

ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ МОЛЕКУЛ В НЕСТАЦИОНАРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

В.В. Скакун, В.В. Апанасович

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь;
E-mail: skakun@bsu.by*

Методы флуоресцентной флукутационной спектроскопии позволяют проводить исследования динамики, взаимодействия и структурных изменений молекулярных систем как *in-vitro*, так *in-vivo* путем анализа временных и/или пространственных флукутаций интенсивности флуоресценции. Применение данных методов для анализа нестационарных потоков фотоотсчетов приводят к получению смещенных оценок параметров молекулярных систем. В данной работе, на основе применения теории производящих функционалов, предложен метод оценки концентрации молекул в системе с нестационарным потоком фотоотсчетов. Корректность метода подтверждена на основе анализа смоделированных данных.

Ключевые слова: флуоресцентная флукутационная спектроскопия; поток фотоотсчетов; производящий функционал; производящая функция; концентрация молекул.

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентная флукутационная спектроскопия (ФФС) это группа методов, позволяющих проводить исследования динамики, взаимодействия и структурных изменений молекулярных систем как *in-vitro*, так *in-vivo*, путем анализа временных и/или пространственных флукутаций интенсивности флуоресценции [1]. Регистрация флукутаций интенсивности флуоресценции производится с однофотонной чувствительностью из предельно малого открытого объема, определяемого лучом лазера, сфокусированного конфокальной оптической системой с высокой числовой апертурой [1]. Методы ФФС разработаны для анализа систем, где зарегистрированный поток фотоотсчетов является стационарным, что накладывает существенные ограничения на спектр их применимости. При проведении измерений в живых клетках редко удается получить измерения со стационарной интенсивностью. Применение же методов ФФС для анализа нестационарных потоков приводят к получению сильно смещенных оценок параметров молекулярных систем, таких как их концентрация и характеристическая яркость, определяемая средним количеством фотонов, излученных одной молекулой в единицу времени. Целью данной работы является разработка метода оценки концентрации молекул в системе с нестационарным потоком фотоотсчетов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пусть имеется область D , в которой находятся молекулы одного вида, излучающие фотоны. Фотоны регистрируются одноквантовым детектором в течение короткого интервала регистрации и в виде фотоотсчетов (моментов попадания фотонов в детектор) сохраняются в системе. Процесс регистрации повторяется много раз. Поток зарегистрированных фотоотсчетов является потоком случайных событий или случайным точечным процессом, для полного описания которого можно применить аппарат производящих функционалов (ПФЛ) [2]. Обозначим через $\lambda(t, \mathbf{r})$ интенсивность потока фотоотсчетов, зарегистрированных системой от одной молекулы, находящейся в точке с радиус вектором $\mathbf{r}$ в области засветки D в момент времени t . Можно показать, что ПФЛ зарегистрированного потока фотоотсчетов будет иметь вид:

$$L[u; \Omega] = \exp\left\{c \int_D [\exp\{\int_{\Omega} \lambda(t, \mathbf{r}) u(t) dt\} - 1] d\mathbf{r}\right\}, \quad (1)$$

где c концентрация молекул, $\Omega = [T_0, T]$ интервал регистрации, $u(t)$ – формальный параметр (пробная функция) и интегрирование выполняется по всей области D . Достоинством полученного выражения является возможность исследования молекулярных систем с нестационарной интенсивностью флуоресценции, описываемой функцией $\lambda(t, \mathbf{r})$.

Производящая функция (ПФ) числа событий потока имеет вид

$$G(z) = \langle z^n \rangle_n = \sum_{n=0}^{\infty} P(n) z^n, \quad (2)$$

где $P(n)$ – вероятность выпадения на Ω ровно n точек потока и z – некоторая вспомогательная переменная, $0 \leq z \leq 1$. ПФ связана с ПФЛ выражением $G(z) = L[z - 1; \Omega]$. Отсюда следует, что с учетом (1) ПФ потока будет иметь вид

$$G(z) = \exp\left\{c \int_D [\exp\{\int_{\Omega} \lambda(t, \mathbf{r}) (z - 1) dt\} - 1] d\mathbf{r}\right\}. \quad (3)$$

Для стационарных систем

$$\lambda(t, \mathbf{r}) = qB(\mathbf{r}), \quad (4)$$

где q – характеристическая способность молекулы излучать фотоны, равная произведению квантового выхода молекулы, коэффициента экстинкции, эффективности системы регистрации и интенсивности падающего излучения и $B(\mathbf{r})$ функция профиля засветки. Для стационарных потоков можем положить $T_0 = 0$. ПФ потока примет вид

$$G(z) = \exp\left\{c \int_D [\exp\{qTB(\mathbf{r})(z - 1)\} - 1] d\mathbf{r}\right\}, \quad (5)$$

что совпадает с выражением, полученным в работе [3].

Таким образом, получаем полное соответствие с теорией метода FIDA [3], разработанной для анализа стационарных систем.

Для оценки концентрации молекул исследуемого вещества рассчитаем вероятность $P(0)$ отсутствия фотоотсчетов на интервале регистрации Ω . Из теории ПФЛ известно $P(0) = \pi_0(\Omega) = L[u, \Omega]|_{u=-1}$. Тогда

$$\pi_0(\Omega) = \exp\left(c \int_D [\exp\{-\int_\Omega \lambda(t, \mathbf{r}) dt\} - 1] d\mathbf{r}\right). \quad (6)$$

Преобразуем (6) к виду

$$\frac{\ln \pi_0(\Omega)}{c} = \int_D [\exp\{-\int_\Omega \lambda(t, \mathbf{r}) dt\} - 1] d\mathbf{r}. \quad (7)$$

Предположим, что проводим калибровочный эксперимент с известной концентрацией c_k , а затем новый эксперимент с неизвестной c , тогда

$$c = c_k \frac{\ln \pi_0(\Omega)}{\ln \pi_k(\Omega)} = c_k \frac{\ln P(0)}{\ln P_k(0)}. \quad (8)$$

Соответственно, оценку концентрации можно получить на основе выражения

$$\tilde{c} = \tilde{c}_k \frac{\ln \tilde{P}(0)}{\ln \tilde{P}_k(0)}, \quad (9)$$

где $\tilde{P}(0)$ и $\tilde{P}_k$ – оценки вероятностей отсутствия фотоотсчетов за время регистрации и $\tilde{c}_k$ оценка концентрации вещества, полученная в калибровочном эксперименте. Выражение (9) без потери общности можно записать и для среднего количества молекул в области наблюдения, воспользовавшись соотношением $\bar{N} = cV_D$, где V_D характеристический объем области засветки. Полученное выражение позволяет определить концентрацию однокомпонентного вещества на основе калибровочного эксперимента с известной концентрацией и оценок вероятностей отсутствия фотоотсчетов за время регистрации Ω . Как следует из выражения (9), оценку концентрации можно получить для потоков с произвольной (нестационарной) интенсивностью $\lambda(t, \mathbf{r})$ на интервале регистрации Ω без учета функции профиля засветки $B(\mathbf{r})$.

Выполним проверку полученного выражения для оценки концентрации вещества на основе калибровочного эксперимента. Будем использовать имитационную модель потока фототсчетов, разработанную в работе [4], заменив интенсивность потока $I(t)$ на нестационарную

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau_d}, t \in [0; T], \quad (10)$$

где I_0 интенсивность в начальный момент времени T_0 , τ_d константа затухания интенсивности. Параметры модели возьмем следующие: число повторений регистрации 5×10^4 , $q = 10^5$, $T = 2 \times 10^{-5}$ с, $\tau_d = 5 \times 10^{-5}$ с, среднее число молекул в объеме наблюдения для калибровочного эксперимента $\bar{N} = 1$. Получим оценку $\tilde{P}(0)$ для калибровочного эксперимента, затем повторим

моделирование, варьируя $\bar{N}$. Результаты эксперимента приведены в таблице.

Оценка $\tilde{N}$ на основе калибровочного эксперимента

$\bar{N}$ истина	$\tilde{P}(0)$	$\tilde{N}$
1	0,5014	калибровочный
2	0,2512	2,001
5	0,0313	5,017
10	0,0010	9,981
0,1	0,9328	0,101
0,01	0,9932	0,010

Наблюдаем точное восстановление среднего числа молекул в объеме наблюдения в широком диапазоне изменения концентрации молекул, что подтверждает работоспособность разработанного метода.

ВЫВОДЫ

В работе выведено выражение для ПФЛ потока фотоотсчетов, зарегистрированных от некоторой молекулярной системы. Полученный ПФЛ потока открывает возможность исследования молекулярных систем с нестационарной интенсивностью флуоресценции. Определены выражения для расчета вероятности отсутствия фотоотсчетов на интервале регистрации, на основе которого предложен способ оценки концентрации вещества с использованием калибровочного эксперимента. Корректную оценку концентрации можно получить для сильно нестационарных потоков, что характерно, например, при проведении измерений в живых клетках. Справедливость полученного выражения проверена на смоделированных данных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Confocal-based fluorescence fluctuation spectroscopy with a SPAD array detector / Slen-
ders, E., Castello, M., Buttafava, M. [et al.] // *Light Sci Appl.*, 2021, P. 10, 31. DOI:
<https://doi.org/10.1038/s41377-021-00475-z>.
2. Апанасович В.В. Коляда А.А., Чернявский А.Ф. Статистический анализ случайных
потоков в физическом эксперименте // Минск: Университетское, 1988. С. 256.
3. Kask P. Palo K., Ullmann D. and Gall K. Fluorescence-intensity distribution analysis and
its application in biomolecular detection technology // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999.
Vol. 96. №. 24. P. 13756.
4. Shingaryov I., Skakun V.V., Apanasovich V.V. Photon counts simulation in fluorescence fluc-
tuation spectroscopy // *Proc. of PRIP conf. Pub. center of BSU, Minsk*, 2009. P. 178-182.