

Оптимизация алгоритмов анализа данных локализационной микроскопии

Научный руководитель – Киреев Игорь Игоревич

Босов Дмитрий Валерьевич

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: dimabosov123@yandex.ru

Стохастическая оптическая реконструкционная микроскопия (STORM) является одним из методов локализационной оптической микроскопии с суперразрешением. Метод был разработан в 2006 году [1] и в его основе лежит способность некоторых типов флуорохромов менять свои флуоресцентные свойства в ответ на облучение. Некоторые флуорохромы способны при возбуждении интенсивным лазерным пучком переходить в долгоживущее темновое состояние, но при определенных условиях они способны спонтанно и ненадолго возвращаться в исходное состояние и флуоресцировать [2]. Таким образом можно получить большое количество снимков, на которых флуоресцируют единичные молекулы, легко отличимые друг от друга. Если локализовать их на каждом отдельном снимке, и после объединить, то можно получить высококачественное изображение с преодолением дифракционного предела.

Весь процесс обработки можно разделить на 4 основные этапа: отделение шума от сигнала, субпиксельная локализация, корректировка после локализации и кластеризация (не обязательный, но важный процесс).

В данной работе STORM-микроскопия была использована для анализа структурной организации реплицирующейся ДНК. Для этой цели клетки HEK 293 NIPBL-mut инкубировали с 10 мкМ EdU с последующим присоединением флуорохрома Alexa-647. Регистрацию в режиме STORM проводили на микроскопе Ti-E (Nikon).

Анализ изображений проводили с помощью плагина ThunderSTORM в ImageJ [3]. Результатом обработки является таблица с субпиксельными координатами молекул флуорохрома и изображение, построенное на основе этих данных.

Алгоритмы подавления шума на первичном изображении используют различные процедуры фильтрации, из которых наибольший вклад дают Wavelet filter (B-spline), Difference of Gaussians filter, Lowered gaussian filter и Difference of Gaussians filter. Анализ точности локализации показал, что Wavelet filter (B-spline) имеет преимущество перед другими, эффективно элиминируя неспецифический сигнал (хотя и за счет снижения точности локализации).

Для идентификации репликативных доменов хроматина использовали алгоритмы кластерного анализа, реализованные в программах ClusterViSu и SR-Tesseler. SR-Tesseler определяет домены с помощью диаграмм Вороного. Экспериментальным путем было показано, что SR-Tesseler работает на несколько порядков быстрее ClusterViSu, но не позволяет модифицировать границы кластеров в зависимости от их плотности.

На основании данных ClusterViSu были построены 3D изображения, в которых пики - это кластеры с высокой плотностью ДНК. Это открывает возможность разработки алгоритмов, надежно идентифицирующих границы кластеров.

Источники и литература

- 1) Rust, M. J. et al. Nature Methods, DOI:10.1038/nmeth929

- 2) Алиева И.Б. и др.: Методы клеточной биологии и цитогенетики. -М.: Издательство “Перо”, 2018. - 260 с.
- 3) Sage, D. et al. Nature Methods, DOI:10.1038/nmeth.3442