arXiv:2603.25447v1 [physics.bio-ph] 26 Mar 2026

相分离凝聚体的界面渗透性、反射率与优先内部混合

OihanJoyot,* Zoé Ferrand,* Fernando Muzzopappa, Pierre Weiss, and Fabian Erdel†法国国家科学研究中心（*CNRS*）综合生物学中心（*CBI*），图卢兹大学，法国图卢兹。

生物分子凝聚体通过在空间上浓缩分子来组织生化过程，同时允许分子与周围环境动态交换。然而，跨越其界面的传输可能受到强烈抑制，从而增强物质滞留并促进优先内部混合。已有两种关键机制用于描述这一现象：偏置界面反射率，用于比较粒子试图进入或离开凝聚体时在界面处被反射的强弱；界面阻力，则决定粒子穿过界面的动力学速率。实验上对这些参数进行定量一直颇具挑战。在此，我们提出一个理论与实验框架来解决这一问题，并拓展了此前开发的半漂白后荧光恢复方法。我们通过谱分解求解具有半透界面的球形扩散问题。通过评估积分恢复曲线所包含的信息，我们表明，这些曲线所编码的信息足以在广阔的参数空间范围内恢复界面参数。将该框架应用于由聚赖氨酸和透明质酸构成的可调复凝聚体后，我们发现其界面具有明显的偏置反射性和显著的阻力，两者均会驱动优先内部混合。这些参数取决于盐浓度，将界面传输与分子间相互作用强度及其在相图中的位置联系起来。我们的结果建立了界面性质与凝聚体动力学之间的定量联系，揭示了两者的相互作用如何形成不同的传输机制。

I. 引言

生物分子凝聚体遍布生命界，在时空维度上组织分子方面发挥着重要作用。许多凝聚体被认为是通过吸引性的多价相互作用组装而成 [1, 2], ，形成分子可在其中扩散的动态组装体。这种行为对许多生物过程至关重要，例如底物和产物不断周转的生化反应。研究者通过荧光漂白恢复（FRAP）研究凝聚体内部的分子扩散及其与周围介质之间的交换：标记粒子经漂白后，研究者会持续追踪荧光恢复情况 [3–6]。另一种方法是进行半区FRAP实验：先将凝聚体的一半漂白，再追踪荧光恢复情况 [4, 7, 8]。尽管许多凝聚体是由分子之间形成吸引性相互作用而构成的，但凝聚体内部的分子扩散及其与周围介质之间的交换，通常用一种模型来描述：该模型考虑在由半透界面包围的区域内扩散的非相互作用粒子 [3–6, 9, 10]。这些模型已用于解释FRAP实验，并提取描述分子传输的参数。为描述这些模型中半透界面的影响，人们提出了两种现象：（i）界面的非对称反射率 [5, 10], ，用于比较粒子从内部或外部遇到界面时被反射的程度，从而确定界面两侧的平衡浓度

界面，以及（ii）界面阻力 [3, 6, 9],，它会降低粒子穿越界面的动力学速率，从而减缓达到平衡的过程。目前尚不清楚这两种现象如何相互作用，从而调节生物分子凝聚体的界面传输和优先内部混合。为解决这一问题，我们将先前开发的半区荧光漂白恢复方法加以扩展，明确考虑界面阻力和偏置反射性对缔合相分离形成的凝聚体的影响。我们通过谱分解求解半透球体内粒子的三维扩散问题，并利用该解推导描述半区和全FRAP实验中恢复过程的方程。我们展示了如何结合积分恢复曲线、定量荧光成像和荧光相关光谱，确定反射偏置和界面阻力；并将这一工作流程应用于不同氯化镁$_2$ 浓度下的PLL-HA 复凝聚体，它们构成了一个可调的生物分子凝聚体模型体系。我们发现，PLL-HA 复凝聚体的界面具有显著的反射偏置（$\rho \geq 50\%$）和界面阻力（ $1/\kappa^* \geq 3$），导致粒子在离开复凝聚体之前经历多轮内部混合。这两个参数均取决于盐浓度，说明界面性质与吸引相互作用的强度相关。结合黏性聚合物模型来解释这种盐浓度依赖性表明，分子离开凝聚体时必须克服一个静电能垒；在单相和两相区域之间的共存线附近，该能垒会消失。我们的结果表明，凝聚体具有一系列共同特征，同时也表现出多样的界面性质，由此产生不同的动力学特征和传输机制。

* 这些作者对本研究贡献相同。
†通讯作者：fabian.erdel@cnrs.fr

II. 结果

A. 半透球体中的粒子扩散

1. 数学模型

下面我们介绍数学框架。我们考虑一个球形定义域 $\Omega = \mathcal{B}(0, L)$，它由另一个较小的球形定义域 $\Omega_{\mathrm{in}} = \mathcal{B}(0, R)$ 和环绕其外的环形区域 $\Omega_{\mathrm{out}} = \mathcal{B}(0, L)\backslash\Omega_{\mathrm{in}}$ 组成；前者半径为 R，后者半径为 L。我们用 $c(x, t)$ 表示位置 x 处在时间 t 的漂白粒子浓度。我们分别用 $c_{\mathrm{in}} = c|_{\Omega_{\mathrm{in}}}$ 和 $c_{\mathrm{out}} = c|_{\Omega_{\mathrm{out}}}$ 表示内部和外部浓度。我们假设扩散系数 D 在每个定义域内均为常数：

$$D(x) = \begin{cases} D_{\mathrm{in}} & \text{if } x \in \Omega_{\mathrm{in}}, \\ D_{\mathrm{out}} & \text{if } x \in \Omega_{\mathrm{out}}. \end{cases}$$

我们考虑以下扩散方程 [3, 11]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c), \tag{1}$$

$$-D_{\mathrm{in}} \partial_r c_{\mathrm{in}}|_{r=R} = -D_{\mathrm{out}} \partial_r c_{\mathrm{out}}|_{r=R}, \tag{2}$$

$$\begin{aligned} -D_{\mathrm{in}} \partial_r c_{\mathrm{in}}|_{r=R} &= \kappa \left(c_{\mathrm{in}}(R_-) - \Gamma c_{\mathrm{out}}(R_+) \right) \\ &= \kappa_{\mathrm{in}\to\mathrm{out}} c_{\mathrm{in}}(R_-) - \kappa_{\mathrm{out}\to\mathrm{in}} \sqrt{\Delta}\, c_{\mathrm{out}}(R_+), \end{aligned} \tag{3}$$

$$D_{\mathrm{out}} \partial_r c_{\mathrm{out}}|_{r=L} = 0. \tag{4}$$

式（2）中的边界条件确保界面处的通量守恒 $r = R$。式（3）中的边界条件描述分子以渗透率 κ （或等效地，以界面阻力 $1/\kappa$）和分配系数 Γ穿过界面的渗透过程。后者等于平衡时内部与外部浓度之比。 $\Delta = D_{\mathrm{out}}/D_{\mathrm{in}}$ 表示外部与内部扩散系数之比，参数$\kappa_{\mathrm{in}\to\mathrm{out}} = \kappa$ 和 $\kappa_{\mathrm{out}\to\mathrm{in}} = \kappa\Gamma/\sqrt{\Delta}$ 分别表示粒子从内部区域和外部区域一侧看到的界面渗透率。它们决定界面两侧的浓度达到平衡值的速度。最后，式（4）中的边界条件确保在 $r = L$处没有通量穿过外部区域的外边界。

2. 谱分解求解

不同几何形状和维度下的类似扩散问题已采用不同方法进行研究，例如 [3, 6, 11–17]。我们基于谱分解求解球面三维情形，从而拓展了这项工作。从数学角度看，该问题涉及算子 $\mathcal{A}$，它是自伴的且具有紧预解式（见定理 A.5）。因此，解可写为 $c(t) = \exp(-t\mathcal{A})c_0$，其中 $\exp(-t\mathcal{A})$ 表示由 $\mathcal{A}$ 生成的扩散半群，而 $c_0 = c(\cdot, 0)$ 是时刻 $t = 0$的初始浓度。Lions 定理 [18, 定理 X.9] 使我们能够确立该问题的适定性。特别是，该问题存在唯一解 $c \in C([0, +\infty); L^2(\Omega)) \cap C^1((0, +\infty); L^2(\Omega))$（见附录 A4）。我们可以将任意时刻 $t > 0$ 的解写为

$$\begin{aligned} c(x, t) = &\int_{\Omega_{\mathrm{in}}} G_t(x, x')\, c_0(x')\, dx' \\ &+ \Gamma \int_{\Omega_{\mathrm{out}}} G_t(x, x')\, c_0(x')\, dx', \end{aligned} \tag{5}$$

其中， $G_t : \Omega \times \Omega \to \mathbb{R}$ 是半群的积分核，即与 $\mathcal{A}$相关的时变格林函数。从物理角度看， $G_t(x, x')$ 与概率密度 $p_t(x, x')$ 有关；该概率密度描述了最初位于位置 x' 的粒子在时间 t时出现在位置 x的概率，其关系为

$$p_t(x, x') = \begin{cases} G_t(x, x') & \text{if } x' \in \Omega_{\mathrm{in}}, \\ \Gamma G_t(x, x') & \text{if } x' \in \Omega_{\mathrm{out}}. \end{cases} \tag{6}$$

由于 $\mathcal{A}$ 具有紧预解式，其谱是可数的（见定理 A.5），相应的特征函数（Φ_k）$_{k\geq 0}$ 构成 $L^2(\Omega)$ 的标准正交基。因此，格林函数可表示为谱展开式

$$G_t(x, x') = \sum_k e^{-\lambda_k t}\, \Phi_k(x) \Phi_k^*(x'), \tag{7}$$

对于某些特征值 $\{\lambda_k\}_{k\in\mathbb{N}}$。由于问题具有径向对称性，这个希尔伯特基可以显式构造。角向依赖由球谐函数给出，而径向部分则通过求解一族斯图姆–刘维尔问题得到。因此，我们用 $k = (\ell, m, n)$ 为特征函数编号，其中 $\ell \geq 0$和 $-\ell \leq m \leq \ell$ 分别表示球谐函数的次数和阶，$n \in \mathbb{N}$ 则为径向特征模态编号。

令 $Y_{\ell m}$ 表示 S^2上的球谐函数。 $\mathcal{A}$ 的特征函数可取为分离变量形式

$$\Phi_{\ell m n}(r, \theta, \varphi) = Y_{\ell m}(\theta, \varphi)\, f_{\ell n}(r), \tag{8}$$

其中归一化径向部分单独定义如下：

$$\begin{aligned} f_{\ell n}^{\mathrm{in}}(r) &= N_{\ell n}\, j_\ell \left(\sqrt{\frac{\lambda_{\ell n}}{D_{\mathrm{in}}}} r \right) && \text{in } \Omega_{\mathrm{in}}, \\ f_{\ell n}^{\mathrm{out}}(r) &= N_{\ell n}\, \beta_{\ell n}\, \psi_\ell \left(\sqrt{\frac{\lambda_{\ell n}}{D_{\mathrm{out}}}} r; \sqrt{\frac{\lambda_{\ell n}}{D_{\mathrm{out}}}} L \right) && \text{in } \Omega_{\mathrm{out}}, \end{aligned} \tag{9}$$

其中：

- $\lambda_{\ell n}$ is, for each ℓ, the n-th solution of the transcendental equation (A25);
- $\psi_\ell(z; z_L) = y_\ell'(z_L) j_\ell(z) - j_\ell'(z_L) y_\ell(z)$ is a Neumann-adapted radial function satisfying $\psi_\ell'(z_L; z_L) = 0$, which enforces the no-flux boundary condition at $r = L$;

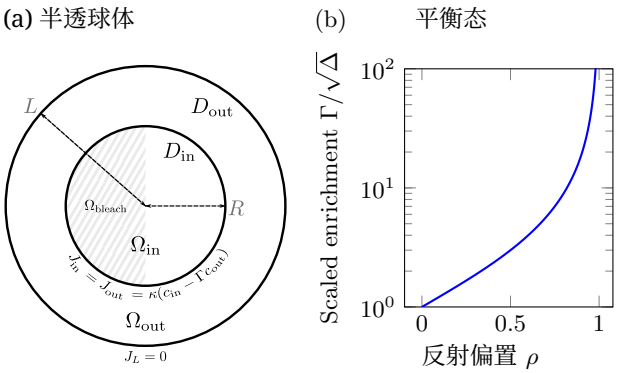


图 1：扩散问题示意图，以及界面的反射偏置与平衡分配之间的联系。

(a) 我们考虑非相互作用粒子在半径为 R 的球形区域内的扩散，该区域位于半径为 L 的较大球形区域中。两个区域之间界面处的通量由图中所示条件给出，而较大区域边界处的通量为零。(b) 缩放后的平衡分配系数随反射偏置 ρ 的变化关系；该偏置决定界面从内部和外部看分别具有多强的反射性。

- j_ℓ 和 y_ℓ 分别表示第一类和第二类球贝塞尔函数；
- $\beta_{\ell n}$ 是在界面处由通量连续性确定的振幅比 $r = R$，如方程 (A24) 所述；
- $N_{\ell n} > 0$ 是由方程（A28）描述的归一化常数。

根据方程（7）、方程（8）以及球谐函数加法定理 [19]，，格林函数可写为

$$\begin{aligned} G_t(x,x') &= \sum_{\ell,m,n} e^{-\lambda_{\ell n} t}\, Y_{\ell m}(\theta,\varphi)\, Y^*_{\ell m}(\theta',\varphi')\, f_{\ell n}(r) f_{\ell n}(r') \\ &= \sum_{\ell,n} e^{-\lambda_{\ell n} t}\, \frac{2\ell+1}{4\pi} P_\ell(\cos\gamma)\, f_{\ell n}(r)\, f_{\ell n}(r'). \end{aligned} \tag{10}$$

其中，$(r,\ \theta,\ \varphi)$ 是 x的球坐标表示，P_ℓ 表示次数为 ℓ 的勒让德多项式，并且 $\cos\gamma = \cos\theta'\cos\theta + \sin\theta\sin\theta'\cos(\varphi-\varphi')$。

3. 重新参数化

II A 1 中的模型取决于参数 D_{in}、D_{out}、κ 和 Γ。在式 (10) 中，模型参数通过特征值 $\lambda_{\ell n}$ 影响结果，这些特征值满足超越方程 (A25)。它们完全由无量纲参数 Γ、Δ 和 $\kappa^* = \kappa R/D_{\text{in}}$ 确定。引入无量纲特征值 $\mu^2_{\ell n} = \lambda_{\ell n} R^2/D_{\text{in}}$ 和无量纲时间 $t^* = tD_{\text{in}}/R^2$ 后，格林函数便完全无量纲化。这表明，R 和 D_{in} 仅作为缩放因子，分别确定特征长度和时间尺度；而无量纲格林函数及由此得到的 Γ、Δ 和 κ^* 则包含了所有非平凡的动力学。下文中，我们通常会用界面的反射偏置（附录 B）替换 Γ，其表达式为：

$$\rho = \frac{1 - \kappa_{\text{in}\to\text{out}}/\kappa_{\text{out}\to\text{in}}}{1 + \kappa_{\text{in}\to\text{out}}/\kappa_{\text{out}\to\text{in}}} = \frac{\Gamma/\sqrt{\Delta} - 1}{\Gamma/\sqrt{\Delta} + 1}. \tag{11}$$

该参数量化了界面的方向不对称性，这种不对称性源于从内部区域和外部区域两侧反射的入射通量比例不同。该表达式与此前报道的一维扩散穿过单一界面的结果一致 [10]。根据构造，$\rho \in [-1, 1]$。如果 $\rho = -1$，则 $\kappa_{\text{out}\to\text{in}} = 0$，粒子无法进入内部区域。如果 $\rho = 0$，则 $\kappa_{\text{in}\to\text{out}} = \kappa_{\text{out}\to\text{in}}$，即对于内部区域和外部区域中的粒子，界面的渗透性相同。如果 $\rho = 1$，则 $\kappa_{\text{in}\to\text{out}} = 0$，粒子无法离开内部区域。

这种重新参数化表明，所有关键参数，包括平衡分配系数 Γ，都直接与单个粒子的动力学相关，即其在各个区域中的扩散系数 D_{in} 和 D_{out}（或等效地，D_{in}和 Δ），以及界面阻力 κ^{-1} 和界面的反射偏置 ρ，这些参数共同决定了粒子在界面处的动力学。

4. 优先内部混合

接下来，我们试图量化粒子在逃逸前于内部区域停留的时间，并将逃逸理解为需要穿越界面并通过一个特征边界层，以避免立即返回。为此，我们计算粒子在半透球体中的平均停留时间 τ_{res}，并通过减去固有扩散时间τ_{diff}，分离出与穿越界面及在外部区域逃逸相关的时间（见附录 C）。具体而言，我们将内部混合程度定义为

$$M \overset{\text{def}}{=} \frac{(\tau_{\text{res}} - \tau_{\text{diff}}) - (\tau_{\text{free}} - \tau_{\text{diff}})}{(\tau_{\text{res}} - \tau_{\text{diff}}) + (\tau_{\text{free}} - \tau_{\text{diff}})}. \tag{12}$$

如附录 C 所示，停留时间 τ_{res} 为

$$\tau_{\text{res}} = \underbrace{\frac{R^2}{6D_{\text{in}}}}_{\tau_{\text{diff}}} + \underbrace{\frac{R}{3\kappa}}_{\tau_{\text{cross}}} + \underbrace{\frac{\Gamma R^2}{3D^{\text{eff}}_{\text{out}}}}_{\tau_{\text{outer}}}. \tag{13}$$

这三个术语可分别理解为扩散至界面的时间 τ_{diff}、穿过界面的时间 τ_{cross}，以及在外部区域中穿过边界层且不会立即返回的逃逸时间 τ_{outer}。

有效扩散系数 $D_{\text{out}}^{\text{eff}}$ 与粒子逃逸判据相关，即边界层的大小（见附录 C）。对于自由扩散的情况，即$\kappa \to \infty$、$\Gamma = 1$ 和 $D_{\text{out}} = D_{\text{in}}$，式 (13) 可简化为

$$\tau_{\text{free}} = \left(\frac{3+\pi}{1+\pi}\right)\frac{R^2}{6D_{\text{in}}} = \left(\frac{3+\pi}{1+\pi}\right)\tau_{\text{diff}}. \tag{14}$$

因此，内部混合程度表示为

$$M = \frac{\tau_{\text{cross}} + \tau_{\text{outer}} - 2\tau_{\text{diff}}/(1+\pi)}{\tau_{\text{cross}} + \tau_{\text{outer}} + 2\tau_{\text{diff}}/(1+\pi)} = \frac{(1+\pi)/\kappa^*_{\text{eff}} - 1}{(1+\pi)/\kappa^*_{\text{eff}} + 1}. \tag{15}$$

这里，$1/\kappa^*_{\text{eff}} = 1/\kappa^* + 1/\kappa^*_{\text{outer}}$ 表示由两个电阻构成的串联电路的无量纲阻力：无量纲界面阻力 $1/\kappa^* = \tau_{\text{cross}}/2\tau_{\text{diff}} = D_{\text{in}}/\kappa R$，它表示粒子穿越界面的难易程度；以及外部区域的无量纲阻力 $1/\kappa^*_{\text{outer}} = \tau_{\text{outer}}/2\tau_{\text{diff}} = \Gamma D_{\text{in}}/D^{\text{eff}}_{\text{out}}$，它表示粒子穿越界面后，在外部区域扩散而非立即返回内部区域的难易程度。$1/\kappa^*_{\text{eff}}$ 的值可解释为粒子在成功逃逸之前，在内部区域进行扩散探索的轮数。

根据定义，$M \in [-1, 1]$。$M = 0$ 的情况对应于在均匀介质中自由扩散时观察到的内部混合程度，而 $M = -1$则对应于粒子到达界面时立即被外部区域吸收的极限情况，此时内部混合程度达到可能的最低值。最后，$M = 1$ 对应于完全限制的极限情况，此时逃逸时间趋于无穷，粒子进行彻底的内部混合。因此，$0 < M \leq 1$ 的值对应于优先内部混合，这可能源于界面穿越动力学缓慢（$1/\kappa^* > 1$），以及外部区域对扩散逃逸的强烈抑制，从而促使粒子迅速返回内部区域（$1/\kappa^*_{\text{outer}} > 1$）。

5. 极限情形 *I*：无界外部区域中的快速扩散

为将上述模型与我们之前的工作 [4],联系起来，我们考虑无界外部区域中的快速扩散这一极限情形。我们假设外部区域始终接近其稳态，因为浓度 c_{out} 相对于系统中其他过程所设定的时间尺度能够快速达到平衡。因此，c_{out} 的时间导数为零，解满足拉普拉斯方程

$$\frac{\partial c_{\text{out}}}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c_{\text{out}}) \approx 0. \tag{16}$$

在这种情况下，我们可以将外部区域中本征函数的径向部分写为

$$f^{\text{out}}_{\ell}(r) = C_{\ell}\left(\frac{R}{r}\right)^{\ell+1} \tag{17}$$

其中，C_{ℓ} 是归一化常数，与下面的讨论无关。利用式（17）并聚焦于各向同性模态 $\ell = 0$；对于足够长的时间或径向对称的全 FRAP 实验，该模态占主导地位，界面处的边界条件为

$$D_{\text{in}}\partial_r f^{\text{in}}_{0n}|_{r=R} = -\frac{D_{\text{out}}}{R} f^{\text{out}}_{0n}(R), \tag{18}$$

$$-D_{\text{in}}\partial_r f^{\text{in}}_{0n}|_{r=R} = \kappa f^{\text{in}}_{0n}(R) + \frac{\kappa\Gamma R}{D_{\text{out}}} D_{\text{in}}\partial_r f^{\text{in}}_{0n}|_{r=R}. \tag{19}$$

将方程中的 $f^{\text{out}}_{0n}(R)$代入方程 (3)，即可得到方程 (18) (19)。整理方程 (19) 得

$$-D_{\text{in}}\partial_r f^{\text{in}}_{0n}|_{r=R} = \underbrace{\left(\frac{1}{\kappa} + \frac{R\Gamma}{D_{\text{out}}}\right)^{-1}}_{\kappa_{\text{eff}}} f^{\text{in}}_{0n}(R). \tag{20}$$

方程 (20) 对应于我们最近考虑的辐射边界条件 [4], ，其有效阻力为 $\kappa^{-1}{}_{\text{eff}} = \kappa^{-1} + \kappa^{-1}_{\text{outer}}$。将该阻力乘以$D_{\text{in}}/R$，即可得到其无量纲对应量；这一对应量已在上一节中引入。请注意，方程 (20) 中的表达式表示外部快速扩散极限下的有效阻力，此时 $D_{\text{out}} \gg D_{\text{in}}$ 和 $D^{\text{eff}}_{\text{out}} \to D_{\text{out}}$（见附录 C）。

6. 极限情形 *II*：界面阻力趋于零

为了将上述模型与先前关于单一界面上单 [10], 维扩散的研究联系起来，我们考虑极限 $\kappa \to \infty$。在这种情况下，界面不再是速率限制因素，且两种渗透率 $\kappa_{\text{in}\to\text{out}}$ 和$\kappa_{\text{out}\to\text{in}}$ 均趋于无穷大。然而，如果 $\kappa_{\text{in}\to\text{out}}/\kappa_{\text{out}\to\text{in}} \neq 1$，界面仍可保留反射偏置，这意味着粒子穿过界面后会立即返回其出发的一侧，从而可能被有效反射。我们回顾一下，由式 (3) 给出的界面通量为 $J = \kappa(c_{\text{in}}(R_-) - \Gamma c_{\text{out}}(R_+))$。由于该通量必须保持有限，$\kappa \to \infty$ 意味着

$$c_{\text{in}}(R_-) = \Gamma c_{\text{out}}(R_+). \tag{21}$$

这一边界条件此前已在一维情形 [10]中得到研究。它自然是我们在此考虑的模型的一个极限情形。

B. 半透球体的荧光漂白后恢复曲线

1. 积分半 *FRAP* 曲线

为了获得内部区域一半被漂白后漂白粒子的浓度，将上文推导的传播子与初始浓度 [20] 进行积分

$$c_0(x) = \begin{cases} \frac{1}{V_{\text{bleach}}} & \text{if } x \in \Omega_{\text{bleach}}, \\ 0 & \text{otherwise,} \end{cases}$$

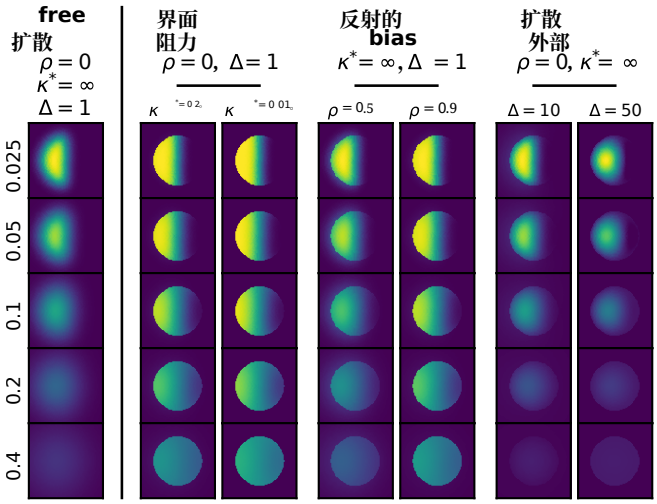


图 2：半漂白后不同时间点漂白粒子的空间分布。

根据式（22），使用所示的参数组合计算漂白粒子的空间分布。随着反射偏置 ρ 增大以及界面阻力 κ^{-1} 增大，漂白粒子在逃逸之前倾向于在内部区域停留更长时间。

其中，Ω_{bleach} 表示内域中被漂白的半区，V_{bleach} 表示其体积，因此得到：

$$\begin{aligned} c(x,t) &= \frac{1}{V_{\text{bleach}}} \int_{\Omega_{\text{bleach}}} G_t(x,x')\,dx' \\ &= \frac{3}{2\pi R^3} \sum_{\ell,n} e^{-\lambda_{\ell n} t} N_{\ell n} I_{\text{r},\ell n} A_\ell(\theta,\varphi) f_{\ell n}(r), \end{aligned} \tag{22}$$

其中，径向积分 $I_{\text{r},\ell n}$ 和角向投影$A_\ell(\theta,\varphi)$分别见式 (D1) 和式 (D3)。为获得积分恢复曲线，我们进一步分别对式 (22) 在漂白半区和未漂白半区上积分，得到

$$\begin{aligned} c_{\text{half,b}}(t) &= \frac{\Gamma V_{\text{bleach}}}{V_{\text{eff}}} + \frac{3}{2\pi R^3} \sum_{\substack{\ell,n \\ \lambda_{\ell n}>0}} e^{-\lambda_{\ell n} t} N_{\ell n}^2 I_{r,\ell n}^2 I_{\text{a},\ell}^{\text{b}}, \\ c_{\text{half,nb}}(t) &= \frac{\Gamma V_{\text{bleach}}}{V_{\text{eff}}} + \frac{3}{2\pi R^3} \sum_{\substack{\ell,n \\ \lambda_{\ell n}>0}} e^{-\lambda_{\ell n} t} N_{\ell n}^2 I_{r,\ell n}^2 I_{\text{a},\ell}^{\text{nb}}, \end{aligned} \tag{23}$$

其中角向积分 $I_{\text{a},\ell}^{\text{b}}$ 和 $I_{\text{a}}^{\text{nb}}{}_{,\ell}$ 分别见方程 (D4) 和方程 (D5)，有效体积则由 $V_{\text{eff}} = \Gamma V_{\text{in}} + V_{\text{out}}$给出。上述表达式中的第一项表示零模，它决定了平衡时的浓度；而对所有模式 $\ell \geq 0$ 和所有正特征值 $\lambda_{\ell n}$ 求和的部分则描述了系统的动力学。随后可通过以下方式得到两半球的 FRAP 曲线：

$$\begin{aligned} \text{FRAP}_{\text{half,b}}(t) &= 1 - c_{\text{half,b}}(t), \\ \text{FRAP}_{\text{half,nb}}(t) &= 1 - c_{\text{half,nb}}(t). \end{aligned} \tag{24}$$

请注意，这些表达式意味着信号覆盖整个半球，因为其轴向覆盖范围完整。使用不具备光学切片功能的显微镜时，情况正是如此。其他情形可通过对方程 (22) 采用不同的积分限，或考虑特定显微镜的点扩散函数来轻松描述。

2. 积分全 *FRAP* 曲线

为求得整个内部区域漂白后漂白粒子的浓度，将上述推导得到的传播子与初始浓度相乘后积分

$$c_0(x) = \begin{cases} \frac{1}{V_{\text{in}}} & \text{if } x \in \Omega_{\text{in}}, \\ 0 & \text{otherwise}, \end{cases}$$

得到：

$$\begin{aligned} c(x,t) &= \frac{1}{V_{\text{in}}} \int_{\Omega_{\text{in}}} G_t(x,x')\,dx' \\ &= \frac{3}{4\pi R^3} \sum_n e^{-\lambda_{0n} t} N_{0n} I_{\text{r},0n} f_{0n}(r), \end{aligned} \tag{25}$$

其中，径向积分 $I_{\text{r},\ 0n}$ 见式（D2）。请注意，所有 $\ell > 0$ 模态均消失，因此求和仅遍历各向同性模态 $\ell = 0$ 的正特征值 λ_{0n}。为获得积分后的恢复曲线，我们进一步对式（25）在整个内部区域上积分，得到

$$c_{\text{full}}(t) = \frac{\Gamma V_{\text{in}}}{V_{\text{eff}}} + \frac{3}{R^3} \sum_{\substack{n \\ \lambda_{0n}>0}} e^{-\lambda_{0n} t} N_{0n}^2 I_{r,0n}^2. \tag{26}$$

整个区域的 FRAP 曲线由此可得：

$$\text{FRAP}_{\text{full}}(t) = 1 - c_{\text{full}}(t). \tag{27}$$

式（23）–（27）和式（D4）–（D5）表明，可通过以下方式从半区荧光漂白恢复曲线得到全FRAP曲线：

$$\text{FRAP}_{\text{full}}(t) = \text{FRAP}_{\text{half,b}}(t) + \text{FRAP}_{\text{half,nb}}(t) - 1. \tag{28}$$

在自由扩散的极限下，Full-FRAP 的表达式可简化为以下闭式（附录 E）：

$$\text{FRAP}_{\text{full}}^{\text{free}}(t) = 1 - c_{\text{full}}^{\text{free}}\left(\frac{R}{\sqrt{Dt}}\right), \tag{29}$$

with

$$c_{\text{full}}^{\text{free}}(u) = \text{erf}(u) - \frac{1}{\sqrt{\pi}}\left[\left(\frac{3}{u} - \frac{2}{u^3}\right) - e^{-u^2}\left(\frac{1}{u} - \frac{2}{u^3}\right)\right]. \tag{30}$$

3. 半区荧光漂白恢复中的凹陷深度

我们此前曾提出使用凹陷深度作为无模型读出，以评估粒子穿过界面进行交换的难易程度 [4]，其定义为

$$\text{dip depth} = 1 - \min\left(\text{FRAP}_{\text{half,nb}}(t)\right). \tag{31}$$

在荧光漂白后恢复$_{\text{half, nb}}(t)$的局部最小值处，其时间导数为零：

$$\begin{aligned}\partial_t \text{FRAP}_{\text{half,nb}}(t) &= -\partial_t \int_{\Omega_{\text{nb}}} c(x,t)dx \\ &= -\int_{\Omega_{\text{nb}}} \partial_t c(x,t)dx = -\int_{\Omega_{\text{nb}}} D_{\text{in}}\Delta c(x,t)dx = 0.\end{aligned} \tag{32}$$

这里，Ω_{nb} 表示未漂白半区，而 $c(x,\ t)$表示该半区中的浓度。最后一步用到了内球的扩散方程 (1)。利用散度定理，式 (32) 可写为

$$\begin{aligned}\partial_t \text{FRAP}_{\text{half,nb}}(t) &= -\int_{\Sigma_{\text{inner}}} D_{\text{in}}\partial_r c(x,t)d\sigma \\ &- \int_{\Sigma_{\text{interface}}} D_{\text{in}}\partial_r c(x,t)d\sigma = J_{\text{mix}} + J_{\text{interface}}.\end{aligned} \tag{33}$$

第一个积分表示通量 J_{mix} ，它穿过将内部区域两半彼此分开的圆形区域。第二个积分表示通量 $J_{\text{interface}}$ ，它穿过内部区域未漂白半区与周围区域之间的界面。Σ_{inner} 和 $\Sigma_{\text{interface}}$ 分别表示相应的表面。在荧光漂白后恢复$_{\text{half, nb}}$的局部最小值处，从漂白半区流入的漂白粒子数量等于穿过界面流出的漂白粒子数量。穿过界面的通量越小，漂白后达到局部最小值所需的时间就越长，而且该最小值也越小，因为在达到通量平衡之前，会有更多漂白粒子进入未漂白半区。因此，如果通过增大界面阻力或外部区域的阻力，越来越多地抑制粒子从内部区域逸出，凹陷深度就会增大。下一节将定量评估凹陷深度与不同模型参数之间的关系。

C. 界面性质和扩散系数对半 FRAP 曲线的影响

我们使用上述方程绘制了不同参数组合下的积分半 FRAP 曲线。我们从自由扩散情形开始，$\Gamma = 1$、$\rho = 0$、$\Delta = 1$和 $\kappa \to \infty$，并一次只改变一个参数（图 3）。随着 ρ增加，使界面偏向从内部具有更高反射率，或者当界面的无量纲渗透率

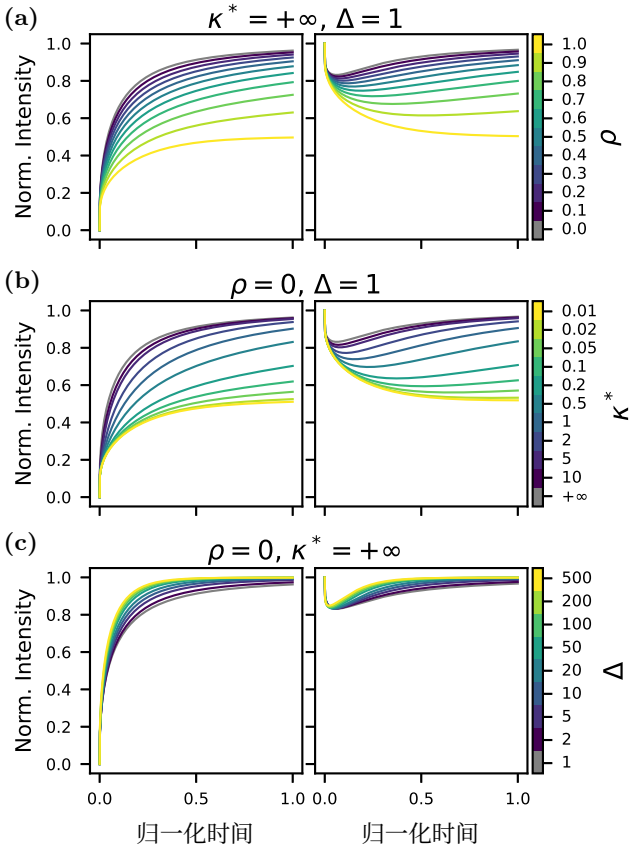


图 3：不同参数组合下的积分半 FRAP 曲线。

(a) 增大界面的反射偏置 ρ 会减慢漂白半区的恢复，并增加未漂白半区的凹陷深度。(b) 增大界面阻力 κ^{-1} 会产生与增大反射偏置相似的影响。(c) 扩散系数比 Δ 的影响较弱，增大 Δ 会使系统更快恢复至平衡态。所有曲线均针对 $L/R = 100$绘制。

通过降低 κ^*，漂白半区中的恢复会变慢，而未漂白半区中的凹陷会加深。随着 Δ增大，可以观察到两半区都更快地恢复至平衡态。接下来，我们量化了不同参数组合下的凹陷深度（图 4）。凹陷深度随 ρ 增大、 κ^*减小而增加；而在参数范围 $\Delta \geq 1$内，扩散系数比 Δ 的影响较小，这对应于生物分子凝聚体的常见情况，即其黏度高于周围介质 [21]。将凹陷深度相对于式 (12) 中定义的内部混合程度 M 作图时，我们观察到数据近似塌缩为一条单调递增的主曲线（图 5）。因此，凹陷深度可直接反映内部混合程度。需要指出的是，凹陷深度的实际数值取决于成像和漂白方式；此处展示的关系对应于未采用光学切片、且漂白剖面呈阶跃状的显微成像设置。

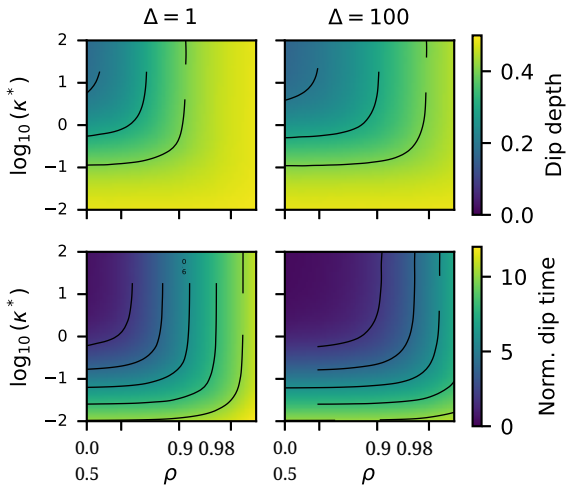


图 4：凹陷深度和归一化凹陷时间。不同反射偏置 ρ、界面阻力 $1/\kappa^*$ 和扩散系数比 Δ组合下凹陷的定量分析。凹陷深度对应于未漂白半区恢复曲线的最小值，而归一化凹陷时间则是达到凹陷时的归一化时间。 ρ 的坐标轴采用反双曲正切变换进行缩放。

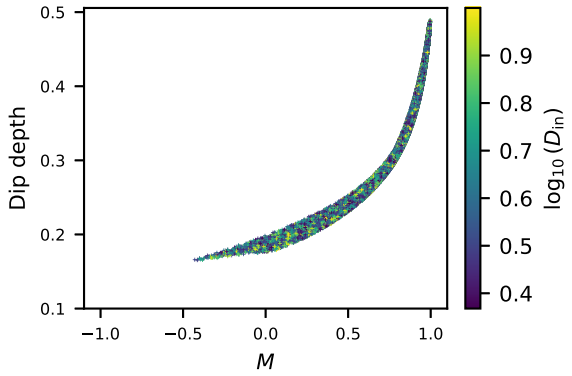


图 5：凹陷深度与内部混合的关系。未漂白半区中观察到的凹陷深度量化了内部区域内的内部混合程度，且与 D_{in} 无关。请注意，此处考虑的恢复曲线意味着使用不具备光学切片功能的显微镜，并假设漂白剖面呈阶跃状。

D. 积分曲线的信息含量

式 (22) 和 (25) 给出的浓度时空演化，比式 (23) 和 (26) 中的积分恢复曲线更详细地描述了扩散过程。尽管如此，积分曲线仍常用于表征荧光恢复，因为分析这些曲线的计算成本较低。检查图 3a、b、图 4 和图 5 可知，ρ 和 κ^* 的变化会对曲线整体形状、凹陷时间和凹陷深度产生定性上相似的影响。这一观察自然引出一个问题：能否仅凭积分曲线唯一确定这些参数？为回答这一问题，我们尝试分析曲线所包含的信息，从而阐明模型参数的可辨识性。

1. 费 *Fisher* 信息

我们考虑参数向量 $\theta = (\kappa^*,\ \rho,\ \Delta,\ D_{\text{in}})$，它应当从积分完整 FRAP 曲线 $S_{\text{full}}(\theta) \in \mathbb{R}^N$ 或一组积分半 FRAP 曲线 $S_{\text{half}}(\theta) \in \mathbb{R}^{2N}$ 中推断得出；该曲线组包含一条对应漂白半区的曲线和一条对应未漂白半区的曲线。这里，N 表示时间点的数量。下文中，S 可以表示 S_{full} 或 S_{half}。从观测 $S(\theta)$中恢复参数 θ 的能力取决于映射 S_{full} 和 S_{half} 是否具有单射性。如果两组参数 $\theta \neq \theta'$ 映射到同一条曲线 $S(\theta) = S(\theta')$，则模型不可辨识，参数也无法唯一确定。对于含噪观测，情况则更为微妙在含噪观测的情况下。此时，可以通过 Fisher 信息矩阵（FIM）评估局部参数可辨识性，该矩阵量化了观测对参数扰动的敏感度。对于一个带有方差为 σ^2 的加性高斯噪声的确定性模型 $S(\theta)$，FIM 定义如下：

$$\text{FI}(\theta) = \frac{1}{\sigma^2} J_S(\theta)^T J_S(\theta). \tag{34}$$

这里，J_S 是雅可比矩阵，其元素为 $[J_S]_{ij} = \frac{\partial S_i}{\partial \theta_j}$。

如果最小特征值 $\lambda_{\min}(\text{FI}(\theta)) = 0$，则参数向量 θ 在局部不可辨识，因为存在一个方向 $v \in \mathbb{R}^4$，使得 $S(\theta + \epsilon v) = S(\theta) + o(\epsilon)$，从而导致这些参数无法区分。对于 θ 的任何无偏估计量 $\hat{\theta}$，其协方差满足克拉美–罗界

$$\text{Cov}(\hat{\theta}) \succeq \text{FI}(\theta)^{-1}, \tag{35}$$

其中，$\succeq$ 表示半正定序，且 FI(θ) 非奇异。这意味着，对 θ 的估计不确定性下限由逆费 Fisher 信息矩阵给出。协方差矩阵的特征值直接决定参数估计值的精度：特征值越大，对应的参数方向就越难辨识。

为了直观展示参数空间中的可辨识性，我们构建了“可辨识性图”，用于呈现由费 Fisher 信息矩阵（FIM）导出的标量度量。假设映射 S 是单射，那么就可以根据无噪声测量 $S(\theta)$精确恢复任意参数集 θ，并构造参数的无偏估计量。协方差矩阵对角线元素的平方根，即为每个参数通过最佳无偏估计量可达到的标准差（σ_{κ^*}，σ_ρ，σ_Δ，$\sigma_{D_{\text{in}}}$）。由于参数 κ^*、Δ 和 D_{in} 的取值可能相差几个数量级，我们在图 6a 中绘制了相对标准差。当 $\rho \to 1$时，界面变得不可渗透，导致积分恢复曲线的形状发生显著变化。

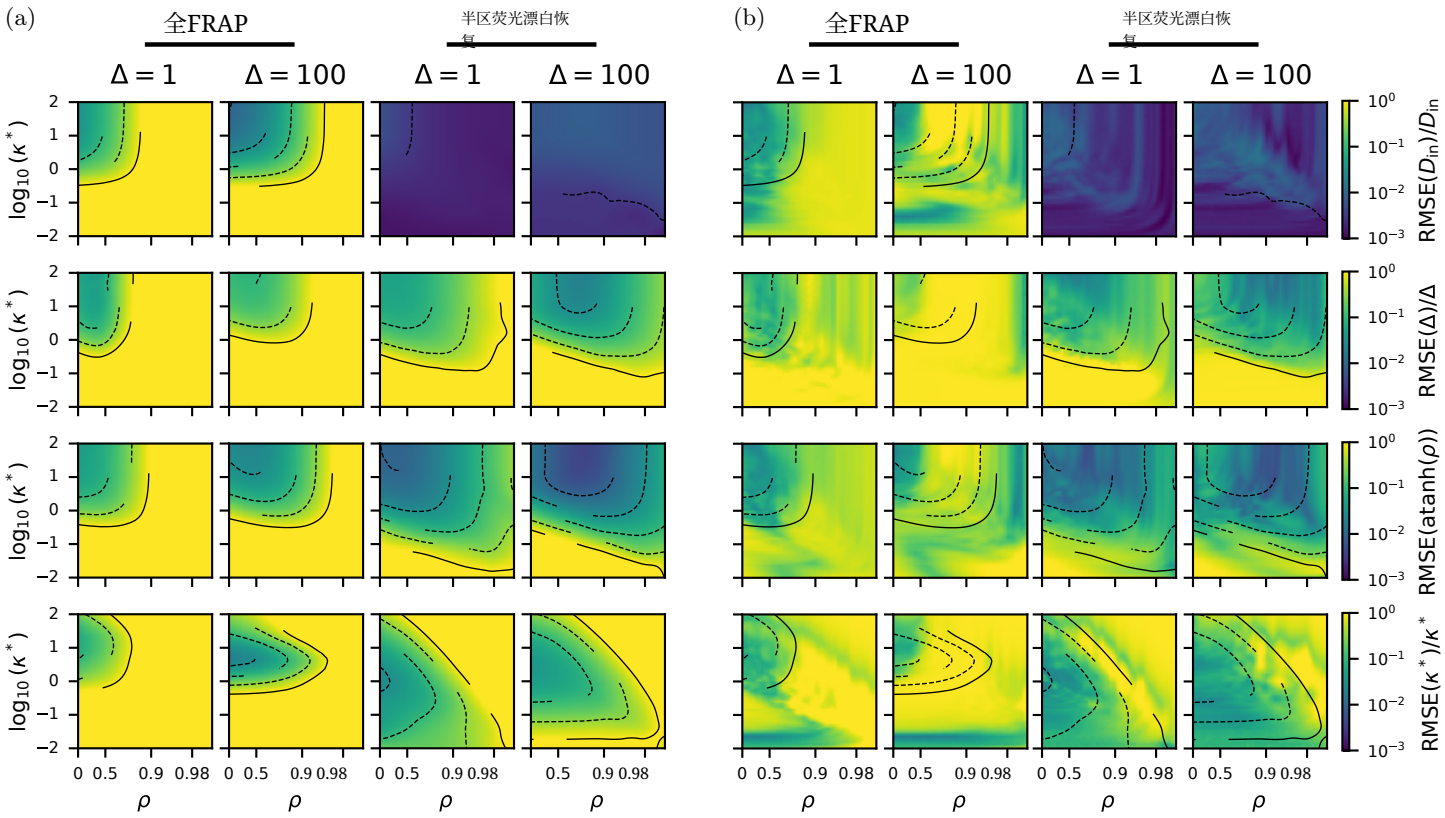


图 6：积分恢复曲线的信息含量与参数可辨识性。比较基于费 Fisher 信息评估的局部参数可辨识性 (a)，以及通过多层感知器评估的实际参数可辨识性 (b)。结果展示了使用 $0.1\,s^{-1}$ D_{in}/R^2 $\sigma = 10^{-2}$ 和噪声水平 . 生成的全FRAP和半 FRAP 曲线。蓝色/绿色区域表示参数具有良好的可辨识性。面板 b 中的等值线对应于面板 a 中的等值线（绘制用于比较）。 ρ 的坐标轴采用反双曲正切变换缩放。

积分恢复曲线的形状。为了更精细地捕捉这一转变，我们绘制 arctanh(ρ) 而非ρ，这会展开 $\rho = 1$ 附近的参数空间，并使 Fisher 信息度量更加均匀。

我们计算了积分恢复曲线 S_{full} 和 S_{half}，总时长为 120 秒，帧率为每秒 25 帧，因此每条曲线共包含 $N = 3000$个时间点。由于 D_{in} 和 R 只会按上述方式缩放积分 FRAP 曲线，因此我们将$D_{\text{in}} = 0.1$ 固定为微米²/秒，将 $R = 1$ 固定为微米。雅可比矩阵J_S 使用经过优化步长的中心有限差分计算。我们为全FRAP曲线设定噪声水平 $\sigma_{\text{full}} = 10^{-2}$，与实验中观察到的数量级相当；为半 FRAP 曲线设定更高的噪声水平 $\sigma_{\text{half}} = \sqrt{2} \cdot 10^{-2}$，这是因为半 FRAP 曲线的平均像素数只有全 FRAP 曲线的一半。

图 6a 显示了参数空间中由协方差矩阵得出的相对标准差。 10^{-2} 表示参数可以以 1% 的相对误差恢复，而大于 1（10^0）则表示相对误差超过 100%。请注意，这些数值对应于理想化情形，因为它们假设正向模型 $S(\theta)$ 与现实完全一致。不过，它们仍提供了以下见解：

•尽管噪声水平较高，半区荧光漂白恢复曲线的信息量仍高于全 FRAP 曲线，且可辨识区域更大。

•全 FRAP 和半区荧光漂白恢复的可辨识性图均显示，从左上角延伸出一个区域，在该区域内可以恢复全部四个参数。该区域对应的界面有效阻力相对较低。

• 采用半区荧光漂白恢复，只要适当选择帧率和实验时长，就能在整个参数空间内恢复内部扩散系数 $D_{\text{于}}$。对于全FRAP， $D_{\text{于}}$只能在参数空间中有效阻力较低的小范围内恢复，这反映了全FRAP对内部混合的敏感性较差。

2. 神经网络恢复

为验证上述费 Fisher 信息分析，我们训练了一个神经网络，将含噪恢复曲线映射到相应的参数。我们通过从以下范围随机抽取参数，生成了 L =100 000 条合成全幅和半幅 FRAP 曲线：$\kappa^* \in [10^{-2}, 10^2]$、 $\rho \in [0,1]$、 $\Delta \in [1,100]$和 $D_{\mathrm{in}} \in [10^{-2}, 1]$ 微米²/秒。 ρ采用均匀分布，其他参数则采用对数均匀分布，以确保在多个数量级范围内均得到充分采样。对于每组参数，我们使用上述推导的方程计算相应的全FRAP和半区荧光漂白恢复曲线。

我们使用了一个简单的多层感知器（MLP）来推断这四个参数。我们没有将完整的离散恢复曲线作为输入，而是将其投影到从 $\mathbb{R}^N$ 中的 L 条采样曲线提取出的前 $Q = 64$ 个主成分上。这种表示方式使结果基本不受时间离散化的影响，并增强了对噪声的稳定性。因此，MLP 可以看作一个函数 M_w： $\mathbb{R}^Q \to \mathbb{R}^4$，由权重 w 参数化。在我们的实现中，使用了一个包含 $|w| = 2.7 \cdot 10^6$ 个参数的过参数化网络。网络通过求解以下问题进行训练：

$$\inf_w \mathbb{E} \sum_{i=1}^{L} \left[\mathrm{loss}(M_w(\Pi_Q(S_i + e)), \theta_i) \right], \tag{36}$$

其中， θ_i 是用于生成曲线 S_i 的参数， $e \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2 \mathrm{I}_N)$ 是加性白高斯噪声，Π_Q： $\mathbb{R}^N \to \mathbb{R}^Q$ 是作用于前 Q 个主成分的投影算子，期望是针对加性噪声求取的。损失函数定义为 κ、 Δ 和 D_{in} 的相对误差之和，以及 ρ 的绝对误差：

$$\mathrm{loss}(\hat{\theta}, \theta) = \frac{|\widehat{D_{\mathrm{in}}} - D_{\mathrm{in}}|}{|D_{\mathrm{in}}|} + \frac{|\widehat{\Delta} - \Delta|}{|\Delta|} + \frac{|\widehat{\kappa^*} - \kappa^*|}{|\kappa^*|} + |\hat{\rho} - \rho|. \tag{37}$$

网络估计可能存在偏差。为了评估其估计精度，并将其与无偏估计量的估计精度进行比较（后者通过图 6a 中的费 Fisher 信息进行评估），我们考察均方根误差 RMSE $= \sqrt{\text{偏差}^2 + \text{方差}}$，其中偏差和方差通过对噪声 e 进行 1000 次蒙特卡洛抽样来估计，噪声的标准差为 $\sigma = 10^{-2}$（全FRAP）和 $\sigma = \sqrt{2} \cdot 10^{-2}$（半区荧光漂白恢复）。抽样对象为$M_w(S_i + e)$。

估计误差如图 6b 所示。图中的曲线与图 6a 中的相似，说明训练后的多层感知机几乎可以复现最小方差估计量。在参数空间的某些区域，网络甚至优于最佳无偏估计量；这看似出乎意料，但可以用偏差-方差权衡来解释：作为有偏估计量，网络在局部可能实现更低的均方根误差，即使费 Fisher 信息较低也是如此。同样，我们看到，基于半 FRAP 曲线的预测总体上优于基于全FRAP 的预测。本节结果表明，通过使用理论恢复曲线训练神经网络，可以构建实用且近乎最优的估计量。

E. 非球形凝聚体中的相分离颗粒与半透球形区域中的非相互作用粒子之间的映射

以上各节研究的模型考虑了存在半透界面时非相互作用粒子的扩散。然而，许多生物分子凝聚体被认为是由吸引性分子间相互作用驱动的缔合相分离形成的。为了将上述模型中使用的参数映射到这类系统中的参数，我们考虑一种黏性聚合物模型，该模型已用于描述不同类型的凝聚体 [22–24], ，包括由聚电解质形成的复凝聚体 [23] ；我们将在下文对其进行实验研究。相分离分子被表示为含有黏性斑块的聚合物，这些斑块能够彼此相互作用。对于静电相互作用，相互作用能由汤川势给出：

$$\frac{E}{kT} = -n \frac{z^2 l_{\mathrm{B}}}{d} e^{-d/l_{\mathrm{D}}} \approx -n z^2 l_{\mathrm{B}} \left(\frac{1}{d} - \frac{1}{l_{\mathrm{D}}} \right). \tag{38}$$

这里， kT是热能， z 是每个黏性斑块的电荷价数， d 是斑块之间的有效接触间距， n表示每次重排过程中交换的离子对数量， [23, 25], 、 l_{B} 和 l_{D} 分别是比耶鲁姆长度和德拜长度，其表达式为

$$l_{\mathrm{B}} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_{\mathrm{r}} kT}, \tag{39}$$

$$l_{\mathrm{D}} = \frac{1}{\sqrt{8 N_{\mathrm{A}} l_{\mathrm{B}} I(c_{\mathrm{salt}})}}. \tag{40}$$

这里， e是元电荷， ϵ_0 是真空介电常数， ϵ_{r} 是溶液的相对介电常数，N_{A} 是阿伏伽德罗常数， I（c_{salt}）是盐浓度为 c_{salt}时的离子强度。对于我们在下文使用的氯化镁这类二价盐， I（c_{salt}）$= 3c_{\mathrm{salt}}$ （其中c_{salt} 以 mmol/l 为单位）。根据这一描述，凝聚体的黏度可写为 [23, 24]

$$\eta(E) = \eta_0 e^{-E/kT}. \tag{41}$$

请注意，若分子间相互作用具有吸引性，则相互作用能 E 为负，因此黏度会随吸引相互作用的强度增加。方程（41）表明，黏度取决于单个黏性斑块的结合能，因为应力松弛是通过单个聚合物链段的重排实现的。通常预期扩散系数与黏度成反比。具体而言，可以设想不同的扩散机制，

这些机制被称为“行走”和“跳跃”[26]。在第一种情况下，聚合物通过扩散时依次断开并重新形成单个黏性斑块之间的相互作用，从而“行走”穿过凝聚体。在第二种情况下，聚合物通过同时断开多个黏性斑块之间的相互作用，迅速扩散一段距离，然后重新形成已断开的相互作用，从而“跳跃”穿过凝聚体。为兼顾这两种可能性，我们在能量项中乘以一个额外参数 N_η；对于“行走”，该参数等于 $N_\eta = 1$ ，对于“跳跃”，则等于 $N_\eta > 1$ 。由此得到凝聚体内部扩散系数的表达式：

$$D_{\mathrm{in}}(E) = D_0 e^{N_\eta E/kT}. \tag{42}$$

假设凝聚体外部的 $D_{\mathrm{out}} = D_0$ ，我们得到扩散系数比 Δ 的以下表达式：

$$\Delta(E) = \frac{D_{\mathrm{out}}}{D_{\mathrm{in}}(E)} = e^{-N_\eta E/kT}. \tag{43}$$

因此，预计 Δ 大于 1，并且会随着相分离分子之间吸引相互作用的强度增加。黏性聚合物模型中的分配系数可写为

$$\Gamma(E) = e^{-\Delta\mu/kT}, \tag{44}$$

其中 $\Delta\mu = \mu_{\mathrm{in}} - \mu_{\mathrm{out}}$ 表示凝聚体内部与外部化学势之差。假设每个相分离分子对化学势的贡献为 N_Γ 个黏性斑块的相互作用能，这意味着将该分子从稀相转移到浓相会使黏性斑块之间额外产生 N_Γ个相互作用，则式（44）变为

$$\Gamma(E) = \Gamma_0 e^{-N_\Gamma E/kT}. \tag{45}$$

为简单起见，我们没有明确考虑相分离分子或反离子的熵贡献。根据式（45），预计 Γ会随着相分离分子之间吸引相互作用的强度增加。此外，由于相分离支架分子在凝聚体中富集， Γ大于 1。利用式（11）、式（43）和式（45），界面的反射偏置为

$$\rho(E) = \frac{\Gamma_0 e^{-E(N_\Gamma - \frac{1}{2}N_\eta)/kT} - 1}{\Gamma_0 e^{-E(N_\Gamma - \frac{1}{2}N_\eta)/kT} + 1}. \tag{46}$$

对于 $\Gamma_0 \geq 1$ 和 $N_\Gamma \geq N_\eta/2$，反射偏置大于或等于零，这意味着界面从内部看比从外部看具有更强的反射性。对于 $E \to -\infty$，反射偏置趋近于 1，这意味着界面从内部看变得完全反射。

界面阻力与分子间相互作用能之间的关系尚不明朗，因为可以设想不同的微观情形。例如，界面阻力可能源于粒子在界面处必须跨越的额外能垒，也可能源于界面处的迁移率最低点[9]。这些现象可能受到界面处长程静电效应的影响 [27, 28], ，而根据本文所考虑的简单模型，很难对此作出准确预测。

我们得出结论：当上述扩散模型用于描述缔合相分离时，其中用于非相互作用粒子的参数彼此并非独立，且只有参数空间的一部分与该情形相关。对于本文考虑的黏性聚合物模型，相应的参数空间为 $\Delta \geq 1$、 $\Gamma \geq 1$ 和 $\rho \geq 0$，而 κ 可以取任意正值。我们注意到，如果采用其他微观模型（例如考虑排斥相互作用，或考虑相分离分子在各相中的构象变化），相关参数空间以及连接不同参数的具体表达式可能会发生变化。

F. PLL-HA复凝聚体的界面性质与内部混合

我们将上述建立的理论框架应用于由聚赖氨酸（PLL）和透明质酸（HA）形成的复凝聚体。PLL-HA 是一种可调控的模型体系，可用于研究相分离的生物分子凝聚体 [4, 29, 30]。具体而言，在 PLL-HA 体系中，可通过添加盐来调节分子间相互作用强度；盐会屏蔽带正电的 PLL 分子与带负电的 HA 分子之间的静电相互作用。式（38）中相互作用能对盐的依赖性通过德拜长度体现，而德拜长度与$1/\sqrt{c_{\mathrm{salt}}}$成正比。如下面所述，我们通过校准后的荧光显微成像实验测量了 PLL-HA 复凝聚体的盐依赖性分配系数 Γ ，并通过荧光相关光谱（FCS）测量了扩散系数比 Δ，由此确定其界面的反射偏置。随后，我们结合已知的 Γ 和 Δ ，采用定量半区荧光漂白恢复（half-FRAP）确定界面阻力，从而全面描述分子跨越复凝聚体界面的传输过程。

1. PLL-HA 凝聚层复凝聚体界面的反射偏置

我们首先根据共聚焦显微图像，尝试确定不同盐浓度下 PLL-HA 凝聚层的平衡分配系数 Γ。我们对不同浓度的 Atto647-PLL 溶液进行成像，以建立荧光强度与浓度之间的关系。与预期一致，在低浓度下二者呈线性关系，而在较高浓度下则呈非线性，可能是由于猝灭效应（图7a）。

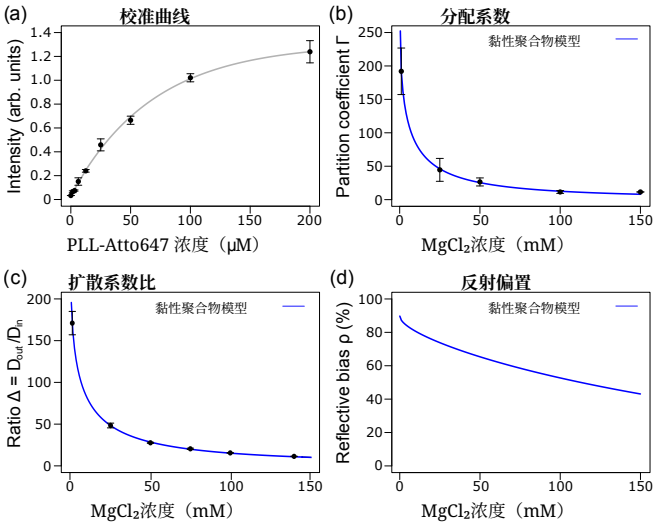


图7：不同盐浓度下 PLL-HA 复凝聚体的分配系数和扩散系数比。

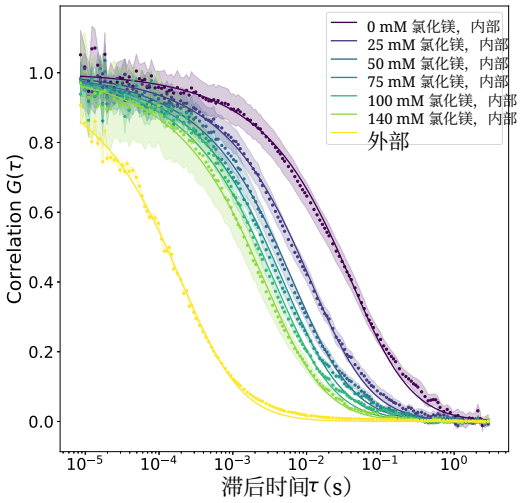


图8：PLL-HA 复凝聚体内部及外部的荧光相关光谱。

（a）显微图像中荧光强度与 PLL-Atto647 浓度之间的校准曲线。（b）通过分析 PLL-HA 复凝聚体的显微图像得到的分配系数 Γ （黑色）。蓝线表示根据公式（45）进行的拟合。（c）在复凝聚体中心及其外部进行荧光相关光谱测量得到的扩散系数比。蓝线表示根据公式（43）进行的拟合。（d）根据前面各图中的分配系数和扩散系数比得到的反射偏置 ρ 。

随后，我们利用该校准曲线将复凝聚体内部和外部的荧光强度转换为浓度，从而得到图7b所示的分配系数。与式（45）的预测一致，随着盐浓度升高，分配系数降低；这是因为静电相互作用逐渐受到屏蔽，由去混合产生的熵代价因而较难得到补偿，浓缩在复凝聚体中的分子也随之减少。接下来，我们尝试测定不同盐浓度下 PLL-HA 复凝聚体外部与内部的扩散系数比。为此，我们在复凝聚体中心及其外部进行了荧光相关光谱测量（图8）。两项测量均在远离复凝聚体界面的位置进行，以尽可能减少粒子与界面相遇所带来的潜在影响。所得自相关曲线可用式（F2）中的扩散模型充分拟合。与式（43）的预测一致，随着盐浓度升高，扩散系数比 Δ 降低（图7c），这是因为复凝聚体中增加分子间摩擦的静电相互作用逐渐受到屏蔽。我们采用上述黏性聚合物模型的预测，对测得的分配系数和扩散系数比进行全局拟合（图7b、c中的蓝线），拟合效果良好，且.....

所示条件下 PLL-HA 凝聚体的自相关曲线。根据拟合得到的表观粒子数 N 对曲线进行了归一化。实线为公式（F2）中扩散模型的拟合结果。

能量 $N_\Gamma E \sim -5.5\,kT$ （不存在氯化镁$_2$时）以及 $N_\eta \sim N_\Gamma$。确定不同盐浓度下 PLL-HA 复凝聚体的分配系数和扩散系数之比后，我们推导出了界面的反射偏置 ρ （图7d）以及两侧的有效反射率。在不存在氯化镁$_2$ 时，反射偏置为 $\rho \sim 90\%$，这意味着从内部接触界面的粒子比从外部接触界面的粒子更容易被反射。随着盐浓度增加， ρ 降低，在氯化镁$_2$浓度为 150 mM 时达到约 50%。这些结果表明，PLL-HA 复凝聚体的界面具有显著的反射偏置，优先反射来自内部的粒子。附录 B 中定义的有效反射率 ρ_{in} 和 ρ_{out} 列于表 I。它们量化了界面传输不受扩散限制时，即满足 $1/\kappa^* \gg 1$时，入射通量中被反射的比例，同时计入直接反射和反复发生的透射—返回事件。不存在氯化镁$_2$, 时，来自内部的有效反射率为 $\rho_{\text{in}} \sim 94\%$，而来自外部的有效反射率为 $\rho_{\text{out}} \sim 6\%$。氯化镁$_2$浓度为 150 mM 时， $\rho_{\text{in}} \sim 77\%$ 和$\rho_{\text{out}} \sim 23\%$。这些数值表明，从内部接触界面的通量中有相当大一部分会被有效反射，从而抑制粒子逃逸，延长粒子在复凝聚体内的滞留时间。

*2. PLL-HA*复凝聚体的界面阻力

接下来，我们试图通过半区荧光漂白恢复实验测定 PLL-HA复凝聚体的界面阻力。

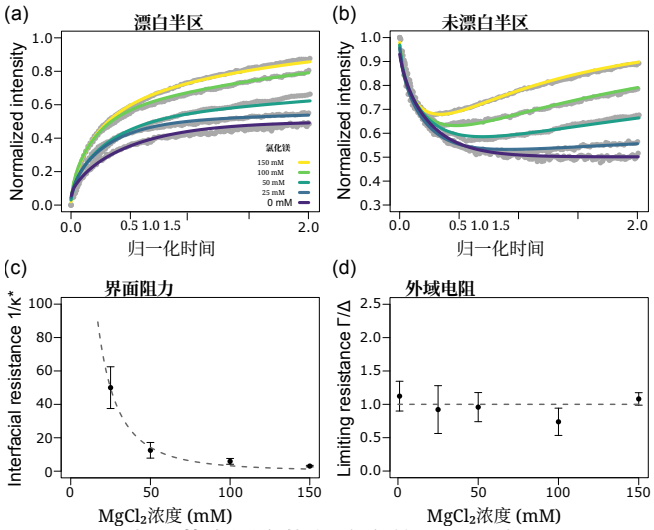


图9：通过半区荧光漂白恢复确定的界面阻力(a,b) PLL-HA复凝聚体的半 FRAP 曲线，并用上述理论模型进行拟合。相应的拟合结果见表 I。(c) 根据前面各图中的半区荧光漂白恢复拟合得到的无量纲界面阻力$1/\kappa^* = D_{\rm in}/\kappa R$。虚线表示指数衰减，其中相互作用能固定为根据图7和 $N_\kappa \sim 2.5N_\Gamma$中的拟合结果所获得的数值。(d) 准稳态极限下外部区域的无量纲阻力。

为此，我们制备了不同氯化镁$_2$ 浓度下的 PLL-HA 复凝聚体，并加入少量荧光标记PLL-FITC进行标记。随后，我们漂白了复凝聚体的一半，并使用上述推导的模型拟合恢复曲线（图9a、b），同时将分配系数 Γ 和扩散系数比 Δ 固定为上述测得的数值（图7）。我们对漂白半区和未漂白半区的曲线进行全局拟合，两者采用相同的 κ^*值，但允许扩散时间 $\tau_{\rm D}$不同，以考虑实际漂白的复凝聚体可能并非恰好一半，因而扩散时间可能略有差异。我们没有将扩散时间换算为绝对扩散系数 $D_{\rm in}$，因为这并非半区荧光漂白恢复实验的目的，而且通常难以做到 [31, 32]。请注意，界面阻力与恢复曲线的形状有关，而该形状不受通过 $D_{\rm in}$ 对时间轴进行缩放的影响（见第II A 3节和第II B 3节）。 $1/\kappa^*$ 的拟合结果绘于图9c。无量纲界面阻力随盐浓度升高而降低，这与以下解释一致：它源于复凝聚体中分子形成的静电相互作用。我们用以下形式的指数函数拟合了无量纲界面阻力

$$\frac{1}{\kappa^*(E)} = \frac{1}{\kappa_0^*} e^{-N_\kappa E/kT}, \tag{47}$$

其中我们使用了上文确定的关系 $N_\eta E \sim -5.5\,kT$，从而能够估算.....之间的比值

N_κ 和 N_η。我们用 $N_\kappa \sim 2.5N_\eta$和 $1/\kappa_0^* \sim 0.005$拟合得很好（图 9c 中的虚线），这表明，穿过界面的分子必须克服一个有效能垒，其高度约为与凝聚体内扩散“跳跃”相关的能垒 $N_\eta E$，或分子处于凝聚体中与处于稀相中的能量差 $N_\Gamma E$ 的 2.5 倍。这个能垒可能源于一种瞬态状态：在这种状态下，分子建立的静电相互作用少于其在任一相中的平均水平；也可能源于界面处非均匀环境所带来的静电约束，例如界面电场 [27, 28]。

为了更好地理解无量纲界面阻力 $1/\kappa^*$ 的数值，我们计算了稳态极限下的无量纲外域阻力 $1/\kappa^*_{\rm outer}$ 。该阻力反映了内部区域中的扩散混合与外部区域中的扩散逃逸之间的比较。如图 9d 所示， $1/\kappa^*_{\rm outer}$ 小于界面阻力，且与盐浓度无关，这表明粒子从PLL-HA复凝聚体中逃逸主要受界面阻力限制，而非外部区域的阻力，尤其是在氯化镁$_2$ 浓度较低时。我们还计算了内部混合程度 M 和有效阻力 $1/\kappa^*_{\rm eff} = 1/\kappa^* + /\kappa^*_{\rm outer}$，后者表示粒子逃逸前大致在内部区域中进行多少轮探索（表 I）。我们发现，在所有氯化镁$_2$ 浓度下，复凝聚体都表现出优先内部混合， $M \geq 80\%$。在没有氯化镁$_2$, 的情况下，粒子平均探索内部区域 ≥ 200次后逃逸。在存在150 mM氯化镁$_2$, 时，它们探索该区域 ~ 4次。因此，优先内部混合表现出显著的盐依赖性：低盐浓度下、处于两相区深处的复凝聚体强烈倾向于内部混合，而靠近共存线的复凝聚体则

参数 \ 氯化镁$_2$	0 mM	25 毫摩尔/升	50 毫摩尔/升	100 毫摩尔/升	150 毫摩尔/升
Γ	192 ± 35	45 ± 17	26 ± 6	11 ± 2	11 ± 1
Δ	171 ± 14	48 ± 3	28 ± 1	16 ± 3	11 ± 1
$1/\kappa^*$	≥ 200	50 ± 13	13 ± 5	6 ± 2	3 ± 1
ρ (%)	88 ± 2	74 ± 9	66 ± 7	46 ± 8	54 ± 4
$\rho_{\rm in}$ (%)	94 ± 1	87 ± 4	83 ± 3	73 ± 4	77 ± 2
$\rho_{\rm out}$ (%)	6 ± 1	13 ± 4	17 ± 3	27 ± 4	23 ± 2
M (%)	≥ 99	99 ± 1	97 ± 4	93 ± 7	87 ± 8
探索	≥ 200	51 ± 13	14 ± 5	7 ± 2	4 ± 1

表 I：PLL-HA 复凝聚体的界面性质通过结合荧光显微成像、荧光相关光谱和半区荧光漂白恢复，确定了描述 PLL-HA 复凝聚体界面的参数。在没有 MgCl$_2$, 的情况下，只能确定 κ^* 的上限。最后一行表示粒子在逃逸前通常会在内部区域进行多少轮扩散探索。

单相和两相区域对内部混合的偏好较弱。这种差异对目标搜索过程有深远影响，因为粒子对复凝聚体内部的探索可能较为彻底，也可能不那么彻底。此外，强烈偏好内部混合会形成一个准孤立的粒子池，其中的粒子会反复回到相同位置，因此可以对这一粒子池进行选择性区分，例如通过寿命短于逃逸时间的瞬时化学修饰。将内部混合与交换的时间尺度分开，可为调节该系统的生化性质和动力学性质提供一种物理手段。

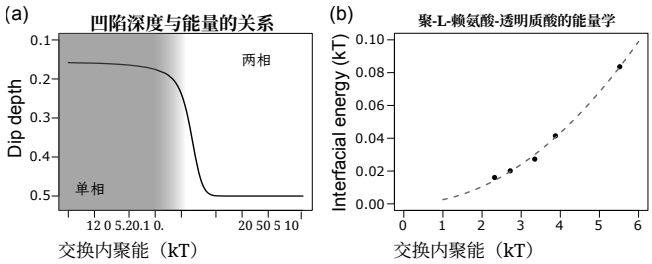


图10：凹陷深度与能量学之间的联系(a) 根据 Γ、 Δ、 κ^* 与交换内聚能之间的关系计算得出的理论凹陷深度。灰色区域表示未观察到 PLL-HA复凝聚体的单相区。凹陷深度是针对不进行光学切片且漂白剖面呈阶跃状的显微镜计算得出的。(b) 本研究测定的不同氯化镁$_2$ 浓度下 PLL-HA复凝聚体的交换内聚能，与此前测定的表观界面能 [4]进行对比。

G. 分子间相互作用能与凹陷深度之间的联系

在确定 PLL-HA 复凝聚体的分配系数 Γ、扩散系数比 Δ 和无量纲界面阻力 $1/\kappa^*$ 的盐依赖性后，我们重新探讨了凹陷深度与 PLL-HA 体系能量学之间的联系。利用式（45）中的 $\Gamma(E)$、式（43）中的 $\Delta(E)$ 以及式（47）中的$1/\kappa^*(E)$的表达式，我们绘制了理论凹陷深度随交换内聚能 $N_\Gamma E$ 变化的曲线；交换内聚能对应于凝聚体中的分子与稀相中的分子之间的能量差（图10a）。我们得到了 S 形关系，这与此前绘制凹陷深度相对于表观界面能[4]的变化时观察到的关系相似。拐点出现在交换内聚能为 $\sim 2.5\,kT$ 时，而对应的表观界面能要小得多，仅为 $\sim 0.03\,kT$ [4]。利用此前测得的 PLL-HA 体系表观界面能，绘制两种能量之间的关系后发现，它们近似呈二次关系，后者比交换内聚能小约两个数量级（图10b）。这些数值表明，与复凝聚体内部的分子相比，界面层中的分子彼此之间的相互作用极少，因此界面张力极低，但黏度相对较高。

III. 讨论

我们提出了一个定量半漂白后荧光恢复框架，并利用该框架研究聚-L-赖氨酸-透明质酸复合物的界面性质。聚-L-赖氨酸-透明质酸复合物是一种定义明确且可调控的相分离生物分子凝聚体模型体系 [29, 30]。我们

首先，通过对扩散算子进行谱分解，求解球形半透定义域中的扩散问题。我们发现，恢复曲线的形状以及此前引入的凹陷深度 [4] 取决于内部混合程度，而内部混合程度主要受控于界面的反射偏置和界面阻力。凝聚体中的扩散系数和凝聚体半径决定了系统的特征时间和长度尺度，因而控制曲线沿时间轴的缩放。因此，它们决定恢复时间，但不决定恢复曲线的形状或凹陷深度。通过评估两半区域积分恢复曲线的信息含量，我们发现，只要界面具有足够的渗透性，就可以获得所有参数。未来的工作将评估在存在漂移、采集诱导的光漂白、漂白剖面偏离阶跃形式以及几何形状非球形的情况下，参数推断的稳健性。对于某些类别的凝聚体，可能存在其与固定支架之间的结合相互作用；这方面的影响也值得进一步研究。

我们将定量半区FRAP模型应用于不同氯化镁$_2$浓度下 PLL-HA 凝聚层的漂白实验，并结合定量共聚焦成像和荧光相关光谱的数据进行分析，以提高结果的稳健性。由此，我们得以确定复凝聚体界面的反射偏置和阻力如何随盐浓度变化。我们发现，复凝聚体界面具有显著的反射偏置，粒子从内部受到的反射更强，同时界面阻力也相当显著。添加氯化镁$_2$, 后，这两项指标均会降低，其中界面阻力的衰减更快。在复凝聚体溶解的临界氯化镁$_2$ 浓度附近，界面阻力几乎消失，而反射偏置仍为 $\sim 50\%$。这些结果表明，在所有氯化镁$_2$ 浓度下，粒子逃逸都会受到阻碍，且复凝聚体内部均呈现优先混合，只是程度有所不同。在单相区和两相区之间的共存线附近，界面阻力较低，粒子逃逸主要受界面内侧反射率限制。在两相区深处，界面内侧反射率和界面阻力都会限制粒子逃逸，从而使复凝聚体更加有效地隔离.....

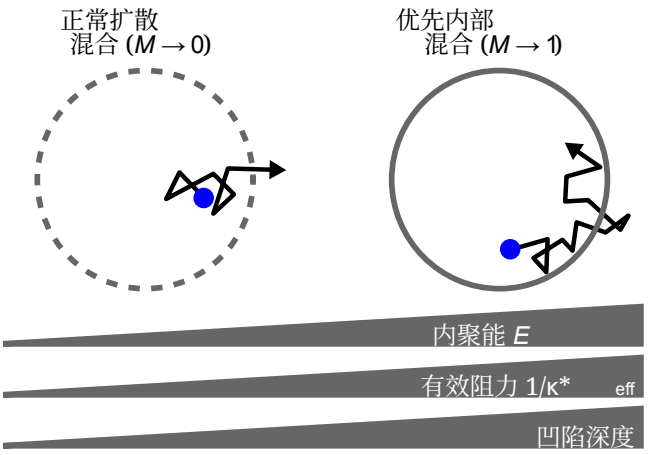


图 11：通过半区荧光漂白恢复区分具有不同动力学特征的凝聚体
生物分子凝聚体可呈现不同的动态特性。有效阻力较大的凝聚体与更强的分子间相互作用相关，其中含有一个准孤立的粒子池，该粒子池表现出优先内部混合，这会影响目标搜索过程和局部生化记忆。半区荧光漂白恢复曲线的凹陷深度可反映优先内部混合。

与周围介质相互交换。对于生物系统而言，至关重要的是，这种物理隔离能够形成局部生化记忆：凝聚体中的特定位置会被同一批分子反复访问；如果这些分子短暂地呈现特定构象，或获得半衰期与交换时间相当的化学修饰，它们便可能在功能上不同于周围环境中的分子。此外，较高的界面反射率会抑制分子瞬态逸入周围介质；如果分子可能在周围定义域中被隔离或修饰，这一点在功能上尤为重要。在非平衡条件下，这一点尤其重要，因为作用于周围介质的外部刺激可能被凝聚体缓冲或传递。我们预计，这些原理适用于多种系统，包括细胞中的生物分子凝聚体以及合成的体外系统；在这些系统中，通过化学调控分子间相互作用能，或可设计出可调控的凝聚体，用于可控药物释放。

致谢

感谢 Frédéric de Gournay 提供支持并参与富有帮助的讨论。OJ 获得 MITT博士生院和奥克西塔尼大区在人工智能健康计划框架下提供的博士奖学金支持。本研究部分由 ERC-2024-CoG RENOME 和 ANR CLEAR显微镜项目（ANR-25-CE45-3780）资助。本研究使用了 GENCI-IDRIS 提供的高性能计算资源（资助编号 AD011012210）。

附录 A：泛函分析

1. 问题陈述

设 $\Omega = B(0, L) \subset \mathbb{R}^d$ 为一个有界区域。我们将 Ω 划分为一个内部子区域 $\Omega_{\text{in}} = B(0, R)$ 和一个外部环域 $\Omega_{\text{out}} = \Omega \setminus \Omega_{\text{in}}$，二者由界面 $\Sigma = \partial\Omega_{\text{in}}$ 分隔。我们考虑由以下初边值问题支配的浓度场$c(t, x)$：

$$\begin{aligned}
\frac{\partial c}{\partial t} - \nabla \cdot (D(x)\nabla c) &= 0 && \text{在 } \Omega \times (0, T), && \text{(A1a)}\\
-D_{\text{in}}\partial_n c_{\text{in}} &= -D_{\text{out}}\partial_n c_{\text{out}} && \text{on } \Sigma, && \text{(A1b)}\\
-D_{\text{in}}\partial_n c_{\text{in}} &= \kappa(c_{\text{in}} - \Gamma c_{\text{out}}) && \text{on } \Sigma, && \text{(A1c)}\\
D_{\text{out}}\partial_n c_{\text{out}} &= 0 && \text{on } \partial\Omega \setminus \Sigma, && \text{(A1d)}\\
c(0, \cdot) &= c_0 && \text{in } \Omega, && \text{(A1e)}
\end{aligned}$$

其中 $D(x)$取值于 D_{in} Ω_{in} ，而 D_{out} 取值于 Ω_{out}。参数 $\Gamma > 0$ 表示分配系数，$\kappa > 0$ 表示界面渗透率。向量n表示分别从各子域向外指的单位法向量。

2. 泛函框架

标准索伯列夫空间 $H^1(\Omega)$ 不适用于这个问题，因为解在由 $\Gamma \neq 1$引起的界面 $r = R$ 处不连续。为此，我们改用“分片”空间。为了处理 Γ 引入的不对称性，我们定义配备加权内积的特定希尔伯特空间。

定义 A.1（希尔伯特空间与内积）。

1. 令 $H = L^2(\Omega_{\text{in}}) \times L^2(\Omega_{\text{out}})$ 为枢轴空间。我们在 H 上定义加权内积：

$$(u, v)_H = \int_{\Omega_{\text{in}}} u_{\text{in}} v_{\text{in}}\, dx + \Gamma \int_{\Omega_{\text{out}}} u_{\text{out}} v_{\text{out}}\, dx. \qquad \text{(A2)}$$

相应范数记为 $|u|_H = \sqrt{(u, u)_H}$。由于 $\Gamma > 0$，此范数等价于标准的 $L^2(\Omega)$ 范数。

2. 令 $V = H^1(\Omega_{\text{in}}) \times H^1(\Omega_{\text{out}})$。我们在 V 上定义加权内积：

$$\begin{aligned}
(u, v)_V = &\int_{\Omega_{\text{in}}} (u_{\text{in}} v_{\text{in}} + \nabla u_{\text{in}} \cdot \nabla v_{\text{in}})\, dx \\
&+ \Gamma \int_{\Omega_{\text{out}}} (u_{\text{out}} v_{\text{out}} + \nabla u_{\text{out}} \cdot \nabla v_{\text{out}})\, dx.
\end{aligned} \qquad \text{(A3)}$$

相应范数记为 $\|u\|_V = \sqrt{(u, u)_V}$。

引理 A.2 (Gelfand三元组). *</style>*空间 V和 H 满足稠密且连续的嵌入：

$$V \hookrightarrow H \equiv H' \hookrightarrow V'. \qquad \text{(A4)}$$

证明。</style>代数嵌入 $V \subset H$ 显然。通过展开 V中的内积，我们可以观察到:

$$\|u\|_V^2 = |u|_H^2 + \left(\|\nabla u_{\mathrm{in}}\|_{L^2}^2 + \Gamma\|\nabla u_{\mathrm{out}}\|_{L^2}^2\right).$$

因此， $|u|_H \le \|u\|_V$，从而证明该嵌入映射具有常数为 1 的连续性。由 V中测试函数的稠密性可知，$C_c^\infty(\Omega_{\mathrm{in}}) \times C_c^\infty(\Omega_{\mathrm{out}})$ 在 H 中稠密，注意这些测试函数均属于 V。通过加权内积 $(\cdot,\cdot)_H$，利用里斯表示定理将 H 与其对偶空间 H'等同，我们得到典范嵌入$H \hookrightarrow V'$。

□

3. 变分形式

令 $c(t) = (c_{\mathrm{in}}(t)\ c_{\mathrm{out}}(t))$ 为试探函数，并令 $v = (v_{\mathrm{in}}, v_{\mathrm{out}}) \in V$ 为与时间无关的测试函数。为获得与跳跃条件相容的对称形式，我们将控制方程 (A1a) 在 Ω_{in} 上乘以 v_{in}，在 Ω_{out} 上乘以 Γv_{out}。分别在相应区域上对积分求和，得到:

$$\begin{aligned}
&\int_{\Omega_{\mathrm{in}}} \partial_t c_{\mathrm{in}} v_{\mathrm{in}}\,dx + \Gamma\int_{\Omega_{\mathrm{out}}} \partial_t c_{\mathrm{out}} v_{\mathrm{out}}\,dx \\
&= \int_{\Omega_{\mathrm{in}}} \nabla\cdot(D_{\mathrm{in}}\nabla c_{\mathrm{in}}) v_{\mathrm{in}}\,dx \\
&\quad + \Gamma\int_{\Omega_{\mathrm{out}}} \nabla\cdot(D_{\mathrm{out}}\nabla c_{\mathrm{out}}) v_{\mathrm{out}}\,dx.
\end{aligned} \tag{A5}$$

左端恰为加权内积 $\frac{d}{dt}(c,v)_H$ 对时间的导数。

我们对右侧应用格林公式（分部积分）。令 $\vec{n}_{\mathrm{in}}$ 和 $\vec{n}_{\mathrm{out}}$ 分别表示 Ω_{in} 和 Ω_{out}的外向单位法向量。在界面Σ（其中 $r = R$）上，有 $\vec{n}_{\mathrm{in}} = \vec{e}_r$ 和 $\vec{n}_{\mathrm{out}} = -\vec{e}_r$。外部边界 $\partial\Omega\setminus\Sigma$上的边界条件为齐次诺伊曼条件，因此该处的边界积分为零。我们得到:

$$\begin{aligned}
\mathrm{RHS} = &-\int_{\Omega_{\mathrm{in}}} D_{\mathrm{in}}\nabla c_{\mathrm{in}}\cdot\nabla v_{\mathrm{in}}\,dx \\
&+\int_{\Sigma} D_{\mathrm{in}}(\nabla c_{\mathrm{in}}\cdot\vec{e}_r) v_{\mathrm{in}}\,d\sigma \\
&-\Gamma\int_{\Omega_{\mathrm{out}}} D_{\mathrm{out}}\nabla c_{\mathrm{out}}\cdot\nabla v_{\mathrm{out}}\,dx \\
&+\Gamma\int_{\Sigma} D_{\mathrm{out}}(\nabla c_{\mathrm{out}}\cdot(-\vec{e}_r)) v_{\mathrm{out}}\,d\sigma.
\end{aligned} \tag{A6}$$

将体扩散项和界面项归为一组，并定义径向通量 $J = -D_{\mathrm{in}}\partial_r c_{\mathrm{in}}$ （其中$\partial_r = \nabla\cdot\vec{e}_r$），表达式变为:

$$\begin{aligned}
\mathrm{RHS} = &-\int_{\Omega_{\mathrm{in}}} D_{\mathrm{in}}\nabla c_{\mathrm{in}}\cdot\nabla v_{\mathrm{in}} \\
&-\Gamma\int_{\Omega_{\mathrm{out}}} D_{\mathrm{out}}\nabla c_{\mathrm{out}}\cdot\nabla v_{\mathrm{out}} \\
&+\mathcal{I}_\Sigma.
\end{aligned}$$

界面项 $\mathcal{I}_\Sigma$ 依据通量守恒条件（A1b）进行分析，该条件指出 $-D_{\mathrm{in}}\partial_r c_{\mathrm{in}} = -D_{\mathrm{out}}\partial_r c_{\mathrm{out}} = J$。因此:

$$\begin{aligned}
\mathcal{I}_\Sigma &= \int_\Sigma (-J) v_{\mathrm{in}}\,d\sigma + \Gamma\int_\Sigma (J) v_{\mathrm{out}}\,d\sigma \\
&= \int_\Sigma J(\Gamma v_{\mathrm{out}} - v_{\mathrm{in}})\,d\sigma.
\end{aligned}$$

利用罗宾跳跃条件（A1c），通量为 $J = \kappa(c_{\mathrm{in}} - \Gamma c_{\mathrm{out}})$。将其代入边界积分:

$$\begin{aligned}
\mathcal{I}_\Sigma &= \int_\Sigma \kappa(c_{\mathrm{in}} - \Gamma c_{\mathrm{out}})(\Gamma v_{\mathrm{out}} - v_{\mathrm{in}})\,d\sigma \\
&= -\int_\Sigma \kappa(c_{\mathrm{in}} - \Gamma c_{\mathrm{out}})(v_{\mathrm{in}} - \Gamma v_{\mathrm{out}})\,d\sigma.
\end{aligned}$$

基于上述推导，我们定义对称双线性型 $a:\ V\times V\to\mathbb{R}$ 如下:

$$\begin{aligned}
a(u,v) = &\int_{\Omega_{\mathrm{in}}} D_{\mathrm{in}}\nabla u_{\mathrm{in}}\cdot\nabla v_{\mathrm{in}}\,dx \\
&+\Gamma\int_{\Omega_{\mathrm{out}}} D_{\mathrm{out}}\nabla u_{\mathrm{out}}\cdot\nabla v_{\mathrm{out}}\,dx \\
&+\int_\Sigma \kappa(u_{\mathrm{in}} - \Gamma u_{\mathrm{out}})(v_{\mathrm{in}} - \Gamma v_{\mathrm{out}})\,d\sigma.
\end{aligned} \tag{A7}$$

变分问题为：求 $c \in L^2(0,\ T;\ V) \cap C([0,T];\ H)$，其中 $\partial_t c \in L^2(0,\ T;\ V')$，使得:

$$\frac{d}{dt}(c(t),v)_H + a(c(t),v) = 0 \quad \forall v \in V, \tag{A8}$$

满足初始条件 $c(0) = c_0$。

4. 存在性与唯一性

我们采用抛物型问题的存在唯一性定理（定理 X.9, J.L. Lions）。

引理 A.3 （双线性型的性质）**.** 双线性型 $a(\cdot,\cdot)$ 满足:

(i)*连续性**：存在 $M > 0$，使得$|a(u,v)| \le M\|u\|_V\|v\|_V$对所有 $u,v \in V$均成立。(ii)*** **强制性（*Gårding* 不等式）**：存在$\alpha > 0$ 和 $C_0 \ge 0$，使得 $a(u,u) \ge \alpha\|u\|_V^2 - C_0|u|_H^2$ 对所有 $u \in V$均成立。

证明。我们将双线性型分解为体积项（I_{vol}）和边界项（I_{bnd}）。

（i）连续性的证明：我们分别估计各项。利用柯西-施瓦茨不等式以及由 $(\cdot,\cdot)_V$ 诱导的范数定义:

$$\begin{aligned}
&|I_{\mathrm{vol}}| \\
&= \left|\int_{\Omega_{\mathrm{in}}} D_{\mathrm{in}}\nabla u_{\mathrm{in}}\cdot\nabla v_{\mathrm{in}} + \Gamma\int_{\Omega_{\mathrm{out}}} D_{\mathrm{out}}\nabla u_{\mathrm{out}}\cdot\nabla v_{\mathrm{out}}\right| \\
&\le D_{\max}\left(\|\nabla u_{\mathrm{in}}\|_{L^2}\|\nabla v_{\mathrm{in}}\|_{L^2} + \Gamma\|\nabla u_{\mathrm{out}}\|_{L^2}\|\nabla v_{\mathrm{out}}\|_{L^2}\right) \\
&\le D_{\max}\max(1,\Gamma)\|u\|_V\|v\|_V.
\end{aligned}$$

对于 I_{bnd}，迹定理表明存在 C_{tr}，使得 $\|w\|_{L^2(\Sigma)} \le C_{\mathrm{tr}}\|w\|_{H^1}$。根据三角不等式：

$$\|u_{\mathrm{in}} - \Gamma u_{\mathrm{out}}\|_{L^2(\Sigma)} \le C_{\mathrm{tr}}\|u_{\mathrm{in}}\|_{H^1} + \Gamma C_{\mathrm{tr}}\|u_{\mathrm{out}}\|_{H^1}.$$

根据 $\|u\|_V$ 的定义，存在 C_Γ，使得 $\|u_{\mathrm{in}} - \Gamma u_{\mathrm{out}}\|_{L^2(\Sigma)} \le C_\Gamma\|u\|_V$。因此：

$$|I_{\mathrm{bnd}}| \le \kappa C_\Gamma^2 \|u\|_V \|v\|_V.$$

将这些界相加，连续性成立。

(ii) 强制性的证明： 由于 $\kappa \ge 0$，边界项 I_{bnd} 为正。令 $D_{\min} = \min(D_{\mathrm{in}}, D_{\mathrm{out}})$。我们有：

$$a(u,u) \ge D_{\min}\left(\|\nabla u_{\mathrm{in}}\|_{L^2}^2 + \Gamma\|\nabla u_{\mathrm{out}}\|_{L^2}^2\right).$$

我们使用第2小节中定义的内积重写括号中的项。注意：

$$(u,u)_V = (u,u)_H + \left(\|\nabla u_{\mathrm{in}}\|_{L^2}^2 + \Gamma\|\nabla u_{\mathrm{out}}\|_{L^2}^2\right).$$

因此：

$$\|\nabla u_{\mathrm{in}}\|_{L^2}^2 + \Gamma\|\nabla u_{\mathrm{out}}\|_{L^2}^2 = \|u\|_V^2 - |u|_H^2.$$

将这一关系代入关于 $a(u,u)$ 的不等式：

$$a(u,u) \ge D_{\min}(\|u\|_V^2 - |u|_H^2).$$

由此得到 Gårding 不等式，其中包含 $\alpha = D_{\min}$ 和 $C_0 = D_{\min}$。 □

定理 A.4 (存在唯一性)。 给定 $c_0 \in H$，存在该问题 (A8)的唯一解 c，满足：

$$c \in L^2(0,T;V) \cap C([0,T];H) \quad \text{and} \quad \frac{dc}{dt} \in L^2(0,T;V').$$

证明。 该结论可由引理 A.3 和 Lions 定理直接推出。由于系数与时间无关，$t \mapsto a(u,v)$ 的可测性显然成立。 □

5. 谱分析

在本小节中，我们研究支配扩散过程的空间算子的谱性质。我们的目标是证明该算子具有纯离散点谱，从而可以对解进行级数展开。

令 $\mathcal{A} : D(\mathcal{A}) \subset H \to H$ 为与双线性型 $a(\cdot,\cdot)$ 和希尔伯特空间 H相关联的无界线性算子。其形式定义如下：

$$(\mathcal{A}u, v)_H = a(u,v) \quad \forall u \in D(\mathcal{A}), \forall v \in V. \tag{A9}$$

其中，定义域 $D(\mathcal{A})$ 由满足映射 $v \mapsto a(u, v)$ 在 H 上连续的函数 $u \in V$ 组成。

定理 A.5 (谱分解)。 算子$\mathcal{A}$是自伴算子，其谱是纯离散谱，由一列实特征值组成：

$$0 \le \lambda_0 \le \lambda_1 \le \cdots \le \lambda_k \le \cdots \to +\infty.$$

此外，相应的特征向量 $\{\Phi_k\}_{k\in\mathbb{N}}$ 构成加权空间 H 的完备标准正交基。

证明。 证明依赖于紧自伴算子的谱定理。我们分三步进行：证明自伴性、构造预解算子，以及证明预解算子的紧性。

a. 对称性与自伴性 第 3 小节中定义的双线性型 $a(u,v)$ 是对称的，即对所有 $u,v \in V$，均有 $a(u,v) = a(v,u)$。由于 $\mathcal{A}$ 是由 Gelfand 三元组上的对称、连续且（经过平移后）强制的双线性型生成的，因此 $\mathcal{A}$ 是 H 上的自伴算子。

b. 预解算子的构造 根据引理 A.3，该型满足 Gårding 不等式：

$$a(u,u) \ge \alpha\|u\|_V^2 - C_0|u|_H^2.$$

设 $\mu > C_0$。我们考虑平移算子 $\mathcal{A}_\mu = \mathcal{A} + \mu I$。相应的双线性型为：

$$a_\mu(u,v) = a(u,v) + \mu(u,v)_H.$$

该双线性形式在 $V \times V$ 上连续且严格强制：

$$a_\mu(u,u) \ge \alpha\|u\|_V^2 + (\mu - C_0)|u|_H^2 \ge \alpha\|u\|_V^2.$$

对于任意源项 $f \in H$，Lax-Milgram 定理保证变分问题存在唯一解 $u \in V$：

$$a_\mu(u,v) = (f,v)_H \quad \forall v \in V.$$

我们定义预解算子 $S_\mu : H \to H$ 由 $S_\mu f = u$ 给出。注意，$S_\mu = (\mathcal{A} + \mu I)^{-1}$。

c. 预解算子的紧性 为了证明谱是离散的，我们必须证明 S_μ 是 H 上的紧算子。首先，我们证明 S_μ 将 H 连续映射到 V。利用 a_μ 的强制性以及内积的连续性：

$$\alpha\|u\|_V^2 \le a_\mu(u,u) = (f,u)_H \le |f|_H|u|_H.$$

由于嵌入 $V \hookrightarrow H$ 是连续的（$|u|_H \le \|u\|_V$），因此有：

$$\alpha\|u\|_V^2 \le |f|_H\|u\|_V \implies \|u\|_V \le \frac{1}{\alpha}|f|_H.$$

因此，线性映射 $f \mapsto u$ 是从 H 到 V 的有界映射。

接下来，我们考虑嵌入 $i : V \hookrightarrow H$。由于 Ω_{in} 和 Ω_{out} 是具有 Lipschitz边界（球体）的有界区域，Rellich–Kondrachov定理适用于每个子域。因此，断裂空间 $V = H^1(\Omega_{\mathrm{in}}) \times H^1(\Omega_{\mathrm{out}})$ 到 $H = L^2(\Omega_{\mathrm{in}}) \times L^2(\Omega_{\mathrm{out}})$ 的嵌入是**紧的**。

将预解算子 S_μ 视为作用于 H 上的算子，其复合形式为：

$$H \xrightarrow[\text{continuous}]{(\mathcal{A}+\mu I)^{-1}} V \xrightarrow[\text{compact}]{i} H.$$

连续算子与紧算子的复合仍为紧算子。因此， S_μ 是作用于 H上的紧的、正的自伴算子。

d. 结论 根据紧算子的谱定理（见 [18, 定理 VI.8]），S_μ 具有可数列特征值 $\nu_k \to 0$，并存在由特征向量构成的标准正交基。 $\mathcal{A}$的特征值为 $\lambda_k = \frac{1}{\nu_k} - \mu$，这意味着 $\lambda_k \to +\infty$。 —

6. 基函数的显式构造

本节将推导特征函数 $\{\Phi_k\}_{k\in\mathbb{N}}$ 的显式解析形式，以及决定特征值的超越方程。我们假设空间维数为 $d = 3$，并采用球坐标（r， θ， ϕ）。

特征值问题 $\mathcal{A}\Phi = \lambda\Phi$ 对应于求解以下非平凡解：

$$\begin{cases} -\nabla\cdot(D\nabla\Phi) = \lambda\Phi \\ F(\Phi) = 0 \end{cases} \tag{A10}$$

其中， $F(\Phi)$表示用于刻画界面条件和边界条件（A1b）-（A1c）-（A1d）违反程度的泛函：

$$F(u) = \begin{bmatrix} -D_{\text{in}}\partial u_{\text{in}}(r=R) + D_{\text{out}}\partial u_{\text{out}}(r=R) \\ D_{\text{in}}\partial u_{\text{in}}(r=R) + \kappa\left[u_{\text{in}}(r=R) - \Gamma u_{\text{out}}(r=R)\right] \\ D_{\text{out}}\partial u_{\text{out}}(r=L) \end{bmatrix} \tag{A11}$$

a. 球谐函数基底中的分辨率

由于球谐函数 $\{Y_{\ell m}\}_{l\in\mathbb{N},\ |m|\le l}$ 构成了 $L^2(S^2)$ 的完备基底，因此特征函数 $\Phi(x)$ 可分解为：

$$\Phi_n(r,\theta,\phi) = \sum_{\ell=0}^{\infty}\sum_{m=-\ell}^{\ell}\mathcal{R}_{\ell m}(r)Y_{\ell m}(\theta,\phi) \tag{A12}$$

由于算子 $\nabla\cdot(D\nabla\cdot)$ 和 F 在 H 中连续（见引理A.3），因此可以逐项作用于该级数。因此：

$$\begin{cases} -\sum_{\ell m}\nabla\cdot(D\nabla\mathcal{R}_{\ell m}Y_{\ell m}) = \sum_{\ell m}\lambda\mathcal{R}_{\ell m}Y_{\ell m} & \text{(A13)} \\ \sum_{\ell m}F\left(\mathcal{R}_{\ell m}Y_{\ell m}\right) = 0 & \text{(A14)} \end{cases}$$

现在，由于 $\Delta u(r,\theta,\phi) = \frac{1}{r^2}\partial_r(r^2\partial_r u) + \frac{1}{r^2}\Delta_{S^2}u$ 和 $\Delta_{S^2}Y_{\ell m} = -\ell(\ell+1)Y_{\ell m}$，方程 (A13) 变为：

$$\begin{aligned} &\sum_{\ell m}\left[-\frac{1}{r^2}\partial_r\left(Dr^2\partial_r\mathcal{R}_{\ell m}\right) + \frac{D\ell(\ell+1)}{r^2}\mathcal{R}_{\ell m}\right]Y_{\ell m} \\ =&\sum_{\ell m}\lambda\mathcal{R}_{\ell m}Y_{\ell m}. \end{aligned} \tag{A15}$$

利用 F 的径向对称性，方程 (A14) 变为：

$$\sum_{\ell=0}^{\infty}\sum_{m=-\ell}^{\ell}F\left(\mathcal{R}_{\ell mn}\right)Y_{\ell m} = 0 \tag{A16}$$

根据球谐函数的正交性，每个径向函数 $\mathcal{R}_{\ell m}(r)$ 均满足：

$$-\frac{1}{r^2}\partial_r\left(Dr^2\partial_r\mathcal{R}_{\ell m}\right) + \frac{D\ell(\ell+1)}{r^2}\mathcal{R}_{\ell m} = \lambda\mathcal{R}_{\ell m} \tag{A17}$$

同时满足界面和边界条件：$F(\mathcal{R}_{\ell m}) = 0$。

由于该方程不依赖于 m，径向函数即为满足式 (A17) 且符合界面和边界条件 $F(\mathcal{R}_\ell) = 0$ 的 $\mathcal{R}_\ell(r)$。

现在，由于 $\Phi_{\ell m}(r,\ \theta,\ \phi) = \mathcal{R}_\ell(r)Y_{\ell m}(\theta,\ \phi)$ 也是特征函数，因此它们构成与特征值 λ 相关的完备特征函数组，因为 Φ 是这些函数的线性组合。

b. 径向解

方程 (A17) 是球坐标下亥姆霍兹方程的径向部分，其在 $L^2([0,R])$ 中的解是球贝塞尔函数 j_ℓ 和 y_ℓ 的线性组合。因此我们有：

a. 内部区域（$0 \le r < R$）：解在原点 $r = 0$ 处必须保持正则，而 y_ℓ 在 0 处是奇异的。因此，一般解与第一类球贝塞尔函数 (j_ℓ) 成正比：

$$\mathcal{R}_\ell^{\text{in}}(r) = Aj_\ell\left(k_{\text{in}}\right) \tag{A18}$$

with $k_{\text{in}} = \sqrt{\lambda/D_{\text{in}}}$.

b. 外部区域（$R < r < L$）：解是第一类球贝塞尔函数 (j_ℓ) 和第二类球贝塞尔函数 (y_ℓ) 的线性组合：

$$\mathcal{R}_\ell^{\text{out}}(r) = Bj_\ell\left(k_{\text{out}}\right) + Cy_\ell\left(k_{\text{out}}\right) \tag{A19}$$

其中 $k_{\text{in}} = \sqrt{\lambda/D_{\text{out}}}$。

在 $r = L$ 处的诺伊曼边界条件要求$\partial_r\mathcal{R}_\ell^{\text{out}}(L) = 0$。我们要求：

$$Bk_{\text{out}}j_\ell'\left(k_{\text{out}}L\right) + Ck_{\text{out}}y_\ell'\left(k_{\text{out}}L\right) = 0.$$

为使其自动满足，我们将辅助函数 $\psi_\ell(z; z_L)$ 定义为：

$$\psi_\ell(z; z_L) = y'_\ell(z_L) j_\ell(z) - j'_\ell(z_L) y_\ell(z). \tag{A20}$$

因此，外部解的形式为（差一个归一化常数）：

$$\mathcal{R}^{\rm out}_\ell(r) = \mathcal{C}_\ell \, \psi_\ell(k_{\rm out} r; k_{\rm out} L). \tag{A21}$$

7. 界面匹配与特征值

我们在界面$r = R$处应用传输条件：

1. **Flux Continuity:** $D_{\rm in} \partial_r \mathcal{R}^{\rm in}_\ell = D_{\rm out} \partial_r \mathcal{R}^{\rm out}_\ell$.
2. **Robin Jump:** $-D_{\rm in} \partial_r \mathcal{R}^{\rm in}_\ell = \kappa(\mathcal{R}^{\rm in}_\ell - \Gamma \mathcal{R}^{\rm out}_\ell)$.

我们代入 $\mathcal{R}$的表达式：

$$-D_{\rm in} k_{\rm in} A j'_\ell(k_{\rm in} R) = -D_{\rm out} k_{\rm out} \mathcal{C} \psi'_\ell(k_{\rm out} R; k_{\rm out} L), \tag{A22}$$

$$= \kappa \left[A j_\ell(k_{\rm in} R) - \Gamma \mathcal{C} \psi_\ell(k_{\rm out} R; k_{\rm out} L) \right]. \tag{A23}$$

由 (A22) 可得振幅比 $\beta = \mathcal{C}/A$：

$$\beta = \frac{j'_\ell(k_{\rm in} R)}{\sqrt{\Delta} \psi'_\ell(k_{\rm out} R; k_{\rm out} L)}. \tag{A24}$$

将其代入 (A23)，得到关于特征值 λ 的**超越方程**：

$$\begin{aligned} &- D_{\rm in} k_{\rm in} j'_\ell(k_{\rm in} R) \\ =&\kappa \left[j_\ell(k_{\rm in} R) - \Gamma \frac{j'_\ell(k_{\rm in} R) \psi_\ell(k_{\rm out} R; k_{\rm out} L)}{\sqrt{\Delta} \psi'_\ell(k_{\rm out} R; k_{\rm out} L)} \right]. \end{aligned} \tag{A25}$$

对于每个 $\ell \in \mathbb{N}$，我们将该方程的解记为 $\{\lambda_{\ell n}\}_{n \in \mathbb{N}}$。算子 $\mathcal{A}$ 的谱由并集 $\bigcup_{\ell=0}^{\infty} \{\lambda_{\ell n}\}_{n \in \mathbb{N}}$ 给出。注意，由于球谐函数，每个特征值 $\lambda_{\ell n}$ 的重数为 $2\ell + 1$。

a. Basis Normalization

对于每个三元组 $(\ell,\ m,\ n)$，特征向量为：

$$\Phi_{\ell m n}(r, \theta, \varphi) = Y_{\ell m}(\theta, \varphi) \, f_{\ell n}(r), \tag{A26}$$

归一化径向部分另行定义如下：

$$\begin{cases} f^{\rm in}_{\ell n}(r) = N_{\ell n} \, j_\ell\left(\sqrt{\frac{\lambda_{\ell n}}{D_{\rm in}}} r \right), & \text{in } \Omega_{\rm in}, \\ f^{\rm out}_{\ell n}(r) = N_{\ell n} \, \beta_{\ell n} \, \psi_\ell\left(\sqrt{\frac{\lambda_{\ell n}}{D_{\rm out}}} r; \sqrt{\frac{\lambda_{\ell n}}{D_{\rm out}}} L \right), & \text{in } \Omega_{\rm out}. \end{cases} \tag{A27}$$

归一化常数$N_{\ell,\ n}$ 的选取满足$|\Phi_{\ell m n}|_H = 1$：

$$N_{\ell n}^{-2} = \int_0^R \left[j_\ell(k r) \right]^2 r^2 dr + \Gamma \beta_{\ell n}^2 \int_R^L \left[\psi_\ell(k/\sqrt{\Delta} r) \right]^2 r^2 dr. \tag{A28}$$

这些函数 $\Phi_{\ell n m}$ 构成 H 的正交归一希尔伯特基，这是由谱定理保证的。

于是，算子 $\mathcal{A}$ 作用于基函数时满足：

$$\mathcal{A} \Phi_{\ell m n} = \lambda_{\ell n} \Phi_{\ell m n}. \tag{A29}$$

8. 格林函数表示

利用 $\mathcal{A}$ 的谱分解，我们可以用特征函数和特征值表示变分问题 (A8) 的解 $c(t)$。给定初始条件$c_0 = \delta_{r_0,\ \theta_0,\ \phi_0} \in H$，我们将 c_0 按正交归一基 $\{\Phi_{\ell n m}\}$展开：

$$c_0 = \sum_{\ell=0}^{\infty} \sum_{n=0}^{\infty} \sum_{m=-\ell}^{\ell} c_{\ell m n} \Phi_{\ell m n}, \tag{A30}$$

其中系数为：

$$c_{\ell m n} = (c_0, \Phi_{\ell m n})_H \tag{A31}$$

$$= \begin{cases} \Phi^*_{\ell m n}(r_0, \theta_0, \phi_0) & \text{in } \Omega_{\rm in}, \\ \Gamma \Phi^*_{\ell m n}(r_0, \theta_0, \phi_0) & \text{in } \Omega_{\rm out}. \end{cases} \tag{A32}$$

格林函数可表示为：

$$\begin{aligned} &G_t(r, \theta, \phi, t | r_0, \theta_0, \phi_0) \\ =&\sum_{\ell m n} c_{\ell m n}(r_0, \theta_0, \phi_0) e^{-\lambda_{\ell n} t} \Phi_{\ell m n}(r, \theta, \phi) \end{aligned} \tag{A33}$$

□

附录 B：界面的反射偏置

为推导方程 (11) 中反射偏置 ρ 的表达式，我们从方程 (3) 中的边界条件出发，并根据以下方式将穿过界面的净通量分解为两个单向通量

$$J_{\rm net} = J_{\rm in \to out} - J_{\rm out \to in} = \underbrace{\kappa_{\rm in \to out} c_{\rm in}}_{J_{\rm in \to out}} - \underbrace{\kappa_{\rm out \to in} \sqrt{\Delta}\, c_{\rm out}}_{J_{\rm out \to in}}. \tag{B1}$$

这些单向通量对应于饱和界面（$1/\kappa^* \gg 1$）极限下的透射通量，此时入射通量并非由体相扩散梯度决定，而是由界面的渗透率决定：

$$\begin{aligned} J_{\rm in \to out} &= J^{\rm in}_{\rm transmitted} = (1 - \rho_{\rm in}) J^{\rm in}_{\rm incident}, \\ J_{\rm out \to in} &= J^{\rm out}_{\rm transmitted} = (1 - \rho_{\rm out}) J^{\rm out}_{\rm incident}. \end{aligned} \tag{B2}$$

此处， ρ_{in} 和 ρ_{out} 分别表示从内部和外部观察到的界面有效反射率，它们既考虑了直接反射，也考虑了界面处反复发生的透射—返回事件。入射通量为

$$\begin{aligned} J^{\text{in}}_{\text{incident}} &= \left(\kappa_{\text{out}\to\text{in}} + \kappa_{\text{in}\to\text{out}}\right) c_{\text{in}}, \\ J^{\text{out}}_{\text{incident}} &= \left(\kappa_{\text{out}\to\text{in}} + \kappa_{\text{in}\to\text{out}}\right) \sqrt{\Delta}\, c_{\text{out}}. \end{aligned} \tag{B3}$$

需要注意的是，在饱和界面的极限下，粒子的扩散到达不再是速率限制因素；来自两侧的入射通量由界面向任一方向输送粒子的总容量决定，对应于内部和外部渗透率之和。外侧入射通量表达式中的因子 $\sqrt{\Delta}$ 考虑了两个区域中扩散到达速率的差异。根据式 (B1)–(B3) 以及内部和外部渗透率的定义，界面的有效反射率为

$$\begin{aligned} \rho_{\text{in}} &= 1 - \frac{J^{\text{in}}_{\text{transmitted}}}{J^{\text{in}}_{\text{incident}}} = \frac{\kappa_{\text{out}\to\text{in}}}{\kappa_{\text{out}\to\text{in}} + \kappa_{\text{in}\to\text{out}}} = \frac{\Gamma/\sqrt{\Delta}}{\Gamma/\sqrt{\Delta}+1}, \\ \rho_{\text{out}} &= 1 - \frac{J^{\text{out}}_{\text{transmitted}}}{J^{\text{out}}_{\text{incident}}} = \frac{\kappa_{\text{in}\to\text{out}}}{\kappa_{\text{out}\to\text{in}} + \kappa_{\text{in}\to\text{out}}} = \frac{1}{\Gamma/\sqrt{\Delta}+1}. \end{aligned} \tag{B4}$$

接下来，我们将界面的反射偏置定义为两个反射率之差的归一化值，得到

$$\rho \overset{\text{def}}{=} \frac{\rho_{\text{in}} - \rho_{\text{out}}}{\rho_{\text{in}} + \rho_{\text{out}}} = \frac{\kappa_{\text{out}\to\text{in}} - \kappa_{\text{in}\to\text{out}}}{\kappa_{\text{out}\to\text{in}} + \kappa_{\text{in}\to\text{out}}} = \frac{\Gamma/\sqrt{\Delta}-1}{\Gamma/\sqrt{\Delta}+1}. \tag{B5}$$

式 (B5) 中的表达式与此前报道的一维粒子穿过单一界面扩散的结果一致 [10]。对于 $\rho = 0$，界面从两侧观察到的反射率相同。对于 $0 < \rho \le 1$，界面从内部一侧的反射性更强；对于 $-1 \le \rho < 0$，界面从外部一侧的反射性更强。分配系数由 ρ 和 Δ 根据下式确定

$$\Gamma = \frac{1+\rho}{1-\rho}\sqrt{\Delta}. \tag{B6}$$

附录 C：从内部区域逃逸

为确定初始位于x_0 的粒子在穿过环绕内部区域的边界层逃逸之前，在内部区域 Ω_{in} 中停留的时间，我们根据以下公式计算其在 Ω_{in} 中的平均停留时间

$$T(x_0) = \int_{t=0}^{\infty} \int_{x\in\Omega_{\text{in}}} p_t(x, x_0)\, dx\, dt, \tag{C1}$$

这里， $p_t(x, x_0)$ 是粒子最初位于位置 x_0 时在位置 x 于时间 t被发现的概率密度，其定义见式（6）。它满足对于 $x \in \Omega_{\text{in}}$:

$$\begin{aligned} p_t(x, x_0) &= p_t(x_0, x) \quad \text{if } x_0 \in \Omega_{\text{in}}, \\ p_t(x, x_0) &= \Gamma p_t(x_0, x) \ \text{ if } x_0 \in \Omega_{\text{out}}. \end{aligned} \tag{C2}$$

接下来，我们定义 T_{in} 和 T_{layer}，分别表示初始位于内部区域和大小为 δ的边界层中的粒子在 Ω_{in} 中的平均停留时间:

$$\begin{aligned} T_{\text{in}}(x_0) &= \int_{t=0}^{\infty} \int_{x\in\Omega_{\text{in}}} p_t(x_0, x)\, dx\, dt \\ T_{\text{layer}}(x_0) &= \Gamma \int_{t=0}^{\infty} \int_{x\in\Omega_{\text{in}}} p_t(x_0, x)\, dx\, dt. \end{aligned} \tag{C3}$$

对于固定的 x，我们定义 $c(t, x_0)$ 定义为 $= p_t(x_0, x)$，它表示在已知粒子的初始位置为 x的条件下，该粒子在时间 t 处于位置x_0 的概率密度。函数 $c(t, x_0)$ 满足扩散方程

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_{\text{in}}}{\partial t} &= D_{\text{in}} \Delta c_{\text{in}} \qquad \text{for } 0 \le r_0 \le R, \\ \frac{\partial c_{\text{layer}}}{\partial t} &= D_{\text{out}} \Delta c_{\text{layer}} \quad \text{for } R \le r_0 \le R+\delta, \end{aligned} \tag{C4}$$

初始条件为 $c(0, \cdot) = \delta(x - x_0)$。在方程 (C4) 中，$r_0 = |x_0|$ 表示径向坐标。为得到停留时间 T 的方程，我们对扩散方程 (C4) 在空间和时间上积分。对于左侧，可得以下方程:

$$\begin{aligned} \int_{t=0}^{\infty} \int_{x\in\Omega_{\text{in}}} \frac{\partial c}{\partial t}\, dx\, dt &= \int_{x\in\Omega_{\text{in}}} c(\infty, x_0)\, dx \\ -\int_{x\in\Omega_{\text{in}}} c(0, x_0)\, dx &= \int_{x\in\Omega_{\text{in}}} p_{t=\infty}(x_0, x)\, dx \\ -\int_{x\in\Omega_{\text{in}}} p_{t=0}(x_0, x)\, dx &= 0 - \begin{cases} 1 & \text{for } 0 \le r_0 \le R \\ 0 & \text{for } R \le r_0 \le R+\delta \end{cases} \end{aligned} \tag{C5}$$

在右端，算子 $\int_{t=0}^{\infty}\int_{x\in\Omega_{\text{in}}}(\cdot)\, dx\, dt$ 与空间导数可交换:

$$\begin{aligned} D_{\text{in}} \Delta T &= -1 \quad \text{for } 0 \le r_0 \le R, \\ D_{\text{out}} \Delta T &= 0 \quad\ \ \text{for } R \le r_0 \le R+\delta. \end{aligned} \tag{C6}$$

我们考虑以下边界条件:

$$\begin{aligned} -D_{\text{in}} \Gamma \partial_r T_{\text{in}}|_{r=R} &= -D_{\text{out}} \partial_r T_{\text{layer}}|_{r=R}, \\ -D_{\text{in}} \partial_r T_{\text{in}}|_{r=R} &= \kappa (T_{\text{in}}(R_-) - T_{\text{layer}}(R_+)), \\ T_{\text{layer}}(R+\delta) &= 0. \end{aligned} \tag{C7}$$

前两个方程描述了守恒通量的半透界面。第三个方程是狄利克雷条件，施加在边界层的边缘 $r = R + \delta$，以将此处的粒子视为

已经逃逸。我们得到拉普拉斯方程的解：

$$T_{\rm in}(r_0) = -\frac{r_0^2}{6D_{\rm in}} + K_1,$$
$$T_{\rm layer}(r_0) = \frac{K_2}{r_0} + K_3, \tag{C8}$$

其中，K_1、K_2 和 K_3 是由边界条件确定的三个常数，其表达式为：

$$K_1 = \frac{R^2}{6D_{\rm in}} + \frac{R}{3\kappa} + \frac{\Gamma R^2}{3D_{\rm out}}\left(\frac{\delta}{R+\delta}\right),$$
$$K_2 = \frac{\Gamma R^3}{3D_{\rm out}},\ K_3 = -\frac{\Gamma R^3}{3D_{\rm out}(R+\delta)}. \tag{C9}$$

我们将边界层的厚度设为粒子在特征内部混合时间 $\tau_{\rm mix} \approx R^2/(\pi^2 D_{\rm in})$ [3], 内移动的距离，得到

$$\delta = \sqrt{D_{\rm out}\tau_{\rm mix}} = R/\pi\sqrt{D_{\rm out}/D_{\rm in}}. \tag{C10}$$

根据以下定义有效扩散系数

$$D_{\rm out}^{\rm eff} \overset{\rm def}{=} D_{\rm out}\left(\frac{R+\delta}{\delta}\right) = D_{\rm out} + \sqrt{\pi^2 D_{\rm in} D_{\rm out}}, \tag{C11}$$

对于从内部区域中心 $r_0 = 0$出发的粒子，其平均停留时间为

$$T_{\rm in}(0) = K_1 = \frac{R^2}{6D_{\rm in}} + \frac{R}{3\kappa} + \frac{\Gamma R^2}{3D_{\rm out}^{\rm eff}}. \tag{C12}$$

这三项可分别解释为：到达内部区域界面的平均首次通过时间，即 $R^2/(6D_{\rm in})$；由界面阻力导致的时间延迟，即 $R/(3\kappa)$；以及从界面扩散至边界层边缘所需的时间，即 $\Gamma R^2/(3D_{\rm out}^{\rm eff})$。

对于 $D_{\rm out} \gg D_{\rm in}$，对应于 $\delta \gg R$的情况，有效扩散系数 $D_{\rm out}^{\rm eff}$ 趋于 $D_{\rm out}$ ，方程（C12）中的表达式与近期针对无界外域中含半透球体的全FRAP实验所得到的恢复时间表达式相似 [3]。

附录 D：半 FRAP 曲线和全 FRAP 曲线表达式中的积分

公式（22）中首次使用的径向积分 $I_{{\rm r},\ \ell n}$ 写作

$$I_{{\rm r},\ell n} = \int_0^R r^2 j_\ell(\sqrt{\lambda_{\ell n}/D_{\rm in}}r)dr = \sqrt{\pi}R^3\frac{(\sqrt{\lambda_{\ell n}/D_{\rm in}}R)^\ell}{2^{\ell+2}}$$
$$\Gamma\left(\frac{\ell+3}{2}\right)\mathrm{PFQ}\left(\frac{\ell+3}{2},\left(\frac{2\ell+3}{2},\frac{\ell+5}{2}\right),-\frac{\lambda_{\ell n}/D_{\rm in}R^2}{4}\right). \tag{D1}$$

这里，$\Gamma(x)$表示伽马函数，PFQ表示正则化广义超几何函数。对于 $\ell =$ 0，这是全FRAP（见式（25））中唯一相关的情况，该表达式简化为

$$I_{{\rm r},0n} = \frac{\sin(\sqrt{\lambda_{0n}/D_{\rm in}}R)}{(\lambda_{0n}/D_{\rm in})^{3/2}} - \frac{R\cos(\sqrt{\lambda_{0n}/D_{\rm in}}R)}{\lambda_{0n}/D_{\rm in}}. \tag{D2}$$

公式（22）中使用的角向投影 $A_\ell(\theta,\ \varphi)$ 在偶数 $\ell > 0$ 时为零，在奇数 $\ell > 1$时具有以下形式：

$$A_\ell(\theta,\varphi) = \frac{2\ell+1}{4\pi}\int_0^\pi d\varphi' \int_0^\pi \sin\theta'\, d\theta' P_\ell(\cos\gamma)$$
$$= \frac{2\ell+1}{2}\frac{(l-2)!!}{(l+1)!!}(-1)^{\frac{l+1}{2}} P_\ell(\sin\theta\cos\varphi). \tag{D3}$$

其中，$P_\ell(x)$ 表示次数为 ℓ 的勒让德多项式，$n!!$ 表示双阶乘，即所有不超过 n 且与 n 具有相同奇偶性（奇数或偶数）的正整数的乘积。角度 $\gamma(\theta,\ \varphi,\ \theta',\ \varphi')$ 在正文中定义。对于 $l = 0$ 和 $l = 1$，分别可得到数值 $A_0 = 0.5$ 和 $A_1(\theta,\ \varphi) = -0.75\sin\theta\cos\varphi$。

公式（23）中使用的角向积分 $I^{\rm b}_{{\rm a},\ \ell}$ 和 $I^{\rm nb}_{{\rm a},\ \ell}$ 在偶数 $\ell > 0$ 时为零，在奇数 $\ell > 1$时具有以下形式：

$$I^{\rm b}_{{\rm a},\ell} = \int_0^\pi d\varphi \int_0^\pi \sin\theta\, d\theta A_\ell(\theta,\varphi)$$
$$= \pi(2\ell+1)\left[\frac{(l-2)!!}{(l+1)!!}\right]^2 (\text{odd } \ell > 1). \tag{D4}$$

$$I^{\rm nb}_{{\rm a},\ell} = \int_\pi^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi \sin\theta\, d\theta A_\ell(\theta,\varphi)$$
$$= -\pi(2\ell+1)\left[\frac{(l-2)!!}{(l+1)!!}\right]^2 (\text{odd } \ell > 1). \tag{D5}$$

对于 $l = 0$ 和 $l = 1$，相应地得到数值 $I^{\rm b}_{{\rm a},\ 0} = I^{\rm nb}_{{\rm a},\ 0} = \pi$、$I^{\rm b}_{{\rm a},\ 1} = 9\pi/16$ 和 $I^{\rm nb}_{{\rm a},\ 1} = -9\pi/16$。

公式（A28）中定义的归一化常数 $N_{\ell,\ n}$ 为

$$N_{\ell n}^{-2} = \int_0^R [j_\ell(kr)]^2 r^2 dr + \Gamma\beta_{\ell n}^2 \int_R^L \left[\psi_\ell(k/\sqrt{\Delta}r)\right]^2 r^2 dr$$
$$= \frac{R^3}{2}\left[j_\ell^2(kR) - j_{\ell-1}(kR)j_{\ell+1}(kR)\right]$$
$$+ \frac{\Gamma\beta_{\ell n}^2}{2}\left[\, x^3\,\Xi_\ell(k/\sqrt{\Delta}x; k/\sqrt{\Delta}L)\right]_{x=R}^{x=L}, \tag{D6}$$

其中缩写为

$$\Xi_\ell(z; z_L) = y_\ell'^2(z_L)\left(j_\ell^2(z) - j_{\ell-1}(z)j_{\ell+1}(z)\right)$$
$$+ j_\ell'^2(z_L)\left(y_\ell^2(z) - y_{\ell-1}(z)y_{\ell+1}(z)\right)$$
$$- 2j_\ell'(z_L)y_\ell'(z_L)\left(j_\ell(z)y_\ell(z) - j_{\ell-1}(z)y_{\ell+1}(z)\right). \tag{D7}$$

根据公式（23）计算积分恢复曲线时，我们将谱和截断于 $\ell_{\max} = 35$

和 $n_{\max}=150$。为修正截断误差，我们估算谱和剩余的尾部，并加入相应项。首先，我们估算各向同性模态的谱和尾部，$\ell=0$。当 n和 $L\gg R$较大时，特征值按 $\lambda_{0n}\approx D_{\mathrm{out}}n^2\pi^2/L^2$缩放。指数项前的权重 $W_{0n}=N^2I_r^2$在 κ较大时随 $1/n^2$衰减，而在 κ较小时衰减更快。因此，各向同性模态尾部误差的保守估计为

$$E_0(t)=\sum_{n>n_{\max}}W_{0n}\,e^{-\lambda_{0n}t}\approx Q_0\int_{k_{\max}}^{\infty}\frac{1}{k^2}e^{-D_{\mathrm{out}}tk^2}dk =\frac{Q_0}{k_{\max}}\left[e^{-\lambda_{\max}t}-\sqrt{\pi\lambda_{\max}t}\,\mathrm{erfc}\left(\sqrt{\lambda_{\max}t}\right)\right]. \tag{D8}$$

这里，$k=\sqrt{\lambda/D_{\mathrm{out}}}$ 是有效波数，而 $k_{\max}=\sqrt{\lambda_{\max}/D_{\mathrm{out}}}$ 是与第 $n_{\max}$个特征值 $\lambda_{\max}$相关的波数。前因子 $Q_0/k_{\max}$表示 $t=0$处尾部的贡献，对应于 $t=0$ 处截断和的值与等于 1 的无穷和理论值之间的差。

接下来，我们估算高阶模态 $\ell>0$的谱和尾部。为简单起见，我们聚焦于每个模态 ℓ的主导特征值。当 ℓ 较大时，指数项前的权重按 $1/\ell^2$缩放。主导特征值按 $\lambda_\ell\approx D_{\mathrm{in}}l^2/R^2$缩放，这代表了角向弛豫变快并与界面性质脱耦时各模态的渐近首阶项。因此，尾部可写为

$$E_1(t)=\sum_{l>l_{\max}}W_{1l}\,e^{-\lambda_\ell t}\approx\int_{l_{\max}}^{\infty}\frac{Q_1}{l^2}e^{-\nu' l^2}dl =\frac{Q_1}{l_{\max}}\left[e^{-\nu' l_{\max}^2}-l_{\max}\sqrt{\pi\nu'}\,\mathrm{erfc}\left(l_{\max}\sqrt{\nu'}\right)\right]. \tag{D9}$$

这里，$\nu'=D_{\mathrm{in}}t/R^2$。前因子 $Q_1/l_{\max}$表示尾部在 $t=0$处的贡献，对应于$t=0$ 处截断和的值与等于 1 的无穷和理论值之间的差。

附录 E：自由扩散的积分全 FRAP 曲线

对于自由扩散的极限情形，即 $\Gamma=1$、$D_{\mathrm{in}}=D_{\mathrm{out}}=D$ 和 $\kappa\to\infty$，格林函数可简化为

$$G_t(x,x')=\frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}}e^{-\frac{|x-x'|^2}{4Dt}}. \tag{E1}$$

为获得整个内部区域漂白后的漂白颗粒总浓度，按照以下方式对内部区域内的格林函数进行积分

$$c_{\mathrm{full}}(t)=\frac{1}{V_{\mathrm{in}}}\int_{\Omega_{\mathrm{in}}}\int_{\Omega_{\mathrm{in}}}\frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}}e^{-\frac{|x-x'|^2}{4Dt}}dx\,dx'. \tag{E2}$$

由于被积函数仅通过 $h=|x-x'|$依赖于 x 和 x'，我们可以根据两个球体的重叠体积 $\gamma(h)$，将 6D 积分化为 1D 积分：

$$c_{\mathrm{full}}(t)=\frac{1}{V_{\mathrm{in}}}\int_0^{2R}\gamma(h)\frac{4\pi h^2}{(4\pi Dt)^{3/2}}e^{-\frac{h^2}{4Dt}}dh. \tag{E3}$$

这里，$\gamma(h)$ 是两个半径为 R、相距 h的球体的重叠体积，其表达式为

$$\frac{\gamma(h)}{V}=1-\frac{3h}{4R}+\frac{h^3}{16R^3}\quad(h\le 2R). \tag{E4}$$

代入 $\gamma(h)$ 的表达式，替换 $s=h/\sqrt{4Dt}$，并引入积分上限 $u=R/\sqrt{Dt}$ 后，式 (E3) 中的积分得出

$$c_{\mathrm{full}}(t)=\frac{4}{\sqrt{\pi}}\int_0^u\left(s^2-\frac{3s^3}{2u}+\frac{s^5}{2u^3}\right)e^{-s^2}ds =\mathrm{erf}(u)-\frac{1}{\sqrt{\pi}}\left[\left(\frac{3}{u}-\frac{2}{u^3}\right)-e^{-u^2}\left(\frac{1}{u}-\frac{2}{u^3}\right)\right]. \tag{E5}$$

请注意，也可以通过对式 (26) 中的谱解取外部区域半径 L 趋于无穷大的极限，得到这一闭式解。在此极限下，对特征模态的离散求和转变为连续的傅里叶-贝塞尔积分，其中包含球体的形状因子；该积分对应于重叠体积的谱表示，从而得到等价的实空间解。

附录 F：材料与方法

1. PLL-HA 凝聚层的制备 s

含有聚赖氨酸（PLL）和透明质酸（HA）的复凝聚体按近期所述方法制备 [4]。简而言之，将聚-L-赖氨酸氢溴酸盐（PLL，15–30 kDa；P7890，Sigma）、聚-L-赖氨酸-异硫氰酸荧光素氢溴酸盐（PLL-FITC，15–30 kDa；P3543，Sigma）、聚-L-赖氨酸-Atto647N 氢溴酸盐（由未标记的 PLL 和 Atto647N（AD 647N-31，ATTO-TEC）制备）以及透明质酸钠（HA，8–15 kDa；40583，Sigma）的储备液配制于 pH 8 的 50 mM Tris-Cl 中，浓度为 10 mg/mL。将 PLL 溶液和 HA 溶液混合，使质量比达到 1:4、最终浓度达到 10 mg/mL，从而重构复凝聚体并实现净电荷中和。随后，将该溶液以 1:10 的比例稀释于 pH 8 的 50 mM Tris-Cl、7.5% 聚乙二醇以及不同含量的氯化镁$_2$

（如所示）。进行荧光漂白后恢复实验时，将 FITC 标记的 PLL 按 1:500 的比例加入未标记的 PLL 中。进行荧光相关光谱实验和分配系数定量时，将 Atto647N 标记的 PLL 按 1:50 的比例加入未标记的 PLL 中。分析了典型尺寸为 2–4 微米的复凝聚体。

2. 用定量共聚焦成像测定分配系数

为了定量测定不同氯化镁$_2$ 浓度下聚-L-赖氨酸-透明质酸凝聚体的分配系数，按照上述方法制备了含有 Atto647N 标记聚-L-赖氨酸的复凝聚体。随后，将样品置于 8 孔 LabTek 盖玻片腔室中，并采集包含多个复凝聚体的视野 z图像堆栈。使用配备 63×/NA 1.2 油浸物镜的蔡司LSM 880共聚焦激光扫描显微镜（卡尔·蔡司，德国奥伯科亨）进行共聚焦成像。还使用同一台显微镜采集了浓度为 10 mg/mL 的聚-L-赖氨酸溶液图像，其中加入了不同浓度（0 至 200 μM）的 Atto647N 标记聚-L-赖氨酸。对每个样品成像时，均使用相同的增益和 HeNe（633 nm）激光设置。

利用 Atto647N 标记聚-L-赖氨酸浓度系列测得的平均强度值，拟合得到校准曲线，所用方程如下

$$I(c) = a + b(1 - e^{-kc}), \tag{F1}$$

其中， $I(c)$为平均强度， c 为Atto647N标记的PLL浓度。为定量测定分配系数，我们根据强度使用大津法 [33], 对 z投影图像中的PLL-HA凝聚层进行分割，并测定稠密相和稀相中的平均强度，再利用上述校准曲线将其换算为浓度。对于每种氯化镁$_2$ 浓度，我们分析了至少三张图像中的多个复凝聚体，并根据 $\Gamma = c_{\mathrm{dense}}/c_{\mathrm{dilute}}$计算分配系数，其中 c_{dense} 和 c_{dilute} 分别对应稠密相和稀相中的浓度。

3. 荧光相关光谱（FCS）

FCS实验在Airyscan模式下使用蔡司LSM 880共聚焦激光扫描显微镜（卡尔·蔡司，德国奥伯科亨）进行，配备63×/NA 1.2油浸物镜。样品由HeNe 633 nm激光激发，发射的荧光依次通过二向色镜、570–620 nm带通滤光片和中心波长为645 nm的长通滤光片。使用50 mM Tris缓冲液中100 μg/mL Atto647N标记的聚-L-赖氨酸均一溶液对Airyscan探测器进行校准。随后，将25 μL含有Atto647N标记聚-L-赖氨酸的复凝聚样品加入96孔板中。为尽量减少蒸发的影响，在室温下将样品移液后15分钟内进行FCS实验。分别在稀相和浓相中进行独立测量，以获取30,000,000个时间点；时间分辨率为1.23 μs，位深为16位，增益为750，针孔孔径设为最大值。FCS数据使用定制的Python脚本进行分析。舍弃测量开始阶段的数据，以排除不动组分的漂白影响，并对Airyscan阵列中32个探测器的信号取平均值。使用multiple-tau Python软件包 [34]中实现的multipletau 算法计算自相关曲线。每种条件至少分析十次实验并取平均。使用以下函数拟合平均曲线：

$$G(\tau) = \frac{1}{N}\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\mathrm{D}}}\right)^{-1}\left(1 + \left(\frac{w_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{\mathrm{D}}}\right)^{-\frac{1}{2}}. \tag{F2}$$

这里， N 是焦点体积中的平均粒子数， τ_D 是扩散时间， w_0 和 z_0 分别是横向和轴向的光束腰。扩散时间通过 $\tau_D = w_0^2/4D$与扩散系数 D 相关。因此，我们得到扩散系数比 Δ与扩散时间比之间的如下关系

$$\Delta = \frac{D_{\mathrm{out}}}{D_{\mathrm{in}}} = \frac{\tau_{\mathrm{D,in}}}{\tau_{\mathrm{D,out}}}. \tag{F3}$$

这里，$\tau_{\mathrm{D,\ in}}$ 和$\tau_{\mathrm{D,\ out}}$ 分别表示在凝聚体内部和外部测得的扩散时间。方便的是， Δ 的表达式与光束腰无关。

4. 荧光漂白恢复（FRAP）

荧光漂白恢复（FRAP）实验使用配备 63×/NA 1.2 油浸物镜的蔡司 LSM 710共聚焦激光扫描显微镜（卡尔·蔡司，德国奥伯科亨）进行。实验按照先前所述方法进行 [4]。简而言之，将每份样品取5 μL，滴加到8孔腔室式LabTek 盖玻片上；这些盖玻片事先用15%聚乙二醇钝化并充分冲洗。为尽量减少蒸发影响，实验在室温下、样品移液后的前15分钟内进行。每次实验以对应于每张图像200 ms的扫描速度，采集300张 128×512 像素的图像。光漂白前，先记录3至5张图像。

使用自定义 Python 脚本对聚集体进行分割，并提取

每帧中漂白半区（I_{B}）、未漂白半区（I_{NB}）、图像背景（I_{BG}）和未漂白结构（I_{REF}）的平均强度。利用这些数值计算漂白半区（$\mathrm{FRAP}_{\mathrm{B}}$）和未漂白半区（$\mathrm{FRAP}_{\mathrm{NB}}$）的 FRAP 曲线：

$$\mathrm{FRAP}^{\mathrm{I}}_{\mathrm{B/NB}} = \frac{I_{\mathrm{B/NB}}(t) - I_{\mathrm{BG}}(t)}{I_{\mathrm{REF}}(t) - I_{\mathrm{BG}}(t)} + A. \tag{F4}$$

此处， A 表示未漂白半区中不必要的漂白。将 $\mathrm{FRAP}_{\mathrm{B}}$ 和 $\mathrm{FRAP}_{\mathrm{NB}}$ 分别乘以漂白区域和未漂白区域的大小（分别为 N_{B} 和 N_{NB}），得到与每个半区中的粒子数成正比的曲线：

$$\mathrm{FRAP}^{\mathrm{II}}_{\mathrm{B/NB}} = \mathrm{FRAP}^{\mathrm{I}}_{\mathrm{B/NB}} \frac{N_{\mathrm{B/NB}}}{N_{\mathrm{B}} + N_{\mathrm{NB}}}. \tag{F5}$$

随后，根据漂白分子的数量对曲线进行归一化：

$$\mathrm{FRAP}^{\mathrm{III}}_{\mathrm{B/NB}} = \frac{\mathrm{FRAP}^{\mathrm{II}}_{\mathrm{B/NB}}(t) - \mathrm{FRAP}^{\mathrm{II}}_{\mathrm{B/NB}}(t_{\mathrm{bleach}})}{\mathrm{FRAP}^{\mathrm{II}}_{\mathrm{B}}(t_{\mathrm{pre}}) - \mathrm{FRAP}^{\mathrm{II}}_{\mathrm{B}}(t_{\mathrm{bleach}})}. \tag{F6}$$

其中， t_{pre} 和 t_{bleach} 分别是漂白前最后一帧和漂白后第一帧的采集时间。最后，对未漂白半区的信号施加一个加性偏移量，使其在漂白前归一化为 **1**。每种条件至少对八次实验取平均。为了比较不同条件下的 FRAP 曲线，将恢复曲线绘制为归一化时间的函数，归一化时间定义为

$$t_{\mathrm{norm}} = \frac{t}{\tau_{\mathrm{FRAP}}}, \tag{F7}$$

其中， t是时间， τ_{FRAP} 是通过拟合全FRAP恢复曲线得到的扩散时间，具体方法如先前所述 [4]。

[1]S. F. Banani、H. O. Lee、A. A. Hyman 和 M. K. Rosen，《生物分子凝聚体：细胞生物化学的组织者》，Nature Reviews Molecular Cell Biology **18**, 285 2017年( )。

[2] T . Mittag 和 R《理解相分离并应对未决问题与挑战的概念框架》，Molecular Cell**82**, 2201 (2022年)。

[3] Y. Zhang, A. G. Pyo, R. Kliegman, Y. Jiang, C. P. Brangwynne, H. A. Stone, and N. S. Wingreen，生物分子凝聚体的交换动力学，eLife **12**，RP91680（2024年）。[4] F. Muzzopappa, J. Hummert, M. Anfossi, S. A. Tashev, D.-P. Herten, and F. Erdel，通过无模型校准半漂白检测并量化活细胞中的液-液相分离，Nature Communications **13**, 7787（2022年）。[5] L. Hubatsch, L. M. Jawerth, C. Love, J. Bauermann, T. D. Tang, S. Bo, A. A. Hyman, and C. A. Weber，液态凝聚体扩散动力学的定量理论，Elife **10**, e68620（2021年）。[6] N. O. Taylor, M.-T. Wei, H. A. Stone, and C. P. Brangwynne，利用光漂白后荧光恢复量化相分离凝聚体的动力学，《生物物理学杂志》**117**，1285（2019年）。[7] F. Erdel, A. Rademacher, R. Vlijm, J. Tünnermann, L. Frank, R. Weinmann, E. Schweigert, K. Yserentant, J. Hummert, C. Bauer, 等，小鼠异染色质呈现数字化压缩状态，但不具备 HP1驱动的液-液相分离的特征，Molecular cell **78**，236（2020年）。[8] C. P. Brangwynne, C. R. Eckmann, D. S. Courson, A. Rybarska, C. Hoege, J. Gharakhani, F. Jülicher, and A. A. Hyman，生殖系P颗粒是通过受控溶解/凝聚定位的液滴，Science **324**，1729（2009年）。[9] L. Hubatsch, S. Bo, T. S. Harmon, A. A. Hyman, C. A. Weber, and F. Jülicher，跨越……的传输动力学

共存液相之间的界面，eLife，2025 (2025). [10]S. Bo, L. Hubatsch, J. Bauermann, C. A. Weber, and F. Jülicher，单分子跨越相界的随机动力学，Physical Review Research **3**, 043150 2021( ). [11] E. Scott, L. Tung, and H. Drickamer, 穿过界面的扩散，《化学物理学杂志》**19**, 1075 (1951). [12] J. G. Powles, M. J. Mallett, G. Rickayzen, and W. Evans，受无限部分可渗透屏障阵列阻碍的扩散的精确解析解，《伦敦皇家学会会刊A辑：数学与物理科学》**436**, 391 (1992). [13] D. S. Grebenkov，在非均匀磁场下圆形和球形层中的受限扩散解析解，The Journal of chemical physics **128** (2008). [14] E. J. Carr and G. Pontrelli，半无限介质中多层球体的质量扩散建模：在药物递送中的应用，《数学生物科学》**303**, 1 (2018). [15] N. Moutal and D. Grebenkov，穿过半透屏障的扩散：谱性质、高效计算与应用，《科学计算杂志》**81**, 1630–1654 (2019). [16] M. Schäfer, W. Wicke, W. Haselmayr, R. Rabenstein, and R. Schober，具有半透边界的球形扩散模型：传递函数方法，载于*ICC 2020-2020 IEEE International Conference on Com- munications (ICC)* (IEEE, 2020) pp. 1–7. [17] P. C. Bressloff，穿过半透屏障扩散的概率模型，《伦敦皇家学会会刊A》**478**, 20220615 (2022). [18] H. Brezis and H. Brézis，《泛函分析、索伯列夫空间与偏微分方程》泛函分析、索伯列夫空间与偏微分方程, Vol. 2 (施普林格, 2011).

[19] G. B. Arfken, H. J. Weber, and F. E. Harris，物理学家的数学方法，第7版 (Academic Press, 波士顿, MA, 2012).[20] 在平衡状态下，我们可以假设外部区域的初始浓度为1，这意味着内部的浓度恒定且等于 Γ。这里，我们倾向于假设内部的初始浓度为$V_{\text{漂白}}^{-1}$，以便将半区荧光漂白恢复曲线归一化至 $t = 0$。[21] H. Wang, F. M. Kelley, D. Milovanovic, B. S. Schuster, and Z. Shi，利用微量移液管吸引定量测定蛋白质凝聚体的表面张力和黏度，Biophysical Reports **1** (2021). [22] J.-M. Choi, A. S. Holehouse, and R. V. Pappu，细胞内相变复杂生物学背后的物理原理，Annual Review of Biophysics **49**, 107 (2020). [23] E. Spruijt, M. A. Cohen Stuart, and J. van der Gucht，聚电解质复合凝聚物的线性黏弹性，Macromolecules **46**, 1633 (2013). [24] M. Rubinstein and A. N. Semenov，缔合聚合物缠结溶液的动力学，Macromolecules **34**, 1058 (2001). [25] F. G. Hamad, Q. Chen, and R. H. Colby，聚电解质复合凝聚物的线性黏弹性与溶胀，Macromolecules **51**, 5547 (2018). [26] P. B. Rapp, A. K. Omar, B. R. Silverman, Z.-G. Wang, and D. A. Tirrell，缔合聚合物网络中的扩散机制：链跳跃的证据，Journal of the American Chemical Society **140**, 14185 (2018).

[27] M. H. van Haren、B. S. Visser 和 E. Spruijt，使用微电泳探测凝聚体的表面电荷，《Nature Communications》**15**，3564（2024年）。[28] A. Majee、C. A. Weber 和 F. Jülicher，液体界面的电荷分离，《Physical Review Research》**6**，033138（2024年）。[29] S. Park、R. Barnes、Y. Lin、B.-j. Jeon、S. Najafi、K. T. Delaney、G. H. Fredrickson、J.-E. Shea、D. S. Hwang 和 S. Han，脱水熵通过分子拥挤驱动液-液相分离，《Communications Chemistry》**3**，83（2020年）。[30] N. A. Yewdall、A. A. André、T. Lu 和 E. Spruijt，作为无膜细胞器模型的复合凝聚体，《Current Opinion in Colloid & Interface Science》**52**，101416（2021年）。[31] D. Mazza、A. Abernathy、N. Golob、T. Morisaki 和 J. G. McNally，活细胞中染色质结合测量的基准，《Nucleic Acids Research》**40**，e119（2012年）。[32] F. Erdel、K. Müller-Ott、M. Baum、M. Wachsmuth 和 K. Rippe，根据蛋白质迁移率图解析活细胞中的染色质相互作用，《Chromosome Research》**19**，99（2011年）。[33] N. Otsu 等，一种基于灰度直方图的阈值选择方法，《Automatica》**11**，23（1975年）。[34] P. Müller，Python 多重τ算法，Python 包索引（2012年）。[35] Y. Maruyama，用于描述三维非连续介质中扩散现象的随机游走：步长平衡与虚速度修正，《Physical Review E》**96**，032135（2017年）。