

АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ РАСПРЕДЕЛЕНИЙ ЧИСЛА ФОТООТСЧЕТОВ В СКАНИРУЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

Предложен метод анализа пространственного распределения числа фотоотсчетов в системах одноквантовой флуоресцентной спектроскопии. Метод справедлив для эргодических систем и основан на применении теории анализа временных распределений числа фотоотсчетов. Эффективность разработанного метода подтверждена в ходе анализа экспериментальных данных, полученных в сотрудничестве с кафедрой молекулярной цитологии университета Амстердама.

Введение. Флуоресцентная флуктуационная спектроскопия (ФФС) – это совокупность методов, позволяющих исследовать физико-химические параметры растворов молекулярных соединений на основе статистического анализа флуктуаций интенсивности флуоресценции в условиях термодинамического равновесия [1]. Источником флуктуаций интенсивности является изменение числа и положения флуоресцентных молекул в открытом объеме регистрации, локализованным лучом лазера, сфокусированным с помощью объектива с большой числовой апертурой (1.2 NA и более). В этом случае измерения производятся в предельно малом (менее 1 фл) неоднородно освещенном объеме. Методы ФФС обладают недостижимой для других методов чувствительностью, отсутствием разрушающего воздействия на исследуемый образец и возможностью исследовать вещество на одномолекулярном уровне.

Анализ распределений числа фотоотсчетов (РЧФ), зарегистрированных в течение некоторого короткого временного интервала регистрации T позволяет найти характеристическую яркость флуоресцентных молекул и их концентрацию, и, соответственно, разрешать смесь веществ с разным квантовым выходом [2–4]. Анализ РЧФ также предоставляет возможность разрешать смесь веществ, отличающихся только по индексу стехиометрии, например, смесь мономер-димер [5], что в свою очередь предоставляет возможность исследования *in-vivo* процессов димеризации и изомеризации [1, 5].

Для анализа РЧФ в ФФС к настоящему времени предложено несколько методов. Наиболее известным из них является метод анализа гистограмм числа фотонов (Photon Counting Histogram – PCH) [2]. Метод PCH был разработан для анализа результатов одноточечных измерений, где флуктуации флуоресценции регистрируются во времени из одной точки, сфокусированной в объеме исследуемого вещества. Современные конфокальные лазерные микроскопы оснащены сканирующей оптикой, позволяющей проводить не только одноточечные измерения, но и в процессе сканирования получать пространственные флуоресцентные изображения исследуемого образца, что определило широкую распространенность данной методики. Результатом измерений является стек изображений, где уже произведен подсчет количества фотонов, попавших в каждый пиксель формируемого изображения. Для оценки параметров исследуемого вещества на основе стека изображений разработан и широко используется метод Number & Brightness (N&B) [6]. В методе N&B среднее количество молекул в объеме наблюдения определяется как отношение квадрата средней интенсивности пикселей изображения к дисперсии, а яркость – как отношение дисперсии к средней интенсивности. Таким образом, оценки яркости и количества молекул получаются лишь на основе первого и второго моментов РЧФ, вычисленных на основе пикселей изображения. Фактически, данный метод является лишь способом генерации начальных приближений [7] для метода PCH в самом упрощенном виде в предположении наличия одной компоненты исследуемого вещества без учета фонового шума, внефокусной засветки и других инструментальных искажений. В тоже время, если образец представляет собой однородный раствор исследуемого вещества, то каждый пиксель изображения можно рассматривать как отдельный временной интервал регистрации. Если исследуемая система обладает эргодическими свой-

ствами, что характерно для широкого круга исследуемых систем, мы можем применить теорию хорошо зарекомендовавшего себя метода РСН для анализа стеков изображений, полученных в сканирующем эксперименте. Назовем этот новый метод как метод SPCH (Space PCN).

Метод SPCH. Как и в методе РСН для вычисления РЧФ, зарегистрированных от двух и более молекул, будем использовать последовательное вычисление конволюций одно-молекулярного распределения числа фотоотчетов $p^{(1)}(n, q)$ [2]

$$p^{(1)}(n, q) = \frac{1}{Q\sqrt{\pi n}} \int_0^\infty \gamma(n, qTe^{-2x^2}) dx, n = 1, 2, \dots, \quad p^{(1)}(0, q) = 1 - \sum_{n=1}^m p^{(1)}(n, q) \quad (1)$$

где $\gamma(n, x)$ неполная гамма-функция, q характеристическая яркость, определяемая количеством фотонов, испущенных одной молекулой в единицу времени (count per second per molecule, cps), Q константа, требуемая для нормировки распределения. Распределение РЧФ $P(n)$ от числа молекул N концентрации C в открытом объеме наблюдения V_{eff} , $N = CV_{eff}$, $V_{eff} = (\int_V B(\mathbf{r}) d\mathbf{r})^2 / \int_V B^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$ есть сумма одно-молекулярных распределений $p^{(1)}(n, q)$, свернутых между собой $j - 1$ раз и взвешенных на вероятность нахождения $j = 0, 1, \dots$ молекул в объеме наблюдения (по распределению Пуассона с параметром QN) [2]

$$P(n, N, q) = \sum_{j=0}^{\infty} p^{(j)}(n, q) Poi(j, QN), \quad (2)$$

$$p^{(j)}(n, q) = \underbrace{p^{(1)} \otimes \dots \otimes p^{(1)}}_{j-1 \text{ раз}}(n, q), \quad p^{(0)}(n, q) = \begin{cases} 1, & n = 0, \\ 0, & n \neq 0. \end{cases}$$

При однофотонном возбуждении функция профиля засветки $B(\mathbf{r})$ аппроксимируется трехмерным асимметричным распределением Гаусса, вытянутым по оси z .

Материалы. Для тестирования метода были проведены измерения раствора молекул зеленого флуоресцирующего белка (экспериментальные данные предоставлены кафедрой молекулярной цитологии университета Амстердама). Все измерения были выполнены с помощью лазерного сканирующего инвертированного конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV1000 с системой регистрации PicoHarp 300 (PicoQuant, Berlin). Измерения были произведены для одного и того же образца в сканирующем и одноточечном режимах. В одноточечном режиме измерение длилось 125 с. Всего было зарегистрировано 1.1×10^6 фотонов. В сканирующем режиме получен стек из 100 изображений 128 на 128 пикселей с временем регистрации фотонов для одного пикселя 100 мкс. Линейный пространственный размер одного пикселя составлял приблизительно 100 нм. Количество зарегистрированных фотонов составило 1.2×10^6 .

Результаты. Для сравнения результатов анализа РЧФ, рассчитанных по пространству для сканирующего измерения и анализа РЧФ, вычисленного во времени для одноточечного измерений, РЧФ для одноточечного эксперимента рассчитывалось с длительностью интервала регистрации $T = 1 \times 10^{-4}$ с, равному времени регистрации фотонов для одного пикселя в стеке изображений. В соответствии с идеей применения метода РСН для анализа пространственного распределения числа фотоотчетов, где каждый пиксель соответствует одиночному счетному временному интервалу, для каждого фрейма строилась гистограмма интенсивностей пикселей изображения. Соответственно, для сканирующего измерения было получено 100 РЧФ.

Теоретическое РЧФ находилось по формулам (1), (2). Анализ РЧФ по методам РСН и SPCH основан на методе наименьших квадратов с оптимизацией Левенберга-Марквардта и предполагает аппроксимацию экспериментально полученного РЧФ моделью (1), (2) [7]. Качество аппроксимации проверялось путем вычисления значения взвешенного критерия χ^2 и визуальным анализом остатков. Стандартные отклонения оцениваемых параметров при анализе одноточечного измерения находились по методу асимптотических стандартных ошибок

(АСО) при доверительной вероятности 0.95 [7]. Гистограммы оценок яркости q и количества молекул в эффективном объеме наблюдения N , полученных в результате применения методов SPCH и N&B при анализе пространственных РЧФ приведены на рисунке 1. Средние значения и стандартные отклонения оценок q и N приведены в таблице 1. Выбросы q и N , определенные стандартным способом как превышающие 3 стандартные отклонения относительно медианы, были исключены из подсчета средних (6 для метода SPCH и 4 для N&B). Результаты анализа однокоточного РЧФ также приведены в таблице для сравнения. При анализе однокоточного измерения получено значение критерия $\chi^2 = 0.89$ и равномерное распределение остатков относительно нуля (данные не приведены), что свидетельствует об хорошем качестве аппроксимации. Качество аппроксимации пространственных РЧФ также является удовлетворительным: разброс остатков не превышает 3 стандартных отклонений (данные не представлены), среднее значение критерия равно 1.1.

Таблица 1

Результаты анализа РЧФ

Параметр	SPCH	Однокоточное измерение	N&B
N	18.84±6.29	16.49±0.87	18.17±5.63
q , cps	1159±423	1454±77	1235±382

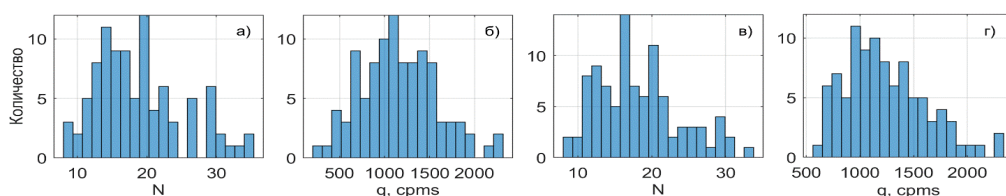


Рисунок 1. Гистограммы оценок яркости и количества молекул в эффективном объеме наблюдения, полученные: а) и б) – при анализе методом SPCH, в) и г) – при анализе методом N&B.

Заключение. В работе предложен новый метод анализа пространственных распределений числа фотоотсчетов для эргодических систем. Эффективность работы метода SPCH подтверждена в ходе сравнительного анализа с методами РЧН и N&B. Оценки яркости и концентрации молекул хорошо согласуются друг с другом для всех трех методов. Это подтверждает гипотезу об эргодичности исследуемой системы и позволяет сделать вывод о возможности применения теории метода РЧН для анализа пространственных РЧФ, рассчитанных на основе стека изображений.

Список литературы

1. Kitamura, A. State-of-the-Art Fluorescence Fluctuation-Based Spectroscopic Techniques for the Study of Protein Aggregation / A. Kitamura, M. Kinjo // *Int J Mol Sci.* – 2018. – 19, 964.
2. Huang, B. Photon counting histogram: One-photon excitation / B. Huang, T. D. Perroud, R. N. Zare // *ChemPhysChem.* – 2004. – 5(10). – P. 1523–1531.
3. Kask, P. Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology / P. Kask, K. Palo, D. Ullmann, K. Gall // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1999. – 96(24). – P. 13756–13761.
4. Скакун, В.В. Анализ распределения числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки в одномолекулярной флуктуационной спектроскопии / В. В. Скакун, В. В. Апанасович // *Вестн. Беларус. гос. ун-та. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика.* – 2008. – № 2. – С. 31–35.
5. Nederveen-Schippers, L. M. Combined FCS and PCH Analysis to Quantify Protein Dimerization in Living Cells / L.M. Nederveen-Schippers *et al* // *Int J Mol Sci.* – 2021. – 22, 14.
6. Digman, M. A. Mapping the Number of Molecules and Brightness in the Laser Scanning Microscope / M.A. Digman, R. Dalal, A.F. Horwitz, E. Gratton // *Biophys J.* – 2008. – 94(6), 2320.
7. Skakun, V.V. Global analysis of autocorrelation functions and photon counting distributions in fluorescence fluctuation spectroscopy / V.V. Skakun, A.V. Digris, and V.V. Apanasovich // *Methods in Molecular Biology.* – 2014. – 1076. – P. 719–741.