

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

学科专业: _____ 光电信息工程

论文研究方向: _____ 荧光图像分析

所在学院: _____ 光电科学与工程学院

导师姓名及职称: _____ 胡敏 实验师

_____ 陈同生 教授

2025 年 4 月 1 日

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, 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 双杂交分析是目前唯一可以在活细胞内进行生物大分子“滴定实验”的技术, 能够定量获得供受体结合的化学计量比和相对亲和力。

FRET 双杂交分析的数据处理过程繁琐费时, 限制了其推广和应用。数据处理过程需要借助 Zeiss ZEN、HCImage、ImageJ、Excel 和 MATLAB 等多个专业软件进行处理, 数据需要在不同软件间进行导入和导出。数据处理过程包括专家标注 ROI (Region of Interest)、背景扣除、异常数据过滤、FRET 效率计算、双杂交拟合计算等过程, 共 28 个步骤, 单次实验过程需要 3.5 至 7 小时。FRET 图像处理过程依赖人工手动标注 ROI, 无法满足大规模数据处理的需求, 限制了 FRET 双杂交分析技术在高通量等大规模数据场景的应用。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, 需要设计一款专门研发的数据处理软件, 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和自动化。

针对活细胞 FRET 双杂交分析数据处理的需求和问题, 本文设计并开发了一款 FRET 双杂交分析数据处理软件 **Fretha**, 支持从原始图像到化学计量比结果的规范化数据处理, 并研发了基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法 (LURS), 实现了数据处理过程的自动化。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**。该软件采用分层架构 (表现层、业务层、数据访问层和数据层) 构建, 封装了 FRET 计算器、图像分析库和双杂交求解器, 实现了 E-FRET、 3^3 -FRET、L-FRET 和 DC-FRET 等多模态分析算法。基于 Qt 5.15.2、OpenCV 和 Dlib, 实现了成像参数设置、数据校验、FRET 图像处理、数据管理、结果可视化等功能模块。**Fretha** 的设计体现了针对 FRET 双杂交分析数据处理的专业性, 实现了从原始图像到化学计量比结果的规范化高效处理。

(2) 对 Fretha 软件进行了系统性测试与评估。应用 Fretha 软件对标准质粒 C4Y/C10Y/C40Y/C80Y 进行手动 3³-FRET 分析和 E-FRET 分析, 测量得到的 E_A 值分别为 0.291 ± 0.020 、 0.243 ± 0.031 、 0.159 ± 0.018 和 0.118 ± 0.019 , E_D 值分别为 0.307 ± 0.040 、 0.230 ± 0.022 、 0.155 ± 0.011 和 0.117 ± 0.012 , 误差小于 5%, R_C 偏差不超过 0.010。使用 Fretha 手动分析 C32V 和 CVC 质粒中 Cerulean 与 Venus 的化学计量比, 测得在 C32V 质粒中的实验值为 1.071, 理论值为 1; 在 CVC 中的实验值为 2.023, 理论值为 2, 从而验证了 Fretha 手动数据处理的准确性。模块测试表明, Fretha 支持成像参数更新、异常数据隔离、FRET 图像处理、一键式数据结算和结果可视化等功能运行正常, 模块运行符合设计预期。Fretha 在 48 小时连续运行和高频操作下资源占用无显著异常, 没有内存泄露等情况, 适用于大数据量持续数据处理等场景。

(3) 首次研发了基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法 (LURS), 实现了自动 FRET 双杂交分析。Fretha 显著规范了 FRET 双杂交分析的数据处理流程, 提升了数据处理效率, 但是仍然依赖人工标注 ROI。LURS 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, 能够识别荧光图像中高信噪比且低变异性的质量荧光信号。在标准质粒验证实验中, LURS 方法测量的 E_A 与 E_D 值与文献报道值误差小于 5%, R_C 偏差不超过 0.05。LURS 测量得到的 C32V 中 C 与 V 的结合计量比为 1.063, 在 CVC 中则为 1.900, 与文献值误差不超过 6.3%。应用 LURS 算法检测活 MCF-7 细胞中 Bcl-xL-Bak 相互作用的化学计量比, 发现加药 A1331852 处理后, Bcl-xL-Bak 之间结合的化学计量比由 1.87 降为 1.12, 与手动分析高度一致。对比基于 SAM-Med2D 和 ilastik 计算误差最小, LURS 具有最佳的鲁棒性。LURS 算法处理 1.4GB 数据集的速度为 6.6 ms / ROI, 峰值内存占用为 800 MB, 在性能上优于 ilastik (35.2 ms / ROI, 1.8 GB) 和 SAM-Med2D (50.7 ms / ROI, 14 GB), 更适用于高通量药物筛选等大数据量场景。

Fretha 的推出, 提高了 FRET 双杂交分析提供了标准化自动化的水平, 推动了该技术在生物大分子相互作用研究的广泛应用。

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

ABSTRACT

Förster resonance energy transfer (FRET) technology is widely used to explore the dynamic interactions of biomacromolecules in living cells, and has broad application prospects in basic life science research, disease development, and drug development. FRET two-hybrid assay is currently the only method that can quantitatively obtain the stoichiometry and relative affinity of donor-acceptor binding through "titration experiments" in living cells. However, the data processing process relies on multiple professional software and manual processing, which is difficult to meet the needs of large-scale data processing and limits the application of FRET two-hybrid assay technology. To solve the problems of cumbersome existing FRET two-hybrid assay data processing process and strong dependence on manual operation, it is necessary to design a specially developed data processing software and develop corresponding FRET image processing algorithms to achieve standardized and automated FRET two-hybrid assay data processing. To address the needs and problems of live cell FRET two-hybrid assay data processing, this thesis designs and develops a fully automated FRET two-hybrid assay data processing software Fretha, which achieves automated processing from raw images to stoichiometry results. The main work and innovations of this thesis are as follows:

(1) The FRET two-hybrid assay data processing software Fretha is designed and implemented for the first time. This software is built based on a layered architecture (presentation layer, business layer, data access layer, and data layer), integrating core functions such as imaging parameter setting, data verification, automatic ROI selection, FRET quantitative calculation, and two-hybrid fitting. By encapsulating the FRET calculator, image analysis library, and two-hybrid solver, multi-modal analysis algorithms such as E-FRET, 3³-FRET, L-FRET, and DC-FRET are realized. The software is developed using Qt 5.15.2 and implements image processing and optimization calculations through the OpenCV and Dlib libraries. The design of Fretha reflects the professionalism and practicality of FRET two-hybrid assay data process-

ing, achieving full-process automated processing from raw images to stoichiometry results, and improving the standardization and automation level of data processing.

(2) The automatic ROI selection algorithm (LURS) based on brightness and uniformity is developed for the first time, achieving the automation of the data processing process. LURS algorithm can identify high signal-to-noise ratio and low variability regions in fluorescence images through multi-channel adaptive threshold segmentation, coefficient of variation uniformity evaluation, and connected region analysis. In the E-FRET measurement of standard plasmids C4Y/C10Y/C40Y/C80Y, the E_A and E_D values have less than 5% error compared to the literature, and the R_C deviation does not exceed 0.05, consistent with the literature values. In the FRET two-hybrid verification experiments of model plasmids C32V and CVC, the stoichiometry of C and V in C32V measured by LURS is 1.06, and in CVC it is 1.90, with an error of less than 6% compared to the literature value. LURS algorithm successfully detected that the stoichiometry of Bcl-xL-Bak binding in A1331852-treated MCF-7 cells decreased from 1.87 to 1.12, which is highly consistent with manual analysis. Compared with algorithms based on SAM-Med2D and ilastik, LURS shows good stability and robustness, making it suitable for large data volume scenarios such as high-throughput drug screening.

(3) A systematic test and evaluation of the Fretha software is conducted, and functional testing shows that the software supports multi-parameter dynamic updates, abnormal data isolation, and result visualization, with high consistency in data processing accuracy with literature values. Performance comparison of algorithms shows that LURS has a single ROI processing time of only 6.6 ms and a memory usage of 800 MB on a 1.4GB dataset, significantly better than ilastik (35.2 ms / 1.8 GB) and SAM-Med2D (50.7 ms / 14 GB). Stability testing shows that the software remains stable under continuous operation for 48 hours and high-frequency operations, with no significant fluctuations in resource usage, making it suitable for high-throughput drug screening scenarios. The launch of Fretha provides a standardized and automated solution for live cell FRET two-hybrid assay, which is expected to promote the large-scale application

of this technology in precision medicine and drug development.

The launch of Fretha provides a standardized and automated solution for live cell FRET two-hybrid assay, 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	III
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)	4
1.2 FRET 双杂交分析	5
1.2.1 基于 Langmiur 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 数据处理方法现状	8
1.3.1 FRET 双杂交分析数据处理现状	8
1.3.2 基于机器学习的 FRET 数据处理	9
1.4 本文的工作内容和意义	10
1.5 本文的章节安排	11
2 Fretha 的设计和开发	13
2.1 引言	13
2.2 需求分析和总体设计	13
2.2.1 需求分析	13
2.2.2 模块划分和界面设计	14
2.2.3 软件总体框架	16
2.2.4 开发技术选型	19
2.3 FRET 算法和后台接口	20
2.3.1 FRET 定量计算器	20
2.3.2 FRET 图像处理器	20
2.3.3 FRET 双杂交求解器	22

2.4	功能模块的实现	26
2.4.1	成像参数设置模块	26
2.4.2	数据检验模块	27
2.4.3	FRET 图像处理模块	28
2.4.4	数据管理模块	32
2.4.5	结果可视化模块	35
2.5	本章小结	37
3	Fretha 的测试	38
3.1	引言	38
3.2	材料与方法	38
3.2.1	细胞培养与转染	38
3.2.2	FRET 成像系统	39
3.2.3	使用 Fretha 手动处理数据	39
3.3	结果	40
3.3.1	E-FRET 和 3^3 -FRET 处理结果	40
3.3.2	模型质粒 FRET 双杂交验证实验	41
3.4	Fretha 软件测试	42
3.4.1	成像参数设置模块测试	42
3.4.2	数据检验模块测试	43
3.4.3	FRET 图像处理模块测试	44
3.4.4	数据管理模块测试	45
3.4.5	结果可视化模块测试	47
3.5	Fretha 稳定性测试	48
3.6	本章小结	50
4	基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法	52
4.1	引言	52
4.2	材料与方法	52
4.2.1	细胞培养与转染	52
4.2.2	FRET 成像系统	53
4.2.3	基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法 (LURS)	53
4.2.4	DC-FRET 方法的数据范围选取	56

4.3	实验结果	57
4.3.1	标准质粒验证实验	57
4.3.2	模型质粒验证实验	58
4.3.3	活细胞中 Bcl-xL-Bak 化学计量比的自动分析	59
4.3.4	LURS 算法性能分析	61
4.4	本章小结	62
5	总结与展望	63
5.1	本文的主要内容和总结	63
5.2	展望	64
	参考文献	66
	作者攻读学位期间发表的学术论文目录	72

1 绪论

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^[3]。在细胞生物学微观环境里, FRET 技术可被用作一种“分子尺”, 可以检测纳米尺度上的生物分子动态, 从而进一步研究其结构与功能。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。

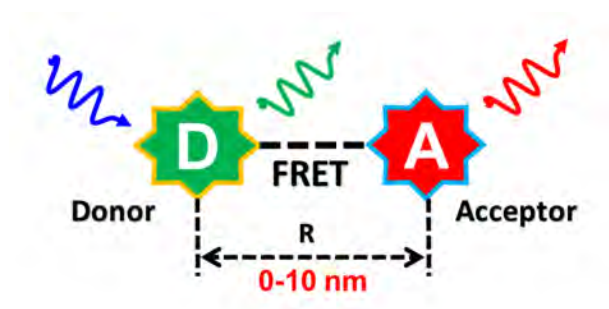


图 1.1 FRET 过程示意图

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^[4]:

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

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 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, 是的 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 [5-7]。

FRET 技术应用到各种生物研究中的重要前提是荧光蛋白的发展 [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]。

FRET 可用于动态监测细胞内钙离子变化。Cornea 等在 2009 利用荧光共振能量转移 (FRET) 技术研究了钙调蛋白 (CaM) 与骨骼肌 Ryanodine 受体 (RyR1) 的结合模式^[11]。2020 年 Yoon 等开发了一种基于 EGFP 和 Fusion Red 的新型 FRET 钙传感器 (FRET-GF-PRed)，并结合高频超声 (HFU) 技术实现了单细胞水平的精准刺激与成像^[12]。邹鹏团队开发红色电压指示剂 Cepheid1，利用 eFRET 技术实现单细胞电活动与钙信号同步监测，揭示了胰腺细胞电振荡与钙波动的时空关联^[13]。基于 FRET 技术在活细胞内实时监测钙离子的动态变化操作简单，灵敏度更高。

FRET 还可用于检测酶的活性^[14, 15]。酶支配着生物体内的新陈代谢、营养和能量转换等许多催化过程，影响着生物体内许多信号转导过程。Cheppali 等利用单分子三色 FRET 监测 NSF 酶解聚 SNARE 复合体的过程，揭示其解聚存在两条路径，澄清了酶作用的中间状态机制^[16]。樊林玮等通过 FRET 传感器发现机械牵张激活 cPLA2，抑制脂肪酸氧化酶活性，通过调控转录因子 YY1 影响血管平滑肌细胞功能^[17]。

在疾病诊断方面，FRET 技术在药物疗效评估等方面同样具有重要意义^[18, 19]。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，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^[20]。

不断发展的 FRET 定量分析技术帮助研究者通过独特的视角研究细胞内蛋白质等大分子相互作用。2016 年，Ben-Johny 等人利用 FRET 双杂交分析技术定量研究了钙离子通道与钙调蛋白之间的结合，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^[21]。杨方方等人利用部分受体光漂白定量 FRET 成像技术，证明了线粒体上 Bax 与 Bcl-xl 的相互作用更强，而胞质中两者可能为松散或瞬时结合^[22]。李小梅等人使用双杂交 FRET 成像等技术对 L 型钙通道 C 末端编码肽进行了定量研究，证明了

Calmudolin 的多种变体均通过与钙调素竞争，抑制钙通道的基本功能 [23]。

1.1.3 基于受体敏化发射的 FRET 定量测量方法 (E-FRET)

受限于实验仪器和样本的准备，早期的 FRET 测量方式都只能基于定性或半定量测量 [24, 25]。复杂实验条件的校正，需要使用表达特定荧光蛋白的细胞进行校正，而蛋白质在细胞中的表达又受到表达的成熟度、胞内的微环境等多种因素制约 [26]。

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 半定量检测技术 [27]。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 [28]:

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

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 [29, 30]。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 [31]。

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 3³-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有所有供体能量转移给受体时受体的荧光发射总量的比例。3³-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，Butz 等人提出将 FRET 效率和自由受供体浓度按照 Langmiur 模型进行拟

合的 FRET 双杂交分析方法^[32]。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 3³-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)

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。因此 L-FRET 往往需要配备一系列梯度比例的供体和受体溶液, 然后分别对其进行混合和检测, 这增加了实验样本的数量。在实验数据处理时, 大量浓度梯度都需要进行测量和数据处理, 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, 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)^[33]。DC-FRET 聚焦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 数据处理方法现状

1.3.1 FRET 双杂交分析数据处理现状

FRET 双杂交数据处理流程复杂耗时，人工依赖程度高，严重制约了实验效率与数据可重复性。

Butz 等指出，数据处理包括图像分析、FRET 定量计算及双杂交分析等多个环节，共 28 个步骤，单次实验数据处理过程需要 3.5-7 小时不等^[32]。在图像分析环节，科研

人员需手动标注上百个典型荧光区域作为 ROI，逐一定量灰度值并计算荧光信号与背景值，这一过程通常耗时 1-3 小时。在 FRET 定量计算阶段，研究人员需将标注三通道荧光强度数据，再通过 Excel 设定公式完成批量计算，包括敏化发射荧光和 FRET 效率等参数。这一过程虽部分实现自动化，但仍需人工输入数据并验证公式逻辑，耗时约 30 分钟至 1 小时。在双杂交拟合计算中，使用 Excel 规划求解拟合 Langmuir 模型需经历 14 个步骤，耗时约 30 分钟。

通用软件缺乏针对 FRET 双杂交的优化。Zen 和 ImageJ 等通用软件可以手动标注 ROI，但是缺少直观的辅助信息如信号背景比等，更无法展示 FRET 效率等直观的结果。Excel 的规划求解功能在处理非线性拟合时灵活性不足，常需结合编程工具进行二次开发，频繁在 Excel 与 Matlab / Python 等工具间转移数据。

传统数据处理流程对科研人员的技术要求较高，不利于实验结果的复现和对比。FRET 图像处理中，人工标记 ROI 是一种盲处理，此类人工操作不仅效率低下，还因缺乏标准化操作规范，易引入主观偏差，影响数据的可复现性。在面对动态荧光事件或低信噪比数据时，人工分析的主观性与低效性尤为突出^[34]。

这些挑战促使科研人员探索更高效的自动化解决方案，以推动 FRET 技术在生物医学研究中的广泛应用。

1.3.2 基于机器学习的 FRET 数据处理

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。

深度学习技术为高效解析 FRET 技术中高效解析动态轨迹数据提供了新方法。Li 等基于 LSTM 和 CNN 的 AutoSiM 框架，自动分类和分割单分子荧光轨迹，提升 SiMREPS 检测灵敏度与 smFRET 分析效率，支持迁移学习适应新数据^[35]。Zhang 等人提出基于 LSTM 的 Kin-SiM 框架通过预训练模拟数据自动识别 smFRET 轨迹中的分子状态及动力学参数，实现轨迹理想化，性能与传统 HMM 相当但效率更高，支持多任务学习适应不同状态数^[36]。Miao 等提出基于深度学习的局部特征分类框架 DEBRIS 和多帧双通道

融合去噪网络 (MUFFLE) , 通过滑动窗口技术和用户自定义标准, 自动识别双色 / 单色单分子荧光事件。

应用深度学习技术提取 FRET 荧光信号, 避免了重复的人工数据处理, 提高了处理效率。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^[37]。Ge 等人研发出一种基于 U-Net 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 ROI 的数据集进行训练, 随后通过旋转操作将数据集扩充, 最终得到 2760 个样本^[38]。Thomsen 等人开发的 DeepFRET 软件基于深度学习技术, 实现了从原始显微镜图像到 FRET 数据分类的全自动化流程^[39]。该软件通过预训练的深度神经网络对荧光轨迹进行逐帧分类, 仅需用户设定质量阈值, 即可快速生成高质量的 FRET 直方图。Feldmann 等在进行 FRET 双杂交分析数据处理时采用了 ilastik 这一用于生物学图像分析的开源交互式工具, 将机器学习算法与用户交互相结合, 能减轻手动标注的工作量^[40]。

然而, 机器学习驱动的 FRET 图像分析算法仍存在一定局限性。首先, 模型训练和泛化的效果依赖优质的数据集, 而 FRET 图像的手动标注需专业知识且耗时费力, 导致优质数据稀缺^[41]。其次, 深度学习模型的训练过程需要大量的计算资源和时间, 尤其是在处理大规模数据集时, 训练时间可能会显著增加^[42, 43]。此外, 深度学习模型的“黑箱”特性使其缺乏可解释性^[44, 45]。在基于强度的 FRET 定量分析中, 神经网络虽能捕捉图像细微特征, 却无法通过清晰的数学框架阐释决策逻辑, 可能引入未知的偏差。

1.4 本文的工作内容和意义

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核心问题, 本文从以下方面开展了工作:

(1) 首次设计并实现了支持多模态分析的 FRET 双杂交数据处理软件 **Fretha**。该软件基于分层架构构建, 集成成像参数设置、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、图像处理器和双杂交求解器, 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。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，确保算法的高效性和可扩展性^[46-48]。通过一键式数据流转的软件功能设计，实现了从原始图像到化学计量比结果的规范化处理，提升了数据处理效率。

(2) 对 Fretha 软件进行了系统的测试验证。通过标准质粒和模型质粒的实验，验证了 Fretha 手动处理功能和精度符合预期。针对每个模块单独进行测试，确认了每个模块的功能效果，保证了软件符合设计预期。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。综合测试结果表明，Fretha 软件在处理效率、准确性和稳定性方面均达到预期，能够支持连续规范化的数据处理。

(3) 创新性提出 Luminance-Uniformity-based ROI Selection (LURS) 算法，显著提高了 FRET 双杂交技术的大规模数据处理能力。LURS 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，显著减少了人工标注 ROI 的时间成本。结合鲁棒性较好的 DC-FRET 方法，Fretha 成功实现了 FRET 双杂交分析的数据处理全自动化。本文对比了深度学习的方法，验证了 LURS 自动处理在性能上优于 ilastik 和 SAM-Med2D，更适用于大数据量场景。LURS 算法为高通量药物筛选等大规模数据处理需求提供了高效可靠的工具。

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，基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法。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，本文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，**Fretha** 的测试和评估。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

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。

本章节介绍了展示 Fretha 软件从设计构思到开发实现的全过程。首先，根据课题组自研的 FRET 显微成像系统（FRETScope）的数据特征和 FRET 双杂交分析数据处理功能进行深入的需求分析，确定了主要的数据处理流程。基于此需求分析，对软件按照功能进行的模块划分和总体框架设计。基于 Dlib 和 OpenCV 等，设计了 FRET 定量计算器、FRET 图像处理器和 FRET 双杂交求解器等后台接口，封装了 E-FRET、 3^3 -FRET、L-FRET 和 DC-FRET 等多模态分析算法。最后，结合 Qt 的图形化界面和 C++ 的高性能计算能力，详细介绍各个功能模块的具体功能和实现方法。

2.2 需求分析和总体设计

2.2.1 需求分析

FRETScope 是本课题组自研的适用于 3^3 -FRET、E-FRET、Pb-FRET 等多种定量 FRET 分析方法的电动 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 FRETScope 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

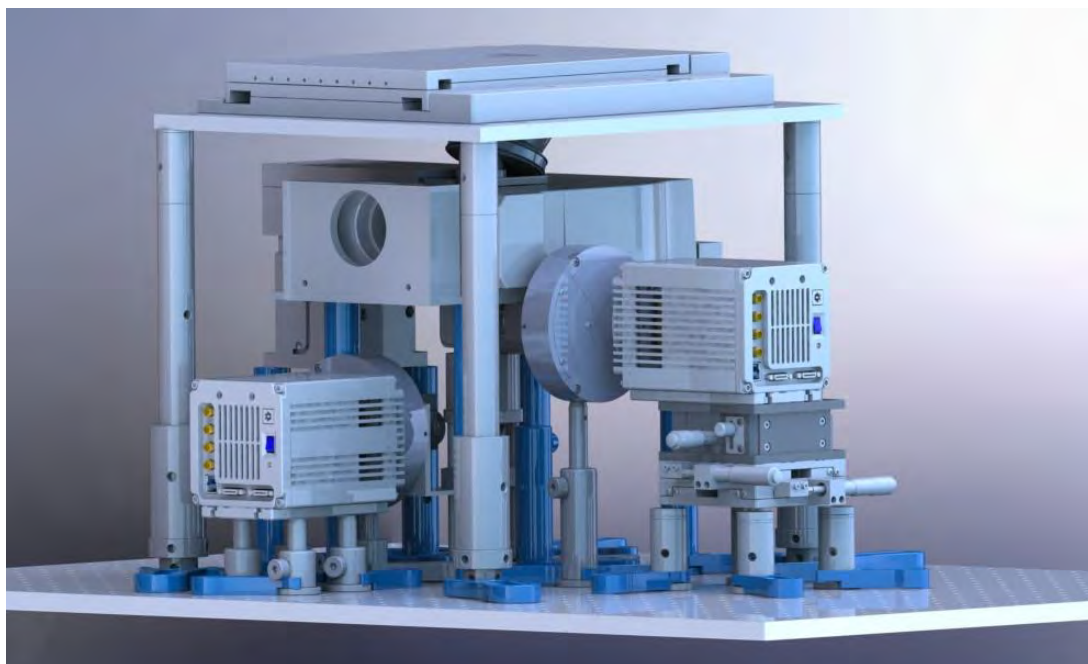


图 2.1 FRETScope 硬件外观示意图

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 2.2 所示。

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

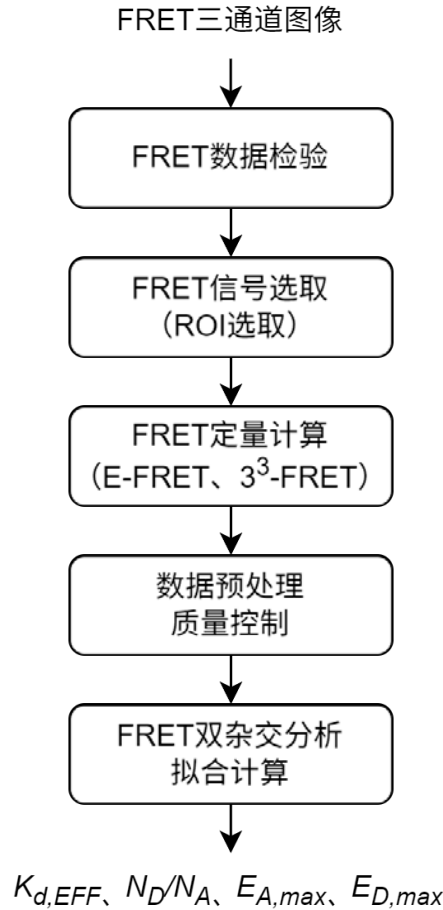


图 2.2 FRET 双杂交分析数据处理流程

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

使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 2.3 所示；参数设置页面包括成像参数设置模块，其界面如图 2.4 所示；数据处理页包



图 2.3 Fretha 开始页面

括数据检验模块的检验结果、FRET 图像处理模块、数据管理模块，其界面和模块划分如图 2.5 所示；结果页展示结果可视化模块中 FRET 双杂交数据处理的图像视图结果，界面如图 2.6 所示。

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 2.7 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



图 2.4 Fretha 参数设置页面



图 2.5 Fretha 数据处理页面及模块划分

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，承担着具体模块功能和其对应的业务逻辑的实现。业务层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。

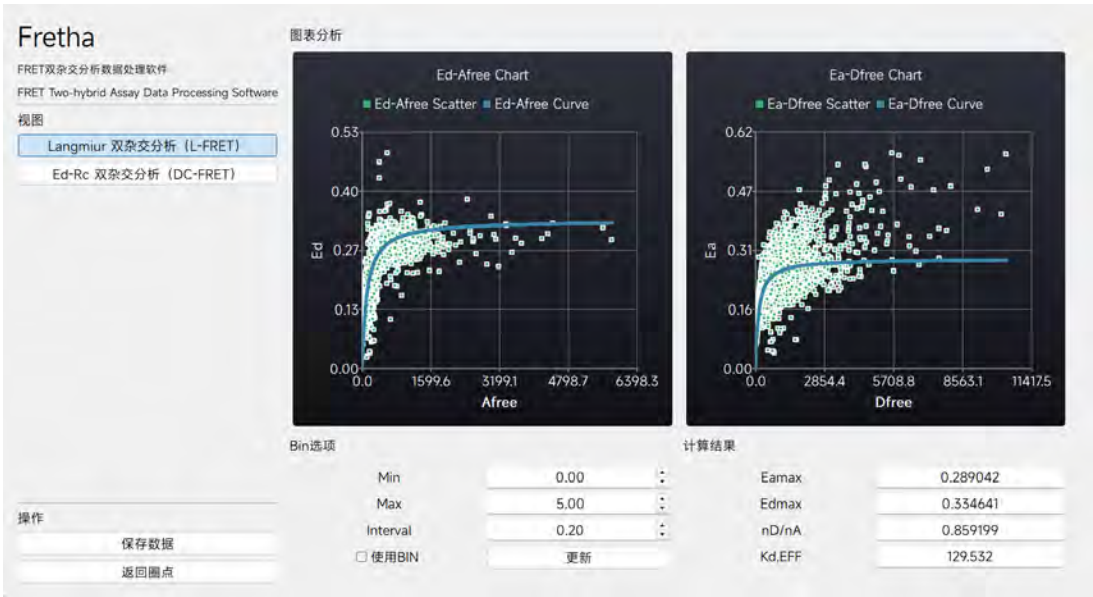


图 2.6 Fretha 结果可视化模块界面



图 2.7 Fretha 软件总体架构

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 的数据访问层包括 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 模型、FretDataPiece 模型和 FretRecord 模型。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提前设置好即可，如成像参数、文件目录等。FretImage、FretDataPiece 和 FretRecord 用来存储和计算各种动态数据。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 2.8 所示。

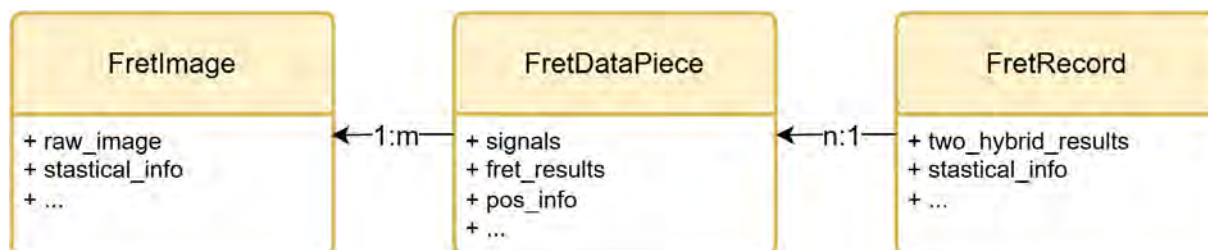


图 2.8 Fretha 数据层实体关联关系图

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。FRETscope 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 FRETscope 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 3³-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。

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



图 2.9 FretCalculator 计算步骤

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 2.9 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。

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

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

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

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 ：

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

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

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，本文引入 `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) - data.
7             aest[i] * parameters(1)) + std::sqrt(std::pow(data.
8             dest[i] - parameters(0) - data.aest[i] * parameters
9             (1), 2) + 4 * parameters(0) * data.dest[i])) / 2;
10        double a_free = data.aest[i] - (data.dest[i] - d_free) /
11            parameters(1);
12        double ea_pred = parameters(2) * d_free / (d_free +
13            parameters(0));
14        double ed_pred = parameters(3) * a_free / (a_free +
15            parameters(0) / parameters(1));
16    }
17    return total_error;
18 }
    
```

```

9
10     total_error += CalculateError(data.ea_corr[i], ea_pred)
11     + CalculateError(data.ed_corr[i], ed_pred);
12 }
13 return total_error;
14 }
```

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

```
15 |
16 |     // 使用 dlib 进行优化
17 |     dlib::find_min_using_approximate_derivatives(dlib::
        bfgs_search_strategy(), dlib::
        objective_delta_stop_strategy(1e-7), objective_wrapper
        , starting_point, -1, 0.01);
18 |
19 |     return starting_point;
20 | }
```

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 2.4 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, +∞)	无
k	受体浓度和供体浓度相同时的荧光比值	(0, +∞)	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, +∞)	无
ExpTimeDD	DD 通道下的成像曝光时间	(0, +∞)	毫秒 (ms)
ExpTimeDA	DA 通道下的成像曝光时间	(0, +∞)	毫秒 (ms)
ExpTimeAA	AA 通道下的成像曝光时间	(0, +∞)	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 2.10 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 FRETscope 的数据格式，从而保证数据处理能够正常开始。如图 2.11 所示，FRETscope 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。

数据检验业务的流程如图 2.12 所示。其中，检查子文件夹类型是通过图 2.11 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，

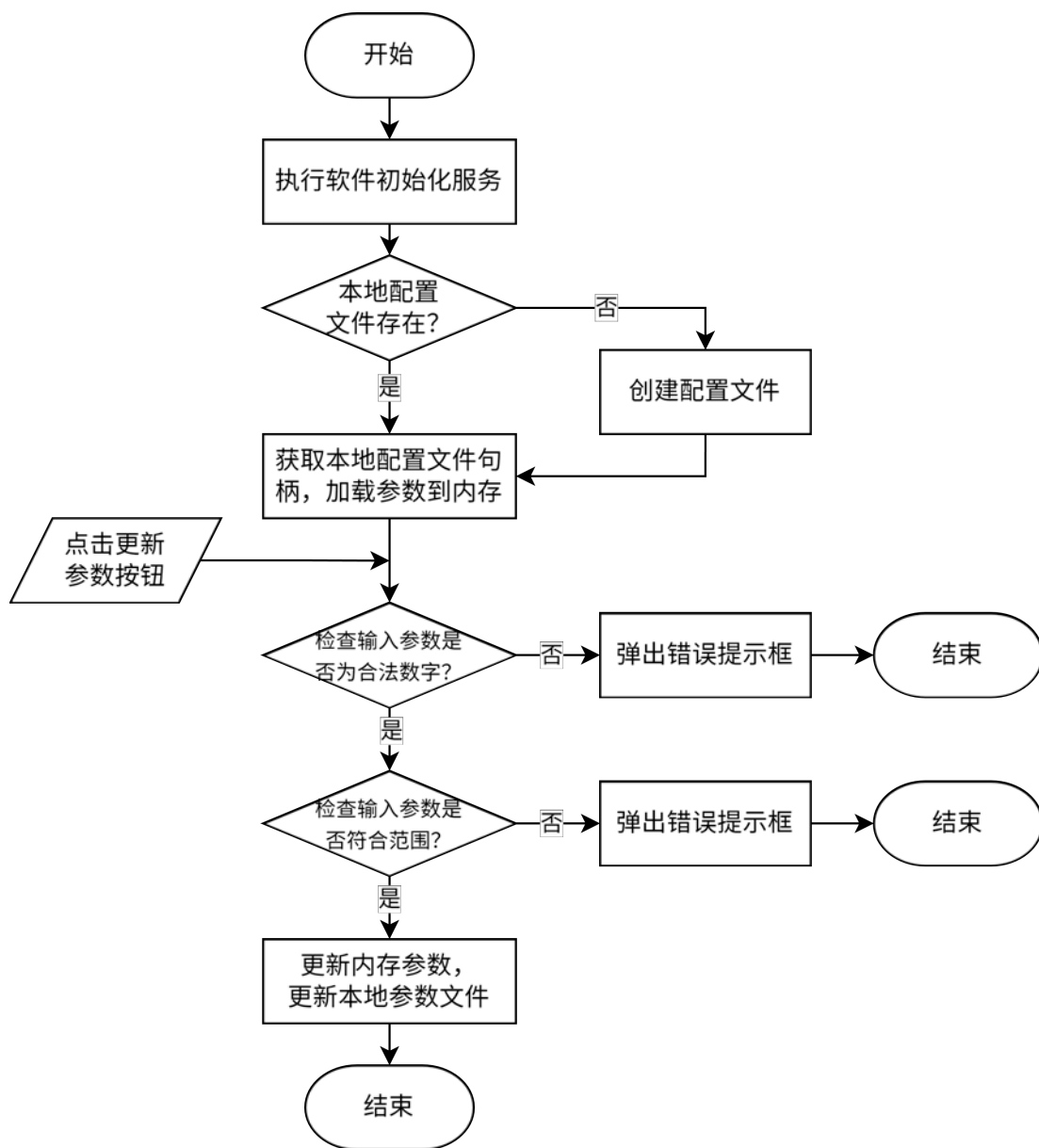


图 2.10 参数设置模块业务流程

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。

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 2.13 所示：在 FRET 图像处理工作中，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

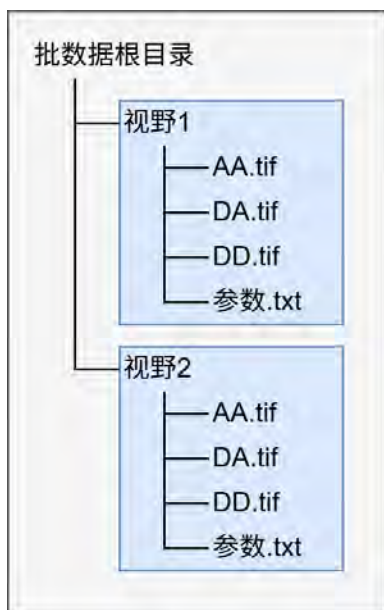


图 2.11 FRETscope 数据文件结构

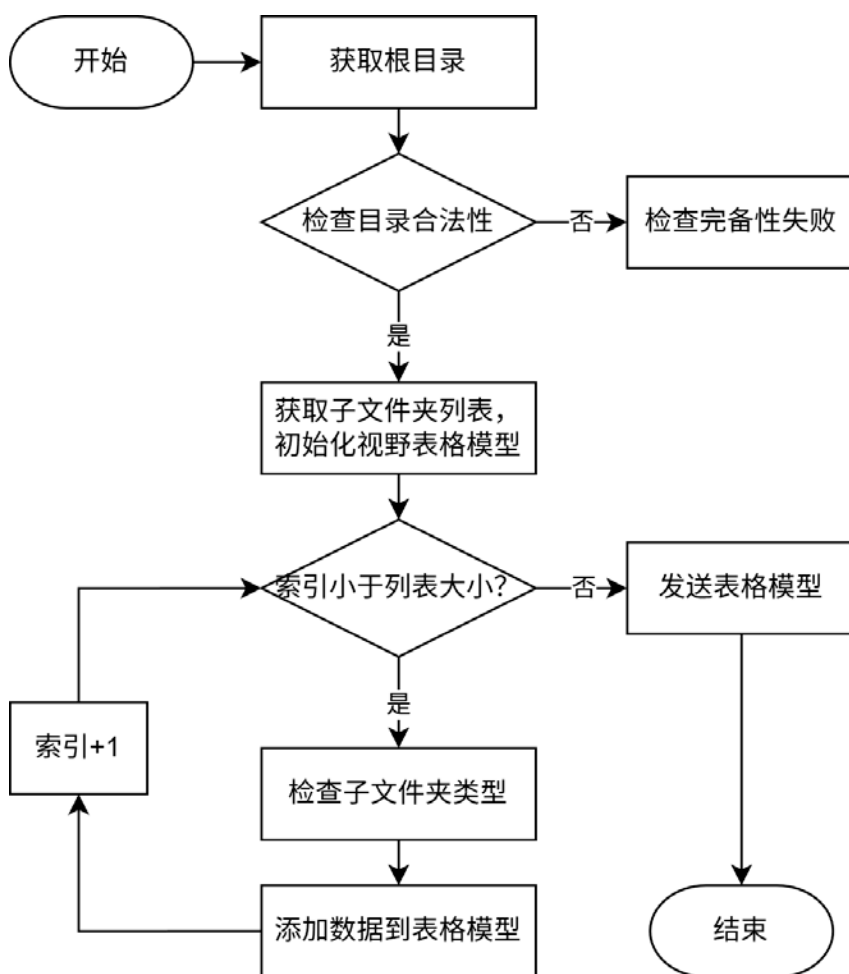


图 2.12 Fretha 数据检验业务主流程图

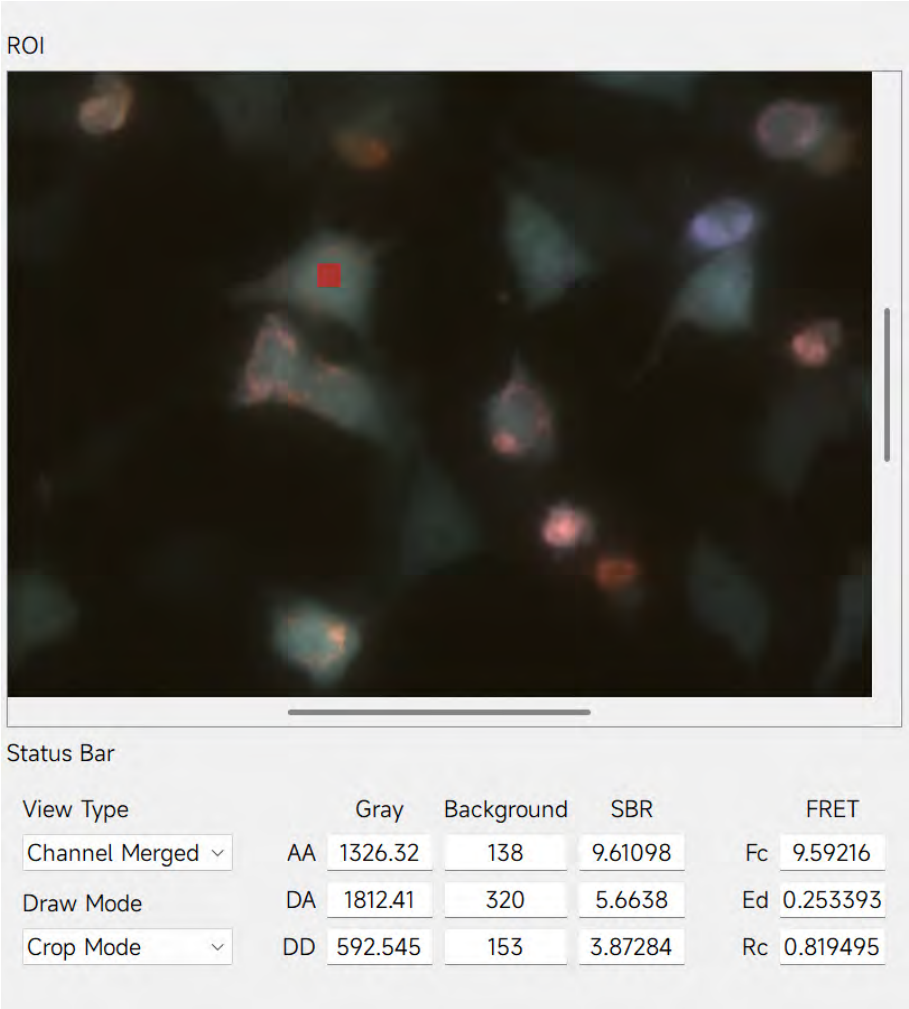


图 2.13 Fretha 图像处理模块界面

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 通道分别归一化的增强视图以

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

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。

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

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	供体视角的表观 FRET 效率
R_C	受体与供体的浓度比

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2.14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。

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。

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

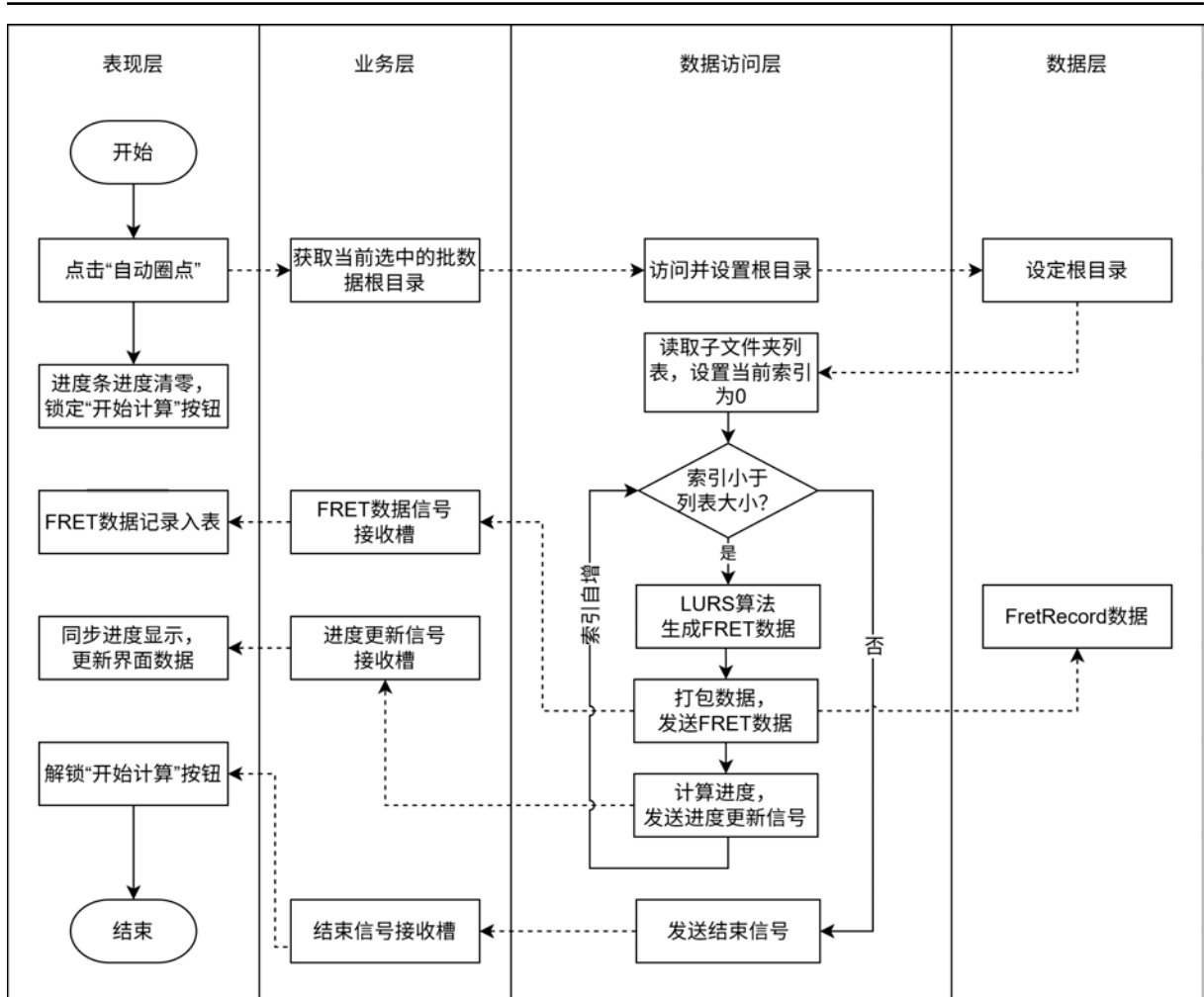


图 2.14 Fretha 自动圈点模块流程

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

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

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，以使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，
 $E_{A,max}$ 、 $E_{D,max}$ 、 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 2.6 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。L-FRET 视图界面在图 2.6 中展示。

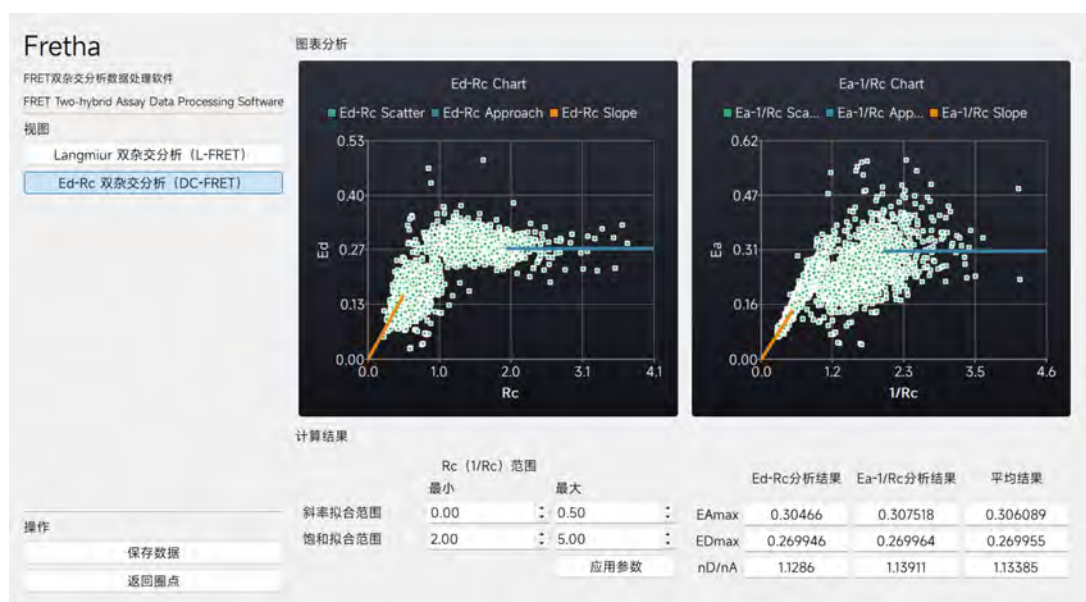


图 2.15 Fretha DC-FRET 视图

DC-FRET 视图的界面如图 2.15 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 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。

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

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 Fretha 的测试

3.1 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、结果可视化模块等。我们对集成在 Fretha 中的自动圈点算法 LURS 进行了性能测试，并对比了 SAM-Med2D、ilastik 等其他自动荧光信号提取的算法。针对系统的稳定性，测试了软件在长时间运行和高频操作下的表现。综合测试结果表明，Fretha 在功能丰富度、性能表现和稳定性方面均达到了预期目标，能够满足复杂科研和高通量应用需求。

3.2 材料与方法

3.2.1 细胞培养与转染

标准质粒实验中，中国科学院细胞库提供的 MCF-7 细胞株在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中培养。在 Bcl-xL-Bak 药效检测实验中，将 MCF-7 细胞（4000 个细胞 / 孔）接种于含 DMEM 培养基和 10% 胎牛血清的 96 孔板（中国 LABSELECT 公司），置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 小时。每孔转染 400 ng 质粒，并以 3:1 或 1:3 的比例形成转染复合物。

Turbofect™ 转染试剂购自美国赛默飞世尔科技公司。所有质粒均由 Steven Vogel 赠送：C17V（Addgene 质粒 # 26395）、C32V（Addgene 质粒 # 26396）、mVenus N1（Addgene 质粒 # 27793）、mCerulean C1（Addgene 质粒 # 27796）、CVC（Addgene 质粒 # 27809）^[49, 50]。CFP（青色荧光蛋白）-YFP（黄色荧光蛋白）二聚体质粒包括 YFP-G4-CFP（C4Y）、YFP-G10-CFP（C10Y）、YFP-G40-CFP（C40Y）和 YFP-G80-CFP（C80Y），由 Christian Wahl-Schott 赠送^[32]。CFP-Bcl-xL 质粒由 A. P. Gilmore 提供^[51]，YFP-Bak 质粒的构建方法已先前报道过^[52]。药物 A1331852 购自美国新泽西州 MCE 公司。

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^[53]。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 和 $\varepsilon_{YFP}(\lambda)/\varepsilon_{CFP}(\lambda)$ 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 d 通过单转 CFP 质粒测量，系统校正因子 G 和 k 和 $\varepsilon_{YFP}(\lambda)/\varepsilon_{CFP}(\lambda)$ 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 使用 Fretha 手动处理数据

使用 Fretha 手动处理数据的步骤如下：

- (1) 打开 Fretha 软件，点击“FRET 参数”按钮，按照表 3.1 中的参数设置成像参数；
- (2) 返回开始界面，点击“浏览”按钮，选择数据文件夹，点击“开始”按钮，进入数据处理界面；
- (3) 进入 FRET 图像处理模块，选择三通道信号背景比大于 3 且区域均匀的 ROI，记录

到数据区；

(4) 点击“筛选数据”，排除异常的数据和离群值；

(5) 点击“开始计算”，进入结果展示页界面，点击“保存结果”按钮，保存数据处理结果。

3.3 结果

3.3.1 E-FRET 和 3³-FRET 处理结果

Fretha 手动处理数据时选取 100 个 ROI，然后统计 Fretha 数据区自动计算的 E-FRET 和 3³-FRET 结果。通过 ZEN 在每个质粒中同样选取了 100 个 ROI，并对应标注了每个 ROI 的背景值，使用 Excel 扣除每个背景后编写公式进行 E-FRET 和 3³-FRET 定量计算，然后统计结果。

如表 3.2 所示，Fretha 手动处理的标准质粒 C4Y 的效率为 $E_A = 0.291 \pm 0.020$ ， $E_D = 0.307 \pm 0.040$ ，受体与供体的浓度比为 $R_C = 0.994 \pm 0.096$ 。对比 C4Y 的文献值 $E_A = 0.296 \pm 0.001$ ， $E_D = 0.299 \pm 0.004$ ， $R_C = 1$ ，发现使用 Fretha 手动数据处理方法的结果均与文献值一致。C10Y、C40Y 和 C80Y 的效率和浓度比也与文献值一致， E_A 、 E_D 和 R_C 的平均相对误差为 3.89%、2.15% 和 0.83%，说明 Fretha 手动数据处理的精度较高。

表 3.2 手动定量 3³-FRET 和 E-FRET 分析标准质粒结果

样本	Fretha 手动处理结果			文献结果		
	E_A	E_D	R_C	E_A	E_D	R_C
C4Y	0.291 ± 0.020	0.307 ± 0.040	0.994 ± 0.096	0.296 ± 0.001	0.299 ± 0.004	1
C10Y	0.243 ± 0.031	0.230 ± 0.022	0.992 ± 0.083	0.228 ± 0.002	0.223 ± 0.003	1
C40Y	0.159 ± 0.018	0.155 ± 0.011	0.991 ± 0.078	0.156 ± 0.002	0.158 ± 0.002	1
C80Y	0.118 ± 0.019	0.117 ± 0.012	1.041 ± 0.109	0.112 ± 0.001	0.116 ± 0.002	1

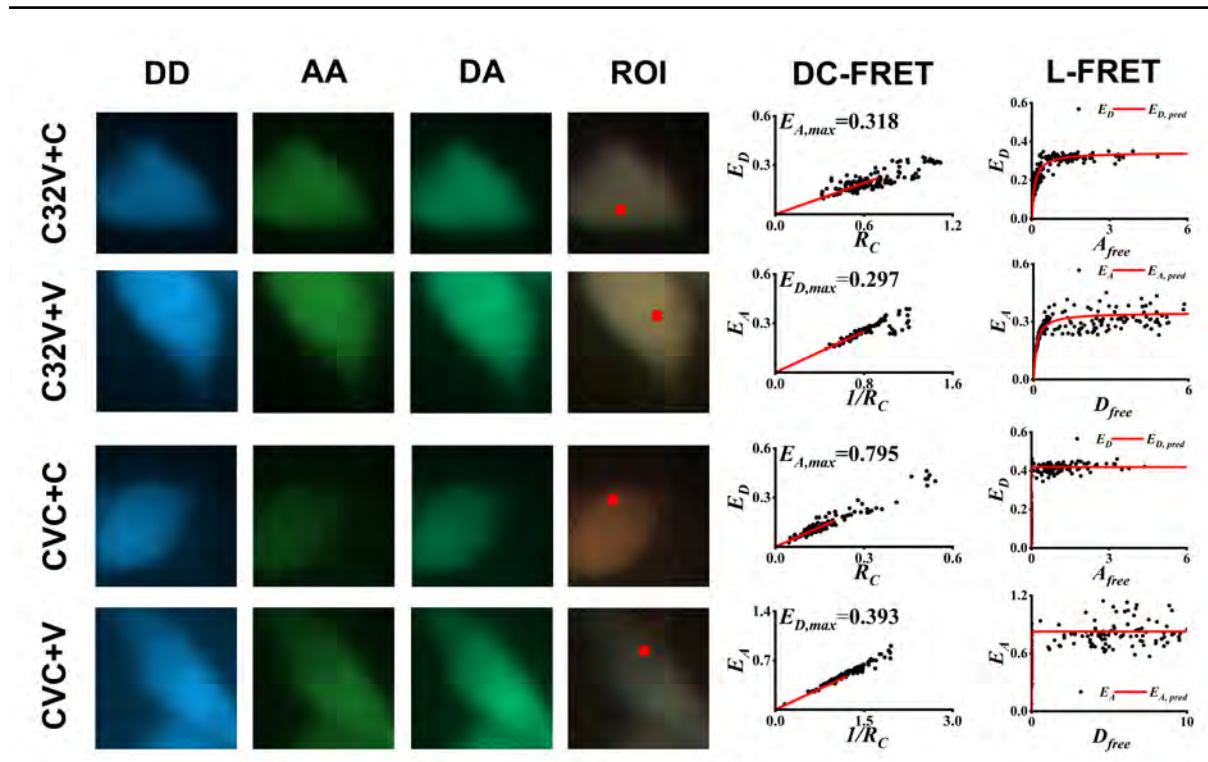


图 3.1 Fretha 手动处理的 C32V 和 CVC 的 FRET 双杂交分析结果

3.3.2 模型质粒 FRET 双杂交验证实验

为了模拟 FRET 双杂交实验，本节使用 Fretha 手动测量了活的 MCF-7 细胞中存在自由供体（Cerulean, C）和自由受体（Venus, V）时固定质粒 C32V 和 CVC 的 $E_{A,max}$ 、 $E_{D,max}$ 和 n_D/n_A 值。图3.1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），使用 Fretha 手动标注的 ROI（中间），以及 DC-FRET 和 L-FRET 的结果图（右侧）。

DC-FRET 数据处理过程中的具体参数设置如下：C32V，选取 R_C 在 0-0.7 之间的数据用于斜率拟合 $E_{A,max}$ ，选取 $1/R_C$ 在 0-0.8 之间的数据用于斜率拟合 $E_{D,max}$ ，测定的 $E_{A,max}$ 为 0.318， $E_{D,max}$ 为 0.297， n_D/n_A 为 1.071；对 CVC，选取 R_C 在 0-0.2 之间的数据用于斜率拟合 $E_{A,max}$ ，选取 $1/R_C$ 在 0-1.2 之间的数据用于斜率拟合 $E_{D,max}$ ，测定的 $E_{A,max}$ 为 0.795， $E_{D,max}$ 为 0.393， n_D/n_A 为 2.023。L-FRET 测量得到 C32V 的 $E_{A,max}$ 为 0.347， $E_{D,max}$ 为 0.344， n_D/n_A 为 1.033，CVC 的 $E_{A,max}$ 为 0.827， $E_{D,max}$ 为 0.419， n_D/n_A 为 2.046。文献报道的 C32V 的 $E_{D,max}$ 为 0.311， n_D/n_A 为 1，CVC 的 $E_{D,max}$ 为 0.414，

n_D/n_A 为 2。

所有的测试结果如表 3.3 所示。使用 Fretha 进行 DC-FRET 和 L-FRET 的测量结果均与文献值一致，说明 Fretha 手动数据处理在准确度上满足预期。

表 3.3 手动处理 C32V、CVC 的 FRET 双杂交分析结果

样本	DC-FRET 结果			L-FRET 结果			文献结果	
	$E_{A,max}$	$E_{D,max}$	n_D/n_A	$E_{D,max}$	$E_{D,max}$	n_D/n_A	$E_{D,max}$	n_D/n_A
C32V	0.318 ± 0.036	0.297 ± 0.018	1.071 ± 0.144	0.347	0.344	1.033	0.311	1
CVC	0.795 ± 0.018	0.393 ± 0.023	2.023 ± 0.113	0.827	0.419	2.046	0.414	2

3.4 Fretha 软件测试

3.4.1 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。

测试时，通过界面操作更新参数，分别用表 3.1 CV 成像参数和 CY 参数处理单转 CV 体系标准质粒 C32V 和 CY 体系标准质粒 C4Y 样本的 FRET 图像数据，进行 E-FRET 分析计算结果 E_D 和 R_C 。将参数和数据匹配的实验组记为正面组，将参数不匹配数据的组别记为反面组，测试结果如表 3.4 所示。

表 3.4 更改参数 C4Y 和 C32V 质粒 E-FRET 测量结果

实验组	参数	样本	E_D	R_C
正面	CV	C32V	0.299 ± 0.022	0.981 ± 0.113
	CY	C4Y	0.307 ± 0.040	0.994 ± 0.096
反面	CY	C32V	0.382 ± 0.054	0.821 ± 0.093
	CV	C4Y	0.221 ± 0.037	1.313 ± 0.135

正面组的测量结果中，C32V 的 E_D 为 0.299 ± 0.022 ， R_C 为 0.981 ± 0.113 ，C4Y 的 E_D 为 0.307 ± 0.040 ， R_C 为 0.994 ± 0.096 ，均与文献值一致。反面组的测量结果中，

C32V 的 E_D 为 0.382 ± 0.054 , R_C 为 0.821 ± 0.093 , C4Y 的 E_D 为 0.221 ± 0.037 , R_C 为 1.313 ± 0.135 , 与文献值存在较大偏差。说明参数 Fretha 后台能够及时使用更新后的参数进行计算。

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。

3.4.2 数据检验模块测试

如 2.4.2 节所述, 数据检验模块用于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 3.5 所示。

表 3.5 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	✓
	AA.tif				
FRET 缺失数据	DD.tif	✓	✗	Unknown	✓
	DA.tif				
非 FRET 数据	D.tif	✓	✗	Unknown	✓
	A.tif				
空数据	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

表 3.6 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	✓

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。

3.4.3 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 3.2 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。

然后测试 ROI 绘制功能。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。分别移动鼠标位置到 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 3.6 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。

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

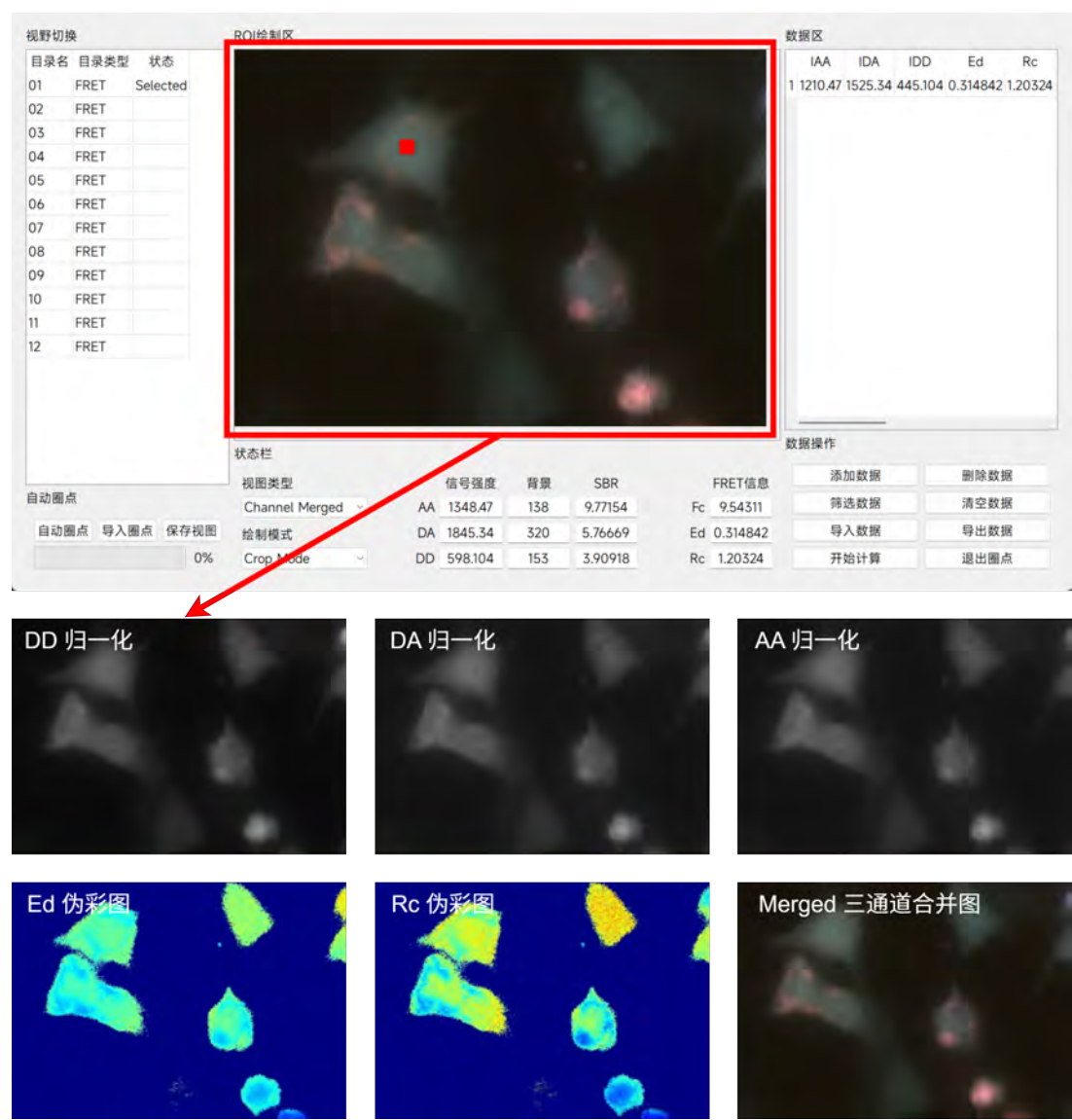


图 3.2 Fretha 图像处理视图切换测试结果

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 3.7 所示。

上述测试结果表明，FRET 图像处理的视图增强、ROI 绘制和 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。

3.4.4 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

表 3.7 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	✓

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 3.8 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。

表 3.8 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	✓
	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	✓

3.4.5 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 3.3 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 3.4 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 3.5 所示, 软件能够正确生成

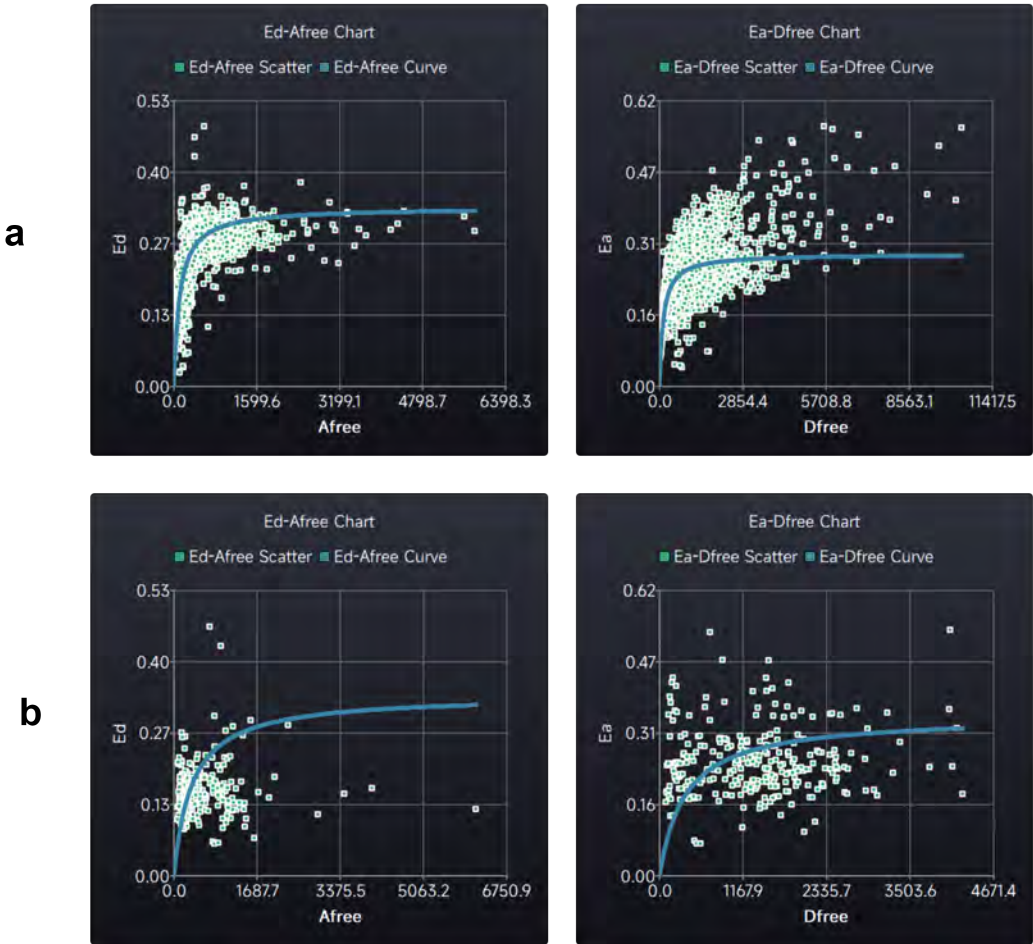


图 3.3 Fretha L-FRET 视图测试结果。图 a 为标准 L-FRET 视图，图 b 为应用 BIN 数据分箱后的 L-FRET 视图。

结果文件，且数据和报告的内容准确无误，符合预期。

综合测试结果表明，Fretha 结果可视化模块的功能正常，能够正确显示和保存数据处理结果，为用户提供了直观的数据分析和保存功能。

3.5 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。测试从：

- (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 and 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，期间每隔 8 小时进行数据导入、数据计算和保存，然后清空数据。记录软件内存占用情况，检测软件是否存在内存泄露

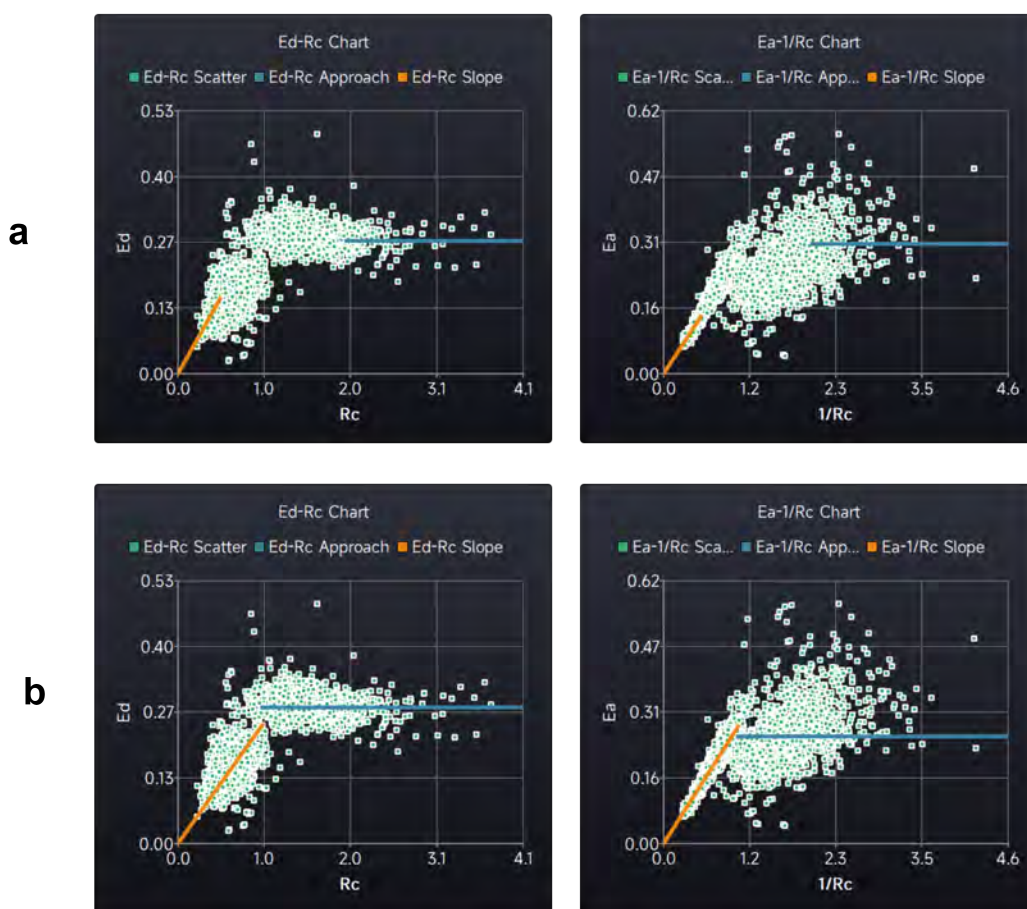


图 3.4 DC-FRET 视图测试结果。图 a 为设置线性拟合的 R_C 数据范围为 (0, 0.5), 均值拟合的 R_C 范围为 (2, 10) 时 Fretha 生成的趋势线和散点图; 图 b 则设置线性拟合的 $1/R_C$ 数据范围为 (0, 1), 均值拟合的 $1/R_C$ 范围为 (1, 10)。

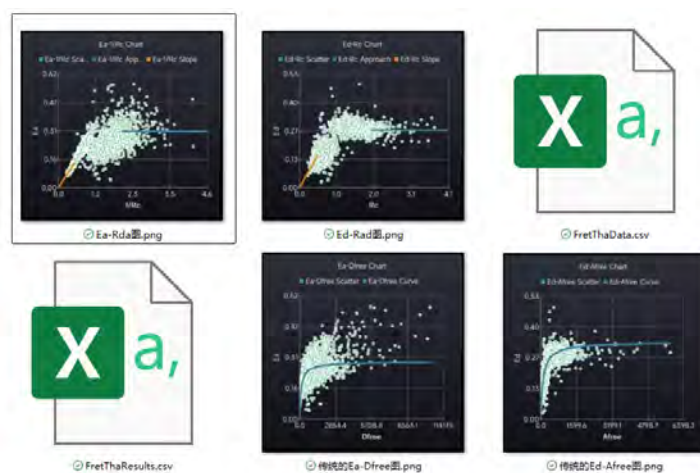


图 3.5 Fretha 结果保存测试结果

(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 3.9 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；长时间运行中的内存占用监测如图 3.6 所示，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。

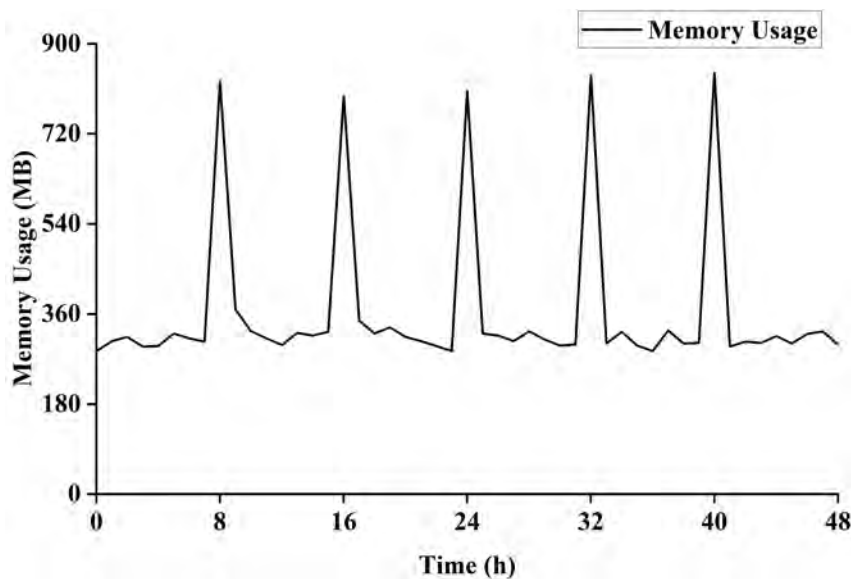


图 3.6 Fretha 软件 48 小时运行内存占用监测

3.6 本章小结

本章对 Fretha 软件的各项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、数据检验模块、FRET 图像处理模块、数据管理模块、结果可视化模块等主要模块的正常运行支持了 FRET 双杂交分析数据处理的所有步骤的用户需求，保证了数据处理过程的安全和高效。

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，

表 3.9 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 and 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%
	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

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。

4 基于明度和均匀度的自动 ROI 选取算法

4.1 引言

FRET 双杂交分析数据处理面临两大难题。一是数据处理过程复杂耗时，包括专家标注 ROI、背景扣除、异常数据过滤、FRET 效率计算、双杂交拟合计算等过程，共 28 个步骤，单次实验过程需要 3.5 至 7 小时。二是对数据质量要求很高，极少数的异常值就可能影响朗缪尔模型拟合的结果，导致拟合失败。当前 FRET 技术中自动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，本章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。通过 C4Y、C10Y、C40Y 和 C80Y 标准质粒验证实验，LURS 算法提取的 FRET 效率与文献结果一致。在 C32V 和 CVC 质粒上，LURS 方法成功识别了供体和受体的化学计量比差异，且计算出的化学计量比的相对误差不超过 6%。最后，本文应用 LURS 方法分析药物处理的活细胞中 Bcl-xL 和 Bak 相互作用的化学计量比，成功检测了两者结合化学计量比的下降，且在高通量场景下 LURS 分析处理的结果优于深度学习的方法和工具，表现出良好的准确性和鲁棒性。

4.2 材料与方法

4.2.1 细胞培养与转染

本章使用的细胞与质粒均与第 3.2.1 节相同。

4.2.2 FRET 成像系统

本章使用的成像系统及成像参数与第 3.2.2 节相同。

4.2.3 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^[54]。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^[55, 56]。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^[57]。背景强度的计算公式为：

$$I_{BG} = \arg \max_p H(p), \quad (4.1)$$

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。本文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:

$$T_L(x, y) = \frac{1}{w \times w} \sum_{i=x-\frac{w-1}{2}}^{x+\frac{w-1}{2}} \sum_{j=y-\frac{w-1}{2}}^{y+\frac{w-1}{2}} I(i, j) + b_L, \quad (4.2)$$

$$Mask_L(x, y) = \begin{cases} 1, & I(x, y) \geq T_L(x, y) \\ 0, & I(x, y) < T_L(x, y) \end{cases}, \quad (4.3)$$

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 4.1 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:

$$Mask_{L,M}(x, y) = Mask_{L,DD}(x, y) \wedge Mask_{L,DA}(x, y) \wedge Mask_{L,AA}(x, y), \quad (4.4)$$

其中 $Mask_{L,DD}$ 、 $Mask_{L,DA}$ 和 $Mask_{L,AA}$ 是基于式 4.3 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。本文采用变异系数 (CV) 评估 ROI 内的灰度均匀性:

$$CV_{ROI} = StdDev_{ROI} / Mean_{ROI}, \quad (4.5)$$

其中 $Mean_{ROI}$ 为 ROI 内像素的平均灰度值, $StdDev_{ROI}$ 为标准差。然后, 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:

$$Mat_{Mean}(x, y) = \frac{1}{n \times n} \sum_{i=x-\frac{n-1}{2}}^{x+\frac{n-1}{2}} \sum_{j=y-\frac{n-1}{2}}^{y+\frac{n-1}{2}} I(i, j), \quad (4.6)$$

其中 n 为 ROI 宽度。基于均值矩阵，标准差矩阵计算为：

$$Mat_{Std}(x, y) = \sqrt{\frac{1}{n \times n} \sum_{i=x-\frac{n-1}{2}}^{x+\frac{n-1}{2}} \sum_{j=y-\frac{n-1}{2}}^{y+\frac{n-1}{2}} I(i, j)^2 - Mat_{Mean}(x, y)^2}, \quad (4.7)$$

将各 ROI 的 CV 值存入 Mat_{CV} ：

$$Mat_{CV} = Mat_{Std}(x, y) / Mat_{Mean}(x, y), \quad (4.8)$$

并通过线性变换将浮点型 CV 值转换为 16 位整数：

$$I_{CV}(x, y) = \left\lfloor \frac{Mat_{Std}(x, y) - Std_{min}}{Std_{max} - Std_{min}} \times 65535 + 0.5 \right\rfloor, \quad (4.9)$$

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（保留更低 CV 值的区域）。像素 (x, y) 的阈值计算为：

$$T_U(x, y) = \frac{1}{w \times w} \sum_{i=x-\frac{w-1}{2}}^{x+\frac{w-1}{2}} \sum_{j=y-\frac{w-1}{2}}^{y+\frac{w-1}{2}} I_{CV}(i, j) + b_U, \quad (4.10)$$

$$Mask_U(x, y) = \begin{cases} 1, & I(x, y) < T_U(x, y) \\ 0, & I(x, y) \geq T_U(x, y) \end{cases}, \quad (4.11)$$

其中 b_U 通过公式 4.1 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 4.11 生成的各通道均匀性掩码， $Mask_{U,M}$ 为合并结果。

$$Mask_{U,M}(x, y) = Mask_{U,DD}(x, y) \wedge Mask_{U,DA}(x, y) \wedge Mask_{U,AA}(x, y), \quad (4.12)$$

- (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:

$$Mask_{LU}(x, y) = Mask_{L,M}(x, y) \wedge Mask_{U,M}(x, y) \quad (4.13)$$

- (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 4.1 所示:

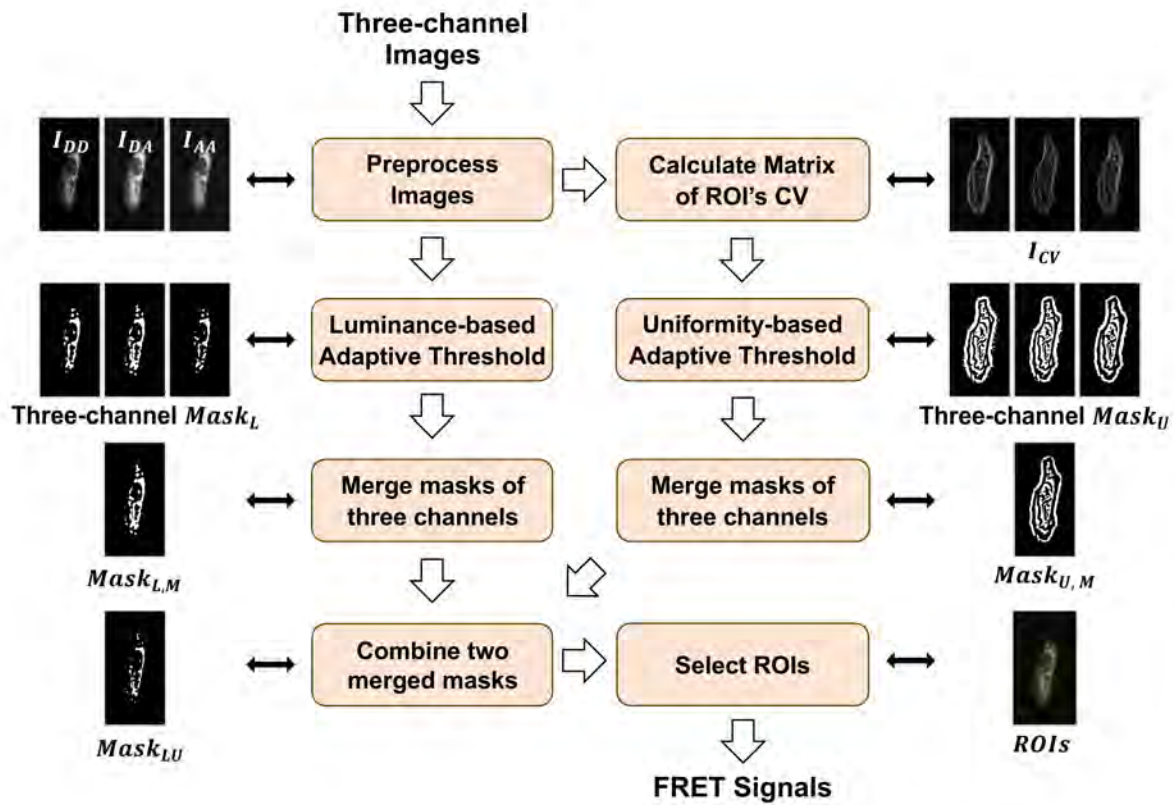


图 4.1 LURS 算法流程图

4.2.4 DC-FRET 方法的数据范围选取

在应用 LURS 方法处理 FRET 双杂交分析数据时，本文更倾向于使用 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。

4.3 实验结果

4.3.1 标准质粒验证实验

准确获取可靠的 3^3 -FRET 和 E-FRET 的测量结果如供受体视角的 FRET 效率 E_A 和 E_D ，是成功进行 FRET 双杂交分析的必要前提。因此，本文运用 LURS 方法自动选取 ROI，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 3^3 -FRET 和 E-FRET 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4.1中。通过对 LURS 提取

表 4.1 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

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, 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。

4.3.2 模型质粒验证实验

本文使用 LURS 结合 DC-FRET 和 L-FRET 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 4.2 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 DC-FRET 和 L-FRET 的结果图 (右侧)。

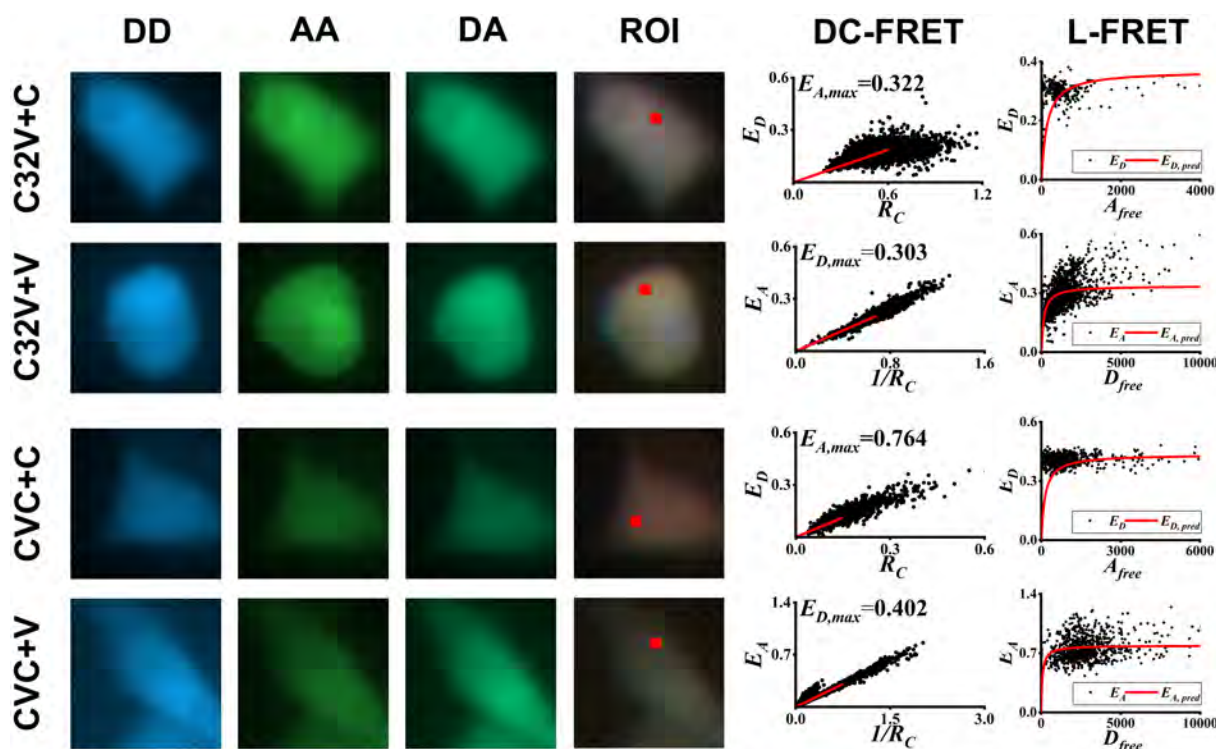


图 4.2 在存在游离供体或受体的情况下, 分别通过 DC-FRET 和 L-FRET 方法对 MCF7 活细胞中标准质粒 (C32V 和 CVC) 的 $E_{A,max}$ 、 $E_{D,max}$ 和 n_D/n_A 进行自动 FRET 双杂交分析测量结果。

C32V 和 CVC 质粒中 Cerulean 与 Venus 之间的结合化学计量比的实验测量结果见表4.2。LURS 结合 DC-FRET，测量得到 C32V 质粒中的 $E_{A,max}$ 为 0.322， $E_{D,max}$ 为 0.303，化学计量比 (n_D/n_A) 为 1.063。这个数值与 C32V 预期的供受体比例 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 0.764、0.402 和 1.900，所获得的结果与先前文献中报道的结果一致^[49]。结合 L-FRET，LURS 自动处理计算得到的 C32V 质粒中的 $E_{D,max}$ 为 0.342， $E_{D,max}$ 为 0.372，化学计量比 (n_D/n_A) 为 0.919。对于 CVC 质粒， $E_{D,max}$ 、 $E_{D,max}$ 和 n_D/n_A 的值分别为 0.791、0.442 和 1.790，与文献报道的结果一致^[50]。这些结果表明，LURS 结合 DC-FRET 和 L-FRET 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和文献结果的相对误差不超过 6%，进一步证明了 LURS 算法提取高质量 ROI 的准确性。

表 4.2 模型质粒的 FRET 双杂交分析结果

样本	DC-FRET 结果			L-FRET 结果			文献结果	
	$E_{A,max}$	$E_{D,max}$	n_D/n_A	$E_{D,max}$	$E_{D,max}$	n_D/n_A	$E_{D,max}$	n_D/n_A
C32V	0.322 ±	0.303 ±	1.063 ±	0.342	0.372	0.919	0.311	1
	0.041	0.012	0.143					
CVC	0.764 ±	0.402 ±	1.900 ±	0.791	0.442	1.790	0.414	2
	0.018	0.024	0.113					

4.3.3 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，本文将 LURS 算法应用于测量两者化学计量比变化的活细胞实验^[58]。

为了对比 LURS 自动 ROI 提取算法和深度学习方法的效果，本文分别测试了应用 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，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，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 的稳定性，本文选取 DC-FRET 作为分析模型和方法。

首先，如图 4.3 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。

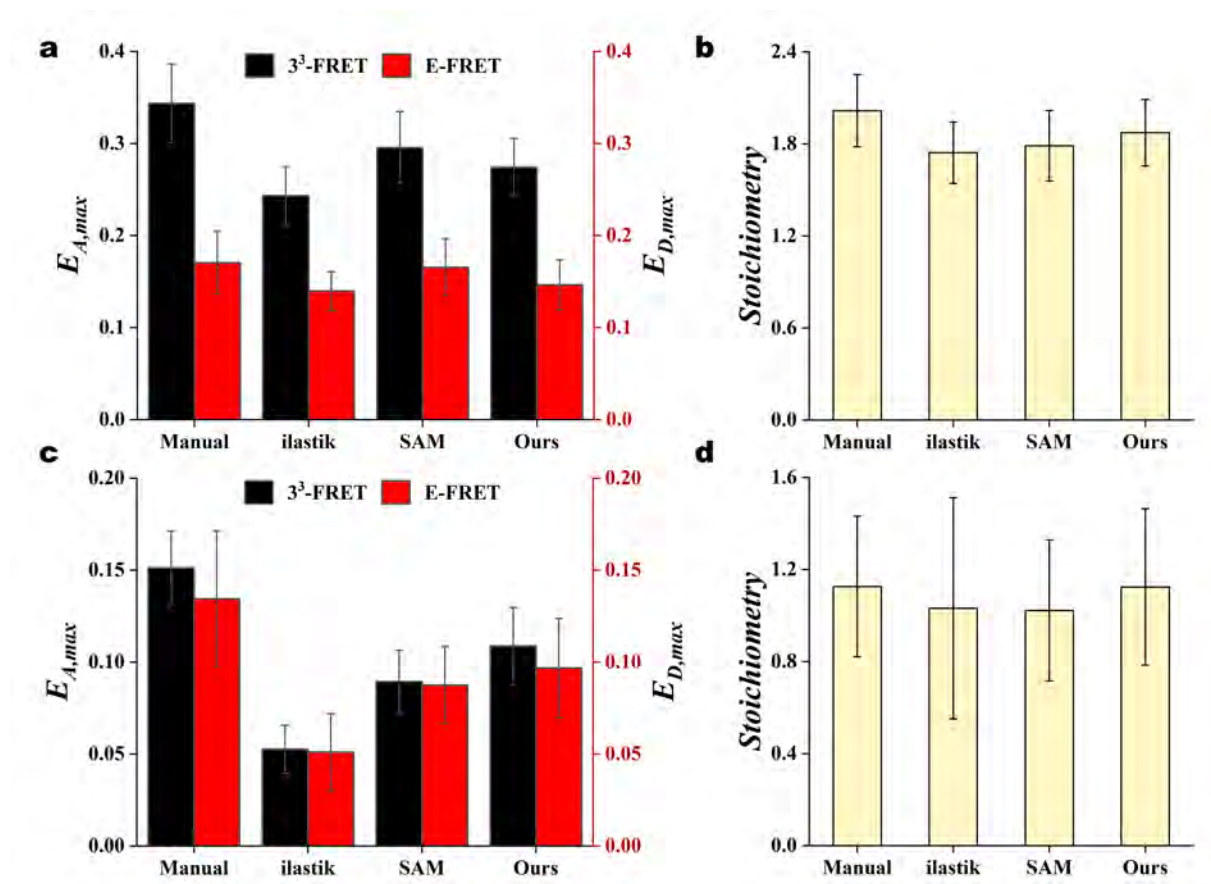


图 4.3 活细胞中 Bcl-xL-Bak 化学计量比的自动分析方法对比。手动、ilastik、SAM-Med2D 及本方法计算的，A1331852 处理前 (a, b) 和处理后 (c, d) Bcl-xL-CFP 与 Bak-YFP 结合的最大 3^3 -FRET (黑色) 和 E-FRET (红色) 效率以及化学计量比 (黄色)。

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 4.3)。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 4.3 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

4.3.4 LURS 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。

如表 4.4 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 10 秒即可提取 1515 个可用的 ROI, 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 4.4 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 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，LURS 结合 DC-FRET 算法敏锐地检测到 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 双杂交分析数据处理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。

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需求和难点，研发了一款 FRET 双杂交分析数据处理软件 **Fretha**。针对 FRET 图像处理时人工标注 ROI 的难点，分析了高质量 ROI 在明度和变异系数上的特点，提出了基于明度和均匀度的 ROI 选取算法 **LURS**，显著提升了数据处理的效率和准确性。本文的研究内容主要包括以下三个方面：

(1) 根据 FRET 双杂交分析数据处理的流程和需求，研发了一款 FRET 双杂交分析数据处理软件 **Fretha**。完成了 **Fretha** 的分层架构设计、模块功能划分、界面设计、模块开发实现等工作。通过对基本数据模型。本文实现了成像参数设置模块和数据检验模块，可有效保证数据处理的前置条件和信息检验。**FRET** 图像处理模块能够切换增强视图类型，辅助 ROI 状态栏，优化了标注 ROI 时的信息反馈，并且设置了 ROI 的自动化选取功能，提升了数据处理的效率。数据管理模块提供了数据筛选、数据导入导出、一键计算等功能，便于用户对数据进行管理和分析，实现了对数据模型的统一管理和在模块间的高效传递。结果可视化模块提供了数据可视化、结果导出等功能，便于用户对数据进行分析 and 展示。**Fretha** 体现出针对 FRET 双杂交分析数据处理的专业性和实用性，提高了 FRET 双杂交分析数据处理的规范化和自动化。

(2) 提出了基于明度和均匀度的 ROI 选取算法 **LURS**。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。**LURS** 算法通过筛选每个 ROI 在局部的相对亮度和变异系数，有效排除低亮度背景和灰度突变区域。在标准质粒 **C4Y**、**C10Y**、**C40Y**、**C80Y** 的 E-FRET 测量和 3^3 -FRET 测量中， E_A 和 E_D 值与文献报道误差小于 5%， R_C 偏差不超过 0.05。在 **C32V** 和 **CVC** 模型质粒的 FRET 双杂交验证中，测量得到的 **C32V** 中 **C** 与 **V** 的结合计量比为 1.06，在 **CVC** 中则为 1.90，符合文献报道的结果。引用 **LURS** 算法测量对照组细胞中 **Bcl-xL-Bak** 相互作用的化学计量比为 1.87，加药 **A1331852** 处理组则为 1.12，化学计量比测量结果与手动分析高度一致。对比基于

SAM-Med2D 和 ilastik 的算法，LURS 表现出良好的稳定性和鲁棒性，适用于高通量药物筛选等大数据量场景。

(3) 对 Fretha 软件进行了系统性测试与评估，完成了对 Fretha 软件的功能测试、性能测试和稳定性测试。Fretha 的参数设置模块响应及时，能够成功更新成像参数，确保数据计算的准确性。数据检验模块可以识别并隔离异常数据，确保软件运行的安全稳定。FRET 图像处理模块的图像显示正常，各个控件的操作响应及时，能够快速标注绘制 ROI，更新 ROI 状态栏信息。数据管理模块能够成功导入导出数据，支持一键计算功能，能够快速完成数据的计算和结果的导出。结果可视化模块展示了 FRET 双杂交分析视图，支持多种格式的结果导出，便于用户对数据进行分析和展示。性能测试表明，Fretha 中 LURS 算法在 1.4GB 数据集上单 ROI 处理时间仅 6.6 ms，内存占用 800 MB，优于其他软件工具如 ilastik (35.2 ms / 1.8 GB) 和 SAM-Med2D (50.7 ms / 14 GB)。稳定性测试表明，测试了 Fretha 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。

5.2 展望

本文研发的 FRET 双杂交分析数据处理软件 Fretha 实现了规范化、自动化的 FRET 双杂交分析数据处理，提升了数据处理的效率和准确性。Fretha 的推出为活细胞 FRET 双杂交分析技术提供了标准化、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。尽管 Fretha 及 LURS 算法已实现 FRET 双杂交分析的自动化处理，面对未来可能的大数据量数据处理需求，今后的工作可以围绕以下几个方面进行改进和完善：

(1) 集成 LURS 算法到显微镜在线成像系统。本文提出的 LURS 算法在性能上已经达到了实时数据处理的实验要求，但是目前还需要将显微镜成像系统中的数据通过数据检验模块导入 Fretha 中离线处理。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，研发智能化的在线成像系统。在线成像系统可以实时监测细胞的荧光信号变化，自动选取 ROI 并进行数据处理，实时输出 FRET 双杂交分

析结果。从而加大显微镜通量，进一步提高 FRET 双杂交实验的效率。

(2) 完善 Fretha 功能，适配更多细胞图像分析方法。Fretha 目前支持 E-FRET、 3^3 -FRET、L-FRET 和 DC-FRET 等分析方法。未来可根据用户需求，增加更多的分析方法和功能模块，如凋亡分析、细胞周期分析等。Fretha 还可以通过引入开源深度学习推理库，如 OpenVINO、TensorRT 等，集成深度学习算法，丰富自动数据处理的算法库。参考 ilastik 的模块化设计，后续可以将不同的分析方法和功能模块集成到 Fretha 中，用户可以自行选择需要的模块进行数据处理。

(3) 搭建数据库和云服务平台。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。Fretha 的自动数据处理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] Yung-Chi C, Prusoff W H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction [J]. Biochemical pharmacology. 1973, 22 (23): 3099–3108.
- [4] Yekta A, Duhamel J, Winnik M A. Dipole-dipole electronic energy transfer. Fluorescence decay functions for arbitrary distributions of donors and acceptors: systems with planar geometry [J]. Chemical physics letters. 1995, 235 (1-2): 119–125.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [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] Cornea R L, Nitu F, Gruber S, et al. FRET-based mapping of calmodulin bound to the RyR1 Ca²⁺ release channel [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106 (15): 6128–6133.
- [12] Yoon S, Pan Y, Shung K, et al. FRET-based Ca²⁺ biosensor single cell imaging interrogated by high-frequency ultrasound [J]. *Sensors*. 2020, 20 (17): 4998.
- [13] Han Y, Yang J, Li Y, et al. Bright and sensitive red voltage indicators for imaging action potentials in brain slices and pancreatic islets [J]. *Science Advances*. 2023, 9 (47): eadi4208.
- [14] Carmona A K, Juliano M A, Juliano L. The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes [J]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2009, 81: 381–392.
- [15] Walter E R, Ge Y, Mason J C, et al. A coumarin–porphyrin FRET break-apart probe for heme Oxygenase-1 [J]. *Journal of the American Chemical Society*. 2021, 143 (17): 6460–6469.
- [16] Cheppali S K, Li C, Xing W, et al. Single-molecule two-and three-colour FRET studies reveal a transition state in SNARE disassembly by NSF [J]. *Nature Communications*. 2025, 16 (1): 250.
- [17] Fan L, Tang Y, Liu J, et al. Mechanical Activation of cPLA2 Impedes Fatty Acid β -Oxidation in Vein Grafts [J]. *Advanced Science*. 2025, 12 (3): 2411559.
- [18] Song Y, Madahar V, Liao J. Development of FRET assay into quantitative and high-throughput screening technology platforms for protein–protein interactions [J]. *Annals of biomedical engineering*. 2011, 39: 1224–1234.
- [19] Sun P, Zhang H, Sun Y, et al. The recent development of fluorescent probes for the detection of NADH and NADPH in living cells and in vivo [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021, 245: 118919.
- [20] Bozza W P, Di X, Takeda K, et al. The use of a stably expressed FRET biosensor for determining the potency of cancer drugs [J]. *PLoS One*. 2014, 9 (9): e107010.

-
- [21] Ben-Johny M, Yue D T D N, Yue D T D N. Detecting stoichiometry of macromolecular complexes in live cells using FRET [J]. *Nature Communications*. 2016, 7 (1): 13709–13709.
 - [22] Yang F, Du M, Wang X, et al. Interaction between Bax and Bcl-XL proteins confirmed by partial acceptor photobleaching-based FRET imaging [J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2020, 13 (03): 2050011.
 - [23] Yang Y, Yu Z, Geng J, et al. Cytosolic peptides encoding CaV1 C-termini downregulate the calcium channel activity-neuritogenesis coupling [J]. *Communications biology*. 2022, 5 (1): 484.
 - [24] Awais M, Sato M, Sasaki K, et al. A genetically encoded fluorescent indicator capable of discriminating estrogen agonists from antagonists in living cells. [J]. *Analytical Chemistry*. 2004, 76 (8): 2181.
 - [25] Aye-Han N N, Ni Q, Zhang J. Fluorescent biosensors for real-time tracking of post-translational modification dynamics [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2009, 13 (4): 392–397.
 - [26] Liu B, Mavrova S N, van den Berg J, et al. Influence of fluorescent protein maturation on FRET measurements in living cells [J]. *ACS sensors*. 2018, 3 (9): 1735–1742.
 - [27] Erickson M G, Alseikhan B A, Peterson B Z, et al. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca²⁺ channels revealed by FRET in single living cells [J]. *Neuron*. 2001, 31 (6): 973–985.
 - [28] Chen H, Puhl H L, Koushik S V, et al. Measurement of FRET efficiency and ratio of donor to acceptor concentration in living cells [J]. *Biophysical journal*. 2006, 91 (5): L39–L41.
 - [29] Zhao H, Li W, Chu W, et al. Quantitative Analysis of Protein Self-Association by Sedimentation Velocity [J]. *Current protocols in protein science*. 2020, 101 (1): e109.
 - [30] Clark S, Mitra J, Elferich J, et al. Single molecule studies of the native hair cell mechanosensory transduction complex [J]. *bioRxiv*. 2023.

-
- [31] Cui Y, Zhang X, Yu M, et al. Techniques for detecting protein-protein interactions in living cells: principles, limitations, and recent progress [J]. *Science China Life Sciences*. 2019, 62: 619–632.
- [32] 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.
- [33] Du M, Yang F, Mai Z, et al. FRET two-hybrid assay by linearly fitting FRET efficiency to concentration ratio between acceptor and donor [J]. *Applied Physics Letters*. 2018, 112 (15): 153702.
- [34] Zhou S, Miao Y, Qiu H, et al. Deep learning based local feature classification to automatically identify single molecule fluorescence events [J]. *Communications Biology*. 2024, 7 (1): 1404.
- [35] Li J, Zhang L, Johnson-Buck A, et al. Automatic classification and segmentation of single-molecule fluorescence time traces with deep learning [J]. *Nature Communications*. 2020, 11 (1): 5833.
- [36] Zhang L, Li J, Walter N G. Pretrained Deep Neural Network Kin-SiM for Single-Molecule FRET Trace Idealization [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2025.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] Thomsen J, Sletfjerding M B, Jensen S B, et al. DeepFRET, a software for rapid and automated single-molecule FRET data classification using deep learning [J]. *Elife*. 2020, 9: e60404.

-
- [40] 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.
 - [41] Kromp F, Bozsaky E, Rifatbegovic F, et al. An annotated fluorescence image dataset for training nuclear segmentation methods [J]. Scientific Data. 2020, 7 (1): 262.
 - [42] Langer M, He Z, Rahayu W, et al. Distributed Training of Deep Learning Models: A Taxonomic Perspective [J]. IEEE Transactions on Parallel and Distributed Systems. 2020, 31 (12): 2802–2818.
 - [43] Huang Y, Cheng Y, Bapna A, et al. GPipe: Efficient Training of Giant Neural Networks using Pipeline Parallelism [C]. In Advances in Neural Information Processing Systems. 2018.
 - [44] Zhang Y, Tiño P, Leonardis A, et al. A survey on neural network interpretability [J]. IEEE Transactions on Emerging Topics in Computational Intelligence. 2021, 5 (5): 726–742.
 - [45] Fan F-L, Xiong J, Li M, et al. On interpretability of artificial neural networks: A survey [J]. IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences. 2021, 5 (6): 741–760.
 - [46] 陆文周. Qt5 开发及实例. 第 2 版 [M]. Qt5 开发及实例. 第 2 版, 2015.
 - [47] Bradski G. The opencv library. [J]. Dr. Dobb's Journal: Software Tools for the Professional Programmer. 2000, 25 (11): 120–123.
 - [48] Bradski G, Kaehler A. Learning OpenCV: Computer vision with the OpenCV library [M]. " O'Reilly Media, Inc.", 2008.
 - [49] Koushik S V, Chen H, Thaler C, et al. Cerulean, Venus, and VenusY67C FRET reference standards [J]. Biophysical journal. 2006, 91 (12): L99–L101.
 - [50] Thaler C, Koushik S V, Blank P S, et al. Quantitative multiphoton spectral imaging and its use for measuring resonance energy transfer [J]. Biophysical journal. 2005, 89 (4): 2736–2749.
 - [51] Warren C F, Wong-Brown M W, Bowden N A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer [J]. Cell death & disease. 2019, 10 (3): 177.

-
- [52] Sun B, Chen H, Wang X, et al. Regorafenib induces Bim-mediated intrinsic apoptosis by blocking AKT-mediated FOXO3a nuclear export [J]. *Cell Death Discovery*. 2023, 9 (1): 37.
- [53] Sun H, Zhang C, Yuan Y, et al. Automated ExEm-spFRET Microscope [J]. *Microscopy and Microanalysis*. 2022, 28 (2): 330–337.
- [54] 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.
- [55] Qu W, Du M, Yang F, et al. Gaussian FRET two-hybrid assays for determining the stoichiometry of hetero-oligomeric complexes in single living cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019.
- [56] 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.
- [57] Sun H, Zhang C, Ma Y, et al. Controlling and online measurement of automatic dual-channel E-FRET microscope [J]. *Biomedical signal processing and control*. 2019, 53 (Aug.): 101585.1–101585.9.
- [58] 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.

作者攻读学位期间发表的学术论文目录

发表的学术论文

- [1] 许莉芬, 曹霏懋, 郑明杰, 肖博健. 基于用户权威度和多特征融合的微博谣言检测模型 [J]. 计算机工程与科学. 2024, 46(4): 752-760.
- [2] 许莉芬, 曹霏懋, 刘聪. 融合转发用户特征的微博谣言检测模型 (投稿至中文信息学报, 已完成第三次返修)
- [3] 肖博健, 曹霏懋, 许莉芬. 多任务学习用于不良言论与个体特征检测 (已被计算机系统应用录用)