

荧光关联谱的数据处理改进方法

王 硕¹, 金 雷^{2*}, 陈颀延¹

1. 清华大学物理系, 原子分子纳米科学教育部重点实验室, 北京 100084

2. 香港中文大学电子工程系, 光电子学实验室, 中国香港

摘 要 荧光关联谱方法凭借其独特的对溶质浓度及扩散系数的测量能力, 在对复杂系统的分子物理化学性质测量方面, 不断扩大和深化其应用领域。但是从经典上, 传统的荧光关联谱数据处理方法容易在拟合自相关曲线的参数时引入一定的误差, 而且图表上的直观信息不多。针对以上问题, 在文章中作者尝试用带有微分的数据处理办法, 来更直观地估测参数并判断荧光多组分问题。经典自相关曲线处理后的微分曲线, 有特异的波谷位置、深度和半深宽度, 由此可判断特征扩散时间和多荧光成分的组分数目。此改进方法为利用荧光涨落谱方法测量生物组织体内的复杂环境提供帮助。

关键词 荧光关联谱; 数据处理; 微分曲线; 估测参数; 多荧光组分

中图分类号: O43, Q632 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)11-2601-04

引 言

荧光关联谱(fluorescence correlation spectroscopy, FCS)方法是一项近年来发展迅速的实验方法, 已经在化学、生命科学等领域逐渐显示出它广阔的应用前景^[1, 2]。荧光关联谱技术测量的是粒子位于一个非常小的激光激发区域时所发出的荧光, 通过分析荧光光强涨落数据的自相关函数得到粒子扩散系数、溶液浓度等信息。荧光关联谱测量与传统的测量方法比较, 其优点主要在于: 很高的灵敏度(可以达到单分子探测的水平); 测量对系统基本无干扰; 可以进行实时监测等。这些优点尤其适用于生物科学的研究^[3-5]。

但是, 目前绝大多数FCS实验的数据处理办法还是几十年前的方法。这种在横坐标采用对数坐标的图中拟合自相关曲线的方法虽然经典, 但是信息不能直观的准确得到, 如特征扩散时间 τ_D 和溶液荧光组分个数这些参数。拟合曲线时, 实验者需要根据自相关曲线形状估计 τ_D , 再作为拟合参数的初始值。特征扩散时间对数据曲线形状极敏感, 数据质量差会导致特征扩散时间有很大的不确定度^[6]。而FCS方法对复杂体系, 如生物样品, 容易产生背景叠加^[7], 强光导致的三重态和漂白效应^[8]等系统误差, 导致曲线质量的下降。另一方面, FCS方法对多组分样品的识别率较低。目前在信噪比很好^[9]而且各组分的特征扩散时间相差一个量级以

上的情况下, 自相关曲线最多可以进行三组分拟合, 更多组分的拟合人眼几乎不能识别, 而且计算机拟合时有很多发散值, 无法进行。更重要的是即使计算机可以多组分拟合该曲线, 很多时候, 实验者无法直观从自相关曲线上判断荧光组分的数目, 也就无法进行下一步的参数拟合。这是因为不同荧光组分数目的问题有不同的拟合公式, 对同一数据用错误公式拟合的结果完全不确定。所以如何判断样品中组分的个数是一个很麻烦的问题。而通过本文中通过对数坐标图中自相关曲线求导, 会比直接观察法便于识别组分的个数。

本文主要针对上述问题, 从数据处理角度提出一些改进办法。通过理论计算, 在处理过的自相关曲线的微分曲线上, 挖掘其物理含义和作用。在比较中发现该方法比传统方法的优势, 并通过实验实例证实了该改进方法的效果。

1 理论部分

平衡体系的溶液中, 在激光束照射的聚焦区域内, 由于扩散、化学反应等过程变化的发生, 分子随机地进出该区域或是从一种分子变成另一种分子时, 探测到该区域中的被激发荧光将出现一定的涨落。引起这种涨落的本质由宏观的物理参数如扩散系数、化学反应常数等决定。相应的变化过程可通过对应的参数方程表征。如扩散过程将遵循扩散方程, 可由扩散系数表征。因此, 研究分子数的自然涨落能够反映

收稿日期: 2007-09-16, 修订日期: 2007-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(10574081)和“973”基础研究基金项目(2007CB5119004)资助

作者简介: 王 硕, 1982年生, 清华大学物理系硕士研究生 e-mail: wshoopk@gmail.com

* 通讯联系人 e-mail: ljin@ee.cuhk.edu.hk

出变化过程本身的一些信息,进而求出相应的物理参数,而研究这种自然涨落的有效方法便是相关分析。

在数学上是利用自相关函数来表示信号与它自身相移以后的相似性。规一化后的定义为,

$$\varphi(\tau) = \frac{\int_0^{\infty} f(t)f(t+\tau)dt}{\int_0^{\infty} |f(t)|^2 dt} \quad (1)$$

上式的物理概念是 $f(t)$ 与其相对延迟时间 τ 的 $f(t+\tau)$ 来比较,

如二者不相关,则乘积的积分为 0;

如二者完全相关;则相乘积分后自相关函数为常数 1;

如二者不完全相关,则乘积的积分为 0, 1 之间某一常数。

因此,自相关函数的大小可用来表征 $f(t)$ 与自身延迟后的 $f(t+\tau)$ 的相关性,故称为自相关函数。

荧光强度涨落的规一化自相关函数为

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t+\tau)\delta F(t) \rangle}{\bar{F}^2} \quad (2)$$

式中 $\delta(F)(t) = F(t) - \bar{F}$ 为荧光强度涨落函数, $\bar{F} = \langle F \rangle$ 为荧光强度平均值。考虑到激光焦点区域的光强呈三维高斯分布,通过某组分 i 的自由扩散扩散方程:

$$\frac{\partial \delta C_i(\vec{r}, t)}{\partial t} = D_i \nabla^2 C_i(\vec{r}, t)$$

可以计算得到荧光关联谱在单组分扩散问题中的二维和三维自相关函数表达式分别是^[10, 11]

$$G_{2D}(\tau) = G_0 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} + 1 \quad (4)$$

和

$$G_{3D}(\tau) = G_0 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} [1 + (\omega_0/z_0)^2 (\tau/\tau_D)]^{-\frac{1}{2}} + 1 \quad (5)$$

式中 τ 是自相关函数的自变量,即时间间隔, τ_D 为特征扩散时间。激光焦点的光腰半径和光轴向尺度半径分别表示为 ω_0 和 z_0 , 而 G_0 是一个与截距有关的常数。具体推导参见文献[10]。

1.1 确定特征扩散时间

对于二维自相关函数式,不难从图 1 中发现 $\tau = \tau_D$ 是自相关曲线的半高值点,但实际实验中所测得曲线的靠 y 轴一段,一般都不能保证水平,故不易通过得到准确的轴高值来估计 τ_D 。经过简单计算还可发现 $\tau = \tau_D$ 还是对数坐标图中自相关曲线的形状在线型坐标下的斜率极值点,如图 2。由此启发,如果对对数坐标图中自相关曲线的形状求导(将原对数横坐标值作一次 10 为底的对数运算,使新横坐标为线性而且曲线形状不变),那我们可以很直观而且准确的在谷底处找到 τ_D 值,如图 2。曲线表达式为

$$-\frac{\tau_D G_0}{(\tau_D + 10^{\tau^*})^2} \times 10^{\tau^*} \ln 10 \quad (6)$$

其中 $10^{\tau^*} = \tau$ 。

当实验数据曲线的两个近水平端的质量不佳,曲线不平滑时,只要 $\tau = \tau_D$ 附近的数据曲线质量尚好,就可以准确得到波谷处的特征扩散时间 $\tau_D = 10^{\tau^*}$; 而在一般经典方法里,曲线上任意一小段的质量问题,都很可能导致拟合曲线的较

大不确定性和随之产生的 τ_D 误差。

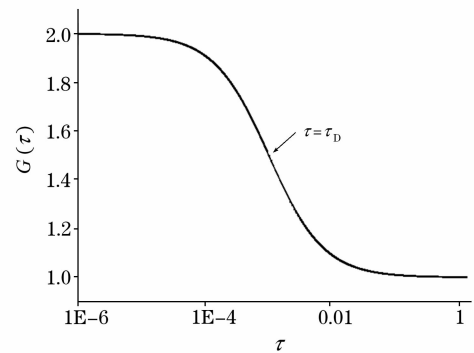


Fig. 1 Classical autocorrelation curve in theory

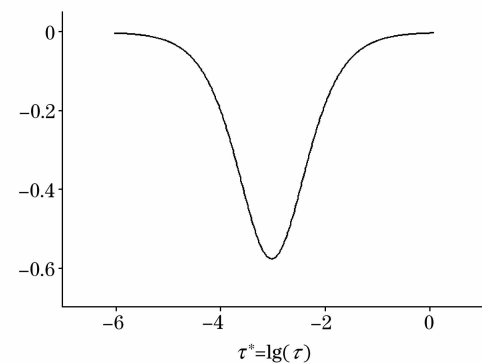


Fig. 2 The differential curve of coordinate-treated autocorrelation curve

1.2 还原自相关曲线

进一步地,由式经过一些运算,可以得到以下两个结果:设波谷纵坐标为 $-a$, 那么

$$G_0 = 4a/\ln 10 \quad (7)$$

图 1 的曲线截距为 $1 + G_0$ 。从而由波谷处的一点,完全还原了原图 1 中的标准自相关曲线,并得到了目标荧光组分的浓度和扩散系数;另外,图 2 中波谷形状的半深宽为 1.53。此半深宽的意义将在下节文中谈及,它可以作为多组分荧光关联谱问题中判断荧光组分数目的辅助标准。

1.3 确定荧光组分数目

构造双组分的自相关曲线。如果用直接观察法,在两组分浓度为 1:1 时,在对数坐标内判断特征扩散时间相差 50 倍左右的双组分问题比较勉强;而采用新方法,可以判断出特征扩散时间相差 20 倍左右的等浓度双组分问题,如图 3,是等浓度的双组分样品自相关曲线的求导曲线。在两个谷值之间有一个小峰,明显是双组分的特征。如果考虑到单组分问题的波谷半深宽为 1.53,则即使谷底间的小峰由于谷底间隔缩短而湮灭,也可以判断是否为双荧光组分。这样,从理论上说,可以将特征扩散时间的相差倍数减小到 10 以下(此时半深宽约 2.2)。

在两荧光组分浓度为 9:1 时,对于理论生成曲线,如果在对数坐标内直接观察,可以判断出特征扩散时间相差 300 倍左右的双组分问题;而采用新的求导法,可以判断出特征

扩散时间相差 100 倍左右的双组分问题。图 4a 是两组分浓度为 9 : 1 时, 双组分样品自相关曲线的求导曲线。两组分浓度为 1 : 9 时, 求导曲线完全轴对称(图 4b)。

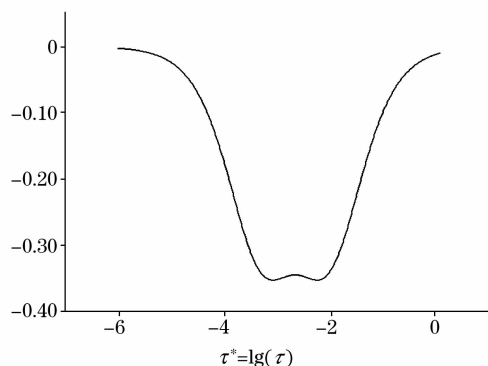


Fig. 3 The differential curve of coordinate-treated autocorrelation curve of two components with the same concentration

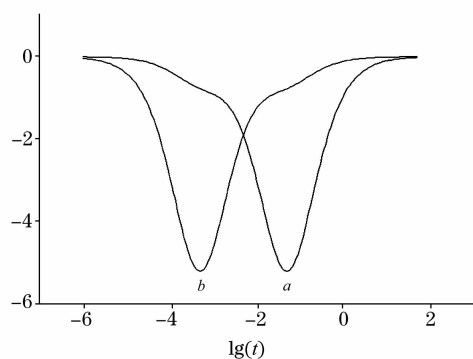


Fig. 4 The differential curves of coordinate-treated autocorrelation curves of two components with different concentrations. $\tau_{D1} = 50$ ms, $\tau_{D2} = 0.5$ ms, the ratio of concentration: $c_1/c_2 = 9 : 1(a)$; $1 : 9(b)$

1.4 三维扩散问题适用性

需要说明的是在三维自由扩散模型中, 尽管(5)式的形式比二维模型时式(4)复杂很多, 但经过数值计算发现, 在对数坐标图中自相关曲线形状的斜率极值点处, τ 与 τ_D 的比值在 0.95 与 0.98 之间(ω_0/z_0 值一般在 1/3 左右, 计算中取 1/3), 可认为两者基本相等。上述对二维问题的处理方法仍有效, 且结论基本相同。

2 实验部分^[11]

FCS 实验装置基于一台 Nikon TE-300 倒置显微镜, 激发光源选用氩离子激光器(Ion Laser Technology, Model 5425)作为探测光源, 波长分别为 488 和 514 nm。具体实验中选用波长为 488 nm, 输出功率约为 7 mW。激光的聚焦和荧光的收集选用数值孔径为 1.4 的 60 倍油镜, 以减小探测区体积并增大荧光的收集效率, 提高信噪比。数据处理记录部分: 荧光信号收集选用雪崩二极管单光子计数模块(Per-

kin-Elmer 公司, SPCM-AQR-14FC), 其暗计数约为 50 cps (Counts per second), 信号窗前样品共轭镜处放置 25 μm 大小的小孔, 也叫共焦小孔^[12], 可以滤除焦点外杂散光。采用相关卡(Correlator 公司, Flex99R-160)作硬件相关处理(内置修正 Afterpulsing 效应算法^[13])。

实验中使用经过净化处理的自制的玻璃底小皿, 荧光样品使用的荧光小球(Molecular Probes 公司, FluoSpheres, F-8888)半径为 44 nm。为防止小球凝聚, 我们在溶液中加入分散剂 Tween80(Altas Chemicals Industries 公司), 实验前还对溶液进行超声处理, 并利用滤膜过滤掉聚集生成的大粒子。

3 结果与讨论

首先, 把相关卡输出的相关曲线数据点, 用经典方法在 Origin 软件内用(5)式拟合, 拟合参数为 G_0 和 τ_D , ω_0/z_0 , 经标定取 0.33。图 5 为自相关数据点和拟合曲线, 该自相关数据质量一般, 数据的左端起始端并不水平, 另外自 $\tau = 0.02$ 开始以右的数据点不再平滑。这些问题将导致一定的特征扩散时间误差。

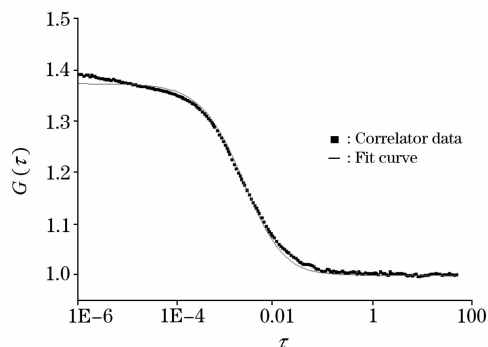


Fig. 5 Fitted autocorrelation curve of fluorescence beads

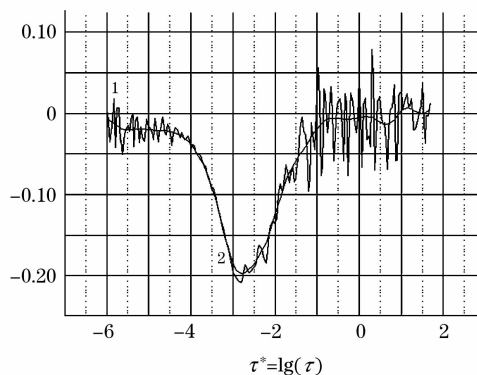


Fig. 6 The differential curve and its smoothed curve in the new method

- 1: Differential of autocorrelation curve;
2: After 10 point FFT smoothing

该数据在中间下降段也就是 $\tau = \tau_D$ 附近的数据比较平滑, 故适用于理论部分 1.1 节确定特征扩散时间的方法。由

于要使微分曲线比较理想,需要原自相关数据在 $\tau = \tau_D$ 附近的平滑程度较好而且数据点较密集,而我们的数据相关卡输出的相关数据只能基本满足上述条件,故图 6 中的微分曲线在波谷附近也有一些抖动。微分曲线左右两端较大的抖动是自相关数据左右两端不平滑导致的,对判断特征扩散时间和波谷半深宽没有影响。我们采用相邻 10 点傅立叶过滤法,滤除波谷附近的抖动,得到的最终曲线(图 6)和理论上的图 2 类似。它的谷底横坐标约为 -2.8 , 所以 $\tau_D \approx 10^{-2.8} \approx 0.0016$; 波谷半深宽约 1.6 , 与单组分理论值 1.53 基本相等,故验证该自相关数据属于单荧光组分问题。

遗憾的是,由于我们的相关卡及其他一些系统固有条件,数据的信噪比未达到能够运用新方法研究双组分问题的

量级。所以目前只能停留在用新方法研究双组分的理论生产曲线上,对双组分问题真实实验曲线的应用,在技术上进一步提高信噪比才有实际意义。

4 结 论

本文从理论计算出发,提出了一种引入微分曲线的新的数据曲线处理方法,一方面它能够从直观上更有效地估测特征扩散时间,另一方面它还可以作为判断荧光组分数目的有效辅助方法。而且,实验证实在某些情况下,它可以比经典的拟合曲线法更准确的给出特征扩散时间,完全可以作为经典 FCS 数据处理办法的一个有益补充。

参 考 文 献

- [1] Yoshida N, Kinjo M, Tamusa M. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 280: 312.
- [2] Lenne P F, Colombo D, Giovannini H, et al. *Single Molecules*, 2002, 3(4): 194.
- [3] Sengupta P, Balaji J, Maiti S. *Methods*, 2002, 27: 374.
- [4] Mayboroda O A, Van Remoortere A, Tanke H J, et al. *Journal of Biotechnology*, 2004, 107(2): 185.
- [5] Berland K M. *Journal of Biotechnology*, 2004, 108(2): 127.
- [6] Enderlein J, Gregor I, Patra D, et al. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2004, 5: 155.
- [7] LIU Guang, CHEN Bo, MENG Fan-bo, et al(刘广,陈波,孟凡波,等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(11): 1379.
- [8] Dittrich P S, Schwille P. *Applied Physics B*, 2001, 73: 829.
- [9] Starchev K, Ricka J, Buffle J. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, 233: 50.
- [10] Elson E L, Magde D. *Biopolymers*, 1974, 13: 1.
- [11] Maiti S, Haupts U, Webb W W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 11753.
- [12] Gosch M, Rigler R. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57: 169.
- [13] Ming Zhao, Lei Jin, Bo Chen, et al. *Applied Optics*, 2003, 42(19): 4031.

Improved Data Processing Method of Fluorescence Correlation Spectroscopy

WANG Shuo¹, JIN Lei^{2*}, CHEN Die-yan¹

1. Key Laboratory of Atomic and Molecular Nanosciences of Ministry of Education, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. Department of Electronic Engineering, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

Abstract By the unique ability of measuring concentration and diffusion coefficient, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) has kept enlarging and deepening its application fields which need measuring physicochemical properties in complex mixtures. However, the classical data processing method in FCS generally induces errors in the fitting parameters, and the intuitionistic information in the chart is little or confused. Aiming at the above problems, we tried a new data processing method with differential treatment to find out whether it has multi-fluorescent-components and estimate the parameters intuitionally in the chart. The differential curves of treated autocorrelation curves have various positions, depths and full widths at half depth of the trough, by which the characteristic diffusion time and the number of the fluorescent components are decided. This improved processing method provides help for the FCS measurement in complex environment of life.

Keywords Fluorescence correlation spectroscopy; Data processing; Differential curve; Parameter estimation; Multi-fluorescent-components

* Corresponding author

(Received Sep. 16, 2007; accepted Dec. 18, 2007)