

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА ФОТООТСЧЕТОВ С КОРРЕКЦИЕЙ ПРОФИЛЯ ЗАСВЕТКИ В ОДНОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ*

A new method of photon counting distribution analysis in fluorescence fluctuation spectroscopy is proposed. It allows to estimate brightness and concentration of molecules of heterogeneous samples and takes into account possible deviations of brightness profile from assumed Gaussian approximation. The applicability of the proposed method was verified by testing on simulated and measured data.

В настоящее время для изучения свойств вещества широко используются флуоресцентные методы исследования. Сочетание высокой чувствительности с отсутствием разрушающего воздействия на вещество приводит к интенсивному применению этих методов с целью анализа возбужденных состояний молекул, фотохимических реакций, динамики быстрых молекулярных процессов, изучения живых клеток, белков и биологических мембран.

Среди флуоресцентных методов особый интерес представляет флуоресцентная флукуационная спектроскопия (ФФС), позволяющая исследовать вещество на одномолекулярном уровне без нарушения термодинамического равновесия. В этом случае регистрация флуоресценции производится из предельно малого открытого объема V , определяемого лучом лазера, сфокусированного оптической системой с высоким коэффициентом усиления [1]. Флуктуации интенсивности флуоресценции могут происходить вследствие изменения количества молекул и их местоположения в неоднородно освещенном объеме.

Для разрешения смеси веществ, отличающихся своими спектральными свойствами, 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). Данные методы позволяют находить оценки концентрации молекул и их характеристической яркости путем анализа распределения числа фотоотсчетов (РЧФ) [2, 3]. Различие этих методов проявляется в способе их алгоритмической реализации и выборе функции $B(\mathbf{r})$, аппроксимирующей профиль засветки. Для расчета РЧФ методом FIDA применяют быстрое преобразование Фурье (БПФ) от производящей функции (ПФ) числа фотоотсчетов и реальный профиль засветки аппроксимируют экспоненциальной функцией одного аргумента с преобразованием элемента объема в виде полинома этого аргумента с несколькими варьируемыми параметрами [2, 4]

$$d\mathbf{r}/dx = A_0 (x + ax^2 + bx^3), \quad x = \ln[B_0/B(\mathbf{r})], \quad (1)$$

где $B_0 = B(\mathbf{0})$ и a, b – параметры подгонки. Метод PCH предусматривает последовательное вычисление конволюций одномолекулярного распределения и для аппроксимации профиля засветки – применение трехмерного асимметричного Гауссова распределения [3]

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

где ω_0 и z_0 характеризуют падение интенсивности излучения лазера в поперечном и аксиальном направлении соответственно. При реализации метода PCH предполагается $B_0 = 1$. Для исправления возможных отличий от реального профиля засветки было предложено включить в PCH дополнительные параметры подгонки F_k , определяемые как относительная разность между интегралами $\chi_k = \int_V B^k(\mathbf{r})d\mathbf{r}$ от реального профиля засветки и его Гауссовой аппроксимации [5]:

$$F_k = (\chi_k - \chi_{Gk})/\chi_{Gk}. \quad (3)$$

В большинстве случаев для получения наилучшей подгонки модели под экспериментальные данные достаточно коррекции первого порядка (все F_k равны нулю, кроме F_1) [5].

Недостатком метода FIDA является слабая чувствительность при разрешении многокомпонентных систем, так как рост числа варьируемых параметров увеличивает число степеней свободы. При анализе данных методом PCH с коррекцией профиля засветки было отмечено, что значения яркости находятся в линейной зависимости от значений параметров коррекции профиля засветки, что не позво-

* Авторы статьи – сотрудники кафедры системного анализа.

ляет сравнивать полученные оценки из различных экспериментов и проводить глобальный анализ [6] нескольких РЧФ со связыванием этих параметров. Для метода FIDA подобная проблема решена путем введения двух начальных параметров A_0 , B_0 и двух уравнений нормировки, их определяющих. В РСН предполагается $B_0 = 1$ и используется одно уравнение нормировки, что и ведет к отмеченной зависимости параметров модели.

Для преодоления названных недостатков в работе предлагается новый метод анализа РЧФ с коррекцией профиля засветки в виде (3), основанный на применении разложения ПФ в ряд Тейлора и введении дополнительного уравнения нормировки для определения начального параметра B_0 в Гауссовой аппроксимации (2).

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 наблюдения T , может быть записана в следующем виде [2]:

$$G(\xi) = \exp \left(\sum_i \langle C \rangle_i \int_V \left(e^{(\xi-1)q_i T B(\mathbf{r})} - 1 \right) d\mathbf{r} \right), \quad (4)$$

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 (4) предполагается, что вклад каждой молекулы в зарегистрированный поток фотонов независим и интенсивность флуоресценции постоянна в течение короткого интервала времени T . ПФ числа фотоотчетов является удобным инструментом для изучения свойств потока зарегистрированных фотонов, несущих информацию об исследуемом веществе [7]. Зная ПФ, легко получить РЧФ $P(n)$ через обратное преобразование Фурье от характеристической функции, получаемой из ПФ путем замены формальной переменной ξ на комплексную экспоненту $e^{i\varphi}$:

$$P(n) = \text{БПФ}^{-1}(G(e^{i\varphi})), \quad n = 0, 1, \dots, m-1, \quad \varphi = 2\pi n/m. \quad (5)$$

Разложим экспоненту под интегралом в выражении (4) в ряд Тейлора

$$\begin{aligned} G(\xi) &= \exp \left\{ \sum_i \langle C \rangle_i \sum_{k=0}^{\infty} \left[\frac{(\xi-1)^k q_i^k T^k \int_V B^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}}{k!} - 1 \right] \right\} = \\ &= \exp \left\{ \sum_i \langle C \rangle_i \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(\xi-1)^k q_i^k T^k \chi_k}{k!} \right\}. \end{aligned} \quad (6)$$

Принимая во внимание (3), получим

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i \langle C \rangle_i \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(\xi-1)^k q_i^k T^k (1 + F_k) \chi_{Gk}}{k!} \right\}. \quad (7)$$

Ряд в выражении (7) быстро сходится при типичных для ФФС значениях параметров. Применение (7) не требует численного нахождения интеграла от сложной функции, и все χ_{Gk} могут быть найдены аналитически.

Запишем выражение для интегралов χ_{Gk} Гауссова распределения

$$\chi_{Gk} = \int_V B_G^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = B_0^k k^{-3/2} (\pi/2)^{3/2} w_0^2 z_0. \quad (8)$$

Так как объем освещенной области намного меньше размера кюветы с измеряемым веществом, то интегрирование в выражении (8) производится в бесконечных пределах. Для определения количества молекул в освещенной области в ФФС применяют понятие приведенного объема $V_{\text{PSF}} = \chi_1$, соответственно равного значению интеграла от функции $B(\mathbf{r})$, нормированного на B_0 . Иногда используют значение так называемого эффективного объема $V_{\text{eff}} = \chi_1^2 / \chi_2$ [1, 5].

Введем обозначение $A_0 = \omega_0^2 z_0$ в выражении (8). Для определения неизвестных параметров A_0 , B_0 будем использовать систему нормировочных уравнений

$$\int_V B(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \chi_1, \quad \int_V B^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \chi_2. \quad (9)$$

Подставим (8) в (3) и из решения системы уравнений (9) получим

$$A_0 = \frac{(1+F_2)\chi_1^2}{\pi^{3/2}(1+F_1)^2\chi_2}, \quad B_0 = \frac{2\sqrt{2}(1+F_1)\chi_2}{(1+F_2)\chi_1}. \quad (10)$$

В этом случае ПФ числа фотоотсчетов (7) примет вид

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i A_0 \langle C \rangle_i \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi-1)B_0 q_i T)^k (1+F_k)}{k!(2k)^{3/2}} \right\} = \\ = \exp \left\{ \frac{(1+F_2)}{(1+F_1)^2} \sum_i N_{2MNi} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi-1)2\sqrt{2}(1+F_1)q_{2MNi}T)^k (1+F_k)}{(1+F_2)^k k!(2k)^{3/2}} \right\}, \quad (11)$$

где введены новые обозначения $N_{2MN} = \langle C \rangle \chi_1^2 / \chi_2$ и $q_{2MN} = q\chi_2 / \chi_1$ (индекс 2MN – нормализация вида (9)). Перепишем (3) как $\chi_k = (1+F_k)\chi_{Gk}$. Из последнего выражения и (10) следует, что выбранная система нормировочных уравнений приводит к независимости параметров N_{2MN} и q_{2MN} от F_k . Можно показать, что в результате игнорирования значения B_0 в РСН и применения нормализации к эффективному объему V_{eff} получим значения начальных параметров

$$A_0 = \frac{(1+F_2)\chi_1^2}{\pi^{3/2}(1+F_1)^2\chi_2}, \quad B_0 = 1. \quad (12)$$

Из сопоставления (10) и (12) с учетом (11) следует, что оценка количества молекул в объеме наблюдения не изменится (значения A_0 в обоих случаях одинаковы), а оценка яркости может быть пересчитана по формуле

$$q_i = B_0 q_{2MNi} = 2\sqrt{2}(1+F_1)q_{2MNi} / (1+F_2). \quad (13)$$

Поскольку q_{2MN} не зависит от параметров коррекции, то оценка q_i становится функцией параметров F_k . Подобная зависимость между параметрами модели не позволяет сравнивать результаты нескольких экспериментов напрямую и проводить глобальный анализ [8] со связыванием q_i при различных значениях параметров коррекции.

Тестирование метода

Программная реализация метода была выполнена в Borland Builder 5.0. РЧФ находили путем вычисления ПФ (11) и применения преобразования (5). Анализ РЧФ основан на методе наименьших квадратов и предполагает подгонку теоретической модели (11), (5) к экспериментально полученному РЧФ [9]. Качество подгонки проверяли путем вычисления значения критерия χ^2 и визуальным анализом остатков. Стандартные отклонения оцениваемых параметров находили по методу асимптотических стандартных ошибок (АСО) [10]. Метод тестировали на смоделированных и измеренных данных.

Тестирование метода на смоделированных данных. При моделировании РЧФ использовали методики, предложенные в работе [11]. Теоретические кривые, вычисленные соответственно тестируемой модели (обозначим как 2MN РСН) и модели метода РСН с коррекцией профиля засветки (обозначим как OFC РСН), полностью совпали. Различие наблюдалось только в оценках яркости q . Полученные оценки были пересчитаны от одного вида нормализации к другому по формуле (13). Так, для РЧФ, смоделированного с параметрами $q = 60000$, $N = 5$, $F_1 = 0,4$, $T = 5E-5$ и отношением сигнал/шум $S/N = 300$, оценки параметров модели OFC РСН составили: $q = 60680 \pm 910$, $N_{\text{eff}} = 5,01 \pm 0,03$, $F_1 = 0,42 \pm 0,02$. Оценки параметров модели 2MN РСН следующие: $q_{2MN} = 15123 \pm 85$, $N_{2MN} = 5,01 \pm 0,03$, $F_1 = 0,42 \pm 0,02$. После пересчета q_{2MN} по формуле (13) получили $q = 60680$, что в точности совпадает с оценкой для OFC РСН. Из проведенного эксперимента видно, что стандартные отклонения параметра q значительно ниже для разработанного метода. Это ожидаемый результат, поскольку вследствие зависимости параметра q от F_k в модели OFC РСН стандартные отклонения для q будут дополнительно

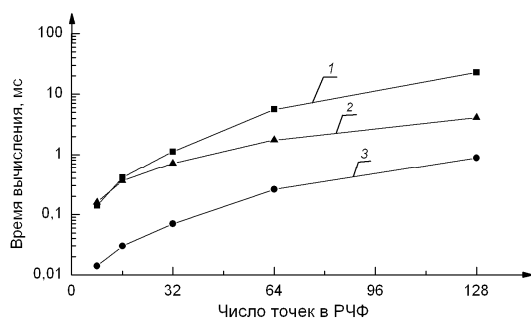


Рис. 1. Скорости вычисления методов:
1 – OFC PCH, 2 – FIDA, 3 – 2MN PCH

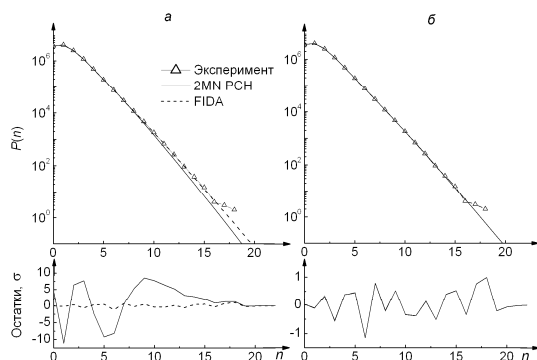


Рис. 2. Результаты анализа смеси Alexa 488 с флуоресцеином однокомпонентной (а) и двухкомпонентной (б) моделью

включать стандартные отклонения F_k . Тестирование с использованием большого количества данных показало увеличение точности оценки параметра q_{2MN} и его независимость от параметров коррекции F_k .

Время, требуемое для вычисления моделей при разном числе точек РЧФ (для различной длительности интервала наблюдения T), представлено на рис. 1. Как видно, разработанная модель характеризуется значительно меньшим временем вычисления.

Тестирование метода на измеренных данных.

С этой целью было проведено измерение смеси Alexa 488 с флуоресцеином (экспериментальные данные предоставлены кафедрой паразитологии медицинского центра Лейденского университета) с помощью системы регистрации ConfoCor 2 (Carl Zeiss, Germany), оснащенной объективом Zeiss Neofluar ($40 \times 1,2$ N.A.). Аргон-ионный лазер использовался для возбуждения флуоресценции на длине волны 488 нм. В качестве кюветы была взята стандартная 96-луночная плата с кварцевым дном (Polyftronics). Измеряемый образец растворялся в PBS (0,035 M phosphate, 0,15 M NaCl, pH 7,6). При времени измерения 120 с число зарегистрированных фотонов составило около $16E+6$. РЧФ рассчитывали при $T = 1E-5$ с. На рис. 2 и в таблице представлены результаты анализа РЧФ. Сначала был проведен однокомпонентный анализ. Значение критерия χ^2 , равномерность распределения остатков, малые стандартные отклонения параметров при использовании метода FIDA свиде-

тельствовали о хорошем качестве подгонки, в то время как результаты анализа, проведенного разработанным нами методом и методом OFC PCH, ясно свидетельствовали о наличии нескольких компонент (см. рис. 2 а и таблицу). Этот пример наглядно демонстрирует возможность переоценки экспериментальных данных методом FIDA. Двухкомпонентный анализ показал очень близкие результаты для всех трех методов. Теоретические кривые и остатки были практически неразличимыми (см. рис. 2 б).

Результаты анализа смеси Alexa 488 и флуоресцеина одно- и двухкомпонентной моделью

Параметр	Однокомпонентная модель		Двухкомпонентная модель		
	FIDA	2MN PCH	FIDA	OFC PCH	2MN PCH
N_1	$4,436 \pm 0,005$	$4,477 \pm 2,675$	$5,521 \pm 0,732$	$6,101 \pm 0,158$	$6,101 \pm 0,158$
q_1	29844 ± 37	29569 ± 18189	16767 ± 852	78753 ± 37133	15062 ± 449
N_2	–	–	$0,661 \pm 0,430$	$0,634 \pm 0,011$	$0,640 \pm 0,010$
q_2	–	–	60272 ± 15571	331480 ± 29496	63399 ± 717
F_V/a	$-1,069 \pm 0,004$	$1,714 \pm 3,427$	$-0,897 \pm 0,067$	$0,849 \pm 0,033$	$0,849 \pm 0,033$
b	$0,518 \pm 0,008$	–	$0,244 \pm 0,041$	–	–
χ^2	0,701	44,01	0,472	0,438	0,438

Примечание. Значения критерия χ^2 и оценки параметров, полученные с использованием разработанного метода и методов FIDA, OFC PCH, представлены для сравнения (для однокомпонентной модели результаты OFC PCH не представлены).

Результаты OFC PCH на рис. 2 не представлены, так как теоретические кривые, полученные с использованием разработанного нами метода и метода OFC PCH, практически неразличимы. Стандартные отклонения параметров q_i для разработанного метода были значительно меньшими, чем для метода OFC PCH, что подтверждает ранее сделанный вывод о возросшей точности метода вследствие устранения зависимости между параметрами модели. Предложенный метод характеризуется большей точностью определения параметров и в сравнении с FIDA. Уменьшение числа степеней свободы поч-

ти также способствует увеличению точности определения параметров модели. Устранение зависимости между параметрами модели позволило провести глобальный анализ нескольких характеристик со связыванием этих параметров.

Таким образом, разработанный метод характеризуется большей чувствительностью при разрешении многокомпонентных систем по сравнению с методом FIDA, отсутствием зависимости между параметрами модели, большей точностью их определения и большей скоростью вычисления.

1. Elson E.L., Magde D. // Biopolymers. 1974. Vol. 1. P. 113.
2. Kask P., Palo K., Ullmann D., Gall K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. № 24. P. 13756.
3. Chen Y., Müller J.D., So P.T.C., Gratton E. // Biophys. J. 1999. Vol. 77. P. 553.
4. Palo K., Mets U., Jager S., Kask P., Gall K. // Ibid. 2000. Vol. 79. P. 2858.
5. Huang B., Perroud T.D., Zare R.N. // ChemPhysChem. 2004. Vol. 5. P. 1523.
6. Beechem J.M. // Methods Enzymol. 1992. № 210. P. 37.
7. Апанасович В.В., Коляда А.А., Чернявский А.Ф. Статистический анализ случайных потоков в физическом эксперименте. Мн., 1988.
8. Beechem J.M. // Methods Enzymol. 1992. Vol. 210. P. 37.
9. Yatskou M.M., Digris A.V., Novikov E.G. et al. // Recent Research Developments in Physical Chemistry. 2004. Vol. 7. Pt. 1. P. 165.
10. Johnson M. L., Faunt L.M. // Methods in Enzymology. 1992. Vol. 210. P. 1.
11. Skakun V.V., Novikov E.G., Apanasovich V.V. et al. // Eur. Biophys. J. 2006. Vol. 35. № 5. P. 410.

Поступила в редакцию 13.03.08.

Виктор Васильевич Скакун – старший преподаватель.

Владимир Владимирович Апанасович – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой.