

## АНАЛИЗ СМЕСИ «МОНОМЕР – ОЛИГОМЕР» В СИСТЕМАХ ОДНОКВАНТОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

В. В. СКАКУН<sup>1)</sup>, В. В. АПАНАСОВИЧ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Предложен метод анализа распределения числа фотоотсчетов и факториальных кумулянтов распределения числа фотоотсчетов в системах одноквантовой флуоресцентной флукутационной спектроскопии, позволяющий находить концентрацию и характеристическую яркость флуоресцирующих молекул (или высокомолекулярных соединений, помеченных флуоресцирующими молекулами) и разрешать смесь веществ с различными яркостными характеристиками. Метод основан на использовании производящей функции распределения числа фотоотсчетов с гауссовской аппроксимацией профиля засветки и коррекцией на внефокусное излучение. Его особенностью является введение параметра, равного отношению яркости олигомера к яркости мономера и отражающего стехиометрию молекулярного комплекса. Задание указанного параметра как ожидаемого значения или введение жестких ограничений на его величину приводят к существенному увеличению разрешающей способности метода. Проведено тестирование метода на смоделированных и полученных в ходе экспериментов двухкомпонентных данных.

**Ключевые слова:** флуоресцентная флукутационная спектроскопия; распределение числа фотоотсчетов; факториальные кумулянты; характеристическая яркость.

## ANALYSIS OF «MONOMER – OLIGOMER» MIXTURES IN FLUORESCENCE FLUCTUATION SPECTROSCOPY SYSTEMS

V. V. SKAKUN<sup>a</sup>, V. V. APANASOVICH<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

The method of photon counting distribution and factorial cumulants of photon counting distribution analysis in fluorescence fluctuation spectroscopy is proposed. This enables one to estimate the brightness and concentration of molecules (or macromolecules labeled by fluorescent markers) in heterogeneous samples and to resolve mixtures with different brightness. The method is based on the generating function of photon counting distribution with Gaussian approximation of the brightness profile and with correction for the out-of-focus emission. A distinctive feature of the method is introduction of the parameter that equals the ratio of oligomer to monomer brightness, reflecting stoichiometry of the molecular complex. Setting this parameter as the expected value or imposing hard constraints on its value, one can significantly improve resolution of the method. The applicability of the proposed method was verified by testing the method on the simulated and measured two-component data.

**Key words:** fluorescence fluctuation spectroscopy; photon counting distribution; fluorescence factorial cumulants; characteristic brightness.

### Образец цитирования:

Скакун В. В., Апанасович В. В. Анализ смеси «мономер – олигомер» в системах одноквантовой флуоресцентной флукутационной спектроскопии // Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. 2016. № 2. С. 52–59.

### For citation:

Skakun V. V., Apanasovich V. V. Analysis of «monomer – oligomer» mixtures in fluorescence fluctuation spectroscopy systems. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2016. No. 2. P. 52–59 (in Russ.).

### Авторы:

**Виктор Васильевич Скакун** – кандидат физико-математических наук, доцент; заведующий кафедрой системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиофизики и компьютерных технологий.

**Владимир Владимирович Апанасович** – доктор физико-математических наук, профессор; профессор кафедры системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиофизики и компьютерных технологий.

### Authors:

**Victor Skakun**, PhD (physics and mathematics), docent; head of the department of systems analysis and computer simulation, faculty of radiophysics and computer technologies.

*skakun@bsu.by*

**Vladimir Apanasovich**, doctor of science (physics and mathematics), full professor; professor at the department of systems analysis and computer simulation, faculty of radiophysics and computer technologies.

*apanasovich@bsu.by*

Флуоресцентная флукуационная спектроскопия (ФФС) – это группа методов, позволяющая исследовать вещество как *in vitro*, так и *in vivo* на одномолекулярном уровне без нарушения термодинамического равновесия. Сочетание высокой чувствительности и неинвазивности приводит к интенсивному применению этих методов для измерения коэффициента диффузии белков, индекса стехиометрии белковых комплексов, анализа динамики быстрых молекулярных процессов и фотохимических реакций в живых клетках. Все методы ФФС объединяет общий принцип проведения измерений – регистрация флуоресценции производится из предельно малого открытого объема ( $V$ ), определяемого лучом лазера, сфокусированного конфокальной оптической системой с высоким коэффициентом увеличения [1]. Оценки параметров исследуемого вещества являются результатом статистического анализа флукуаций интенсивности флуоресценции, которые могут происходить вследствие изменения как количества и местоположения исследуемых молекул в неоднородно освещенном объеме, так и их характеристической яркости (определяемой как количество фотонов, излученных одной молекулой в единицу времени), равной произведению интенсивности засветки в фокусе, коэффициента поглощения лазерного излучения молекулами вещества, квантового выхода флуоресценции и эффективности системы регистрации.

Для разрешения смеси веществ, различающихся по их характеристической яркости или по индексу стехиометрии (например, смеси «мономер – димер»), в настоящее время применяются следующие методы: анализ распределения интенсивности флуоресценции [2] (Fluorescence Intensity Distribution Analysis, FIDA), анализ гистограммы счета фотонов [3] (Photon Counting Histogram, PCH), кумулянтный анализ фотоотчетов [4–6] (Fluorescence Cumulants Analysis, FCA) и анализ нормированной яркости [7, 8]. Эти методы позволяют находить оценки концентрации молекул и их характеристической яркости и, следовательно, разрешать многокомпонентные смеси веществ, отличающихся по своим спектральным свойствам и стехиометрии [2–8]. Методы FIDA и PCH отличаются способом их алгоритмической реализации и выбором функции, аппроксимирующей профиль засветки. Для расчета распределения числа фотоотчетов (PЧФ) в методе FIDA применяют быстрое преобразование Фурье (БПФ) производящей функции (ПФ) числа фотоотчетов и полиномиальную аппроксимацию профиля засветки [2]. В методе PCH используется последовательное вычисление конволюций одномолекулярного распределения числа фотоотчетов, а профиль засветки аппроксимируется трехмерным асимметричным гауссовским распределением [3]. В кумулянтном анализе и анализе нормированной яркости выполняется анализ факториальных кумулянтов PЧФ [4, 7, 8]. Показано, что PCH, FIDA и FCA являются математически эквивалентными методами (могут быть выведенными из единой ПФ числа фотоотчетов) и при отсутствии экспериментального шума должны приводить к одним и тем же оценкам концентрации молекул и их характеристической яркости [6].

Большой проблемой при анализе PЧФ и его кумулянтов является регистрация большого количества рассеянных некоррелированных фотонов, искажающих профиль засветки [6]. Для восстановления профиля засветки применяют следующие способы: полиномиальная аппроксимация [2]; введение дополнительных параметров коррекции  $F_1$ ,  $F_2$ , определенных как относительная разность между интегралами  $\chi_k = \int_V B^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$  от реального профиля засветки  $B(\mathbf{r})$  и его гауссовской аппроксимации

$$B_G(\mathbf{r}) = B_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega_0^2} - \frac{2z^2}{z_0^2}\right),$$

где  $\omega_0$  и  $z_0$  – параметры, характеризующие профиль засветки в поперечном и аксиальном направлении соответственно [9]:

$$F_k = \frac{\chi_k - \chi_{Gk}}{\chi_{Gk}}, \quad (1)$$

и подгонка так называемых  $\gamma$ -факторов  $\gamma_k = \frac{\chi_k}{\chi_1}$  (нормированных интегральных характеристик профиля засветки) [5].

В работе [6] показано, что при анализе PЧФ с использованием метода PCH с коррекцией профиля засветки значения яркости линейно коррелируют со значениями параметров коррекции  $F_1$ ,  $F_2$  профиля засветки, что не позволяет сравнивать полученные оценки из различных экспериментов и проводить глобальный анализ [10] нескольких PЧФ или кумулянтов со связыванием значений яркости. Подгонка  $\gamma$ -факторов также не позволяет проводить глобальный анализ данных [6]. Применение полиномиальной аппроксимации профиля засветки приводит к уменьшению чувствительности метода при разрешении многокомпонентных систем, так как рост числа варьируемых параметров увеличивает число

степеней свободы. Вышеуказанные недостатки устранены в методе анализа РЧФ, использующем коррекцию профиля засветки в виде (1) и два уравнения нормировки (взамен одного для РСН) для определения двух неизвестных инструментальных факторов, характеристического объема освещенной области и яркости в фокусе [11].

Тем не менее применение метода, описанного в работе [11], не позволяет во многих случаях разрешить смесь веществ, отличающихся по яркости лишь в 2 раза, например смесь зеленого флуоресцирующего белка (или белка, помеченного какой-либо флуоресцирующей меткой), находящегося в форме мономера и димера. Для успешного разрешения подобной смеси требуется накопление значительной статистики фотоотсчетов, что в ряде случаев, например при работе с живыми клетками, не представляется возможным. Деграция флуорофоров и изменение местоположения клетки накладывают жесткие временные ограничения на длительность измерений. Для преодоления указанных недостатков предлагается модификация хорошо зарекомендовавшего себя метода анализа РЧФ, приведенного в [11], путем введения параметра  $s$ , являющегося отношением яркостей олигомера и мономера и отражающего стехиометрию молекулярного комплекса. Фиксация данного параметра в ожидаемом значении или наложение на него жестких ограничений приводят к существенному увеличению разрешающей способности метода.

### Теория метода

Производящая функция  $G(\xi)$  распределения  $P(n)$  числа фотонов, излученных флуоресцентными молекулами, находящимися в равновесном состоянии в открытом объеме наблюдения  $V$  в течение интервала счета  $T$ , может быть записана в общем случае для произвольной функции профиля засветки  $B(\mathbf{r})$  в следующем виде [2]:

$$G(\xi, T) = \exp\left(\sum_i \langle C \rangle_i \int_V (e^{(\xi-1)q_i TB(\mathbf{r})} - 1) d\mathbf{r}\right), \quad (2)$$

где  $\langle C \rangle$  – средняя концентрация молекул  $i$ -й компоненты;  $q_i$  – их характеристическая яркость. При выводе выражения (2) использовались следующие допущения: вклад каждой молекулы в зарегистрированный поток фотонов независим, интенсивность флуоресценции постоянна в течение короткого интервала  $T$ , процессами фоторазрушения и насыщения можно пренебречь [2]. РЧФ  $P(n)$  можно получить через обратное преобразование Фурье от характеристической функции, получаемой из ПФ путем замены формальной переменной  $\xi$  на комплексную экспоненту  $e^{i\varphi}$ .

$$P(n) = \text{БПФ}^{-1}\left(G(e^{i\varphi})\right), \quad n = 0, 1, \dots, m-1, \quad \varphi = \frac{2\pi n}{m}. \quad (3)$$

При выводе ПФ будем использовать гауссовскую аппроксимацию профиля засветки с коррекцией вида (1). Запишем выражение для интегралов  $\chi_{Gk}$  гауссовского распределения (интегрирование производится в бесконечных пределах, так как объем освещенной области много меньше размера кюветы с измеряемым веществом):

$$\chi_{Gk} = \int_V B_G^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = B_0^k k^{-3/2} \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} w_0^2 z_0. \quad (4)$$

Введем обозначение  $A_0 = \omega_0^2 z_0$ . Для определения неизвестных параметров  $A_0, B_0$  будем использовать систему нормировочных уравнений [11]:

$$\int_V B_G(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \chi_{G1}, \quad \int_V B_G^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \chi_{G2}. \quad (5)$$

В работе [11] было показано, что использование нормировочных уравнений вида (5) эквивалентно следующей замене переменных:  $N_{\text{eff}} = \langle C \rangle \frac{\chi_{G1}^2}{\chi_{G2}} = \langle C \rangle V_{\text{eff}}, \quad q^* = \frac{q\chi_{G2}}{\chi_{G1}}$ , где  $V_{\text{eff}} = \frac{\chi_{G1}^2}{\chi_{G2}}$  – так называемый эффективный объем [1, 9]. Разложив экспоненту под интегралом в выражении (2) в ряд Тейлора и принимая во внимание (1) и (4), получим [11]

$$G(\xi, T) = \exp \left\{ \frac{1+F_2}{(1+F_1)^2} \sum_i N_{\text{eff}i} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi-1)2\sqrt{2}(1+F_1)q_i^*T)^k (1+F_k)}{(1+F_2)^k k!(2k)^{3/2}} \right\}, \quad (6)$$

где  $N_{\text{eff}}$  – число молекул (макромолекул) в эффективном объеме  $V_{\text{eff}}$ ;  $q^*$  – приведенная яркость, связанная с истинной в случае гауссовской аппроксимации простым соотношением  $q^* = \frac{q}{2\sqrt{2}}$ . Для исключения необходимости пересчета приведенной яркости в истинную переписем выражение (6) с учетом данного соотношения

$$G(\xi, T) = \exp \left\{ \frac{1+F_2}{(1+F_1)^2} \sum_i N_{\text{eff}i} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi-1)(1+F_1)q_i T)^k (1+F_k)}{(1+F_2)^k k!(2k)^{3/2}} \right\}. \quad (7)$$

При анализе смеси «мономер – олигомер» часто известно соотношение их яркостей или концентраций. Введем новые параметры, равные отношению характеристических яркостей и концентраций соответственно (индекс  $m$  означает мономер):

$$s_i = \frac{q_i}{q_m}, \quad r_i = \frac{N_{\text{eff}i}}{N_{\text{eff}m}}. \quad (8)$$

Следовательно, димер должен иметь значение параметра  $s = 2$  (следует помнить, что  $s$  не обязательно должен быть целым числом из-за потерь вследствие, например, резонансного переноса энергии). После подстановки (8) в (7) получим ( $M$  – количество компонент в смеси)

$$\begin{aligned} G(\xi, T) &= \exp \left\{ \frac{1+F_2}{(1+F_1)^2} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(\xi-1)^k (1+F_1)^k (1+F_k)}{(1+F_2)^k k!(2k)^{3/2}} \sum_i N_{\text{eff}i} q_i^k T^k \right\} = \\ &= \exp \left\{ \frac{1+F_2}{(1+F_1)^2} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(\xi-1)^k (1+F_1)^k (1+F_k)}{(1+F_2)^k k!(2k)^{3/2}} N_m q_m^k T^k \left[ 1 + \sum_{i=2}^M r_i s_i^k \right] \right\}. \end{aligned} \quad (9)$$

Используя полученное выражение ПФ, можно найти выражения для факториальных кумулянтов РЧФ  $K_{[k]}$  (квадратные скобки означают факториальные индексы) путем дифференцирования логарифма ПФ

$$K_{[k]}(T) = \left. \frac{d^k \ln G(\xi, T)}{d\xi^k} \right|_{\xi=1}, \quad k = 1, 2, \dots \quad (10)$$

Последовательно выполняя дифференцирование (9), получим

$$\begin{aligned} K_{[1]}(T) &= \frac{1}{2\sqrt{2}} N_m q_m T \left[ 1 + \sum_{i=2}^M r_i s_i \right], \\ K_{[2]}(T) &= \frac{1}{8} N_m q_m^2 T^2 \left[ 1 + \sum_{i=2}^M r_i s_i^2 \right], \\ K_{[k]}(T) &= \frac{(1+F_1)^{k-2}}{(2k)^{3/2} (1+F_2)^{k-1}} N_m q_m^k T^k \left[ 1 + \sum_{i=2}^M r_i s_i^k \right], \quad k = 3, 4, \dots \end{aligned} \quad (11)$$

Отметим, что факториальные кумулянты высоких порядков имеют большую погрешность [4], поэтому на практике обычно используют первые 5–6 кумулянтов.

Выражения (9) и (11) являются основой метода анализа РЧФ и его кумулянтов в ФФС. Анализ данных выполняется по методу наименьших квадратов (МНК). Теоретической моделью для анализа РЧФ являются выражения (9), (3). Система уравнений (11) применяется для анализа кумулянтов РЧФ. Теоретически полученные выражения позволяют находить оценки параметров вещества для произвольного

количества компонент. Но на практике обычно приходится ограничиваться числом компонент, равным 2 ( $M = 2$ ). При небольшом отношении «сигнал – шум», когда накопленной статистики фотоотсчетов недостаточно для разрешения двухкомпонентной смеси, необходимо использовать для параметров  $s$  или  $r$  априори известные значения, а для инструментальных параметров  $F_1, F_2$  – значения, полученные в калибровочном эксперименте.

### Начальные приближения

Метод наименьших квадратов является итерационным и требует задания начальных приближений (НП) для параметров модели. Если НП близки к наилучшим оценкам параметров, для применения МНК необходимо всего несколько итераций для достижения глобального минимума. В противном случае, особенно для сложной поверхности целевого критерия, имеющего множество локальных минимумов, сходимость к глобальному минимуму не гарантируется или это требует больших временных затрат. Поскольку в основе кумулянтного анализа РЧФ лежит система уравнений, связывающих экспериментальные и теоретические факториальные кумулянты, для генерации НП необходимо решение системы с числом уравнений, равным числу оцениваемых параметров. Вывод некоторого общего выражения для НП не является целесообразным, так как точность получаемых оценок параметров сильно зависит от порядка используемых кумулянтов. Вывод НП для однокомпонентной модели не представляет сложности [6]. Приведем вывод НП для наиболее часто используемого случая двухкомпонентной смеси с известными индексом стехиометрии комплекса  $s$  и инструментальными параметрами  $F_1, F_2$ .

Для нахождения НП воспользуемся методом моментов. В нашем случае потребуется решение следующей системы уравнений:

$$\begin{aligned} N_m q_m T + N_s s q_m T &= 2\sqrt{2}\tilde{K}_{[1]} = a, \\ N_m q_m^2 T^2 + N_s s^2 q_m^2 T^2 &= 8\tilde{K}_{[2]} = b, \\ N_m q_m^3 T^3 + N_s s^3 q_m^3 T^3 &= \tilde{K}_{[3]} 6^{3/2} \frac{(1 + F_2)^2}{1 + F_1} = c \end{aligned} \quad (12)$$

относительно  $N_m, N_s, q_m$ , где  $N_s$  – количество (макро)молекул комплекса;  $\tilde{K}_{[1]}$  – экспериментально полученные кумулянты; переменные  $a, b, c$  введены для сокращения записи. Выразим из первого уравнения  $N_m$ :

$$N_m = \frac{a}{q_m T} - N_s s \quad (13)$$

и подставим полученное выражение во второе и третье уравнения системы (12). Из второго уравнения выразим  $N_s$ :

$$N_s = \frac{b - a q_m T}{q_m^2 T^2 (s^2 - s)} \quad (14)$$

и, соответственно, подставим в третье уравнение. Полученное квадратное уравнение

$$q_m^2 T^2 a(1 - d) + q_m T b d - c = 0, \quad (15)$$

где  $d = \frac{s^3 - s}{s^2 - s}$ , легко разрешимо относительно  $q_m$ . Данная оценка  $q_m$  затем подставляется в выражения (13), (14). Оценка  $r$  получается из соотношения  $r = \frac{N_s}{N_m}$ .

Если дискриминант  $D = T^2 [(bd)^2 + 4ac(1 - d)] < 0$ , то решения в действительной области не существует. Если  $D \geq 0$ , то получаем два возможных действительных корня уравнения (15)

$$q_m = \frac{-bdT \pm \sqrt{D}}{2a(1 - d)T^2}. \quad (16)$$

Для выбора наилучшего решения предлагается сначала отбрасывать физически невозможные отрицательные и нулевые значения. Затем, если по-прежнему остаются два корня, наилучшим считается тот, у которого значение критерия  $\chi^2$ , вычисленного по найденному набору оценок параметров  $N_m, r, q_m$ , минимально. Если какой-либо из параметров ( $s, F_1, F_2$ ) заранее неизвестен, НП можно найти путем варьирования данного параметра в некотором интервале и выбора наилучшей комбинации  $N_m, r, q_m$  по минимуму значения критерия  $\chi^2$  [12]. Необходимо отметить, что найденные НП могут использоваться и самостоятельно для быстрой неитерационной оценки параметров вещества.

### Тестирование метода

Программная реализация МНК была выполнена на языке C++. Теоретическое РЧФ находилось путем вычисления ПФ (9) и применения преобразования (3). Теоретические факториальные кумулянты находились в соответствии с (11). Экспериментальные кумулянты вычислялись на основе измеренного РЧФ  $\tilde{P}(n)$ :

$$\tilde{K}_{[k]} = \tilde{F}_k - \sum_{i=1}^{k-1} \frac{(k-1)!}{i!(k-i-1)!} \tilde{K}_{[k-i]} \tilde{F}_i, \quad \tilde{F}_k = \sum_{n=k}^m n(n-1)\dots(n-k+1) \tilde{P}(n). \quad (17)$$

Градиентный метод Марквардта – Левенберга [13] был выбран как оптимизационный. Для целевого критерия использовался взвешенный критерий  $\chi^2$ , стремящийся к 1 при наилучшей аппроксимации. Качество аппроксимации проверялось путем вычисления значения взвешенного критерия  $\chi^2$  и визуального анализа остатков. Стандартные отклонения оцениваемых параметров находились по методу асимптотических стандартных ошибок (АСО) [14]. Тестирование метода проводилось на смоделированных и измеренных данных.

### Тестирование метода на смоделированных данных

Алгоритм, описанный в работе [15], использовался для имитационного моделирования потока фотоотсчетов. В целях уверенного разрешения двухкомпонентной смеси «мономер – димер» ( $N_m = 5, q_m = 50\,000, N_s = 1, q_s = 1 \cdot 10^6, F_1 = 0,8$ ) поток моделировался на интервале 500 с. РЧФ рассчитывалось с шириной интервала  $T = 2 \cdot 10^{-5}$  с. Результаты анализа РЧФ и его кумулянтов представлены в таблице. Близость оценок параметров к их истинным значениям, величина критерия  $\chi^2$  и равномерное распределение остатков относительно нуля свидетельствуют о действенности представленного метода.

Результаты анализа смоделированных и измеренных данных

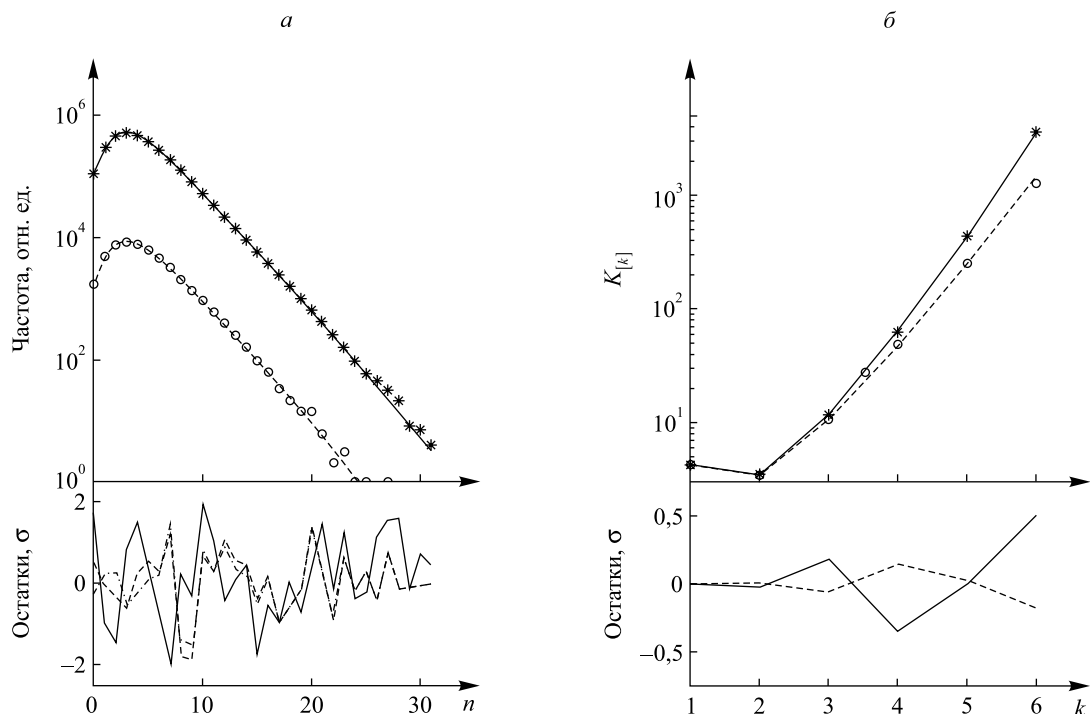
Вид анализа	Оценка параметра					$\chi^2$
	$N_m$	$q_m$	$r$	$s$	$F_1$	
Анализ РЧФ, смоделированные данные	4,85 ± 0,38	57 756 ± 8007	0,25 ± 0,15	2,0 ± 0,14	0,79 ± 0,04	0,82
Анализ кумулянтов, смоделированные данные	4,53 ± 3,5	54 720 ± 30 670	0,35 ± 0,96	2,0 фикс.	0,80 ± 0,17	1,21
Анализ РЧФ, измеренные данные, 60 с	5,96 ± 0,13 (5,83)	80 016 ± 3481 (90 070)	0,078 ± 0,009 (0,04)	3,3 ± 0,13 (3,5 фикс.)	0,83 ± 0,04 (0,85 фикс.)	1,02
Анализ кумулянтов, измеренные данные, 60 с	5,82 ± 0,55 (5,92)	87 140 ± 2612 (81 670)	0,055 ± 0,074 (0,072)	3,3 фикс. (3,3 фикс.)	0,87 ± 0,15 (0,85 фикс.)	0,40
Анализ РЧФ, измеренные данные, 1 с (параметр $s$ фиксирован)	6,27 ± 0,25 (6,07)	66 327 ± 16 518 (59 720)	0,14 ± 0,11 (0,20)	3,3 фикс. (3,3 фикс.)	0,76 ± 0,11 (0,83 фикс.)	0,76
Анализ РЧФ, измеренные данные, 1 с (все параметры оцениваются)	14,8 ± 37,2	29 670 ± 52 530	0,034 ± 0,23	11,3 ± 44,7	$2,5 \times 10^{-3} \pm 2,36$	0,70
Анализ кумулянтов, измеренные данные, 1 с	6,19 ± 0,97 (6,07)	64 130 ± 51 430 (59 720)	0,16 ± 0,44 (0,20)	3,3 фикс. (3,3 фикс.)	0,80 ± 0,63 (0,83 фикс.)	0,055

Примечания: 1. В скобках приведены НП. 2. Фикс. – фиксация параметра в данном значении.

### Тестирование метода на измеренных данных

В качестве модели смеси флуоресцирующих веществ с различающейся яркостью была выбрана смесь фрагментов антител IgG, помеченных красителями Alexa 488 (*Molecular Probes Europe BV*, Нидерланды) и Fab2-Cy2 (Нидерланды). Экспериментальные данные предоставлены кафедрой паразитологии медицинского центра Лейденского университета (г. Лейден, Нидерланды). Натрий-фосфатный буфер (0,035 моль/л фосфата, 0,15 моль/л NaCl, pH 7,6) использовался в качестве растворителя. Все измерения были выполнены с помощью инвертированного конфокального *epi*-флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, оснащенного объективом Zeiss Neofluar (40X 1,2 N.A.) и системой регистрации ConfoCor 2 (*Carl Zeiss*, Германия). Аргон-ионный лазер использовался для возбуждения флуоресценции на длине волны 488 нм. При времени измерения 60 с получили число зарегистрированных фотонов около  $1,3 \cdot 10^7$ . РЧФ и кумулянты рассчитывались при  $T = 2 \cdot 10^{-5}$  с.

На первом этапе выполнялась генерация НП. Затем проводился финальный анализ как РЧФ, так и его кумулянтов по методу наименьших квадратов. Для проверки разрешающей способности метода был также выполнен расчет РЧФ и его кумулянтов для первой секунды измерения. Результаты анализа в течение 60 и 1 с измерений приведены в таблице. Графические результаты аппроксимации экспериментальных данных представлены на рисунке. Анализ полного измерения (60 с) показал, что для успешной аппроксимации данных достаточно коррекции первого порядка ( $F_1 \neq 0, F_2 = 0$ ). Значение  $F_2$  было близко к нулю и практически не сказывалось на величине критерия  $\chi^2$ .



Результаты аппроксимации РЧФ (а) и кумулянтов РЧФ (б) смеси IgG-Alexa 488 и Fab2-Cy2:  
 — результаты анализа полного измерения (60 с) (\*); - - - результаты анализа измерения за 1 с (o);  
 - · - · - остатki при анализе за 1 с измерения с варьированием всех параметров;  $\sigma$  – среднеквадратическое отклонение

Все параметры оценивались в течение 60 с. Для измерения за 1 с параметры  $s$  и  $F_1$  были зафиксированы в значения, полученные при анализе за 60 с измерения. Попытка анализа измерения за 1 с с варьированием всех параметров привела к получению нереалистичных их оценок с очень широкими доверительными интервалами (см. таблицу). Из представленных результатов можно заключить, что разработанный метод анализа РЧФ уверенно разрешает двухкомпонентную смесь. Кумулянтный анализ показал немного худшие результаты, что большей частью отражалось в величине доверительных интервалов. Фиксация параметров  $s$  или  $r$  в обоих случаях приводила к увеличению разрешающей способности метода, что проявлялось в уменьшении стандартных отклонений оцениваемых параметров.

Таким образом, разработанный метод анализа РЧФ и его кумулянтов характеризуется большей разрешающей способностью многокомпонентных систем по сравнению с методами FCA, PCH, FIDA. Другой отличительной особенностью данного метода является возможность получения оценки истинной, а не приведенной характеристической яркости ( $q$ ).

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Elson E. L., Magde D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory // *Biopolymers*. 1974. Vol. 13, issue 1. P. 1–27 [Elson E. L., Magde D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*. 1974. Vol. 13, issue 1. P. 1–27 (in Engl.)].
2. Kask P., Palo K., Ullmann D., Gall K. Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. Vol. 96, № 24. P. 13756–13761 [Kask P., Palo K., Ullmann D., Gall K. Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. Vol. 96, No. 24. P. 13756–13761 (in Engl.)].
3. Chen Y., Müller J. D., So P. T. C., Gratton E. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77, issue 1. P. 553–567 [Chen Y., Müller J. D., So P. T. C., Gratton E. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* 1999. Vol. 77, issue 1. P. 553–567 (in Engl.)].
4. Müller J. D. Cumulant analysis in fluctuation spectroscopy // *Biophys. J.* 2004. Vol. 86, issue 6. P. 3981–3992 [Müller J. D. Cumulant analysis in fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* 2004. Vol. 86, issue 6. P. 3981–3992 (in Engl.)].
5. Bin Wu, Chen Y., Müller J. D. Fluorescence Fluctuation Spectroscopy of mCherry in Living Cells // *Biophys. J.* 2009. Vol. 96, № 6. P. 2391–2404 [Bin Wu, Chen Y., Müller J. D. Fluorescence Fluctuation Spectroscopy of mCherry in Living Cells. *Biophys. J.* 2009. Vol. 96, No. 6. P. 2391–2404 (in Engl.)].
6. Skakun V. V., Novikov E. G., Apanasovich T. V., Apanasovich V. V. Fluorescence cumulants analysis with non-ideal observation profiles // *Methods Appl. Fluoresc.* 2015. Vol. 3, № 4. 045003 [Skakun V. V., Novikov E. G., Apanasovich T. V., Apanasovich V. V. Fluorescence cumulants analysis with non-ideal observation profiles. *Methods Appl. Fluoresc.* 2015. Vol. 3, No. 4. 045003 (in Engl.)].
7. Sanchez-Andres A., Chen Y., Müller J. D. Molecular Brightness Determined from a Generalized Form of Mandel's Q-Parameter // *Biophys. J.* 2005. Vol. 89, № 5. P. 3531–3547 [Sanchez-Andres A., Chen Y., Müller J. D. Molecular Brightness Determined from a Generalized Form of Mandel's Q-Parameter. *Biophys. J.* 2005. Vol. 89, No. 5. P. 3531–3547 (in Engl.)].
8. Hur K., Müller J. D. Quantitative Brightness Analysis of Fluorescence Intensity Fluctuations in *E. coli* // *PLOS ONE*. 2015. 10 (6): e0130063 [Hur K., Müller J. D. Quantitative Brightness Analysis of Fluorescence Intensity Fluctuations in *E. coli*. *PLOS ONE*. 2015. 10 (6): e0130063 (in Engl.)].
9. Huang B., Perroud T. D., Zare R. N. Photon Counting Histogram: One – Photon Excitation // *ChemPhysChem*. 2004. Vol. 5, № 10. P. 1523–1531 [Huang B., Perroud T. D., Zare R. N. Photon Counting Histogram: One – Photon Excitation. *ChemPhysChem*. 2004. Vol. 5, No. 10. P. 1523–1531 (in Engl.)].
10. Beechem J. M. Global analysis of biochemical and biophysical data // *Methods Enzymol.* 1992. Vol. 210. P. 37–54 [Beechem J. M. Global analysis of biochemical and biophysical data. *Methods Enzymol.* 1992. Vol. 210. P. 37–54 (in Engl.)].
11. Скакун В. В., Апанасович В. В. Анализ распределения числа фотоотчетов с коррекцией профиля засветки в одномолекулярной флукуационной спектроскопии // *Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика*. 2008. № 2. С. 31–35 [Skakun V. V., Apanasovich V. V. Analiz raspredeleniya chisla fotootchetov s korrektsiei profilya zasvetki v odnomolekulyarnoi fluktuatsionnoi spektroskopii = Photon counting distribution analysis with brightness profile correction in single molecule fluctuation spectroscopy. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2008. No. 2. P. 31–35 (in Russ.)].
12. Skakun V. V., Novikov E. G., Apanasovich V. V., Tanke H. J., Deelder A. M., Mayboroda O. A. Initial guesses generation for fluorescence intensity distribution analysis // *Eur. Biophys. J.* 2006. Vol. 35, № 5. P. 410–423 [Skakun V. V., Novikov E. G., Apanasovich V. V., Tanke H. J., Deelder A. M., Mayboroda O. A. Initial guesses generation for fluorescence intensity distribution analysis. *Eur. Biophys. J.* 2006. Vol. 35, No. 5. P. 410–423 (in Engl.)].
13. Marquardt D. W. Algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters // *J. Soc. Indust. Appl. Math.* 1963. Vol. 11. P. 431–441 [Marquardt D. W. Algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.* 1963. Vol. 11. P. 431–441 (in Engl.)].
14. Johnson M. L., Faunt L. M. Parameter Estimation by Least – Squares Methods // *Methods Enzymology*. 1992. Vol. 210. P. 1–37 [Johnson M. L., Faunt L. M. Parameter Estimation by Least – Squares Methods. *Methods Enzymology*. 1992. Vol. 210. P. 1–37 (in Engl.)].
15. Shingaryov I. P., Skakun V. V., Apanasovich V. V. Simulation of Autocorrelation Function and Photon Counting Distribution in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy // *Fluoresc. Spectrosc. Microsc.* 2014. Vol. 1076. P. 743–755 [Shingaryov I. P., Skakun V. V., Apanasovich V. V. Simulation of Autocorrelation Function and Photon Counting Distribution in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Fluoresc. Spectrosc. Microsc.* 2014. Vol. 1076. P. 743–755 (in Engl.)].

Статья поступила в редколлегию 17.02.2016.  
Received by editorial board 17.02.2016.