

# МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОТОКА ФОТООТСЧЁТОВ С УЧЁТОМ ДВУХ ИЗЛУЧАТЕЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ МОЛЕКУЛ В СИСТЕМАХ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

И. П. Шингарёв, В. В. Скакун

## ВВЕДЕНИЕ

Во флуоресцентной флукуационной спектроскопии (ФФС) анализируются флукуации интенсивности флуоресценции небольшого числа молекул, что даёт информацию об их структуре, количестве, динамике, излучательных свойствах и взаимодействиях [1]. Многие флуоресцирующие молекулы обладают двумя состояниями с разным квантовым выходом [2]. При этом молекула может спонтанно изменять своё состояние, что обусловлено, например, реакциями изомеризации [3], интеркомбинационной динамикой [4] или конформационными изменениями [5]. Учёт этих изменений при разработке методов анализа данных ФФС необходим для получения адекватных оценок параметров исследуемых образцов.

Предварительное тестирование метода анализа с целью установления его адекватности, точности, устойчивости и границ применения удобно проводить на данных, полученных с помощью имитационных моделей. В настоящей работе предлагается имитационная модель потока фотоотсчётов в ФФС при учёте диффузии флуоресцирующих молекул с двумя обратимыми излучательными состояниями. Особенностью модели является получение фотоотсчётов в виде случайного потока событий, что позволяет проводить тестирование методов анализа данных ФФС, основанных на построении различных характеристик потока.

## ТЕОРИЯ.

Система ФФС представляет собой совокупность образца и измерительной установки, выполненной на базе конфокального микроскопа [6]. При постоянной интенсивности возбуждающего излучения величина флукуаций интенсивности флуоресценции может быть представлена как [7]:

$$\delta F(t) = \int_V W(r) \delta(qC(r,t)) dr, \quad (1)$$

где  $W(\mathbf{r})$  – нормированный профиль засветки, характеризующий пространственное распределение детектируемого излучения,  $q$  – характеристическая яркость, равная количеству фотонов, регистрируемых от моле-

кулы за единицу времени, и зависящая от её квантового выхода,  $C(\mathbf{r}, t)$  – локальная концентрация молекул.

Профиль засветки  $W(\mathbf{r})$  может быть аппроксимирован функцией вида [8]:

$$B(\mathbf{r}) = \exp\left[-2(x^2 + y^2)/\omega_0^2 - 2z^2/z_0^2\right], \quad (2)$$

где  $\omega_0$  и  $z_0$  определяют размеры области засветки,  $\mathbf{r} = (x, y, z)$ .

Для оценки размеров области, в которой молекулы преимущественно возбуждаются и излучают фотоны, вводится понятие эффективного объёма [9]:

$$V_{eff} = \left( \int_V W(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \right)^2 / \int_V W^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (3)$$

что позволяет оценивать концентрацию, находя число молекул  $N_{eff} = CV_{eff}$ , где  $C$  – концентрация молекул.

Одним из методов анализа данных ФФС является метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС), основанный на анализе автокорреляционной функции (АКФ) флуктуаций интенсивности [9]. Для случая свободно диффундирующих молекул с двумя излучательными состояниями  $A$  и  $B$  при учёте (2), АКФ флуктуаций интенсивности флуоресценции записывается как [10]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N_{eff}} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{Dj}} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{\tau}{a^2 \tau_{Dj}} \right)^{-1/2} \left( 1 + \frac{F}{1-F} \exp\left[ -\frac{\tau}{\tau_p} \right] \right), \quad (4)$$

где  $\tau_D = \omega_0^2/4D$ ,  $a = z_0/\omega_0$ ,  $\tau_p = (K_{AB} + K_{BA})^{-1}$ ,  $F = K_{AB}K_{BA}(q_A - q_B)^2 (K_{AB} + K_{BA})^{-1} (K_{AB} q_A^2 + K_{BA} q_B^2)^{-1}$ ,  $D$  – коэффициент диффузии молекул,  $K_{AB}$  и  $K_{BA}$  – частоты переходов между состояниями,  $q_A$  и  $q_B$  – характеристические яркости состояний.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОТОКА ФОТООТСЧЁТОВ.

Будем считать, что молекулы независимы и время затухания флуоресценции молекул пренебрежимо мало по сравнению со временем моделирования наиболее быстрых процессов. Система уравнений, описывающая динамику переходов между состояниями  $A$  и  $B$ , может быть представлена в виде [3, 9]:

$$\frac{dS_A(t)}{dt} = K_{BA}S_B(t) - K_{AB}S_A(t), \quad \frac{dS_B(t)}{dt} = K_{AB}S_A(t) - K_{BA}S_B(t), \quad (5)$$

где  $S_A(t)$ ,  $S_B(t)$  – вероятности обнаружения молекулы в соответствующем состоянии в момент времени  $t$ , при этом начальные условия  $S_A(0)=1$ ,  $S_B(0)=0$ .

Из (5) следует, что вероятности обнаружения молекулы в состояниях  $A$  и  $B$  выражаются как

$$p_A = K_{BA}/(K_{AB} + K_{BA}), \quad p_B = K_{AB}/(K_{AB} + K_{BA}). \quad (6)$$

Для нахождения распределения моментов времени, в которые молекула меняет своё состояние, рассмотрим динамику выхода из состояния  $A$ . Для этого решим первое уравнение системы (5) без слагаемого  $K_{BA}S_B(t)$  [11]. Решением этого уравнения является  $f_A(t)=\tau_A^{-1}\exp(-t/\tau_A)$ , где  $\tau_A=1/K_{AB}$  – среднее время нахождения в состоянии  $A$  (рассуждения для  $B$ -состояния аналогичны). Вероятности перехода в противоположное состояние по истечении промежутка времени  $\Delta t_A$  или  $\Delta t_B$ , выразятся как:

$$p_{\Delta t_A} = 1 - \exp(-\Delta t_A / \tau_A), \quad p_{\Delta t_B} = 1 - \exp(-\Delta t_B / \tau_B). \quad (7)$$

В модели предполагается, что за  $\Delta t_A$  ( $\Delta t_B$ ) перемещение молекулы незначительно, поэтому, при постоянном возбуждающем излучении, интенсивность регистрации фотонов от неё также постоянна в течение этого промежутка времени. Тогда поток фотоотсчётов от молекулы будет стационарным потоком Пуассона [12], события которого на  $[T_0; T_m]$  вычисляются как  $t_i = t_{i-1} - \lambda^{-1} \ln \alpha_i$ , где  $\lambda$  – интенсивность потока,  $\alpha$  – реализация случайной величины с равномерным распределением на  $[0;1]$ ,  $t_0 = T_0$ . Генерация событий происходит до тех пор, пока не будет превышена граница  $T_m$  [13].

Область моделирования (ОМ) представляет собой прямоугольный параллелепипед, с началом координат в точке пересечения его диагоналей. Моделирование диффузии проводится по методу случайных блужданий: координатам молекул придаются приращения, имеющие гауссово распределение с нулевым математическим ожиданием и дисперсией  $\sigma^2 = 2D\Delta t$ , где  $D$  – коэффициент диффузии молекулы,  $\Delta t$  – время перемещения [14] Для поддержания постоянной концентрации молекул в ОМ используются периодические граничные условия.

Пользуясь предположением о независимости молекул, можно получать поток фотоотсчётов от каждой молекулы по отдельности и затем объединять их в один поток. Вначале молекула с равной вероятностью помещается в одну из точек ОМ и задаётся её начальное состояние по (6). Подсчитывается интенсивность регистрации фотоотсчётов  $\lambda(t_i^S)=q_S B(\mathbf{r}_i)$ , где  $t_i^S$  – момент перехода молекулы в определённое состояние  $S$  ( $A$  или  $B$ ),  $q_S$  – характеристическая яркость молекулы. Генерируется интервал времени  $t_{i+1}^S - t_i^S = \Delta t_S = -\tau_A \ln(1-\alpha)$ . На этом интервале генерируется поток Пуассона с интенсивностью  $\lambda(t_i^S)$ . Состояние молекулы меняется на противоположное и, в соответствии с процедурой моделирования диффузии при  $\Delta t = \Delta t_S$ , молекула перемещается в но-

вую точку ОМ. Эти шаги повторяются до тех пор, пока  $t_{i+1}^S$  не превысит заданное время моделирования  $T$ .

### ЧИСЛЕННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ.

Для доказательства адекватности разработанной модели были проведены численные эксперименты. Параметры функции засветки  $\omega_0 = 0,3$  мкм,  $z_0 = 0,9$  мкм, константы переходов молекул (Rhodamine 6G в воде [4])  $K_{AB}=1,1$  МГц,  $K_{BA}=0,49$  МГц, коэффициент диффузии  $D=2,8 \cdot 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с. Характеристические яркости  $q_A=100$  кГц,  $q_B=20$  кГц, концентрация  $C=0,25$  нМ. Размеры ОМ  $3 \times 3 \times 9$  мкм, время регистрации фотоотсчетов  $T=100$  с. Также проведено моделирование для случая с  $q_B=0$ .

Для полученных потоков фотоотсчетов были вычислены АКФ, которые были проанализированы по методу ФКС с использованием программы FFS Data Processor [15]. Аппроксимация характеристик основана на поиске минимума критерия  $\chi^2$  с помощью метода оптимизации Маркварда-Левенберга [16]. Качество аппроксимации оценивалось по нормированным остаткам [17].

Таблица 1

#### Результаты анализа полученных потоков

Параметр	$q_A \neq 0, q_B = 0$		$q_A \neq 0, q_B \neq 0$	
	Задано	Получено	Задано	Получено
$\tau_p$ , мкс	0,62	0,70±0,06	0,62	0,51±0,09
$F$	0,75	0,75±0,02	0,43	0,45±0,04
$\tau_D$ , мкс	80,4	79,6±2,3	80,4	81,4±1,9
$N_{eff}$	0,068	0,068±0,001	0,068	0,0672±0,0004
$z_0/\omega_0$	3	3,25±0,22	3	2,82±0,13
$\chi^2$	–	1,36	–	1,02

Результаты анализа потоков фотоотсчетов приведены в Таблице 1, из которой видно, что полученные оценки параметров близки к исходным значениям. Графики автокорреляционных функций приведены на рис. 1, из которого видно влияние второго излучательного состояния в микросекундном диапазоне временной задержки. Стремление значений критерия  $\chi^2$  к единице и равномерность и величина распределения остатков относительно нуля свидетельствует о хорошем качестве аппроксимации АКФ.

### ВЫВОДЫ.

Разработана имитационная модель потока фотоотсчетов в системах ФФС, учитывающая диффузию и переходы молекул между двумя излучательными состояниями. На основании полученных потоков фотоотсчетов построена АКФ, которая проанализирована с помощью метода ФКС.

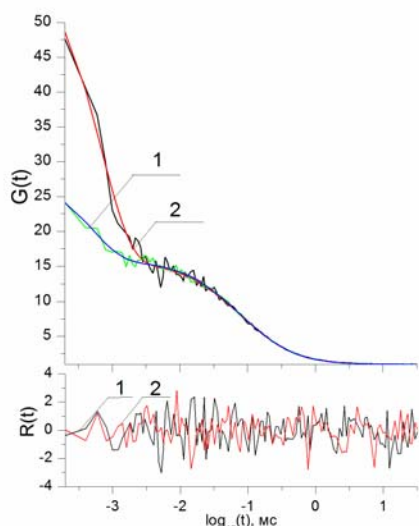


Рис. 1. Вид АКФ  $G(t)$  и нормированных остатков  $R(t)$  при обоих излучательных состояниях молекулы (1) и одном излучательном состоянии (2).

Близость полученных оценок параметров модели к их истинным значениям, значения критерия согласия, вид нормированных остатков показывают адекватность модели в рассмотренных случаях. Разработанная модель может применяться для тестирования методов анализа данных ФФС.

### Литература

1. *Fogarty K., et. al./ Biophys. J., vol. 98, issue 3, suppl. 1, 2010, pp 655a-656a*
2. *Hendrix J., et al./ Biophys. J., vol. 94, №10, 2008, pp. 4103 – 4113*
3. *Elson E., Madge D./ Biopolymers, vol. 13, 1974, pp. 1-27*
4. *Widengren J., et. al./ J. Phys. Chem., vol. 99, 1995, pp. 13368–13379*
5. *Edman L., et. al./ Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, 1996, pp. 6710-6715*
6. *ConfoCor 3. Laser Scanning Detection Module. Application Manual, 2009, Carl Zeiss.*
7. *Schwille P., et. al./ Biophys. J., vol. 77, 1999, pp. 2251–2265*
8. *Rigler R., et. al./ Eur. Biophys. J., vol. 22, 1993, pp. 169–175*
9. *Krichevsky O., Bonnet G./ Reports on Progress in Physics, vol. 65, 2002, pp. 251-297,*
10. *Malvezzi-Campeggi F., et. al./ Biophys. J., vol. 81, №3, 2001, pp. 1776–1785*
11. *Осадько И. С./ УФН, том 176, № 1, 2006, стр. 23-57*
12. *Saleh B., Teich M. Fundamentals of Photonics. New York, 1991, 966 p.*
13. *Апанасович В. В., Коляда А. А., Чернявский А. Ф. Статистический анализ случайных потоков в физическом эксперименте. Минск, 1988, 256 с.*
14. *MacKeown P. K. Stochastic simulation in physics. Singapore, 1997, 456 p.*
15. *Skakun V., et. al./ Eur. Biophys. J., 2005, vol. 34, pp. 323–334*
16. *Bevington P. R., Robinson D. K. Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences. New York, 320 p.*
17. *O'Connor D., Philips D. Time-correlated Single Photon Counting. London, 1984, 288 p.*