**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОТОКА ФОТООТСЧЁТОВ ВО ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ МОЛЕКУЛ С ДВУМЯ ИЗЛУЧАТЕЛЬНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ**

**Шингарёв\* И. П., Скакун В. В., Апанасович В. В.**

shynharou@bsu.by

Белорусский государственный университет, 220030 г. Минск, пр. Независимости, 4

Дата поступления статьи:

**АННОТАЦИЯ**

Представлена имитационная модель потока фотоотсчётов, регистрируемого в системах флуоресцентной флуктуационной спектроскопии от молекул с двумя излучательными состояниями, свободно диффундирующих в растворе. С помощью разработанной модели можно получать различные характеристики случайного потока фотоотсчётов, что позволяет проводить тестирование методов анализа флуоресцентной флуктуационной спектроскопии и прогнозировать результаты натурных экспериментов.

**Ключевые слова:** флуоресцентная корреляционная спектроскопия, фотоотсчёты, моделирование случайных потоков событий

**Введение.** Флуоресцентная флуктуационная спектроскопия (ФФС) используется для исследования вещества на одномолекулярном уровне путём статистического анализа флуктуаций интенсивности флуоресценции молекул, находящихся в малой освещенной области исследуемого образца. Методы ФФС позволяют получать информацию о структуре, количестве, динамике, излучательных свойствах и взаимодействиях молекул [1, 2]. Особенностью ФФС является высокая чувствительность, неинвазивность и возможность применения при комнатных температурах, что обусловило её широкое применение при исследовании живых клеток [3].

Многие флуоресцирующие макромолекулы обладают двумя и более состояниями с разным квантовым выходом [4 – 6]. Находясь в возбуждённом состоянии, такие молекулы могут спонтанно переходить из одного состояния в другое, что обусловлено, например, реакциями изомеризации [7], интеркомбинационной динамикой [8] или конформационными изменениями [9]. При разработке методов анализа данных ФФС необходимо учитывать эти переходы, так как это позволяет получать более адекватные оценки параметров исследуемых веществ [10].

Важной составляющей процесса разработки моделей и методов анализа данных является этап тестирования с целью установления их адекватности, точности, устойчивости и границ применения, для чего обычно используются данные натурных экспериментов. Однако ввиду больших временных и материальных затрат, сложности проведения эксперимента с точно заданными условиями, более удобным является проведение предварительного тестирования метода анализа на данных, полученных с помощью имитационных моделей. На сегодняшний день имеется ряд имитационных моделей, учитывающих трансляционную диффузию, интеркомбинационную динамику и фотообесцвечивание флуоресцирующих молекул [11–13]. Эти модели основаны на получении числа фотоотсчётов за малый промежуток времени (порядка микросекунд), что позволяет вычислять статистические характеристики потока, основанные только на интенсивности регистрации событий, при ширине интервала регистрации равной или кратной этому промежутку времени. При этом адекватность подобных моделей зависит от величины данного промежутка.

В настоящей работе предлагается имитационная модель потока фотоотсчётов в ФФС при учёте диффузии флуоресцирующих молекул нескольких типов с двумя обратимыми излучательными состояниями. Особенностью модели является получение фотоотсчётов в виде случайного потока событий, что делает возможным вычисление различных характеристик потока на произвольном интервале регистрации, что в свою очередь позволяет проводить тестирование более широкого круга методов анализа данных ФФС.

**Теория.** Система ФФС представляет собой совокупность образца (обычно раствор флуоресцирующих молекул) и измерительной установки, построенной на базе инвертированного конфокального микроскопа с высокоаппертурным объективом, источника лазерного излучения и детектора, работающего в режиме однофотонного счета. [14]. При постоянной интенсивности возбуждающего излучения величина флуктуаций интенсивности может быть представлена в виде [15]:

, (1)

где *W*(***r***) – нормированный профиль засветки, характеризующий пространственное распределение детектируемого излучения, *qk* –характеристическая яркость, равная количеству фотонов, регистрируемых от молекулы за единицу времени, и зависящая от интенсивности падающего излучения, эффективности регистрирующей системы, квантового выхода и сечения поглощения молекул, *Ck*(***r****,t*) – локальная концентрация молекул, *M* – количество типов молекул в исследуемом образце, ***r***= (*x,y,z*).

Для аппроксимации профиля засветки *W*(***r***) наиболее часто применяется функция вида [16]:

, (2)

где ω0 и *z*0 определяют размеры области засветки.

Для оценки размеров области, в которой молекулы преимущественно возбуждаются и излучают фотоны, вводится понятие эффективного объёма, величина которого определяется как [17]:

. (3)

Введение *Veff* позволяет оценивать концентрацию путём определения числа молекул *Neff = CVeff*, где *С* – концентрация молекул. Для аппроксимации вида (2) *Veff =*π3/2ω02z0.

Большинство органических молекул имеет триплетный уровень энергии, который находится между основным и первым возбуждённым синглетными уровнями. Выделим в схеме энергетических уровней молекулы *S0* – основной уровень (невозбуждённое состояние), *S1* – первое возбуждённое состояние, *T* – триплетный уровень. При непрерывном облучении светом в молекуле в основном происходят переходы *S0*↔*S1*, при этом поглощается или испускается фотон. Переходы *S1*→*T* и *T*→*S0* запрещены правилами отбора, но с малой вероятностью возможны, поэтому молекула может переходить в триплетное состояние и находится в нём некоторое время [18]. Излучательным переходам из триплетного состояния соответствует фосфоресценция, квантовый выход которой намного меньше квантового выхода флуоресценции [8]. В результате последовательность излучённых фотонов перемежается случайными паузами, во время которых излучение практически отсутствует [18]. Поэтому в дальнейшем будем рассматривать триплетное состояние как неизлучательное.

Если пренебречь временем нахождения молекулы в состояниях *S0*и *S1* (наносекунды), то описанная выше трехуровневая схема может быть сведена к схеме с двумя состояниями: *A* – излучательное состояние, *B* – неизлучательное. В ряде других процессов, например в процессах изомеризации и конформационных изменений молекул, могут также наблюдаться два излучательных (или одно излучательное и одно неизлучательное) состояния молекул [7, 9]. Переходы между состояниями *A* и *B* могут быть описаны системой дифференциальных уравнений вида [7, 17]:

 (4)

где *SA*(*t*), *SB*(*t*) – вероятности обнаружения молекулы в соответствующем состоянии в момент времени *t*, при этом начальные условия *SA*(0)=1, *SB*(0)=0, где *KAB* и *KBA* – частоты переходов между соответствующими состояниями.

Одним из основных методов анализа данных ФФС является метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС), основанный на анализе автокорреляционной функции (АКФ) флуктуаций интенсивности, которая с учётом (1) выражается как [7]:

, (5)

где <*F*> - среднее по времени значение интенсивности.

Для случая свободной диффузии молекул с обратимыми переходами между двумя излучательными состояниями выражение для АКФ можно записать в виде [19]:

, (6)

где *GD*(*τ*) и *X*(*τ*) учитывают диффузию молекул и динамику обратимых переходов между двумя состояниями соответственно.

Для флуоресцирующих молекул *M* видов при использовании аппроксимации (2) *GD*(*τ*) записывается как [17]:

, (7)

где τ*Dj =*ω0*2/4Dj*, *Dj* – коэффициент диффузии молекул *j*-го вида, *Neff*(*j*) - число частиц *j*-го вида в эффективном объёме *Veff*, *a = z*0*/*ω0.

Выражение *X*(*τ*) не зависит от параметров профиля засветки и выражается как [19]:

, (8)

при этом

, (9)

, (10)

где *KAB* и *KBA* – частоты переходов, а *qA* и *qB* – характеристические яркости в соответствующем состоянии.

Наряду с ФКС широкое распространение получил метод анализа серии распределений числа фотоотсчётов (АСРЧФ), вычисленных при различных временах счёта фотонов *T* [20, 21]. Этот метод позволяет различать вещества по их характеристической яркости, концентрации и коэффициенту диффузии. Распределение вероятностей регистрации *k* фотонов *P*(*k,T*) за время *T* для *M*-компонентного образца может быть получено через обратное преобразование Фурье (при ξ=*exp*(*i*φ)) от производящей функции, имеющей вид:

, (11)

где ξ – переменная производящей функции, *Ni*(*T*) – среднее число молекул *i*-го типа в эффективном объёме.

Истинные оценки характеристической яркости *q0* и числа частиц *N0* в эффективном объёме можно вычислить по формулам

, (12)

, (13)

где

, (14)

. (15)

**Моделирование потока фотоотсчётов.** Будем считать, что молекулы движутся и излучают независимо и время затухания флуоресценции молекул пренебрежимо мало по сравнению со временем нахождения молекулы в заданном излучательном состоянии.

Решение системы (4) можно представить в виде:

,  (16)

Из (16) следует, что вероятности обнаружения молекулы в состояниях *A* и *B* (при t→∞) выразятся как

, . (17)

Для нахождения распределения моментов времени, в которые молекула переходит из состояния *A* в состояние *B,* найдём решение первого уравнения системы (4) без слагаемого *KBASB*(*t*) [18]. Им является нормированная функция , где *τA*=1/*KAB* – среднее время нахождения в состоянии *А.* Аналогично находится *fB*(*t*) – распределение моментов выхода из состояния *B*. Вероятности того, что по истечении промежутка времени *ΔtA* или *ΔtB* произойдёт переход в противоположное состояние, выразятся как:

, . (18)

При моделировании фотоотсчётов от одиночной молекулы в заданном состоянии будем предполагать, что за промежуток времени Δ*tA* (или Δ*tB*) перемещение молекулы незначительно, поэтому, при постоянном возбуждающем излучении, интенсивность регистрации фотонов от неё также постоянна в течение этого промежутка времени. Поэтому поток фотоотсчётов от молекулы можно аппроксимировать стационарным потоком Пуассона [22], события которого на интервале [*T*0;*Tm*] можно вычислить из рекуррентного соотношения *ti = ti-*1*–*λ- 1lnα*i*, где λ *–* интенсивность потока, α – реализация случайной величины с равномерным распределением на [0;1], *t*0= *T*0. Генерация событий происходит до тех пор, пока не будет превышена граница *Tm* [23].

В качестве области моделирования (ОМ) выбран прямоугольный параллелепипед c 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 σ*2 =*2*D*Δ*t*, где *D* – коэффициент диффузии молекулы, Δ*t* – время перемещения [24]. Для поддержания постоянной концентрации молекул в ОМ используются периодические граничные условия.

Пользуясь предположением о независимости молекул, можно получать поток фотоотсчётов от каждой молекулы в отдельности и затем объединять их в один поток с упорядоченными по возрастанию событиями. Этим же подходом удобно пользоваться в случае моделирования фотоотсчётов от нескольких типов флуоресцирующих молекул. Опишем общую схему получения потока фотоотсчётов от одной молекулы. Вначале молекула с равной вероятностью помещается в одну из точек области моделирования и задаётся её начальное состояние *A* или *B* в соответствии с (17). Затем генерируется величина интервала времени Δ*ts=ti+*1*–ti=*–τs*ln*(1-α), в течение которого молекула находится в состоянии *S* (*A* или *B*), *ti* – момент перехода молекулы в состояние *S*. На этом интервале генерируется стационарный поток Пуассона с интенсивностью λ(*ti*)=*qSW*(***ri***), где *qS* – характеристическая яркость молекулы в *S-*состоянии. После этого координаты молекулы изменяются в соответствии с процедурой моделирования диффузии при Δ*t*=Δ*tS*, а текущее излучательное состояние изменяется на противоположное. Все указанные шаги повторяются до тех пор, пока *ti+*1 не превысит заданное время моделирования *T*.

**Обсуждение результатов численных экспериментов.** Для доказательства адекватности разработанной модели были проведены численные эксперименты для распространённой в ФФС ситуации, когда одно из состояний молекул (*B*-состояние) является неизлучательным. В ходе численного эксперимента с помощью имитационной модели генерировались потоки фотоотсчётов, на основании которых строились автокорреляционные функции и распределения числа фотоотсчётов. В качестве параметров модели были приняты значения, типичные для экспериментов по ФФС. Генерация потоков производилась для однокомпонентного и двухкомпонентного случаев. Адекватность имитационной модели проверялась путём сравнения построенных характеристик с характеристиками, рассчитанными при помощи методов ФКС и АРЧФ.

Анализ вычисленных характеристик потоков по методам ФКС и АСРЧФ был выполнен с использованием программы FFS Data Processor [25]. Автокорреляционная функция строилась в квазилогарифмической шкале: первые 16 точек рассчитывались с шагом 0,2 мкс, для каждой последующей группы из 8 точек шаг удваивался. При генерации серии РЧФ время счёта фотонов *T* также задавалось в квазилогарифмической шкале: первая группа из 8 РЧФ строилась с *T=*2 мкс и шагом по времени 2 мкс, затем время счёта фотонови шаг по времени удваивались для следующей группы из 8 РЧФ. В каждом рассмотренном ниже случае было построено и проанализировано 85 распределений.

Аппроксимация построенных характеристик осуществлялась путём поиска минимума значения приведенного критерия χ2 с использованием метода оптимизации Маркварда-Левенберга [26]. Качество аппроксимации также оценивалось по виду нормированных остатков [27]. Cтандартные отклонения оценок параметров находились с помощью метода асимптотических стандартных ошибок [28].

В однокомпонентном случае параметры имитационной модели имели следующие значения: ω0= 0,3 мкм, *z*0= 0,9 мкм, константы переходов молекул *KAB*=1,1 МГц, *KBA*=0,49 МГц, коэффициент диффузии *D*=2,8\*10-10 м2/с (Rhodamine 6G в воде [8]), характеристическая яркость *q*= 100 кГц, концентрация *С*= 0,25 нМ, размеры области моделирования 3×3×9 мкм, общее время регистрации фотоотсчётов составило 100 c.

Результаты анализа построенных АКФ и РЧФ с помощью методов ФКС и АСРЧФ, соответственно, приведены в Таблице 1. Ожидаемые значения для параметров построенных характеристик вычислены, исходя из заданных параметров модели: *Neff =*π3/2ω02z0*C*, τ*D =*ω0*2/4D*, где *С* – концентрация молекул, *D* – коэффициент диффузии. Значения для параметров АКФ τ*p* и *F* вычислены по формулам (9) и (10). Значение характеристической яркости *q'*=25260±270 Гц, полученное по методу АСРЧФ, рассчитано по формуле

. (19)

Из Таблицы 1 видно, что оценки параметров, полученные в результате проведённого анализа, близки к соответствующим ожидаемым значениям.

На Рисунке 1 приведены графики теоретических и построенных характеристик и их нормированные остатки. Близость значений критерия χ2 к единице, соответствие полученных оценок параметров модели и их ожидаемых значений, вид распределения остатков свидетельствуют об адекватности разработанной модели.

**Таблица 1.**

**Рисунок 1.**

Было также проведено моделирование потока фотоотсчётов, регистрируемого от раствора двух типов флуоресцирующих молекул, с различными коэффициентами диффузии и характеристическими яркостями. Это, например, соответствует ситуации, когда исследуемый образец содержит флуоресцирующие метки и более крупные молекулы с этими же метками. Параметры модели были выбраны следующими: ω0= 0,3 мкм, *z*0= 0,9 мкм, *KAB*=1,1 МГц, *KBA*=0,49 МГц. Для молекул типа I характеристическая яркость *q*1=50 кГц, коэффициент диффузии *D*1=2,8\*10-10 м2/с, концентрация *С*1=0,5 нМ. Для молекул типа II *q*2=100 кГц, коэффициент диффузии *D*2=5\*10-11 м2/с, концентрация *С*2=0,25 нМ, размеры ОМ 3×3×9 мкм. Общее время регистрации фотоотсчётов составило 200 c. Результирующий поток в случае двухкомпонентной системы был получен объединением потоков, полученных от каждого типа частиц по отдельности.

Результаты анализа полученного потока приведены в Таблице 2. Оценки характеристических яркостей рассчитаны по формуле (19) на основе значений *q1'*= 11160±80 Гц, *q2'*=26020±90 Гц, полученных по методу АСРЧФ.

**Таблица 2.**

Из приведённых в Таблице 2 результатов анализа видно, что как и в предыдущем случае, найденные оценки параметров модели близки к их ожидаемым значениям. Графики теоретических и построенных характеристик, приведённые на Рисунке 2, и их нормированные остатки, а также значения критерия χ2 свидетельствуют о хорошем качестве аппроксимации, что подтверждает адекватность разработанной модели.

**Рисунок 2.**

**Заключение.** Разработана имитационная модель потока фототсчётов в системах флуоресцентной флуктуационной спектроскопии, учитывающая диффузию и переходы молекул между двумя излучательными состояниями. Разработанная модель может применяться для тестирования методов анализа данных флуоресцентной флуктуационной спектроскопии. Адекватность модели была проверена путем анализа автокорреляционной функции потока и серии распределения числа фотоотсчётов по, соответственно, методу флуоресцентной корреляционной спектроскопии и методу анализа серии распределений числа фотоотсчётов. Близость полученных оценок параметров модели к их истинным значениям, значения критерия согласия, вид нормированных остатков свидетельствуют об адекватности модели во всех рассмотренных случаях. Использование предположения о независимости молекул позволяет проводить параллельное моделирование потоков фотоотсчётов, получать потоки большой длительности и при большой концентрации молекул разных типов.

1. **Y. Chen, B. Wu, K. Musier-Forsyth, L. Mansky, J. Mueller.** [Biophys. J.](http://www.sciencedirect.com/science/journal/00063495), **96**, (2009) 1961–1969

2. **J. Skinner, Y. Chen, J. Müller.** [Biophys. J.](http://www.sciencedirect.com/science/journal/00063495), **94** (2008) 2349–2360

3. **B. Wu, Y. Chen, J. Müller.** Biophys. J., **96** (2009) 2391–2404

4. **Schenk, S. Ivanchenko, C. Röcker, J. Wiedenmann, G. Nienhaus.** Biophys. J., **86**, (2004) 384–394

5. **J. Hendrix, C. Flors, P. Dedecker, J. Hofkens, Y. Engelborghs.** Biophys. J., **94**, № 10 (2008) 4103–4113

6. **С. Лоуэр, М. Эль-Сайед.** Успехи физических наук, **94**, №2 (1968) 289–351

7. **E. Elson, D. Madge.** Biopolymers, **13**, (1974) 1–27

8. **J. Widengren, Ü. Mets, R. Rigler.** J. Phys. Chem., **99**, (1995) 13368–13379

9. **L. Edman, Ü. Mets, R. Rigler.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, (1996) 6710–6715

10. **K. Palo, Ü. Mets, V. Loorits, P. Kask.** Biophys. J., **90**, (2006) 2179–2191

11. **J. Dix, E. Hom, A. Verkman.** J. Phys. Chem. B, **110**, (2006) 1896–1906

12. **D. Bunfield, L. Davis.** Applied Optics, **37**, №12, (1998) 2315–2326

13. **J. Wohland, R. Rigler, H. Vogel.** Biophys. J., **80**, (2001) 2987–2999

14. ConfoCor 3. Laser Scanning Detection Module. Application Manual. (2009). Carl Zeiss.

15. **P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, W. Webb.** Biophys. J., **77**, (1999) 2251–2265

16. **R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask.** Eur. Biophys. J., **22**, (1993) 169–175

17. **O. Krichevsky, G. Bonnet.** Reports on Progress in Physics, **65**, (2002) 251–297

18. **И. С. Осадько.** Успехи физических наук, **176**, №1, (2006) 23–57

19. **F. Malvezzi-Campeggi, M. Jahnz, K. Heinze, P. Dittrich, P. Schwille.** Biophys. J., **81**, №3 (2001) 1776–1785

20. **T. D. Perroud, B. Huang, R. N. Zare.** ChemPhysChem, **6**, №5, (2005) 905-912.

21. **K. Palo, U. Metz, S. Jager, P. Kask, K. Gall.** Biophys. J., 79, №6, (2000) 2858-2866.

22. **B. Saleh, M. Teich.** Fundamentals of Photonics. New York, John Wiley&Sons, (1991). 966 р.

23. **В. В. Апанасович, А. А. Коляда, А. Ф. Чернявский.** Статистический анализ случайных потоков в физическом эксперименте. Минск, Университетское, (1988), 256 c.

24. **P. K. MacKeown**. Stochastic simulation in physics. Singapore, Springer, (1997), 456 p.

25. **V. Skakun, M. Hink, A. Digris, R. Engel, E. Novikov, V. Apanasovich, A. Visser.** Eur. Biophys. J., **34**, (2005) 323–334

26. **P. R. Bevington, D. K. Robinson.** Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences, New York, McGraw-Hill, 2003, 320 p.

27**. D. O'Connor, D. Philips.** Time-correlated Single Photon Counting. London, Academic Press, (1984), 288 p.

28. **M. L. Johnson, L. M. Faunt.** Methods in Enzymology, **210**, (1992) 1–37.

**Таблица 1. Результаты анализа АКФ и серии РЧФ, проведённого по методам ФКС и АРЧФ, для потока, соответствующего однокомпонентному случаю**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Параметр** | **Ожидаемое значение** | **ФКС** | **АСРЧФ** |
| τ*p*, мкс | 0,62 | 0,70±0,06 | 0,65±0,16 |
| *F* | 0,75 | 0,75±0,02 | 0,75±0,04 |
| τ*D*, мкс | 80,4 | 79,6±2,7 | 79,7±2,7 |
| *Neff* | 0,0679 | 0,0682±0,0008 | 0,0688±0,0008 |
| *z*0*/*ω0 | 3 | 3,3±0,2 | 3,2±0,2 |
| *q,* Гц | 100000 | – | 101040±1080 |
| χ2 | – | 1,4 | 1,6 |

**Таблица 2. Результаты анализа АКФ и серии РЧФ, проведённого по методам ФКС и АРЧФ, для потока, соответствующего двухкомпонентному случаю**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Параметр** | **Ожидаемое значение** | **ФКС** | **АСРЧФ** |
| τ*p*, мкс | 0,62 | 0,67±0,03 | 0,62±0,08 |
| *F* | 0,75 | 0,74±0,01 | 0,75±0,02 |
| τ*D*1, мкс | 80,4 | 94±29 | 102±3 |
| *Neff*1 | 0,136 | 0,14±0,02 | 0,157±0,001 |
| τ*D*2, мкс | 450 | 440±70 | 392±7 |
| *Neff*2 | 0,0679 | 0,065±0,02 | 0,0664±0,0004 |
| *z*0/ω0 | 3 | 3,0±0,4 | 2,9±0,1 |
| *q1,* Гц | 50000 | – | 44640±310 |
| *q2,* Гц | 100000 | – | 104080±350 |
| χ*2* | – | 1,1 | 1,1 |

**Рисунок 1. Результаты анализа характеристик потока в однокомпонентном случае. На левой панели представлены результаты анализа автокорреляционной функции *G*(*t*), на правой – результаты анализа частот наблюдения *k* фотоотсчётов *F*(*k*). *R*(*t*), *R*(*k*) – нормированные остатки.**

**Рисунок 2. Результаты анализа характеристик потока в двухкомпонентном случае. На левой панели представлены результаты анализа автокорреляционной функции *G*(*t*), на правой – результаты анализа частот наблюдения *k* фотоотсчётов *F*(*k*). *R*(*t*), *R*(*k*) – нормированные остатки.**