

АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА ФОТООТСЧЕТОВ В СКАНИРУЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

М. В. Антоненко, В. В. Скакун

*Белорусский государственный университет
Минск, Беларусь
e-mail: misha.antonenko.minsk@gmail.com*

Предложен метод анализа данных во флуоресцентной флукуационной спектроскопии, позволяющий находить характеристическую яркость и количество молекул на основе флуоресцентного изображения исследуемого вещества, получаемого в результате сканирования образца. Метод основан на применении метода РСН, разработанного для одноточечных измерений, для анализа пространственного распределения интенсивности флуоресценции изображения. Проведены тестирование метода на экспериментальных изображениях и сравнение результатов, полученных при одноточечном режиме измерения.

Ключевые слова: флуоресцентная флукуационная спектроскопия; анализ распределения числа фотоотчетов; флуоресцентные изображения.

SPATIAL PHOTON COUNTING HISTOGRAM ANALYSIS IN THE SCANNING FLUORESCENCE FLUCTUATION SPECTROSCOPY

M. V. Antonenka, V. V. Skakun

*Belarusian State University
Minsk, Belarus*

A new approach of data analysis in fluorescence spectroscopy is proposed. It allows to estimate brightness and number of molecules from the fluorescence image of scanned sample under investigation. This method based on applying photon count histogram (PCH) method for the fluorescence intensity spatial distribution analysis. The applicability of the proposed method was verified by testing on the experimental images and by comparing with results from one-point measurements mode.

Keywords: fluorescence fluctuation spectroscopy; photon count histogram; fluorescence images.

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентная флукуационная спектроскопия (ФФС) – это совокупность методов, позволяющих исследовать физико-химические параметры вещества на основе анализа флукуаций интенсивности флуоресценции [1]. Флукуации интенсивности могут быть вызваны изменением числа флуоресцентных молекул, например вследст-

вие диффузии, или изменением их квантового выхода. Измерения производятся в предельно малом освещенном объеме (может достигать значений менее 1 фл), определяемом лучом лазера, сфокусированным оптической системой с высокой числовой апертурой. В объеме такого размера может поместиться либо одна макромолекула, либо несколько небольших молекул. Таким образом, методы ФФС позволяют исследовать вещество на одномолекулярном уровне. Сочетание высокой чувствительности с отсутствием разрушающего воздействия на исследуемое вещество приводит к интенсивному применению этих методов для исследования динамики молекулярных процессов и изучения процессов переноса вещества в живых клетках.

При проведении измерений луч лазера фокусируется на вход инвертированного конфокального микроскопа и через объектив с высокой числовой апертурой фокусируется на исследуемом образце. Хотя флуоресцентные молекулы возбуждаются на всем пути распространения лазерного луча, наибольший вклад в регистрируемый сигнал вносят молекулы, находящиеся в фокусе объектива. Испускаемое флуоресцентное излучение собирается тем же объективом микроскопа и поток зарегистрированных фотонов сохраняется в памяти компьютера. Использование конфокальной диафрагмы позволяет значительно уменьшить интенсивность внефокусного сигнала и, соответственно, повысить соотношение сигнал/шум.

Интенсивность регистрируемой флуоресценции $F(t)$ зависит от концентрации C молекул в объеме наблюдения, их характеристической яркости q (определяемой количеством фотонов, испущенных одной молекулой в единицу времени) и распределения интенсивности флуоресценции $B(r)$. Анализ распределения числа фотоотчетов (РЧФ), зарегистрированных в течение некоторого короткого временного интервала, позволяет найти характеристическую яркость флуоресцирующих молекул и их концентрацию и, соответственно, разрешать смесь веществ с разным квантовым выходом.

Для анализа распределения числа фотоотчетов в ФФС были предложены два метода: анализ распределения интенсивности флуоресценции [2] (Fluorescence Intensity Distribution Analysis – FIDA) и анализ гистограммы счета фотонов [3] (Photon Counting Histogram – PCH). Различие этих методов проявляется в способе их алгоритмической реализации и выборе функции $B(r)$, аппроксимирующей профиль засветки. В методе PCH профиль засветки аппроксимируют асимметричным Гауссовым распределением и результирующее распределение находят в виде свертки одномолекулярных распределений. Для расчета РЧФ в методе FIDA применяют быстрое преобразование Фурье (БПФ) от производящей функции (ПФ) числа фотоотчетов, и реальный профиль засветки аппроксимируют экспоненциальной функцией одного аргумента с преобразованием элемента объема в виде полинома этого аргумента с несколькими варьируемыми параметрами.

Методы PCH и FIDA были разработаны для одноточечных измерений, где флуктуации флуоресценции регистрируются во времени из одной пространственной точки. Современные конфокальные лазерные микроскопы оснащены сканирующей оптикой, позволяющей не только проводить одноточечные измерения, но и получать в процессе сканирования полноценные флуоресцентные изображения исследуемого образца, что определило высокую востребованность данной методики. Для увеличения скорости получения таких изображений и в целях уменьшения деградации флуоресценции время регистрации из одной пространственной точки (фактически пиксела формируемого изображения) выбирают достаточно малым (доли секунды), что не позволяет применить методы PCH и FIDA для определения характеристик вещества. Для решения данной задачи разработан и широко используется метод Number & Brightness (N&B) [4].

В методе N&B среднее количество молекул определяется как отношение квадрата средней интенсивности к дисперсии, а яркость – как отношение дисперсии к средней интенсивности. Таким образом, яркость и количество молекул получаются лишь на основе первого и второго моментов распределения интенсивностей, что является довольно упрощенной моделью.

В то же время если образец представляет собой однородный раствор исследуемого вещества, то каждый пиксель изображения можно рассматривать как одиночный счетный временной интервал в одноточечном измерении. Если исследуемая система обладает эргодическими свойствами, где статистика флуктуаций флуоресценции по пространству и во времени одинакова, мы можем применить хорошо изученные и зарекомендовавшие себя методы анализа РЧФ во временной области для одноточечного эксперимента. Таким образом, цель работы – исследовать возможность применения метода РСН, разработанного для анализа РЧФ во временной области, для анализа пространственного распределения интенсивности флуоресценции стека изображений, полученного с использованием сканирующего лазерного конфокального микроскопа.

ТЕОРИЯ МЕТОДА РСН

Производящая функция (ПФ) $G(\xi)$ распределения $P(n)$ числа фотонов, излученных флуоресцентными молекулами, находящимися в равновесном состоянии в открытом объеме наблюдения V в течение интервала наблюдения T , может быть записана в следующем виде [2]:

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

где $\langle C \rangle$ – концентрация молекул i -й компоненты, q_i – их характеристическая яркость (определяемая количеством фотонов, испущенных одной молекулой в единицу времени, и равная произведению интенсивности засветки в фокусе, коэффициента поглощения лазерного излучения молекулами вещества, его квантового выхода и эффективности системы регистрации). При выводе выражения (1) предполагается, что вклад каждой молекулы в зарегистрированный поток фотонов независим и интенсивность флуоресценции постоянна в течение короткого интервала T . ПФ числа фотоотчетов является удобным инструментом для изучения свойств потока зарегистрированных фотонов, несущих информацию об исследуемом веществе. Зная ПФ, легко получить само РЧФ $P(n)$ через обратное преобразование Фурье от характеристической функции, получаемой из ПФ путем замены формальной переменной ξ на комплексную экспоненту $e^{i\varphi}$:

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

Разложив экспоненту под интегралом в выражении (1) в ряд Тейлора, получим

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i \langle C \rangle_i \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(\xi-1)^k q_i^k T^k \chi_k}{k!} \right\}, \quad (3)$$

где

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

Для определения количества молекул в освещенной области в ФФС используют понятие эффективного объема $V_{eff} = \chi_1^2 / \chi_2 = \pi^{3/2} w_0^2 z_0$. Тогда, принимая во внимание

$$\chi_k C_i = \chi_k \frac{N_{eff i}}{V_{eff}} = \frac{N_{eff i}}{(2k)^{3/2}}, \text{ получим}$$

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i N_{eff i} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi-1)q_i T)^k}{k!(2k)^{3/2}} \right\}. \quad (5)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для тестирования метода были проведены измерения раствора молекул GFP (Green Fluorescence Protein) (экспериментальные данные предоставлены кафедрой молекулярной цитологии Амстердамского университета). Все измерения были выполнены с помощью лазерного сканирующего инвертированного конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV1000 с системой регистрации (СР) PicoHarp 300 (PicoQuant, Berlin). При проведении данного эксперимента СР использовалась в режиме тэгирования времени (time-tagged mode), в котором каждому событию испускания фотона от образца ставится в соответствие его абсолютное время регистрации. Для сравнения результатов измерения были произведены в сканирующем и одноточечном режимах.

В одноточечном режиме измерение длилось 120 с. Всего было зарегистрировано $1,1 \times 10^6$ фотонов. В сканирующем режиме в файл данных дополнительно записывались временные маркеры начала фрейма, начала и конца текущей сканирующей линии, что в совокупности с событиями регистрации фотонов позволяет восстановить стек изображений исследуемого образца. Всего было получено четыре стека изображений с разным временем регистрации фотонов для одного пикселя: 10, 20, 40 и 100 мкс. Количество фреймов в каждом стеке – 100, размер одного фрейма – 128×128 пикселей. Линейный пространственный размер одного пикселя во всех экспериментах составлял 100 нм. Количество зарегистрированных фотонов для каждого стека являлось: $3,3 \times 10^6$.

Для одноточечного эксперимента РЧФ рассчитывалось для временного интервала $T = 1 \times 10^{-4}$ с. 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 каждого измерения в сканирующем режиме было получено по 100 РЧФ.

Теоретическое РЧФ находилось путем вычисления ПФ (5) и применения преобразования (2). Анализ РЧФ основан на методе наименьших квадратов с оптимизацией Марквардта – Левенберга и предполагает подгонку теоретической модели (5), (2) к экспериментально полученному РЧФ [5]. Качество аппроксимации проверялось путем вычисления значения критерия χ^2 и визуальным анализом остатков. Стандартные отклонения оцениваемых параметров находились по методу асимптотических стандартных ошибок (АСО) [6].

Результаты анализа одноточечного измерения представлены на рис. 1 (сплошная линия). Оценки параметров характеристической яркости q и количества молекул N соответственно составили 1460 ± 35 фотонов/с и $16,42 \pm 0,38$ молекул соответственно. Результаты анализа двух фреймов (для 100 мкс/пиксель эксперимента) в сканирую-

щем режиме также представлены на рис. 1 (штриховая и пунктирные линии). Значения критерия и вид остатков свидетельствуют о хорошем качестве аппроксимации экспериментальных данных во всех трех случаях, что подтверждает гипотезу об эргодичности исследуемой системы и вывод о возможности применения метода РСН также и для анализа пространственного РЧФ, рассчитанного на основе изображения.

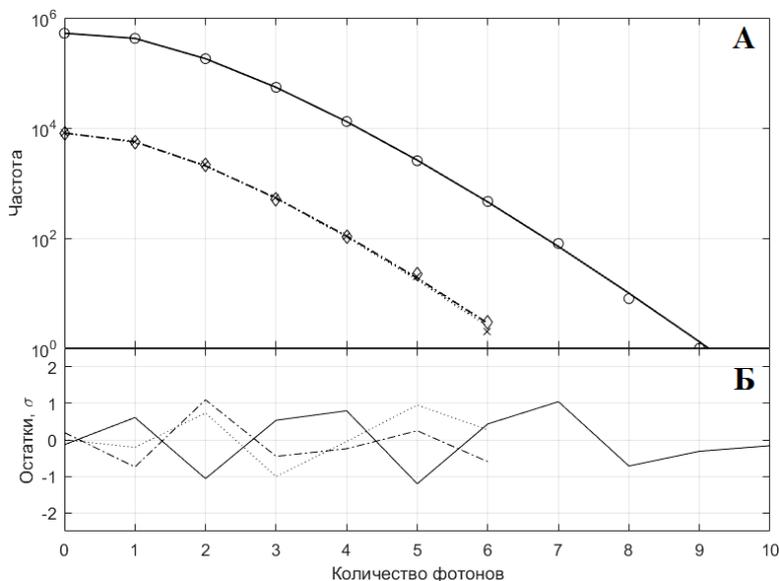


Рис. 1. Результаты анализа пространственного РЧФ раствора GFP в однотоочечном (сплошная линия) и сканирующем (штриховая и пунктирные линии) режимах методом РСН: *А* – экспериментальные значения гистограммы и аппроксимирующие кривые; *Б* – остатки для визуальной оценки качества. Значение критерия: 0,822 для однотоочечного эксперимента, 0,641 и 0,616 для двух фреймов в сканирующем режиме соответственно.

Оценки параметров характеристической яркости q и количества молекул N , полученных для всех 100 фреймов каждого измерения, были сведены в таблицу (данные не приведены). Из дальнейшего анализа были исключены результаты, представляющие собой явные выбросы, в количестве 3, 3, 2, 2 для экспериментов 10, 20, 40 и 100 мкс/пиксель соответственно. Гистограммы полученных оценок параметра q представлены на рис. 2 в первой строке, а параметра N – на рис. 2 во второй строке.

Из приведенных результатов можно сделать вывод, что при данной статистике фотоотсчетов (для 100 мкс/пиксель измерения максимальное число зарегистрированных фотонов для одиночного пикселя не превышало 6 (рис. 1), а для меньших времен счета – пропорционально меньше) метод РСН не рекомендуется применять на изображениях, полученных с временем меньше чем 20 мкс/пиксель. Для времени счета 10 мкс/пиксель стандартное отклонение количества молекул превышает среднее и гистограмма яркостей имеет скорее равномерный, нежели ожидаемый гауссовский вид.

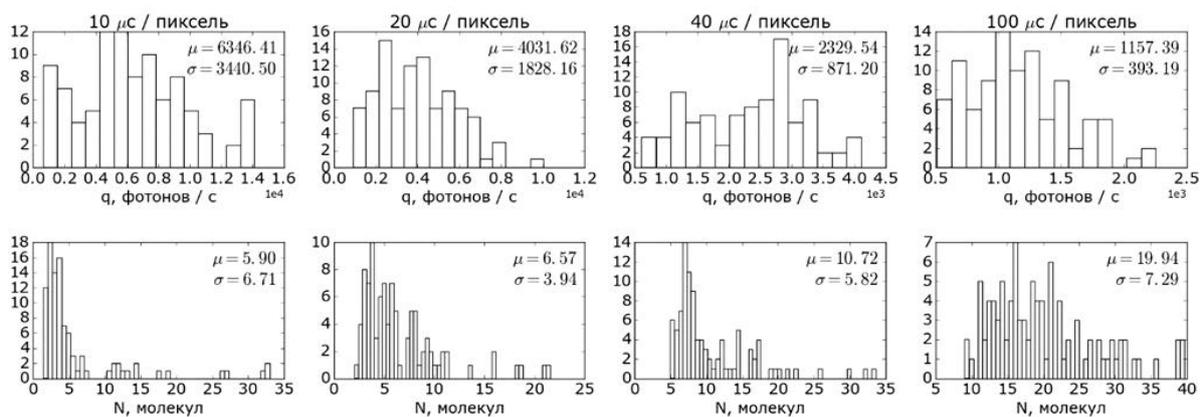


Рис. 2. Гистограммы оценок яркости (первая строка) и количества молекул (вторая строка) для экспериментов с 10, 20, 40, 100 мкс/пиксель. Среднее значение и стандартное отклонение приведены аннотацией на графиках

В результате анализа получено хорошее совпадение оценок характеристической яркости и количества молекул GFP в растворе для одноточечного и сканирующего режима измерений. Поскольку эти оценки зависят от времени T [5], то их можно сравнивать только при одинаковом времени счета. Некоторое отличие можно объяснить немного меньшим фактическим временем счета в сканирующем режиме, так как оно складывается из времени перемещения оптики и собственно времени измерения. Гистограммы полученных оценок параметров имеют ожидаемую форму, близкую к гауссовой. Стоит отметить, что некоторые отклонения в экспериментах с малым временем регистрации фотонов на пиксель изображения (10 мкс/пиксель) свидетельствуют о недостаточном количестве статистических данных.

ВЫВОДЫ

Хорошее качество аппроксимации экспериментальных данных, полученных в сканирующем режиме, и близость оценок характеристической яркости и количества молекул для одноточечного и сканирующего режима измерений подтверждает гипотезу о возможности применения метода РСН, разработанного для одноточечных экспериментов, также и для анализа пространственного РЧФ, рассчитанного на основе изображения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Elliot L. Elson and Douglas Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory // Biopolymers. 1974. Vol. 13, iss. 1. P. 1–27.
2. Fluorescence–intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology / P. Kask [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96, № 24. P. 13756–13761.
3. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy / Y. Chen [et al.] // Biophys. J. 1999. Vol. 77. P. 553–567.
4. Digman M. A., Stakic M., Gratton E. Raster image correlation spectroscopy and number and brightness analysis // Methods Enzymol. 2013. Vol. 518. P. 121–144.
5. Skakun V. V., Digris A. V., Apanasovich V. V. Global Analysis of Autocorrelation Functions and Photon Counting Distributions in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy // Methods Mol Biol. 2014. Vol. 1076. P. 719–741.
6. Johnson M. L., Faunt L. M. Parameter Estimation by Least–Squares Methods // Methods in Enzymology. 1992. Vol. 210. P. 1–37.