

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

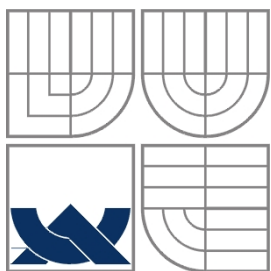
ČÍSLICOVÉ ZPRACOVÁNÍ ELEKTROFORETOGRAMU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

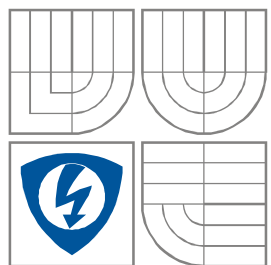
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUKÁŠ ONDROUŠEK

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ČÍSLICOVÉ ZPRACOVÁNÍ ELEKTROFORETOGRAMŮ

DIGITAL SIGNAL PROCESSING OF ELECTROPHORETOGRAMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

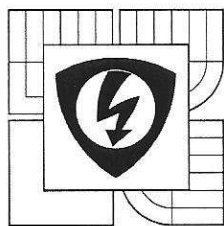
AUTHOR

LUKÁŠ ONDROUŠEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. DENISA MADERÁNKOVÁ



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Lukáš Ondroušek
Ročník: 3

ID: 119734
Akademický rok: 2010/11

NÁZEV TÉMATU:

Číslicové zpracování elektroforetogramů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s elektroforetickými metodami pro použití v analýze sekvencí nukleových kyselin a aminokyselin. Seznamte se s metodami digitálního zpracování elektroforetogramů. V programovém prostředí Matlab vytvořte algoritmus pro načtení elektroforetogramů a jejich zpracování některou z filtračních metod a jeho převod do černobílého formátu. Funkčnost algoritmu vyzkoušejte na sérii vzorových elektroforetogramů.

V programovém prostředí Matlab vytvořte grafickou uživatelskou aplikaci pro práci s elektroforetogramy. Aplikace bude umožňovat načtení elektroforetogramů v různých obrazových formátech a jejich zpracování alespoň třemi metodami fitrace obrazů. Dále bude umožňovat rozkódování sekvence ze Sangerova elektroforetogramu. K aplikaci vytvořte uživatelský návod. Pomocí programu proveďte analýzu vybraných elektroforetogramů.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] JAN, J.: Číslicová filtrace, analýza a restaurace signálů. VUTUM, Brno, 2002.
- [2] MARTIN, R.: Gel Electrophoresis: nucleic acids. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 1996.

Termín zadání: 7.2.2011

Termín odevzdání: 27.5.2011

Vedoucí práce: Ing. Denisa Maděránková

Konzultanti bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Licenční smlouva

poskytovaná k výkonu práva užít školní dílo

uzavřená mezi smluvními stranami:

1. Pan/paní

Jméno a příjmení: Lukáš Ondroušek
Bytem: Blansko, Kamnářská 5, 678 01
Narozen/a (datum a místo): 21.1.1989, Boskovice
(dále jen „autor“)

a

2. Vysoké učení technické v Brně

Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií
se sídlem Údolní 244/53, 602 00 Brno
jejímž jménem jedná na základě písemného pověření děkanem fakulty:
Ing. Denisa Maděránková
(dále jen „nabyvatel“)

Čl. 1

Specifikace školního díla

1. Předmětem této smlouvy je vysokoškolská kvalifikační práce (VŠKP):

- ☐ disertační práce
 - ☐ diplomová práce
 - ☐ bakalářská práce
 - ☐ jiná práce, jejíž druh je specifikován jako
- (dále jen VŠKP nebo dílo)

Název VŠKP: Číslicové zpracování elektroforetogramů
Vedoucí/školicel VŠKP: Ing. Denisa Maděránková
Ústav: Ústav biomedicínského inženýrství
Datum obhajoby VŠKP:

VŠKP odevzdal autor nabyvateli v:

- ☐ tištěné formě – počet exemplářů 2
- ☐ elektronické formě – počet exemplářů 2

2. Autor prohlašuje, že vytvořil samostatnou vlastní tvůrčí činností dílo shora popsané a specifikované. Autor dále prohlašuje, že při zpracovávání díla se sám nedostal do rozporu s autorským zákonem a předpisy souvisejícími a že je dílo dílem původním.

3. Dílo je chráněno jako dílo dle autorského zákona v platném znění.
4. Autor potvrzuje, že listinná a elektronická verze díla je identická.

Článek 2

Udělení licenčního oprávnění

1. Autor touto smlouvou poskytuje nabyvateli oprávnění (licenci) k výkonu práva uvedené dílo nevýdělečně užít, archivovat a zpřístupnit ke studijním, výukovým a výzkumným účelům včetně pořizování výpisů, opisů a rozmnoženin.
2. Licence je poskytována celosvětově, pro celou dobu trvání autorských a majetkových práv k dílu.
3. Autor souhlasí se zveřejněním díla v databázi přístupné v mezinárodní síti
 - ☐ ihned po uzavření této smlouvy
 - ☐ 1 rok po uzavření této smlouvy
 - ☐ 3 roky po uzavření této smlouvy
 - ☐ 5 let po uzavření této smlouvy
 - ☐ 10 let po uzavření této smlouvy(z důvodu utajení v něm obsažených informací)
4. Nevýdělečné zveřejňování díla nabyvatelem v souladu s ustanovením § 47b zákona č. 111/ 1998 Sb., v platném znění, nevyžaduje licenci a nabyvatel je k němu povinen a oprávněn ze zákona.

Článek 3

Závěrečná ustanovení

1. Smlouva je sepsána ve třech vyhotoveních s platností originálu, přičemž po jednom vyhotovení obdrží autor a nabyvatel, další vyhotovení je vloženo do VŠKP.
2. Vztahy mezi smluvními stranami vzniklé a neupravené touto smlouvou se řídí autorským zákonem, občanským zákoníkem, vysokoškolským zákonem, zákonem o archivnictví, v platném znění a popř. dalšími právními předpisy.
3. Licenční smlouva byla uzavřena na základě svobodné a pravé vůle smluvních stran, s plným porozuměním jejímu textu i důsledkům, nikoliv v tísní a za nápadně nevýhodných podmínek.
4. Licenční smlouva nabývá platnosti a účinnosti dnem jejího podpisu oběma smluvními stranami.

V Brně dne:

.....
Nabyvatel

.....
Autor

Abstrakt:

Cílem této práce je seznámení s elektroforetickými metodami a jejich využitím, popis několika základních filtračních metod, které jsou vhodné pro zpracování elektroforetogramů. A následné využití v programu, který je vytvořen v grafickém prostředí programu Matlab, a zpracovává elektroforetogramy. Funkčnost programu bude vyzkoušena na Sangerových obrázcích.

Abstract:

The target of this work is introduction to electrophoretic methods. Basic filtering methods suitable for processing of electrophoretograms are described. These filtering methods are implemented in program which was created in Matlab GUI. The functionality of the program was tested on Sanger's electrophoretograms.

Klíčová slova:

Elektroforetogram, sekvenování, DNA, mediánový filtr, Sangerův elektroforetogram.

Keywords:

Elektroforetogram, sequencing, DNA, median filter, Sanger's electrophoretograms.

Bibliografická citace díla:

ONDROUŠEK, L. *Číslicové zpracování elektroforetogramů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011. 64s. Vedoucí semestrální práce Ing. Denisa Maděránková.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svůj semestrální projekt na téma Číslicové zpracování elektroforetogramů jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího semestrálního projektu a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedeného semestrálního projektu dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 25. května 2011

.....
podpis autora

Poděkování:

Rád bych poděkoval především Ing. Denise Maděránkové, vedoucí mé bakalářské práce, která mě mnohému naučila, se vším mi vždy poradila a věnovala mi mnoho času a úsilí.

V Brně dne 25. května 2011

.....
podpis autora

Vysoké učení technické v Brně

Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

POPISNÝ SOUBOR ZÁVEREČNÉ PRÁCE

Autor: Lukáš Ondroušek

Název závěrečné práce: Číslicové zpracování elektroforetogramů

Název závěrečné práce ENG: Digital signal processing of electrophoretograms

Anotace závěrečné práce:

Předkládaná práce se zabývá problémy spojenými se zpracováním elektroforetogramů – jejich filtrací a detekcí.

Základním zaměřením práce je program vytvořený v grafickém prostředí Matlab, který bude nežádoucí šum filtrovat a následně bude provádět úspěšnou a korektní detekci elektroforetogramu.

Anotace závěrečné práce ENG:

Submitted work is deals with the problems associated with processing electrophoretograms - their filtering and detection. The main focus of work is a program created in Matlab GUI which will be filter out unwanted noise and then will be perform a successful and correct detection of electrophoretogram.

Klíčová slova:

Elektroforetogram, sekvenování, DNA, mediánový filtr, kumulace

Klíčová slova ENG:

Elektroforetogram, sequencing, DNA, median filter, cumulation.

Typ závěrečné práce: Bakalářská

Datový formát elektronické verze: formát pdf

Jazyk závěrečné práce: český

Přidělovaný titul: Bc.

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Denisa Maděránková

Škola: Vysoké učení technické v Brně

Fakulta: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií

Ústav: Ústav biomedicínského inženýrství

Studijní program: Elektrotechnika, elektronika, komunikační a řídicí technika

Studijní obor: Biomedicínská technika a bioinformatika

OBSAH

1. Úvod	9
2. Elektroforéza	10
2.1. Gelová elektroforéza	11
2.2. Kapilární elektroforéza	14
2.3. CE LIF.....	16
3. Princip sekvenování.....	17
3.1. Sangerova metoda	17
3.1.1. Sekvenování	17
4. DNA	20
4.1. DNA v praxi	21
5. Digitální zpracování elektroforetogramů.....	23
5.1. Aplikace bodových operátorů.....	23
5.1.1. Globální transformace kontrastu	23
5.1.2. Metoda prahování.....	25
5.2. Aplikace lokálních operátorů	26
5.2.1. Mediánový filtr.....	26
5.2.2. Zaostřování obrazu.....	26
5.2.3. Detekce hran a linií	27
5.3. Další možnosti zpracování	28
5.3.1. Kumulační technika.....	28
6. Program	30
6.1. Filtrace obrazu.....	30
6.1.1. Prvotní zpracování elektroforetogramu	30
6.1.2. Transformace obrazu.....	30
6.1.3. Mediánová filtrace.....	31
6.1.4. Detekce hran.....	32
6.1.5. Subtrakce	33
6.2. Detekce sekvence	35
7. Návod k aplikaci.....	39
7.1. Kompatibilita aplikace.....	45
8. Závěr.....	46
9. Seznam použitých zdrojů.....	47
10. Příloha: Zdrojový kód programu	50
10.1. bc_elektroforetogram	50
10.2. transfor_obraz.....	60
10.3. filtr_med	61
10.4. detek_hran	63
10.5. substr_obr	64

1. Úvod

Elektroforéza je separační metoda, která se využívá k dělení látek, které nesou elektrický náboj. Mezi elektricky nabitě částice patří bílkoviny, proteiny i samotná deoxyribonukleová kyselina neboli DNA, která ukrývá velké množství informací použitelných v mnoha oborech, v lékařství při zjišťování geneticky podmíněných nemocí, v kriminalistice při usvědčování pachatelů, při mapování genomu a zkoumání funkcí jednotlivých genů, či „vytváření“ nových organismů.

Nedílnou součástí práce je program pro zpracování elektroforetogramů vytvořený v programovém prostředí Matlab v grafickém prostředí GUI, ke kterému bude vytvořen uživatelský návod. Algoritmus bude zpracovávat sérii skutečných elektroforetogramů, které budou filtrovány a převáděny do černobílého obrazu, následně proběhne analýza sekvence a možnost jejího uložení do textového dokumentu.

Druhá kapitola je věnována elektroforetickým metodám, jejich principům, výhodám a nežádoucím jevům, které s touto metodou současně probíhají. Ve třetí kapitole popisují princip sekvenování – jak vznikne samotný elektroforetický obraz. Následující čtvrtá kapitola ukazuje, jak je elektroforéza v dnešním světě nepostradatelná – a jak je využívána v praxi v mnoha vědních oborech. V páté kapitole popisují digitální zpracování obrázků s rozбором několika filtrů. Popis programu – algoritmu pro zpracování elektroforetogramu je rozebrán v šesté kapitole. A uživatelský manuál je zařazen v následující sedmé kapitole. Závěr této práce se nachází v kapitole číslo devět.

2. Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která využívá schopnosti pohybu nabitých částic ve vnějším elektrickém poli. Vzhledem k tomu, že rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly. Různě velké a různě nabitě molekuly se budou pohybovat odlišnou rychlostí. Elektroforézu proto můžeme využívat k separaci látek. Elektroforetická pohyblivost u určité nabitě částice se může vyjádřit rychlostí, kterou se pohybuje v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Jsou-li na začátku separace částice na jednom místě, pak během separace se dostávají dopředu ty nabitě částice, které mají větší pohyblivost a opožďují se částice s menší pohyblivostí. Tím dochází k jejich oddělení. Na nabitou částici působí síla elektrického pole úměrná náboji částice a intenzitě elektrického pole (1). Proti této síle působí odpor prostředí vyjádřený Stokesovou silou (2), kde η je viskozita kapaliny, d je hydrodynamická vlastnost částice a v je rychlost částice. K rovnováze sil dojde při rovnoměrném pohybu nabitě částice rychlostí v . Nabitá částice je charakterizována elektroforetickou pohyblivostí (3) neboli mobilitou μ , a ta je číselně rovna konstantní rychlostí v , kterou částice dosáhne v daném prostředí. [1, 2, 3]

$$F = q \cdot E \quad (1)$$

$$F = 3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d \cdot v \quad (2)$$

$$\mu = \frac{v}{E} = v \cdot \frac{L}{U} \quad \left[\frac{m^2}{Vs} \right] \quad (3)$$

Kde E je intenzita elektrického pole, U je přiložené napětí, L je vzdálenost na které vzniká gradient napětí. Ze vzorce (3) se dá vyjádřit rychlost v (4).

$$v = \frac{\mu \cdot U}{L} \quad [ms^{-1}] \quad (4)$$

Produkce Jouleova tepla je doprovodný jev při probíhající elektroforéze, jelikož také zde proudí elektrický proud a podle Ohmova zákona (5) s rostoucím napětím roste i elektrický proud. Pokud elektrický proud nekoná mechanickou nebo chemickou práci, energie se bez užitku mění na teplo (6), Jouleovo teplo. [4]

$$I = \frac{U}{R} \quad (5)$$

$$W = I^2 \cdot R \cdot t \quad [J] \quad (6)$$

W – Jouleovo teplo

I – Proud

R – Odpor

t – Čas

Jouleovo teplo je nežádoucí efekt, který ovlivňuje pohyb iontů v elektrickém poli. Vzniklé teplo může způsobit změnu viskozity a tím i změnu pohyblivosti separovaných látek, dále může

teplo způsobit odpaření nosiče nebo změnu vodivosti gelu, dokonce i denaturaci separovaných látek. Z tohoto důvodu jsou elektroforetická zařízení pracující s vyšším napětím vybavena účinným chlazením, aby se předešlo tomuto nežádoucímu jevu. [5]

Dalším nežádoucím jevem doprovázejícím elektroforézu je elektrolýza. Ta vzniká díky průchodu stejnosměrného proudu, přičemž se elektrolyt v okolí rozkládá. Tím se postupně mění i pH v těchto prostorech – u katody roste a u anody pH klesá. Použité pH nosiče je důležité již kvůli správné separaci látek, jelikož je-li pH roztoku, ve kterém elektroforéza probíhá, větší než je izoelektrický bod, pak separovaná látka má celkově záporný náboj. Je-li naopak pH gelu nižší než izoelektrický bod, pak celkový náboj látky je kladný. Pokud pH gelu odpovídá izoelektrickému bodu látky, pak se separovaná látka nepohybuje. [5, 6]

Elektroforetické metody se mohou klasifikovat podle různých hledisek. Můžeme je dělit podle děleného množství látky:

- Analytické
- Preparativní
 - Laboratorní
 - Průmyslové

nebo podle typu na:

- Jednorázové
- Kontinuální

dělení podle vloženého napětí:

- Vysokonapěťová elektroforéza ($U > 1000V$): používá se více pro dělení nízkomolekulárních látek. Je nutné chlazení.
- Nízkonapěťová elektroforéza ($U \sim 230V$): se používá pro vysokomolekulární látky. Také zde se doporučuje chlazení vzhledem k jejich teplotní labilitě.

V současné době se elektroforetické metody nejčastěji třídí podle prostředí, ve kterém k separaci dochází. [5]

Elektroforéza je v dnešní době jednou z hlavních metod, pomocí které se provádí separace elektricky nabitých částic (např. biologické makromolekuly). Hlavní uplatnění je v molekulární biologii, k separaci či lépe k analýze sekvence DNA, ale také k analýze bílkovin. [4]

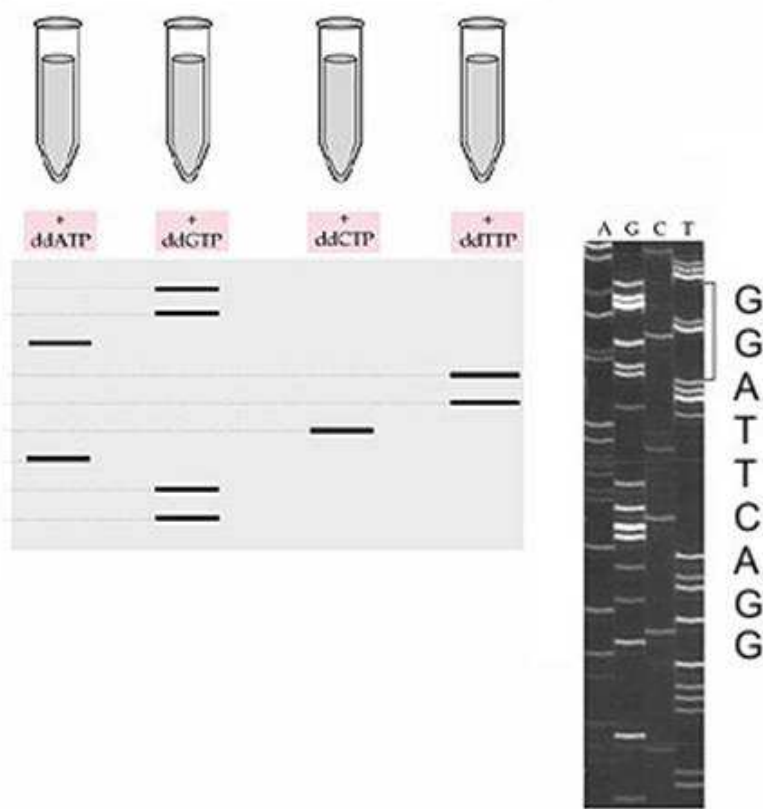
2.1. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je mnohem všestrannější než papírová nebo celulosa-acetánová elektroforéza. Jedná se o kontinuální zónovou elektroforézu a historicky prvně proběhla na

škrobovém gelu, ale v současnosti se preferuje polyakrylamidový nebo agarosový gel. Jednou z výhod této metody je snadné znovuzískání vzorků. [4]

Kvalita elektroforézy závisí především na použitém nosiči. V současnosti se především využívá jako nosič gel – agarosový gel (polysacharid z mořských řas) nebo polyakrylamidový gel (vzniká polymerací akrylamidu a N,N-methylenbisakrylamidu (BIS)). Na gel je připojeno stejnosměrné napětí a gradient tohoto napětí určuje rychlost migrace stejně tak jako použitý nosič. Částice putují k elektrodě s opačnou polaritou, než jakou samy mají. Tudíž DNA se bude pohybovat ke katodě, jelikož má záporný náboj. [4]

Pomocí gelové elektroforézy můžeme rozdělit fragmenty DNA podle velikosti, tj. pokud aplikujeme připravené čtyři roztoky z jednotlivých zkumavek na gel vedle sebe, jsme schopni podle délky, kterou jednotlivé fragmenty urazí, přečíst pořadí ukleotidů v sekvenci.

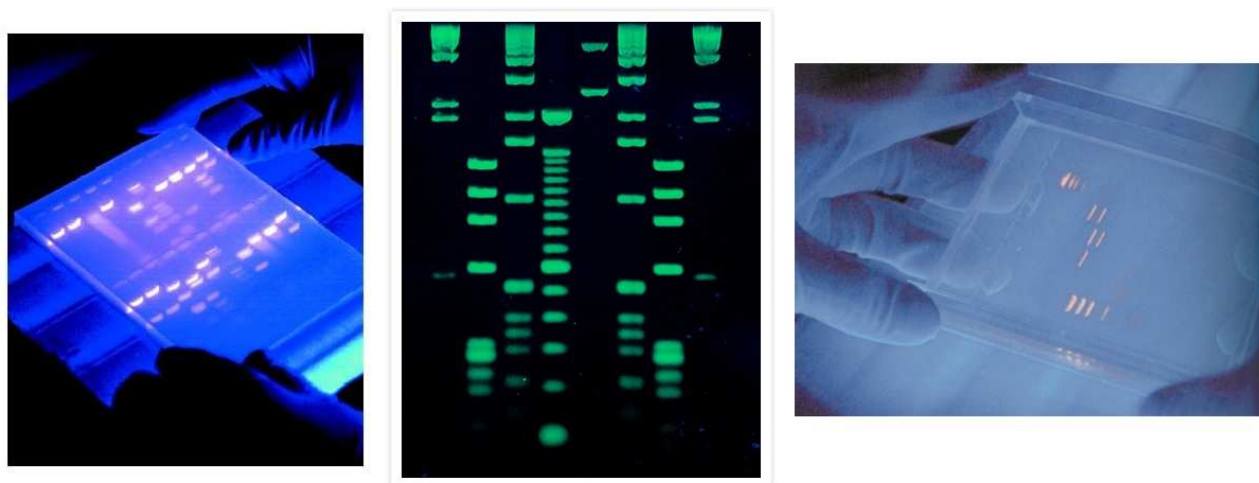


Obr.: 1 Aplikování roztoků na gel, získaná sekvence nukleotidů [7]

Po ukončení elektroforézy, která se provádí pomocí přístroje na obr.: 2, je potřeba výsledek umístit pod UV-transluminátor a pod zářením o vlnové délce 420 nm až 500 nm se odečte výsledek. Použité světlo způsobí vizualizaci jednotlivých fragmentů DNA, které se v gelu pohybovaly různou rychlostí a tím se roztřídily od nejmenšího fragmentu DNA až po největší fragment. Výsledkem je tedy obrázek, jenž můžete vidět na obr.: 3 a který je vstupem k mému programu.



Obr.: 2 Aparatura pro gelovou elektroforézu [8]



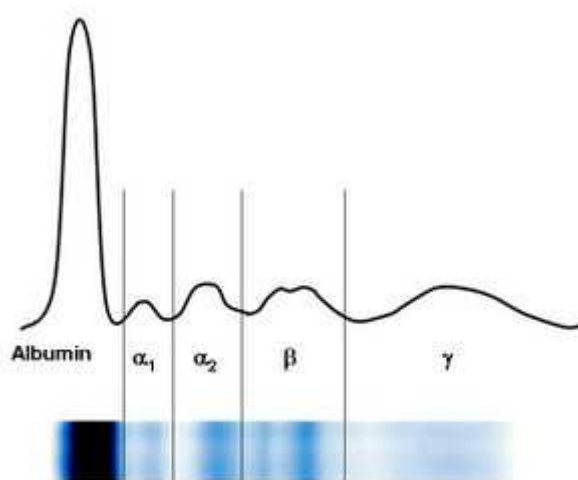
Obr.: 3 Ukázka výsledných obrázků pro elektroforézu [9]

Elektroforéza se také hojně využívá pro separaci bílkovin. Poskytuje informaci o přítomnosti popřípadě nepřítomnosti dostatku dané bílkoviny, která má přímý vliv na stav či funkčnost organismu. Tato metoda slouží k detekci, diagnostice a monitorování stavů i léčbě onemocnění spojených s danou bílkovinou, například mnohočetný myelom, chronické zánětlivé choroby, některá jaterní onemocnění, postižení ledvin či nádorové procesy. [10, 11]

Vyšetření touto metodou je indikováno lékařem, který má podezření na onemocnění. K dignostice se využívá krev, popřípadě moč. Výsledek elektroforézy proteinů poskytuje lékaři informaci o jednotlivých frakcích bílkovin přítomných v organismu. Neexistuje 100% fyziologická hodnota, s kterou se výsledek dá srovnávat, jelikož má mnoho faktorů ovlivňujících kvantitu proteinu obsaženém v organismu, jako je například pohlaví, věk nebo stav pacienta (např.: těhotenství). [10, 11]

Bílkoviny jsou pomocí elektroforézy rozděleny do pěti, popřípadě šesti zón. Každá zóna má specifický název. Největší podíl - až 60% - představuje albumin, který je produkován jaterními

buňkami. Výsledkem elektroforézy je graf (obr.: 4) s charakteristickými píky a každá vizuální “změna” je spojena s určitým onemocněním. [10, 11]



Obr.: 4 Elektroforéza bílkovin [12]

Jedním z nejčastějších testů bílkovin je elektroforéza hemoglobinu. Hemoglobin je látka obsažená v červených krvinkách, která přenáší kyslík. Elektroforéza detekuje všechny typy hemoglobinů, které jsou ve vzorku obsaženy. Následně se zkoumá, zda výsledné hodnoty jsou v toleranci, popřípadě, který typ či typy hemoglobinu jsou v přebytku nebo naopak v nedostatku. [13, 14]

Některé typy hemoglobinů jsou přímou indikací určitých chorob, například přítomnost hemoglobinu S je indikací srpkovité anémie, nebo přebytek hemoglobinu E naznačuje onemocnění červených krvinek – nemoc, kdy jsou krvinky menší než jejich zdravé formy. [13, 14]

Selhání ledvin, poruchy kostní dřeně, onemocnění plic nebo zneužívání drog sportovci za účelem dopingu to vše lze stanovit pomocí této metody. [13, 14]

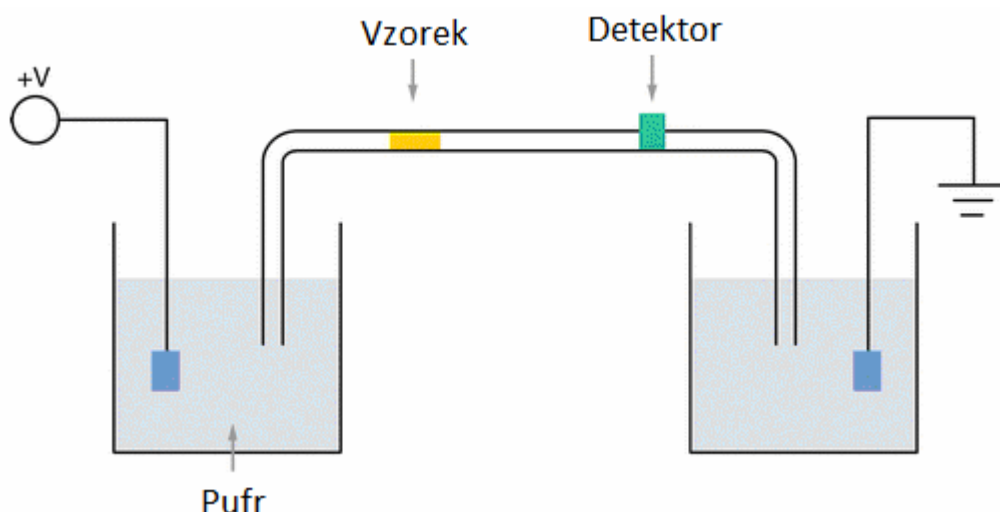
2.2. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je nástupcem klasické gelové elektroforézy. Princip metody je stejný jako s gelovou elektroforézou, rozdíl je v místě, kde dochází k separaci jednotlivých látek. Separační děj u gelové elektroforézy probíhá ve vaničce naplněné gelem. A u kapilární elektroforézy, jak již název napovídá, separační proces probíhá v kapilárách.

Zařízení pro kapilární elektroforézu se skládá (obr.: 5):

- Zdroj stejnosměrného vysokého napětí
- Dvě nádoby na roztok (gel)
- Dvě elektrody
- Křemenná kapilára

- Detektor – sleduje množství procházející látky úsekem kapiláry (absorbanční spektrofotometr)
- Termostátový systém – udržuje konstantní teplotu uvnitř kapiláry (není nezbytné)
- Zapisovací systém – PC



Obr.: 5 Schéma kapilární elektroforézy [15]

Separace vložené složky, především se jedná o biologické makromolekuly (bílkoviny, DNA), probíhá v křemenných kapilárách o průměru 25-75 μm . Kapiláry jsou naplněny gelem, směs, kterou chceme analyzovat, aplikujeme do kapiláry na začátku práce. Objem vzorku je velmi malý, řádově v nanolitrech. Elegantní způsob dávkování takto malých objemů spočívá v ponoření konce kapiláry do vzorku, nadzvednutí do určité výšky a nasátí vzorku působením gravitace. Následně jsou oba konce vloženy do oddělených nádob, které obsahují gel a elektrody, na které je připojeno vysoké stejnosměrné napětí. Detekce je prováděna přímo v kapiláře, lze detekovat koncentrace i 1 μM . [4, 16, 17]

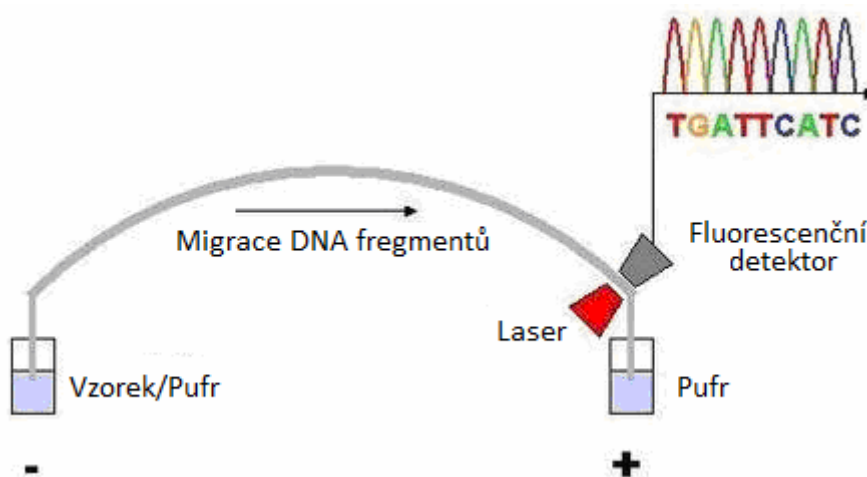
Touto metodou se analyzují proteiny v krevním séru, genetická nebo farmaceutická analýza a mnoho dalších možností využití. Mezi hlavní uplatnění patří zejména analýza DNA, díky tomuto technologickému pokroku nedošlo pouze k zrychlení analýzy, ale i k zautomatizování procesu. Díky automatizovanému procesu sekvenování DNA se vědci mohou více soustředit na biologickou či genetickou analýzu daného vzorku než na pracné sekvenování DNA. [18]

Dalším využitím je farmaceutická analýza, jedná se o běžný proces, který kvantifikuje léky obsažené v krevní plazmě, v mozku, ledvinách nebo v srdeční tkáni. Umožňuje rychlý a snadný screening léčiv toxikologického charakteru. Spektrálně popíše strukturu látky a zjistí elektroforetickou pohyblivost a tím poskytne vysoce reprodukovatelnou identifikaci daného farmaceutika. Další využití ve farmaceutickém odvětví je schopnost rychle detekovat enantiomerní nečistoty na úrovni výrazně menší než 0,1%. Kapilární elektroforéza se také využívá při analýze proteinů, sacharidů. [18]

Hlavní předností této metody je nízká spotřeba gelu a tudíž i její cena je nižší oproti klasické gelové elektroforéze. Další výhodou je sledování neutrálních látek, které se nachytají na křemennou kapiláru. Také menší produkce Jouleova tepla během probíhající elektroforézy je výhodou – menší limitace přiloženého napětí, tudíž s vyšším protékajícím proudem dojde k rychlejší separaci analyzovaných látek. Zmenšením průměru kapiláry se zvýší odvod nežádoucího Jouleova tepla, může se též zvýšit přiložené napětí a tudíž se i zkrátí doba potřebná k analýze daného vzorku. Zmenšením průměru kapiláry dochází však k menší citlivosti detektoru, jelikož se zmenšila i optická dráha detektoru. [4]

2.3. CE LIF

CE LIF neboli kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (obr.: 6). Je založena na detekci fluorescenčně označených nukleotidů. Každý nukleotid má svou barvu a tedy specifickou absorbanci. Hlavní výhodou je, že původně čtyři reakce pro přípravu vzorku můžeme sloučit do jedné zkumavky a též je analyzovat v jedné kapiláře. V gelu se opět jednotlivé fragmenty rozdělí podle pohyblivosti. A při průchodu kolem detektoru se zaznamená barva – absorbance daného fragmentu. Výsledkem je časový průběh absorbancí – záporných píků, z kterých lze určit zkoumanou sekvenci. [3]



Obr.: 6 Schéma CE LIF [19]

3. Princip sekvenování

Elektroforetické metody jsou separační metody, které využívají různou pohyblivost elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Dnes je známo obrovské množství metod sekvenování DNA, ale v dnešní době převládá Sangerova metoda. A z tohoto důvodu ji také беру jako názorný příklad - jak vůbec vznikne vstupní obrázek mého programu.

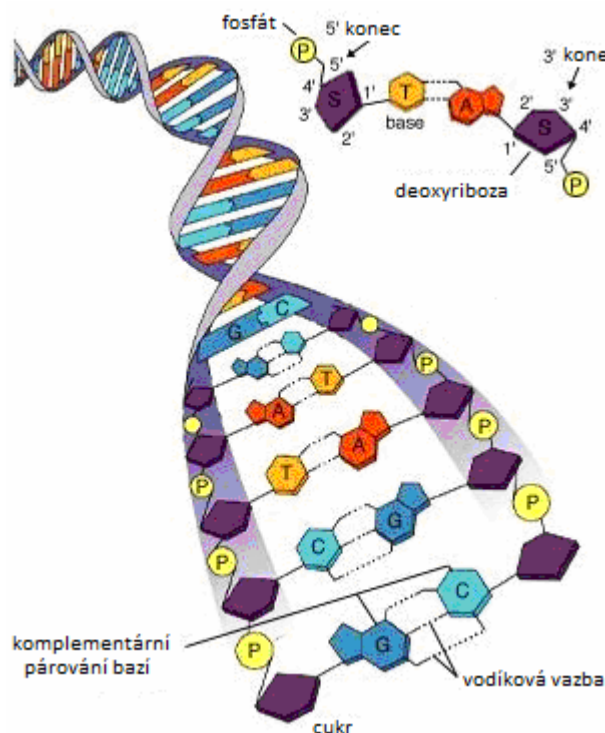
3.1. Sangerova metoda

Sangerova metoda byla vynalezena v roce 1975 britským chemikem Frederickem Sangerem. Frederick Sanger se narodil se 13. srpna 1918 a je nositelem dvou Nobelových cen. První Nobelovu cenu obdržel již v roce 1958 za určení struktury inzulínu, druhou Nobelovu cenu dostal za chemii v roce 1980 – Průlom v zjišťování struktury bílkovin, nukleových kyselin a virů. [20]

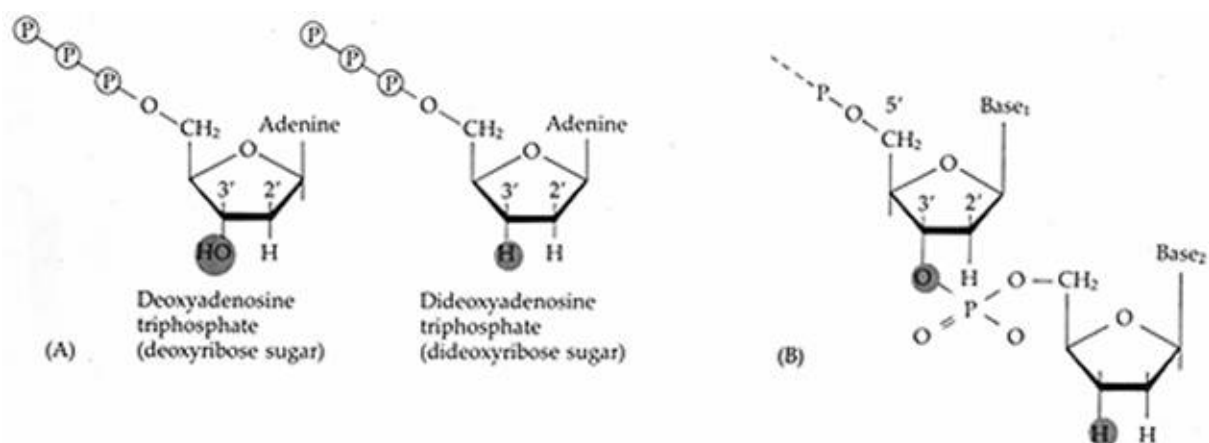
3.1.1. Sekvenování

Tato metoda je použitelná k sekvenování krátké sekvence jednovláknové DNA. Ve své podstatě využívá biologického procesu replikace DNA. Vybraná sekvence se vloží do reakční směsi, která obsahuje následující složky:

- DNA (obr.: 7)
- Primer – jenž určí počáteční místo replikace
- DNA polymerázu – přidává nukleotidy pouze na 3'-OH konec nově vznikajícího DNA
- Čtyři druhy deoxyribonukleotidů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) - je nukleotid, složený z nukleové báze (A, C, G, T, (U)), cukru deoxyribózy a jedné či více fosfátových skupin. (Obsahuje -OH skupinu obr.: 8)
- A jeden ze čtyř dideoxyribonukleotidů (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) – je derivát nukleotidů, který postrádá OH skupinu na 2' i 3' uhlíku svého cukru, jak je vidět na obr.: 8. A díky tomu jsou schopné ukončit probíhající replikaci DNA. Tyto deriváty nukleotidů jsou uměle vytvořeny. [21]



Obr.: 7 Primární struktura DNA [22]



Obr.: 8 A - srovnání dATP a ddATP, B - navázání dideoxynukleotidu [23]

Máme čtyři reakční směsi a do každé z nich dáme jeden ze čtyř dideoxyribonukleotidů a všechny čtyři deoxyribonukleotidy plus ostatní složky primer, DNA polymerázu a samotnou DNA, které jsou potřebné k připravení sekvence DNA. DNA se replikuje v každé zkumavce zvlášť a ve zmíněné zkumavce je DNA zakončena vždy příslušným dideoxyribonukleotidem, který tam byl přidán. Derivát nukleotidu vždy zakončí DNA na místě, na kterém by byl obsažen „normální“ nukleotid. Díky tomuto postupu máme čtyři zkumavky, které obsahují různé dlouhé sekvence DNA zakončené vždy derivátem nukleotidu, který nahrazuje příslušný deoxyribonukleotid.



5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAA**G**
 3'-GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCC**G**
 3'-GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCC**G**
 3'-GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGGAT**G**
 3'-GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5'-GAATGTCCTTTCTCTAAGTCCTAAGTCCTCCGGATGGTACTTCTA**G**
 3'-GGAGACTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

Obr.: 9 Příklad zkumavky s ddGTP [24]

4. DNA

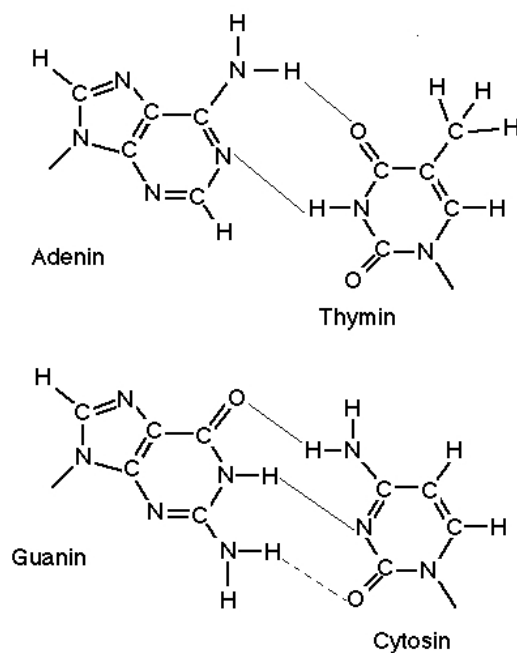
Elektroforéza je metoda v dnešním světě snad nepostradatelná, která má sílu měnit budoucí běh událostí v jednotlivých vědních oborech. Tato snad i prostá metoda má vážnost díky tomu, s čím pracuje. Přece jen DNA, kterou elektroforéza „luští“ je nejpreciznější a nejsofistikovanější strukturou, kterou člověk byl schopen objevit.

DNA neboli deoxyribonukleová kyselina je nepostradatelnou součástí většiny organismů. Určuje, jakou roli bude daná buňka mít a jak bude vypadat výsledný organismus, který je nositelem příslušné genetické informace. Každý organismus má proto jedinečnou genetickou informaci – ani jednovaječná dvojčata nemají stejnou DNA. [25]

DNA se skládá ze tří složek (obr.: 7):

- Cukr – deoxiriboza
- Fosfát
- Báze – jeden ze čtyř nukleotidových bazí
 - A – Adenin
 - C – Cytosin
 - G – Guanin
 - T – Thymin

Sekundární struktura DNA je šroubovice dvou spojených antiparalelních částí. Spojují se přes báze pomocí vodíkové vazby. Určitá báze se může pojit pouze k odpovídající bázi, adenin (A) se spojuje s thyminem (T) pomocí dvou vodíkových vazeb (obr.: 10) a může se spojovat i thymin s adeninem. Další pár je vytvořen pomocí cytosinu (C) a guaninu (G), samozřejmě se pár může vytvořit i naopak guanin s cytosinem, pomocí tří vodíkových vazeb (obr.: 10).



Obr.: 10 Párování bazí: adeninu a thiminu; cytosinu a guaninu [26]

Elektroforéza určuje primární strukturu DNA – zjišťuje, jak jdou jednotlivé báze v DNA struktuře za sebou. A tedy následně lze určit, jestli DNA nebo lépe část DNA se rovná nebo podobá jinému úseku DNA. Elektroforéza se v praxi nevyužívá pro zjištění celé primární struktury, jelikož genetická informace se skládá z $3 \cdot 10^3 - 3 \cdot 10^9$ bází a kvůli takovému množství informací, které je v ní obsaženo, by elektroforéza nebyla vhodná metoda, využívá se pouze pro 10-100 bází.

4.1.DNA v praxi

Samotná DNA je tedy biologická makromolekula, která je uložena uvnitř buněčného jádra. Informace, které uschovává, umožňují organizovat molekuly v živý organismus, který je schopen regulace, růstu a reprodukce. Každý organismus, který má DNA, vlastní originální genetickou informaci.

Tento předpoklad je využíván v kriminalistice, díky čemuž mohou odhalit pachatele, který zanechal na místě činu svou DNA. Kriminalisté posbírají důkazy v různých formách, mezi ně jsou zahrnuty i lidské buňky jako například: krev, vlasy, kožní buňky, sliny, a nebo jiné různé tělesné tekutiny. Z těchto důkazů pak získají profil DNA a porovnávají ať už s existující databází nebo s podezřelými osobami. A tím vyloučí nebo potvrdí, zda podezřelý byl na místě činu či nikoli. Tato metoda patří mezi nejspolehlivější techniky v kriminalistice. Nyní zpětně odhaluje zločiny, které byly pro nedostatek důkazů odloženy či neuzavřeny. [25]

Další praktické využití principu elektroforézy je ve vědě, kde vědci mapují genomy určitých organismů. Tento proces je velice složitý a zdoluhavý z důvodu velkého množství informací obsažených v celém genomu. Znalost celého genomu je užitečná, ale bez znalosti jednotlivých genů

a jejich funkcí je to nedostačující informace. Díky rozluštění genomu a pozorování funkčnosti jednotlivých genů byly objeveny dědičné nemoci. [27]

Následně tento poznatek vstupuje do praktické medicíny, v běžné praxi se prozatím nevyužívá. Předpokládá se, že by se lidský genom mohl dekodovat jako běžné vyšetření a díky tomu by bylo možné předvídat nemoci, které by se u daného pacienta mohly rozvinout a následně nasadit včasnou či podpůrnou léčbu ve správný čas. [28]

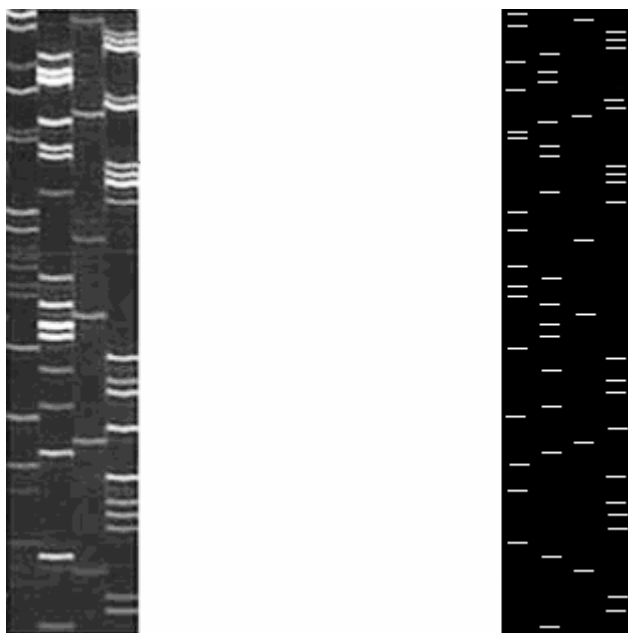
V současné době se praktická aplikace elektroforézy uchytila nejen v kriminalistice, ale i v medicíně. Jedná se o testy otcovství. Při zjišťování se odeberou tři vzorky od matky, dítěte a potenciálního otce. Ze získaných genetických materiálů se zkoumá shoda některých polymorfních znaků v sekvenci DNA. Následně může být vypracován znalecký posudek, který lze za dodržení určitých podmínek použít u soudu. [29]

A nyní, když jsme si probrali praktické využití v současné době, bych uvedl potenciál, který vědci objevili a jehož následné praktické využití již plánují. Průlom spočívá v umělé syntetizaci DNA. Donedávna vědci dokázali syntetizovat dvojitou šroubovici DNA složenou nanejvýš z desítek či stovek bází. Nyní jsou však již schopni uměle syntetizovat až přes milion bází. Díky tomuto převratnému pokroku dokázal americký tým syntetizovat kompletní genom jednoduché bakterie. Tento genom vložili do bakteriální buňky a vložený genom začal ovládat buňku a po chvíli bakterie vytvořila přes miliardu svých kopií. Výsledek je podle vědců obrovským úspěchem a otvírá se zde i mnoho otázek. A vědci si slibují, že díky této genetické revoluci – vytváření umělých buněk – budou moci vyrábět nové léky, palivo a dokonce likvidovat skleníkové plyny. [30]

Elektroforetické metody v dnešní době patří mezi nepostradatelné metody současného světa. Využívají se v mnoha oborech – v lékařství, kriminalistice nebo ve výzkumu. Elektroforéza patří nerozlučně k DNA, s kterou se v současné době pracuje v mnoha odvětvích a zkoumá se její potenciál, který by vědci a svět využili pro „lepší zítřek“. Složitost DNA se promítá i do jejího zpracování.

5. Digitální zpracování elektroforetogramů

Zpracování elektroforetogramů má stejný základ jako zpracování obrazů. Je zde ale patrný malý rozdíl, jelikož u elektroforetického obrázku víme, nebo bychom aspoň měli předpokládat, jak má výsledek elektroforézy vypadat. Neměl jsem na mysli samotnou posloupnost sekvence v detekované struktuře DNA, ale obecnou a pro většinu elektroforetických obrázků velmi podobnou strukturu výsledku. Předpoklad, že správný elektroforetogram bude mít bílé obdélníčky na černém podkladě – v idealizované formě, nám ulehčí vybírání digitálních algoritmů, kterými budeme elektroforetogram upravovat.



Obr.: 11 Elektroforetogramy: vlevo fotografie [8]; vpravo idealizovaná forma fotografie

Na obr.: 11 jsou dva elektroforetogramy. Ač oba kódují stejnou sekvenci DNA, jsou velice rozdílné, především ve své kvalitě. Vlevo je elektroforetogram složen z odstínů šedi a to je také hlavním důvodem možné chybné detekce jednotlivých světlých ploch. Naproti tomu elektroforetogram vpravo je složen pouze ze dvou barev – černo-bílý obraz. Díky tomu je detekce výsledné sekvence mnohem jednodušší, především kvůli menším (v idealizovaném případě žádným) nežádoucím artefaktům, které jinak zkreslují výsledek.

5.1. Aplikace bodových operátorů

5.1.1. Globální transformace kontrastu

Hlavním účelem této funkce je zvýšení kontrastu v některé části stupnice šedi. Zatímco je původní histogram, udávající zastoupení jednotlivých odstínů obvykle velmi nerovnoměrný, histogram transformovaného obrazu má vyjadřovat co nejrovnoměrnější zastoupení celého dynamického rozsahu, který daný systém nabízí. [31]

Na obr.: 12 jsou vidět dva obrázky - vlevo před upravením, vpravo po lineárním zvýraznění kontrastu. Ke každému je přidělen histogram, který znázorňuje využitý rozsah hodnot pro daný obraz. Levý obrázek využívá převážně nižší (tmavší) hodnoty a právě tyto body byly transformovány do celého rozsahu stupnice. Ačkoliv nedošlo ke zvýšení informačního obsahu obrazu, jak se občas nesprávně uvádí, představuje takto upravený obraz tzv. brilantní obraz, který se často lépe hodí k posuzování. Lineární upravení obrazu jsem provedl pomocí vzorce (7). [19,31, 32]

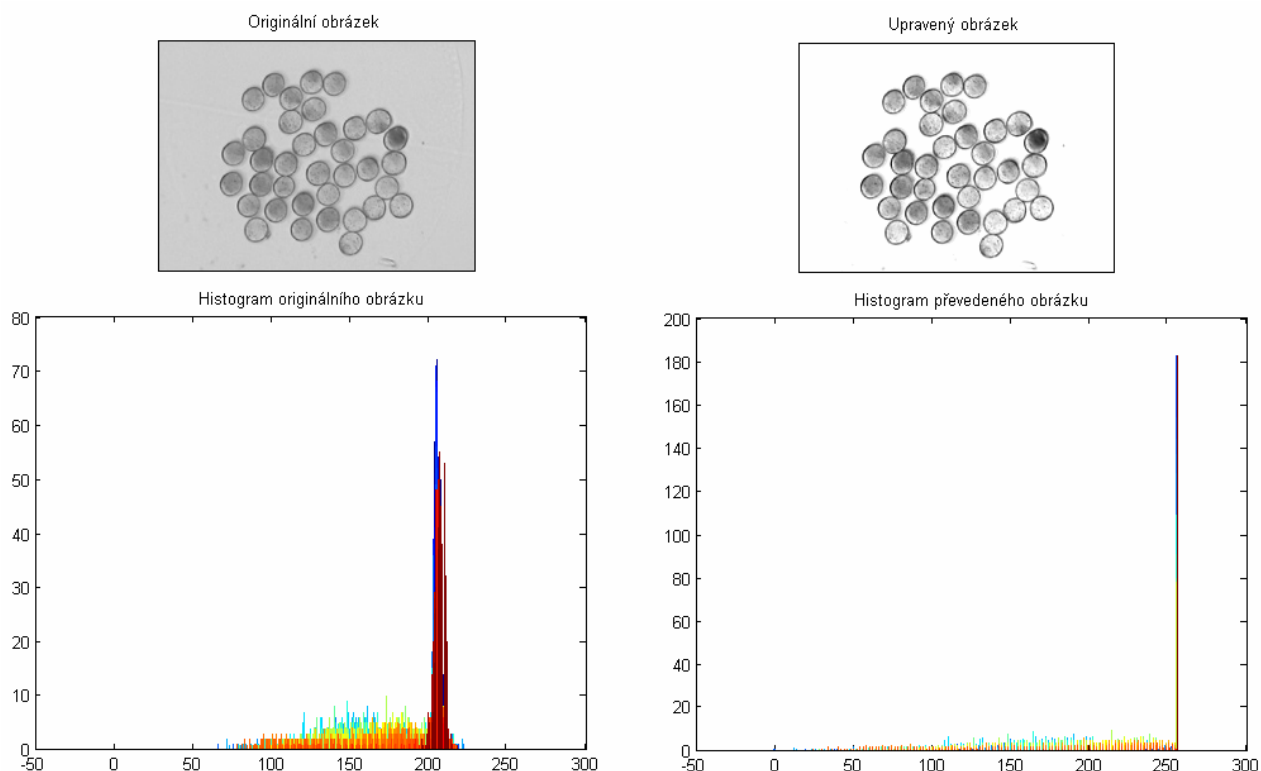
$$O(x) = \frac{255 \cdot [I(x) - I_{\min}]}{I_{\max} - I_{\min}} \quad (7)$$

$O(x)$ – výstupní hodnota

$I(x)$ – vstupní hodnota

I_{\min} – minimální vstupní hodnota

I_{\max} – maximální vstupní hodnota



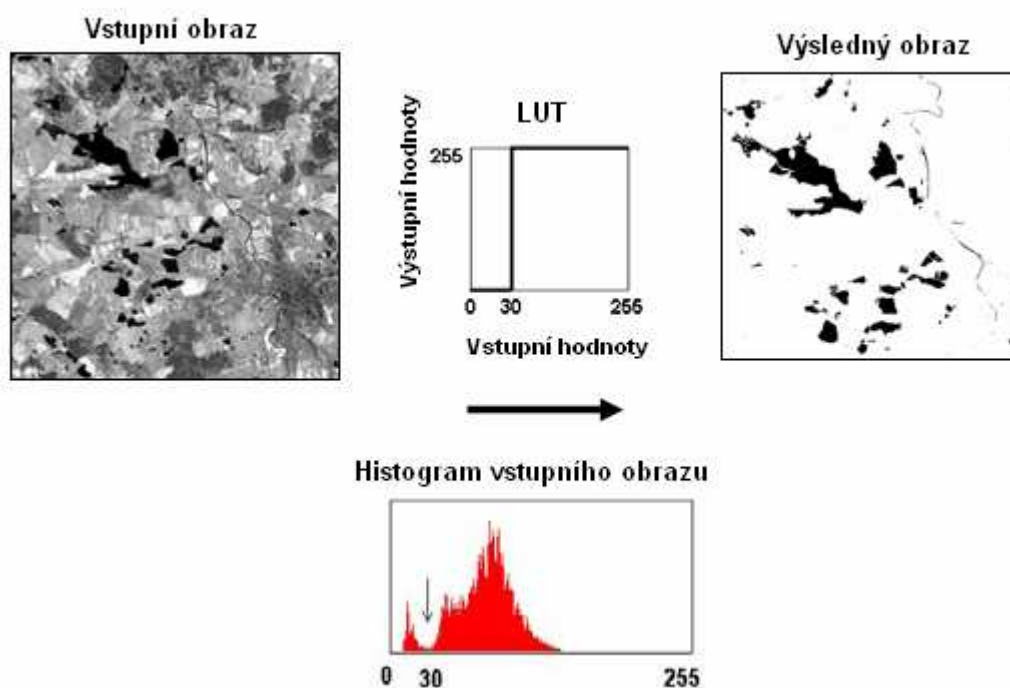
Obr.: 12 Vlevo před úpravou + histogram; vpravo po úpravě + histogram [32]

Globální transformace kontrastu, ale i následující metoda „metoda prahování“ je mimořádně jednoduchá. Jelikož každá vstupní hodnota je podrobena stejné transformační funkci, lze tyto operace provádět bod po bodu i v reálném čase. [20]

5.1.2. Metoda prahování

Tato filtrace je jednoduchá a pro elektroforetické fotografie velice efektivní metoda. Metodou prahování docílíme černo-bílého obrazu a tím se přiblížíme idealizované formě.

Metoda využívá jednoduchého principu (obr.: 13). Prvním krokem je vytvoření histogramu z upravovaného obrazu. Z histogramu je určena "prahová" hodnota, pomocí které se dělí hodnoty pixelů na snímku (obrázku) pouze do dvou kategorií. První kategorie je po práh a hodnota původních pixelů je nahrazena nulou – což odpovídá černé barvě a v druhé kategorii (nad prahem) jsou hodnoty pixelů nahrazeny bílou barvou (255). Výsledkem prahování je tedy tzv. bitový obraz. [33]



Obr.: 13 Metoda prahování [33]

V mnoha případech není možno se spokojit s těmito „jednoduchými“ metodami úpravy obrazů. Jelikož zmíněné postupy se zajímají pouze převáděným bodem a na body ve svém okolí není brán žádný zřetel. Z tohoto důvodu se mnohdy nazývají „bodové operátory“. Metody, které do výpočtu určitého elementu zahrnují i svoje okolí, se řadí do kategorie: „lokální operátory“ nebo jinak také „maskové operace“. Jejich využití je mnohostranné, například: [31]

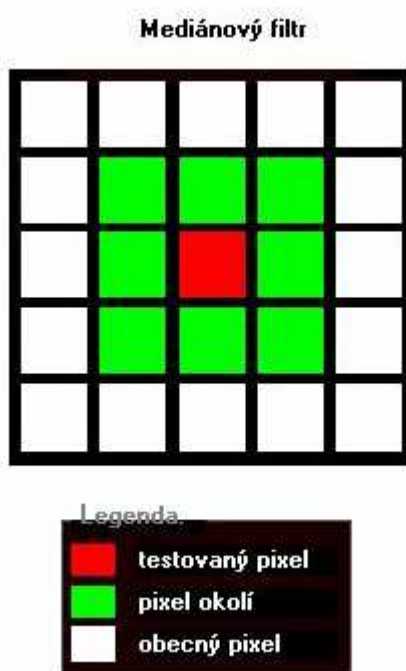
- Potlačení šumu
- Zostřování obrazu
- Příprava pro segmentaci – detekce hran, linií apod.
- Morfologické operace

5.2. Aplikace lokálních operátorů

5.2.1. Mediánový filtr

Mediánový filtr patří mezi nelineární filtry, které fungují na principu třídění. Využívá se především k potlačení impulsního šumu, pro šedý šum není tento typ filtru vhodný. Přednost mediánového filtru spočívá v tom, že zachovává hrany. Záleží na masce mediánového filtru, který určí co potlačit a co zanechat (co už není šum). [31]

Příklad masky mediánového filtru je vidět na obr.: 14. Princip je následující: pod maskou jsou seřazeny hodnoty pixelů, v našem případě se jedná o červené a zelené čtverce. Je z nich vytvořena posloupnost hodnot podle určitého pravidla (například od největšího po nejmenší). Ze seřazených hodnot je vybrán medián a dosazen za pixel, pro který se počítal (červený čtverec). Tímto způsobem jsou přepočteny všechny pixely v obraze. [31]



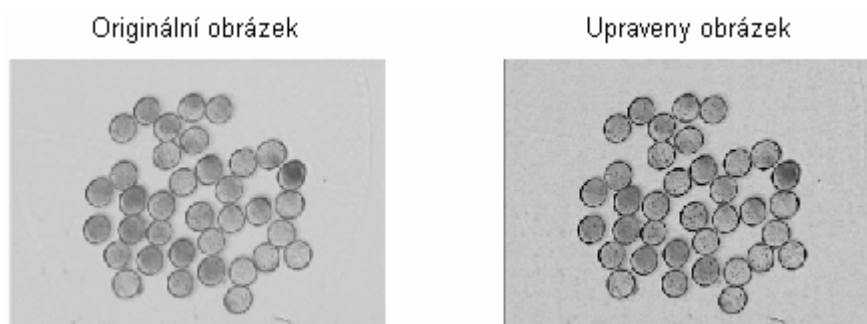
Obr.: 14 Maska mediánového filtru

5.2.2. Zaostrování obrazu

Zaostrování obrazu je operace do jisté míry v protikladu se záměrem potlačování šumu. Jelikož zaostrující operátory zvyšují podíl složek s vyššími frekvencemi, o nichž se předpokládá, že nesou zejména informaci o detailech a hranách. Na rozdíl od lokálního průměrování (mediánového filtru), který tyto vyšší prostorové frekvence potlačuje, neboť je považuje převážně za šumové a tudíž nežádoucí. Vzhledem k tomu, že obě hypotézy jsou pravdivé a obvykle platí současně, je nutné najít kompromis: zaostrování je možné jen do té míry, aby nedošlo k neúnosnému zhoršení signálu k šumu. [31]

Na obr.: 15 je patrný rozdíl zaostrování obrazu. Zaostrění se provádí pomocí masky (obr.:

16), pod kterou se spočítá vážený průměr, tato hodnota se uloží na příslušné místo matice (obrazu), stejným způsobem se dopočítají všechny hodnoty. Nyní jsme získali Laplacián rozostřeného obrazu. Výsledný zaostřený obraz získáme odečtením vstupního obrazu od Laplaciánem rozostřeného obrazu. [31, 34]



Obr.: 15 Vlevo originál; vpravo zaostřený obraz [34]

$$\begin{pmatrix} 2 & -1 & 2 \\ -1 & -4 & -1 \\ 2 & -1 & 2 \end{pmatrix}$$

Obr.: 16 Maska operátoru [34]

5.2.3. Detekce hran a linií

Detekce hran a linií v obraze slouží k nalezení tzv. hranové reprezentace, tj. odvozeného obrazu, v němž jsou hrany v první etapě zdůrazněny diferenčními operátory a následně pak ty z nich, které se jeví dostatečně výrazné, vymezeny např. prahováním. Taková prahová reprezentace může v dalším postupu sloužit pro segmentaci obrazu, založenou na hranách. Ukázka detekce hran je na obr.: 17.



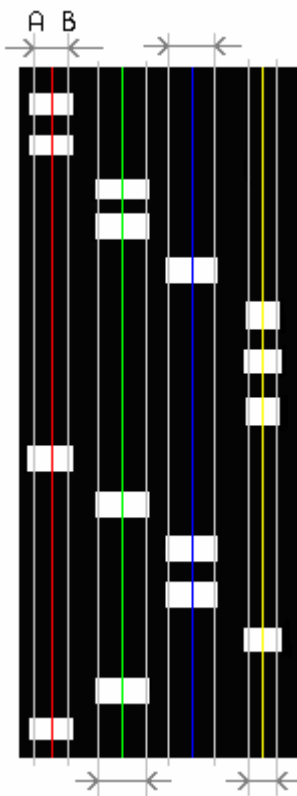
Obr.: 17 Vlevo originál; vpravo detekce hran a linií [34]

5.3. Další možnosti zpracování

5.3.1. Kumulační technika

Další upravení elektroforetogramu je možné pomocí kumulačního principu neboli průměrování. Jedná se o metodu, která zlepšuje poměr signál/šum u signálů, jež jsou periodické nebo repetiční. Hlavním předpokladem je, že šum, který je obsažen v obraze, má stochastický (náhodný) charakter a z toho plyne, že šum má nulovou střední hodnotu – průměr samotného šumu je nulový. Tudíž užitečný signál není závislý na šumu. A průměrováním dojde k potlačení míry šumu, který se uplatňuje na úkor užitečného signálu. [31]

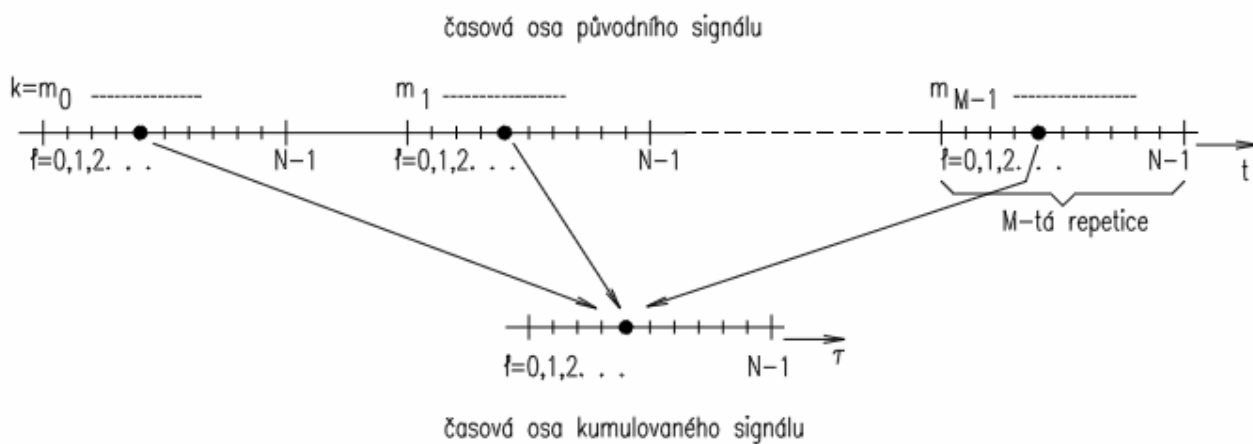
Opakující se signál nebo řada pixelů napříč elektroforetogramem, jak je vidět na obr.: 18. Kolem jednotlivých řezů (barevných čar) lze v idealizované formě předpokládat, že hodnoty jednotlivých pixelů se nebudou lišit. Pokud tomu tak není, je to zapříčiněno nežádoucím stochastickým signálem. Díky tomuto předpokladu můžeme využít kumulační techniky, která zlepší poměr signál/šum a tedy odstraní nežádoucí šum v elektroforetogramu.



Obr.: 18 Elektroforetogram s naznačeným opakováním

Princip metody je patrný z obr.: 19. Aplikace kumulačního principu na elektroforetogram na obr.: 18 je následující: Opakující se signál je mezi sloupcemi A-B. Vezmeme první řádek mezi sloupcemi A-B a sečteme hodnoty jednotlivých pixelů a podělíme je jejich počtem – dostaneme

průměr. Tento průměr pak dosadíme jako novou hodnotu pixelů, s kterými jsme počítali. Tímto způsobem přepočítáme všechny řádky mezi sloupci A-B. Stejným principem přepočteme i hodnoty okolo zbylých třech sloupců.



Obr.: 19 Princip kumulace repetičního signálu [31]

6. Program

Program byl vytvořen pomocí programu Matlab a jeho příslušného jazyka. Vytvořený skript (program) se dělí na dvě části: v první části dochází k upravování vstupního obrazu pomocí různých filtrů a v druhé části je samotná detekce sekvence ze vstupního digitalizovaného obrazu. K programu bylo vytvořeno grafické prostředí pro jeho jednodušší použití.

6.1. Filtrace obrazu

Na obraz je aplikováno několik typů filtračních metod. Nejprve dochází k zlepšení kontrastu pomocí substrakční techniky a transformace obrazu, následuje mediánová filtrace. Po úpravě kontrastu a odstranění impulsního šumu dojde k detekci hran a následně opět k substrakci, tím dostaneme výsledný obraz pro analýzu sekvence.

6.1.1. Prvotní zpracování elektroforetogramu

Prvním příkazem po načtení obrázku je jeho převedení do černobílého formátu, jelikož elektroforetogramy jsou v idealizované formě pouze černo-bílé, z tohoto důvodu je zbytečné zpracovávat obraz ve formátu RGB. Následujícím krokem byla substrakce obrazu s jeho vlastní průměrnou hodnotou. Na tuto úpravu byla použita funkce, kterou Matlab nabízí a to příkaz `imsubtract`.

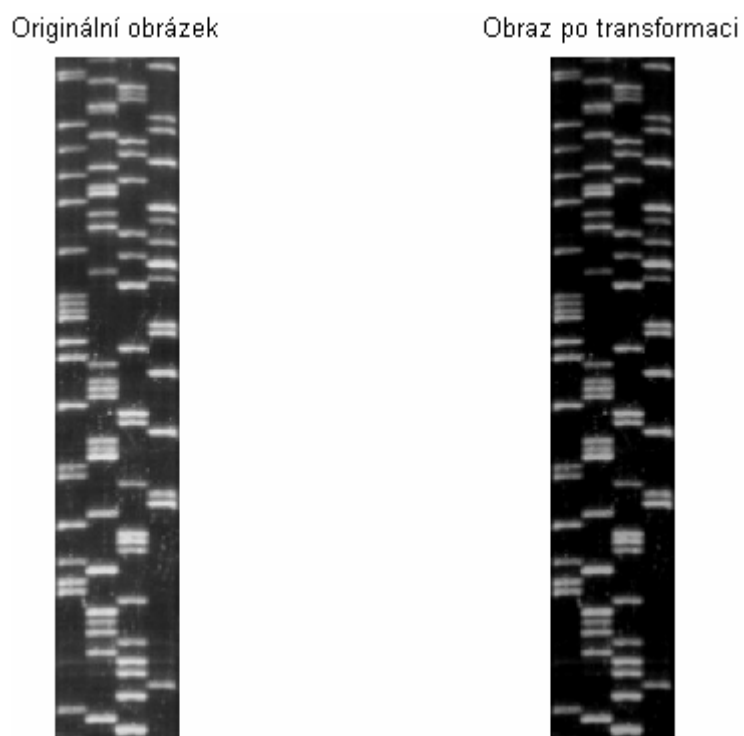
6.1.2. Transformace obrazu

Následující úprava je transformace obrazu. Tato metoda byla naprogramována jako samostatný skript a je volán pomocí příkazu, který je vidět na obr.: 20.

```
upr=transfor_obraz(upr);
```

Obr.: 20 Příkaz pro volání skriptu

Skript načte obrázek, zjistí jeho parametry – šířku, výšku, maximální a minimální hodnotu, která je v obraze. Hodnoty dosadí do vzorce (7) a přepočítá hodnotu každého pixelu na nahradí ji. Výsledek lze vidět na obr.: 12, kde je zobrazen originální a transformovaný obraz včetně příslušných histogramů, nebo na obr.: 21.

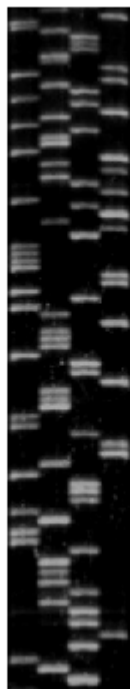


Obr.: 21 Elektroforetogram před a po transformaci obrazu

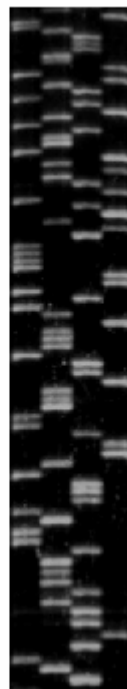
6.1.3. Mediánová filtrace

Dalším krokem v úpravě elektroforetogramu je mediánová filtrace, která má za úkol odstranit nežádoucí šum v obraze. Obr.: 22 demonstruje tuto filtrační metodu. Vlevo je vstupní elektroforetogram – po „transformaci kontrastu v obraze“ a vpravo je elektroforetogram po aplikaci mediánového filtru. I tato metoda je naprogramována jako samostatný skript a je volán příkazem – obr.: 23.

Vstupní obraz - po transformaci



Obraz po mediánové filtraci



Obr.: 22 Elektroforetogram před a po mediánové filtraci

```
upr1=filtr_med(upr);
```

Obr.: 23 Příkaz pro volání skriptu

6.1.4. Detekce hran

Detekce hran probíhá pomocí samostatného skriptu, který je zavolán pomocí příkazu – obr.:24. Vstupní obraz již je zpracován pomocí dvou předešlých metod, které jsou: transformace kontrastu v obraze a mediánová filtrace. Detekce hran využívá masku (obr.: 25), která detekuje hrany pouze kolmé na osu y.

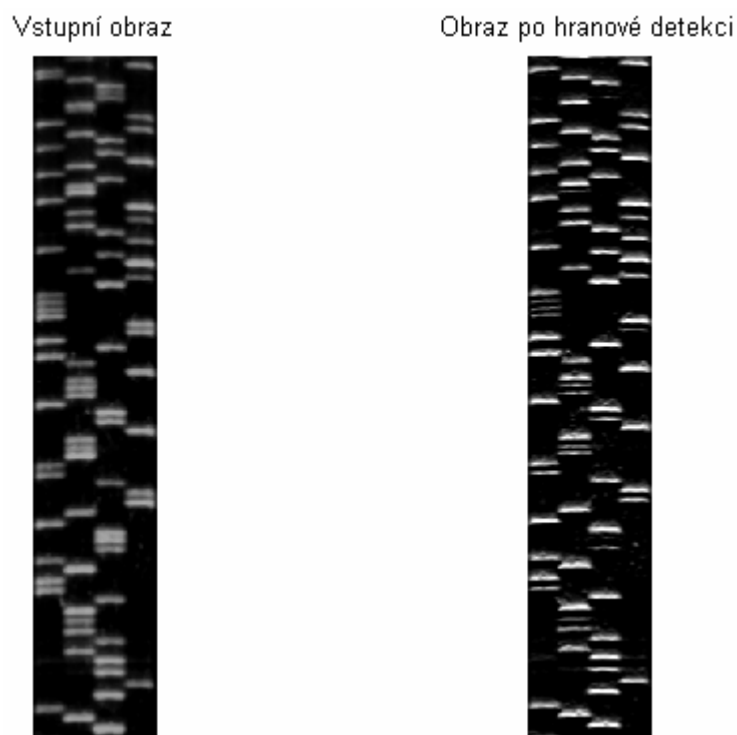
```
upr=detek_hran(upr1);
```

Obr.: 24 Příkaz pro volání skriptu

$$\begin{pmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{pmatrix}$$

Obr.: 25 Maska pro detekci hran

Vstupní obraz nalevo, výstupní po detekci hran napravo – obr.: 26. Na jednotlivých hranách dochází ke zlepšení kontrastu, pro zlepšení ostroty ještě aplikujeme substrakci obrazů.



Obr.: 26 Elektroforetogram před a po hranové detekci

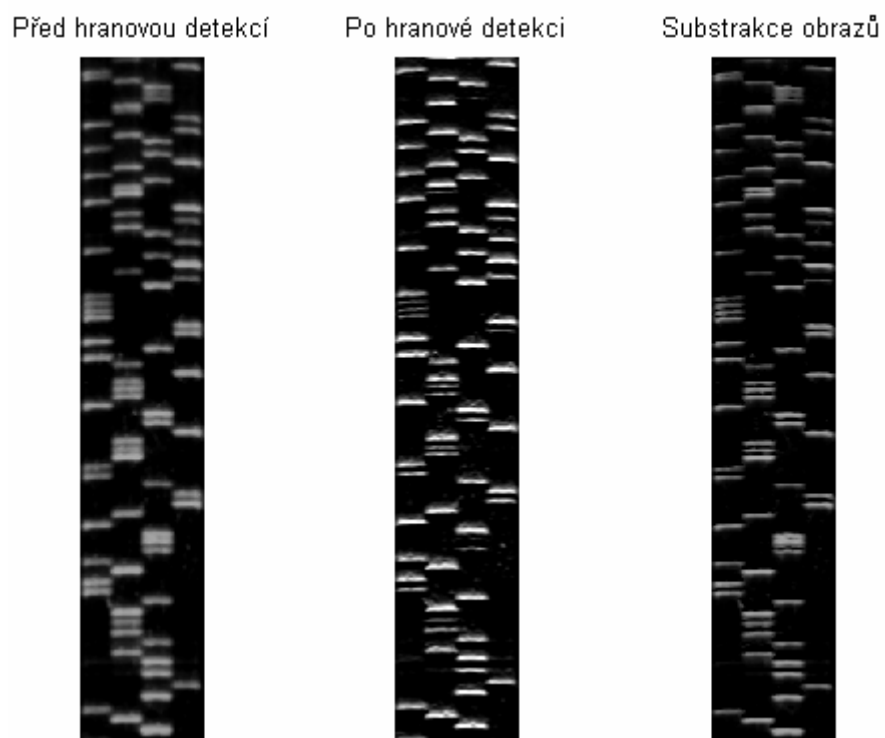
6.1.5. Subtrakce

Hlavně pro přehlednost samotného programu jsou filtrační metody naprogramovány do samotných skriptů a tudíž i tato metoda – subtrakce. Volá se pomocí příkazu – obr.: 27.

```
upr=substr_obr (upr1,upr) ;
```

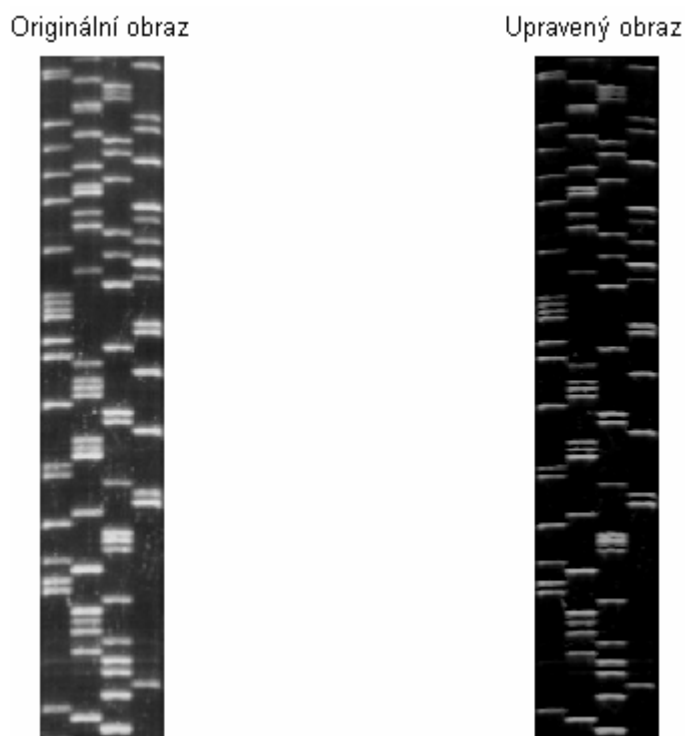
Obr.: 27 Příkaz pro volání skriptu

Subtrakce obrazů je metoda, při níž dochází k „odečtení“ dvou obrazů od sebe. Obraz vlevo na obr.: 28 je před hranovou detekcí a od tohoto elektroforetogramu odečteme prostřední obraz – po hranové detekci. Výsledek subtrakce je vidět vpravo a lze pozorovat především zaostření hran.



Obr.: 28 Subtrakce obrázků (pravého a prostředního, vlevo je výsledný)

Když srovnáme neupravený a upravený elektroforetogram (obr.: 29) po všech aplikovaných metodách, vidíme, že došlo k zostření hran a zlepšení kontrastu.

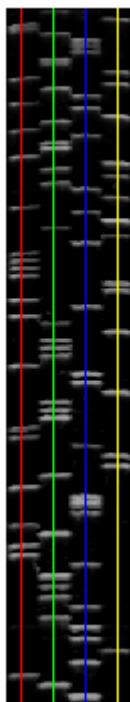


Obr.: 29 Srovnání originálního a upraveného elektroforetogramu

6.2. Detekce sekvence

Druhou částí programu je analýza sekvence z číslicově upraveného obrazu (obr.:30), kterou elektroforetogram demonstruje. Za užitečnou část elektroforetogramu je považováno pouze okolí čtyř barevných čar, jež jsou předem vypočítané (tab. 1). Rozsah výseče určuje *odchylka* od příslušné barevné čáry (8).

Upravený obraz



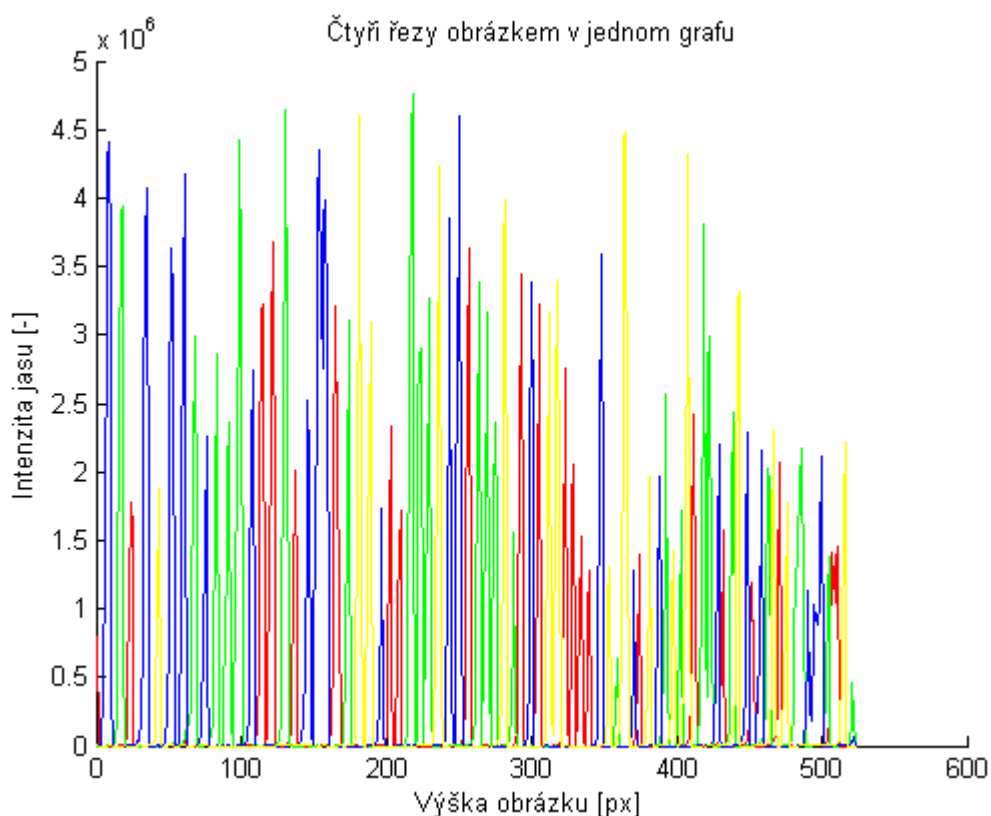
Obr.: 30 Elektroforetogram

Tab. 1 Závislost poměru obrazu a řezu

Řez obrazem	Barva řezu	Kudy je řez veden obrazem
1	Červená	1/8 šířky obrazu
2	Zelená	3/8 šířky obrazu
3	Modrá	5/8 šířky obrazu
4	Žlutá	7/8 šířky obrazu

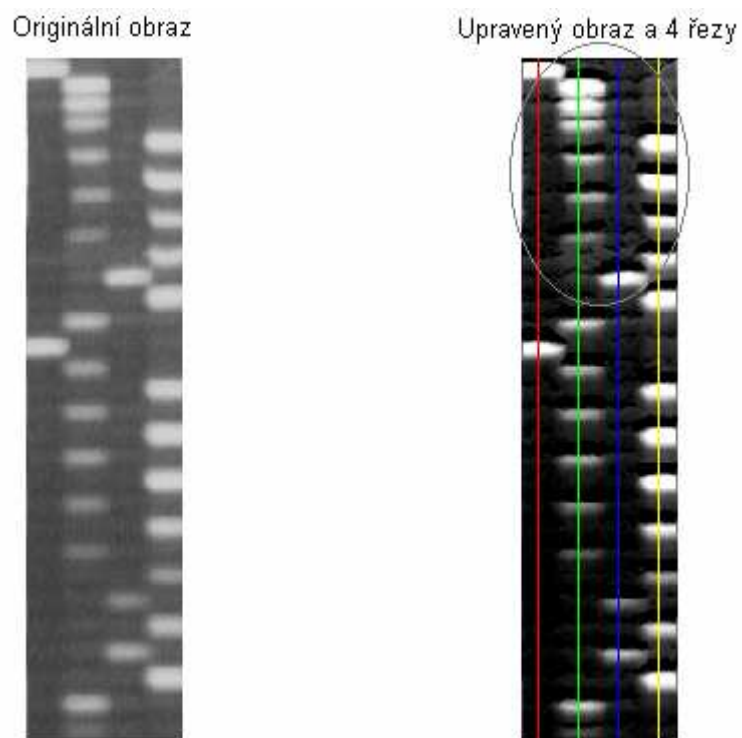
$$odchylka = \frac{1}{16} \cdot sirky \quad obrazku \quad (8)$$

Další krok v detekci je sumace hodnot pixelů jednotlivých řádků ve výseči, tím dostaneme čtyři průběhy, které charakterizují sloupce v elektroforetogramu. Druhá mocnina těchto průběhů je zobrazena na obr.:31. Z tohoto grafu také uživatel definuje *prahovou hodnotu*, díky které určuje co je ještě šum nebo naopak užitečná informace v podobě bílé plochy.

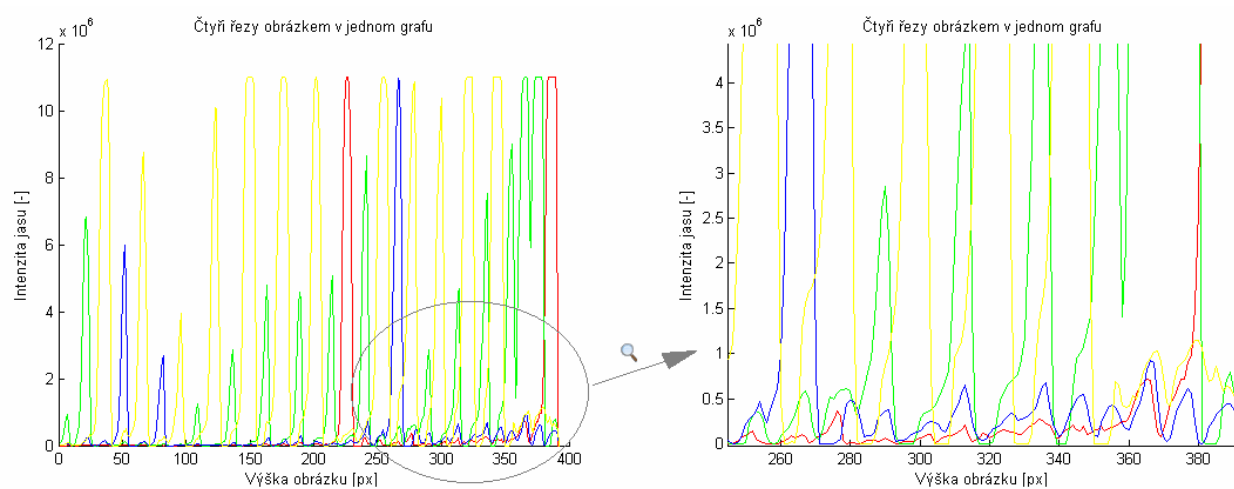


Obr.: 31 Druhá mocnina sumovaných výsečů

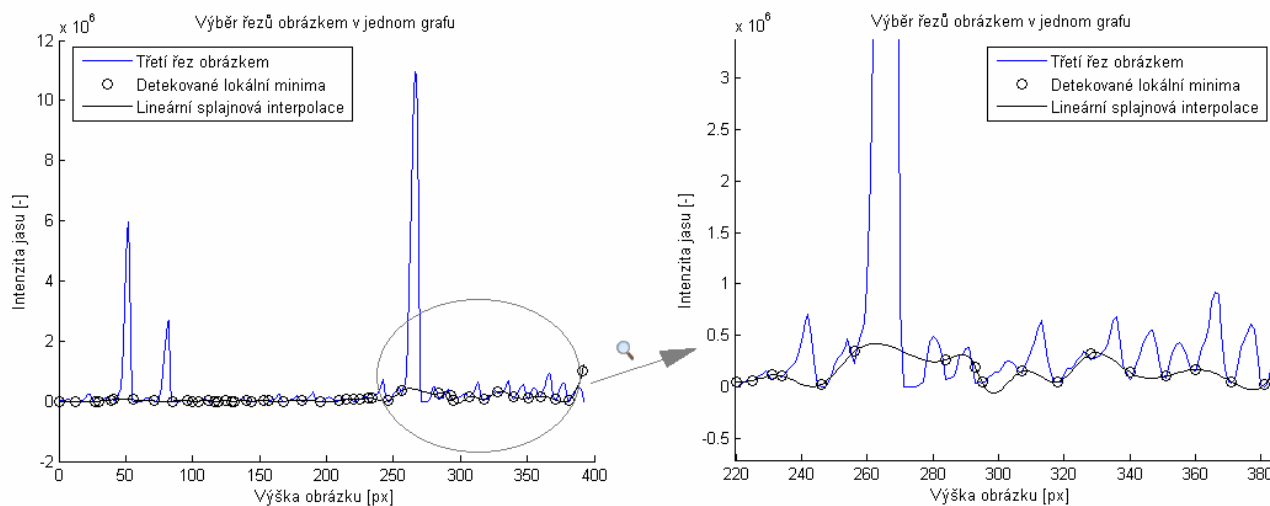
Abychom mohli zjistit, kde se nacházejí lokální maxima a minima, signály jsou zderivovány. Lokální minima jsou hledána kvůli „stejnoseměrné“ složce, jinak definováno – příliš nízké kvalitě černé barvy (obr.: 32). Když jsou nalezena lokální minima pomocí první derivace, tak je použita lineární splajnová interpolace, jež způsobí proložení bodů (lokálních minim) v určité délce (v tomto případě výšce) obrázku. Jednotlivé řezy obrázkem, kde je patrná vysoká nehomogenita černého podkladu, jsou vidět na obr.: 33. Ukázka lineární splajnové interpolace na obr.: 34, pro třetí řez elektroforetogramem.



Obr.: 32 Elektroforetogram, vpravo důležitá oblast



Obr.: 33 Řezy – vlevo celkový pohled; vpravo přiblížení



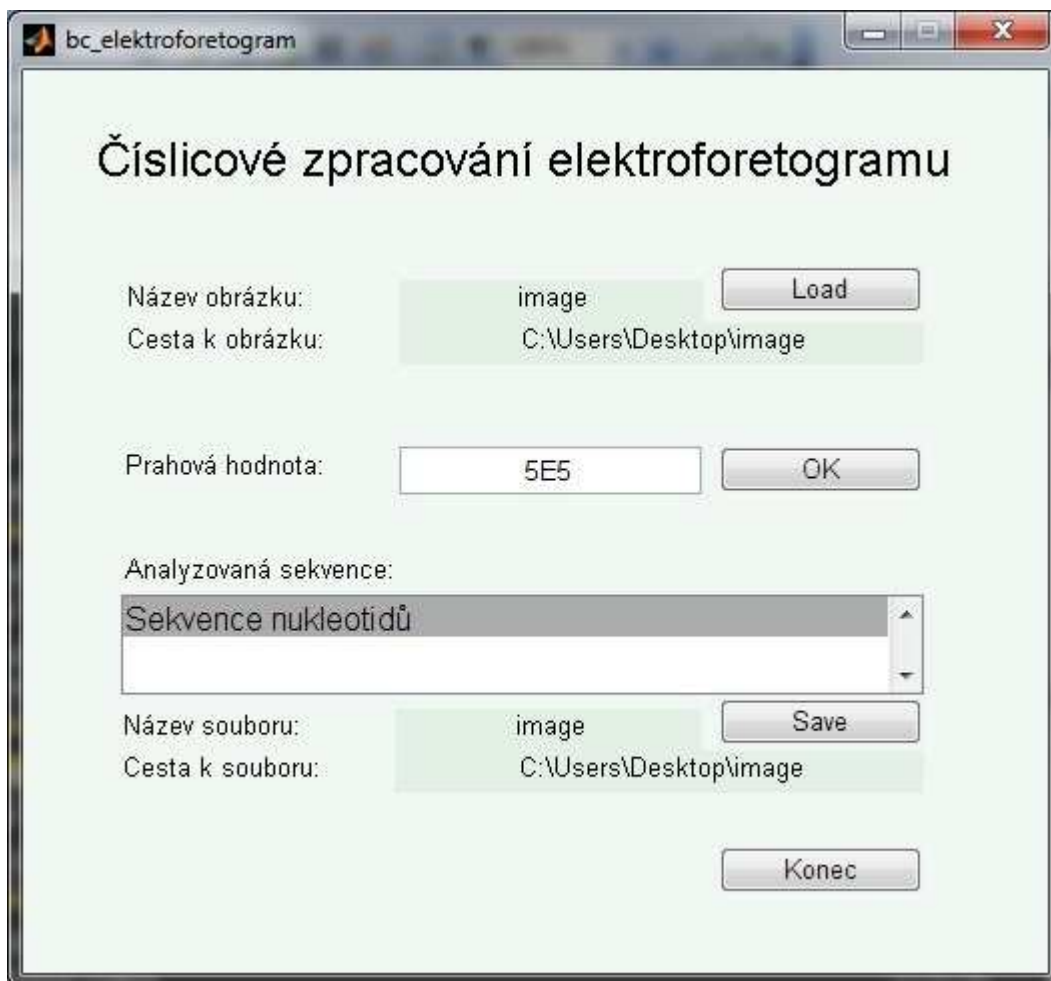
Obr.: 34 Třetí řez – vlevo celkový pohled; vpravo přiblížení

Interpolace splajnem je aplikována kvůli lepší detekci maxim. Uživatel zadá prahovou hodnotu, jež je závazná pro posuzování maxim. Hledání maxim probíhá pomocí derivace, nalezená lokální maxima ještě musí odpovídat podmínce pro prahovou hodnotu. Pokud je prahová hodnota větší než rozdíl mezi splajnovou interpolací a hodnotou píku, pak tento bod je považován za užitečnou informaci a dojde k zaznamenání pozice a řezu, v kterém byl detekován. Po analýze všech čtyř řezů dojde k sloučení a seřazení detekovaných píků podle pozice v elektroforetogramu.

Posledním krokem je přiřazení písmen podle toho, v jakém řezu se pík nacházel. Tím vznikne výsledná sekvence, kterou demonstroval elektroforetogram. Program dále nabízí uložení sekvence nukleotidů do textového dokumentu, ale to je popsáno až v kapitole „Návod k aplikaci“.

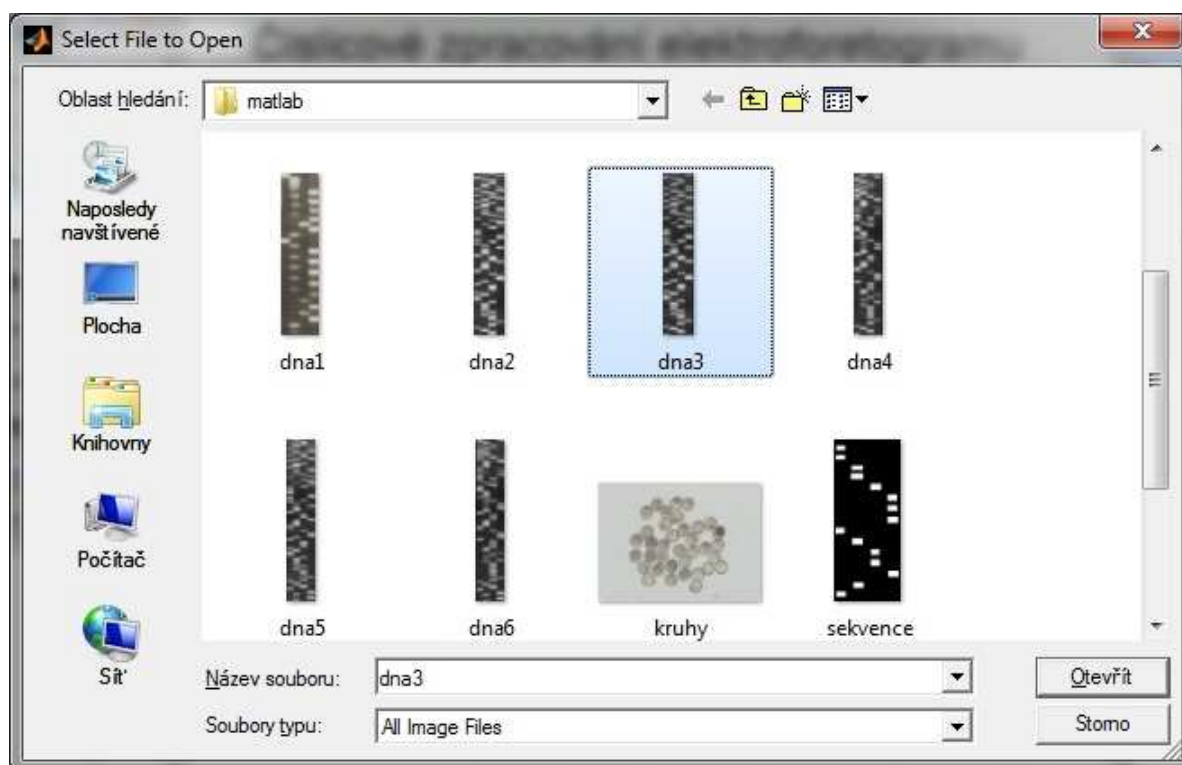
7. Návod k aplikaci

Aplikace je vytvořena v programovém prostředí GUI, které nabízí program Matlab. Po otevření aplikace na “Číslicové zpracování elektroforetogramu” – soubor s názvem “bc_elektroforetogram” se objeví hlavní okno programu (obr.35). Uživatelsky přehledný charakter tohoto vstupního okna umožňuje intuitivní ovládání celého programu.

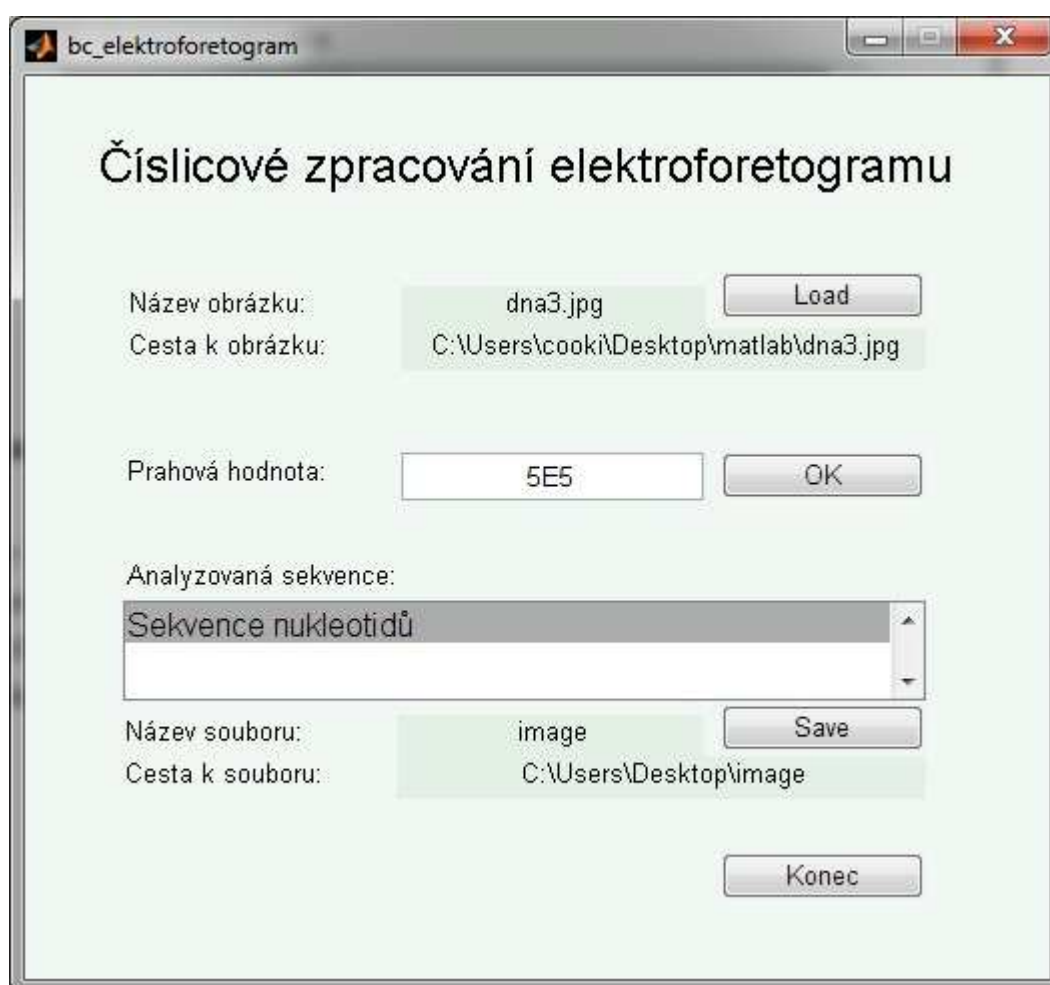


Obr.: 35 Pracovní okno

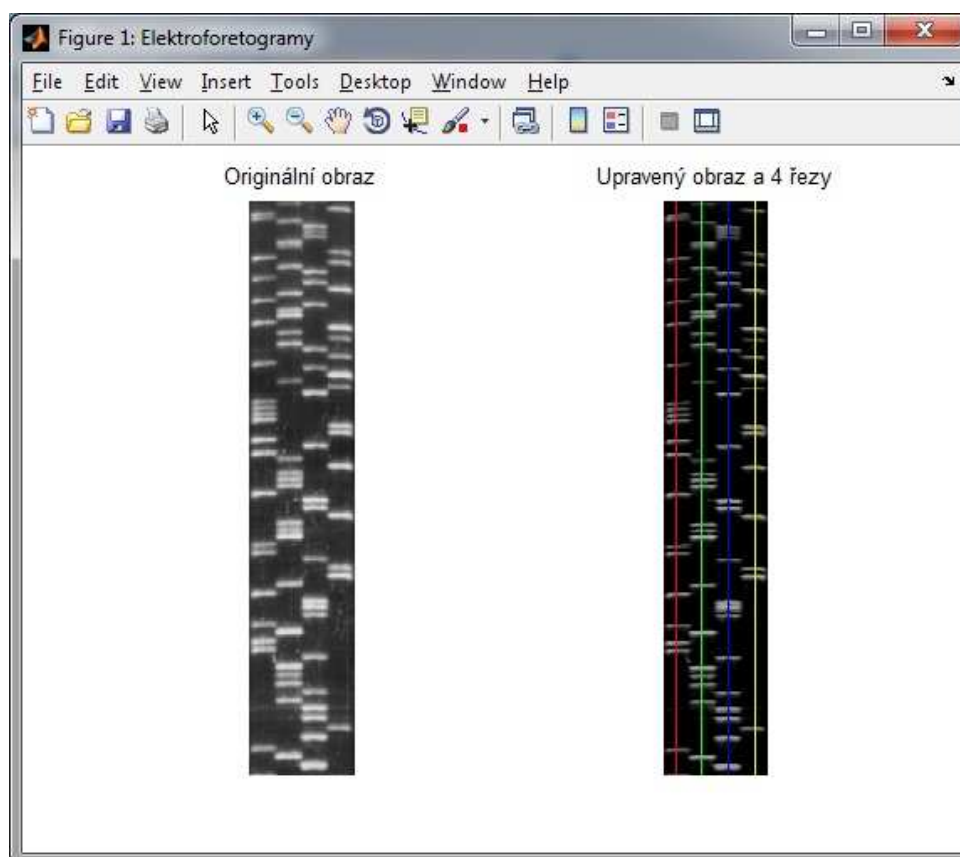
V okně se nachází čtyři tlačítka, přičemž každé má svoji specifickou funkci. Načtení elektroforetogramu je prvním krokem a provádí se kliknutím na tlačítko „Load“ zobrazí “okno pro výběr“ (obr.: 36), kde si uživatel zvolí elektroforetogram, který chce analyzovat. Aplikace následně zadá do okének data, která definují, jaký obrázek zpracovává: „Název obrázku“ a „Cesta k obrázku“ (obr.: 37). Přičemž samotný elektroforetogram je zpracován první částí programu a zobrazí se dvě nové okna. Jedno z nich (obr.: 38) zobrazuje elektroforetogram před a po číslicovém zpracování a druhé okno (obr.: 39) je graf průběhů jednotlivými řezy elektroforetogramem.



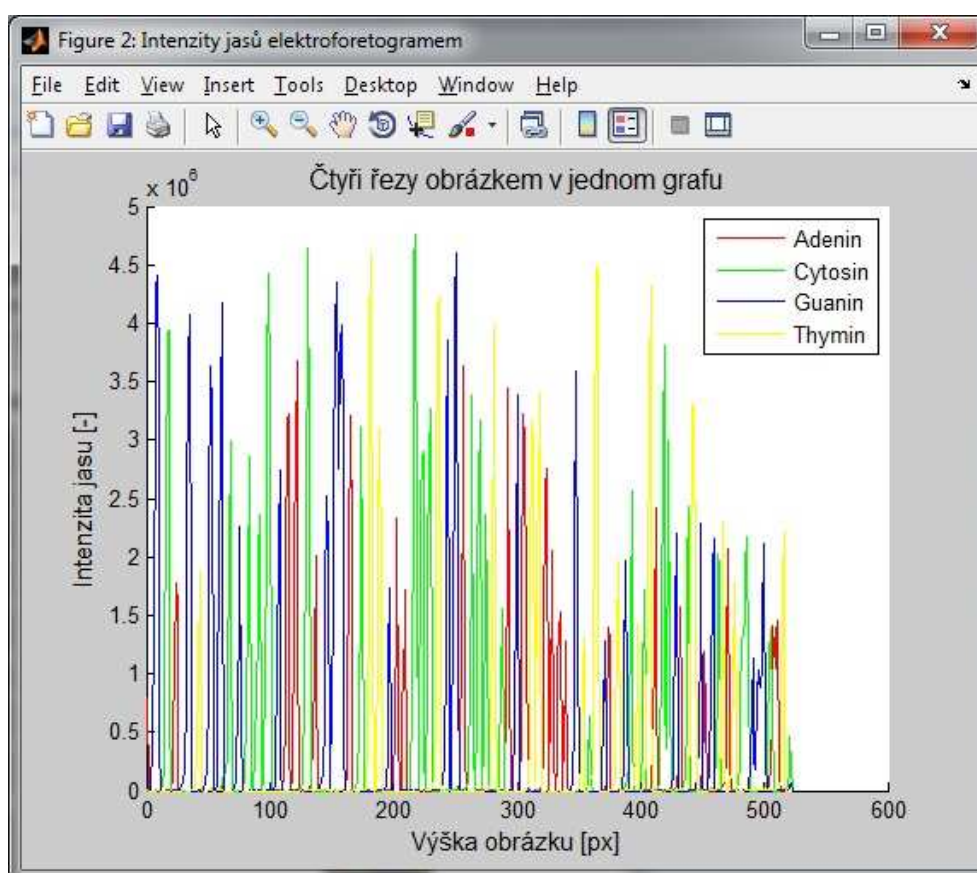
Obr.: 36 Okno pro výběr



Obr.: 37 Pracovní okno



Obr.: 38 Elektroforetogramy



Obr.: 39 Graf průběhů elektroforetogramem

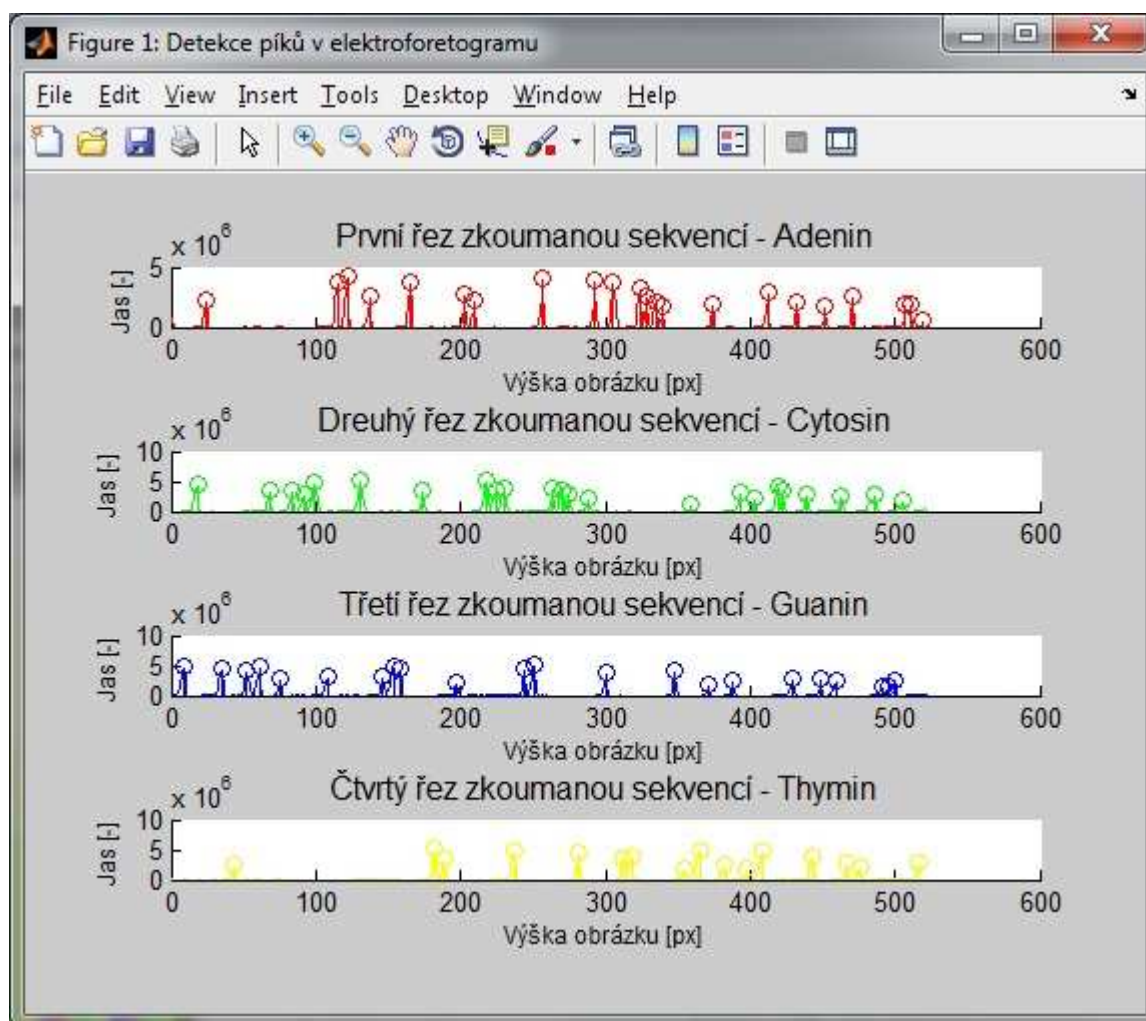
Pro uživatele je tento graf (obr.: 39) důležitý, jelikož pomocí těchto průběhů rozhodne o *prahové hodnotě*, která určuje, co ještě je užitečný pík nebo naopak. Prahovou hodnotu zadá do “pracovního okna” – okénko “Prahová hodnota”. Po zadání prahu a stisknutí tlačítka “OK” dojde k analyzování sekvence podle zvoleného prahu.

Sekvence se vypíše v okénku s názvem: “Analyzovaná sekvence” (obr.: 40) a zobrazí se také graf (obr.: 41), který zobrazuje jednotlivé řazy elektroforetogramem - průběhy a pozitivní detekce je naznačena kroužkem nad příslušným píkem (obr.: 41).

The screenshot shows a software window titled "bc_elektroforetogram". The main heading is "Číslicové zpracování elektroforetogramu". The interface includes several input fields and buttons:

- Název obrázku:** dna3.jpg (with a "Load" button)
- Cesta k obrázku:** C:\Users\cooki\Desktop\matlab\dna3.jpg
- Prahová hodnota:** 5E5 (with an "OK" button)
- Analyzovaná sekvence:** A text box containing the sequence "ACTTGAACCCTGGACCCTCAGATTAAAAGTCTGAT".
- Název souboru:** image (with a "Save" button)
- Cesta k souboru:** C:\Users\Desktop\image
- A "Konec" (End) button at the bottom right.

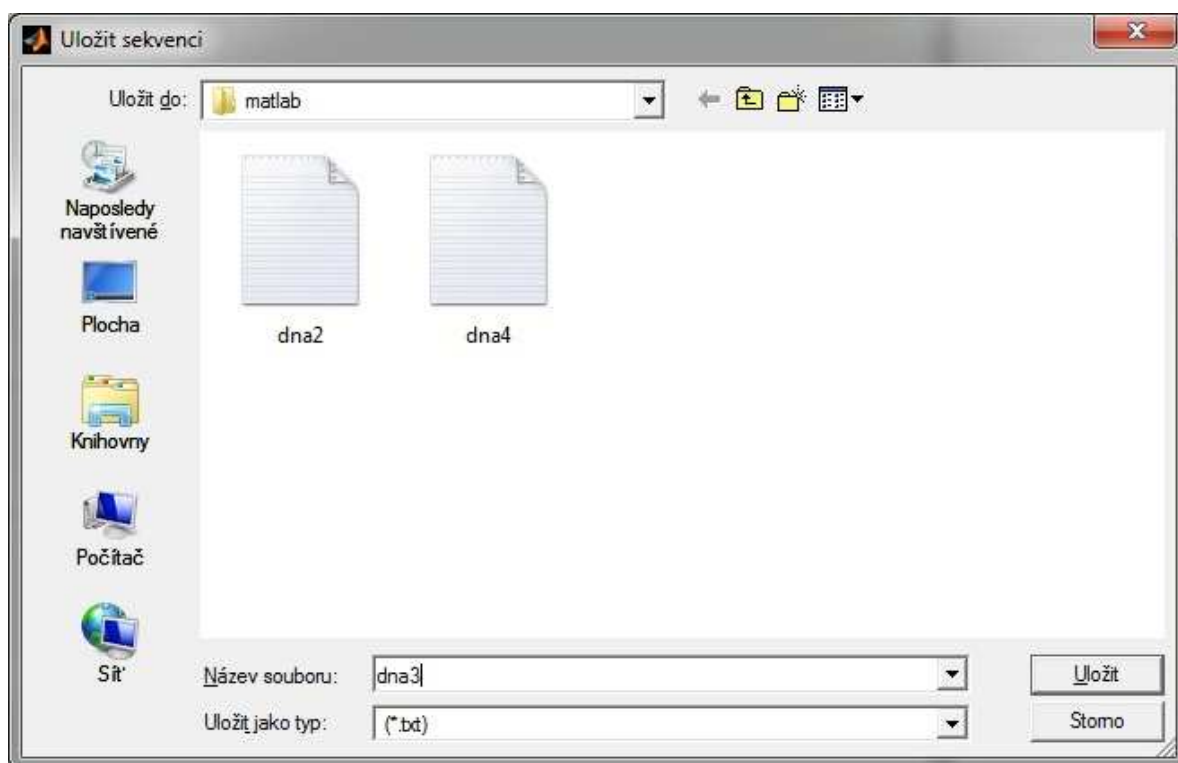
Obr.: 40 Pracovní okno – vypsání sekvence



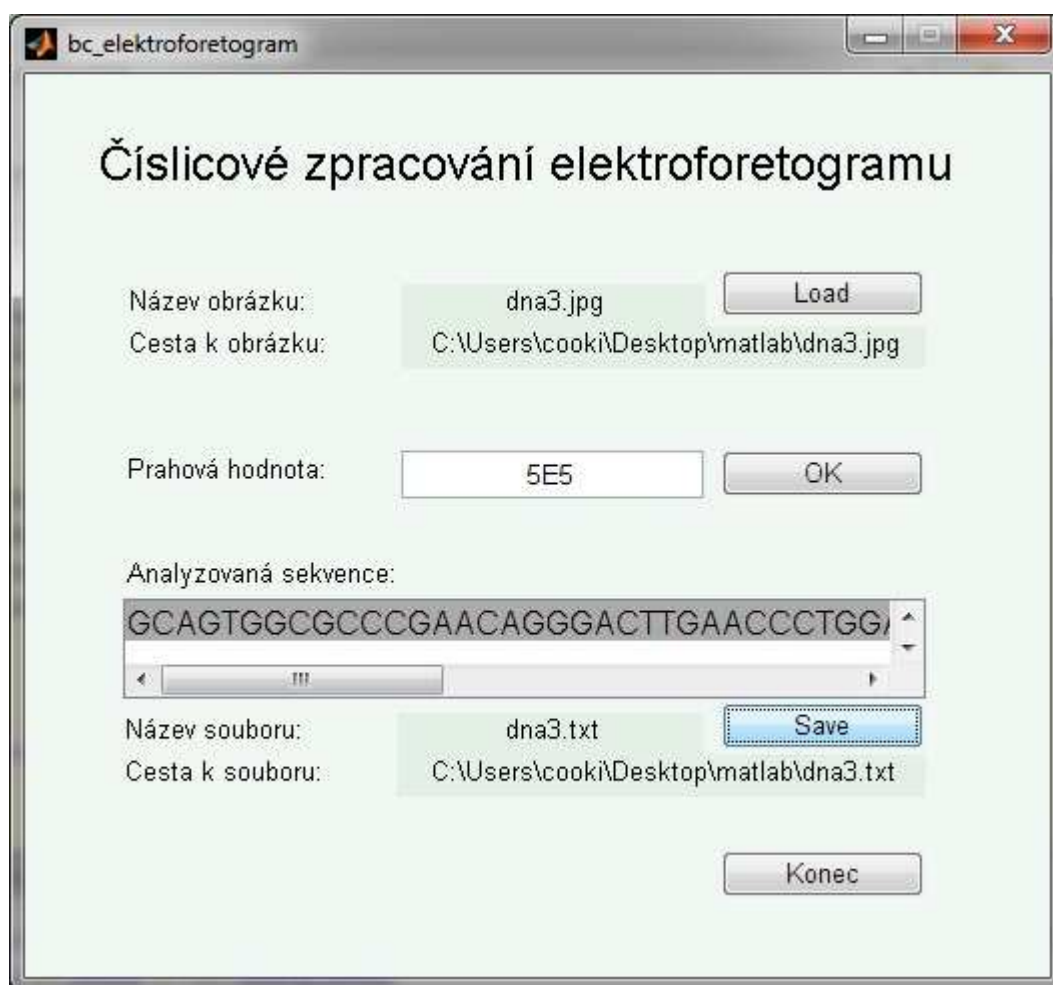
Obr.: 41 Detekování píků

Detekovanou sekvenci, která je zobrazena v okénku “Analyzovaná sekvence“, lze uložit pomocí tlačítka “Save“. Po kliknutí na toto tlačítko dojde k zobrazení “Okno pro výběr“ (obr.: 42), v tomto případě pro výběr kam sekvenci uložit. Uživatel zadá název, nebo nechá předdefinovaný název – stejný jako název obrázku. Po potvrzení dojde k vytvoření popřípadě přepsání textového souboru s příslušným názvem a sekvence se do tohoto souboru uloží. V pracovním okně se vyplní kolonky “Cesta k souboru“ a název souboru (obr.: 43).

Čtvrté poslední tlačítko s názvem “Konec“ způsobí uzavření pracovního okna.



Obr.: 42 Okno pro výběr



Obr.: 43 Pracovní okno

7.1. Kompatibilita aplikace

Aplikace byla naprogramována v programu Matlab. Použitá verze je MATLAB R2008a.

8. Závěr

Využití této jednoduché metody je obrovské. Zefektivnění zpracování ve prospěch uživatele je vítanou změnou. Rychlejší a méně finančně náročnou detekci ocení každý, kdo s elektroforézou pracuje.

Mým hlavním záměrem bylo vás seznámit s principem elektroforetických metod a jejich využitím nejen v současné době, ale poukázat na plánované využití na vědecké scéně v blízké budoucnosti.

Nedílnou částí mé práce je i program, který číselně zpracovává a následně provádí analýzu sekvence z elektroforetogramu dle uživatelem zadaného prahu. K programu jsem vytvořil grafické prostředí pro jednodušší používání a orientaci uživatele. K aplikaci jsem také sepsal uživatelský návod.

Číselné zpracování provádím pomocí různých filtrů, přičemž čtyři z nich jsou naprogramovány jako samostatné skripty:

- Transformace kontrastu v obraze
- Mediánový filtr
- Hranová detekce
- Subtrakce obrázků

Druhým krokem je detekce sekvence. V této problematice využívám poznatky o derivaci, lineární splajnové interpolaci a díky tomu dochází k spolehlivé detekci.

Program jsem odzkoušel na skutečných Sangerových obrázcích. Byla odstraněna značná část nežádoucích informací, tudíž došlo k zlepšení kontrastu a ostrosti. Takto byl proveden první krok k úspěšné detekci. Program následně provede detekci dle zadané prahové hodnoty a pokud uživatel zadá vhodnou prahovou hodnotu, tak dojde k úspěšné analýze sekvence a její vypsání do textové formy.

Program analyzuje Sangerovy obrázky s velmi dobrým výsledkem v závislosti na vhodně zadaném prahu. Aplikace dále umožňuje uložení sekvence do textového souboru na místo, které uživatel zadá.

9. Seznam použitých zdrojů

- [1] *Www.biochemie.sweb.cz* [online] *Elektroforéza* [cit. 17.11.2010] Dostupné z WWW:
< <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm#gel> >
- [2] *Www.vscht.cz* [online] *VŠCHT - Vysoká škola Chemicko-Technologická v Praze* [cit. 12.12.2010] Dostupné z WWW:
< http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf >
- [3] <http://bart.chemi.muni.cz/> [online] *Jan Preisler Page* [cit. 15.12.2010] Dostupné z WWW:
< <http://bart.chemi.muni.cz/courses/Lab%20Cv%20CELIF%202006%20CZ.pdf> >
- [4] <http://mat.skola-biotechnologie.cz/> [online] [cit. 22.2.2010] Dostupné z WWW:
< http://mat.skola-biotechnologie.cz/2007/VIII.workshop/Lecture_5a6.ppt >
- [5] VÁCLAV PROSSER A KOLEKTIV Experimentální metody biofyziy. Vydala Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1989. 716 stran. ISBN 80-200-0059-3.
- [6] *www.wikiskripta.eu* [online] *Home – WikiSkripta* [cit. 13.4.2010] Dostupné z WWW:
< <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektrofor%C3%A9za> >
- [7] <http://apendix.bf.jcu.cz/> [online] *.: Department of molecular biology .:* [cit. 17.11.2010] Dostupné z WWW:
< http://apendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio2_soubory/image003.jpg >
- [8] *Www.verkon.cz* [online] *Laboratorní chemikálie, laboratorní sklo, laboratorní sklo/VECTOR* [cit. 17.11.2010] Dostupné z WWW:
< <http://www.verkon.cz/data/catalog/big/img1868.jpg> >
- [9] Zleva: *Www.sites.google.com/a/luther.edu/genetics/* [online] *Genetics* [cit. 17.11.2010] Dostupné z WWW: < http://www.biologyreference.com/images/biol_02_img0140.jpg >

Uprostřed: *Www.invitrogen.com/site/us/en/home.html* [online] *Invitrogen by Life Technologies* [cit. 17.11.2010] Dostupné z WWW:
< <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/gallery/low/g000462.jpg> >

Zprava: *Www.musee-afrappier.qc.ca/en/index.php?pageid=1002* [online] *Copyrigts* [cit. 17.11.2010] Dostupné z WWW: < <http://www.musee-afrappier.qc.ca/images/site/large/gel-agarose-adn-nicole-catellier.jpg> >
- [10] *www.labtestsonline.cz* [online] *Labtest* [cit. 10.2.2010] Dostupné z WWW:
< <http://www.labtestsonline.cz/tests/Electrophoresis.html?tab=3> >
- [11] *www.labtestsonline.cz* [online] *Labtes* [cit. 10.2.2010] Dostupné z WWW:
< <http://www.labtestsonline.cz/static/template/test.prn.aspx?idcontent=625> >
- [12] *www.wikiskripta.eu* [online] *Home – WikiSkripta* [cit. 10.2.2010] Dostupné z WWW:
< <http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/3/3c/Elektrofor%C3%A9za.jpg/300px->

Elektrofor%C3%A9za.jpg >

- [13] *www.webmd.com* [online] *WebMD - Better information. Better health.* [cit. 22.2.2010]
Dostupné z WWW: < <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/hemoglobin-electrophoresis>>
- [14] *www.medicinenet.com* [online] *MedicineNet - Health and Medical Information Produced by Doctors* [cit. 22.2.2010] Dostupné z WWW:
< <http://www.medicinenet.com/hemoglobin/article.htm>>
- [15] *www.annualreviews.org* [online] *Annual Reviews – Home* [cit. 8.2.2010] Dostupné z WWW:
< <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.fluid.38.050304.092053?journalCode=fluid> >
- [16] <http://placek.lukas.sweb.cz/> [online] *About me* [cit. 12.12.2010] Dostupné z WWW:
< http://placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CE.pdf >
- [17] *www.lekopis.cz* [online] *Český lékopis 97* [cit. 8.2.2010] Dostupné z WWW:
< http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm >
- [18] *www.beckmancoulter.com* [online] *Beckman Coulter Home* [cit. 24.2.2010] Dostupné z WWW: < http://www.celeader.com/genfiles/CELeadercomCapi_30154142.asp >
- [19] *wapedia.mobi* [online] *Wapedia* [cit. 8.2.2010] Dostupné z WWW:
< http://wapedia.mobi/en/DNA_sequencing >
- [20] *Www.wikipedia.cz* [online] *Frederick Sanger* [cit. 16.11.2010] Dostupné z WWW:
< http://cs.wikipedia.org/wiki/Frederick_Sanger >
- [21] *Www.wikipedia.cz* [online] *Sekvenování DNA* [cit. 15.11.2010] Dostupné z WWW:
< http://cs.wikipedia.org/wiki/Sekvenov%C3%A1n%C3%AD_DNA#Sangerova_metoda >
- [22] *Www.mhhe.com* [online] *Welcome to MHHE* [cit. 17.11.2010] Dostupné z WWW:
< http://www.mhhe.com/biosci/esp/2001_gbio/folder_structure/ge/m4/s1/assets/images/gem4s1_1.jpg >
- [23] <http://apendix.bf.jcu.cz/> [online] *.: Department of molecular biology .:* [cit. 17.11.2010]
Dostupné z WWW:
< http://apendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio2_soubory/image001.jpg >
- [24] <http://apendix.bf.jcu.cz/> [online] *.: Department of molecular biology .:* [cit. 17.11.2010]
Dostupné z WWW:
< http://apendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio2_soubory/image002.jpg >
- [25] *Www.navajo.cz* [online] *Encyklopedie Navajo* [cit. 28.11.2010] Dostupné z WWW:
< <http://dna.navajo.cz> >
- [26] *Www.osel.cz* [online] *.: OSEL.CZ .:* [cit. 28.11.2010] Dostupné z WWW:
< <http://www.osel.cz/index.php?clanek=246> >

- [27] *Www. genetika.wz.cz* [online] *Genetika - Základy genetiky, dědičnosti a evoluce* [cit. 30.11.2010] Dostupné z WWW: < <http://genetika.wz.cz/mapovani.htm> >
- [28] *Www. ihned.cz* [online] *iHNed.cz : Zpravodajský server Hospodářských novin* [cit. 30.11.2010] Dostupné z WWW: < <http://digiweb.ihned.cz/c1-44534680-zmapovani-genomu-cloveka-meni-medicinu>>
- [29] *Www.p-test.cz* [online] *Anonymní testy otcovství – test DNA* [cit. 30.11.2010] Dostupné z WWW: < <http://www.p-test.cz/o-testech-otcovstvi-princip-dna-testu/> >
- [30] *Www. ihned.cz* [online] *iHNed.cz : Zpravodajský server Hospodářských novin* [cit. 3.12.2010] Dostupné z WWW: < <http://digiweb.ihned.cz/veda-a-vyzkum/c1-43696580-geneticka-revoluce-americti-vedci-tvrdi-ze-se-jim-podarilo-vytvorit-umely-zivot> > a < <http://digiweb.ihned.cz/c1-43790190-sedmy-den-stvoreni/> >
- [31] JAN J. Číslicová filtrace, analýza a restaurace signálů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2002. 427 stran. ISBN 80-214-1558-4.
- [32] <http://e-learning.tul.cz> [online] *E-learning* [cit. 16.2.2010] Dostupné z WWW: < http://e-learning.tul.cz/cgi-bin/elearning/elearning.fcgi?ID_tema=67&ID_obsah=1183&stranka=publ_tema&akce=polozka_vstup>
- [33] www.geogr.muni.cz [online] *Úvodní stránka / Geografický ústav* [cit. 23.12.2010] Dostupné z WWW: < http://www.geogr.muni.cz/archiv/vyuka/DPZ_CVICENI/Texty/DZO_04_zvyrazneni_1.pdf >
- [34] <http://e-learning.tul.cz> [online] *E-learning* [cit. 22.2.2010] Dostupné z WWW: < http://e-learning.tul.cz/cgi-bin/elearning/elearning.fcgi?ID_tema=67&ID_obsah=1134&stranka=publ_tema&akce=polozka_vstup>

10. Příloha: Zdrojový kód programu

10.1. *bc_elektroforetogram*

```
function varargout = bc_elektroforetogram(varargin)
% BC_ELEKTROFORETOGRAM M-file for bc_elektroforetogram.fig
%     BC_ELEKTROFORETOGRAM, by itself, creates a new BC_ELEKTROFORETOGRAM or
%     raises the existing
%     singleton*.
%
%     H = BC_ELEKTROFORETOGRAM returns the handle to a new BC_ELEKTROFORETOGRAM
%     or the handle to
%     the existing singleton*.
%
%     BC_ELEKTROFORETOGRAM('CALLBACK',hObject,eventData,handles,...) calls the
%     local
%     function named CALLBACK in BC_ELEKTROFORETOGRAM.M with the given input
%     arguments.
%
%     BC_ELEKTROFORETOGRAM('Property','Value',...) creates a new
%     BC_ELEKTROFORETOGRAM or raises the
%     existing singleton*. Starting from the left, property value pairs are
%     applied to the GUI before bc_elektroforetogram_OpeningFcn gets called.
%     An
%     unrecognized property name or invalid value makes property application
%     stop. All inputs are passed to bc_elektroforetogram_OpeningFcn via va-
%     rargin.
%
%     *See GUI Options on GUIDE's Tools menu. Choose "GUI allows only one
%     instance to run (singleton)".
%
% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES

% Edit the above text to modify the response to help bc_elektroforetogram

% Last Modified by GUIDE v2.5 11-May-2011 11:30:51

% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',       mfilename, ...
                  'gui_Singleton',   gui_Singleton, ...
                  'gui_OpeningFcn', @bc_elektroforetogram_OpeningFcn, ...
                  'gui_OutputFcn',  @bc_elektroforetogram_OutputFcn, ...
                  'gui_LayoutFcn',  [], ...
                  'gui_Callback',    []);
if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end

if nargout
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% End initialization code - DO NOT EDIT

% --- Executes just before bc_elektroforetogram is made visible.
```

```

function bc_elektroforetogram_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)
% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject      handle to figure
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
% varargin     command line arguments to bc_elektroforetogram (see VARARGIN)

% Choose default command line output for bc_elektroforetogram
handles.output = hObject;

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% UIWAIT makes bc_elektroforetogram wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);

% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = bc_elektroforetogram_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
% varargout    cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject      handle to figure
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;

% --- Executes on button press in pbLoad.
function pbLoad_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to pbLoad (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
clear global
clc
sekvence=[];
global FileName PathName sekvence
sekvence_nukleotidu=('Sekvence nukleotidu');

[FileName,PathName]=uigetfile({'...
    '*.bmp;*.dib;*.jpg;*.jpeg;*.jpe;*.jfif;*.gif;*.tif;*.tiff;*.png','All Image
Files';...
    '*.*','All Files'});

if length(FileName)==1 && length(PathName)==1
    FileName=('image');
    PathName=('C:\Users\Desktop\');
    filenameSave=('image.txt');
    pathnameSave=('C:\Users\Desktop\');

    set(handles.txtNazev,'String',FileName);
    set(handles.txtCesta,'String',[PathName,FileName]);
    set(handles.txtSeq,'String',sekvence_nukleotidu);
    set(handles.txtSouborNazev,'String',filenameSave);
    set(handles.txtSouborCesta,'String',[pathnameSave,filenameSave]);
else
    set(handles.txtNazev,'String',FileName);
    set(handles.txtCesta,'String',[PathName,FileName]);
    set(handles.txtSeq,'String',sekvence_nukleotidu);
    filenameSave=('image.txt');
    pathnameSave=('C:\Users\Desktop\');

```

```

set(handles.txtSouborNazev,'String',filenameSave);
set(handles.txtSouborCesta,'String',[pathnameSave,filenameSave]);

%% vlastní program
% pro úpravu obraz včetně vykreslení originálního a upraveného
% elektroforetogramu
global original obraz pismeno_1 pismeno_2 pismeno_3 pismeno_4

original=imread([PathName,FileName]);
obraz=rgb2gray(original);

pismeno_1='A';
pismeno_2='C';
pismeno_3='G';
pismeno_4='T';

%%
hod1=mean(obraz);
hod=mean(hod1);

upr = imsubtract(obraz,hod*2/3);

% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Subtrakce obrazu');
%% transformace kontrastu v obrazu
upr=transfor_obraz(upr);

% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Transformace obrazu');
%% medianová filtrace
upr1=filtr_med(upr);

% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Po medianové filtraci');
%% hranová detekce
upr=detek_hran(upr1);

% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Po hranové detekci');
%% substrakce dvou obrazů
upr=substr_obr(upr1,upr);

% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Subtrakce obrazů')
%% vykreslení upraveného obrazu + 4 čáry
[vyska sirka]=size(upr);

```

```

% vypočítání řezů obrázkem
sloupec1=round(sirka/8);
sloupec2=round(3*sirka/8);
sloupec3=round(5*sirka/8);
sloupec4=round(7*sirka/8);
%% originální obrázek a upravený elektroforetogram

figure('Name', 'Elektroforetogramy')
subplot(1,2,1)
hold on
imshow(obraz)
axis off
axis image
title('Originální obraz');

subplot(1,2,2)
imshow(upr)
axis image
line(sloupec1,1:vyska,'Color',[1 0 0]) % červená
line(sloupec2,1:vyska,'Color',[0 1 0]) % zelená
line(sloupec3,1:vyska,'Color',[0 0 1]) % modrá
line(sloupec4,1:vyska,'Color',[1 1 0]) % žlutá
title('Upravený obraz a 4 řezy');
set(gcf,'Color',[1,1,1])
hold off
%% analýza sekvence

odchylka=round(sloupec1/2); % odchylka od každého řezu (+/- sloupec)

upraveny_obr=upr;

%% pseudo"kumulace"
% vložení součtu (+/- odchylka od sloupce) příslušného sloupce v
% příslušném řádku do proměnné sum_rez
sum_rez=[];
pom1=[];
for o=1:vyska
    sum_rez(1,o)=sum(upraveny_obr(o,(sloupec1-
odchylka):(sloupec1+odchylka)));
    pom1(1,o)=mean(upraveny_obr(o,(sloupec1-odchylka):(sloupec1+odchylka)));
    upraveny_obr(o,(sloupec1-odchylka):(sloupec1+odchylka))=pom1(1,o);

    sum_rez(2,o)=sum(upraveny_obr(o,(sloupec2-
odchylka):(sloupec2+odchylka)));
    pom1(2,o)=mean(upraveny_obr(o,(sloupec2-odchylka):(sloupec2+odchylka)));
    upraveny_obr(o,(sloupec2-odchylka):(sloupec2+odchylka))=pom1(2,o);

    sum_rez(3,o)=sum(upraveny_obr(o,(sloupec3-
odchylka):(sloupec3+odchylka)));
    pom1(3,o)=mean(upraveny_obr(o,(sloupec3-odchylka):(sloupec3+odchylka)));
    upraveny_obr(o,(sloupec3-odchylka):(sloupec3+odchylka))=pom1(3,o);

    sum_rez(4,o)=sum(upraveny_obr(o,(sloupec4-
odchylka):(sloupec4+odchylka)));
    pom1(4,o)=mean(upraveny_obr(o,(sloupec4-odchylka):(sloupec4+odchylka)));
    upraveny_obr(o,(sloupec4-odchylka):(sloupec4+odchylka))=pom1(4,o);
end

% figure,
% imshow(upraveny_obr)

```

```

% axis off
% axis image
% title('Po pseudo"kumuaci"');

%% převrácení hodnot v sum_rez
% analýza elektroforetogramu probíhá od spodu a matlab indexuje obrazek z
% vrchu
sum_rez_in=[];
for k1=1:4
    for k=1:1:vyska
        sum_rez_in(k1,k)=sum_rez(k1,vyska+1-k);
    end
end

%% derivace sečtených řezů
global diff_sum

for k4=1:4
    diff_sum(k4,:)=diff(sum_rez_in(k4,:));
end

%% zadání prahové hodnoty
global sum_rez_in

sum_rez_in=sum_rez_in.^2;          % na druhou (kvůli menšímu rozpětí černé
složky)

figure('Name', 'Intenzity jasu elektroforetogramem')
hold on
plot(sum_rez_in(1,:), 'Color',[1 0 0])    % červená
plot(sum_rez_in(2,:), 'Color',[0 1 0])    % zelená
plot(sum_rez_in(3,:), 'Color',[0 0 1])    % modrá
plot(sum_rez_in(4,:), 'Color',[1 1 0])    % žlutá
title('Čtyři řezy obrázkem v jednom grafu','fontsize',12)
xlabel('Výška obrázku [px]','fontsize',11)
ylabel('Intenzita jasu [-]','fontsize',11)
legend('Adenin','Cytosin','Guanin','Thymin')
hold off
end

% --- Executes on button press in pbOK.
function pbOK_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to pbOK (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
global prah sekvence
prah = str2double(get(handles.edPrah,'String'));

if prah<=0 || isnan(prah)
    errordlg('Musíte zadat kladné číslo','Error');
    clc
    return
else

    global diff_sum sum_rez_in
    global pismeno_1 pismeno_2 pismeno_3 pismeno_4

    %% hledání minim
    % minima hledám kvůli "stejnoseměrné" složce, která následně "posouvá"
    % prahovou hodnotu pro hledání maxim. Minima hledám do určité prahové
    % hodnoty. Pro všechny 4 řezy.

```

```

if length(sum_rez_in)~=0

    n5=2;
    for k2=1:length(diff_sum)-1
        if (diff_sum(1,k2)<0) && (diff_sum(1,k2+1)>=0) &&
sum_rez_in(1,k2)<prah/2
            hod_1(1,n5)=sum_rez_in(1,k2);
            hod_1(2,n5)=k2+1;
            n5=n5+1;
        end
    end
    hod_1(1,end+1)=prah;
    hod_1(2,end)=k2+1;

    n6=2;
    for k3=1:length(diff_sum)-1
        if (diff_sum(2,k3)<0) && (diff_sum(2,k3+1)>=0) &&
sum_rez_in(2,k3)<prah/2
            hod_2(1,n6)=sum_rez_in(2,k3);
            hod_2(2,n6)=k3+1;
            n6=n6+1;
        end
    end
    hod_2(1,end+1)=prah;
    hod_2(2,end)=k3+1;

    n7=2;
    for k4=1:length(diff_sum)-1
        if (diff_sum(3,k4)<0) && (diff_sum(3,k4+1)>=0) &&
sum_rez_in(3,k4)<prah/2
            hod_3(1,n7)=sum_rez_in(3,k4);
            hod_3(2,n7)=k4+1;
            n7=n7+1;
        end
    end
    hod_3(1,end+1)=prah;
    hod_3(2,end)=k4+1;

    n8=2;
    for k5=1:length(diff_sum)-1
        if (diff_sum(4,k5)<0) && (diff_sum(4,k5+1)>=0) &&
sum_rez_in(4,k5)<prah/2
            hod_4(1,n8)=sum_rez_in(4,k5);
            hod_4(2,n8)=k5+1;
            n8=n8+1;
        end
    end
    hod_4(1,end+1)=prah;
    hod_4(2,end)=k5+1;

    % lineární splajnová interpolace "detekovaných" minim - uměle spočtená
    % pseudo-stejnoseměrnou složku
    splin_1 = interp1(hod_1(2,:),hod_1(1,:),1:length(sum_rez_in),'spline');
%'linear'
    splin_2 = interp1(hod_2(2,:),hod_2(1,:),1:length(sum_rez_in),'spline');
%'linear'
    splin_3 = interp1(hod_3(2,:),hod_3(1,:),1:length(sum_rez_in),'spline');
%'linear'
    splin_4 = interp1(hod_4(2,:),hod_4(1,:),1:length(sum_rez_in),'spline');
%'linear'
    %% hledání maxim
    % jestliže přechod první derivace je z kladných do záporných hodnot a

```



```

pík      % příslušný bod je nad prahovou hodnotou pak se tento bod detekuje jako

% v elektroforetogramu.
n1=1;
n2=1;
n3=1;
n4=1;
prah(1,1:4)=prah;

for k6=1:4
    for k5=2:length(diff_sum)-1
        if (diff_sum(k6,k5-1)>0) && (diff_sum(k6,k5)>0) &&
(diff_sum(k6,k5+1)<=0) %
            if k6==1 && sum_rez_in(k6,k5+1)>=prah(k6)+splin_1(k5)
                polohy1(1,n1)=k5+1;
                polohy1(2,n1)=1;
                %
                prah(k6)=0.5*sum_rez_in(k6,k5+1);
                n1=n1+1;
            end
            if k6==2 && sum_rez_in(k6,k5+1)>=prah(k6)+splin_2(k5)
                polohy2(1,n2)=k5+1;
                polohy2(2,n2)=2;
                %
                prah(k6)=0.5*sum_rez_in(k6,k5+1);
                n2=n2+1;
            end
            if k6==3 && sum_rez_in(k6,k5+1)>=prah(k6)+splin_3(k5)
                polohy3(1,n3)=k5+1;
                polohy3(2,n3)=3;
                %
                prah(k6)=0.5*sum_rez_in(k6,k5+1);
                n3=n3+1;
            end
            if k6==4 && sum_rez_in(k6,k5+1)>=prah(k6)+splin_4(k5)
                polohy4(1,n4)=k5+1;
                polohy4(2,n4)=4;
                %
                prah(k6)=0.5*sum_rez_in(k6,k5+1);
                n4=n4+1;
            end
        end
    end
end

%% odstranění těsných detekcí
polohy_1=polohy1(:,1);
for k7=2:length(polohy1(1,:))
    if polohy1(1,k7)-polohy1(1,k7-1)<=2
    else
        polohy_1=[polohy_1 polohy1(:,k7)];
    end
end

polohy_2=polohy2(:,1);
for k8=2:length(polohy2(1,:))
    if polohy2(1,k8)-polohy2(1,k8-1)<=2
    else
        polohy_2=[polohy_2 polohy2(:,k8)];
    end
end

polohy_3=polohy3(:,1);
for k9=2:length(polohy3(1,:))
    if polohy3(1,k9)-polohy3(1,k9-1)<=2
    else

```

```

        polohy_3=[polohy_3 polohy3(:,k9)];
    end
end

polohy_4=polohy4(:,1);
for k10=2:length(polohy4(1,:))
    if polohy4(1,k10)-polohy4(1,k10-1)<=2
    else
        polohy_4=[polohy_4 polohy4(:,k10)];
    end
end

%% vykreslení

figure('Name', 'Detekce píků v elektroforetogramu') % první řez
subplot(4,1,1)
hold on
% obyčejný sesumovaný průběh
line(1:length(sum_rez_in(1,:)),sum_rez_in(1,:), 'Color',[1 0 0]) %
červená
% derivace
% line(1:length(diff_sum(1,:)),diff_sum(1,:), 'Color',[0 0 0]) % čer-
ná
% detekce píků
stem( polohy_1(1,:), sum_rez_in(1,polohy_1(1,:))+prah(1,1), 'Color',[1 0
0])
% červená
% splajnová interpolace
% plot(hod_1(2,:),hod_1(1,:), 'o',1:length(sum_rez_in),splin_1)
title('První řez zkoumanou sekvencí - Adenin','fontsize',12)
xlabel('Výška obrázku [px]','fontsize',9)
ylabel('Jas [-]','fontsize',9)
hold off

% figure, % druhý řez
subplot(4,1,2)
hold on
% obyčejný sesumovaný průběh
line(1:length(sum_rez_in(2,:)),sum_rez_in(2,:), 'Color',[0 1 0]) %
zelená
% derivace
% line(1:length(diff_sum(2,:)),diff_sum(2,:), 'Color',[0 0 0]) % čer-
ná
% detekce píků
stem( polohy_2(1,:), sum_rez_in(2,polohy_2(1,:))+prah(1,2), 'Color',[0 1
0])
% zelená
% splajnová interpolace
% plot(hod_2(2,:),hod_2(1,:), 'o',1:length(sum_rez_in),splin_2)
title('Druhý řez zkoumanou sekvencí - Cytosin','fontsize',12);
xlabel('Výška obrázku [px]','fontsize',9)
ylabel('Jas [-]','fontsize',9)
hold off

% figure, % třetí řez
subplot(4,1,3)
hold on
% obyčejný sesumovaný průběh
line(1:length(sum_rez_in(3,:)),sum_rez_in(3,:), 'Color',[0 0 1]) %
modrá
% derivace
% line(1:length(diff_sum(3,:)),diff_sum(3,:), 'Color',[0 0 0]) % čer-
ná
% detekce píků

```

```

1]) stem( polohy_3(1,:), sum_rez_in(3,polohy_3(1,:))+prah(1,3), 'Color',[0 0
% modrá
% splajnová interpolace
% plot(hod_3(2,:),hod_3(1,:), 'o',1:length(sum_rez_in),splin_3)
title('Třetí řez zkoumanou sekvencí - Guanin', 'fontsize',12);
xlabel('Výška obrázku [px]', 'fontsize',9)
ylabel('Jas [-]', 'fontsize',9)
hold off

% figure, % čtvrtý řez
subplot(4,1,4)
hold on
% obyčejný sesumovaný průběh
% žlutá line(1:length(sum_rez_in(4,:)),sum_rez_in(4,:), 'Color',[1 1 0]) %
% derivace
% ná line(1:length(diff_sum(4,:)),diff_sum(4,:), 'Color',[0 0 0]) % čer-
% detekce píků
0]) stem( polohy_4(1,:), sum_rez_in(4,polohy_4(1,:))+prah(1,4), 'Color',[1 1
% žlutá
% splajnová interpolace
% plot(hod_4(2,:),hod_4(1,:), 'o',1:length(sum_rez_in),splin_4)
title('Čtvrtý řez zkoumanou sekvencí - Thymin', 'fontsize',12);
xlabel('Výška obrázku [px]', 'fontsize',9)
ylabel('Jas [-]', 'fontsize',9)
hold off

%% vložení čtyř detekovaných píků do jednoho
seqw1=polohy_1(1,:);
seqw2=polohy_2(1,:);
seqw3=polohy_3(1,:);
seqw4=polohy_4(1,:);
seqw=[seqw1 seqw2 seqw3 seqw4];

poz1=polohy_1(2,:);
poz2=polohy_2(2,:);
poz3=polohy_3(2,:);
poz4=polohy_4(2,:);

poz=[poz1 poz2 poz3 poz4];

%% seřazení od nejmenšího po největší a odstranění stejných detekcí
c(1,:)=seqw;
c(2,:)=poz;
[serad pozice] = sort(c(1,:));

rozdily = diff(serad);
c = c(:,pozice);

q = [];
for i = 1:length(rozdily)
    if rozdily(i) == 0
        if c(2,i) == c(2,i+1)
            q(end+1) = i;
        end
    end
end
end

c(:,q) = [];
seq=c;

```

```

%% rozkodování sekvece výše vyhovujícím podmínkám
sekvence=[];
for k13=1:length(seq(1,:))
    if seq(2,k13)==1
        sekvence=[sekvence pismeno_1];
    elseif seq(2,k13)==2
        sekvence=[sekvence pismeno_2];
    elseif seq(2,k13)==3
        sekvence=[sekvence pismeno_3];
    elseif seq(2,k13)==4
        sekvence=[sekvence pismeno_4];
    end
end
%% vypsání sekvece
global sekvence
set(handles.txtSeq, 'String', sekvence);
clc

else
    helpdlg('Žádná data ke zpracování. Nejprve načti obrázek', 'Žádná dana');
end

end

% --- Executes on button press in pbSave.
function pbSave_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to pbSave (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
global FileName PathName sekvence

if length(sekvence)~=0

    FileNameetxt=FileName(1:end-4);
    [filenameSave,pathnameSave] = uiputfile([PathName FileNameetxt
    '.txt'],'Uložit sekvenci');

    if length(filenameSave)>1 && length(pathnameSave)>1
        fid = fopen([pathnameSave,filenameSave], 'w');
        fprintf(fid,sekvence);
        fclose(fid);

        set(handles.txtSouborNazev, 'String', filenameSave);
        set(handles.txtSouborCesta, 'String', [pathnameSave,filenameSave]);

    else
        filenameSave=('image.txt');
        pathnameSave=('C:\Users\Desktop\');
        set(handles.txtSouborNazev, 'String', filenameSave);
        set(handles.txtSouborCesta, 'String', [pathnameSave,filenameSave]);
    end

else
    helpdlg('Žádná data k uložení.', 'Žádná dana');
end

% --- Executes on button press in pbKonec.
function pbKonec_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to pbKonec (see GCBO)

```

```

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
helpdlg('Program byl úspěšně ukončen','Ukončení programu');
close(gcf)

function edPrah_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edPrah (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edPrah as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edPrah as a
double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edPrah_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edPrah (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% --- Executes on selection change in txtSeq.
function txtSeq_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to txtSeq (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns txtSeq contents as cell array
% contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from txtSeq

```

10.2. *transfor_obraz*

```

function [upr]=transfor_obraz(obrg);
%%
orig=obrg;
upr=obrg;

%% vykreslení originálu
% figure,
% imshow(orig)
% axis off
% axis image
% title('Originální obrázek');

%% velikost obrázku
[vyska sirka]=size(orig);

%% transformace kontrastu v obraze
minimum=255;

```

```

maximum=1;

for vl=1:vyska
    for sl=1:sirka

        %hledání minima
        if minimum>orig(vl,sl)
            minimum=orig(vl,sl);

        %hledání maxima
        elseif maximum<orig(vl,sl)
            maximum=orig(vl,sl);
        end

    end
end

kon=255/(maximum-minimum); %vzorec pro lineární transformaci obrazu

for vl=1:vyska
    for sl=1:sirka
        upr(vl,sl)=round(kon*(orig(vl,sl)-minimum));
    end
end

%% vykreslení upraveného obr po hranové detekci
% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Obrázek po transformaci');

```

10.3. *filtr_med*

```

function [upr]=filtr_med(obrg);
%%
orig=obrg;
upr=obrg;

%% vykreslení originálu
% figure,
% imshow(orig)
% axis off
% axis image
% title('Originální obrázek');

%% velikost obrázku
[vyska sirka]=size(orig);

%% filtrace medianovým filtrem
for vl=1:vyska
    for sl=1:sirka
        pom1=[];
        % rohy
        if vl==1 && sl==1 %levý horní roh
            pom1=[orig(vl,sl:s1+1), orig(vl+1,sl:s1+1)];
            leng_p=4;
        elseif vl==1 && sl==sirka %pravý horní roh

```

```

        poml=[orig(vl,s1-1:s1), orig(vl+1,s1-1:s1)];
        leng_p=4;
    elseif vl==vyska && s1==1           %levý spodní roh
        poml=[orig(vl-1,s1:s1+1), orig(vl,s1:s1+1)];
        leng_p=4;
    elseif vl==vyska && s1==sirka       %pravý spodní roh
        poml=[orig(vl-1,s1-1:s1), orig(vl,s1-1:s1)];
        leng_p=4;

    %hrany
    elseif vl==1 && (s1~=1 || s1~=sirka) %horní hrana
        poml=[orig(vl,s1-1:s1+1),orig(vl+1,s1-1:s1+1)];
        leng_p=6;
    elseif vl==vyska && (s1~=1 || s1~=sira) %dolní hrana
        poml=[orig(vl-1,s1-1:s1+1), orig(vl,s1-1:s1+1)];
        leng_p=6;
    elseif s1==1 && (vl~=1 || vl~=vyska)   %levá hrana
        poml=[orig(vl-1,s1:s1+1), orig(vl,s1:s1+1), orig(vl+1,s1:s1+1)];
        leng_p=6;
    elseif s1==sirka && (vl~=1 || vl~=vyska) %pravá hrana
        poml=[orig(vl-1,s1-1:s1), orig(vl,s1-1:s1), orig(vl+1,s1-1:s1)];
        leng_p=6;

    %hlavní část obrázku
    else
        poml=[orig(vl-1,s1-1:s1+1), orig(vl,s1-1:s1+1), orig(vl+1,s1-
1:s1+1)];
        leng_p=9;
    end

    % seřazení hodnot v promné poml
    for k1=1:leng_p
        for k2=1:leng_p
            if poml(1,k1)<poml(1,k2)
                pom=poml(:,k1);
                poml(:,k1)=poml(:,k2);
                poml(:,k2)=pom;
            end
        end
    end

    % vybrání správné hodnoty ze seřazené masky
    if leng_p==4
        pom=round((poml(2)+poml(3))/2);
    elseif leng_p==6
        pom=round((poml(3)+poml(4))/2);
    elseif leng_p==9
        pom=poml(5);
    end

    % nahrazení hodnoty v obázku
    upr(vl,s1)=pom;
end
end

%% vykreslení upraveného obr po mediánové filtraci
% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Po medianove filtraci');
```

10.4. *detek_hran*

```
function [upr]=detek_hran(obrg);  
%%  
orig=obrg;  
upr=obrg;  
  
%% vykreslení originálu  
% figure,  
% imshow(orig)  
% axis off  
% axis image  
% title('Originální obrázek');  
  
%% velikost obrázku  
[vyska sirka]=size(orig);  
maska=[-1 -2 -1 0 0 0 1 2 1];  
  
%% hranová detekce  
for vl=1:vyska  
    for sl=1:sirka  
        poml=[];  
        % rohy  
        if vl==1 && sl==1 %levý horní roh  
            poml=[orig(vl,sl:sl+1), orig(vl+1,sl:sl+1)];  
            poml=double(poml);  
            pom=sum(poml.*[0 0 2 1]);  
        elseif vl==1 && sl==sirka %pravý horní roh  
            poml=[orig(vl,sl-1:sl), orig(vl+1,sl-1:sl)];  
            poml=double(poml);  
            pom=sum(poml.*[0 0 1 2]);  
        elseif vl==vyska && sl==1 %levý spodní roh  
            poml=[orig(vl-1,sl:sl+1), orig(vl,sl:sl+1)];  
            poml=double(poml);  
            pom=sum(poml.*[-2 -1 0 0]);  
        elseif vl==vyska && sl==sirka %pravý spodní roh  
            poml=[orig(vl-1,sl-1:sl), orig(vl,sl-1:sl)];  
            poml=double(poml);  
            pom=sum(poml.*[-1 -2 0 0]);  
  
        %hrany  
        elseif vl==1 && (sl~=1 || sl~=sirka) %horní hrana  
            poml=[orig(vl,sl-1:sl+1),orig(vl+1,sl-1:sl+1)];  
            poml=double(poml);  
            pom=sum(poml.*[0 0 0 1 2 1]);  
        elseif vl==vyska && (sl~=1 || sl~=sirka) %dolní hrana  
            poml=[orig(vl-1,sl-1:sl+1), orig(vl,sl-1:sl+1)];  
            poml=double(poml);  
            pom=sum(poml.*[-1 -2 -1 0 0 0]);  
        elseif sl==1 && (vl~=1 || vl~=vyska) %levá hrana  
            poml=[orig(vl-1,sl:sl+1), orig(vl,sl:sl+1), orig(vl+1,sl:sl+1)];  
            poml=double(poml);  
            pom=sum(poml.*[-2 -1 0 0 2 1]);  
        elseif sl==sirka && (vl~=1 || vl~=vyska) %pravá hrana  
            poml=[orig(vl-1,sl-1:sl), orig(vl,sl-1:sl), orig(vl+1,sl-1:sl)];  
            poml=double(poml);  
            pom=sum(poml.*[-1 -2 0 0 1 2]);  
  
        %hlavní část obrázku
```



```

        else
            pom1=[orig(v1-1,s1-1:s1+1), orig(v1,s1-1:s1+1), orig(v1+1,s1-
1:s1+1)];
            pom1=double(pom1);
            pom=sum(pom1.*maska);
        end

        %ošetření aby honota v obrazku nebyla menší než a větší než 255
        pom=uint8(pom);

        % nahrazení hodnoty v obázku
        upr(v1,s1)=pom;
    end
end

%% vykreslení upraveného obr po hranové detekci
% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Po hranové detekci');

```

10.5. *substr_obr*

```

function [upr]=substr_obr(nazev_originalu, nazev_upr);

%% velikost obrázku
[vyska sirka]=size(nazev_originalu);

%% substrakce obrazu
for v1=1:vyska
    for s1=1:sirka
        upr(v1,s1)=nazev_originalu(v1,s1)-nazev_upr(v1,s1);
    end
end

%% vykreslení upraveného obr po substrakci
% figure,
% imshow(upr)
% axis off
% axis image
% title('Substrakce obrazů');

```