

КУМУЛЯНТНЫЙ АНАЛИЗ ПОТОКОВ ФОТОНОВ В ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

В.В. Скакун, В.В. Апанасович

Предлагается кумулянтный метод анализа фотоотсчетов в флуоресцентной флукуационной спектроскопии с коррекцией профиля засветки. Метод позволяет находить оценки концентрации молекул и их характеристической яркости. Введенная коррекция профиля засветки позволяет значительно улучшить качество анализа экспериментальных данных.

Введение

Среди флуоресцентных методов особый интерес представляют методы флуоресцентной флукуационной спектроскопии (ФФС), позволяющие исследовать вещество на одномолекулярном уровне без нарушения термодинамического равновесия. В этих методах регистрация флуоресценции производится из предельно малого открытого объема V , определяемого лучом лазера, сфокусированного оптической системой с высоким коэффициентом усиления [1]. Одним из методов ФФС является кумулянтный метод анализа фотоотсчетов (Fluorescence Cumulants Analysis - FCA), позволяющий находить оценки концентрации молекул и их характеристической яркости и, следовательно, разрешать смеси веществ, отличающихся по своим спектральным свойствам [2].

Факториальные кумулянты (ФК) K_k числа фотонов, полученных за время интервала наблюдения T , пропорциональны произведению концентрации молекул $\langle C \rangle$ и их характеристической яркости q [2]

$$K_k = c_k \sum_i \langle C \rangle_i (q_i T)^k, \quad (1)$$

где $c_k = \int_V B^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$ и $B(\mathbf{r})$ функция, аппроксимирующая профиль засветки. На практике применяется следующая формула [2]

$$K_k = g_k \sum_i N_{PSF i} (q_i T)^k, \quad (2)$$

где интегралы c_k заменены на безразмерные гамма-факторы $g_k = c_k / V_{PSF}$, $g_1 = 1$ и проведен пересчет концентрации к числу молекул $N_{PSF} = \langle C \rangle V_{PSF}$ в приведенном объеме V_{PSF} , численно равному значению c_1 .

Применение (1) требует знания функции $B(\mathbf{r})$, наилучшим образом аппроксимирующей реальный профиль засветки. Для однофотонного возбуждения обычно применяется асимметричное гауссовское распределение

$$B_G(\mathbf{r}) = B_G(x, y, z) = \exp\left[-2(x^2 + y^2)/w_0^2 - 2z^2/z_0^2\right] \quad (3)$$

где w_0 и z_0 характеризует падение интенсивности излучения лазера в поперечном и аксиальном направлении соответственно. В этом случае g -факторы любого порядка могут быть рассчитаны по формуле $g_{Gk} = 1/k^{3/2}$.

Применение идеализированной гауссовской аппроксимации не позволяет получить хорошей подгонки под экспериментальные данные [3, 4]. Для коррекции профиля засветки в ФСА было предложено подгонять g -факторы вместе с другими параметрами [3]. Недостатком такой методики является зависимость числа параметров модели от числа экспериментальных точек и невозможность анализа отдельного набора кумулянтов. Число параметров становится больше числа экспериментальных точек, что ведет к получению бесконечного количества решений.

Для решения проблемы предлагается воспользоваться подходом, хорошо зарекомендовавшим себя для анализа распределения числа фотоотсчетов (РЧФ) в ФФС. В методе РСН [4, 5] было предложено включить дополнительные параметры подгонки F_k , определенные как относительная разность между интегралами от реального профиля засветки и его Гауссовой аппроксимации (3)

$$F_k = (c_k - c_{Gk}) / c_{Gk}. \quad (4)$$

В большинстве случаев для получения наилучшей подгонки модели под экспериментальные данные достаточно коррекции первого порядка (все F_k равны нулю кроме F_1) [5]. Применение в ФСА коррекции профиля засветки в виде (4) позволит проводить анализ одиночного набора кумулянтов и стандартизировать процедуру анализа, устранив зависимость числа параметров модели от экспериментальных данных.

Кумулянтный метод анализа с коррекцией профиля засветки

Теория метода. Кумулянты K_k любого порядка могут быть рассчитаны из производящей функции (ПФ) $G(\xi)$ распределения числа фотоотсчетов $P(n)$

$$K_k = \left. \frac{d^k \ln G(x)}{dx^k} \right|_{x=1}, \quad k = 1, 2, \mathbf{K}. \quad (5)$$

ПФ РЧФ, излученных флуоресцентными молекулами, находящимися в равновесном состоянии в открытом объеме наблюдения V в течение интервала наблюдения T , может быть записана в виде [6]

$$G(x) = \exp \left(\sum_i \langle C \rangle_i \int_V \left(e^{(x-1)q_i T B(\mathbf{r})} - 1 \right) d\mathbf{r} \right). \quad (6)$$

С учетом фонового шума детектора и рассеянного света получим

$$G(x) = \exp \left(IT(x-1) + \sum_i \langle C \rangle_i \int_V \left(e^{(x-1)q_i T B(\mathbf{r})} - 1 \right) d\mathbf{r} \right), \quad (7)$$

где λ средняя интенсивность фонового сигнала.

Разложим экспоненту под интегралом в выражении (7) в ряд Тейлора. Учитывая (4), запишем

$$G(x) = \exp \left\{ IT(x-1) + \sum_i \langle C \rangle_i \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(x-1)^k q_i^k T^k (1 + F_k) c_{Gk}}{k!} \right\}. \quad (8)$$

Подставив (8) в (5) получим

$$\begin{aligned} K_1 &= IT + (1 + F_1) c_{G1} \sum_i \langle C \rangle_i q_i T, \\ K_k &= (1 + F_k) c_{Gk} \sum_i \langle C \rangle_i q_i T^k \end{aligned} \quad (9)$$

Интегралы c_{Gk} могут быть найдены аналитически

$$c_{Gk} = \int_V B_G^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = k^{-3/2} (p/2)^{3/2} w_0^2 z_0. \quad (10)$$

Произведем пересчет концентрации к N_{PSF}

$$N_{PSF} \langle C \rangle V_{PSF} = \langle C \rangle (1 + F_1) c_{G1} = \langle C \rangle (1 + F_1) (p/2)^{3/2} w_0^2 z_0. \quad (11)$$

Выражение для расчета ФК фотоотсчетов примет вид

$$\begin{aligned} K_1 &= IT + \sum_i N_{PSF i} q_i T \\ K_k &= \frac{(1 + F_k)}{k^{3/2} (1 + F_1)} \sum_i N_{PSF i} q_i T^k, \quad k = 2, 3, \mathbf{K} \end{aligned} \quad (12)$$

Кумулянтный анализ основан на методе наименьших квадратов и предполагает подгонку теоретических кумулянтов (12) к экспериментально полученным. Качество подгонки проверяется путем вычисления значения критерия χ^2 и визуальным анализом взвешенных остатков.

Тестирование метода. Тестирование проводилось путем сравнения результатов кумулянтного анализа с результатами метода РСН с коррекцией профиля засветки, так как FCA и РСН эквивалентны в результатах. В этих целях было проведено измерение красителя Alexa 488 и смеси Alexa 488 и Флуоресцеина. Экспериментальные данные были предоставлены кафедрой паразитологии Медицинского центра Лейденского университета (LUMC, the Netherlands). Все измерения были выполнены с помощью измерительной системы ConfoCor 2 (Carl Zeiss, Germany). Измеряемый образец растворялся в PBS (0.035M phosphate, 0.15M NaCl, pH 7.6). Фоновый сигнал был оценен из измерения чистого растворителя. Доверительные интервалы находились по методу исчерпывающего поиска (exhausted search) [7] при доверительной вероятности 0.67.

Анализ измеренных данных показал, что для получения хороших результатов достаточно применения коррекции первого порядка. Для проверки также была применена коррекция второго порядка (F_1 и F_2 отличны от нуля). Результаты анализа практически не изменились и значение параметра F_2 составило $1E-7$. Это подтверждает, что для наших измерений достаточно коррекции первого порядка. Результаты анализа Alexa 488 приведены в таблице 1 и показаны на рис. 2. Таблица 2 и рис. 2 отображают результаты анализа смеси Alexa 488 и Флуоресцеина. Как видно из представленных результатов, применение коррекции профиля засветки значительно улучшает качество подгонки. Результаты предложенного метода кумулянтного анализа практически совпадают с результатами метода РСН, что подтверждает справедливость сделанных выкладок.

Таблица 1 – Результаты анализа Алекса 488. Представлены результаты предложенного метода, а также результаты методов FCA и РСН для сравнения. Время измерения 30 сек. Число зарегистрированных фотонов $8.6E+6$. $T = 8E-6$ сек. $\lambda = 1$ кГц.

Метод	c^2	N	q_1*10^4	F_1
РСН	12.0	4.40 [4.27; 4.54]	6.52 [6.31; 6.73]	–
FCA	48.8	4.31 [3.95; 4.73]	6.66 [6.07; 7.24]	–
РСН с коррекцией	1.39	2.77 [2.74; 2.80]	10.48 [9.53; 11.23]	0.57 [0.45; 0.70]
FCA с коррекцией	0.59	2.80 [2.74; 2.87]	10.21 [8.74; 11.66]	0.55 [0.32; 0.77]

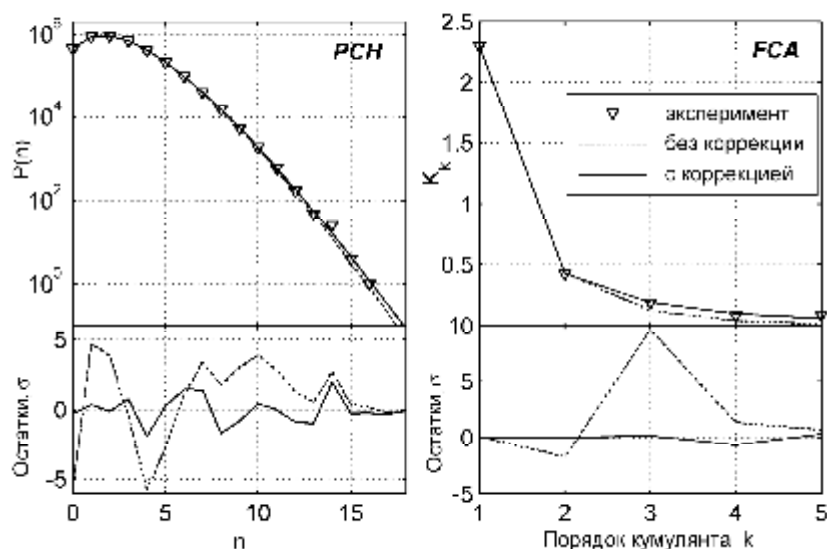


Рисунок 1 – Результаты анализа Алекса 488

Для проверки возможности оценки параметра коррекции при анализе двухкомпонентных данных (5 оцениваемых параметров) при наличии 5 экспериментальных кумулянтов был проведен следующий эксперимент. Вначале данные были проанализированы методом РСН с коррекцией, затем FCA со свободным параметром коррекции, затем FCA с параметром коррекции, зафиксированным в полученное методом РСН значение. В двух последних случаях были получены близкие по значению оценки параметров. Следовательно, метод FCA с коррекцией профиля засветки способен разрешать двухкомпонентную смесь с достаточной точностью без предварительного оценивания параметра коррекции.

Таблица 2 – Результаты анализа смеси Алекса 488 и Флуоресцеина. Представлены результаты предложенного метода кумулянтного анализа, а также результаты методов FCA и РСН для сравнения. Время измерения 120 сек. Число зарегистрированных фотонов $16E+6$. $T = 1E-5$ сек. $\lambda = 1$ кГц. Прочерк означает отклонение более чем на 100%.

Метод	c^2	N_1	q_1*10^4	N_2	q_2*10^4	F_1
РСН	1.58	4.49 [4.14; 4.88]	2.31 [2.07; 2.53]	0.10 [0.088; 0.12]	30.1 [29.0; 31.2]	–
FCA	2.82	3.85 [2.65; –]	2.76 [0.28; 4.40]	0.081 [0.042; –]	32.0 [25.6; 38.8]	–
РСН с коррекцией.	0.44	1.17 [1.03; 1.46]	7.87 [5.40; 10.2]	0.12 [0.11; 0.14]	33.2 [31.5; 35.2]	0.85 [0.58; 1.02]
FCA с коррекцией.	0.60	1.14 [1.01; 1.42]	8.27 [5.51; 10.2]	0.11 [0.064; 0.18]	34.1 [29.7; 39.0]	0.85 (фикс.)

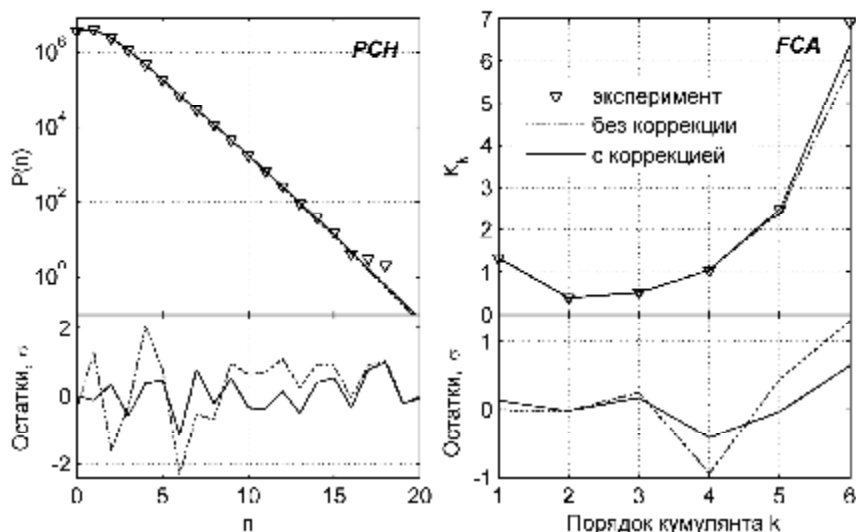


Рисунок 2 –Результаты анализа смеси Alexa 488 и Флуоресцеина

Выводы:

Разработан метод кумулянтного анализа с коррекцией профиля засветки. Устранена зависимость числа параметров модели от числа экспериментальных точек. Коррекция профиля засветки в виде (4) позволила значительно улучшить качество анализа экспериментальных данных при наличии всего одного дополнительного параметра подгонки, что в свою очередь гарантирует получение более достоверных оценок параметров модели (полученное при анализе отношение концентраций изменилось от неправдоподобного 48 к ожидаемому 10). Эффективность метода была проверена путем сравнения результатов анализа измеренных данных с результатами хорошо зарекомендовавшего себя метода PCH. Показано, что кумулянтный анализ с коррекцией профиля засветки способен разрешать двухкомпонентную смесь без предварительного оценивания параметра коррекции.

Литература:

1. Elson E.L. and D. Magde // Biopolymers. 1974. Vol. 1. P. 113.
2. Muller J.D. // Biophys. J. 2004. №86. P. 3981-3992.
3. Wu B. and J.D. Müller // Biophys. J. 2005. № 89. P. 2721-2735.
4. Chen Y., J. Müller, P.T. So, E. Gratton // Biophys. J. 1999. № 77. P. 553-567.
5. Huang B., T. Perroud, R. Zare // ChemPhysChem. 2004. Vol. 5. P. 1523-1531.
6. Kask P. K. Palo, D. Ullmann, K. Gall // PNAS. 1999. Vol. 96. №. 24. P. 13756-13761.
7. Johnson M. and L. Faunt // Methods in Enzymology. 1992. Vol. 210. P. 1–37.

Виктор Васильевич Скакун, старший преподаватель кафедры системного анализа Белорусского государственного университета, skakun@bsu.by

Владимир Владимирович Апанасович, заведующий кафедры системного анализа Белорусского государственного университета, доктор физ-мат. наук, профессор, apanasovich@bsu.by