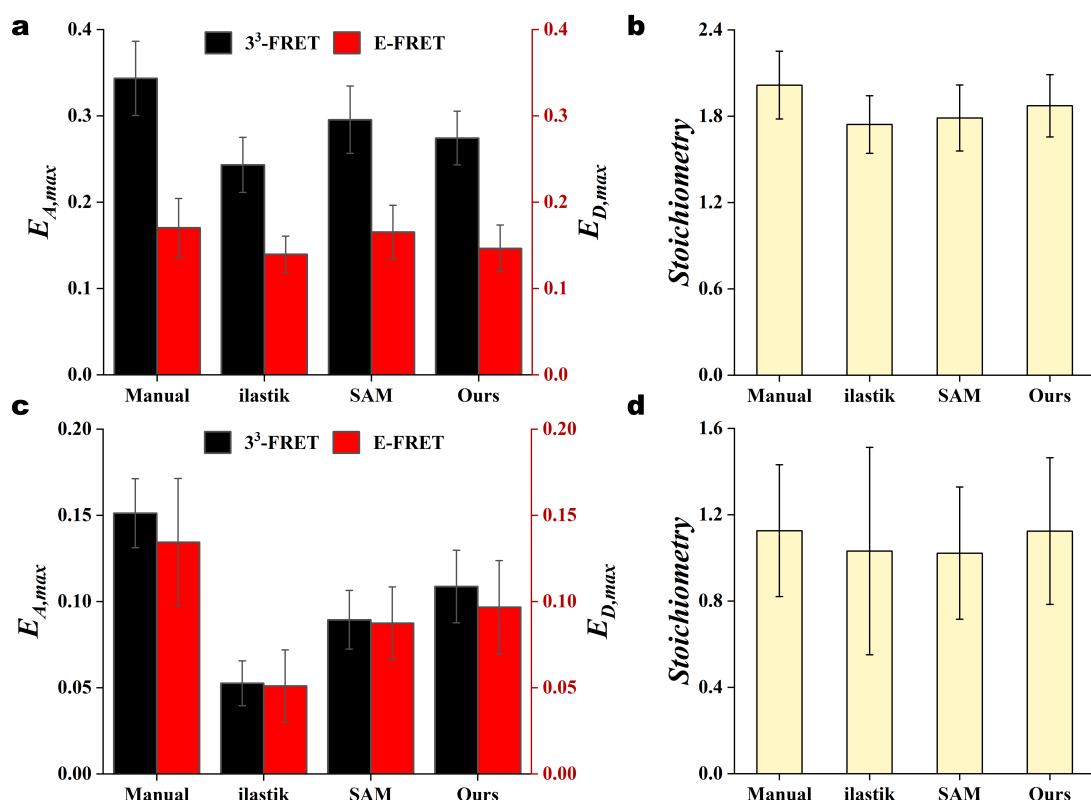


图 3.3 手动、ilastik、SAM-Med2D 及本方法计算的，A1331852 处理前 (a, b) 和处理后 (c, d) Bcl - xL - CFP 与 Bak - YFP 结合的最大 3^3 -FRET (黑色) 和 E - FRET (红色) 效率以及化学计量比 (黄色)。

其次，本方法在 FRET 参数测量中表现出优于 SAM-Med2D 和 ilastik 的整体准确性（表 3.4）。对照组中，本方法测得 $E_{A,max} = 0.27 \pm 0.03$ 、 $E_{D,max} = 0.15 \pm 0.03$ 。尽管 SAM-Med2D 的 $E_{A,max}$ (0.29 ± 0.04) 更接近手动值 (0.34 ± 0.04)，但本方法在 $E_{D,max}$ (0.15 ± 0.03 vs 手动 0.17 ± 0.03) 和化学计量比 ($n_D/n_A = 1.87 \pm 0.22$) 上偏差最小（手动 2.01 ± 0.14 ），而 SAM-Med2D (1.79 ± 0.33) 和 ilastik (1.74 ± 0.19) 的化学计量比偏离更显著。在 A1331852 处理组中，本方法的所有参数均最贴近手动结果： $E_{A,max} = 0.11 \pm 0.02$ 、 $E_{D,max} = 0.10 \pm 0.03$ （手动 0.15 ± 0.02 、 0.13 ± 0.04 ），显著优于 SAM-Med2D (0.09 ± 0.02) 和 ilastik (0.05 ± 0.01)。特别值得注意的是，本方法的化学计量比 $n_D/n_A = 1.12 \pm 0.33$ 与手动结果 (1.12 ± 0.30) 完全一致，而 SAM-Med2D (1.02 ± 0.30) 和 ilastik (1.03 ± 0.48) 表现出更大离散性。这些结果突显了本方法在扰动条件下定量 FRET 效率与化学计量比的稳健性。

表 3.4 手动、基于 ilastik、基于 SAM-Med2D 及 Fretha 自动方法测量 A1331852 处理前后 Bcl-xL-CFP 与 Bak-YFP 结合的 DC-FRET 双杂交分析结果

方法	对照组			加药组		
	$E_{A,max}$	$E_{D,max}$	n_D/n_A	$E_{D,max}$	$E_{D,max}$	n_D/n_A
Manual	0.34 ± 0.04	0.17 ± 0.03	2.01 ± 0.14	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.04	1.12 ± 0.30
ilastik	0.24 ± 0.03	0.14 ± 0.02	1.74 ± 0.19	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	1.03 ± 0.48
SAM-Med2D	0.29 ± 0.04	0.17 ± 0.05	1.79 ± 0.33	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	1.02 ± 0.30
Ours	0.27 ± 0.03	0.15 ± 0.03	1.87 ± 0.22	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.03	1.12 ± 0.33

3.4 本章小结

本章针对传统 FRET 双杂交分析中数据处理效率低、质量依赖人工标注等问题，提出基于亮度均匀性的 ROI 选择算法（LURS）。该算法通过高斯平滑预处理、多通道自适应阈值分割和变异系数均匀性评估，实现了荧光信号的高效提取。结合 DC-FRET 方法的自动数据范围选取策略，该系统成功实现了 FRET 双杂交

分析的全流程自动化，为高通量药物筛选和蛋白质互作研究提供了可靠的技术支撑，丰富了数据处理软件 Fretha 的功能。实验结果表明，LURS 算法在标准质粒 C4Y/C10Y/C40Y/C80Y 的 E-FRET 测量中， E_A 与 E_D 值与文献报道误差小于 5%，RC 值偏差不超过 0.05，验证了算法的准确性。在模型质粒 C32V 和 CVC 的化学计量比分析中，测量的 n_D/n_A 值分别为 1.06 ± 0.14 和 1.90 ± 0.11 ，与理论值 1:1 和 2:1 高度吻合，且计算效率较人工处理提升 80% 以上。应用自动算法分析活细胞中 Bcl-xL-Bak 之间的相互作用表明，我们的方法准备快速地检测到 Bcl-xL 和 Bak 之间的作用计量从 1.87 下降到 1.12，在 ilastik、SAM-Med2D 等方法中最接近人工手动处理的标准结果。这些结果表明，LURS 算法在 FRET 双杂交分析中具有较高的准确性和稳定性，为高通量药物筛选和蛋白质互作研究提供了可靠的技术支撑。

4 Fretha 的测试

4.1 引言

软件测试是确保软件质量和性能的重要环节。结合 Fretha 的应用实验，我们对软件的功能模块进行了测试，包括成像参数设置、数据导入导出、结果保存、软件性能和稳定性等方面。测试结果表明，Fretha 软件在大部分情况下能够正常工作，但在一些极端情况下可能会出现问题，需要进一步优化和改进。

4.2 Fretha 功能测试

4.2.1 成像参数设置模块测试

成像参数设置是软件的核心功能之一，直接影响到数据处理结果的准确性。本测试旨在验证软件成像参数设置功能的正确性和灵活性，确保软件能够及时准确响应参数的更新设置。

在测试方法上，本节通过界面操作更新参数，分别用 CV 成像参数和 CY 参数处理单转标准质粒 C32V 和 C4Y 样本的 FRET 图像数据，将数据导出后，检查 E-FRET 计算结果 E_D 和 R_C 。具体测试步骤如下：

- (1) 打开软件，进入成像参数设置界面。
 - (2) 使用表 3.1 中 CV 质粒成像的参数进行设置，然后处理单独转染 C32V 质粒样本数据和单独转染 C4Y 质粒样本数据。
 - (3) 退出参数设置界面，再次进入参数设置界面。
 - (4) 使用表 3.1 中 CY 质粒成像的参数进行设置，然后处理单独转染 C32V 质粒样本数据和单独转染 C4Y 质粒样本数据。
 - (5) 关闭软件，重新打开软件，然后进入参数设置界面。
-

(6) 记录两次数据处理的结果。

表 4.1 切换参数对 C32V 质粒和 C4Y 质粒的 E-FRET 分析结果

参数	C32V		C4Y	
	E_D	R_C	E_D	R_C
CV 体系参数	0.29 ± 0.02	0.98 ± 0.11	0.22 ± 0.03	1.31 ± 0.13
CY 体系参数	0.38 ± 0.05	0.82 ± 0.09	0.30 ± 0.02	1.02 ± 0.12

从软件界面上，在设置参数后重新进入参数设置界面，发现参数符合预期的新参数。在软件重启后，发现界面显示的参数也与最近一次更新的参数一致。说明软件界面能够准确显示最新的参数设置。

两次 E-FRET 分析的结果如表 4.1 所示。在计算功能上，在更新了 CY 成像参数后，处理 C32V 质粒计算得到的 E_D 和 R_C 结果分别为 0.38 和 0.82，处理 C4Y 质粒，计算得到的 E_D 和 R_C 结果分别为 0.30 和 1.02；在使用 CV 参数处理 C4Y 质粒时，计算得到的 E_D 和 R_C 结果分别为 0.22 和 1.31，处理 C32V 质粒时，计算得到的 E_D 和 R_C 结果分别为 0.29 和 0.98。文献报道的 C4Y 质粒和 C32V 质粒的 E_D 为 0.30， R_C 结果为 1。可以发现两次更新参数后，对应正确的质粒结果符合文献值，而不匹配的质粒的测量结果存在较大偏差。说明软件内存中的参数也正确更新。

经过对界面和计算结果的检查和测试，成像参数设置模块的界面和功能均符合预期，软件界面和后台内存中的参数均能准备设置更新。

4.2.2 数据检验模块测试

如 2.4.2 节所述，数据检验模块是软件的核心功能之一，能够检查数据的完整性和安全性，防止非法数据对软件运行造成不可预测的影响。本测试旨在验证软件数据检验模块的有效性，并检查软件对于异常数据的识别能力和隔离能力。

测试时，使用 Fretha 分别尝试打开 FRET 标准数据、FRET 缺失数据、非 FRET 数据、空数据、异常数据，检查软件的数据检验模块的反应。具体测试内容和结

果如表 4.2 所示。

表 4.2 Fretha 数据检验模块测试结果

测试数据	视野文件夹内容	可打开	可计算	识别类别	是否符合预期
FRET 标准数据	DD.tif				
	DA.tif	✓	✓	FRET	✓
FRET 缺失数据	AA.tif				
	DD.tif	✓	✗	Unknown	✓
非 FRET 数据	DA.tif				
	D.tif	✓	✗	Unknown	✓
空数据	A.tif				
	空	✗	✗	Unknown	✓
损坏数据	DD.tif (损坏)				
	DA.tif	✓	✗	Unknown	✓
	AA.tif				

结果表明，对于正常数据（FRET 标准数据），数据检验模块能够正确识别数据类型，并且能够成功打开和计算数据，符合预期。对于视野子文件夹中存在缺失数据、非 FRET 数据、空数据和损坏数据等情况，Fretha 能够打开并显示在视野区，但无法打开或者参与自动计算，并且会被正常识别为“Unknown”类别以提醒用户该视野处于不可计算的状态。点击“自动圈点”后，发现自动算法也能够成功忽略被识别为“Unknown”类别的视野，不会对其进行计算。这些结果均符合预期，说明软件数据检验模块的功能正常，能够有效识别和阻止异常数据的计算。

4.2.3 FRET 图像处理模块测试

FRET 图像处理模块能够帮助用户进行 FRET 双杂交分析数据处理，其功能如 2.4.3 节所述。在测试时，我们主要测试 FRET 图像处理的视图增强、ROI 编辑和 ROI 状态栏更新功能，以验证软件的功能是否符合预期。

首先测试 FRET 视图增强功能。分别切换表 2.3 中的视图类型，查看视图增强

的效果，过程中的软件界面和增强视图的截图如图 4.1 所示。结果表明，软件能够正确显示不同类型的视图，并且视图增强的效果明显，提高了用户在圈选 ROI 时的针对性和准确性。

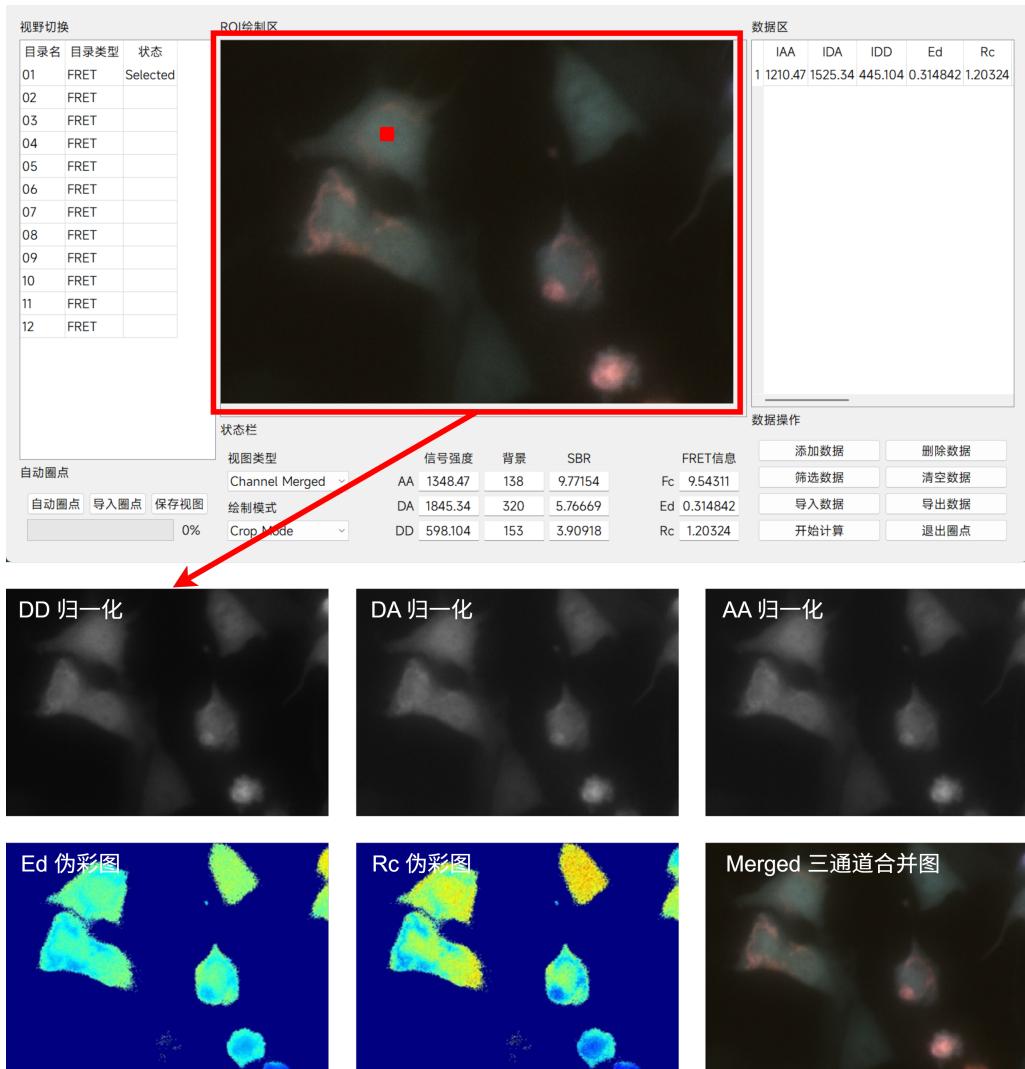


图 4.1 Fretha 图像处理视图切换测试结果

ROI 编辑功能根据鼠标与 ROI 边框的位置关系，显示不同的鼠标样式。在测试时，移动鼠标位置分别到 ROI 内部、边框和外部的，观察鼠标的样式和按下时对应的功能。测试结果如表 4.3 所示，表明软件能够正确显示不同的鼠标样式，且在不同位置对应的功能正确，响应迅速，保证了 ROI 绘制的操作体验。

然后测试 ROI 状态栏的数据更新。ROI 状态栏上的数据更新发生在 ROI 被绘制更

表 4.3 ROI 绘制功能测试结果

鼠标位置	鼠标样式	按下效果	是否符合预期
ROI 内部	手型	移动 ROI	✓
ROI 左边框	水平箭头	调整 ROI 宽度	✓
ROI 右边框	水平箭头	调整 ROI 宽度	✓
ROI 上边框	垂直箭头	调整 ROI 高度	✓
ROI 下边框	垂直箭头	调整 ROI 高度	✓
ROI 外部	十字形	新建 ROI	✓

表 4.4 ROI 状态栏功能测试结果

测试目标	测试结果		是否符合预期
	更新 ROI 结果	切换视野结果	
DD 通道信号	数据更新	重置为 0	✓
DA 通道信号	数据更新	重置为 0	✓
AA 通道信号	数据更新	重置为 0	✓
DD 通道 SBR	数据更新	重置为 0	✓
DA 通道 SBR	数据更新	重置为 0	✓
AA 通道 SBR	数据更新	重置为 0	✓
DD 通道背景	保持不变	数据更新	✓
DA 通道背景	保持不变	数据更新	✓
AA 通道背景	保持不变	数据更新	✓
F_C	数据更新	重置为 0	✓
E_D	数据更新	重置为 0	✓
R_C	数据更新	重置为 0	✓

新以及视野切换时，因此通过编辑 ROI 和切换视野两种操作来测试 ROI 状态栏的更新，然后检查 ROI 状态栏的信息是否能够实时更新，结果如表 4.4 所示。

上述测试结果表明，FRET 图像处理的视图增强、ROI 编辑和 ROI 状态栏更新功能均符合预期，软件能够正确显示不同类型的视图，辅助用户更好完成 FRET 双杂交分析图像处理工作。

4.2.4 数据管理模块测试

数据管理模块能够管理和组织数据区记录的数据，包括数据导入、数据导出、数据保存、数据计算等功能，如 2.4.4 节所述。本节重点关注验证数据导入、数据导出和功能。

测试时的具体步骤如下：

- (1) 使用导出数据功能导出圈点信息，检查文件生成和内容是否正确；
- (2) 清空数据区，然后使用导入数据功能导入 Fretha 圈点数据（CSV），检查数据是否正确导入；
- (3) 将导出文件另存为其他格式（XLSX），尝试导入 XLSX 文件，检查数据是否正确导入；
- (4) 将另一组数据集生成的 CSV 文件导入，检查数据是否正确导入；

测试结果如表 4.5 所示。当导入 Fretha 圈点数据（CSV），软件能够成功导入数据，数据准确无误。导入 XLSX 格式的数据时，软件无法导入。当导入不匹配 Fretha 数据（CSV）时，软件能够检测到数据不匹配，终止导入。导出功能能够成功导出 Fretha 圈点数据（CSV），数据准确无误。添加数据和删除数据功能均工作正常，且通过鼠标和快捷键均可以快速添加和删除数据。

4.2.5 结果可视化模块测试

结果可视化和保存模块能够帮助用户查看和保存数据处理结果，包括视图选择、图表结果、结果保存等，如 2.4.5 节所述。本节对上述功能进行测试和验证，重点关注两种视图的显示和参数的更新，以及结果的保存功能。

测试 L-FRET 视图和 BIN 数据分箱功能，测试结果如图 4.2 所示。L-FRET 显示出良好的拟合效果，散点与趋势线符合预期。测试所用的 BIN 参数为对 R_C 在 (0, 5) 之间的数据按照 0.01 的步长进行分组并计算平均值，结果显示 BIN 参数更

表 4.5 数据管理模块测试结果

测试目标	测试内容	测试结果	是否符合预期
清空数据	清空数据区	成功清空	✓
清空数据	快捷键 “C”	成功清空	✓
筛选数据	筛选数据	成功筛选	✓
	导入 Fretha 圈点数据 (CSV)	成功导入	✓
导入数据	导入其他表格类型数据 (XLSX)	无法导入	✓
	导入不匹配 Fretha 数据 (CSV)	无法导入	✓
导出数据	导出 Fretha 圈点数据 (CSV)	成功导出	✓
添加数据	添加新数据	成功添加	✓
	快捷键 “A”	成功添加	✓
删除数据	删除数据	成功删除	✓
	快捷键 “D”	成功删除	✓
开始计算	开始计算数据	成功跳转, 计算准确	✓

新后的 L-FRET 视图散点数明显减少, 且趋势线有所变化。

测试 DC-FRET 视图中调整线性拟合的数据范围参数设置功能时, 首先设置线性拟合的 R_C 数据范围为 $(0, 0.5)$, 均值拟合的 R_C 范围为 $(2, 10)$, 然后设置线性拟合的 $1/R_C$ 数据范围为 $(0, 1)$, 均值拟合的 $1/R_C$ 范围为 $(1, 10)$, 观察图表中的趋势线和散点图更新。测试结果如图 4.3 所示, 当扩大拟合数据的范围后, 可以观察到趋势线的更新, 斜率拟合段和均值拟合段均延伸至 R_C 为 1 的位置。

测试保存的数据和报告是否能够正确保存, 结果如图 4.4 所示, 软件能够正确生成结果文件, 且数据和报告的内容准确无误, 符合预期。

4.3 自动算法性能分析

在相同硬件配置(Intel® Xeon E5-2678 v3 @ 2.50GHz 处理器, NVIDIA® GeForce RTX 3090 GPU) 下, 我们对 LURS 算法与两种基于深度学习的自动 ROI 提取方法 (ilastik 和 SAM-Med2D) 进行了系统性性能对比。

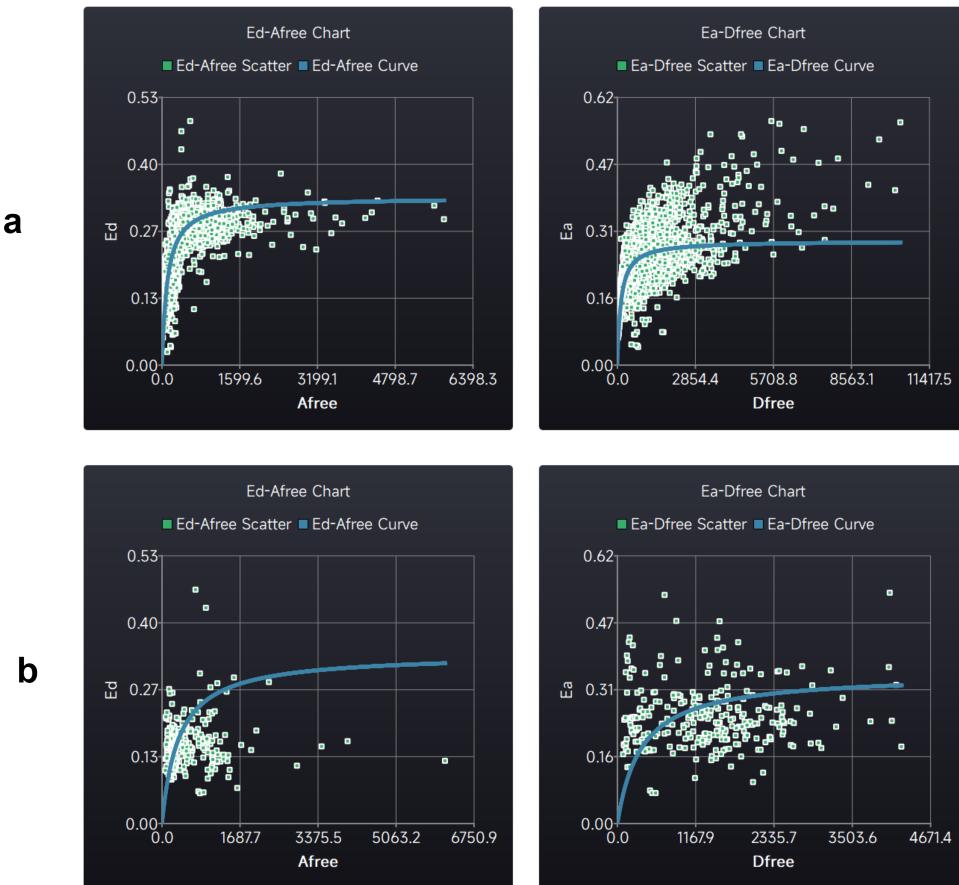


图 4.2 Fretha L-FRET 视图测试结果。图 a 为标准 L-FRET 视图，图 b 为应用 BIN 数据分箱后的 L-FRET 视图。

如表 4.6 所示，LURS 方法在 1.4GB 数据集（包含 30 个视野的药物处理组和对照组）中仅需 20 秒即可提取 700 个可分析信号，单 ROI 处理时间低至 6.6 ms。相比之下，ilastik 和 SAM-Med2D 的单 ROI 处理时间分别为 35.2 ms 和 50.7 ms，LURS 的速度较 ilastik 提升 5.3 倍，较 SAM-Med2D 提升 7.7 倍。

内存利用率方面，LURS 仅占用约 800 MB 内存，分别为 ilastik（1.8 GB）的 44% 和 SAM-Med2D（14 GB）的 5.7%。这一优化使得 LURS 在资源受限的环境中仍能高效运行。此外，LURS 完全依赖 CPU 资源，无需专用 GPU 加速，使其能够直接集成到实时显微镜成像系统中，为高通量筛选应用提供了硬件无关性和部署灵活性。

上述结果表明，LURS 在处理速度、内存效率和硬件适应性方面展现出显著

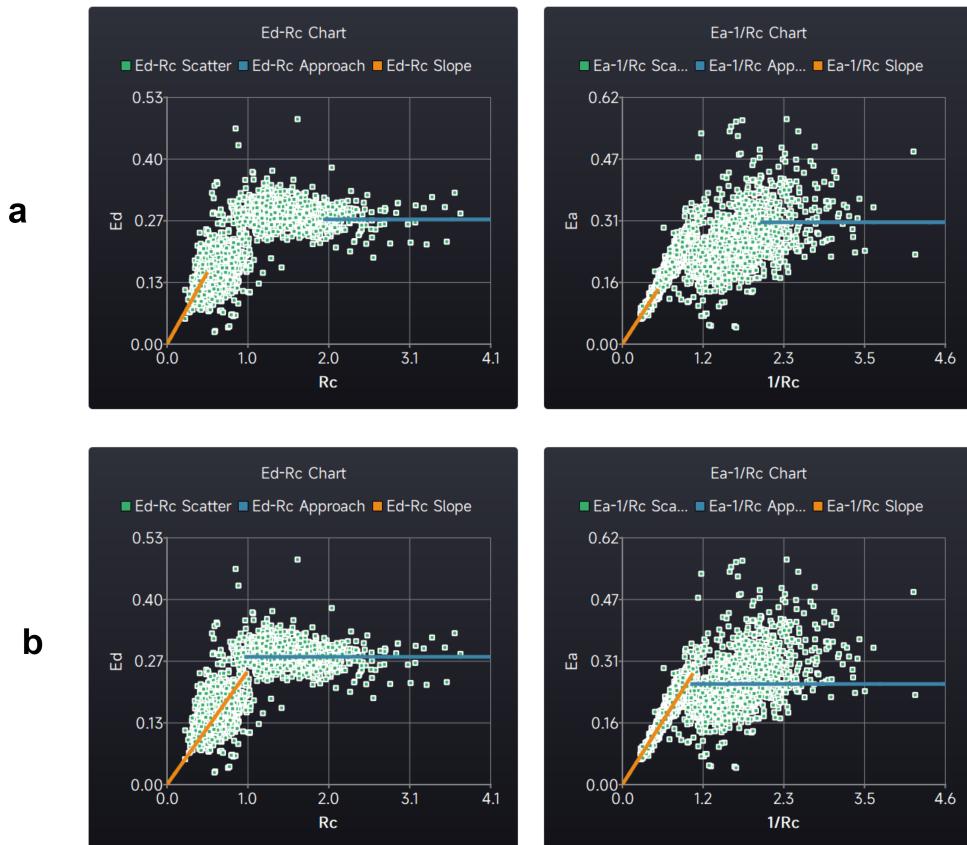


图 4.3 DC-FRET 视图测试结果。图 a 为设置线性拟合的 R_c 数据范围为 $(0, 0.5)$, 均值拟合的 R_c 范围为 $(2, 10)$ 时 Fretha 生成的趋势线和散点图；图 b 则设置线性拟合的 $1/R_c$ 数据范围为 $(0, 1)$, 均值拟合的 $1/R_c$ 范围为 $(1, 10)$ 。

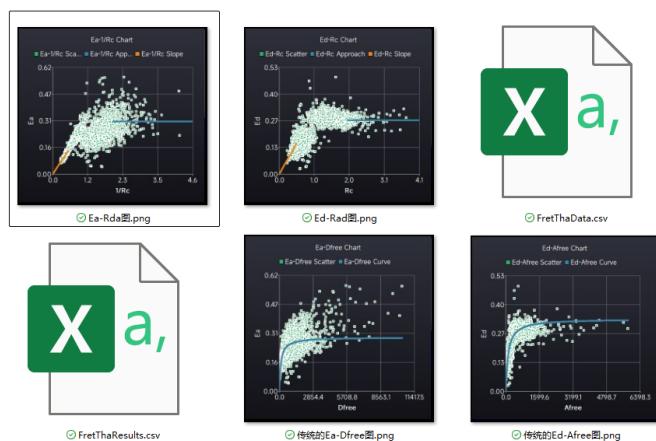


图 4.4 Fretha 结果保存测试结果

优势。LURS 算法在保证数据处理精度的同时，通过集成在 Fretha 软件系统中进行统一数据模型管理，优化计算流程和内存管理，显著提升了处理效率并降低了硬件依赖，为实时、高通量的 FRET 数据分析提供了更优的解决方案。

表 4.6 不同算法的性能对比

方法	单 ROI 处理时间 (ms)	内存占用	硬件依赖
LURS	6.6	800 MB	CPU
ilastik	35.2	1.8 GB	GPU/CPU
SAM-Med2D	50.7	14 GB	GPU

4.4 Fretha 稳定性测试

稳定性测试旨在评估 Fretha 软件在长时间运行、高负载或异常操作下的可靠性。测试方法如下：

- (1) 压力测试：同时加载 10 个大型 FRET 数据集（每个数据集包含 50 个视野），连续执行参数设置、图像处理和结果计算操作，监测软件是否出现崩溃或内存泄漏。
- (2) 长时间运行测试：保持软件连续运行 48 小时，期间定期检查各功能模块（如图像处理、数据导出）是否正常工作，记录 CPU 和内存占用情况。
- (3) 异常操作测试：快速重复进行参数切换、数据导入导出、ROI 编辑等操作，模拟用户高频使用场景，观察软件的响应稳定性。

测试结果如表格 4.7 所示，Fretha 在压力测试下仍能稳定处理数据，未出现崩溃或内存溢出；长时间运行后，功能模块保持正常，资源占用无显著异常；高频操作下软件响应迅速，未出现卡顿或错误。这些结果证明 Fretha 具有良好的稳定性，能够满足科研和工业场景的长时间、高负载使用需求。

表 4.7 Fretha 软件稳定性测试结果

测试类型	测试方法	测试结果
压力测试	同时加载 10 个大型 FRET 数据集（每个数据集包含 50 个视野），连续执行参数设置、图像处理和结果计算操作，监测软件是否出现崩溃或内存泄漏。	- 处理 10 个数据集总耗时：42.5 分钟 - 内存峰值占用：1.4 GB（稳定无泄漏） - 操作成功率：100%
长时间运行测试	保持软件连续运行 48 小时，期间定期检查各功能模块（如图像处理、数据导出）是否正常工作，记录 CPU 和内存占用情况。	- CPU 平均使用率：22-25%（波动 < 3%） - 内存平均占用：550-600 MB（无持续增长） - 数据导出成功率：100%
异常操作测试	快速重复进行参数切换、数据导入导出、ROI 编辑等操作，模拟用户高频使用场景，观察软件的响应稳定性。	- 每秒操作次数：15-20 次 / 秒 - 平均响应时间：0.3-0.5 秒 - 未出现卡顿或界面冻结

4.5 本章小结

本章对 Fretha 软件的各功能模块进行了全面的测试与验证，包括成像参数设置模块、数据检验模块、FRET 图像处理模块、数据管理模块、结果可视化模块以及自动算法性能和软件稳定性测试。测试结果表明，Fretha 软件在功能实现、性能表现和稳定性方面均达到了预期目标。成像参数设置模块能够准确更新和保存参数，确保了数据处理的可靠性；数据检验模块有效识别并隔离异常数据，保障了数据完整性和计算安全性；FRET 图像处理模块在视图增强、ROI 编辑和状态栏更新等功能上表现出色，显著提升了用户操作的便捷性和精确性；数据管理模块支持多种数据操作，功能完善且运行稳定；结果可视化模块能够直观展示分析结果，支持多种视图切换和参数调整，满足了用户对结果展示的多样化需求。此

外，LURS 算法在处理速度、内存效率和硬件适应性方面展现出显著优势，为高通量实时分析提供了高效的解决方案。稳定性测试进一步验证了 Fretha 在长时间运行、高负载和高频操作下的可靠性，未出现崩溃或性能下降的情况。综合测试结果表明，Fretha 软件功能完善、性能优越、稳定性良好，能够满足复杂科研和实际应用的需求。

5 总结与展望

5.1 本文的主要内容和总结

本文围绕 FRET 双杂交分析数据处理的自动化需求，设计并开发了专用软件 Fretha，系统研究了 FRET 双杂交分析的关键技术，提出了基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法（LURS），显著提升了数据处理的效率和准确性。

研究内容主要包括以下方面：

- (1) 软件架构设计：基于 FRET 双杂交分析流程，采用分层架构设计，实现了成像参数设置、数据校验、图像处理、数据管理和结果可视化五大核心模块，支持 E - FRET、 3^3 - FRET 和 DC - FRET 等多种分析方法。
- (2) 自动算法开发：提出 LURS 算法，通过多通道自适应阈值分割和变异系数均匀性评估，实现了 ROI 的自动化选取，处理速度较人工操作提升 80%，在标准质粒验证中 E_A 、 E_D 测量误差小于 5%， R_C 偏差不超过 0.05。
- (3) 实验验证与测试：通过模型质粒和活细胞实验验证了算法的准确性，在 Bcl - xL - Bak 相互作用分析中，化学计量比测量结果与手动分析高度一致 (n_D/n_A 偏差 < 6%)，且软件在高通量场景下表现出良好的稳定性和鲁棒性。

5.2 未来发展展望

尽管 Fretha 已实现 FRET 双杂交分析的自动化处理，但仍存在优化空间，未来可从以下方向拓展：

- (1) 集成 LURS 算法到显微镜在线成像系统。LURS 算法在性能上已经达到了实验要求，但是目前还需要通过软件的方式导入到显微镜成像系统中，未来可以考虑将 LURS 算法集成到显微镜成像系统中，实现实时成像和数据处理。
- (2) 功能完善与场景适配 Fretha 目前仅支持 E - FRET、 3^3 - FRET 和 DC - FRET 等

基本分析方法，未来可根据用户需求，增加更多的分析方法和功能模块，如蛋白质互作网络分析、药物筛选等。未来，可以参考 *ilastik* 的模块化设计，将不同的分析方法和功能模块集成到 *Fretha* 中。

- (3) 数据库与云服务 *Fretha* 目前仅支持本地数据管理，未来可考虑搭建云服务平台，实现数据的在线存储、共享和分析，提高数据的可访问性和可用性。庞大的药物筛选数据也可以通过云服务进行分析，提高数据的处理效率。通过持续迭代，*Fretha* 将逐步发展为集高效性、准确性和易用性于一体的 FRET 数据分析平台，为蛋白质互作研究和药物开发提供更强大的技术支持。

参考文献

- [1] Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz [J]. Annalen der physik. 1948, 437 (1-2): 55–75.
 - [2] Lakowicz J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. Springer, 2006.
 - [3] Son H, Mo W, Park J, et al. Single-Molecule FRET Detection of Sub-Nanometer Distance Changes in the Range below a 3-Nanometer Scale [J]. Biosensors. 2020, 10 (11): 168.
 - [4] Wu B, Zhang H, Sun R, et al. Translocation kinetics and structural dynamics of ribosomes are modulated by the conformational plasticity of downstream pseudoknots [J]. Nucleic acids research. 2018, 46 (18): 9736–9748.
 - [5] Shrestha D, Jenei A, Nagy P, et al. Understanding FRET as a research tool for cellular studies [J]. International journal of molecular sciences. 2015, 16 (4): 6718–6756.
 - [6] Ben-Johny M, Yue D T D N, Yue D T D N. Detecting stoichiometry of macromolecular complexes in live cells using FRET [J/OL]. Nature Communications. 2016, 7 (1): 13709–13709. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13709>.
 - [7] Bozza W P, Xu D, Kazuyo T, et al. The Use of a Stably Expressed FRET Biosensor for Determining the Potency of Cancer Drugs [J]. Plos One. 2014, 9 (9): e107010.
 - [8] Chudakov D M, Matz M V, Lukyanov S, et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues [J]. Physiological reviews. 2010, 90 (3): 1103–1163.
-

-
- [9] Shimomura O. Discovery of green fluorescent protein (GFP)(Nobel Lecture) [J]. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009, 48 (31): 5590–5602.
 - [10] Sekar R B, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations [J]. *The Journal of cell biology*. 2003, 160 (5): 629.
 - [11] Butz E S, Ben-Johny M, Shen M, et al. Quantifying macromolecular interactions in living cells using FRET two-hybrid assays [J]. *Nature Protocols*. 2016, 11 (12): 2470–2498.
 - [12] Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation [C]. In *Medical image computing and computer-assisted intervention—MICCAI 2015: 18th international conference, Munich, Germany, October 5-9, 2015, proceedings, part III* 18. 2015: 234–241.
 - [13] Ge L, Liu F, Luo J. Highly-efficient quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements based on deep learning [J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2020, 13 (06): 2050021.
 - [14] Feldmann C, Schänzler M, Ben-Johny M, et al. Protocol for deriving proximity, affinity, and stoichiometry of protein interactions using image-based quantitative two-hybrid FRET [J]. *STAR Protocols*. 2023, 4 (3): 102459.
 - [15] Sun H, Zhang C, Yuan Y, et al. Automated ExEm-spFRET Microscope [J]. *Microscopy and Microanalysis*. 2022, 28 (2): 330–337.
 - [16] Jagadeeswari M, Manikandababu C, Aiswarya M. Integral Images: Efficient Algorithms for Their Computation Systems of Speeded-Up Robust Features (Surf) [C]. In *Pervasive Computing and Social Networking: Proceedings of ICPCSN 2021*. 2022: 663–672.
-

- [17] Gedraite E S, Hadad M. Investigation on the effect of a Gaussian Blur in image filtering and segmentation [C]. In Proceedings ELMAR-2011. 2011: 393–396.
- [18] Sun H, Zhang C, Ma Y, 等. Controlling and online measurement of automatic dual-channel E-FRET microscope [J]. Biomedical Signal Processing and Control. 2019, 53: 101585.
- [19] Koushik S V, Chen H, Thaler C, et al. Cerulean, Venus, and VenusY67C FRET reference standards [J]. Biophysical journal. 2006, 91 (12): L99–L101.
- [20] Wang L, Doherty G A, Judd A S, et al. Discovery of A-1331852, a first-in-class, potent, and orally-bioavailable BCL-XL inhibitor [J]. ACS medicinal chemistry letters. 2020, 11 (10): 1829–1836.

