

國立臺灣師範大學物理學系

碩士論文

Department of Physics

National Taiwan Normal University

Master's Thesis

不同深度學習演算法應用於細胞影像分割之比較

與大腸桿菌質體分離實例分析

Comparison of Different Deep Learning Algorithms
Applied to Cell Image Segmentation and Case Analysis of
Plasmid Partition in *Escherichia coli*

研究生：宋狄恩

指導教授：張宜仁 教授

中華民國 111 年 7 月

摘要

活體細胞縮時攝影可以產生大量的數據，隨之而來的問題則是如何將影像中的細胞分割出來。在傳統影像處理方面，Otsu 演算法與分水嶺演算法 (Watershed Algorithm) 是兩種常見的將影像二值化的方法。對於細胞影像分割，處在細胞較稠密或是緊鄰的狀態下，傳統影像處理無法達到完美的細胞分割結果。因此，我們將深度學習中的電腦視覺應用於細胞影像分割，選擇了 SuperSegger、Unet、Mask R-CNN 這三種模型進行細胞分割的比較與分析。在這三種模型中，表現最出色的為 Unet，並以此作為實例分析中影像處理的基礎。

在大腸桿菌質體分佈實例分析的部分，過去的研究顯示多套數質體並沒有類似低套數質體主動分離的機制，且有可能由轉錄或是轉譯所導致質體群聚的現象，因此多套數質體的穩定維持機制並不明確。我們以螢光抑制操作系統標記多套數的 CoE1 衍生質體，透過長時間的細胞縮時攝影實驗，搭配影像分割模型 Unet，統計在有無抑制轉錄的情況下，子代細胞分配到親代細胞質體的比率。發現在抑制轉錄的情況下，質體分配的比率更集中在成功機率為 1/2 的二項分布寬度內。我們記錄了不同的養菌條件下，質體數量在細胞中成長的變化情形。儘管細胞在洋菜膠上仍然會分裂，但在細胞中質體數量比較多的情況時，細胞是傾向不消耗能量去複製質體。在細胞極性的統計實驗當中，我們發現新端細胞比舊端細胞有更容易獲得質體的趨勢，這個現象可能來自於細胞中類核在空間上的分布不均勻，且在第二次細胞分裂前，質體的聚集出現在靠近新端附近的頻率可能是比較高的，因此新端細胞會更有機會分配到較多的質體。

關鍵字：細胞縮時攝影、影像分割、深度學習、多套數質體

Abstract

Live cell time-lapse microscope can generate a lot of data, and the problem that comes with it is how to segment the cells in the image. In traditional image processing, Otsu algorithm and Watershed Algorithm are two common methods to binarize images. For cell image segmentation, when the cells are dense or in close, the traditional image processing methods cannot achieve perfect cell segmentation results. Therefore, we applied deep learning to cell image segmentation, and selected three models include SuperSegger, Unet, and Mask R-CNN to compare with each other and analyze their performance on cell segmentation. Among these three models, the best model is Unet, which is used as the basis for image processing in the following case analysis.

In the part of the case analysis of *E. coli* plasmid partition, there is evidence that high-copy number plasmid does not have a mechanism similar to the active partition system of low-copy number plasmid. In addition, for high-copy number plasmid, there is an existence of aggregation which may be caused by transcription or translation. The mechanism of plasmid maintenance is still unclear. We labeled high-copy number of CoE1-derivative plasmid with the fluorescent repressor-operator systems. Through Live cell time-lapse microscope experiments, with the cell segmentation model Unet, we recorded the distribution of plasmid inheritance of daughter cells with or without transcription inhibition. It was found that in the case of transcription inhibition, the ratio of plasmid inheritance was more concentrated within the width of the binomial distribution with a success probability of 1/2. We recorded the growth rate of plasmid under different bacterial growth conditions. Although the cells division still occur on agar, when the number of plasmids in the cells is relatively large, the cells tend not to replicate the plasmid. In the section of cell polarity, we found that the new pole cells

tend to obtain plasmids more easily than the old pole cells. This phenomenon may be caused by the uneven spatial distribution of nucleoids in the cells and the frequency of plasmid cluster in the new pole may be relatively high. Thus, the new pole cell has a better chance to inherit more plasmids.

Keywords: live cell time-lapse microscope, image segmentation, deep learning, high-copy number plasmid



致謝

在研究所的這段時間，我成長了很多，學會了蒐集資料、整合資料、面對研究上的困難的能力。能夠完成這本論文，首先我要感謝爸爸媽媽及妹妹對我的支持，讓我能心無旁騖地專注在課業及研究上。感謝指導教授 張宜仁老師，一直以來細心的指導，遇到困難時會給予不同的建議和幫助，讓我一步步解決遇到的問題。感謝中研院物理所周家復老師長期穩定提供實驗室所需的儀器與資源，讓我能夠專心地進行實驗。也感謝 周家復老師及 邱顯智老師願意擔任我的口試委員，對我的論文給予寶貴的建議，讓我能從中了解到能夠補強的地方。

感謝中研院的學長、學姊，以及實驗室的各個學弟、學妹，在研究所的日常當中，除了給予實驗上的協助，也帶來很多日常的歡樂與陪伴。

謝謝在讀研究所的路上，所有幫助過我的人。



目錄

摘要	i
Abstract.....	ii
致謝	iv
目錄	v
圖目錄	viii
表目錄	xi
1 第一章 緒論	1
1.1 研究動機與目的	1
1.2 文章架構	3
2 第二章 深度學習介紹	4
2.1 神經網路(Neural Network).....	4
2.2 卷積神經網路 CNN (Convolutional Neural Network)	5
2.2.1 卷積層 (Convolution Layer)	6
2.2.2 池化層 (Pooling Layer).....	7
2.2.3 全連接層 (Fully Connected Layer).....	8
2.3 反向傳播 (Backpropagation)	8
3 第三章 文獻回顧與實例分析對象	11
3.1 SuperSegger.....	11
3.2 Unet & FCN (Fully Convolutional Networks)	12
3.3 R-CNN (Regions with Convolutional Neural Networks).....	14
3.4 Fast R-CNN	15
3.5 Faster R-CNN	17

3.6 Mask R-CNN.....	18
3.7 實例分析對象之質體介紹.....	20
4 第四章 實驗設計與原理.....	22
4.1 質體螢光標記-FROS.....	22
4.2 抑制設計.....	23
4.3 類核螢光標記.....	24
5 第五章 實驗材料與方法.....	26
5.1 深度學習模型.....	26
5.1.1 訓練環境.....	26
5.1.2 資料集.....	27
5.1.3 資料增強(Data Augmentation).....	28
5.1.4 模型評估方法.....	29
5.2 實驗樣品制備.....	31
5.2.1 質體.....	31
5.2.2 菌株.....	32
5.3 光學儀器.....	32
5.4 實驗操作與分析.....	33
5.4.1 單一質體螢光標記分佈.....	33
5.4.2 細胞內多套數質體數量分佈.....	34
5.4.3 抑制轉錄後，細胞內多套數質體數量分佈.....	35
6 第六章 實驗結果與討論.....	37
6.1 深度學習模型評估結果.....	37
6.2 大腸桿菌質體實例分析.....	41
6.2.1 單一質體螢光標記分佈.....	41
6.2.2 多套數質體細胞之子代細胞質體繼承.....	43

6.2.3 質體在細胞週期內複製情形	44
6.2.4 細胞中的極性	50
7 第七章 結論	58
8 參考文獻	60

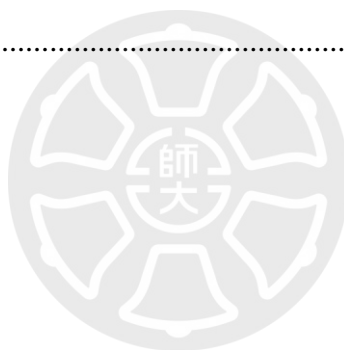


圖目錄

圖 1-1 電腦視覺任務圖	2
圖 2-1 神經網路架構圖	4
圖 2-2 神經元示意圖	5
圖 2-3 卷積神經網路示意圖	6
圖 2-4 卷積運算過程圖	7
圖 2-5 池化示意圖	8
圖 3-1 SuperSegger 流程圖	11
圖 3-2 Fully Convolutional Networks 架構圖	12
圖 3-3 Transpose convolution 運算過程	13
圖 3-4 Unet 架構圖	13
圖 3-5 R-CNN 流程圖	14
圖 3-6 Fast R-CNN 流程圖	15
圖 3-7 RoI Pooling	16
圖 3-8 RoI Pooling	16
圖 3-9 Faster R-CNN 流程圖	17
圖 3-10 Anchors	18
圖 3-11 Mask R-CNN 流程圖	18
圖 3-12 雙線性內插示意圖	19
圖 3-13 RoI Align	20
圖 4-1 質體螢光標記 FROS 設計	23
圖 4-2 質體轉錄抑制設計	24
圖 5-1 細胞原始影像	27
圖 5-2 細胞分割標註資料	28

圖 5-3 SuperSegger 錯誤示意圖	28
圖 5-4 資料增強效果	29
圖 5-5 IoU (Intersection over Union)	31
圖 6-1 簡單測試資料結果	39
圖 6-2 中等測試資料結果	39
圖 6-3 困難測試資料結果	40
圖 6-4 極困難測試資料結果	40
圖 6-5 於 CPU 運行時間	41
圖 6-6 於 GPU 運行時間	41
圖 6-7 菌株 BWMC 質體螢光標記	42
圖 6-8 質體 pZC320-lacO.b 螢光亮度分佈與單高斯函數擬合線	42
圖 6-9 無添加阿拉伯糖情況之細胞內質體分配散布圖	43
圖 6-10 添加阿拉伯糖情況之細胞內質體分配散布圖	44
圖 6-11 第二代細胞在週期內質體成長(無阿拉伯糖)	45
圖 6-12 第二代細胞在週期內質體成長(有阿拉伯糖)	46
圖 6-13 各週期質體成長分佈圖(無阿拉伯糖)	46
圖 6-14 各週期質體成長分佈圖(有阿拉伯糖)	47
圖 6-15 細胞在週期內質體成長(質體數小於 11 個)	47
圖 6-16 細胞在週期內質體成長(質體數 11~30 個)	48
圖 6-17 細胞在週期內質體成長(質體數 31 個以上)	48
圖 6-18 細胞在週期內質體成長(質體數小於 11 個)	49
圖 6-19 細胞在週期內質體成長(質體數 11~30 個)	49
圖 6-20 細胞在週期內質體成長(質體數 31 以上個)	50
圖 6-21 新舊端細胞示意圖	52
圖 6-22 舊端細胞質體分配(無抑制轉錄)	53

圖 6-23 新端細胞質體分配(無抑制轉錄).....	53
圖 6-24 舊端細胞質體分配(抑制轉錄).....	54
圖 6-25 新端細胞質體分配(抑制轉錄).....	54
圖 6-26 質體與類核螢光標記.....	54
圖 6-27 質體與類核螢光標記.....	55
圖 6-28 質體與類核螢光標記.....	55
圖 6-29 質體分配示意圖.....	55
圖 6-30 體分配示意圖.....	56
圖 6-31 體分配示意圖.....	56
圖 6-32 體分配示意圖.....	57
圖 6-33 質體分配比率圖.....	57



表目錄

表 5-1 混淆矩陣.....	30
表 5-2 質體表.....	36
表 5-3 菌株表.....	36
表 6-1 質體獲得比率關係式.....	57



第一章 緒論

1.1 研究動機與目的

活體細胞縮時攝影的實驗，能夠回答許多生物學的問題，包括細菌和真核生物中轉錄的調控，亦或是營養環境以及抗生素的變化對於細胞的影響。藉由長時間的錄影，我們便能夠觀察細胞間的差異，以及這些現象是如何隨著時間演變[1, 2]。活體細胞縮時攝影可以產生大量的數據。在這樣的情況下，人工手動將每一幀畫面中所有的細胞圈選出來，進行後續的統計分析，很顯然是費時且不合適的。因此，建構一個迅速且自動化將細胞從影像中分割出來的系統是必要的[3]。

在傳統的圖像分割方面，將影像二值化為常見的做法，Otsu 提出的演算法能夠根據影像自動選出較適合的閾值，以影像灰階進行分類。Otsu 假定影像中包含兩類元素，欲找出能使不同類別之間具有最大變異量、相同類別內具有最小變異量的閾值作為影像二值化的最佳門檻[4]。分水嶺演算法 (Watershed Algorithm) 為另一種根據型態學 (Morphology) 進行圖像分割的方法。在分水嶺演算法 (Watershed Algorithm) 中，圖像被視為具有山脊和山谷的地形景觀，景觀的高低程度由每個像素的灰度值或梯度來決定。其中灰度值較高的像素點連線被視為山脊，也就是分水嶺，低窪地區所積累的水位則是用於二值化的閾值。當水位上升到一定的高度時，為了避免相鄰的山谷水匯集，會在山脊建立大壩，最終所有大壩的連線便達成了圖像分割的任務[5]。

上述的兩種傳統影像處理方法，對於較複雜的場景，例如，影像中細胞較稠密或是緊鄰的狀態下，無法達到完美的細胞分割結果。往往需要對細胞的大小、影像的品質去進行各種的調製，意即需要許多專業知識和人工挑選適當的影像特徵來達成細胞分割。

而隨著硬體運算能力的提升，利用深度學習來進行影像分割處理的方法也越

來越受到重視，且已被證實基於神經網路對於二維影像上的細胞分割也能表現得比傳統影像處理方法還要更出色[6]。當我們將深度學習的方法引入影像處理時，我們需要先定義欲解決的問題，由簡單到複雜分別是影像辨識、影像定位、語義分割、實例分割，示意圖如圖 1-1。

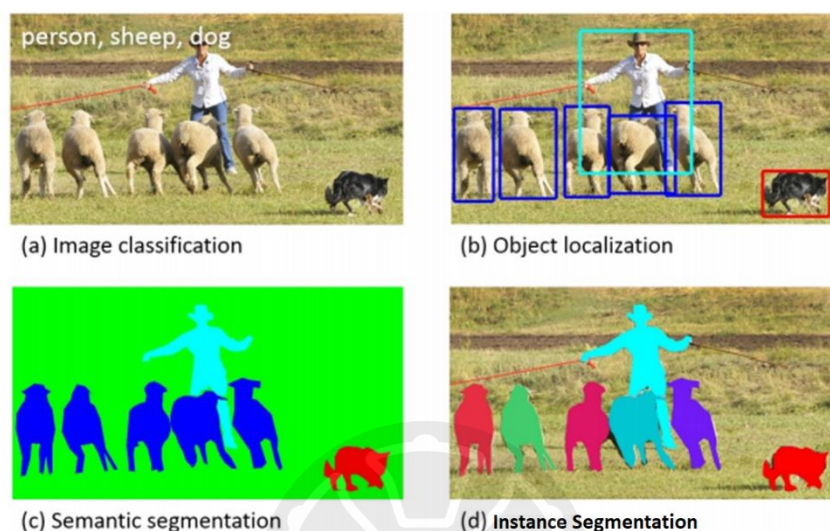


圖 1-1 電腦視覺任務圖 取自[7]

以圖 1.1-a 為例，影像辨識 (Image Classification) 為在一張照片中，將照片中的物件類別分辨出來。當圖像辨識的任務實現以後，如圖 X-b 所示，下一個目標是要知道辨識出來的物件位置在哪裡，並將座標框 (Bounding Box) 標示出來。語義分割 (Semantic Segmentation) 則是指將圖片中的每一個 pixel 進行分類。實例分割 (Instance Segmentation) 是物件偵測和語義分割的結合，是相對較困難的任務。實例分割會針對感興趣的像素點進行分類，並且將各個物件定位，即使是相同類別也會分割成不同物件。

綜合上述所提及的概念，為了能夠在擁擠且複雜的細胞場景下獲得好的影像分割結果，本論文採用了三種不同神經網路的演算法，分別是 SuperSegger、Mask R-CNN、Unet[8-10]，來嘗試解決以往用傳統影像處理方法無法達到理想細胞分割結果的問題。其中 SuperSegger 為傳統影像處理方法結合神經網路的方式達到細胞分割。Mask R-CNN 為實例分割代表性的模型，Mask R-CNN 除了可以

將影像中的物件定位，也能針對象素分類，符合我們希望達成細胞影像分割的需求；Unet 則是語義分割代表性的模型，在醫療影像辨識上有出色的表現，且近年也有許多研究將其用於生物影像[11]，因此我們想嘗試將其任務應用於細胞影像分割方面。由於 SuperSegger 是現成的細胞影像分割套件，我們想藉由 SuperSegger 所產生細胞影像分割結果，作為 Mask R-CNN 與 Unet 的訓練資料來源，看看這兩個模型是否能夠有更出色的細胞分割能力，並比較三者之間的差異。上述所提及的三種影像分割方法會在後續的章節進行詳細的介紹。

本論文實例分析的對象為大腸桿菌中的質體分配情形。質體可作為基因工程中的載體且操作容易，因此在分子生物學實驗中受到廣泛的利用與研究。其中一個重要的問題是，質體是如何在細胞世代之間維持存在(Plasmid maintenance)。主導質體穩定維持的關鍵為質體的分離機制，低套數質體可以透過主動分離機制，主動將質體分配至子代細胞，達成質體的維持。而多套數質體雖然在細胞內有可能由轉錄或是轉譯所導致的群聚現象[12]，但多套數質體並沒有類似低套數質體主動分離的機制，因此多套數質體的穩定維持機制並不明確。為了觀察多套數質體分配的情形，需要長時間的細胞縮時攝影實驗，並透過上述所提及的深度學習演算法，來協助細胞影像分割，以對大量的影像數據進行統計分析，觀察親代細胞與子代細胞質體數量的變化，統計出細胞分裂過程中質體的數量分配情形。

1.2 文章架構

本論文共有七個章節，第一章緒論，說明研究動機與目的、文章架構。第二章為深度學習的介紹，包括卷積神經網路、卷積層、池化層、全連接層與反向傳播。第三章為重要文獻回顧與實例分析對象的介紹。第四章為實驗設計與原理。第五章實驗材料與方法。第六章實驗結果與討論。第七章結論。

第二章 深度學習介紹

深度學習是機器學習的一個分支，是以神經網路為架構，對輸入資料進行學習的演算法。自深度學習出現以來，它已成為很多領域，尤其是在電腦視覺和語音辨識中，表現出優秀的成績。隨著硬體設備的進步，也讓深度學習獲得更多的關注。高效能的圖形處理器大幅提升了矩陣運算的速度，使深度學習演算法的運算時間能夠顯著地縮短。

本章節會介紹關於深度學習的重要先輩知識，於 2.1 節裡，介紹神經網路的基本架構；於 2.2 節裡，介紹卷積神經網路及其運作方式；於 2.3 節裡，會說明反向傳播演算法是如何讓深度學習模型更新網路中的權重，以達成學習目的。

2.1 神經網路(Neural Network)

神經網路也被稱為人工神經網路 (Artificial Neural Network, ANN)或類神經網路，是一種模仿生物神經元彼此之間傳送訊息方式的數學模型或計算模型。典型的神經網路架構如圖 2-1 所示。

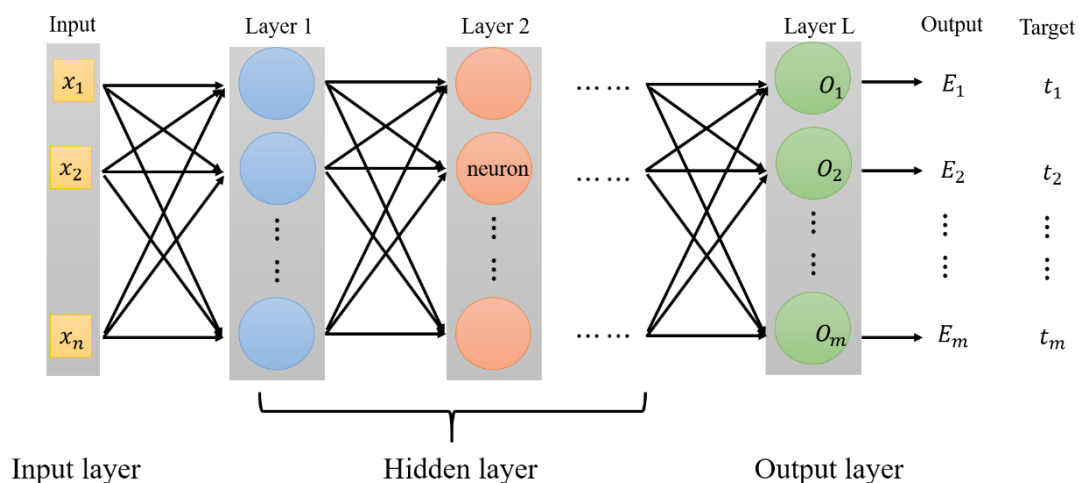


圖 2-1 神經網路架構圖

一個神經網路主要由輸入層(Input layer)、隱藏層(Hidden layer)、輸出層(Output layer)所組成。神經網路的第一層被稱為輸入層，顧名思義就是將資料輸入，與下

一層的神經(neuron)元連接。在輸入層與輸出層之間的層面稱為隱藏層。隱藏層可以是一層或多層。隱藏層的層數以及各層神經元的數目不定，可以依據欲解決的任務進行調整。當隱藏層的數量越多，也代表計算所需的時間及複雜度越高。對於隱藏層中，第 l 層中第 j 個神經元，如圖 2-2 所示，可以給出以下定義。

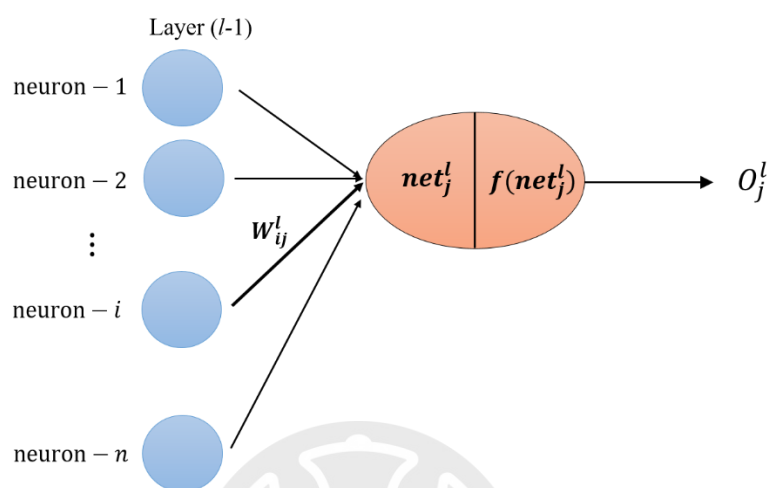


圖 2-2 神經元示意圖

在 $(l-1)$ 層中第 i 個神經元以及其權重 w_{ij}^l 對於 l 層中第 j 個神經元的輸入為：

$$net_j^l = \sum_{i=1}^{n^{l-1}} w_{ij}^l f(net_i^{l-1}) \quad (\text{式 2.1})$$

輸出為 $O_j^l = f(net_j^l)$ ，其中 f 為激勵函數 (activation function)，為非線性函數，透過這些非線性函數的反覆疊加，使神經網路整體有足夠的能力來抓取特徵。在神經網路的最後一層為輸出層，他會接收最後一個隱藏層的輸出。輸出層的神經元數量會依據神經網路想解決的問題而定。假如網路被訓練來辨識圖片中，四種可能的動物，狗、貓、兔子、老鼠，對應的神經元數目則會有四個，每一個神經元代表一種所屬類別的機率。

2.2 卷積神經網路 CNN (Convolutional Neural Network)

卷積神經網路一般使用英文縮寫 CNN 來稱呼，與傳統神經網路的最大差異

在於卷積層及池化層這兩部分，讓 CNN 擁有能夠捕捉圖像或語音細節的能力。在 2012 年的 ILSVR (ImageNet Large Scale Visual Recognition Competition) 圖像辨識挑戰賽中，採用 CNN 技術的 AlexNet 以錯誤率與第二名超過 10% 的差距一舉拿下比賽的冠軍[13]，CNN 因而受到許多關注且衍伸出許多應用，包括人臉辨識、自然語言處理，生醫影像處理等等。CNN 簡易基本結構如圖 2-3 所示。

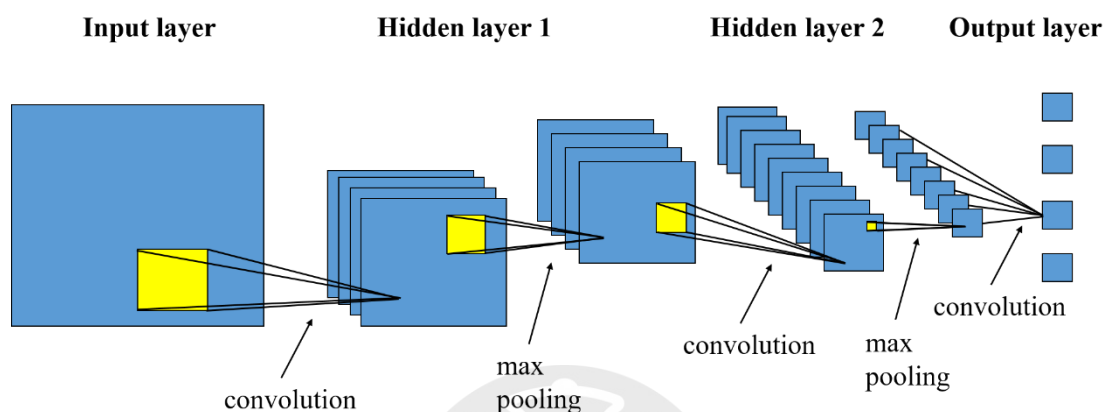
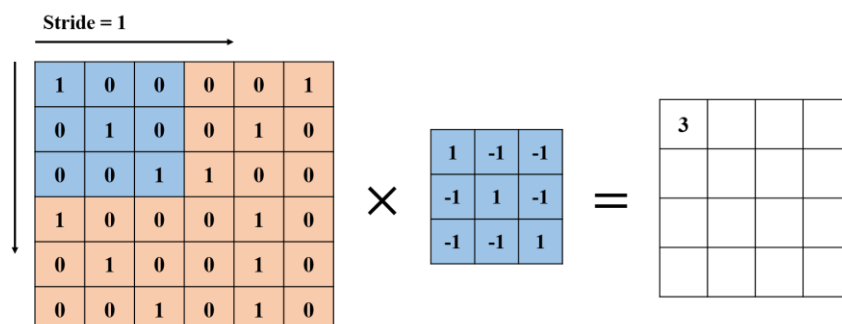


圖 2-3 卷積神經網路示意圖

CNN 主要由卷積層(Convolution Layer)、池化層(Pooling Layer)、全連接層(Fully Connected Layer)所組成，將於接下來的小節中介紹。

2.2.1 卷積層 (Convolution Layer)

卷積層的作用是藉由卷積核在輸入圖像上的滑動並進行特定的運算，進而獲得特徵圖 (feature map)，計算的過程如圖 2-4。



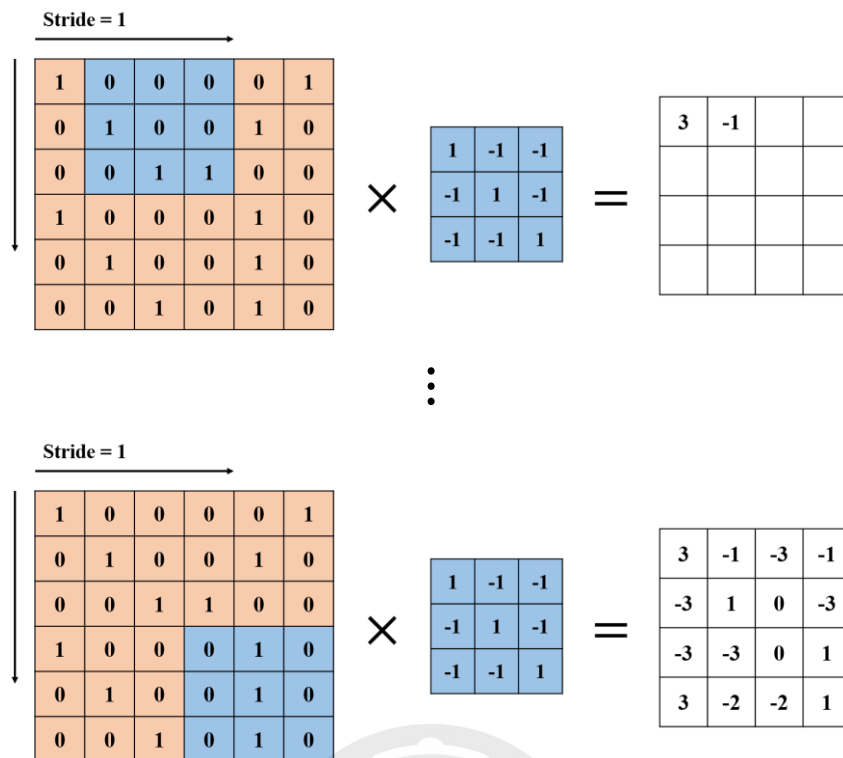


圖 2-4 卷積運算過程圖

如圖 2-4 所示，假設我們有一張大小為 6×6 的圖像，與大小為 3×3 的卷積核，卷積核會在圖像上滑動一個步長 (Stride)，並與對應的位置元素進行乘積的運算，加總過後會在白色的特徵圖中得到一個數值，如此反覆的運算過後，最終會得到一張完整的特徵圖 (feature map)；而根據不同的步長 (Stride) 與不同的卷積核大小，最終得出的特徵圖 (feature map) 大小也會有所不同。

2.2.2 池化層 (Pooling Layer)

通常在經過卷積層之後，會進入池化的過程，其實就是對特徵圖 (feature map) 進行採樣，降低特徵圖 (feature map) 的維度，但同時又保持重要的資訊。池化的方式有最大池化 (Max Pooling)、平均池化 (Average Pooling)、全局池化 (Global Pooling) 等等，我們以最常見的最大池化 (Max Pooling) 為範例，其過程如圖 2-5。

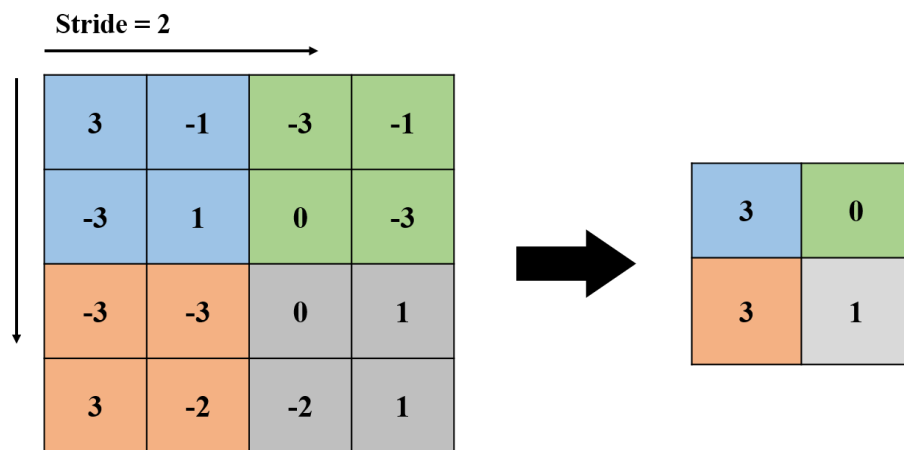


圖 2-5 池化示意圖

池化過程與卷積過程相似，如圖 2.5 所示，表示對一個 4×4 的特徵圖(feature map)鄰域內的值，用一個 2×2 的卷積核，步長為 2 進行滑動，選擇最大值輸出到下一層，此過程即為最大池化 (Max Pooling)。

2.2.3 全連接層 (Fully Connected Layer)

全連結層 (Fully Connected Layer)通常分部在神經網路結構的最後幾層，大多用於分類的任務上，它會將上一層的所有神經元 (neuron)與下一層的所有神經元 (neuron)連接，把之前抽取獲得的特徵圖 (feature map)拉直 (Flatten)，轉為特徵向量特徵映射到下一層，或者映射到最終的 Softmax 層來判斷屬於各類別的機率。其中 Softmax 為歸一化函式，表示方式為：

$$\sigma(z)_j = \frac{e^{z_j}}{\sum_{k=1}^K e^{z_k}} \text{ for } j = 1, \dots, K \quad (\text{式 } 2.2)$$

$\sigma(z)_j$ 為 Softmax 輸出向量 $\sigma(z)$ 的第 j 個數值，所有元素的數值範圍皆在(0,1)之間，且所有元素的總和為 1。

2.3 反向傳播 (Backpropagation)

反向傳播 (Backpropagation) 是目前在深度學習中一種非常重要的演算法。藉由反向傳播 (Backpropagation)，讓我們能夠用有效率的方式計算出損失函數對

於權重 (Weight) 的梯度，使用梯度下降法 (Gradient Descent) 來更新每一個權重，以最小化損失函數，使神經網路能夠「學習」[14]。以下為反向傳播的推導。

假設我們現在有一個 L 層神經網路模型如圖 2.1 所示，輸入層為 n 維，輸出層的維度是 m 維，且任一 l 層中都有 n_l 個神經元。由於反向傳播使用梯度下降法，需要計算損失函數 (Loss function) 對網絡權重的導數，我們在這裡先定義損失函數為：

$$E = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^m (t_k - o_k)^2 = \frac{1}{2} E_k \quad (\text{式 2.3})$$

其中， t_i 為目標向量第 i 維之值， o_i 為輸出向量第 i 維之值。在 $(l-1)$ 層中第 i 個神經元以及其權重 w_{ij}^l 對於 l 層中第 j 個神經元的輸入可由式 2.1 及圖 2.2 得知：

$$net_j^l = \sum_{i=1}^{n^{l-1}} w_{ij}^l f(net_i^{l-1}) \quad (\text{式 2.1})$$

輸出為 $O_j^l = f(net_j^l)$ 。為了從梯度下降法獲得最佳化，我們必須計算出每一個權重對於損失函數的偏導數 $\frac{\partial E}{\partial w_{ij}^l}$ 。我們可以先觀察神經網路的最後一層，根據

Chain rule 所算出的偏導數為：

$$\begin{aligned} \frac{\partial E}{\partial w_{ij}^l} &= \frac{\partial E}{\partial net_j^l} \frac{\partial net_j^l}{\partial w_{ij}^l} \\ &= \frac{\partial E}{\partial O_j^l} \frac{\partial O_j^l}{\partial net_j^l} \frac{\partial net_j^l}{\partial w_{ij}^l} \\ &= \frac{\partial}{\partial O_j^l} \left(\frac{1}{2} \sum_{k=1}^m (t_k - o_k)^2 \right) \frac{\partial}{\partial net_j^l} (f(net_j^l)) \frac{\partial}{\partial w_{ij}^l} \left(\sum_{i=1}^{n^{l-1}} w_{ij}^l f(net_i^{l-1}) \right) \\ &= 2 \cdot \frac{1}{2} (t_j - o_j) \cdot f'(net_j^l) \cdot f(net_i^{l-1}) \end{aligned} \quad (\text{式 2.4})$$

倘若是中間層的情況，偏導數的計算方式為：

$$\frac{\partial E}{\partial w_{ij}^l} = \frac{\partial E}{\partial net_j^l} \frac{\partial net_j^l}{\partial w_{ij}^l} = \delta_j^l \frac{\partial net_j^l}{\partial w_{ij}^l} = \delta_j^l \cdot f(net_j^{l-1}) \quad (\text{式 2.5})$$

$$\delta_j^l = \frac{\partial E}{\partial net_j^l} = \sum_{k=1}^{n^{l+1}} \frac{\partial E}{\partial net_j^{l+1}} \frac{\partial net_j^{l+1}}{\partial o_j^l} \frac{\partial o_j^l}{\partial net_j^l} = \sum_{k=1}^{n^{l+1}} \delta_k^{l+1} \cdot w_{jk}^{l+1} \cdot f'(net_j^l) \quad (\text{式 2.6})$$

透過式 2.4 與式 2.5 我們已經了解了梯度的計算方式，只要知道 net_i^l 、 w_{ij}^l 、 δ_{k+1}^l 即能計算出權重對於損失函數的偏導數。藉由式 2.6，我們知道任一個 δ_j^l 皆能由 δ^{l+1} 、 δ^{l+2} 、……、 δ^L 計算出來。因此，反向傳播的演算法可以分成兩個部分進行：

- 前向傳播 (Forward pass)：輸入向量 x_1 、 x_2 、……、 x_n ，計算出神經網路每一層中每個神經元的 net_i^l 以及對應的權重 w_{ij}^l 。
- 反向傳播 (Backward pass)：經由前向傳播計算出損失函數的數值 E 以後，便能算出最後一層的 δ^L ，進而推算出前面所有的 δ 。

藉此，我們便能透過反向傳播來有效率的計算出所有權重對於損失函數的梯度，並使用梯度下降法來更新權重：

$$w_{ij}^l \leftarrow w_{ij}^l - \eta \cdot \frac{\partial E}{\partial w_{ij}^l} \quad (\text{式 2.7})$$

其中， η 為權重更新的幅度，也可稱為學習率 (learning rate)。



第三章 文獻回顧與實例分析對象

在此章節中，我們會回顧關於深度學習應用在電腦視覺的重要架構，包含語義分割、物件偵測、實例分割。3.1 節至 3.6 節為各個深度學習模型的介紹以及歷史的演變。最後在 3.7 節的地方，則是對本論文實例分析的對象，質體，進行介紹。

3.1 SuperSegger

SuperSegger 是一個 MATLAB-based 的影像處理套件，它將傳統影像處理方法與深度學習進行結合，來完成細胞分割的任務[8]。其流程如圖 3-1 所示。

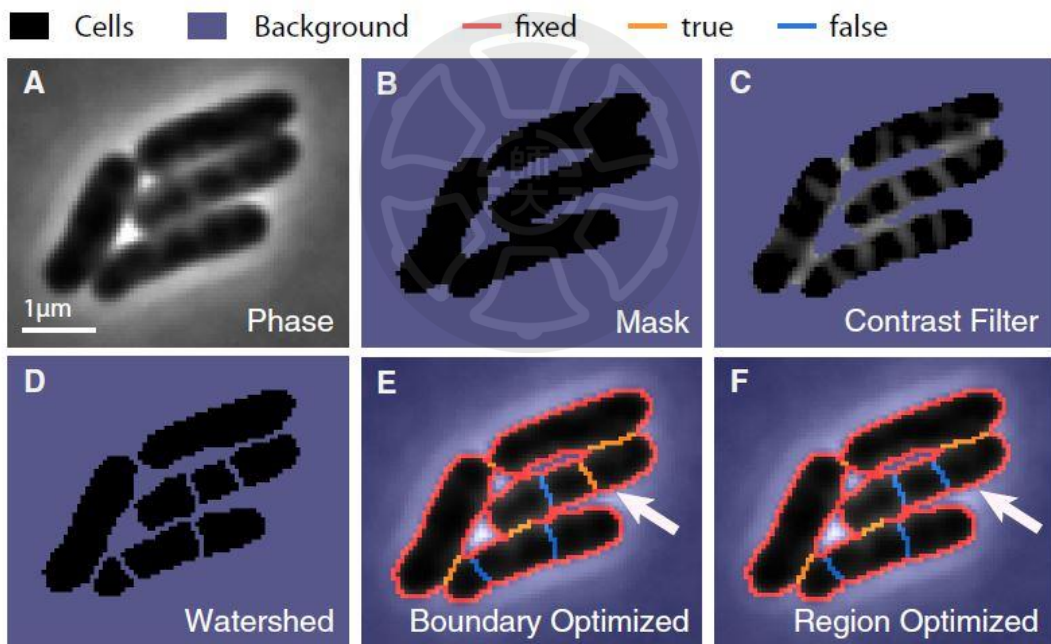


圖 3-1 SuperSegger 流程圖 取自[8]

首先，他們會將影像歸一化後，利用固定的閾值將影像進行二值化，將細胞與背景區分開來，藉由圖 3-13-B 所得到的 Mask 影像與原圖相乘，即能獲得過濾後的影像。接著會採用 Watershed 演算法尋找細胞邊界，由於 Watershed 演算法將局部最小值視為集水區域，如圖 3-13-C 中相對較暗的區域，會造成細胞影像的過度分割。在這些分割的邊界中，有些為 True boundary，有些為 False boundary。為

此，他們收集這些邊界以及細胞相關的資訊，包含細胞形狀、邊界長度、邊界像素值強度等等，訓練一個神經網路來分類經由 Watershed 演算法所得到的邊界屬於 True boundary 還是 False boundary，優化選取的細胞邊界，進而達成最終細胞分割的目的。

3.2 Unet & FCN (Fully Convolutional Networks)

Unet 為本論文所使用的演算法之一，是一種語義分割的模型。在了解 Unet 的架構之前，必須先理解 FCN (Fully Convolutional Networks) 為語義分割所奠定的基礎[15]。一般而言，CNN 的最後一層常為全連接層(Fully connected layer)，用來獲得各類別的機率，而此輸出的維度是一維，因此喪失了物件在空間位置中的訊息，無法預測每一個像素點屬於的類別。FCN 最重要的概念是將網路的最後一層由全連接層(Fully connected layer)改為卷積層，並能接受任意尺寸大小的輸入影像，輸出為每個像素點所對應的類別，示意圖如圖 3-2。

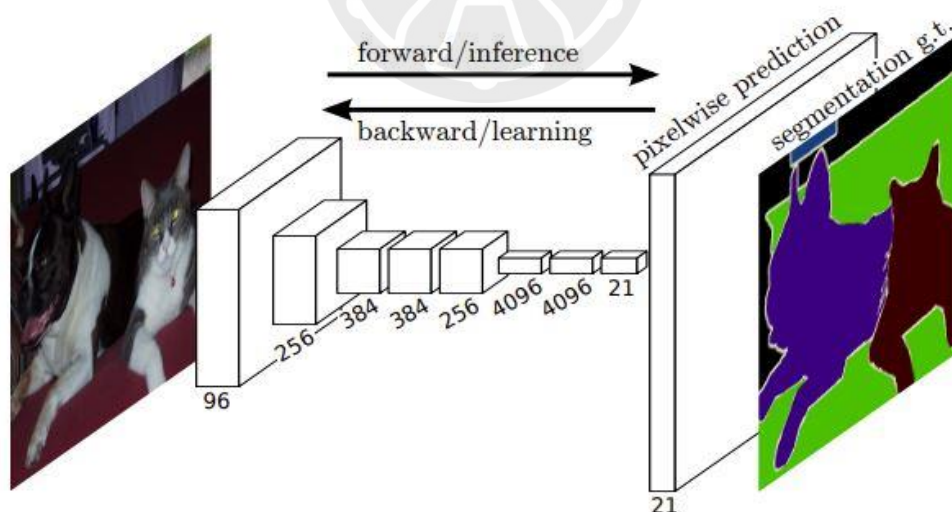


圖 3-2 Fully Convolutional Networks 架構圖 取自[15]

從圖 3-2 中可以得知，輸入影像會經過一連串的卷積與池化提取特徵的過程，代表著影像的維度也會逐漸變小，為了得到跟輸入的原圖一樣的尺寸，需要進行上採樣(Upsampling)將特徵圖轉為與原圖相同的大小。一般來說，最容易先想到的

上採樣方法是直接利用插值法方式，但是這樣得出的結果通常不好，該文獻的作者使用了轉置卷積 (Transpose convolution)來獲得放大的圖像，如圖 3-3。

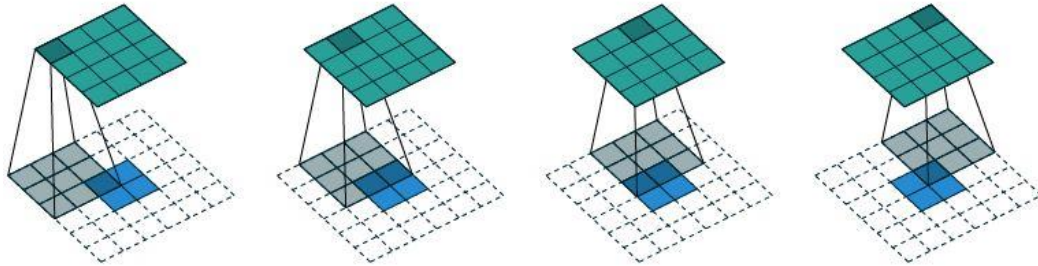


圖 3-3 Transpose convolution 運算過程 取自[16]

轉置卷積 (Transpose convolution)的運作方式與卷積相似，以圖 3-2 為例，當我們得到了一個大小為 2×2 的特徵圖且上採樣(Upsampling)的大小為原本的兩倍時，會先透過 Padding 的方式將特徵圖擴大，接著使用卷積核來獲得放大的圖像，如此一來便能達成語義分割。有了上述 FCN 的概念以後，便能進入 Unet 介紹的環節，其網路的結構如圖 3-3 所示。

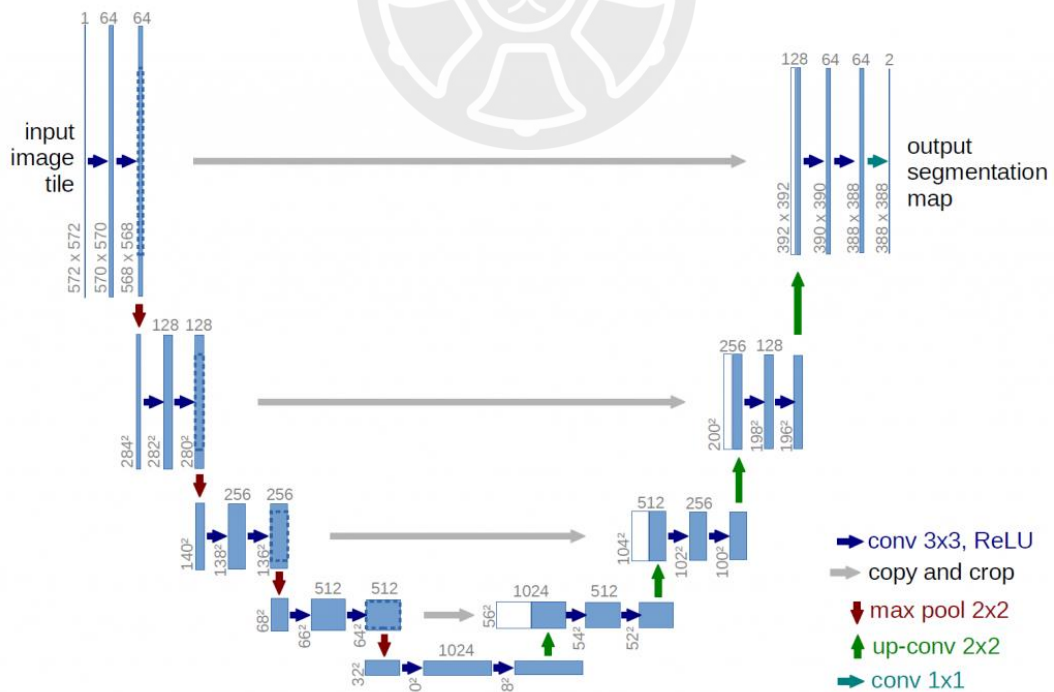


圖 3-4 Unet 架構圖 取自[10]

Unet 的外型與英文字母 U 非常相似，且為全卷積網路，對於醫療影像辨識在語義

分割的任務上有著出色的表現[10]。圖 3-3 中的左半側為特徵提取的過程，與 FCN 類似，藉由一連串卷積與池化萃取出影像的特徵，灰色箭頭代表在逐步上採樣轉置卷積的過程中，會將先前左半部提取的特徵圖與反卷積的結果疊加在一起，用來保留影像位置的訊息；右半邊為反卷積的過程，與 FCN 不一樣的地方是，FCN 僅用一步將特徵圖放大回原本影像的大小，而 Unet 採取的策略為逐步放大，如此反覆的操作直到輸出結果的尺寸與輸入影像相同，同時也保有更多影像位置的細節，最終達到語義分割的目的。

3.3 R-CNN (Regions with Convolutional Neural Networks)

在 2014 年的時候，Ross Girshick 提出了 Region proposal 加上 CNN 的方式取代了傳統滑動窗口加上手工設計特徵的方式，設計了 R-CNN 的架構[17]，來達成物件偵測的任務。R-CNN 的流程如圖 3-5。

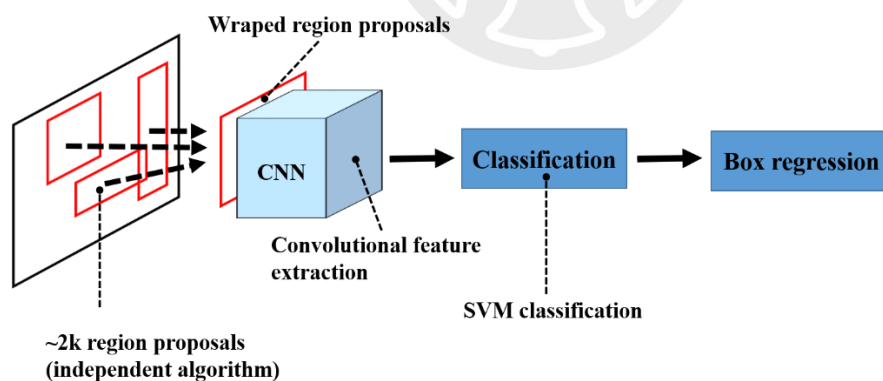


圖 3-5 R-CNN 流程圖

R-CNN 的輸入為一張照片，接著透過 Selective Search 演算法，計算照片中相鄰區域內的相似度，將顏色、紋理、形狀等相似度高的區域合併，最終會提取大約 2000 個左右的候選框[18]。將這些候選框調整至特定的大小作為後續 CNN 的輸入，進行特徵提取，最後再從取出的特徵圖經由 SVM (Support Vector Machine)分

類器區分照片中物件的類別[19]，以及線性回歸模型校正邊界框(Bounding box)的位置。然而，R-CNN 本身有以下兩個主要的缺點，第一，R-CNN 在一開始必須產生大約 2000 個候選框，而這些候選框大多數是互相重疊的，每一個候選皆會通過 CNN 來進行特徵的提取，因此計算量較大。第二，R-CNN 本身是由 CNN、SVM、線性回歸模型這三個模型所組成，彼此之間的訓練是獨立的，因此所需訓練的時間較長。

3.4 Fast R-CNN

Fast R-CNN 改善了 R-CNN 运算速度缓慢的缺点[20]，Fast R-CNN 的流程如图 3-6。

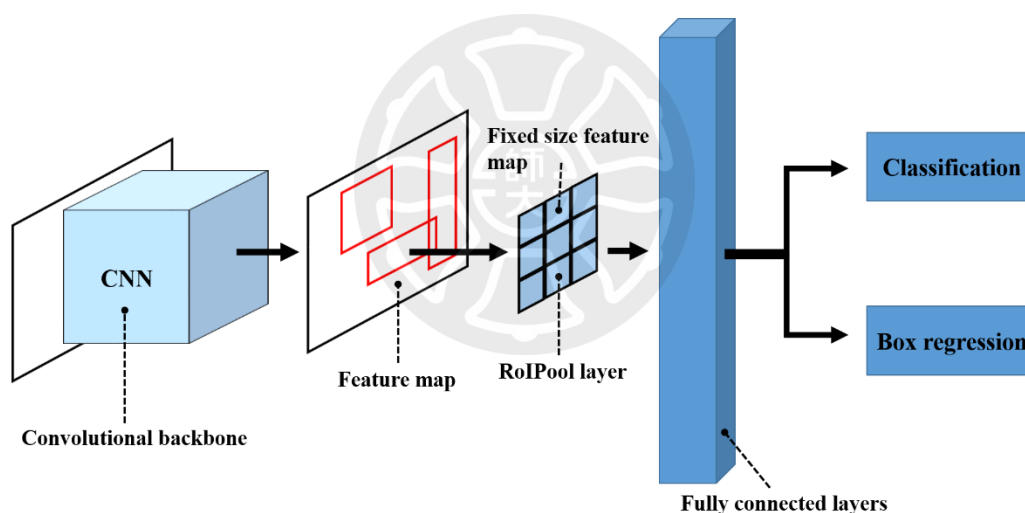


圖 3-6 Fast R-CNN 流程圖

與先前不一樣的地方是，R-CNN 在輸入圖片以後，需要做 2000 次的 CNN 來提取特徵圖，在這之中，有許多重複區域的計算，而 Fast-RCNN 只需要一次的 CNN 運算，從特徵圖中產生大約 2000 個候選框，再透過 RoI Pooling(Region of Interest Pooling)為後續的邊界框以及物件類別分類做準備，其過程如圖 3-6 至圖 3-7。

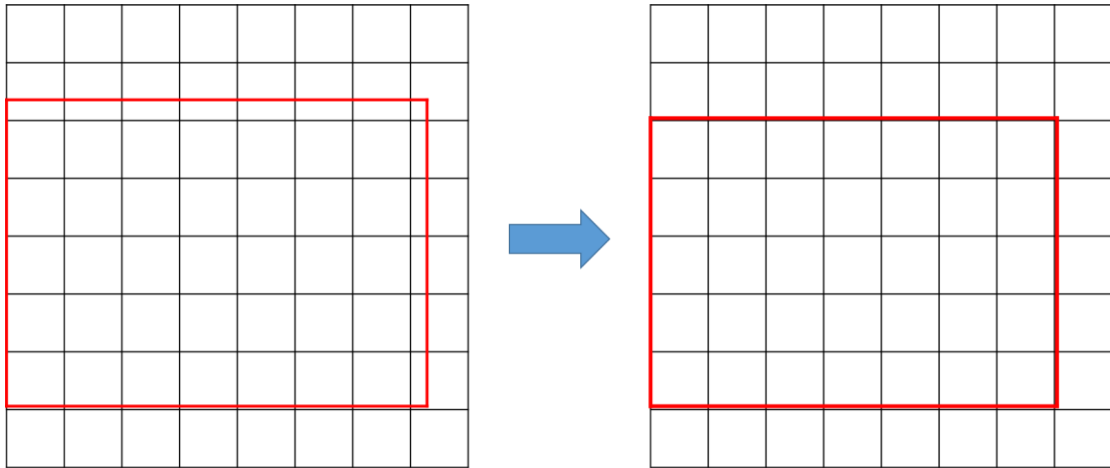


圖 3-7 RoI Pooling

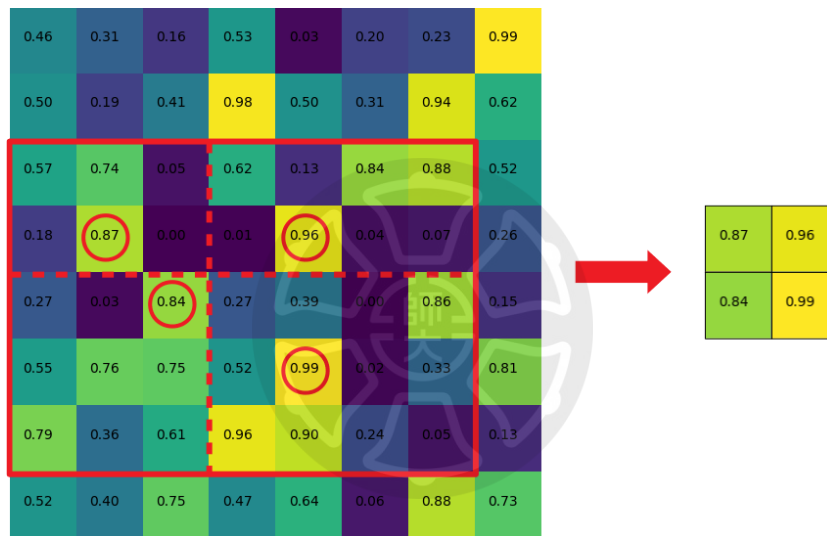


圖 3-8 RoI Pooling

RoI 的座標與長、寬、高通常會是小數，為了計算方便，會進行長寬數值的整數化(圖 3.6)。這個整數化的操作會導致一些偏差，影響到後續邊界框的精確度。倘若我們獲得了一張大小為 8×8 的特徵圖，而 RoI 為圖 3-7 紅色粗線條的區域，目標的池化大小為 2×2 時，大小為 7×5 的 RoI 因為無法整除而被分配成圖 3-8 虛線表示的型態。每一個 RoI(Region of Interest) 會被池化成固定大小的特徵圖，接著拉直(Flatten)轉為特徵向量，與全連接層(Fully connected layer) 連接，取代了 R-CNN 中的 SVM 分類器，來進行物件的分類。與由三個模型建構的 R-CNN 相比，Fast-RCNN 僅需一個模型便能夠達成特徵提取、物件分類、以及邊界框的生

成，因此所需的訓練時間也比較短。但即便如此，Fast R-CNN 在產生候選框所使用的方式仍然是 Selective Search 演算法，這一個步驟是比較需要時間的，使得在處理一張照片所需的時間大約為 2 秒，對於實時影像偵測的任務來說，仍然不夠理想。

3.5 Faster R-CNN

Faster R-CNN 是 Fast R-CNN 的優化[21]，兩者最主要的差別在於生成候選框的方式，解決了 Selective Search 過於花費時間的問題。Faster R-CNN 的架構如圖 3-9。

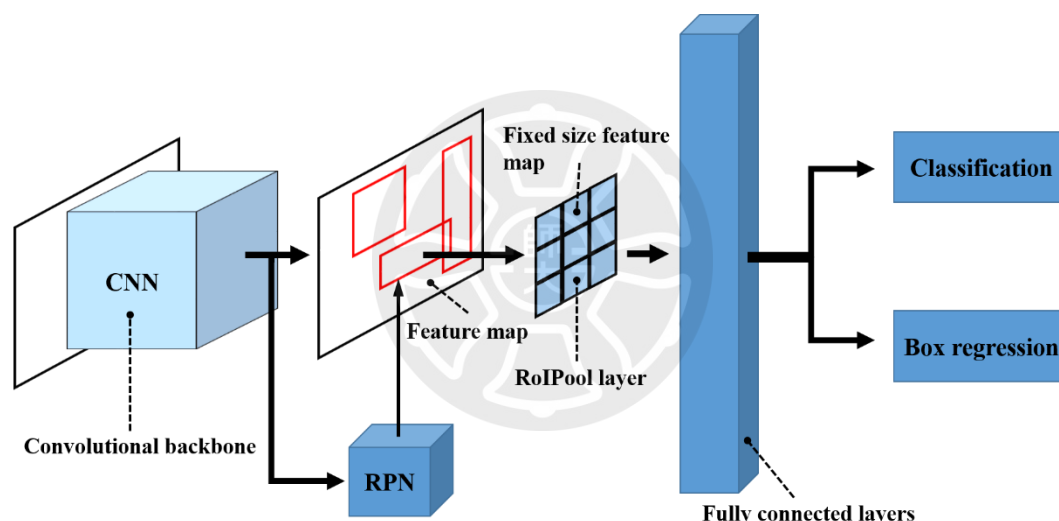


圖 3-9 Faster R-CNN 流程圖

其中 RPN (Region Proposal Network) 為處理 Region Proposal 的一個小網路架構，RPN 會在特徵圖上的每一個像素點形成 Anchors，依據這個 Anchors，生成不同大小比例的矩形，文獻中的矩形的長寬比 W:H 為 1:1、1:2、2:1，如圖 3-10。這樣的設計可以達到在物件檢測中多尺度的檢測。依據特徵圖上各個 Anchors 所產生的矩形，在 RPN 網路會分類這些候選框哪些是較有可能包含物件的框作為最終的候選框，後續的分類以及 Bounding Box 的回歸校正與先前提及的 Fast R-CNN 相同。

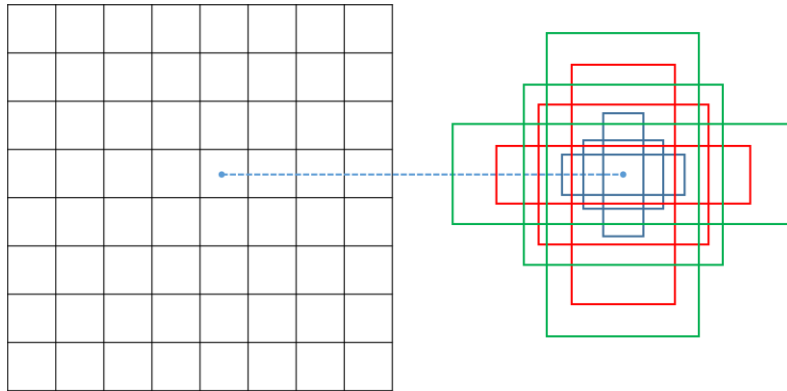


圖 3-10 Anchors

3.6 Mask R-CNN

Mask R-CNN 的架構與 Faster R-CNN 非常類似，如圖 3-11。

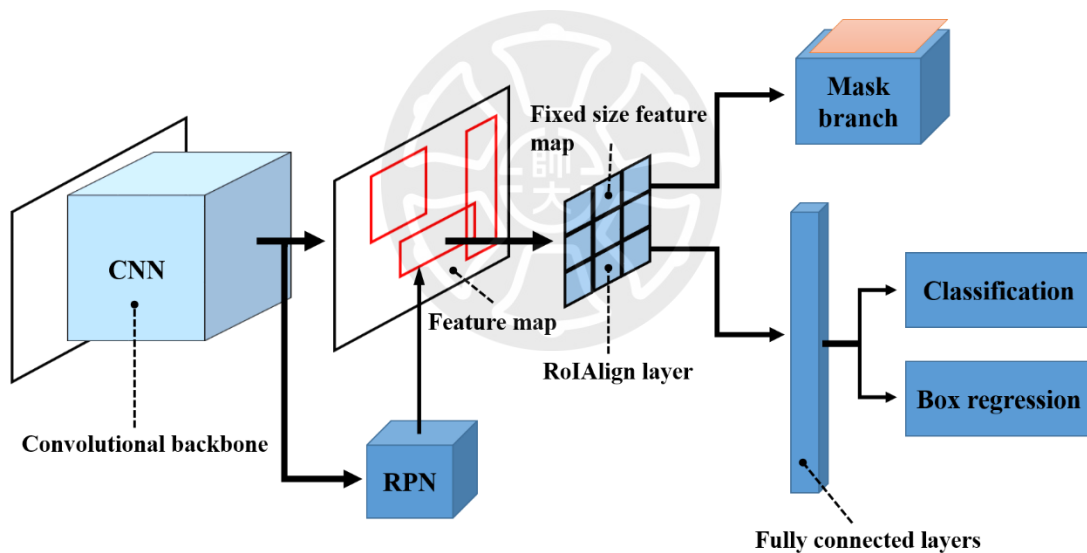


圖 3-11 Mask R-CNN 流程圖

有變化的地方在於 RoI Pooling 的地方換成了 RoI Align，改善了原本 RoI Pooling 取整數化造成物件座標位置的誤差[9]。其過程會利用雙線性插值法，示意圖如圖 3-12。

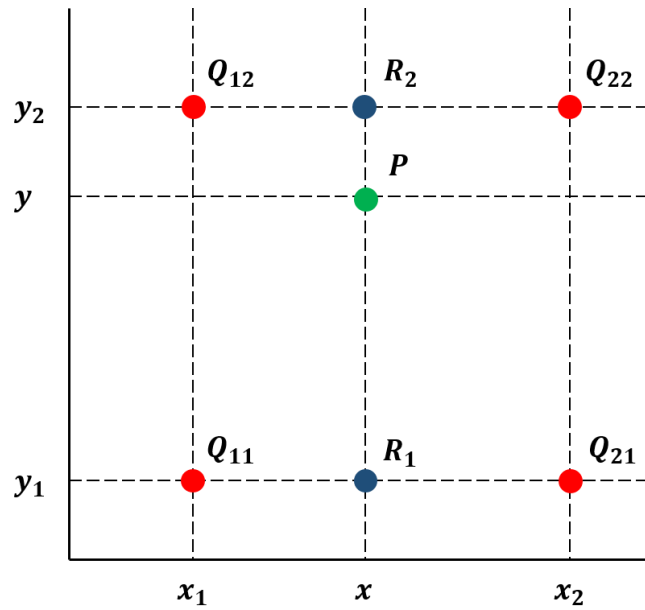


圖 3-12 雙線性內插示意圖

如果我們想得到未知函數 f 在點 $P(x,y)$ 的數值，並假設已經知道函數 f 在 Q_{11} 、 Q_{12} 、 Q_{21} 、 Q_{22} 的數值，點 $P(x,y)$ 的數值便能透過下列的式子，分別先從 x 方向做線性插值算出 R_1 、 R_2 ，再由 y 方向做線性插值將 P 計算出來，如式 3.1 至式 3.3。

$$f(x, y_1) \approx \frac{x_2 - x}{x_2 - x_1} f(Q_{11}) + \frac{x - x_1}{x_2 - x_1} f(Q_{21}) \quad (\text{式 3.1})$$

$$f(x, y_2) \approx \frac{x_2 - x}{x_2 - x_1} f(Q_{12}) + \frac{x - x_1}{x_2 - x_1} f(Q_{22}) \quad (\text{式 3.2})$$

$$f(x, y) \approx \frac{y_2 - y}{y_2 - y_1} f(x, y_1) + \frac{y - y_1}{y_2 - y_1} f(x, y_2) \quad (\text{式 3.3})$$

RoI Align 利用雙線性插值獲取小數點座標點的像素數值，如圖 3-13。

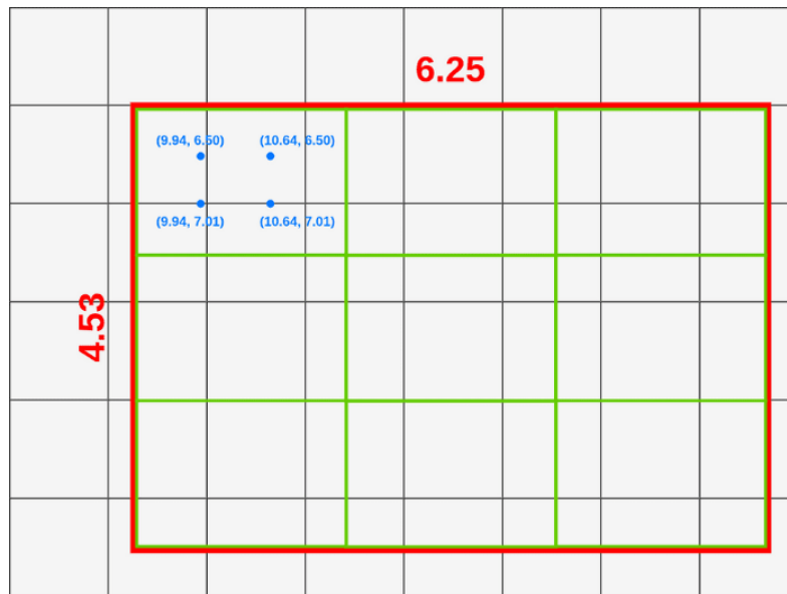


圖 3-13 RoI Align

假設特徵圖的大小為 8×6 ，RoI 的大小為 6.25×4.53 ，且欲池化的大小為 3×3 ，會將 RoI 分成九個小塊，而每個小區塊皆會有四個均分的取樣點，經由雙線性插值法，即能計算出這四個點的像素值，接著進行 Max Pooling 便能取得最終 RoI Align 的結果。Mask 產生的方法則是跟先前提到的語義分割利用上採樣轉置卷積的方式來得到 Mask 的預測。

3.7 實例分析對象之質體介紹

質體是指在細胞的染色體之外，能夠自主複製的 DNA 分子。質體的 DNA 長度從數千鹼基對至數十萬鹼基對(base pair)都有，存在於許多細菌以及酵母菌等生物中，且一個細胞裡可以有一種或是數種的質體的存在。質體會因為其複製原點的不同而有所區別，而複製原點會決定質體的複製方式及其在細胞中的套數。常見的質體種類與套數如下：單套數質體 F(single copy)[22]、低套數質體 R1(1~5 copies)[23]、多套數質體 pBR322(~20 copies)[24]、pUC19(~100 copies)[25]。相較於染色體紀錄了細胞生存必需的訊息，質體則不是，且質體的複製與基因表達會造成細胞內的生理負擔(metabolic burden)。因此，為了被保留於細胞中，質體必

須提供宿主細胞一些特殊機能，使宿主細胞擁有生長優勢，而將質體保留下來。常見特殊機能如：抗藥性、代謝能力、致病傳染力[26-28]。當環境改變且質體對於宿主細胞不再有生長優勢時，在細胞分裂的過程中有可能會發生質體遺失(plasmid loss)的情形，產生無質體的細胞。由於無質體的細胞不需要承受有質體時的生理負擔，因此有較快的生長速率。隨著時間增長，無質體細胞的比例也會隨之增加，質體也因而從細胞中丟失。質體在細胞世代之間穩定傳遞的策略主要為環境篩選與降低質體丟失率兩類。環境篩選的主要方式為提供抗藥性基因使宿主細胞能在有抗生素的環境下存活；降低質體丟失率的策略則有低套數質體的主動分離機制(active partition mechanism)、以質體的多套數(high-copy number)分散於細胞中[29]。低套數質體可以透過主動分離機制，主動將質體分配至子代細胞，達成質體的維持與傳遞，多套數質體則沒有類似的機制，目前多套數質體的穩定維持機制並不明確。



第四章 實驗設計與原理

本論文中的實驗總共包含兩大主軸，一部分為細胞影像分割模型的訓練，另一部分為大腸桿菌中質體分離的實例分析。本章節主要為實例分析樣品的設計與原理介紹。關於影像分割模型的訓練，則會在實驗材料與方法中進行說明。

由於多套數質體會分布於類核排開的空間，在細菌端點的位置形成質體的群聚，這些群聚可能是由轉錄或轉譯所導致。在細胞分裂的過程中，小群聚會遠離原本群聚的位置，將質體分配至子細胞[30]。為了瞭解多套數質體分配的情形，我們採取長時間的細胞影像縮時攝影實驗，觀察質體經過多次的細胞分裂以後，親代細胞與子代細胞所繼承的質體數量變化，經由數據統計來瞭解質體的分配行為。

為了在顯微鏡下觀察到質體，以及轉錄抑制與否對於質體群聚的影響，我們設計了轉錄抑制系統並採用了螢光標記的技術進行觀測。

在質體方面，我們選用螢光抑制操作系統(fluorescent repressor operator system, FROS)來標記質體[31]。FROS 是將操作子陣列(operator array)插入到質體的基因序列，再以螢光抑制蛋白(fluorescent repressor)與操作子陣列鍵結，達成質體的螢光標記在細胞的類核方面，我們採用 HupA 的全細胞螢光顯微術，觀察類核的位置與變化。

本章節會介紹樣品設計的原理，4.1 節說明螢光抑制操作系統的原理；4.2 節針對轉錄抑制系統進行介紹；4.3 節介紹類核標記的方法。

4.1 質體螢光標記-FROS

FROS 是由螢光抑制蛋白與操作子陣列所組成，常見的組合配對有乳糖抑制蛋白 LacI^{adi} 與操作子 *lacO*。抑制蛋白 LacI^{adi} 能夠與操作子序列 *lacO* 進行專一性結合。同時，我們也透過融合蛋白技術(fusion protein approach)，將螢光蛋白

(fluorescence protein)的基因序列與抑制蛋白的基因序列 $lacI^{adi}$ 銜接，表達出有螢光標記功能的抑制蛋白。本實驗中，我們選用紅色螢光蛋白 mCherry 與 $LacI^{adi}$ 結合，示意圖如圖 4-1。

pLacOIC24

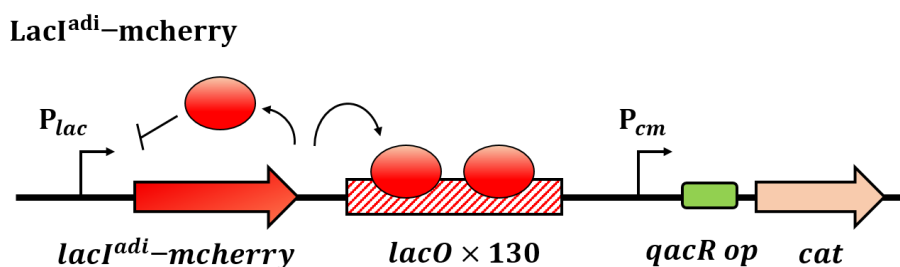


圖 4-1 質體螢光標記 FROS 設計

關於螢光抑制表達的控制，我們選擇了啟動子 P_{lac} ，在 P_{lac} 中具有兩個操作子 $lacO$ 序列，當 P_{lac} 上的 $lacO$ 序列與 $LacI^{adi}-mCherry$ 結合，此啟動子便會失去功能停止表達。由於質體上的 P_{lac} 與 $lacO$ 序列陣列皆有機會與 $LacI^{adi}-mCherry$ 進行專一性結合，如此的設計便能夠讓整個系統達成自回授方式調控螢光抑制蛋白的表現量，產生出足夠的標記螢光蛋白，同時也不造成細胞中標記螢光蛋白表達過多導致螢光背景增加的情形。

當質體中重複的 $lacO$ 序列陣列越長，即代表有越多與 $LacI^{adi}-mCherry$ 結合的位置，而獲得螢光對比度越高的影像。但是越長的 $lacO$ 序列陣列會造成越大的細胞生理負擔，且易造成序列重組，形成長度所短的操作子陣列重複序列。因此，我們所選用的穩定操作子陣列長度為 130 個重複的 $lacO$ 序列(4.3kbp)。

4.2 抑制設計

根據前文所述，細胞中多套數質體的聚集可能是由轉錄或轉譯所導致。因此我們控制抗生素基因的表達，達到關閉轉錄的運行。我們採用抑制子與操縱子的配對系統，藉由產生抑制蛋白與操縱子結合，達到關閉轉錄的效果，其示意圖如

圖 4-2。我們會在啟動子 P_{cm} 的序列中加入 QacR 抑制蛋白的操縱子基因，也就是 qacR operator，並另外使用阿拉伯糖誘導系統，以啟動子 P_{BAD} 決定 QacR 的表達，然後將兩個質體轉殖到同一個細胞當中。當環境中沒有阿拉伯糖時，抑制蛋白 AraC 會與啟動子 P_{BAD} 結合，使後面的 QacR 抑制蛋白無法被表達出來，這個時候 P_{cm} 仍然正常進行轉錄，將抗藥性蛋白表達；當我們加入阿拉伯糖到環境中時，抑制蛋白 AraC 會與阿拉伯糖結合，使其無法與 P_{BAD} 鍵結，QacR 蛋白因而被表現出來。QacR 抑制蛋白便會與 qacR 操縱子結合，讓 P_{cm} 的轉錄受到阻礙，停止轉錄。質體 placOIC24 上會進行轉錄的部分除了 P_{cm} 跟 P_{lac} ，還有 origin 複製原點。由於 P_{lac} 會受到自回授的調控，轉錄會被關閉，而 origin 的轉錄並不是頻繁的發生，所以當我們關閉 P_{cm} 的轉錄後，質體 placOIC24 基本上就沒有在進行轉錄了。

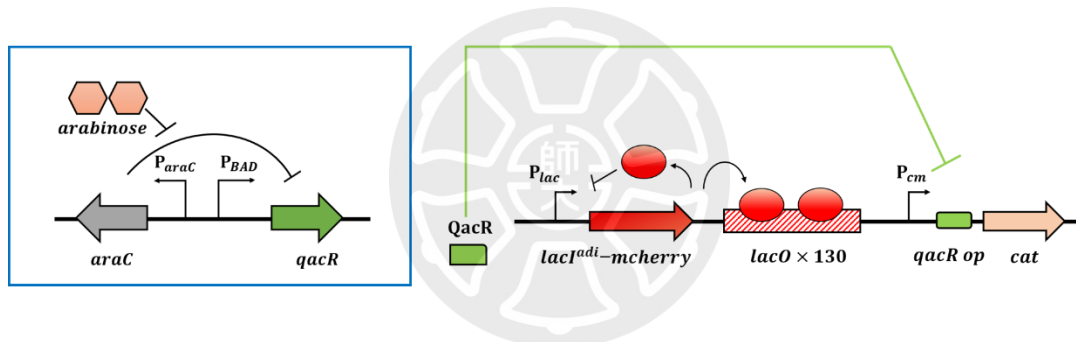


圖 4-2 質體轉錄抑制設計

4.3 類核螢光標記

類核黏附蛋白(nucleoid-associated proteins, NAPs)是多種參與染色體組織(chromosomal organization)與轉錄的蛋白，其成員包括 HU、Fis、H-NS。為了在細胞中看見染色體的位置與分佈，我們透過 HU 的次單元蛋白 HupA 進行標記，將基因 *hupA* 與青色螢光蛋白 *mturquoise2* 銜接，如圖 4-3，表達出帶有螢光蛋白的 HupA-mTurquoise2，以此標記染色體。

p15AA-PQH2

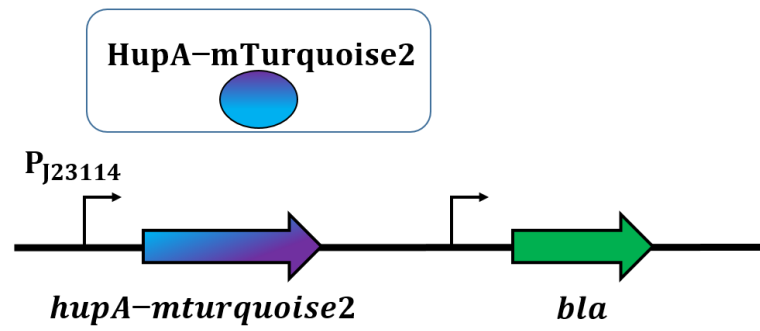


圖 4-3 類核螢光標記設計



第五章 實驗材料與方法

如前文所提及，本論文的實驗有兩大主軸，一是細胞影像分割模型的訓練，二是大腸桿菌中多套數質體的分離。關於細胞影像分割部分為模型的訓練影像資料集的取得與訓練結果的評估。關於大腸桿菌中多套數質體分離的實例分析實驗有三個部分，單一質體螢光標記分佈、細胞內多套數質體數量分佈、抑制轉錄後，細胞內多套數質體數量分佈。在單一質體螢光標記分佈的實驗中，我們量測質體螢光標記的基本亮度，作為螢光標記亮度與質體數量的計算標準。細胞內多套數質體數量分佈，觀察細胞分裂後，親代細胞與子代細胞繼承的質體數量，並與抑制轉錄後的情境進行比較。

本章節主要說明上述實驗的材料與方法，細胞影像分割模型的部分，會說明訓練環境、資料集的準備、資料增強、評估方法。接著會介紹質體與菌株的製備、實驗光學儀器、實驗觀察菌株的培養與操作、影像拍攝條件與分析。

5.1 深度學習模型

在訓練深度學習模型之前，有許多事前的準備，包含訓練環境的建置、資料準備及模型訓練過後的表現評估等等。於 5.1 節的部分，會依序說明上述所提及的事項。

5.1.1 訓練環境

1. 處理器：Intel i7-10700K
2. 顯示卡：NVIDIA GEFORCE RTX 3060
3. 記憶體：64G
4. 作業系統：Windows 10 64bit
5. 程式環境：Python 3.8、Tensorflow、CUDA

5.1.2 資料集

本論文所使用的影像資料集均是自行拍攝細菌細胞的白光源影像。我們以 LB 培養液為溶劑，與洋菜膠粉末(SeaPlaque[®] Agarose low melting temperature agraose)配製濃度為 2% 的洋菜膠溶液，取 20 μ l 滴在塗有真空油的 25 \times 75 載玻片 (VMR micro slides)，再蓋上 18 \times 18 mm 蓋玻片(Dekgläser cover glasses)。等待 40~60 分鐘，在洋菜膠固定以後，取下附著洋菜膠的蓋玻片，取 0.3 μ l 的菌液，滴在洋菜膠上，接著覆蓋於 22 \times 22 mm 載玻片(GOLD SEAL COVER GLASS)上，並將其置於顯微鏡的物鏡上方進行拍攝。當我們拍攝了細胞白光源影像後，會透過 SuperSegger 產生出細胞分割的標註資料，如圖 5-1 與圖 5-2 所示。圖 5-2 中黑色的區域為背景，被標記成 0；白色的區域為細胞，標記為 1。由於 SuperSegger 所產生的細胞分割結果並不是完美的，經常在細胞邊緣產生破碎的圖像，或是角落的細胞無法被分割出來，如圖 5-3 紅圈處。因此我們透過修圖軟體 FireAlpaca，人工手動去修正這些錯誤的分割結果。我們總共收集了約 1500 張的細胞影像及其修正過後的標註影像作為資料集，並以 8:2 的比例將其分為訓練資料(training data)與驗證資料(validation data)。

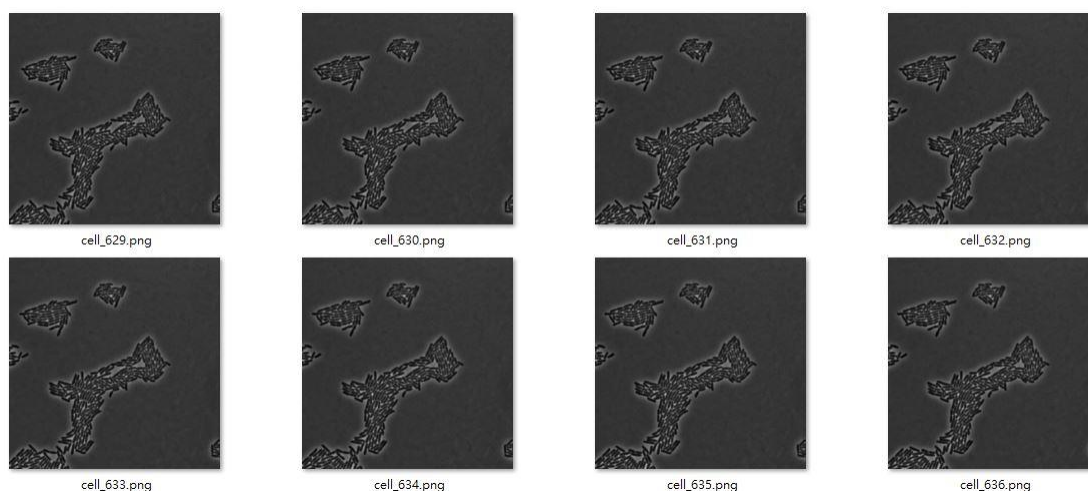


圖 5-1 細胞原始影像

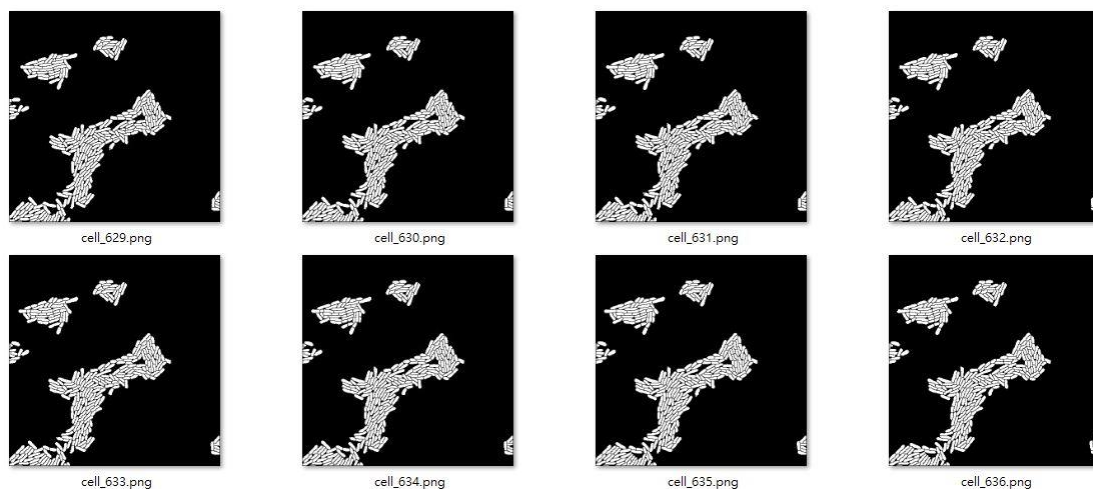


圖 5-2 細胞分割標註資料

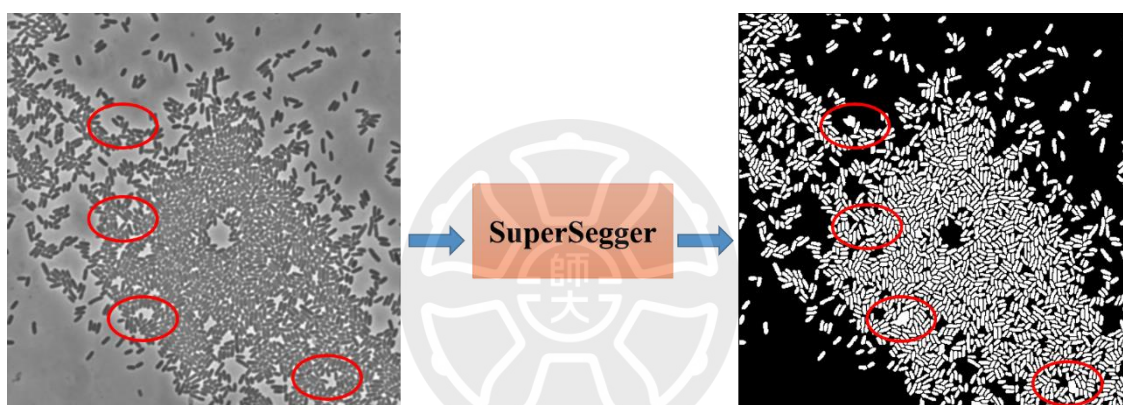


圖 5-3 SuperSegger 錯誤示意圖

5.1.3 資料增強(Data Augmentation)

此小節會對我們進行資料增強的方法進行說明。由於深度學習模型往往需要大量的訓練資料，而訓練資料取得的可能非常耗時與不容易；亦或是資料不平衡的問題，例如簡單的資料數量大於困難資料的數量，讓資料不夠多樣性。在這樣的情況下，就無法訓練出一個好的模型。因此，我們使用資料增強的方式，來增加手上資料的數目及多樣性。

我們使用了 Python 的 Library `imgaug`[32]來進行資料增強，選用了水平翻轉、隨機旋轉、增加高斯雜訊、Random Cut Out、Elastic Transform。在對影像進

行資料增強的時候，會隨機選取一種或數種上述提及的變換方法。其變換的效果如圖 5-4。

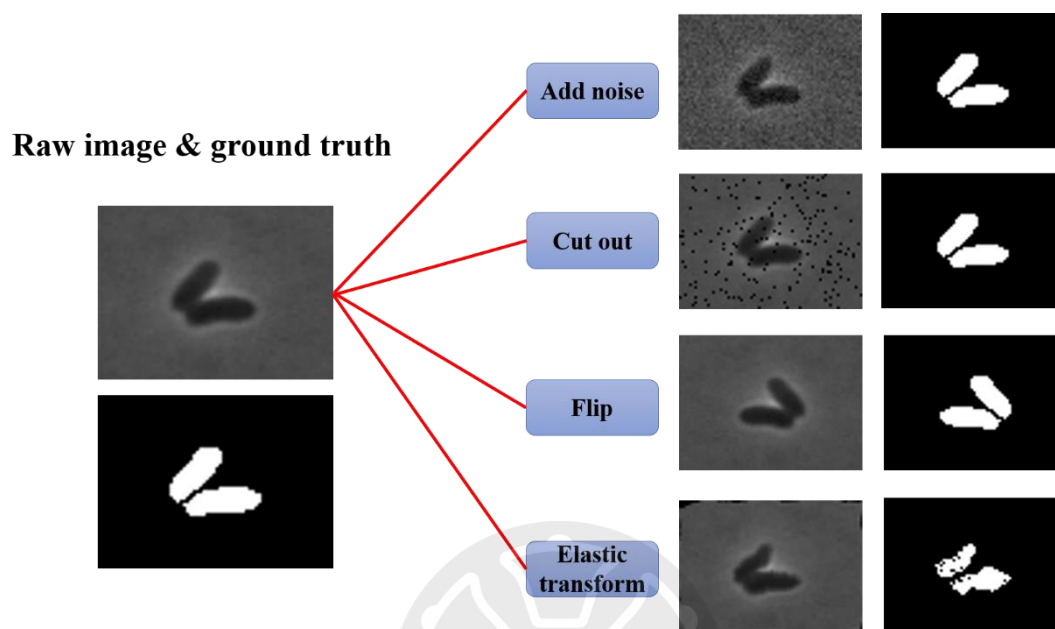


圖 5-4 資料增強效果

5.1.4 模型評估方法

當我們訓練完深度學習模型 Mask R-CNN 與 Unet 以後，需要對模型的表現結果進行評估。我們依照影像中的細胞數目與密度($\frac{\text{細胞總面積}}{\text{影像總面積}}$)，從 100 個(密度：0.012)、100~400 個(密度：0.085)、400~800 個(密度：0.144)、800 個以上(密度：0.401)，分成了四種測試難度。我們所採用的評估指標有混淆矩陣(Confusion Matrix)、F1-Score、IoU(Intersection over Union)，並記錄模型分別在 CPU 及 GPU 上運行的時間。本小節會依序說明各個評估指標。

5.1.4.1 混淆矩陣(Confusion Matrix)

在深度學習物件分類的任務中，混淆矩陣是一種能將模型表現可視化的一種工具，其示意圖如表 5.1。

表 5-1 混淆矩陣

混淆矩陣		真實值	
		Positive	Negative
預測值	Positive	TP	FP
	Negative	FN	TN

根據表 5.1，可以給出以下定義：

- TP (True Positive，真陽性)：即實際為 True，預測為 Positive。預測的結果與實際情況相同。
- TN (True Negative，真陰性)：即實際為 True，預測為 Negative。預測的結果與實際情況相同。
- FP (False Positive，偽陽性)：即實際為 False，預測為 Positive。預測的結果與實際情況不同。
- FN (False Negative，偽陰性)：即實際為 False，預測為 Negative。預測的結果與實際情況不同。

從混淆矩陣中，我們可以給出分類模型的精確率(Precision)、召回率(Recall)以及 F1-Score。他們的計算方法分別如式 5.1 至式 5.3。

$$\text{Precision} = \frac{TP}{TP+FP} \quad (\text{式 5.1})$$

$$\text{Recall} = \frac{TP}{(TP+FN)} \quad (\text{式 5.2})$$

$$\text{F1-Score} = 2 \frac{\text{Precision} \times \text{Recall}}{\text{Precision} + \text{Recall}} \quad (\text{式 5.3})$$

精確率(Precision)的重點為，在預測陽性的情況中正確預測的比率，比較在意預測為陽性的答對數量。而召回率(Recall)是針對原來的樣本中，陽性有多少被正確預測，即找到所有陽性的能力。F1-Score 為精確率與召回率的調和平均，能夠同時考慮這兩項數值，平衡地反映模型的精確度。

5.1.4.2 IoU (Intersection over Union)

Intersection over Union 是一種測量數據集中，檢測相應物體準確度的一個標準，示意圖如圖 5-5。IoU 的輸出為 0 到 1 之間的數值，數值愈高代表預測結果與真實答案愈接近。

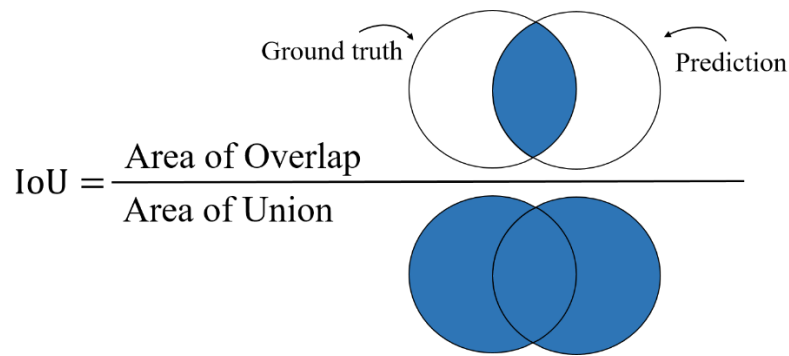


圖 5-5 IoU (Intersection over Union)

5.2 實驗樣品制備

在實例分析的實驗中，我們建構了三種質體，其基因型如表 5-2。5.2.1 節會說明各個質體的功用以及建構的方式。5.2.1 節中會介紹使用的菌株。

5.2.1 質體

5.2.1.1 pLacOIC 24

由質體 pLacIa 2-1 取得，其主要序列包含氯黴素(chloramphenicol)抗藥性基因 *cat* 及紅色螢光基因 *mcherry*。為了達成抑制轉錄的功效，我們利用 PCR 技術修改了抗藥性蛋白啟動子 P_{cm} 的序列，在其下游加上 QacR 抑制蛋白的操縱子序列，建構出質體 pLacIa9-1。我們將 pLacIa9-1 作為載體，加入操縱子陣列 *lacO*。其中，*lacO* 陣列的來源為質體 pLacOIG6，由限制酶 BamHI 與 KpnI 取得，與來自 pLacIa9-1 的載體組成 pLacOIC24。

5.2.1.2 pZC320-lacO.b

由質體 pZC320 以 PCR 技術合成複製原點 mini-F，與質體 pLacOIC2.bx 的限制酶 Sma1/Nhe1 切割片段 $P_{lac}::lacI^{adi}-mcherry::lacO \times 130$ 組成質體 pZC320-lacO.b。

5.2.1.3 p15AA-PQH2

源自於質體 p15AA-phlFH.tq，其序列包含氨苄青黴素(ampicillin)抗藥蛋白乙內醯胺分解酶 β -lactamase的基因 *bla*、類核標記功能之螢光基因 hupA-mturquoise2、阿拉伯糖誘生產抑制蛋白 PhlF 之系統。我們以此質體做為載體，在 *phlF* 基因的下游，加入 QacR 抑制蛋白基因序列， $P_{BAD}::phlF::qacR$ ，建構出質體 p15AA-PQH2。只有在環境中存在阿拉伯糖時，抑制蛋白 QacR 才會被表達出來。

5.2.2 菌株

我們的實驗均以大腸桿菌 BW25113 做為勝任細胞，將上述 5.2.1 節所提及的質體，依照實驗的需求轉植至勝任細胞當中。

在觀察單一質體螢光亮度的實驗中，我們會將質體 pZC320-lacO.b 轉植至勝任細胞當中，代號為 BWMC。為了同時觀察到螢光標記質體的數量以及調控轉錄，我們將兩種質體 pLacOIC 24、p15AA-PQH2 轉植於同一菌株當中，代號為 BWP1。我們可以藉由阿拉伯糖調控轉錄的抑制，觀察質體聚集跟子代細胞分配到的質體數量變化情形。

5.3 光學儀器

我們在觀察實驗中所使用的顯微鏡為 Olympus IX83 倒立式全電動螢光光學顯微鏡，物鏡為 Olympus UPlanfl 100x/1.3 Oil；接收光子訊號端使用的是電子倍

增電荷耦合元件相機(EM-CCD digital camera, HAMAMATSU ImageEM)。在長時間細胞縮時錄影的實驗中，我們所使用的螢光蛋白為 mCherry 與 mTurquoise2，因此我們選用的光源波長為 550nm 及 435nm。光源來自於 CoolLED pE-4000 產生的 LED 光源。在單一質體螢光標記分佈的實驗中，波長為 550nm 的 LED 光源出光功率為 256.6 μ W。在細胞內多套數質體數量分佈的實驗中，波長為 550nm 的 LED 光源出光功率為 37.3 μ W、波長為 435nm 的 LED 光源出光功率為 79.3 μ W。

5.4 實驗操作與分析

我們總共有三個子實驗，分別為單一質體螢光標記分佈、細胞內多套數質體數量分佈、抑制轉錄後，細胞內多套數質體數量分佈。本節會說明各個實驗的菌株培養跟拍攝條件，以及各實驗的影像分析方法。

5.4.1 單一質體螢光標記分佈

1. 操作步驟

- a. 將菌株 BWMS 稀釋 1/1000 倍，培養在 ampicillin 濃度 100 μ g/ml 的 LB (Lysogeny broth) 培養液中，置於 30 $^{\circ}$ 的培養箱，轉速為 240 rpm 培養 18-20 小時。
- b. 將培養過後的菌液稀釋 1/30~1/40 倍，此時以分光光度計(Thermo scientific Multiskan go) 測量菌液在波長 600 奈米的吸光度，OD₆₀₀ 約為 0.08~0.1。再以半乳糖(galactose) 濃度 0.4% 的 EZ 培養液(EZ rich defined medium)，於 30 $^{\circ}$ 的培養箱重新培養菌液至 OD₆₀₀ 約為 0.3~0.4。
- c. 當菌液的 OD₆₀₀ 約為 0.3~0.4 時，將菌液放入離心機中，以 2000 rpm 離心 3 分鐘，並倒去上清液。
- d. 以 EZ 培養液為溶劑，與洋菜膠粉末(SeaPlaque[®] Agarose low melting temperature agarose) 配製濃度為 2% 的洋菜膠溶液，取 20 μ l 滴在塗有真空油的 25 \times 75 載玻片(VMR micro slides)，再蓋上 18 \times 18 mm 蓋玻片(Dekgläser cover glasses)。等待 40~60 分鐘，在洋菜膠固定以後，取下附著洋菜膠的蓋玻片，取 0.3 μ l 的菌液，滴在洋菜膠上，接著覆蓋於 22 \times 22 mm 載玻片(GOLD SEAL COVER GLASS)上。並將其置於顯微鏡的物鏡

上方，進行觀察。

- e. 分別以白光源和激發光波長為 550 nm LED 光源，照射樣品 BWMS，每張影像曝光時間為 0.1 秒。
- f. 改變觀察的視野位置，重複步驟 e.，取得多個細胞的白光影像及螢光影像。

2. 影像分析

我們經由白光確定細胞的位置，利用深度學習演算法 Unet，將細胞從拍攝的照片中分割出來。透過螢光影像與細胞分割結果疊加，便能取得細菌內螢光亮點的位置。將這些螢光亮點的數值進行統計，以此決定單一質體的螢光亮度。

5.4.2 細胞內多套數質體數量分佈

1. 操作步驟

- a. 將菌株 BWP1 稀釋 1/1000 倍，培養在 ampicillin 濃度 100 μ g/ml、chloramphenicol 濃度 34 μ g/ml 的 LB 培養液中，置於 30 $^{\circ}$ 的培養箱，轉速為 240 rpm 培養 18-20 小時。
- b. 將培養過後的菌液稀釋 1/30~1/40 倍，此時以分光光度計(Thermo scientific Multiskan go)測量菌液在波長 600 奈米的吸光度，OD₆₀₀ 約為 0.08~0.1。再以半乳糖(galactose)濃度 0.4%、ampicillin 濃度 100 μ g/ml、chloramphenicol 濃度 34 μ g/ml 的 EZ 培養液(EZ rich defined medium)，於 30 $^{\circ}$ 的培養箱重新培養菌液至 OD₆₀₀ 約為 0.3~0.4。
- c. 當菌液的 OD₆₀₀ 約為 0.3~0.4 時，將菌液放入離心機中，以 2000 rpm 離心 3 分鐘，並倒去上清液。
- d. 以半乳糖(galactose)濃度 0.4% 的 EZ 培養液為溶劑，與洋菜膠粉末(SeaPlaque[®] Agarose low melting temperature agarose)配製濃度為 2% 的洋菜膠溶液，取 20 μ l 滴在塗有真空油的 25 \times 75 載玻片(VMR micro slides)，再蓋上 18 \times 18 mm 蓋玻片(Dekgläser cover glasses)。等待 40~60 分鐘，在洋菜膠固定以後，取下附著洋菜膠的蓋玻片，取 0.3 μ l 的菌液，滴在洋菜膠上，接著覆蓋於 22 \times 22 mm 載玻片(GOLD SEAL COVER GLASS)上。並將其置於顯微鏡的物鏡上方，進行觀察。
- e. 分別以白光源和激發光波長為 550 nm、435 nm LED 光源，藉由光學閘門間隔 2 秒輪流開啟閘門，依序以不同光源照射樣品。白光源影像曝光時間為 0.03 秒；螢光影像曝光時間皆為 0.1 秒，取得三種光源的連續影像，每組白光源以及螢光影像的間隔時間為 180 秒，連續拍攝 360 分鐘。

2. 影像分析

我們經由白光確定細胞的位置，利用深度學習演算法 Unet，將細胞從拍攝的照片中分割出來。透過螢光影像與細胞分割結果疊加，便能取得細菌內螢光數值，計算出細胞內質體的數量。並利用 Python 建構出追蹤細胞的演算法，記錄每個細胞內質體數量隨時間的變化。

5.4.3 抑制轉錄後，細胞內多套數質體數量分佈

1. 操作步驟

- a. 將菌株 BWP1 稀釋 1/1000 倍，培養在 ampicillin 濃度 100 μ g/ml、chloramphenicol 濃度 34 μ g/ml 的 LB 培養液中，置於 30 $^{\circ}$ 的培養箱，轉速為 240 rpm 培養 18-20 小時。
- b. 將培養過後的菌液稀釋 1/30~1/40 倍，此時以分光光度計(Thermo scientific Multiskan go)測量菌液在波長 600 奈米的吸光度，OD₆₀₀ 約為 0.08~0.1。再以半乳糖(galactose)濃度 0.4%、阿拉伯糖濃度 0.02% 的 EZ 培養液(EZ rich defined medium)，於 30 $^{\circ}$ 的培養箱重新培養菌液至 OD₆₀₀ 約為 0.3~0.4。
- c. 當菌液的 OD₆₀₀ 約為 0.3~0.4 時，將菌液放入離心機中，以 2000 rpm 離心 3 分鐘，並倒去上清液。
- d. 以半乳糖(galactose)濃度 0.4%、阿拉伯糖濃度 0.02% 的 EZ 培養液為溶劑，與洋菜膠粉末(SeaPlaque[®] Agarose low melting temperature agarose)配製濃度為 2% 的洋菜膠溶液，取 20 μ l 滴在塗有真空油的 25 \times 75 載玻片(VMR micro slides)，再蓋上 18 \times 18 mm 蓋玻片(Dekgläser cover glasses)。等待 40~60 分鐘，在洋菜膠固定以後，取下附著洋菜膠的蓋玻片，取 0.3 μ l 的菌液，滴在洋菜膠上，接著覆蓋於 22 \times 22 mm 載玻片(GOLD SEAL COVER GLASS)上。並將其置於顯微鏡的物鏡上方，進行觀察。
- e. 分別以白光源和激發光波長為 550 nm、435 nm LED 光源，藉由光學閘門間隔 2 秒輪流開啟閘門，依序以不同光源照射樣品。白光源影像曝光時間為 0.03 秒；螢光影像曝光時間皆為 0.1 秒，取得三種光源的連續影像，每組白光源以及螢光影像的間隔時間為 180 秒，連續拍攝 360 分鐘。

2. 影像分析

同 5.4.2 節之影像分析方法。

表 5-2 質體表

質體	說明	抗藥基因
pZC320-lacO.b	mini-F, $P_{lac}::lacI^{adi}-mcherry::lacO$ repeats	<i>bla</i>
p15AA-PQH2	p15A, $P_{J23119}::B0034::hupA-mturquoise2$, $araC::P_{arac}::P_{BAD}::phlF::qacR$	<i>bla</i>
pLacOIC24	ColE1, $P_{lac}::lacI^{adi}-mcherry::lacO$ repeats	<i>cat</i>

表 5-3 菌株表

菌株	說明	抗藥基因
BW25113	$(lacI^q, rrrnB_{T14}, \Delta lacZ_{WJ16}, hsdR514,$ $\Delta araBAD_{AH33}, \Delta rhaBAD_{LD78})$ derived from <i>E.coli</i> K-12 strain	non
BWMC	BW25113/pZC320-lacO.b	<i>bla</i>
BWP1	BW25113/ p15AA-PQH2/ pLacOIC24	<i>bla</i> <i>cat</i>

第六章 實驗結果與討論

為了能夠讓我們在細胞縮時攝影有出色的分割結果，我們訓練了兩種深度學習模型，比較他們之間的分割成效，從中選擇效果最好的模型，作為質體實例分析實驗中，影像處理的重要基礎。

本章節主要分為兩大部分，一為深度學習模型訓練過後的表現評估，二為大腸桿菌中質體分配的實例分析。在第二部分的實驗中，有三個子實驗。我們首先測量單一質體 pZC320-lacO.b 的螢光亮度分布，以此決定在多套數質體的細胞中，質體 pLacOIC24 的數目。我們透過長時間的細胞縮時錄影，觀察細胞中質體分配的情形，以及在阿拉伯糖系統抑制轉錄的情況下，質體的分配情形是否有所不同。

6.1 深度學習模型評估結果

在 5.1.4 小節中，我們介紹了深度學習模型的評估方法。我們所採用的評估指標有精確率(Precision)、召回率(Recall)、F1-Score、IoU(Intersection over Union)，並記錄模型分別在 CPU 及 GPU 上運行的時間。除此之外，我們也對測試的資料進行分等，依照單張影像中的細胞密度，分成了四種難度。圖 6-1 至圖 6-4 為 SuperSegger、Mask R-CNN、Unet 在四種難度測試情況下的評估結果；圖 6-6 至圖 6-7 為模型在 CPU 及 GPU 上的運算時間紀錄。

從測試的結果中我們可以得知，在簡單場景下，也就是照片中細胞密度較低的時候，三個模型對於細胞分割，都有不錯的表現。然而，隨著資料難度的提升，Mask R-CNN 在精確率及召回率都下降了許多，尤其是召回率，下降至 0.275。如 5.1.4 小節中所述，召回率是針對原來的樣本中，陽性有多少被正確預測。對 Mask R-CNN 而言，低的召回率代表模型沒辦法將照片中所有的細胞分割出來，會有遺漏的情況發生。SuperSegger 雖然能夠分割出細胞，但也有與 Mask

R-CNN 相同的問題，在越困難的資料也會出現遺漏細胞或是分割後的細胞有破碎的狀況發生。此外，由於 SuperSegger 是傳統影像處理搭配深度學習模型，且開發者所編寫的程式碼並不支援在 GPU 上運行，使得細胞分割的任務只能透過 CPU 去運算，缺少了平行運算的優勢，花費的運算時間較多，且也會隨資料的困難程度而增加。相較於另外兩種模型，Unet 的各項評估指標皆維持在高水平的狀態，在稠密的細胞場景下，不僅能夠正確辨識細胞，也能將所有細胞分割出來。Unet 在 CPU 及 GPU 上的運算時間與 SuperSegger 及 Mask R-CNN 相比，所耗費的時間相當短。

關於 Mask R-CNN 表現能力下降的原因，可能是因為他本身是一個較為龐大的神經網路模型，且需要產生許多的候選框並進行篩選，才會進到像素的分割及分類，如此一來，當照片的細胞密度提升時，沒有被候選框定位到的細胞即會被遺漏。相對而言，Unet 沒有提取候選框的步驟，而是直接像素進行分類，雖然少了物件定位的功能，但是計算量並不如 Mask R-CNN 一樣龐大，因此除了在運行上所需時間比較短以外，細胞遺漏發生的機會也比較低。SuperSegger 在進入神經網路處理的環節前，是先透過傳統影像處理將影像進行二值化，因此對於細胞影像的品質會有一定的要求，倘若一張影像有一些不規則的亮點或黑點，即有可能使最終的辨識結果產生一些錯誤。

綜觀四個測試難度的評估結果，Unet 為這三個影像分割模型中，表現最好的模型。因此，我們會選擇 Unet 作為我們在質體實例分析實驗中，影像處理的重要基礎。

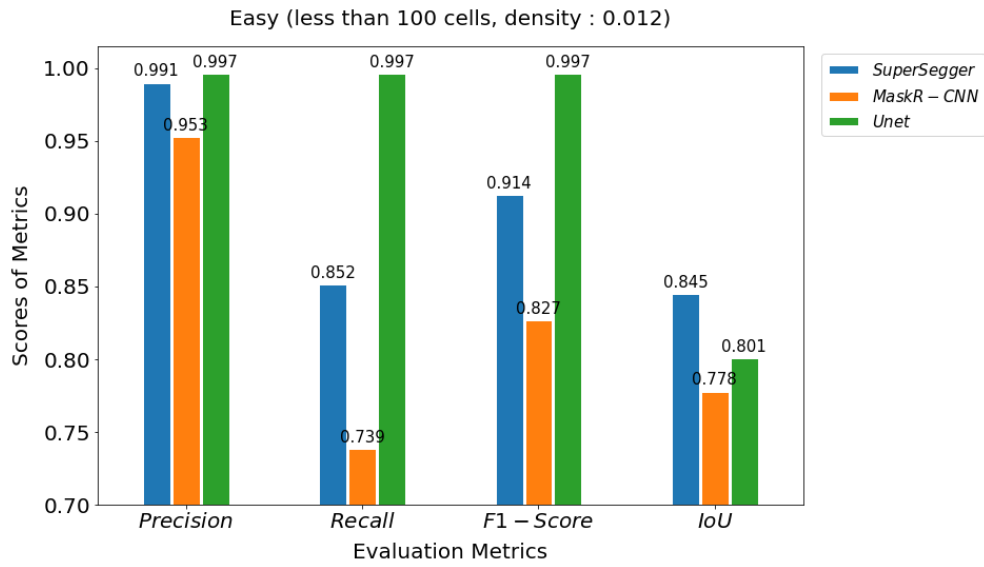


圖 6-1 簡單測試資料結果

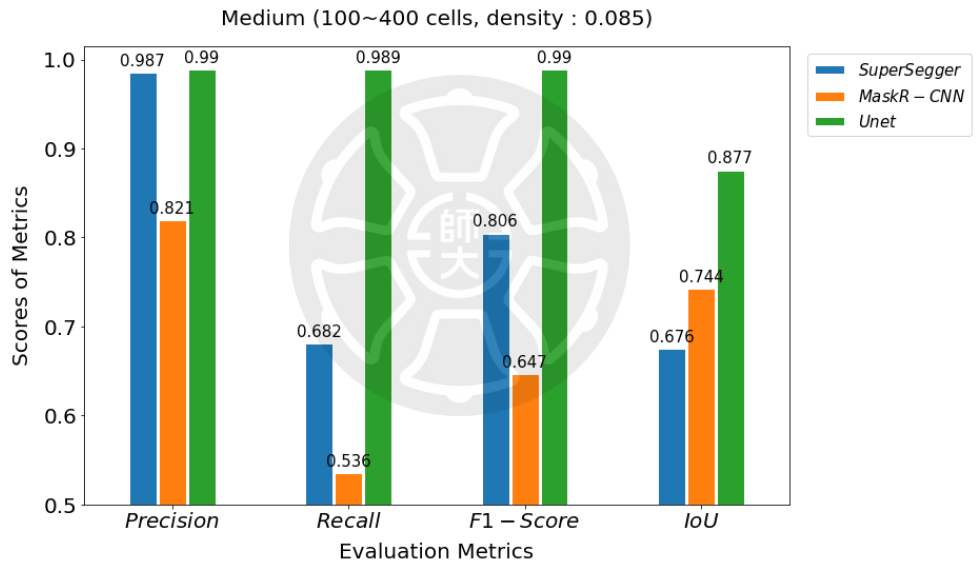


圖 6-2 中等測試資料結果

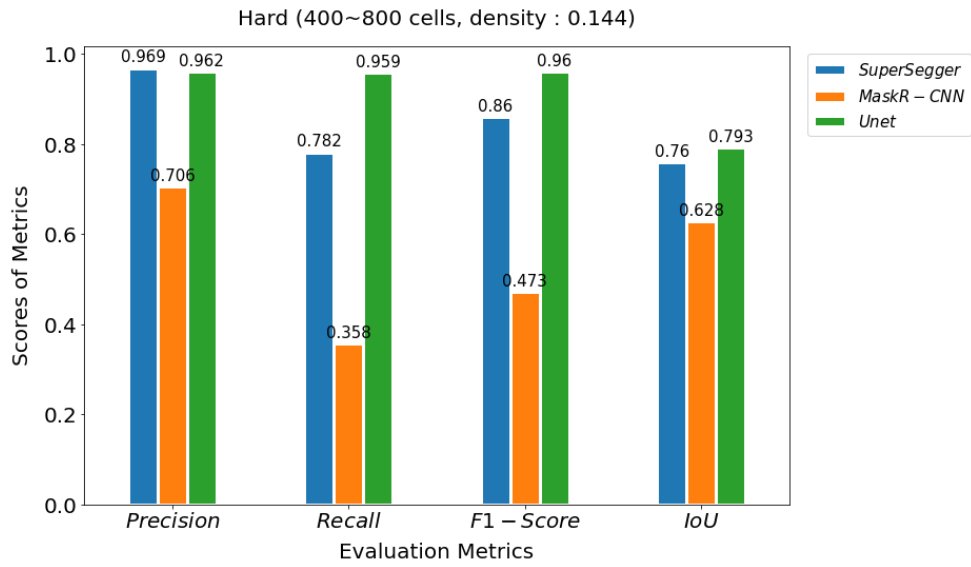


圖 6-3 困難測試資料結果

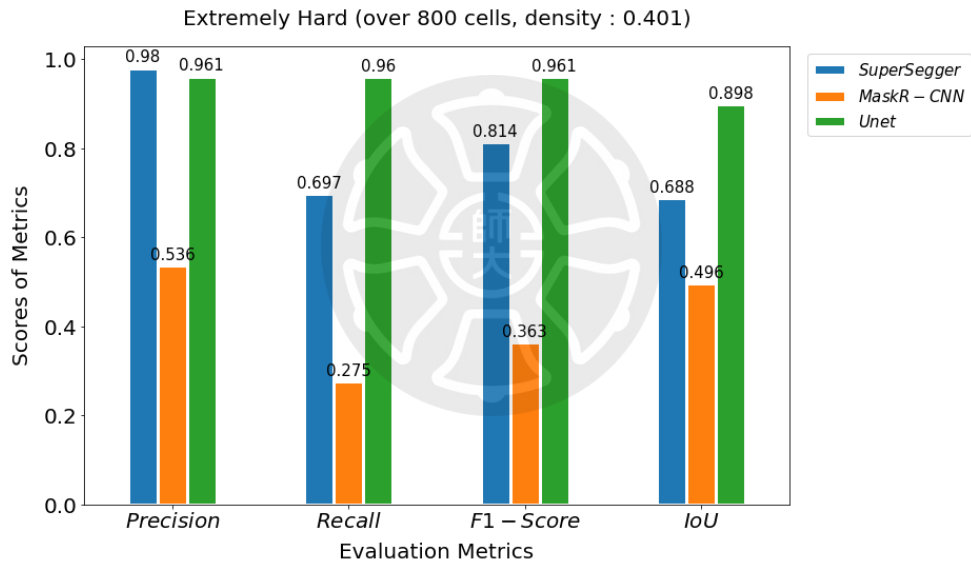


圖 6-4 極困難測試資料結果

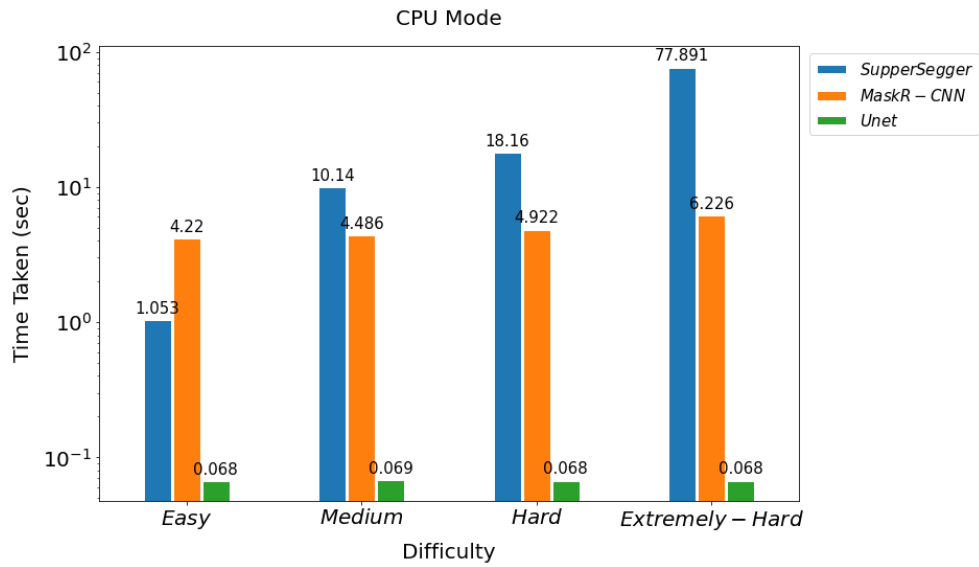


圖 6-5 於 CPU 運行時間

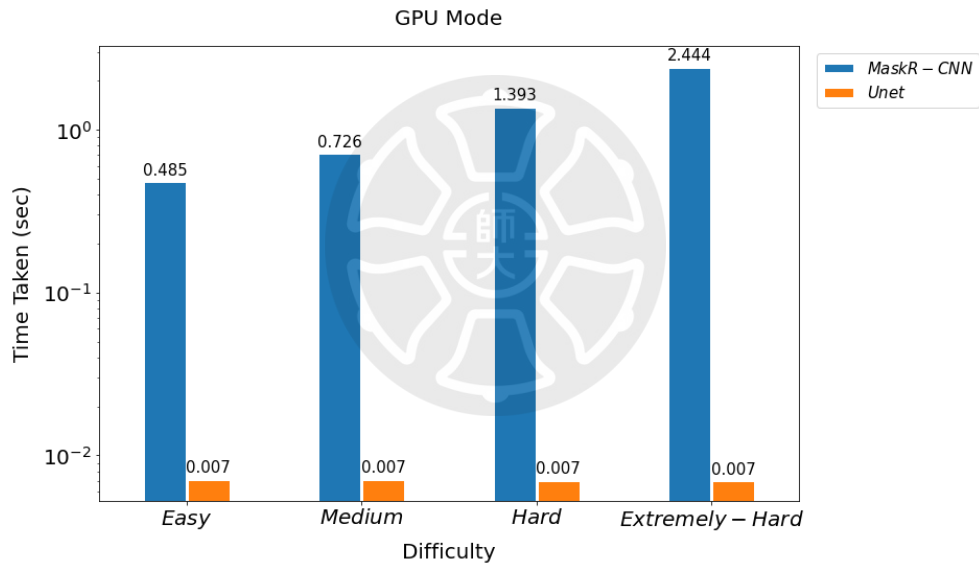


圖 6-6 於 GPU 運行時間

6.2 大腸桿菌質體實例分析

6.2.1 單一質體螢光標記分佈

我們量測了菌株 BWMC 中，質體 pZC320-lacO.b 的螢光亮度，其結果如圖 6.7 與圖 6.8。我們首先拍攝細胞的白光影像，利用深度學習細胞圖像分割的演算法，將細胞從拍攝的照片中分割出來。透過螢光影像與細胞分割結果疊加，便能

取得細菌內螢光亮點的位置。我們會搜索細胞內亮點的位置，以亮點為中心，形成 5×5 的像素方格，將方格內的螢光亮度加總，並扣除背景的螢光亮度以及細胞本身的自體螢光亮度，得到最終質體的螢光數值。

我們使用雙高斯函數擬合質體 pZC320-lacO.b 的螢光亮度分佈，得到的第一個高峰平均值為 11.222 au(arbitrary unit, au)、標準差為 3.1177au，第二個高峰的平均值為 22.494 au、標準差為 5.1579 au。

透過此實驗，我們決定了單一質體的螢光亮度，也確立了計算細胞中多套數質體數量的計算基礎。

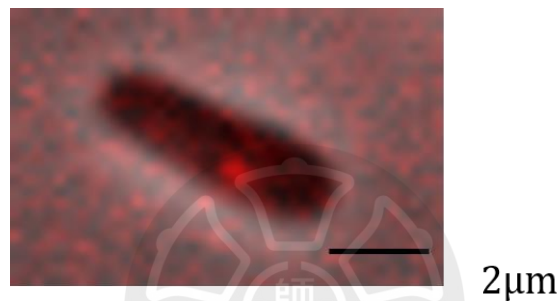


圖 6-7 菌株 BWMC 質體螢光標記

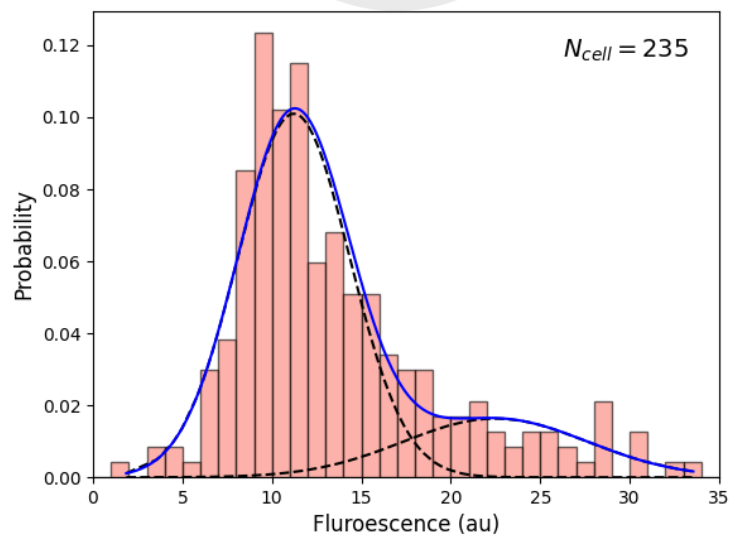


圖 6-8 質體 pZC320-lacO.b 螢光亮度分佈與單高斯函數擬合線

6.2.2 多套數質體細胞之子代細胞質體繼承

透過長時間的細胞影像錄影，我們記錄了細胞分裂前後，親代細胞與子代細胞中 pLacOIC24 質體的數量，並與在有加入阿拉伯糖抑制轉錄的情況下比較。首先我們會觀察兩種養菌條件下，細胞內質體的分配情形，其結果如圖 6.9 與圖 6.10。 $N_{P,P}$ 代表親代細胞中擁有質體 pLacOIC24 的數量； $N_{P,D}/N_{P,P}$ 為子代細胞分配到質體的比率，黃色區域為成功機率 0.5 的二項分布寬度。

我們假定質體的分配為成功機率 0.5 的二項分布，經過計算，子代細胞分配到質體的比率落在二項分布寬度內的機率是 70%。在沒有抑制轉錄的情況下，子代細胞分得質體的比率落在寬度內的機率是 65%；在加入阿拉伯糖抑制轉錄的情況下，子代細胞分得質體的比率落在寬度內的機率是 72%。這樣的結果表示，在抑制轉錄的情況下，由於細胞中質體的分布是比較均勻的，因此質體分配情形的分布會更集中。

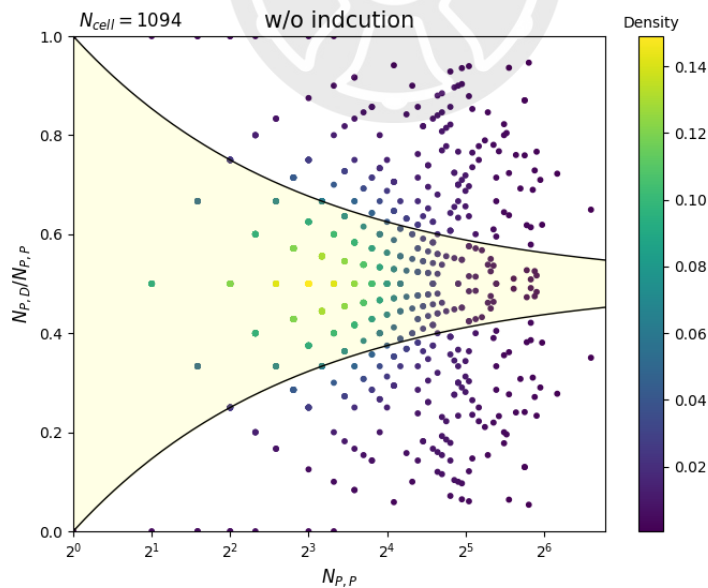


圖 6-9 無添加阿拉伯糖情況之細胞內質體分配散布圖

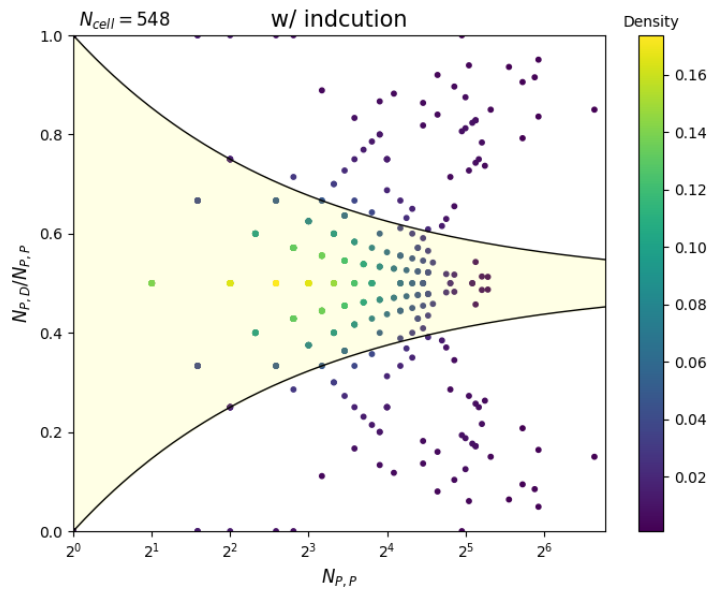


圖 6-10 添加阿拉伯糖情況之細胞內質體分配散布圖

6.2.3 質體在細胞週期內複製情形

我們記錄了不同的養菌條件下，第二個世代的細胞在由 5.4.2 節及 5.4.3 節中所述的洋菜膠上時，質體數量在細胞中成長的變化情形，其結果如圖 6-11 至圖 6-12。選擇由第二個世代開始的原因為，當我們將菌液點在洋菜膠上以後，我們並不能確定從點上洋菜膠開始到第一次細胞分裂的時間間隔，是不是完整的一個細胞生長週期，因此我們皆不考慮第一次分裂的數據。

圖 6-11 至圖 6-12 中，橫坐標為細胞週期的階段，縱坐標為不同階段當下，其細胞內質體數目與細胞剛分裂時的質體數目的比值。圖 6-13 與圖 6-14 為個週期的成長分佈。從上述的圖中，我們可以得知，當細胞點在洋菜膠上過後，細胞內的質體成長幅度非常小。其原因可能為，相較於細胞處在培養液的情況，洋菜膠上的環境對於細胞而言，是比較嚴苛的一個生長環境。此外，我們依據不同的起始質體數進行分組，比較細胞內不同質體數量時，質體成長的情形，其結果如

圖 6-15 至圖 6-20。從圖中我們可以得知，在細胞中質體數目較少的時候，在兩種不同的養菌條件下，質體數成長的幅度均是稍微大一點的。而在質體數超過 10 的組別中，質體成長的幅度較小。我們推論這樣的現象主要是因為，當細胞內的質體數量愈多時，質體的複製其實會造成細胞內的生理負擔(metabolic burden)。此外，質體的複製是受 RNAI、RNAII、RNA 組織蛋白所調控，而 RNAI 為負調節因子，隨著 DNA 的複製，當質體數目較多，負調節因子數量也增加時，使調控系統不複製質體。

綜合上述的結果我們可以得知，洋菜膠上的環境對於細胞而言，是比較嚴苛的一個生長環境，儘管細胞在洋菜膠上仍然會分裂，但在細胞中質體數量比較多的情況下，為了減輕細胞的生理負擔，細胞的調控系統傾向不消耗能量去複製質體。

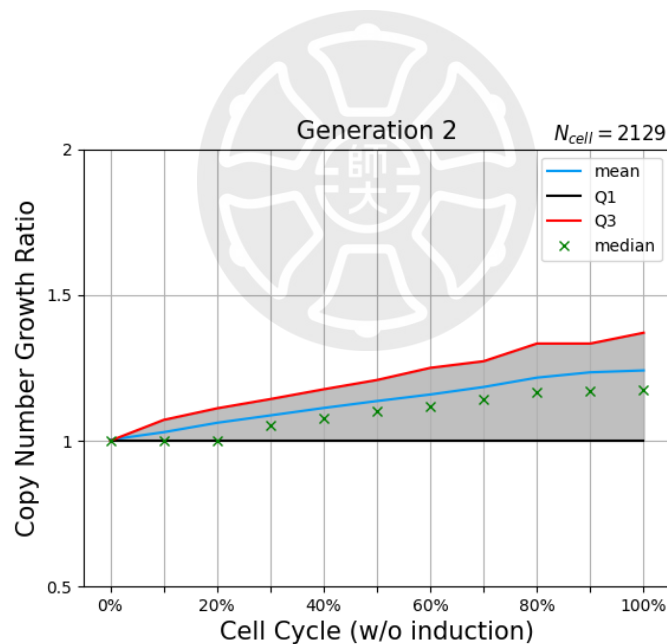


圖 6-11 第二代細胞在週期內質體成長(無阿拉伯糖)

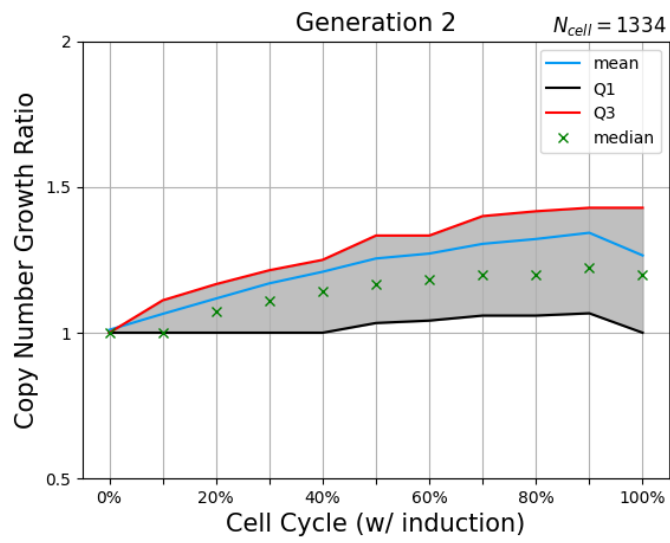


圖 6-12 第二代細胞在週期內質體成長(有阿拉伯糖)

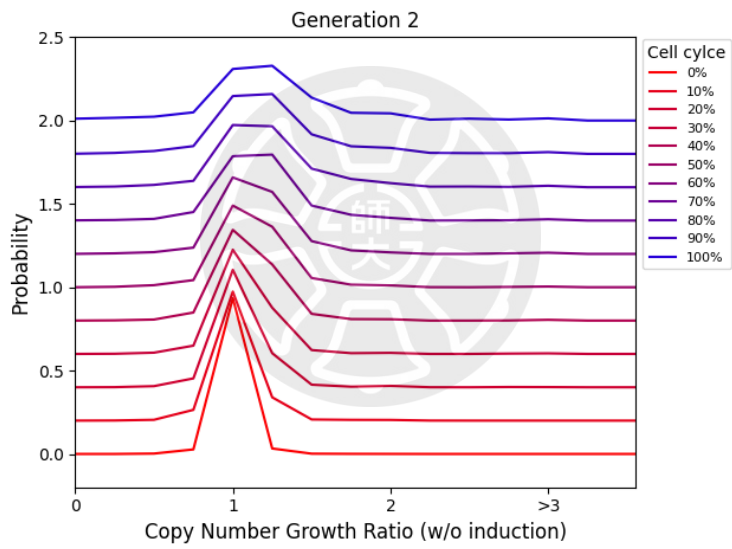


圖 6-13 各週期質體成長分佈圖(無阿拉伯糖)

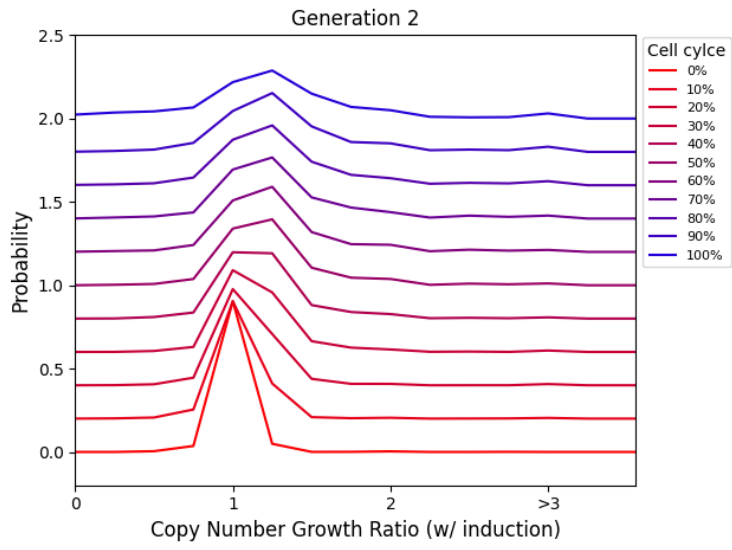


圖 6-14 各週期質體成長分佈圖(有阿拉伯糖)

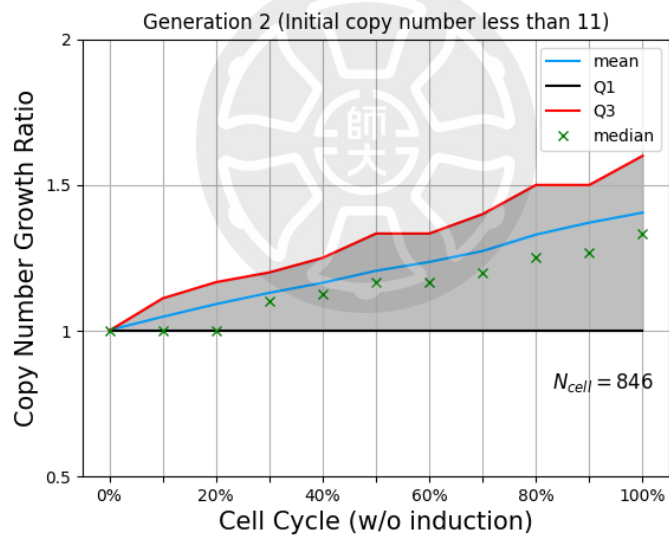


圖 6-15 細胞在週期內質體成長(質體數小於 11 個)

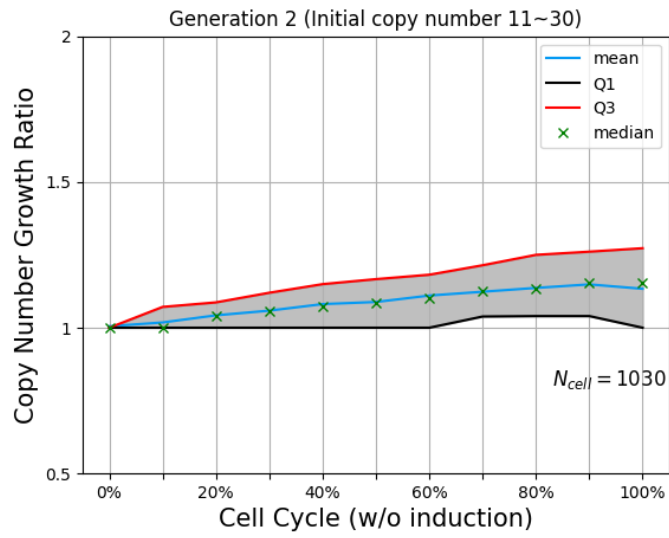


圖 6-16 細胞在週期內質體成長(質體數 11~30 個)

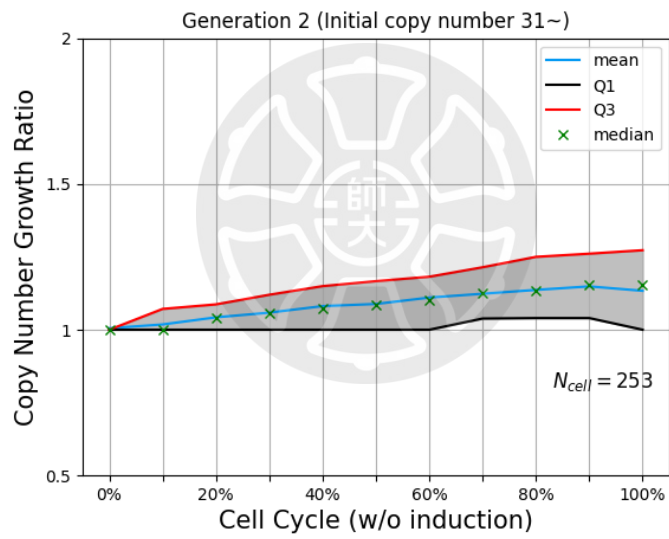


圖 6-17 細胞在週期內質體成長(質體數 31 個以上)

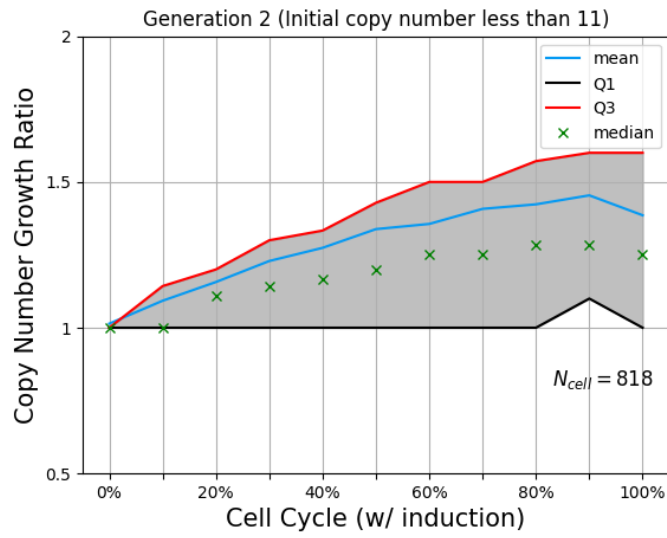


圖 6-18 細胞在週期內質體成長(質體數小於 11 個)

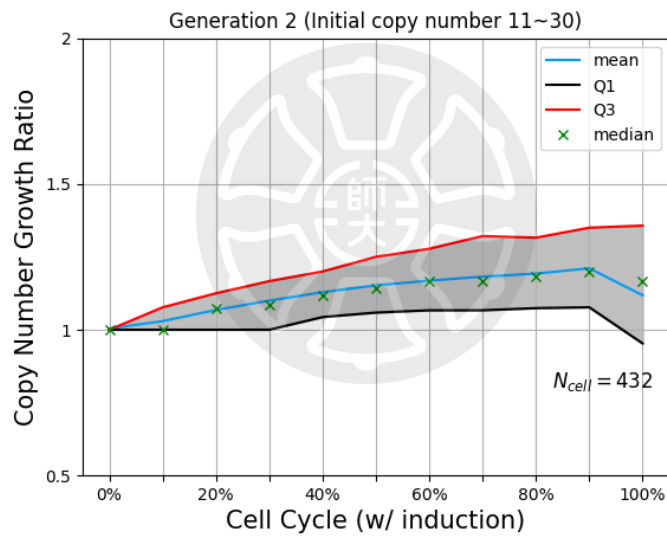


圖 6-19 細胞在週期內質體成長(質體數 11~30 個)

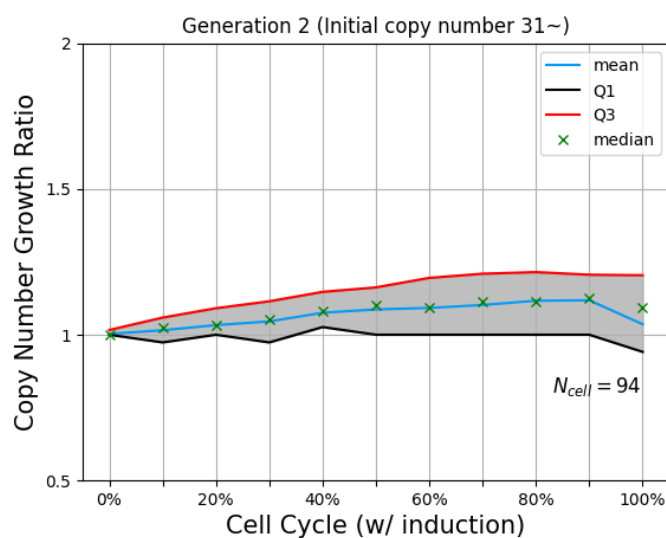


圖 6-20 細胞在週期內質體成長(質體數 31 以上個)

6.2.4 細胞中的極性

我們觀察了細胞中是否有極性的現象，新端細胞與舊端細胞的規則如圖 6-21。當一個細胞經過第一次分裂以後，中間分裂的一端是新端(new pole)，另一端是舊端(old pole)。如此一來，經過第二次的細胞分裂之後，我們便能定義哪一個細胞來自舊端，哪一個細胞來自新端，以此決定新端細胞與舊端細胞。

我們想要觀察的現象為，新端細胞與舊端細胞中，是否有哪一側比較容易分配到質體。在兩種養菌條件下，我們統計了舊端細胞與新端細胞獲得質體比率，將統計結果畫成分布圖，如圖 6-22 至圖 6-25。從舊端細胞與新端細胞獲得質體比率的分佈圖可以發現，新端細胞有比較容易分配到多一些質體的趨勢。我們將分配到質體比率 0.43~0.57 作為獲得較多或較少質體的上下界。選擇這兩個數值的原因為，我們在 5.4.1 節所測量單一質體亮度分布是有寬度的。經過計算，對於剛好獲得親代細胞一半的質體比率的不確定範圍為 0.43~0.57。在沒有抑制轉錄的情況下，新端細胞獲得較多質體的比率(>0.57)、獲得一半質體的比率(0.43~0.57)、獲得較少質體的比率(<0.43)分別為 0.43、0.35、0.22；舊端細胞獲得較多質體的比率(>0.57)、獲得一半質體的比率(0.43~0.57)、獲得較少質體的比率

(<0.43)分別為 0.22、0.35、0.43。在抑制轉錄的情況下，新端細胞獲得較多質體的比率(>0.57)、獲得一半質體的比率(0.43~0.57)、獲得較少質體的比率(<0.43)分別為 0.30、0.48、0.22；舊端細胞獲得較多質體的比率(>0.57)、獲得一半質體的比率(0.43~0.57)、獲得較少質體的比率(<0.43)分別為 0.22、0.48、0.30。

這樣的趨勢可能是由於細胞中的類核在細胞分裂之前，並不是對稱地分布在細胞當中，使得質體的聚集有機會存在於細胞內較空曠的區域，如圖 6-26 與圖 6-28。圖 6-26 與圖 6-28 的(b)-(d)分別為類核螢光標記、質體螢光標記、兩種標記影像之疊圖。質體在細胞中的聚集分布與分配大致可以分為四種情境，如圖 6-29 至圖 6-32。當質體聚集是靠近中間的位置時，經過第一次分裂後，假如多數的質體仍停留在新端的一側，再一次分裂後的新端細胞，有較高的機會分到多一些質體，示意圖如圖 6-29。而當質體聚集偏向細胞端點時，舊端(Old pole)側擁有較多的質體，經過第二次細胞分裂後的舊端細胞，則會分配到較多的質體，示意圖如圖 6-30。倘若在第二次細胞分裂前，質體的聚集是出現在細胞中央時，新端細胞與舊端細胞各自所分到的質體數量可能是均分，或其中一側分得稍多或稍少的情形，示意圖如圖 6-31。在加入阿拉伯糖抑制轉錄的情況下，質體在細胞中的分布是較均勻的，因此新舊端細胞所分得的質體數量會比較相近，示意圖如圖 6-32。

由於我們所統計出的結果為新端細胞有分配到較多質體的趨勢，我們可以針對這樣的結果建立一個簡易的模型來描述。假設質體留在細胞中央位置的機率為 P ，位在細胞端點的機率為 $(1-P)$ ；並假設如果質體的聚集在細胞中央時，分裂後質體分配包含三種情況，第一種為均分，第二種為分到新端，第三種為分到舊端。若是均分的情形的話，其機率為 $P(1 - Q_1 - Q_2)$ ，這裡 Q_1 、 Q_2 分別代表質體在細胞中間時，分裂後分配至新端或是舊端的機率，是可以變動的數值。依照這樣的假設，新端細胞獲得質體的比率為 $P(1 - P) + P \times Q_1$ ，同樣地，舊端細胞獲得質體的比率為 $(1 - P)(1 - P) + P \times Q_2$ 。我們假設 $Q_1 = Q_2 = 0.25$ ，因此可以整理出新端細胞獲得質體的比率、舊端細胞獲得質體的比率、質體均分的比率的關

係式，如表 6-1。以此繪製出新端細胞與舊端細胞獲得質體比率的關係圖，如圖 6-33。圖 6-33 的縱軸代表獲得質體的比率，橫軸代表質體留在細胞中央的比率。從圖 6-33 中可以知道，質體的聚集出現在細胞中央的機率需要落在接近 0.75 時，才會與我們統計出的結果相似(新端：0.43、對半分配：0.35、舊端：0.22)。

目前的模型假設都屬於非常初步的階段，例如僅考慮質體聚集在中央時，分裂過後新端與舊端獲得質體的比率會相同，即 $Q_1 = Q_2$ ，但實際上分配的過程還是會受到類核分布的影響， Q_1 、 Q_2 的數值也許是不同的。此外，質體在細胞中並不是全部聚集在一起，仍然有些質體是漂散在其他空間當中，是我們沒有考慮到的。因此在後續的研究中，可以針對這些細節去設計更完整的實驗，讓模型的呈現更加完善。

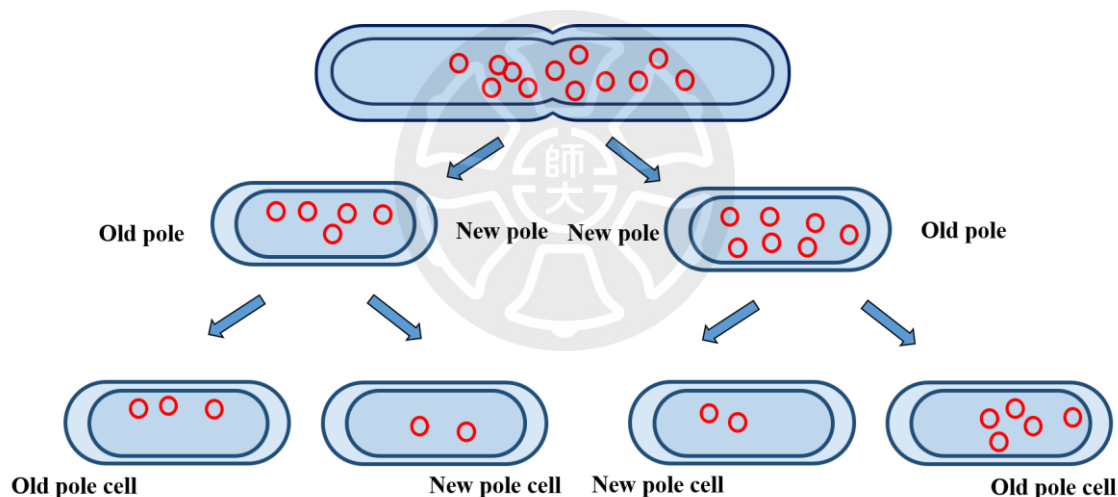


圖 6-21 新舊端細胞示意圖

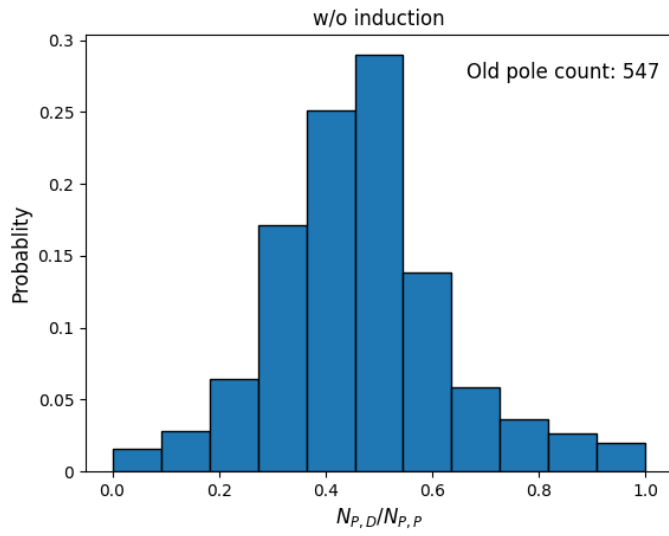


圖 6-22 舊端細胞質體分配(無抑制轉錄)

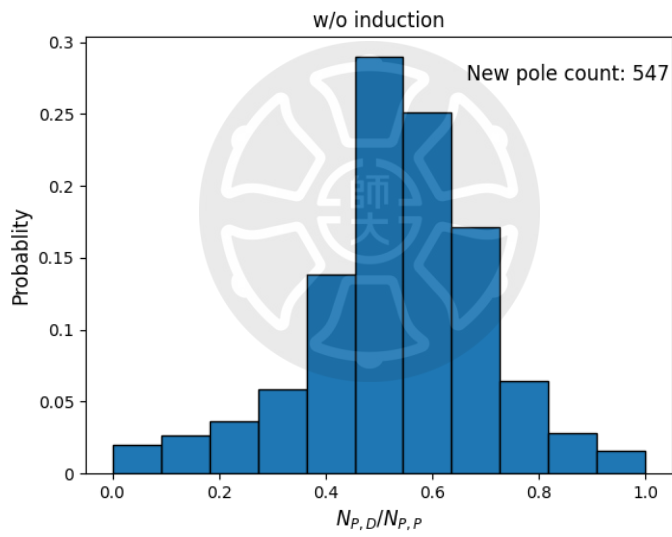


圖 6-23 新端細胞質體分配(無抑制轉錄)

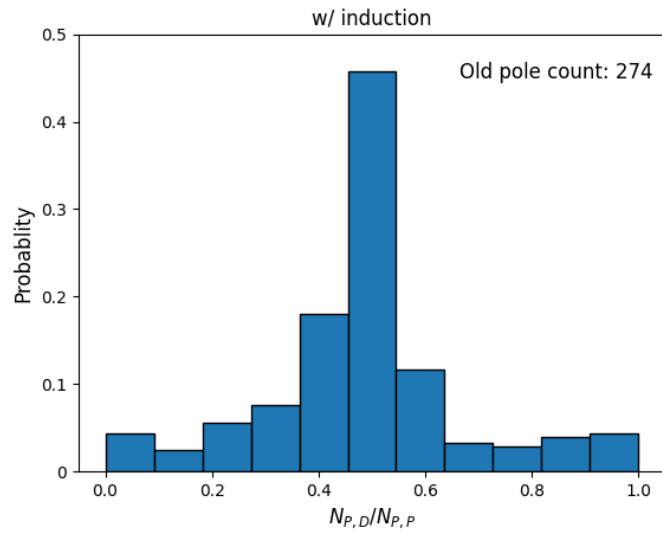


圖 6-24 舊端細胞質體分配(抑制轉錄)

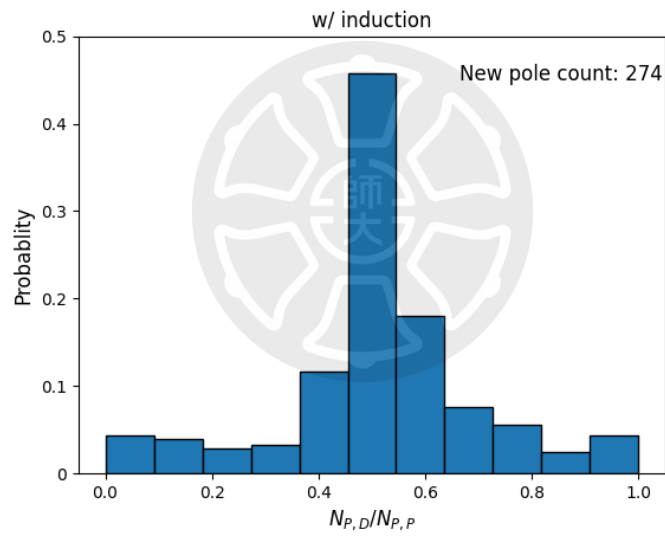


圖 6-25 新端細胞質體分配(抑制轉錄)

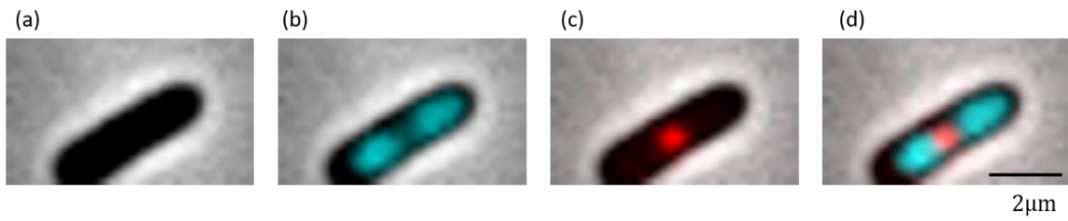


圖 6-26 質體與類核螢光標記

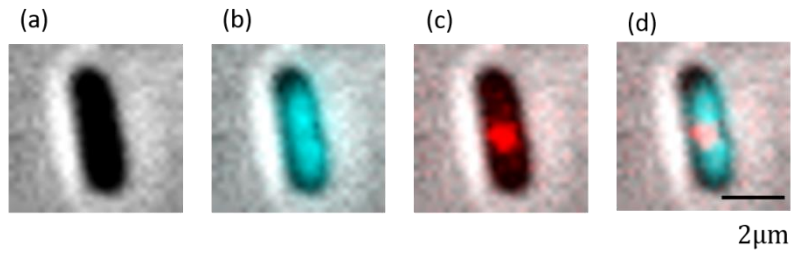


圖 6-27 質體與類核螢光標記

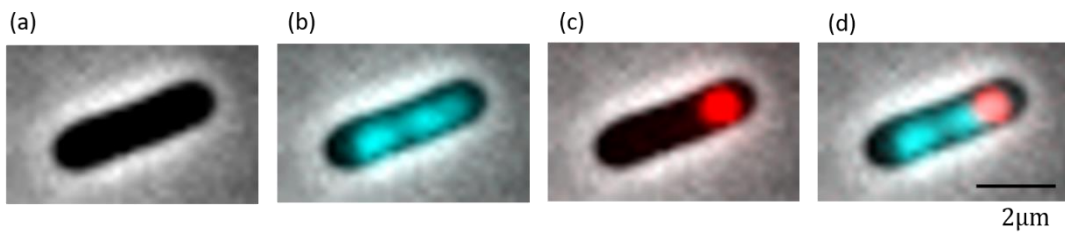


圖 6-28 質體與類核螢光標記

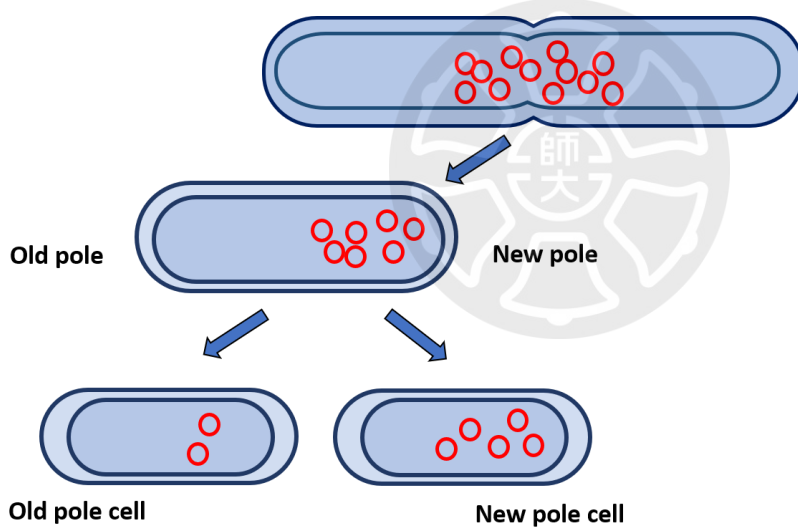


圖 6-29 質體分配示意圖

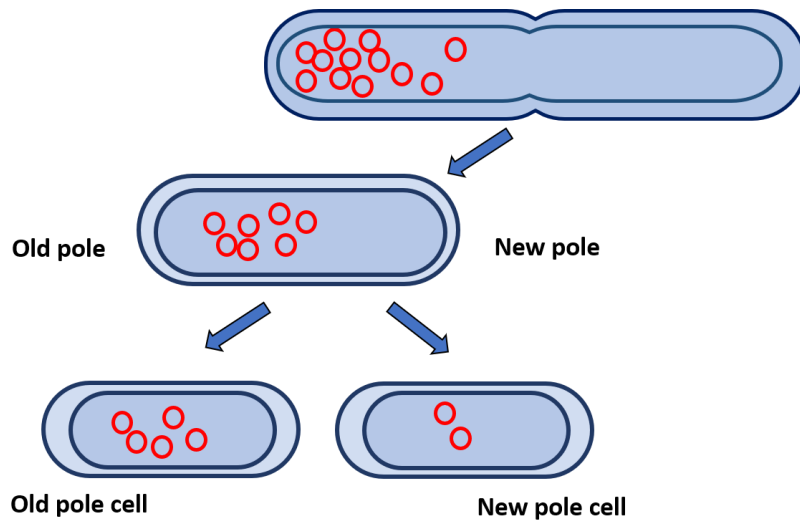


圖 6-30 體分配示意圖

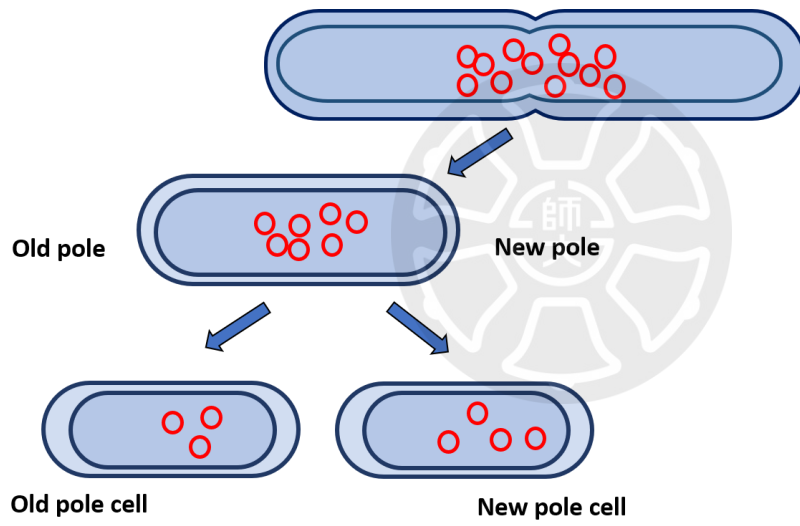


圖 6-31 體分配示意圖

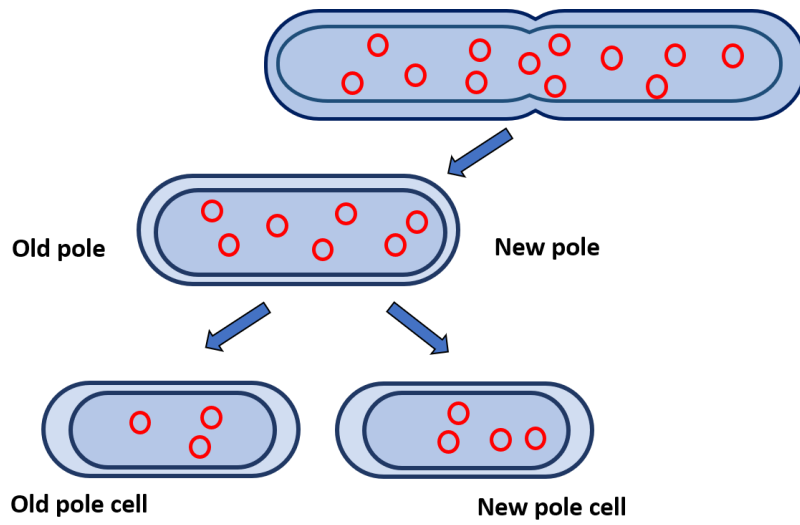


圖 6-32 體分配示意圖

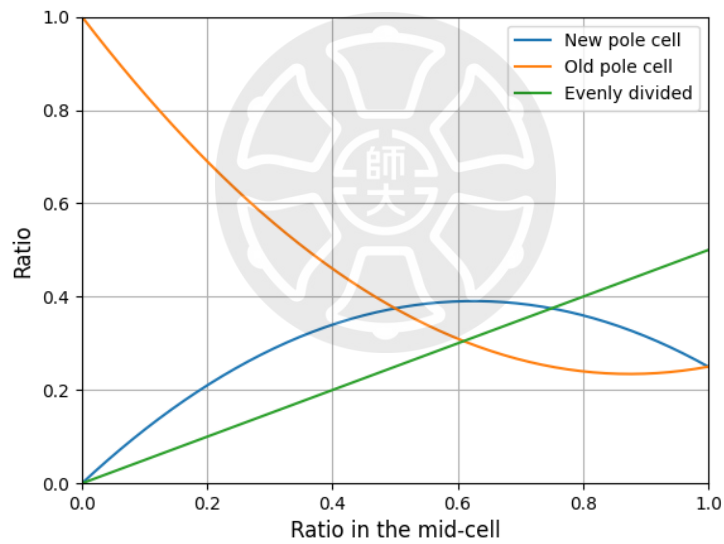


圖 6-33 質體分配比率圖

表 6-1 質體獲得比率關係式

新端細胞獲得質體的比率	$P(1 - P) + 0.25P$
舊端細胞獲得質體的比率	$(1 - P)(1 - P) + 0.25P$
質體均分的比率	$0.5P$

第七章 結論

本論文主要分為兩個部分，第一部分為深度學習模型應用於細胞影像分割的探討與比較，第二部分為大腸桿菌中質體分佈的實例分析，並使用深度學習模型 Unet 作為影像處理的基礎。

在第一部分的實驗中，相較於以往傳統影像處理的方法，如 Otsu 二值化、分水嶺演算法 (Watershed Algorithm)，對於細胞影像分割的結果經常不盡理想，因此我們引入深度學習中圖像分割的模型，並將其於細胞影像上。

綜觀三種模型，SuperSegger、Mask R-CNN、Unet，SuperSegger 因為是一小部分的神經網路再搭配傳統影像處理的方法，對於細胞影像的品質會有一定的要求，當原始影像有一些不規則的亮點或黑點，就有可能使最終的辨識結果產生一些錯誤。此外，由於 SuperSegger 作者所撰寫的程式碼並不支援 GPU，在運算速度方面也會比較緩慢。Mask R-CNN 作為實例分割(Instance Segmentation)代表性的模型，對於日常生活中隨處可見的物件如車子、行人、紅綠燈等，在一張影像當中是屬於較大的物件有很不錯的分割效果。但將其應用於稠密且單個物件較小的細胞影像時，便無法發揮很好的表現。當我們使用語義分割模型 Unet 在細胞影像分割時，無論資料的難易度如何，Unet 在各項評估指標當中，幾乎都是表現最出色的，不僅正確率高，模型運算所耗費的時間也相當的短，即便最終的細胞分割結果邊緣處可能有細胞相黏的情形發生，僅需透過一些簡單的影像後處理如侵蝕(erosion)或膨脹(dilate)，便能改善。

由於目前現行將深度學習應用於細胞影像分割，其標註資料的像素解析度大多為 80nm/px 至 100nm/px，與我們所拍攝的像素解析度 160nm/px 有些微的不同，因此得到的分割影像結果在細胞邊緣的部分，會有比較鋸齒狀的情況發生，使得會無法應用在超解析度成像的相關細胞實驗當中。也因此未來，將現有 160nm/px 的細胞分割結果轉換成 20nm/px 的遮罩圖像(Mask Image)會是一個重要

的研究方向。

在第二部分，大腸桿菌中質體分佈的實例分析實驗中，我們使用 Unet 作為細胞影像處理的基礎，來幫助我們對取得的數據進行統計。我們先透過單一質體螢光標記分佈來確立細胞內質體數量的計算依據。當我們統計子代細胞所獲得親代細胞質體的比例時，了解到在抑制轉錄的情況下，質體的分佈會更均勻，使得質體分配的比率更集中在成功機率為 0.5 的二項分布寬度內。此外我們認為當細胞中質體數量較多時，其生理負擔是比較大的，儘管細胞在洋菜膠上仍然會生長與分裂，但是幾乎不會進行質體的複製。在細胞極性的統計結果當中，新端細胞有比舊端細胞更容易獲得質體的趨勢，這樣的現象可能來自於細胞中類核在空間上的分佈不均勻，且在第二次細胞分裂前，質體的聚集出現在靠近新端附近的頻率可能是比較高的，使新端細胞更有機會分配到較多的質體。

由於我們的實驗影像數據僅能看出類核在細胞中並不是均勻分佈，缺少了細胞分裂前後，類核在新端細胞與舊端細胞中分佈的情形，且目前的模型假設都屬於比較粗略的階段，例如僅考慮質體聚集在中央時，分裂過後的細胞會剛好獲得一半的質體，但實際上分配的過程還是會受到類核分佈的影響，此外，質體在細胞中並不是全部聚集在一起，仍然有些質體是漂散在其他空間當中，是我們沒有考慮到的。因此在未來的實驗方向中，可以增加細胞分裂前後，類核在新端細胞與舊端細胞中分佈情形的記錄，讓我們了解在細胞分裂的過程中，細胞的極性對於類核在空間上的分佈是不是有甚麼樣的影響，使我們在現階段的統計實驗觀察到新端細胞有分配到較多質體的趨勢。這些都需要在未來設計更完整的實驗來說明目前看到的現象。除此之外，我們也期望能夠改善觀測的條件。就目前的觀測條件下，細胞在生長週期中幾乎不太複製質體。我們可以嘗試設計對於細胞而言，更舒適的觀察條件，讓細胞處在一個比較舒適的環境，得到的數據統計可能會更貼近真實細胞在液體狀態裡面生長的情形。

參考文獻

- [1] N. Rosenfeld, J. W. Young, U. Alon, P. S. Swain, and M. B. Elowitz, "Gene regulation at the single-cell level," *Science*, vol. 307, no. 5717, pp. 1962-5, Mar 25 2005, doi: 10.1126/science.1106914.
- [2] F. M. Weinert, R. C. Brewster, M. Rydenfelt, R. Phillips, and W. K. Kegel, "Scaling of gene expression with transcription-factor fugacity," *Phys Rev Lett*, vol. 113, no. 25, p. 258101, Dec 19 2014, doi: 10.1103/PhysRevLett.113.258101.
- [3] A. Elfving, Y. LeMarc, J. Baranyi, and A. Ballagi, "Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis," *Appl Environ Microbiol*, vol. 70, no. 2, pp. 675-8, Feb 2004, doi: 10.1128/AEM.70.2.675-678.2004.
- [4] N. Otsu, "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms," *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 9, no. 1, pp. 62-66, 1979, doi: 10.1109/TSMC.1979.4310076.
- [5] J. B. T. M. Roerdink and A. Meijster, "The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies," *Fundamenta Informaticae*, vol. 41, pp. 187-228, 2000, doi: 10.3233/FI-2000-411207.
- [6] J. C. Caicedo *et al.*, "Nucleus segmentation across imaging experiments: the 2018 Data Science Bowl," *Nature Methods*, vol. 16, no. 12, pp. 1247-1253, 2019/12/01 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0612-7.
- [7] T.-Y. Lin *et al.*, "Microsoft COCO: Common Objects in Context," in *Computer Vision – ECCV 2014*, Cham, D. Fleet, T. Pajdla, B. Schiele, and T. Tuytelaars, Eds., 2014// 2014: Springer International Publishing, pp. 740-755.
- [8] S. Stylianidou, C. Brennan, S. B. Nissen, N. J. Kuwada, and P. A. Wiggins, "SuperSegger: robust image segmentation, analysis and lineage tracking of bacterial cells," *Mol Microbiol*, vol. 102, no. 4, pp. 690-700, Nov 2016, doi: 10.1111/mmi.13486.
- [9] K. He, G. Gkioxari, P. Dollár, and R. Girshick, "Mask R-CNN," in *2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)*, 22-29 Oct. 2017 2017, pp. 2980-2988, doi: 10.1109/ICCV.2017.322.
- [10] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, "U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation," in *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*, Cham, N. Navab, J. Hornegger, W. M. Wells, and A. F. Frangi, Eds., 2015// 2015: Springer International Publishing, pp.

- 234-241.
- [11] C. Spahn *et al.*, "DeepBacs for multi-task bacterial image analysis using open-source deep learning approaches," *Commun Biol*, vol. 5, no. 1, p. 688, Jul 9 2022, doi: 10.1038/s42003-022-03634-z.
 - [12] S. Yao, A. Toukdarian, and D. R. Helinski, "Inhibition of protein and RNA synthesis in Escherichia coli results in declustering of plasmid RK2," *Plasmid*, vol. 56, no. 2, pp. 124-32, Sep 2006, doi: 10.1016/j.plasmid.2006.04.003.
 - [13] A. Krizhevsky, I. Sutskever, and G. E. Hinton, "Imagenet classification with deep convolutional neural networks," *Advances in neural information processing systems*, vol. 25, 2012.
 - [14] D. E. Rumelhart, G. E. Hinton, and R. J. Williams, "Learning representations by back-propagating errors," *Nature*, vol. 323, no. 6088, pp. 533-536, 1986/10/01 1986, doi: 10.1038/323533a0.
 - [15] J. Long, E. Shelhamer, and T. Darrell, "Fully convolutional networks for semantic segmentation," in *2015 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, 7-12 June 2015 2015, pp. 3431-3440, doi: 10.1109/CVPR.2015.7298965.
 - [16] V. Dumoulin and F. Visin, "A guide to convolution arithmetic for deep learning," *arXiv preprint arXiv:1603.07285*, 2016.
 - [17] R. Girshick, J. Donahue, T. Darrell, and J. Malik, "Rich Feature Hierarchies for Accurate Object Detection and Semantic Segmentation," in *2014 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 23-28 June 2014 2014, pp. 580-587, doi: 10.1109/CVPR.2014.81.
 - [18] J. R. Uijlings, K. E. Van De Sande, T. Gevers, and A. W. Smeulders, "Selective search for object recognition," *International journal of computer vision*, vol. 104, no. 2, pp. 154-171, 2013.
 - [19] M. A. Hearst, S. T. Dumais, E. Osuna, J. Platt, and B. Scholkopf, "Support vector machines," *IEEE Intelligent Systems and their Applications*, vol. 13, no. 4, pp. 18-28, 1998, doi: 10.1109/5254.708428.
 - [20] R. Girshick, "Fast R-CNN," in *2015 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)*, 7-13 Dec. 2015 2015, pp. 1440-1448, doi: 10.1109/ICCV.2015.169.
 - [21] S. Ren, K. He, R. Girshick, and J. Sun, "Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 39, no. 6, pp. 1137-1149, 2017, doi: 10.1109/TPAMI.2016.2577031.
 - [22] J. Shi and D. P. Biek, "A versatile low-copy-number cloning vector derived from

- plasmid F," *Gene*, vol. 164, no. 1, pp. 55-8, Oct 16 1995, doi: 10.1016/0378-1119(95)00419-7.
- [23] K. Nordstrom, "Plasmid R1--replication and its control," *Plasmid*, vol. 55, no. 1, pp. 1-26, Jan 2006, doi: 10.1016/j.plasmid.2005.07.002.
- [24] F. Bolivar, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, J. Shine, R. L. Rodriguez, and H. W. Boyer, "Origin of replication of pBR345 plasmid DNA," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 74, no. 12, pp. 5265-9, Dec 1977, doi: 10.1073/pnas.74.12.5265.
- [25] J. Vieira and J. Messing, "The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers," *Gene*, vol. 19, no. 3, pp. 259-68, Oct 1982, doi: 10.1016/0378-1119(82)90015-4.
- [26] D. L. Coplin, "Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria," *Annual review of phytopathology*, vol. 27, pp. 187-212, 1989.
- [27] F. Silva, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, "Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*," *Biotechnology advances*, vol. 30, no. 3, pp. 691-708, 2012.
- [28] J. C. Diaz Ricci and M. E. Hernández, "Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism," *Critical reviews in biotechnology*, vol. 20, no. 2, pp. 79-108, 2000.
- [29] A. Fedorec, "Mechanisms for Plasmid Maintenance," 2014.
- [30] S. Yao, D. R. Helinski, and A. Toukdarian, "Localization of the naturally occurring plasmid ColE1 at the cell pole," *Journal of bacteriology*, vol. 189, no. 5, pp. 1946-1953, 2007.
- [31] A. F. Straight, A. S. Belmont, C. C. Robinett, and A. W. Murray, "GFP tagging of budding yeast chromosomes reveals that protein-protein interactions can mediate sister chromatid cohesion," *Current Biology*, vol. 6, no. 12, pp. 1599-1608, 1996.
- [32] A. B. Jung *et al.*, *imgaug*. <https://github.com/aleju/imgaug>.