

**КУМУЛЯНТНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА  
ФОТООТСЧЕТОВ С УЧЕТОМ ДИФФУЗИИ  
ДЛЯ ДВУХКОМПОНЕНТНОГО ОБРАЗЦА**

**Е. Ю. Шинкевич, В. В. Скакун**

Во флуоресцентной флуктуационной спектроскопии информацию о биологических молекулах получают путём измерения флуктуаций интенсивности флуоресцирующих молекул, проходящих через маленький исследуемый

объем. Флуктуации флуоресценции несут информацию о транспортных свойствах, химических реакциях, агрегатном состоянии молекул, и т.д.

Метод флуоресцентного кумулянтного анализа (ФКА) является одним из методов анализа распределения интенсивности флуоресценции, изучающим вещество на молекулярном уровне без изменения термодинамического равновесия исследуемой системы. Метод основывается на приведении экспериментально полученных кумулянтов к математической модели, используя метод моментов, позволяющий приравнивать теоретические и экспериментальные кумулянты, и находить искомые параметры [1].

В методе ФКА кумулянты выражаются в виде функции от яркости и числа молекул для каждого флуоресцирующего вида

$$FK_r = \sum_i \gamma_r q_i^r c_i, \quad (1)$$

где  $q_i$  и  $c_i$  – яркость и число молекул  $i$ -ой смеси, коэффициенты  $\gamma_r$  определяются по формуле

$$\gamma_r = \int_V (B(\vec{r}))^r dr^3 / \int_V B(\vec{r}) dr^3, \quad (2),$$

где  $B(\vec{r})$  – профиль засветки. Выражение (1) может быть получено, используя производящую функцию [2] или формулу Мандела [3], устанавливающую связь между моментами интегрированной интенсивности и моментами фотоотсчетов.

Экспериментальные факториальные кумулянты любого порядка могут быть вычислены через обычные моменты фотоотсчетов [4].

Для нахождения искомых параметров двухкомпонентного образца достаточно выписать выражения для первых четырех кумулянтов, используя формулу (1), и решить полученную систему уравнений (3):

$$\begin{cases} FK_1 = (c_1 q_1 + c_2 q_2) T & FK_2 = \gamma_2 (c_1 q_1^2 + c_2 q_2^2) T^2 \\ FK_3 = \gamma_3 (c_1 q_1^3 + c_2 q_2^3) T^3 & FK_4 = \gamma_4 (c_1 q_1^4 + c_2 q_2^4) T^4 \end{cases}, \quad (3)$$

### КОРРЕКЦИЯ МЕТОДА ФКА С УЧЁТОМ ДИФФУЗИИ

Измеряемая интенсивность флуоресцентного излучения изменяется пропорционально числу флуоресцентных молекул, находящихся в облучаемой области. В зависимости от выбора ширины интервала наблюдения диффузия молекул оказывает большее или меньшее влияние на флуктуации интенсивности флуоресценции, и, соответственно, на значения определяемых параметров. Поэтому возникает необходимость во введении коррекции на диффузию молекул через облучаемую область. Перепишем систему уравнений

(3) для действительных яркости  $\tilde{q}_j$  и концентрации  $\tilde{c}_j$  молекул, используя вспомогательную функцию  $\Gamma_j(T)$ , объединяющую диффузионные свойства и зависимость параметров от ширины интервала времени наблюдения  $T$  [2]:

$$\begin{cases} FK_1 = (\tilde{q}_1\tilde{c}_1 + \tilde{q}_2\tilde{c}_2)T \\ FK_2 = \gamma_2(\Gamma_{2_1}(T)\tilde{q}_1^2\tilde{c}_1 + \Gamma_{2_2}(T)\tilde{q}_2^2\tilde{c}_2)T^2 \\ FK_3 = \gamma_3(\Gamma_{3_1}(T)\tilde{q}_1^3\tilde{c}_1 + \Gamma_{3_2}(T)\tilde{q}_2^3\tilde{c}_2)T^3, (4) \\ FK_4 = \gamma_4(\Gamma_{4_1}(T)\tilde{q}_1^4\tilde{c}_1 + \Gamma_{4_2}(T)\tilde{q}_2^4\tilde{c}_2)T^4 \end{cases}$$

где  $\Gamma_r(T) = r! \int_{\substack{\tau_2, \tau_3, \dots, \tau_r \geq 0, \\ \tau_2 + \tau_3 + \dots + \tau_r \leq T}} G_r(\tau_2, \tau_3, \dots, \tau_r)(T - \tau_2 - \tau_3 - \dots - \tau_r) d\tau_2 d\tau_3 \dots d\tau_r, (5)$

$G_r(\tau_2, \tau_3, \dots, \tau_r)$  – корреляционная функция числа фотоотсчётов  $r$ -порядка.

### РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА КУМУЛЯНТНОГО АНАЛИЗА

В алгоритме метода ФКА выделим три основных этапа. Вначале найдем численные значения кумулянтов, используя экспериментальные данные. Затем определим значения коэффициентов и корректирующего фактора, используя выражения (2) и (5) соответственно. На заключительном этапе составим системы уравнений (3) и (4) для случаев с учетом диффузии и без него соответственно и решим их с целью нахождения оценок искомых параметров – яркости и числа молекул в облучаемой области.

Для тестирования метода ФКА для двухкомпонентной смеси в качестве исследуемого образца была использована смесь белка FreeFAB, помеченного красителем Cy2, и иммуноглобулина IgG, помеченного красителем Alex488. Экспериментальные данные были получены с помощью флуоресцентного корреляционного спектроскопа ConfoCor2. Используя символьную математику среды MATLAB, была решена система уравнений (3) и найдены яркость и количество молекул без учета диффузии. Для того, чтобы учесть диффузию, необходимо определить численные значения корректирующих факторов (5). Для нахождения многомерных интегралов в формуле (5) был использован метод Монте-Карло. Аналитическое решение системы уравнений (4) найти не удалось, поэтому для определения численных значений входящих в неё параметров был использован метод наименьших квадратов.

В результате тестирования разработанного алгоритма были получены графики зависимости яркости и количества молекул для обоих веществ от ширины интервала наблюдения  $T$  (рис. 1 – 4).

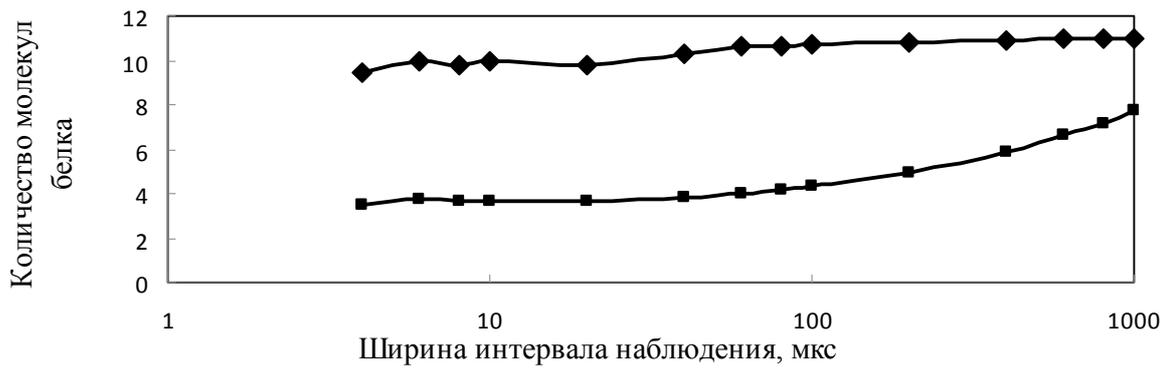


Рис. 1. График зависимости яркости молекул красителя Cy5 от ширины интервала наблюдения без коррекции ■ и с коррекцией ♦



Рис. 2. График зависимости количества молекул белка в исследуемом объеме от ширины интервала наблюдения без коррекции ■ и с коррекцией ♦



Рис. 3. График зависимости яркости молекул красителя Alex488 от ширины интервала наблюдения без коррекции ■ и с коррекцией ♦



Рис. 4. График зависимости количества молекул иммуноглобулина в исследуемом объеме от ширины интервала наблюдения без коррекции ■ и с коррекцией ◆

Ожидается, что при ведении коррекции искомые параметры не должны зависеть от ширины интервала наблюдения (кривая на графике должна быть параллельна оси абсцисс). Из вида графиков следует, что диффузия молекул через исследуемый объем имеет существенное влияние на вычисляемые значения и введение коррекции устраняет зависимость искомых параметров от ширины интервала наблюдения.

Разработанный алгоритм ФКА был протестирован на смоделированных и измеренных данных. Проведенные тесты подтвердили его достоверность и работоспособность.

#### Литература

1. *Chen, Y., J.D. Muller, P.T.C. So, and E. Gratton.* The Photon Counting Histogram in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Biophysical Journal*. 1999.
2. *Muller, J.* Cumulant Analysis in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2004.
3. *Skakun, V., E. Novikov, V. Apanasovich, H. Tanke, A. Deelder.* Initial guesses generation for fluorescence intensity distribution analysis. *Biophysical Journal*. 2006.
4. *Кендалл, М. Дж. и А. Стьюарт.* Теория распределений. 1977.