

Rasterikuvakorrelaatio-spektroskopiämittauksia Nikon A1R⁺ -konfokaalimikroskoopilla

Tuukka Ruhanen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO
FYSIIKAN LAITOS

Pro gradu -tutkielma
19. joulukuuta 2014

*“Älköön viisas kerskuko viisaudestaan,
älköön sankari voimistaan,
älköön rikas rikkaudestaan!
Jos joku kerskuu, kerskukoon siitä,
että hänellä on ymmärrystä
ja että hän tuntee minut,
Herran.”*
(Jeremia 9:22)

Kiitokset

Kiitokset ohjaajilleni, professori Jussi Timoselle ja Vesa Aholle. Vaikka tämä tutkielma tulikin tehtyä melko itsenäisenä työskentelynä, arvostan kovasti käymiämme keskusteluja ja panostanne työni tarkastamisessa sekä palautteen antamisessa. Teidän ansiostanne minulle oli mahdollista suuntautua opinnoissani juuri kiinnostukseni kohteeseen, biologiseen fysiikkaan.

Haluan kiittää myös Maija Vihinen-Rantaa ja hänen tutkimusryhmäänsä, jonka toiminnassa olen saanut olla mukana. Kiitos mahdollisuudesta työskennellä teidän laboratoriossanne ja kaikesta, mitä olen saanut oppia. Innostava asenteenne antoi monesti lisää motivaatiota kirjoittamiseen. Kiitos erityisesti Vesalle, Jorille ja Visalle rennosta työilmapiiristä ja hauskoista hetkistä.

Suuret kiitokset kaikille ystävilleni ja perheelleni tuesta ja välittämisestä, joista olen saanut opiskelujeni aikana nauttia. Erityiskiitos Tuomakselle, jolta saamani neuvot ovat olleet erittäin suureksi avuksi.

Jyväskylässä joulukuussa 2014

Tuukka Ruhanen

Abstract

Raster image correlation spectroscopy (RICS) is a microscopy technique for quantitatively studying the dynamics of fluorescent species from 2D confocal images. In this thesis the theoretical and practical principles of RICS are discussed and demonstrated. On the basis of the theory, the applicability of a commercial confocal microscope system (Nikon A1R⁺, Nanoscience Center, University of Jyväskylä) for RICS diffusion measurements is determined. The system was found to be inefficient for measuring fast molecules, such as EGFP (diffusion coefficient $D > 10 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$). The greatest drawback was high detector correlation, because of which results determined from fast fluctuations deviated significantly from literature values. Measurements were performed also to study the RICS method on a more general level. Some experimental details, such as sub-pixel scanning and variable scan speed, were found to be surprisingly important considering the fact that apparently they have not been discussed in previous publications.

Tiivistelmä

Rasterikuvakorrelaatio-spektroskopia (RICS) on kvantitatiivinen mikroskopiamenetelmä fluoresoivien molekyylien dynamiikan tutkimiseen kaksikulotteisista konfokaalikuvista. Tässä työssä käydään läpi RICS-menetelmän teoreettiset ja kokeelliset lähtökohdat, ja niiden pohjalta määritetään kaupallisen konfokaalimikroskooppijärjestelmän (Nikon A1R⁺, Jyväskylän yliopiston Nanotiedekeskus) soveltuvuus diffuusion mittaamiseen RICS-menetelmällä. Järjestelmän havaittiin soveltuvan heikosti nopeiden molekyylien, kuten EGFP:n mittaamiseen (diffuusiokerroin $D > 10 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$). Suurin haitta RICS-mittausten kannalta oli korkea ilmaisimesta aiheutuva korrelaatio, jonka seurauksena nopeista fluktuaatioista määritetyt tulokset poikkesivat merkittävästi kirjallisuusarvoista. Mittauksissa tehtiin lisäksi yleisiä huomioita RICS-menetelmää koskevista yksityiskohdista. Esimerkiksi pikselinsäisellä skannausliikkeellä ja skannausnopeuden muuttumisella todettiin olevan yllättävän suuri merkitys ottaen huomioon sen, ettei niitä tiettävästi ole käsitelty aiemmissa julkaisuissa.

Sisällysluettelo

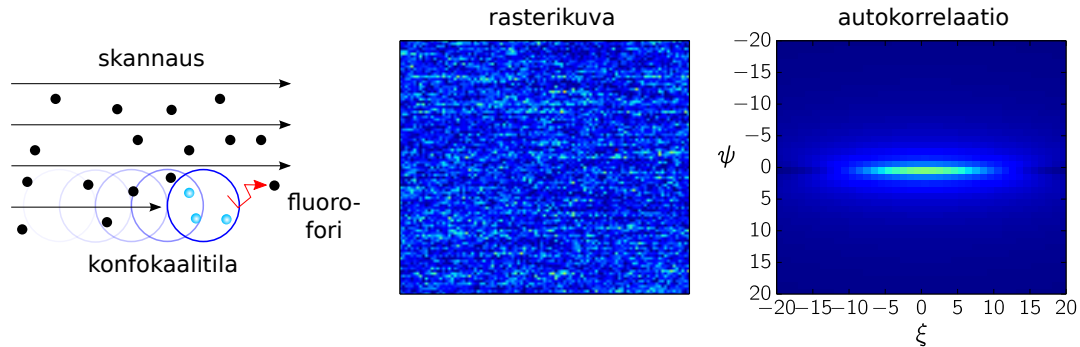
Kiitokset	ii
Abstract	iii
Tiivistelmä	iii
Sisällysluettelo	iv
1 Johdanto	1
2 Teoreettiset lähtökohdat	3
2.1 Fluoresenssi	3
2.2 Diffuusio	4
2.3 Konfokaalimikroskopia	6
2.3.1 Konfokaalitila	6
2.3.2 Approksimaatioista	8
2.4 Korrelaatio-spektroskopia	9
2.4.1 Fluoresenssikorrelaatio-spektroskopia (FCS)	10
2.4.2 Kaksoisfokus-FCS (2FFCS)	14
2.5 Rasterikuvakorrelaatio-spektroskopia (RICS)	15
2.5.1 Diffuusion tutkiminen RICSillä	16
2.5.2 Mittausparametrit	18
2.5.3 Virhetekijät	21
2.6 Autokorrelaation laskenta numeerisesti	25
3 Kokeelliset menetelmät	27
3.1 Nikon A1R ⁺	27
3.2 Liuosmittaukset	28
3.3 RICS-analyysi	29
4 Tulokset	30
4.1 Nikon A1R ⁺ :n soveltuvuus RICS-mittauksiin	30
4.1.1 Mittausparametrit	30
4.1.2 Skannausnopeuden muuttuminen	31
4.1.3 GaAsP-ilmaisimien	33

4.1.4	Liuosmittaukset	35
4.2	Yleisiä huomioita RICS-menetelmästä	36
4.2.1	Pikselinsisäinen skannausliike	36
4.2.2	Skannausnopeuden optimointi	37
4.2.3	Kommentteja SimFCS-ohjelmistosta	41
5	Päätelmät	42
	Kirjallisuus	45
A	Yhtälöiden johtaminen	52
A.1	Teoreettinen autokorrelaatiofunktio homogeeniselle diffuusiolle . .	52
A.2	Diffuusioyhtälön Greenin funktio ja keskimääräinen neliösiirtymä .	57
A.3	Korrelaatioteoreema ja autokorrelaatio diskreetin Fourier-muun- noksen avulla	59

1 Johdanto

Rasterikuvakorrelaatio spektroskopia (*raster image correlation spectroscopy*, RICS) on kvantitatiivinen mikroskopiamenetelmä fluoresoivien molekyylien (fluoroforien) dynamiikan tutkimiseen. Menetelmällä voidaan mitata esimerkiksi fluoroforien liikkumiseen vaikuttavia tekijöitä, kuten diffuusiota, aktiivista kuljetusta, sitoutumista ja ympäristön rakenteellisia ominaisuuksia [1, 2]. Menetelmä perustuu ensisijaisesti fluoresenssikorrelaatio spektroskopiaan (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS), jonka periaate kehitettiin vuonna 1972 [3, 4, 5, 6]. Laajempaa huomiota FCS saavutti 90-luvulla, kun sen soveltaminen vaativampiin mittauksiin tuli mahdolliseksi konfokaalimikroskopian ja fotonii-ilmäisimien kehityksen myötä. Samalla FCS:stä kehitettiin useita muunnelmia, joista samankaltaisia menetelmiä ovat kaksoisfokus-FCS (*dual-focus FCS*, 2FFCS) [7, 8, 9, 10] ja RICSin käsittävä skannaus-FCS (*scanning FCS*, SFCS) [11, 12, 13, 14].

RICSin periaate on esitetty kuvassa 1. Lähtökohtana menetelmässä on tarkasteltavan näytteen sisältämien fluoresoivien molekyylien (fluoroforien) virittäminen ja syntyneen fluoresenssivalon mittaaminen ajan funktiona. Viritys tehdään pieneltä alueelta (konfokaalilita) suhteessa fluoroforipitoisuuteen, jolloin yksittäisten fluoroforien aiheuttamat fluoresenssin fluktuaatiot erottuvat muusta signaalista. RICSissä konfokaalilita siirtyy mittauksen aikana rivittäin, ja muodostuneesta rasterikuvasta lasketaan fluktuaatioita kuvaava korrelaatio spektri. Fluktuaatioi-



Kuva 1. RICS-menetelmän periaate. Mitattavan järjestelmän sisältämiä fluoroforeja viritetään tasaisesti siirtyvällä fokusoidulla lasersäteellä, ja emittoituva fluoresenssivaloa mitataan paikan funktiona. Mitatusta rasterikuvasta lasketaan kaksiuotteinen korrelaatio spektri (autokorrelaatio), josta fluoroforien dynamiikkaa kuvaavat suureet voidaan määrittää.

den taustalla olevat fysikaaliset tapahtumat voidaan tällöin kvantifioida vertaamalla spektriä teoreettisiin fluktuaatiomalleihin [15, 16, 17, 18].

FCS-menetelmien lisäksi vastaaviin sovelluskohteisiin on olemassa myös muita menetelmiä, kuten fluoresenssin palautuminen (*fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP), fluoresenssin häviäminen (*fluorescence loss in photobleaching*, FLIP) ja yksihiukkasseuranta (*single particle tracking*, SPT) [19, 20, 21]. Fluoresenssin sammuttamiseen perustuvina menetelminä FRAP ja FLIP vaikuttavat kuitenkin merkittävästi mitattavaan järjestelmään, ja SPT:n soveltamisessa on toisaalta tarkat vaatimukset esimerkiksi fluoroforien kirkkaudesta ja pitoisuudesta. Kyseiset ongelmat ovat huomattavasti pienempiä FCS-menetelmissä, jotka perustuvat useiden molekyylien aiheuttamien fluktuaatioiden mittaamiseen tasapainotilassa olevasta järjestelmästä. Tästä syystä FCS-menetelmät ovat osoittautuneet lupaaviksi biologisten solu- ja molekyyli-tason tapahtumien tutkimiseen, jossa tavoitteena on mitattavan kohteen pitäminen mahdollisimman häiriöttömässä tilassa [22, 23]. Erityisesti RICSin soveltaminen on myös erittäin käytännöllistä, koska mittauksia varten ei tarvita erikoisvalmisteisia laitteistoja, vaan ne voidaan tehdä tavanomaisella konfokaalimikroskoopilla. Skannausliikkeen vuoksi RICS-mittaus sisältää myös enemmän tietoa esimerkiksi näytteen rakenteellisista ominaisuuksista verrattuna FCS:ään ja 2FFCS:ään [16, 17].

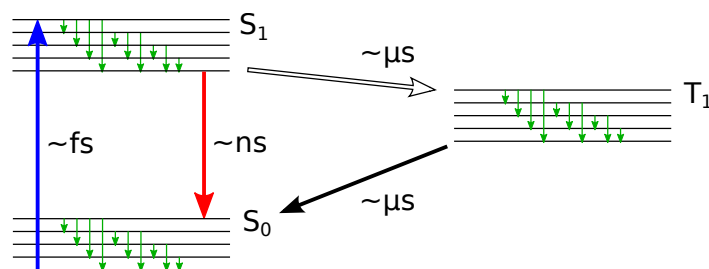
Tämä työ käsittelee RICS-menetelmän soveltamista fluoroforien diffuusion mittaamiseen Jyväskylän yliopiston Nanotiedekeskuksen Nikon A1R⁺ -konfokaalimikroskoopilla. Menetelmän teoreettiset lähtökohdat ja kokeelliset periaatteet käydään yksityiskohtaisesti läpi, ja niiden pohjalta määritetään A1R⁺:n soveltuvuus RICS-mittauksiin. Samalla tarkastellaan RICSiin liittyviä yksityiskohtia yleisemmin ja tutkitaan esimerkiksi kuvausparametrien optimointia mitattavan järjestelmän ominaisuuksien perusteella. Työssä tehtyjen mittausten korrelaatioanalyysiä varten kirjoitettiin Python-ohjelma, jolla kaikki tässä työssä esitetyt tulokset on laskettu. Suljettuihin ohjelmistoihin verrattuna itse tehdyn ohjelman käyttö mahdollisti RICS-menetelmän tarkastelun huomattavasti yksityiskohtaisemmin.

2 Teoreettiset lähtökohdat

2.1 Fluoresenssi

Tyypillisen fluoresoivan molekyylin (fluoroforin) osittainen energiatasokaavio on esitetty kuvassa 2. Fluoresenssissa fotonin virittämä (sininen nuoli) fluorofori relaxoituu värähtelytilojen kautta (vihreät nuolet) ennen toisen fotonin emittoitumista ja fluoroforin palaamista takaisin perustilalle (punainen nuoli). Emittoituneen fotonin energia on värähtelyrelaksaation vuoksi matalampi verrattuna fluoroforin virittäneeseen fotoniin. Koska emittoituneiden fotonien energijakauma (emissiospektri, ks. kuva 11) on jokaiselle fluoroforille ominainen, voidaan fluoroforeja käyttää tehokkaasti esimerkiksi leima-aineina kuvantamisessa.

Ennen kuin kuvaa 2 vastaava fluorofori relaxoituu virittyneeltä singlettitalalta S_1 takaisin perustilalle S_0 , fluoroforilla on mahdollisuus siirtyä myös niin kutsutulle triplettilalle T_1 . Mitä pidemmän ajan fluorofori on S_1 -tilalla, sitä todennäköisemmin se jossakin vaiheessa siirtyy T_1 -tilalle. Fluorofori siirtyy triplettilalle niin kutsutussa triplettisiirtymässä (*intersystem crossing*, valkoinen nuoli), jossa virittyneen elektronin spin vaihtuu niin, ettei se enää ole pariutunut perustilalla olevan parittoman elektronin kanssa. Triplettisiirtymässä ei emittoitu fotonia, ja sitä seuraavaa käyttäytymistä voidaan kuvata kahdella kvanttimekaniikan lainalaisuudella. Ensiksi, koska triplettilan energia on aina matalampi verrattuna vastaavaan singlettitalaan (Hundin sääntö), käänteinen triplettisiirtymä triplet-



Kuva 2. Tyypillisen fluoroforin yksinkertaistettu osittainen energiatasokaavio ja siirtymien todennäköisyyttä kuvaavat aikaskaalat. Fluoresenssimittausten kannalta olennaiset siirtymät elektronisten energiatiilojen välillä tapahtuvat singlettitiilojen (perustila S_0 ja viritystila S_1) sekä virittyneen triplettilan (T_1) välillä. Liuoksessa värähtelytilojen väliset siirtymät (vihreät nuolet) tapahtuvat huomattavasti nopeammin kuin elektroniset siirtymät, joiden voidaan tästä johtuen olettaa tapahtuvan aina matalimmalta värähtelytilalta [24, 25].

titilan matalimmalta vibraatiotilalta takaisin singletttilalle S_1 on erittäin epätodennäköinen. Toiseksi, Paulin kieltoäännön mukaisesti triplettitilan purkautuminen perustilalle S_0 on ns. kielletty siirtymä eikä täten tapahdu yhtä helposti kuin toiselta singletttilalta [26].

Edellä mainittujen ilmiöiden vuoksi triplettitilan elinaika on huomattavasti pidempi kuin virittyneen singlettitilan. Kun fluorofoori lopulta siirtyy triplettitilalta takaisin perustilalle, triplettitilan energia voi purkautua joko fotonin emission (fosforesenssi) tai värähtelyn kautta ympäristöön (musta nuoli kuvassa 2). Koska fluoroforit ovat mittausten aikana yleensä nesteen ympäröimiä, jälkimmäinen vaihtoehto on huomattavasti todennäköisempi [24].

Fluoresenssia mitattaessa yksittäinen fluorofoori on normaalisti osan ajasta triplettitilalla, riippuen siitä kuinka nopeasti siirtymät viritystilalle seuraavat toisiaan. Triplettitilalla fluorofoori ei kykene emittoimaan fotoneja eikä fluoresenssi-signaalia havaita, minkä vuoksi tavanomaisissa fluoresenssiin perustuvissa kuvantamismenetelmissä triplettisiirtymiä tulee yleisesti välttää. Triplettitilat voivat lisäksi johtaa peruuttamattomiin kovalenttisiin muutoksiin fluoroforin kemiallisessa rakenteessa, minkä seurauksena fluorofoori menettää lopullisesti kykynsä fluoresoida. Jos fluoroforien kokonaislukumäärä näytteessä on pieni, tämä fluoresenssin sammuminen (*photobleaching*) johtaa asteittaiseen fluoroforien ehtymiseen estäen luotettavat pitkäkestoiset mittaukset. Mikäli fluoresenssin sammumisen todennäköisyys on suuri ja sitä tapahtuu usein, se voi triplettitilan tavoin vaikuttaa fluoresenssin flukтуаatioihin myös pienemmällä aikaskaalalla [27, 28].

2.2 Diffuusio

Etenemisdiffuusio (*translational diffusion*), lyhyemmin diffuusio, on yksi tutkituimmista ilmiöistä fluoresenssikorrelaatiospektroskopian sovelluksissa. Diffuusio tarkoittaa hiukkasten (esim. elektronien, atomien tai molekyylien) leviämistä lämpöliikkeen seurauksena kohti statistista tasapainojakaumaa. Verrattuna virtausliikkeeseen, joka perustuu suuremman hiukkaskokonaisuuden yhtenäiseen liikkeeseen, diffuusio on täysin passiivinen ja suuntautumaton ilmiö, joka seuraa satunnaisista hiukkasten välisistä törmäyksistä. Yhden diffundoituvan hiukkasen liike on ns. Brownin liikettä [29].

Diffuusiota voidaan kuvata matemaattisesti diffuusioyhtälöllä

$$\partial_t C(\mathbf{r}, t) = \nabla_{xyz} \cdot [D(\mathbf{r}) \nabla_{xyz} C(\mathbf{r}, t)] , \quad (1)$$

joka liittää toisiinsa hiukkasten pitoisuusjakauman $C(\mathbf{r}, t)$ aikakehityksen ja sen paikalliset vaihtelut [30]. Operaattori ∂_t on osittaisderivaatta ajan suhteen, ja $\nabla_{xyz} \equiv \partial_x + \partial_y + \partial_z$ on operaattori, joka sisältää osittaisderivaatat paikkakoordinaattien suhteen.

Diffuusion nopeutta kuvaava diffuusiokerroin $D(\mathbf{r})$ voidaan määritellä myös diffundoituvan hiukkasen keskimääräisen neliösiirtymän (*mean squared displacement*, MSD) kasvunopeuden avulla yhtälöstä

$$MSD(t) = \left\langle (\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0))^2 \right\rangle = 2dDt , \quad (2)$$

missä $\mathbf{r}(t)$ on hiukkasen sijainti ajanhetkellä t , ja d on diffuusion vapausasteiden määrä (kolmiulotteisessa diffuusiossa $d = 3$).

Yhtälö (2) voidaan johtaa esimerkiksi ratkaisemalla diffuusioyhtälö (1) deltafunktion muotoiselle lähtöjakaumalle $C(\mathbf{r}, 0) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$ (johdettu liitteessä A.2). Samalla saadaan diffuusioyhtälön Greenin funktio

$$\mathcal{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) = (4\pi Dt)^{-\frac{3}{2}} \exp \left[-\frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2}{4Dt} \right] \quad (3)$$

kyseiselle järjestelmälle, jossa ei ole muita reunaehtoja. Greenin funktio vastaa järjestelmän pitoisuusjakaumaa (ja yhden hiukkasen sijainnin todennäköisyysjakaumaa) ajanhetkellä t ,

$$\mathcal{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) = \frac{C(\mathbf{r}, t)}{\langle C \rangle} , \quad (4)$$

ja sen avulla diffuusioyhtälön ratkaisu mielivaltaiselle lähtöjakaumalle voidaan esittää muodossa

$$C(\mathbf{r}, t) = \int d\mathbf{r}' \mathcal{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) C(\mathbf{r}', 0) . \quad (5)$$

Laminaarisessa nesteessä tapahtuvan diffuusion nopeuden riippuvuus ympäristön ominaisuuksista voidaan esittää Stokesin–Einsteinin-yhtälön [29]

$$D(\mathbf{r}, T) = \frac{k_B T(\mathbf{r})}{6\pi R \eta(\mathbf{r}, T)} \quad (6)$$

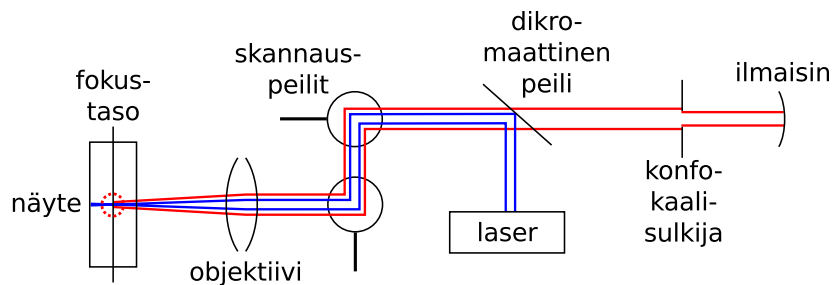
avulla, missä $T(\mathbf{r})$ ja $\eta(\mathbf{r}, T)$ ovat ympäristön lämpötila ja viskositeetti, R siinä diffundoituvan pyöreän hiukkasen säde ja k_B Boltzmannin vakio.

2.3 Konfokaalimikroskopia

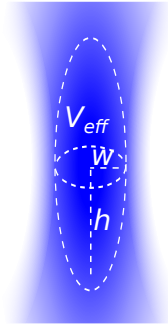
Konfokaalimikroskoopin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 3. Fluoroforeja virittävä lasersäde keskitetään yhteen pisteeseen tutkittavassa näytteessä, ja fluoresenssissa emittoituvan valon voimakkuutta mitataan fotonilmaisimella. Ennen ilmaisinta valo ohjataan ns. konfokaalisulkijan läpi, jolla kuvaa voidaan tarkentaa rajaamalla pois valonsäteet, joiden määrittämä suora ei leikkaa mitattavaa pistettä. Tyypillisesti konfokaalimikroskoopilla mitataan fluoresenssin voimakkuutta useasta eri pisteestä, minkä jälkeen mittauspisteistä muodostetaan näytteessä olevien fluoroforien jakaumaa vastaava kuva. Jokaista kuvaa varten näyte skannataan piste pisteeltä läpi esimerkiksi lasersädettä ohjaavien kääntyvien peilien avulla. Menetelmää kutsutaan laserskannauskonfokaalimikroskopiaksi (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) [31].

2.3.1 Konfokaalitila

Yksittäisten hiukkasten aiheuttamiin fluktuaatioihin perustuvien korrelaatio-spektroskopiamenetelmien kannalta tärkeä asia konfokaalimikroskoopilla toteutettavassa mittauksessa on hyvin määritelty konfokaalitila (*confocal volume*, kuva 4). Konfokaalitulalla tarkoitetaan sitä äärellisen kokoista tilaa, johon lasersäde on keskitetty ja josta fluoresenssia mitataan. Koska vain konfokaalitulassa olevien hiukkasten fluoresenssi havaitaan, fluoresenssisignaali riippuu merkittävästi tilan



Kuva 3. CLSM-fluoresenssimikroskoopin toimintaperiaate. Ns. epivalaisussa (*epi-illumination*) laservalon keskittäminen ja fluoresenssivalon kerääminen tapahtuu saman objektiivin kautta.



Kuva 4. Havainnekuva keskitetyn lasersäteen muodostamasta konfokaalitulasta ja efektiivisestä mittaustilavuudesta V_{eff} . Lasersäteen diffraktiosta aiheutuva voimakkuusjakauma määritellään parametrien w ja h avulla yhtälöstä (8).

muodon ja koon muutoksista. Tulosten luotettavaa tulkintaa varten teoreettisten fluktuaatiomallien on näin ollen vastattava konfokaalitulaston ominaisuuksia.

Konfokaalitulaston muoto voidaan määrittää todennäköisyytenä $P(\mathbf{r})$ havaita fluoresenssia fluoroforista pisteessä \mathbf{r} . Todennäköisyys on verrannollinen tulostoon

$$P(\mathbf{r}) \propto CEF(\mathbf{r}) \times I(\mathbf{r}), \quad (7)$$

missä $I(\mathbf{r})$ on virittävän säteilyn voimakkuusjakauma ja $CEF(\mathbf{r})$ on käytetyn mikroskoopin havainnointitodennäköisyysfunktio (*collection efficiency function*). Fluoresenssin saturaation vaikutukset jätetään yleensä huomiotta, jolloin fluoresenssin voimakkuuden oletetaan riippuvan lineaarisesti $I(\mathbf{r})$:stä [32].

Keskitetyn, karteesisessa z -suunnassa etenevän lasersäteiden voimakkuusjakaumaa approksimoidaan yleisesti Gaussisena funktiona

$$I(\mathbf{r}) = I_0 \exp \left[-\frac{2}{w^2} (r_x^2 + r_y^2 + k^{-2} r_z^2) \right], \quad (8)$$

missä I_0 on jakauman maksimivoimakkuus. Jakauman muoto poikittaissuunnassa määräytyy konfokaalisäteiden w (*beam waist*) ja z -suunnassa muotoparametrin (*structure parameter*) $k = h/w$ perusteella, missä h on konfokaalitulaston z -suuntaisen puoliakselin pituus (kuva 4). Parametrien avulla voidaan määrittää myös konfokaalitulosta kuvaava ns. efektiivinen mittaustilavuus (*effective measurement volume*)

$$V_{\text{eff}} \equiv \pi^{\frac{3}{2}} k w^3. \quad (9)$$

Yhtälössä (7) $CEF(\mathbf{r})$ on mittausparametreista riippuva havainnointitodennäköisyysfunktio, joka vastaa havaittavan säteilyn osuutta pisteessä \mathbf{r} olevasta valonlähteestä tulevasta säteilystä. $CEF(\mathbf{r})$:ää voidaan pitää konfokaalitalan ulompana rajoittavana tekijänä, joka määrittelee kuinka konfokaalisulkija estää valonsäteet, jotka eivät kulje konfokaalitalan läpi. $CEF(\mathbf{r})$ määräytyy käytetyn objektiivin numeerisen aukon, suurennoksen ja erottelukyvyyn sekä konfokaalisulkijan halkaisijan perusteella [24].

Konfokaalitalan koko (yhtälö (7)) määrittää mikroskoopin suurimman erottelukyvyyn eli pienimmän mahdollisen etäisyyden, jolla ovat kaksi pistemäistä valonlähettä voidaan luotettavasti erottaa toisistaan. Teoreettinen maksimi erottelukyvyille seuraa valon diffraktiosta, joka rajoittaa sekä fokuksipisteeseen keskitetyn lasersäteiden kokoa (yhtälö (8)) että pistemäisen valonlähteen paikallistamista siitä lähteneiden fotonien perusteella. Nykyaikaiset konfokaalimikroskoopit toimivat tällä ns. diffraktiorajalla (*diffraction limit*), jossa muiden optisten poikkeamien, kuten pallo- ja kromaattisen vääristymän, vaikutus voidaan olettaa mitättömäksi [31].

2.3.2 Approksimaatioista

Teoreettisissa malleissa konfokaalitalan muodon oletetaan yleensä vastaavan täysin virittävän lasersäteiden voimakkuusjakaumaa, jolloin havainnointitodennäköisyysfunktio oletetaan vakioksi,

$$CEF(\mathbf{r}) \times I(\mathbf{r}) \approx CEF \times I(\mathbf{r}) . \quad (10)$$

Oletus ei kuitenkaan ole perusteltu, mikäli $CEF(\mathbf{r})$ on jossakin konfokaalitalan pisteessä yhtälön (7) rajoittava tekijä. Esimerkiksi jos konfokaalisulkija on asemoitu virheellisesti tai sen halkaisija on liian pieni, $CEF(\mathbf{r})$ saattaa rajoittaa fluoresenssin havaitsemista epätasaisesti konfokaalitalan eri osissa. Konfokaalisulkija on tämän vuoksi huolellisesti säädettävä vastaamaan mahdollisimman hyvää $CEF(\mathbf{r})$:n ja $I(\mathbf{r})$:n päällekkäisyyttä.

Toinen yleinen teoreettinen approksimaatio koskee Gaussista laserin voimakkuusjakaumaa. TEM₀₀-tilassa toimivan laserin säteen poikkileikkaus vastaa hyvin Gaussin jakaumaa, mutta z -suunnassa vastaavalle jakaumalle ei ole fyysikaalista perustetta [33]. Valon voimakkuuden pitäisi sitä vastoin riippua z -suunnassa vain säteen poikittaisesta jakaumasta niin, että kokonaisvoimakkuus pysyy vakiona.

Tätä niin kutsuttua Lorentzin jakaumaa ei kuitenkaan yleensä sovelleta, koska sen käsittely analyttisesti on monimutkaisempaa [34, 35]. Gaussisesta approksiimaatiosta aiheutuva virhe ei myöskään ole suuri teoreettisen tarkastelun kannalta, ja muotoparametria k yhtälössä (8) käsitellään tavallisesti efektiivisenä arvona. Muut virhelähteet ovat yleensä merkittävämpiä [36, 37].

Kolmas oletus koskee fluoroforien saturaatiota, joka on seurausta peräkkäisten viritysten ajallisesta hajautumisesta (*antibunching*). Koska viritystilat eivät purkaudu välittömästi virityksen jälkeen, korkein mahdollinen viritystaaajuus riippuu viritystilojen keskimääräisestä elinajasta. Riittävän suurella laserteholla ei tästä syystä voida lisätä havaitun fluoresenssin määrää, koska yhä suurempi osa fotoneista ei viritä yhtään fluoroforia. Jos tämä niin kutsuttu fluoresenssin saturaatio on merkittävää useammassa pisteessä konfokaalitalan sisällä, konfokaalitalan muoto vastaa enemmän havainnointitodennäköisyysfunktioita $CEF(\mathbf{r})$ kuin virittävän lasersäteen voimakkuusjakaumaa, eikä approksimaatio (10) enää päde. Saturaatio saattaa olla merkittävää suhteellisen alhaisillakin lasertehoilla, minkä vuoksi tässä esitettyä teoreettista konfokaalitalaa tulisikin pitää vain likimääräisenä mallina [38, 39, 40].

Edellä mainituilla virhelähteillä ei ole juurikaan merkitystä tavanomaisessa kvalitatiivisessa konfokaalimikroskopiassa, jossa olennainen tieto liittyy kuvien sisäisiin rakenteisiin ja fluoresenssin voimakkuuseroihin mittauspisteiden välillä. Kvantitatiivisina menetelminä korrelaatio-spektroskopian sovellukset tätä vastoin edellyttävät teoreettista tarkkuutta, ja eri virhelähteiden tunnistaminen on tärkeää tulosten luotettavuuden arvioinnissa. Niitä ja niiden vaikutuksia mittaustuloksiin käsitellään tarkemmin esimerkiksi kohdassa 2.4.1.

2.4 Korrelaatio-spektroskopia

Korrelaatiolla tarkoitetaan kahden mittauksen välistä riippuvuutta. Korrelaatio-spektroskopia viittaa näiden riippuvuuksien statistiseen tarkasteluun suurelle määrälle mittauksia tehtävien matemaattisten operaatioiden avulla. Mittaukset voivat erota toisistaan esimerkiksi ajan tai paikan suhteen, jolloin niiden väliin korrelaatioon voi sisältyä tietoa esimerkiksi mitattavan järjestelmän käyttäytymiseen vaikuttavista fysikaalisista ilmiöistä. Tarkasteltava järjestelmä voidaan näin ollen karakterisoida vertaamalla mitattua korrelaatiota näitä ilmiöitä kuvaaviin teoreettisiin malleihin. Korrelaatio-spektroskopia mahdollistaa karakterisoin-

nin esimerkiksi tasapainotilassa tapahtuvien fysikaalisten fluktuaatioiden perusteella, minkä vuoksi se soveltuu erityisesti herkkien kohteiden kuten biologisten järjestelmien tutkimiseen.

Alla on käsitelty RICS-periaatteen taustalla olevien korrelaatio spektroskopiamenetelmien, FCS:n ja 2FFCS:n, teoreettisia lähtökohtia. Korrelaatio spektrin muodostaminen ja muut menetelmiä yhdistävät tekijät käydään läpi niin, että niitä voidaan myöhemmin käyttää RICS-menetelmän tarkastelussa ja soveltamisessa.

2.4.1 Fluoresenssikorrelaatio spektroskopia (FCS)

Fluoresenssiin perustuvista korrelaatiomenetelmistä toteutukseltaan yksinkertaisin on fluoresenssikorrelaatio spektroskopia (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS). FCS:ssä lasersäde ja konfokaalitila pidetään mittauksen aikana paikallaan, ja mitatun signaalin korrelaatio lasketaan mittauspisteiden välisen ajan suhteen. Tyypillisiä tutkittavissa olevia ilmiöitä ovat esimerkiksi fluoroforien diffuusio, kemialliset reaktiot, sitoutuminen ja energiatilasiirtymät [5, 24].

FCS:llä tutkittavien ilmiöiden ominaisuudet asettavat vaatimuksia mittauslaitteiston tarkkuudelle. Molekyyli tason muutosten tarkastelua varten esimerkiksi konfokaalitalan koon pitää vastata näytteen pitoisuutta niin, että yksittäiset fluoroforit voivat aiheuttaa havaittavissa olevia fluktuaatioita fluoresenssin voimakkuudessa. Energiatilasiirtymien aiheuttamien ja muiden suhteellisen nopeiden fluktuaatioiden karakterisointiin tarvitaan lisäksi riittävä fotoni-ilmaisimen aikaresoluutio ja herkkyys.

Erityisesti diffuusion tutkimista varten konfokaalitalan muodon pitää olla tarkasti määritelty (ks. kohta 2.3.1). Etenemisdifфуusiota tarkasteltaessa on myös huomattava, että FCS perustuu fluoresenssin fluktuaatioiden mittaukseen äärellisestä ja paikallaan pysyvistä konfokaalitalasta, joten difфуusiokertoimen (yhtälö (1)) paikkariippuvuutta konfokaalitalan sisällä ei voida määrittää. Tästä syystä FCS:ssä ja muissa konfokaalimikroskopiaan perustuvissa mittausmenetelmissä fluktuaatioita aiheuttava difфуusio oletetaan konfokaalitalan kokoluokassa paikkariippumattomaksi. Mikäli paikkariippuvuutta kuitenkin on, teoreettista mallia voidaan korjata esimerkiksi tulkitsemalla difфуusio aikariippuvaksi (ns. anomaalinen difфуusio) [41].

FCS:ssä paikallisen fluoresenssisignaalin kvantitatiivinen tarkastelu perustuu ns. korrelaatio-spektrin muodostamiseen, joka kuvaa signaalissa esiintyvien fluktuaatioiden keskimääräistä käyttäytymistä. Fluktuaatioita aiheuttavien fysikaalisten ilmiöiden pohjalta spektrille voidaan johtaa teoreettisia malleja, joita kokeellisiin tuloksiin sovittamalla tutkittava näyte voidaan karakterisoida. Teoreettisia autokorrelaatiofunktioita on käsitelty tarkemmin kohdassa 2.5 ja liitteessä A.1.

Autokorrelaation määritelmä

FCS-mittauksen korrelaatio-spektrin muodostaminen toteutetaan autokorrelaatiolla (*autocorrelation*), jonka avulla voidaan selvittää, onko aikasarjassa usein toistuvia jaksoja. Autokorrelaatio kuvaa vakioaikavälin etäisyydellä olevien mitaustulosten keskimääräistä riippuvuutta (korrelaatiota) toisistaan, ja se ilmoitetaan yleensä mitaustulosten välisen ajan, korrelaatioajan τ (*correlation time, lag time*), funktiona. Normalisoidun autokorrelaatiofunktion määritelmä on

$$g_{ac}(\tau) \equiv \frac{\langle \delta F(0) \delta F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2}, \quad (11)$$

missä $F(t)$ on fluoresenssin voimakkuus ajanhetkellä t ja fluoresenssin poikkeama $\delta F(t)$ määritellään yhtälöstä

$$\delta F(t) \equiv F(t) - \langle F \rangle. \quad (12)$$

Kulmasulut tarkoittavat otoskeskiarvoa.

Autokorrelaatio voidaan määritellä myös fluoresenssin voimakkuuden funktiona,

$$G_{ac}(\tau) \equiv \frac{\langle F(0) F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2}, \quad (13)$$

jolloin autokorrelaatio voidaan suoraan laskea mitattavasta signaalista. Riippuvuus $g_{ac}(\tau)$:n ja $G_{ac}(\tau)$:n välillä saadaan sijoittamalla yhtälö (12) yhtälöön (11),

$$\begin{aligned}
g_{\text{ac}}(\tau) &= \frac{\left\langle \left(F(0) - \langle F \rangle \right) \left(F(\tau) - \langle F \rangle \right) \right\rangle}{\langle F \rangle^2} \\
&= \frac{\langle F(0) F(\tau) \rangle - \langle F(0) \rangle \langle F \rangle - \langle F(\tau) \rangle \langle F \rangle + \langle F \rangle^2}{\langle F \rangle^2} \\
&= G_{\text{ac}}(\tau) - 1.
\end{aligned} \tag{14}$$

Kokeellinen autokorrelaatio ja virhelähteet

Tasapainotilassa olevassa järjestelmässä yhtälön (11) otoskeskiarvo vastaa aika-keskiarvoa,

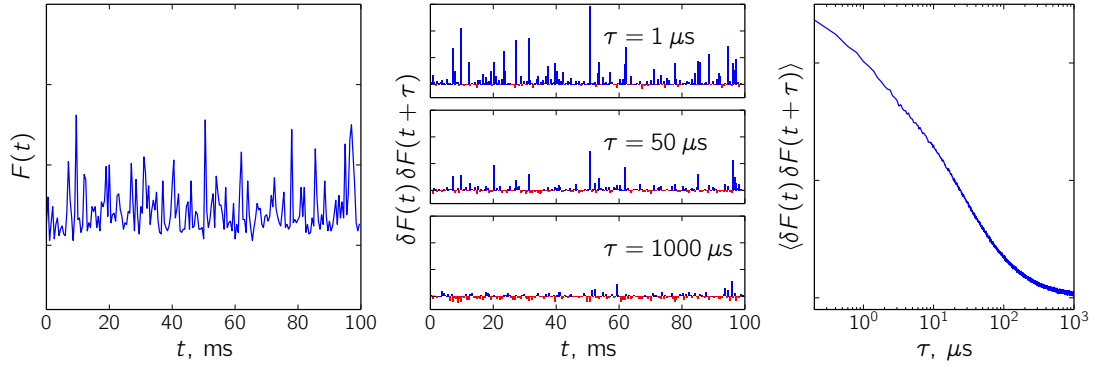
$$\langle \delta F(0) \delta F(\tau) \rangle = \lim_{\Theta \rightarrow \infty} \frac{1}{\Theta} \int_0^{\Theta} dt \delta F(t) \delta F(t + \tau), \tag{15}$$

missä integrointi tehdään mittauksen kokonaispituuden Θ yli. Näin määritellyn kokeellisen autokorrelaation periaate on esitetty kuvassa 5. Äärellisestä aikasarjasta laskettava diskreetti autokorrelaatioestimaattori voidaan yhtälöiden (13) ja (15) pohjalta määritellä yhtälön

$$G_{\text{kok}}(\nu) = \frac{\frac{1}{N - \nu} \sum_{k=1}^{N-\nu} F_k F_{k+\nu}}{\left(\frac{1}{N - \nu} \sum_{k=1}^{N-\nu} F_k \right) \left(\frac{1}{N - \nu} \sum_{k=1}^{N-\nu} F_{k+\nu} \right)} \tag{16}$$

mukaisesti, missä mittaus on jaettu aikaväleihin, joiden pituus vastaa yhden mittauksen valotusaikaa θ . F_k vastaa aikavälin k aikana mitattua fluoresenssin voimakkuutta (havaittujen fotonien määrää), ja N on aikasarjan kokonaispituus. Korrelaatioaika τ on korvattu korrelaatioindeksillä ν . Estimaattori on normalisoitu niin, ettei se riipu käytetystä laserin voimakkuudesta eikä fluoroforien kirkkaudesta. Yhtälössä (16) on käytetty niin kutsuttua symmetristä normalisointia, joka suurilla korrelaatioajan arvoilla vähentää rajatermien vaikutusta estimaattorin varianssiin [42, 43].

Diskretisoinnin ja äärellisen mittausajan vuoksi yhtälön (16) kuvaama kokeellinen autokorrelaatio sisältää sekä satunnaista että systemaattista virhettä. Merkittävin virhelähde fluoresenssin korrelaatiomittauksissa on niin kutsuttu raekohina



Kuva 5. Fluoresenssisignaali $F(t)$ lasketun kokeellisen autokorrelaation $\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle$ (yhtälö (15)) periaate. Korrelaatiot $\delta F(t) \delta F(t + \tau)$ eri mittauspisteiden välillä on kuvattu keskisarakeessa kolmelle eri korrelaatioajan τ arvolle. Käytännössä korrelaatioaika toimii kynnyksarvona, jota lyhyemmät fluktuatiot eivät kasvata korrelaatiota. Korrelaatioajan suhteen laskettu kokeellinen autokorrelaatio (korrelaatiopektri) kuvaa tällöin fluktuatioiden pituusjakamaa keskiarvoistamalla korrelaatiot koko mitatun signaalin yli.

(*shot noise*), joka seuraa fotonien emissioon ja havaitsemisen noudattamasta Poissonin satunnaisjakaumasta. Raekohinan aiheuttama autokorrelaation keskihajonta σ on verrannollinen mittauspisteiden lukumäärään suhteessa $\sigma \propto (N - \nu)^{-\frac{1}{2}}$ [43]. Kohinan vuoksi autokorrelaatiota ei kannata laskea liian suurilla korrelaatioindeksin arvoilla, jolloin voidaan tehdä oletus $\nu \ll N$.

Toinen satunnaisuutta lisäävä tekijä on havaittujen fluoroforien lukumäärä, joka laimeassa liuoksessa noudattaa niin ikään Poissonin jakaumaa ja aiheuttaa niin kutsuttua hiukkaskohinaa (*particle noise*) [43, 44]. Myös itse korrelaatioiden epäsäännöllisyydestä aiheutuu satunnaisvirhettä, ja lisäksi äärellinen mittausaika johtaa yhtälön (16) avulla lasketussa autokorrelaatiossa systemaattiseen poikkeamaan (*bias*) todellisesta arvosta. FCS-mittausten virhelähteitä ja -tarkastelua on käsitelty tarkemmin esimerkiksi lähteissä [43], [42] ja [45].

Virhelähteistä huolimatta tyypillisissä fluoresenssin fluktuatioihin perustuvissa korrelaatiopektroskopian toteutuksissa virhetarkastelu jätetään usein huomiotta. Esimerkiksi teoreettisten mallien, kuten yhtälön (21), sovituksista saatavat järjestelmää kuvaavat parametrit riippuvat erittäin epälineaarisesti itse mitatuista fluktuatioista, mikä tekee mittaustulosten tarkkuuden luotettavasta arvioinnista vaikeaa [46]. Virhetarkastelun sivuuttaminen saattaa olla perusteltua pitkäkestoisten mittausten ja yksinkertaisten diffusiojärjestelmien kohdalla, mut-

ta monimutkaisemmissa tapauksissa autokorrelaation painotus on edellytys tulosten luotettavuudelle [47].

2.4.2 Kaksoisfokus-FCS (2FFCS)

Kaksoisfokus-FCS:ssä (*dual-focus fluorescence correlation spectroscopy*, 2FFCS) korrelaatio lasketaan FCS:n vastaisesti kahdesta signaalista, jotka mitataan eri kohdista tarkasteltavaa järjestelmää [9]. Autokorrelaatio korvataan parikorrelaatiofunktiolla (*pair correlation function*)

$$g_{pc}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) \equiv \frac{\langle \delta F(\mathbf{r}', 0) \delta F(\mathbf{r}, \tau) \rangle}{\langle F(\mathbf{r}') \rangle \langle F(\mathbf{r}) \rangle}, \quad (17)$$

joka kuvaa korrelaatiota sekä paikan että ajan suhteen, sisältäen myös rakenteellista tietoa tarkasteltavasta järjestelmästä [2].

Parikorrelaatiofunktion käyttäytymistä diffuusiomittauksissa voidaan havainnollistaa homogeenisesti diffundoituvia fluoroforeja sisältävällä järjestelmällä. Tällöin, jos mittauspisteet ovat riittävän kaukana toisistaan, systemaattinen korrelaatio voi seurata vain pisteiden välillä tapahtuvasta diffuusiosta, ja teoreettinen parikorrelaatiofunktio vastaa yhtälön (3) Greenin funktiota. Fluoroforin sijainti pisteessä \mathbf{r}' mielivaltaisella ajanhetkellä vastaa siis Greenin funktion lähtöjakamaa $C(\mathbf{r}, 0) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$. Satunnaisten fluoroforien aiheuttamat fluktuaatiot eivät lisää korrelaatiota pisteiden välillä.

Mittauksesta ja diskretisoinnista aiheutuvat virheet ovat 2FFCS:ssä enimmäkseen samat kuin FCS:ssä. 2FFCS:llä tehdyissä diffuusiomittauksissa tulosten luotettavuus riippuu kuitenkin merkittävästi vähemmän konfokaalitalan muodosta, koska FCS:ssä autokorrelaatioon vaikuttavat enemmän yksittäisten fluktuaatioiden sisäiset ominaisuudet. Sen sijaan 2FFCS:ssä parikorrelaatio kasvaa vain, kun kaksi eri fluktuaatiota korreloivat keskenään. Parikorrelaatio riippuu näin ollen enemmän kahden eri konfokaalitalan välisestä etäisyydestä kuin niiden muodosta [48, 49]. Toisaalta, jos mittauspisteet ovat päällekkäin, parikorrelaatio vastaa käytännössä autokorrelaatiota ja FCS:ää.

Fluoresenssisignaalin mittaaminen samanaikaisesti kahdesta eri kohdasta voidaan toteuttaa monella eri tavalla [9, 12, 8]. Sovellukset, joissa mittauspisteet pysyvät paikallaan mittauksen ajan, vaativat kuitenkin yleensä erityisiä mittausjärjestelmiä, jotka eivät sovellu muihin tarkoituksiin. Parikorrelaation periaatetta

voidaan kuitenkin hyödyntää myös muilla tavoilla, joista hyvä esimerkki on rasterikuvakorrelaatio-spektroskopia.

2.5 Rasterikuvakorrelaatio-spektroskopia (RICS)

Tavanomaisessa konfokaalimikroskopiassa kuva muodostetaan skannaamalla näytettä ja mittaamalla fluoresenssin voimakkuutta piste pisteeltä. Skannausliikkeen aikariippuvuutta ei oteta huomioon, vaan saadun kuvan oletetaan vastaavan fluorofoorien jakaumaa tietyllä ajanhetkellä. Aikariippuvuus on kuitenkin suoraan hyödynnettävissä korrelaatio-spektroskopian avulla, jolloin mittauspisteiden välisistä korrelaatioista voidaan saada tietoa näytteen dynamiikasta. Ideaa hyödyntävää CLSM:n ja korrelaatio-spektroskopian yhdistelmää kutsutaan rasterikuvakorrelaatio-spektroskopiaksi (*raster image correlation spectroscopy*, RICS) [1, 16].

RICSin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 1. Konfokaalitila liikkuu rivi kerrallaan yhdensuuntaisesti vakionopeudella, ja tallennetun rasterikuvan jokainen pikseli vastaa yhtä mittauspistettä. Kahden pikselin välinen aika saadaan yhtälöstä

$$\tau(\xi, \psi) = \tau_x \xi + \tau_y \psi, \quad (18)$$

missä τ_x on yhden pikselin valotusaika ja τ_y kahden peräkkäisen rivin välinen aika. Kokonaisluvut ξ ja ψ kuvaavat kahden pikselin välistä siirtymää x - ja y -suunnassa. Mittauspisteiden välinen etäisyys saadaan kaavasta

$$\|\mathbf{r} - \mathbf{r}'\| = d_p \sqrt{\xi^2 + \psi^2}, \quad (19)$$

missä d_p on pikselin koko eli matka, jonka konfokaalitila liikkuu x -suunnassa valotusajan aikana tai y -suunnassa kahden rivin välillä.

RICS-mittaus vastaa siis käytännössä 2FFCS-mittausta, jossa mittauspisteiden välinen etäisyys riippuu korrelaatioajasta τ . RICSillä saadut tulokset riippuvat täten 2FFCS:n tavoin vähemmän konfokaalitilan muodosta verrattuna FCS:ään. RICS-mittaus koostuu kuitenkin yhdestä aikasarjasta, joten korrelaatio-spektri lasketaan autokorrelaatiolla, kuten kuvassa 5. Kokeellinen autokorrelaatio (kuva 1) voidaan laskea rasterikuvasta kaksiulotteisesti jokaiselle siirtymälle

(ξ, ψ) yhtälöstä

$$G_{\text{rics}}(\xi, \psi) \equiv \frac{(X - \xi)(Y - \psi) \sum_{k=1}^{X-\xi} \sum_{l=1}^{Y-\psi} F_{kl} F_{k+\xi, l+\psi}}{\left(\sum_{k=1}^{X-\xi} \sum_{l=1}^{Y-\psi} F_{kl} \right) \left(\sum_{k=1}^{X-\xi} \sum_{l=1}^{Y-\psi} F_{k+\xi, l+\psi} \right)}, \quad (20)$$

missä X ja Y ovat rasterikuvan pikselileveys ja -korkeus ($\xi \ll X$ ja $\psi \ll Y$), ja F_{kl} vastaa fluoresenssin voimakkuutta pikselissä (x_k, y_l) . Yhtälön käyttäytymistä kuvataan usein symmetrisesti peilaamalla autokorrelaatio origon suhteen, kuten kuvassa 1.

Yhtälö (20) on mahdollista määritellä myös yksiulotteisena pitäen ξ tai ψ nollana, esimerkiksi jos tarkasteltavien ilmiöiden aikaskaala eroaa huomattavasti skannausnopeudesta x - tai y -suunnassa. Riippuen käytetystä resoluutiosta yhden pikselin valotusaika voi olla esimerkiksi satoja kertoja lyhyempi kuin yhden rivin skannaamiseen kuluva aika. Mikäli kaksiulotteista korrelaatiota ei tarvita, myös itse mittaus voidaan toteuttaa ilman y -akselia skannaamalla näytettä vain yhtä viivaa pitkin. Tällä ns. viivakorrelaatio-spektroskopiolla (*line correlation spectroscopy*, LCS) mittaus voidaan lisäksi rajata pienemmälle alueelle.

2.5.1 Diffuusion tutkiminen RICSillä

Tässä työssä tarkastellaan lähtökohtaisesti RICSin soveltamista homogeenisen diffuusion tutkimiseen. Muiden korrelaatio-spektroskopiomenetelmien tavoin RICSillä voidaan käytännössä tutkia muitakin ilmiöitä, joiden aiheuttamat flukтуаatiot ovat riittävällä tarkkuudella havainnoitavissa käytetyllä mittalaitteistolla. Tällaisia ovat esimerkiksi fluoroforien sitoutuminen, aktiivinen kuljetus, energiatilasiirtymät, fluoresenssin sammuminen, fluoroforipitoisuus ja muut fluoresenssin flukтуаatioihin vaikuttavat tekijät. Koska konfokaalitulaa siirretään mittauksen aikana, menetelmän avulla näytteestä voidaan saada selville myös rakenteellista tietoa esimerkiksi fluoroforien liikkeen suuntautumisesta, liikettä estävistä rakenteista ja paikallisista muutoksista [17, 2].

Homogeenista diffuusiota kuvaava teoreettinen autokorrelaatiofunktio RICS-mittaukselle on muotoa (määritelmä (11))

$$g(\xi, \psi) = g_D(\xi, \psi) g_S(\xi, \psi), \quad (21)$$

missä

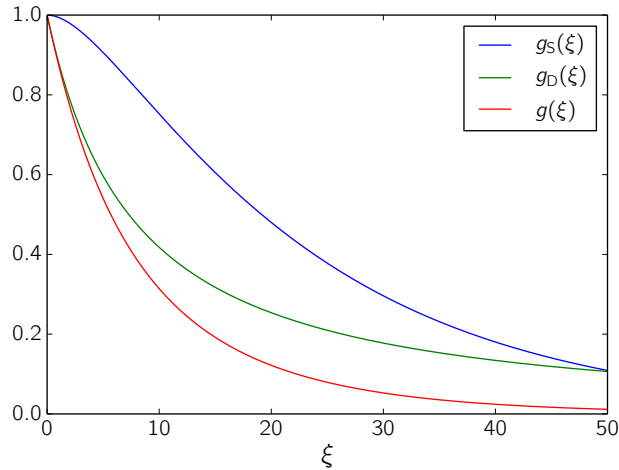
$$g_D(\xi, \psi) = \left[\langle n \rangle \left(1 + \frac{4D\tau(\xi, \psi)}{w^2} \right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau(\xi, \psi)}{k^2 w^2}} \right]^{-1} \quad (22)$$

kuvaa fluoroforien diffuusiota ja

$$g_S(\xi, \psi) = \exp \left[-\frac{d_p^2 (\xi^2 + \psi^2)}{w^2 + 4D\tau(\xi, \psi)} \right] \quad (23)$$

konfokaalitalan skannausliikettä. Keskiarvo $\langle n \rangle$ on efektiivisen mittaustilavuuden V_{eff} (yhtälö (9)) sisällä olevien fluoroforien keskimääräinen lukumäärä. Yhtälöiden kuvaajat on esitetty kuvassa 6, johtaminen yksityiskohtaisemmin on käyty läpi liitteessä A.1.

Ilman skannausliikettä kuvaavaa eksponenttikerrointa ($g_S(\xi, \psi)$) yhtälö (21) vastaisi tavallista FCS-mittausta. Mikäli pikselin koko d_p on tarpeeksi pieni suhteessa konfokaalisäteeseen w , RICS-mittaus ei itse asiassa juurikaan eroa FCS-mittauksesta. Toisaalta, jos d_p on liian suuri (tai valotusaika τ_x yhtälössä (18) on tarpeeksi lyhyt), korrelaatio laskee erittäin nopeasti, koska konfokaalitala liikkuu nopeammin kuin fluoroforit diffundoituvat. Yhtälön käyttäytymisen vaikutuksia mittaustuloksiin on käsitelty tarkemmin kohdissa 2.5.2 ja 4.2.2.



Kuva 6. Teoreettisen autokorrelaatiofunktion $g(\xi, \psi)$ (yhtälö (21)) ja sen diffuusiota ja skannausliikettä kuvaavien kertoimien $g_D(\xi, \psi)$ ja $g_S(\xi, \psi)$ (yhtälöt (22) ja (23)) normitetut yksiulotteiset ($\psi = 0$) kuvaajat. Parametrien arvot ovat $D = 100 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, $w = 300 \text{ nm}$, $d_p = 24 \text{ nm}$, $\tau_x = 28 \mu\text{s}$ ja $k = 3$.

Sovittamalla yhtälö (21) rasterikuvasta laskettuun autokorrelaatioon voidaan selvittää esimerkiksi näytteen fluoroforipitoisuus ($\langle n \rangle / v_{\text{eff}}$), konfokaalisäde w , rakenneparametri k ja fluoroforien diffuusiokerroin D . Sovitusta varten yhtälöön voidaan myös lisätä esimerkiksi taustakohinaa ja fluoresenssin sammumista vastaavia korjauksia [28]. Konfokaalisäde selvitetään tyypillisesti etukäteen tekemällä kalibraatiomittaus jollekin tunnetulle diffuusiojärjestelmälle. Skannausnopeutta kuvaavat parametrit d_p , τ_x ja τ_y oletetaan vakioiksi ja määritetään konfokaalimikroskoopin asetusten mukaan. Myös rakenneparametri k oletetaan yleensä käytetyn objektiivin ominaisuuksista riippuvaksi vakioksi [1].

Mittaustarkkuudesta riippuen RICSillä voidaan määrittää vähintään suhteellisia eroja diffuusionopeudessa eri järjestelmien välillä. Tarkimmissa mittauksissa RICSin on osoitettu soveltuvan myös absoluuttisten diffuusiokertoimien määrittämiseen kaupallisilla CLSM-järjestelmillä [1, 12].

2.5.2 Mittausparametrit

CLSM-kuvantamisessa on kiinnitettävä huomiota useisiin mittausparametreihin, jotka vaikuttavat mitattavaan signaaliin. Tällaisia ovat esimerkiksi virittävän lasersäteen ja näytteen fluoresenssivalon kuljettamiseen käytettyjen välineiden ominaisuudet, kuten peilien ja suotimien aallonpituusriippuvuus, suljinten halkaisijat ja näyteobjektiivin ominaisuudet. RICSin kannalta tärkeitä parametreja ovat erityisesti konfokaalitalan liikkeeseen vaikuttavat suureet, kuten pikselin koko ja valotusaika. Statistisen fluktuatioanalyysin vuoksi on kiinnitettävä huomiota myös mittauspisteiden kokonaisuuteen. Alla käsitellyt mittausparametrit ja niiden vaikutuksia tarkastellaan myöhemmin kokeellisesti kohdassa 4.2.

Pikselin koko

Konfokaalimikroskoopissa pikselin koko määrittää etäisyyden vierekkäisten mittauspisteiden välillä, eli kuinka pitkän matkan konfokaalitala siirtyy yhden valotusajan aikana. Tavanomaisessa kuvantamisessa ns. Nyquistin sääntö asettaa pikselin koolle alarajan, jota pienemmäksi diffraktiorajoitetun konfokaalimikroskoopin suurennosta ei ole hyödyllistä kasvattaa [50]. RICS-mittauksessa tätä rajaa ei ole, sillä mittausten tarkoituksena ei ole ensisijaisesti havaita fluoroforien sijaintia ja jakaumaa, vaan pikselin koosta riippumattomia fluoresenssin fluktuatioita. Pikselin kokoa voidaan täten laskea merkittävästikin Nyquistin rajaa pienem-

mäksi, jotta esimerkiksi hitaiden fluoroforien diffuusion aiheuttamat fluktuaatiot saataisiin näkyviin. Erittäin pientä pikselin kokoa käyttävissä mittauksissa menetetään toisaalta 2FFCS-periaatteen hyöty, koska tulokset riippuvat enemmän konfokaalitalan muodosta (ks. kohta 2.4.2).

Riippuen mittauksen kohteena olevasta järjestelmästä pikselin koolle kannattaa näin ollen asettaa esimerkiksi suurin mahdollinen arvo, jolla diffuusion aiheuttamia fluktuaatioita voidaan havainnoida riittävästi korrelaatioanalyysiä varten. Liian suurella pikselin koolla fluktuaatioiden aiheuttamaa korrelaatiota havaitaan vain muutaman vierekkäisen pikselin välillä, eikä teoreettisen mallin sovitusta voida tehdä tarkasti. Tällöin myös ilmaisimen korrelaatio (ks. kohta 2.5.3) ja muut lyhyen aikaskaalan virhetekijät voivat tehdä mittauksesta epätarkemman. CLSM:llä tehtävissä mittauksissa tulee lisäksi huomioida pikselin kokoon verrannollinen pikselinsisäinen skannausliike, jonka vuoksi eri pikselin koon arvoilla tehdyt mittaukset eivät ole täysin vertailukelpoisia (ks. kohdat 2.5.3 ja 4.2.1).

Valotusaika

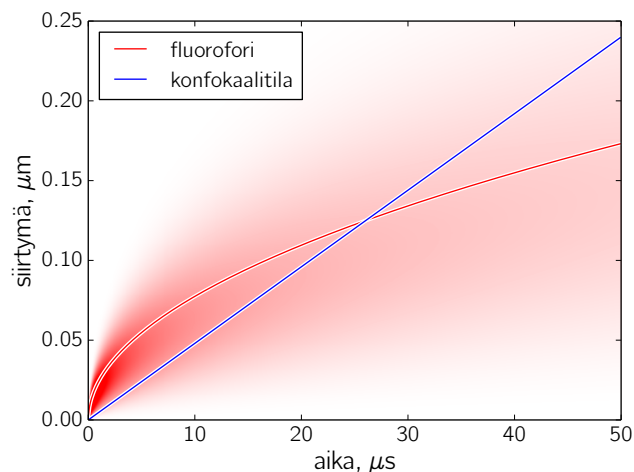
Valotusaika on pikselin koon lisäksi toinen RICSin kannalta tärkeä CLSM:n kuvausparametri. Valotusajan valintaan vaikuttavia tekijöitä ovat skannausnopeus sekä kuvien signaalikohinasuhde ja aikaresoluutio. Esimerkiksi jos mittauksen kokonaiskesto on pidettävä lyhyenä aikariippuvan näytteen vuoksi, on valotusajan oltava tarpeeksi pitkä signaalikohinasuhteen pitämiseksi kohtuullisena (ks. kohta Kokeellinen autokorrelaatio ja virhelähteet sivulla 12). Pidemmällä valotusajolla mittauksen aikaresoluutio toisaalta rajoittaa mitattavissa olevia fluktuaatioita, eikä esimerkiksi nopeasti diffundoituvien fluoroforien diffuusion mittaaminen välttämättä ole mahdollista. Signaalin vahvistamiseksi voidaan tällöin esimerkiksi kasvattaa virittävän lasersäteen voimakkuutta valotusajan sijaan.

Optimaalinen skannausnopeus

Teoreettista autokorrelaatiota kuvaavasta yhtälöstä (21) voidaan nähdä kuinka skannausnopeus (parametrit d_p , τ_x ja τ_y) vaikuttaa autokorrelaation muotoon. Jos diffuusiokerroin D on pieni suhteessa skannausnopeuteen, skannausliikettä kuvaavan eksponenttikertoimen merkitys kasvaa. Tällöin diffuusiokertoimen muutoksilla on pienempi vaikutus autokorrelaation käyttäytymiseen, ja sovituksen tarkkuus diffuusionopeuden suhteen heikkenee. Vastaavasti jos diffuusio on huomattavas-

ti nopeampaa kuin konfokaalitalan liike, on eksponenttikertoimen vaikutus autokorrelaatioon vähäisempi, ja konfokaalitalan muodon merkitys diffuusiokertoimen määrittämisessä kasvaa.

Edellä mainituista syistä skannausnopeuden ja diffundoituvien hiukkasten leviämisenopeuden vastaavuus on tärkeää [16]. Vastaavuuden merkitys voidaan nähdä myös yhtälöstä (2), jossa diffundoituvien hiukkasten keskimääräinen neliösiirtymä MSD on suoraan verrannollinen kuluneeseen aikaan. Koska skannaus tapahtuu lineaarisesti ajan suhteen ja diffuusion aikariippuvuus on neliöllinen, valittu skannausnopeus on optimaalinen vain tietyllä aikaskaalalla (kuva 7). Näin ollen kahden mittauspisteen välisen siirtymän (ja aikavälin) kasvaessa yhä harvempi fluorofori havaitaan molemmissa pisteissä, ja skannausnopeutta muuttamalla voidaan vaikuttaa siihen, monellako siirtymän (ξ, ψ) arvolla autokorrelaatio on merkittävää. Huomioitavaa on myös se, että konfokaalitalan liikettä ja korrelaatiota voidaan tarkastella sekä x - että y -suunnassa, jolloin yhdessä RICS-mittauksessa on käytössä kaksi eri skannausnopeutta. Skannausnopeuden optimointia on käsitelty lisää kohdassa 4.2.2.



Kuva 7. Konfokaalitalan ($d_p = 24 \text{ nm}$, $\tau_x = 5 \mu s$) ja diffundoituvan fluoroforin ($D = 100 \frac{\mu m^2}{s}$) käyttäytyminen ajan suhteen. Fluoroforin sijainti on kuvattu keskimääräisen neliösiirtymän (yhtälö (2)) neliöjuurena. Liukuväri kuvaa fluoroforin siirtymän todennäköisyysjakaumaa (yhtälö (3)).

Mittauspisteiden lukumäärä

Kokeellisen autokorrelaation signaalikohinasuhteeseen merkittävästi vaikuttava tekijä on rekisteröityjen fluktuaatioiden lukumäärä (ks. kohta Kokeellinen autokorrelaatio ja virhelähteet sivulla 12). Tarkkaa korrelaatioanalyysiä varten tyypillinen riittävä määrä mittauksia tietyn ilmiön aiheuttamista fluktuaatioista on esimerkiksi $\sim 10\,000$ [17]. Koska mittaukset voidaan tehdä tasapainotilassa olevalle järjestelmälle, mittaustarkkuutta voidaan CLSM:llä näin ollen lisätä esimerkiksi skannaamalla näytettä useampaan kertaan tai kasvattamalla kuvien kokoa.

Jos näytteessä on mittauspisteiden välillä fluktuaatioiden dynamiikkaan vaikuttavia eroja, kuten kiinteitä rakenteita tai viskositeettieroja, keskimääräinen autokorrelaatio ei suuresta mittauspisteiden määrästä huolimatta välttämättä riitä näytteen karakterisointiin. Paikallista tarkkuutta varten on tällöin joko jaettava kuva pienempiin osiin tai otettava erot huomioon kuvia analysoitaessa. Mittauspisteiden määrän ja kiinteiden rakenteiden vaikutusta RICS-menetelmän mittaustarkkuuteen on käyty tarkemmin läpi esimerkiksi lähteissä [17] ja [1].

2.5.3 Virhetekijät

Kohdassa 2.4.1 käytiin läpi muun muassa mittaustulosten satunnaisuuteen vaikuttavia tekijöitä. Satunnaisvirheen merkitystä voidaan korrelaatio spektroskopiassa kuitenkin pitää vähäisenä, sillä korrelaatioanalyysi perustuu lähtökohtaisesti satunnaisten fluktuaatioiden keskiarvoistamiseen [17]. Alla on eritelty muita, RICS-analyysin kannalta merkittävämpiä virhetekijöitä, jotka vaikuttavat systemaattisesti mitattaviin fluktuaatioihin ja korrelaatioon.

Konfokaalitalan nopeuden muutokset

Tavanomaisella CLSM:llä toteutetussa RICS-mittauksessa virittävää lasersädettä siirretään kuvattavan näytteen sisällä, ja analysoitava rasterikuva muodostuu säteen läpikäymistä pisteistä mitatun fluoresenssin perusteella. Kuvaa varten konfokaalitalaa siirretään rivi kerrallaan, ja skannausnopeus oletetaan vakioksi. Johtuen lasersädettä skannaavien komponenttien fysikaalisista rajoitteista skannausnopeuden vaihtelut ovat kuitenkin mahdollisia.

Lasersäteen liikuttaminen toteutetaan tavallisesti motorisoiduilla peileillä, jotka värähtelevät aksiaalisesti edestakaisin vakiotaajuudella (kuva 3). Edestakais-

ta liikkeestä johtuen peilien kulmanopeus on ajasta riippuvaa, ja vakionopeuksisen skannauksen toteuttamiseksi vain osa ajasta voidaan käyttää näytteen kuvaamiseen. Tästä huolimatta skannausnopeus voi vaihdella yhden kuvan sisällä, mikä on otettava huomioon erityisesti korrelaatioanalyysissä, jossa mittauspisteiden väliset ajat ja etäisyydet vaikuttavat suoraan mittaustuloksiin [31].

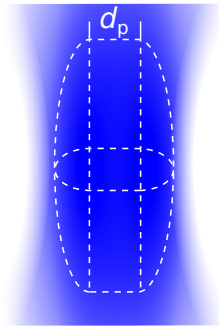
Skannausnopeuden merkitys rasterikuvan muodostamisessa riippuu mitatun fluoresenssisignaalin käsittelytavasta. Jos signaali jaetaan pikseleihin ajan suhteen, skannausnopeuden muutokset johtavat pikselin koon vaihteluihin eli paikasta riippuvaan kuvan venymiseen tai supistumiseen. Toinen vaihtoehto on jakaa signaali konfokaalitalan sijainnin suhteen, jolloin valotusaika (ja mitatun fluoresenssin voimakkuus) riippuu skannausnopeudesta. Skannausnopeuden vaihtelun aiheuttamia vääristymiä voidaan kummassakin tapauksessa vähentää muokkaamalla signaalia jälkikäteen, mutta korrelaatioanalyysiä varten rasterikuvien tulee olla alkuperäisiä, jotta mahdolliset vääristymät voidaan ottaa laskennallisesti huomioon.

Pikselinsisäinen skannausliike

Teoreettinen autokorrelaatiota kuvaava yhtälö (21) on johdettu olettamalla konfokaalitalan muoto täysin virittävän lasersäteen voimakkuusjakaumaa (yhtälö (8)) vastaavaksi. Oletuksen ja siitä johtuvien poikkeamien (ks. kohta 2.3.2) lisäksi RICS-mittauksen teoreettisessa tarkastelussa tehdään tavallisesti yksi merkittävä approksimaatio koskien pikselinsisäistä skannausliikettä.

CLSM:llä toteutetussa RICS-mittauksessa konfokaalitala on jatkuvassa liikkeessä. Jokainen pikseli vastaa näin ollen äärellistä matkaa, jonka konfokaalitala liikkuu valotusajan aikana. Yhdensuuntaisessa skannausliikkeessä konfokaalitala ei tästä syystä ole yhtälön (8) tavoin pyörähdyssymmetrinen vaan skannausuuntaan pidentynyt (kuva 8). Mitä suurempaa pikselin kokoa käytetään, sitä pidemmän matkan konfokaalitala kulkee yhden pikselin kohdalla, ja sitä enemmän todellinen konfokaalitalan muoto poikkeaa yhtälöstä (8).

2FFCS-periaatteen ja mittauspisteen siirtymisen vuoksi konfokaalitalan muodon vaikutus tuloksiin vähenee pikselin koon kasvaessa (eksponentiaalikerroimen merkitys yhtälössä (21) kasvaa). Pikselinsisäisestä skannausliikkeestä johtuen eri pikselin koon arvoilla tehtyjen mittausten vertailukelpoisuuteen tulee kuitenkin suhtautua varauksella. Teoreettisen ja todellisen konfokaalitalan välisen poikkeaa-



Kuva 8. Havainnekuva pikselinsisäisen skannausliikkeen ja pikselin koon d_p vaikutuksesta yhtä pikseliä vastaavan konfokaalitilan todelliseen muotoon (vrt. kuva 4).

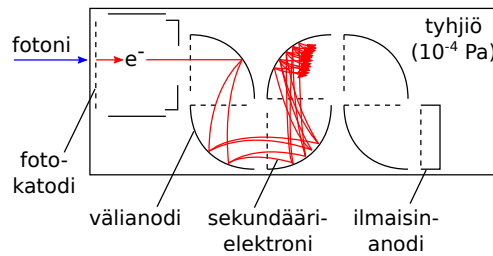
vuuden seurauksena myös absoluuttisten diffuusiokertoimien määrittämisen voidaan olettaa olevan epätarkempaa ja vaativan huolellisia kalibraatiomittauksia. Pikselinsisäisen skannausliikkeen vaikutuksia mittaustuloksiin on tarkasteltu kohdassa 4.2.1.

Ilmaisimen korrelaatio

Ilmaisimen korrelaatiolla viitataan näytteestä riippumattomiin, ilmaisimesta peräisin oleviin korrelaatioihin. Merkittävä ilmaisimen korrelaatio voi aiheuttaa virhettä kokeelliseen autokorrelaatioon sovitettaviin parametreihin, mikäli sitä ei oteta huomioon teoreettisen funktion sovituksessa.

RICS-mittausten kannalta merkittävin ilmaisimen korrelaatio seuraa niin kutsutuista jälkipulssista (*afterpulsing*), joilla tarkoitetaan todellisten fotonien havaitsemista seuraavia virheellisiä havaintoja. Toinen, merkitykseltään vähäisempi ilmaisimen korrelaatioon johtava ilmiö on ns. hukka-aika (*dead time*), eli lyhyin aikaväli, jona kaksi peräkkäistä fonia voidaan havaita. Ilmaisimen saturaatioita aiheuttava hukka-aika on yleensä CLSM:n aikaresoluutioon ($>5 \mu\text{s}$) nähden kuitenkin lyhyt ($< 0,1 \mu\text{s}$), eikä sitä tavallisesti oteta huomioon [51].

Jälkipulssien vaikutus kokeelliseen autokorrelaatioon riippuu käytetystä ilmaisintyypistä. Tämän työn kokeellisessa osuudessa käytetään valomonistusputkea (*photomultiplier tube*, PMT), jossa fotonien havaitseminen perustuu fotokatodilta irtoaviin elektroneihin (kuva 9). Elektronit kiihdytetään monen välianodin kautta niiden irrottaessa samalla anodeista sekundäärisiä elektroneja, jotka lopulta tuottavat mitattavan signaalin. PMT:ssä syntyvät jälkipulssit ovat yleensä seurausta elektronien ionisoimista ja välianodeihin osuvista kaasumolekyyleistä (putken si-



Kuva 9. Lineaarisen valomonistinputken toimintaperiaate [32].

sällä epätäydellinen tyhjiö), jotka irrottavat uusia sekundäärisiä elektroneja. Jälkipulssien syntymiseen vaikuttavat myös esimerkiksi materiaalivirheet ja ilmaisimen toimintalämpötila [52].

Ilmaisintyyppin ja sen ominaisuuksien lisäksi jälkipulssien aiheuttaman korrelaation käyttäytyminen riippuu siitä, miten ilmaisimen tuottama signaali käsitellään. Fotonilaskennassa (ns. *Geiger*-tila) jokaisen fotonin aiheuttama signaali rekisteröidään erikseen, ja mittausdata koostuu esimerkiksi fotonien havaintoajoista [32]. Jälkipulssit tulkitaan tällöin yksittäisinä fotoneina, ja kokeellisessa autokorrelaatiossa ne näkyvät voimakkaana laskuna erittäin lyhyillä korrelaatioajoilla. Verrattuna diffuusion ja sen aiheuttamiin korrelaatioihin jälkipulssit tapahtuvat yleensä huomattavasti nopeammin, ja fotonilaskennalla toteutetussa mittauksessa ilmaisimen korrelaation torjumiseksi riittää yleensä jälkipulsseja vastaavien korrelaatioaikojen poistaminen kokeellisesta autokorrelaatiosta [17]. Ilmaisimen korrelaation vaikutusta voidaan vähentää myös mittaamalla ilmaisimen korrelaatio erikseen ja vähentämällä se näytteen korrelaatiosta [53].

Fotonilaskennan sijaan ilmaisimen tuottamaa signaalia voidaan käsitellä myös analogisesti. Tällöin yhden valotusajan aikana havaittujen fotonien aiheuttamat signaalit integroidaan analogisesti, ja lopputulos eli fluoresenssin voimakkuus yhdessä mittauspisteessä muunnetaan digitaaliseen muotoon. Analogisesta käsittelystä johtuen ilmaisimesta ja integrointipiiristä aiheutuva korrelaatio mittauspisteiden välillä on erilaista ja huomattavasti pitkäkestoisempaa kuin fotonilaskennassa [54, 55]. Kokeellisen autokorrelaation rajaaminen ei tästä syystä välttämättä riitä vertailukelpoisten mittausten tekemiseen, jos ilmaisimen korrelaatio ja diffuusion aiheuttamat flukтуаatiot vastaavat ajallisesti toisiaan. Ilmaisimen korrelaatiota voidaan tällöin yrittää vähentää esimerkiksi valitsemalla valotusaika niin, että se vastaa ilmaisimesta peräisin olevien, mahdollisesti säännöllisten flukтуаatioiden jaksonaikaa. Signaalista voidaan myös suodattaa pois matalat fluore-

senssin voimakkuudet, jolloin ilmaisimen aiheuttamien heikompien fluktuaatioiden merkitys pienenee. Suodattaminen toisaalta lisää kokeellisen autokorrelaation kohinaa, joten kynnyksarvoa ei tule asettaa liian suureksi [56].

Fluoresenssin sammuminen

Fluoresenssin sammumista ja sen vaikutuksia käsiteltiin aikaisemmin kohdassa 2.1. Ilmiötä voidaan pitää yhtenä merkittävimmistä fluoresenssiin perustuvia mittausten menetelmiä rajoittavista tekijöistä. Sen lisäksi että se estää pitkäkestoisten tai monesti toistettavien mittausten tekemisen luotettavasti, herkästi tapahtuva fluoresenssin sammuminen voi RICS-mittauksessa laskea kokeellista autokorrelaatiota pitkällä korrelaatioajoilla. Konfokaalitalan siirtyminen mittauksen aikana toisaalta myös estää hitaasti diffundoituvien fluoroforien jäämistä konfokaalitalaan pidemmäksi aikaa. Rajoittuneemmissa diffuusiojärjestelmissä, joissa fluoroforeja on vähän tai yksittäiset fluoroforit voivat olla pitkiä aikoja altistuneina virittävälle lasersäteelle, fluoresenssin sammuminen tulisi kuitenkin ottaa huomioon tuloksia analysoitaessa. Muutoin virittävän lasersäteen voimakkuus on pidettävä tasolla, jolla fluoresenssin sammuminen ei vaikuta mittaustuloksiin [28].

2.6 Autokorrelaation laskenta numeerisesti

RICS-analyysin tekemiseksi on olemassa valmiita ohjelmistoja, joiden avulla mitatuista CLSM-kuvista voidaan vaivattomasti laskea kokeelliset autokorrelaatiot ja sovittaa teoreettisia funktioita kuvatus järjestelmän karakterisoimiseksi (ks. kohta 4.2.3). Alla on käyty läpi autokorrelaation laskemiseen käytettyjen algoritmien periaatteet. Tässä työssä käytettyä toteutusta on eritelty tarkemmin kohdassa 3.3.

Raa'an voiman algoritmi

Raa'an voiman algoritmi perustuu autokorrelaation laskemiseen numeerisesti suoraan yhtälön (20) perusteella kaavasta (ei normalisointia)

$$G_{\text{raaka}}(\xi, \psi) = \sum_{k=1}^{X-\xi} \sum_{l=1}^{Y-\psi} F_{kl} F_{k+\xi, l+\psi}. \quad (24)$$

Toteutuksen aikavaativuus on $O(XY N_{\xi} N_{\psi})$, missä N_{ξ} ja N_{ψ} ovat laskettavien siirtymien lukumäärät x - ja y -suunnassa. Aikavaativuus vastaa myös normalisoi-

dun autokorrelaation (yhtälö (20)) aikavaativuutta, koska normalisoinnin toteutus on päällekkäisten summien vuoksi vaativuudeltaan matalampi.

Autokorrelaatio Fourier-muunnoksen avulla

Funktion $G_{\text{raaka}}(\xi, \psi)$ laskemista voidaan tehostaa huomattavasti käyttäen hyväksi korrelaatioteoremaa [57]. Tällöin kokeellinen autokorrelaatio voidaan laskea Fourier-muunnosten avulla yhtälöstä

$$G_{\text{DFT}}(\xi, \psi) = \text{DFT}_{\xi\psi}^{-1} \left[\overline{\text{DFT}(ZP(F))} \text{DFT}(ZP(F)) \right], \quad (25)$$

missä diskreetti Fourier-muunnos (*discrete Fourier transform*, DFT) on muotoa

$$\text{DFT}_{kl}(f) = \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} f_{xy} \exp \left[-i2\pi \left(\frac{xk}{X} + \frac{yl}{Y} \right) \right] \quad (26)$$

ja käänteinen DFT muotoa

$$\text{DFT}_{kl}^{-1}(f) = \frac{1}{XY} \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} f_{xy} \exp \left[i2\pi \left(\frac{xk}{X} + \frac{yl}{Y} \right) \right]. \quad (27)$$

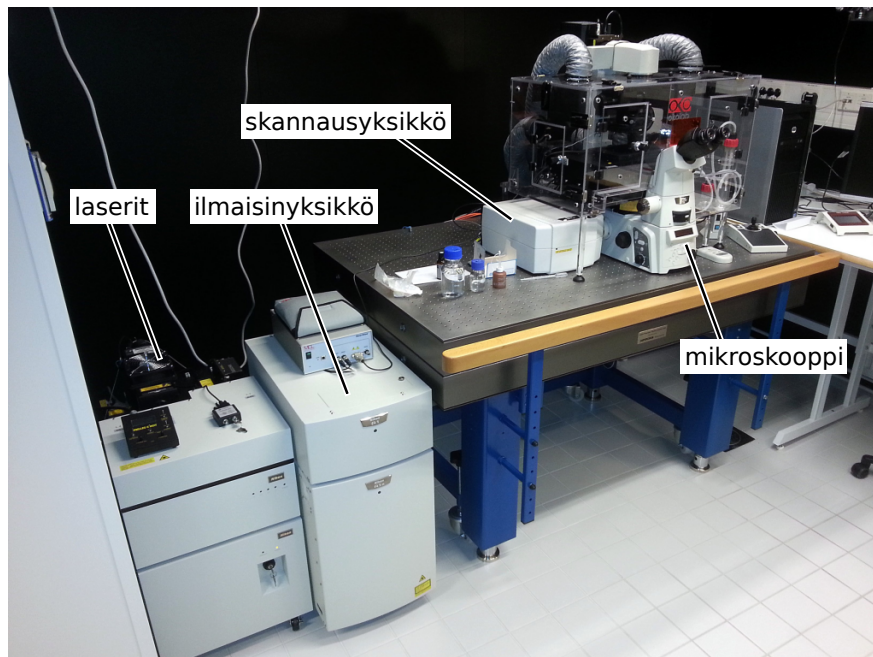
Ylleviivaus tarkoittaa kompleksikonjugaattia ja merkintä $ZP(F)$ kuvan mittauspisteiden täydentämistä nolilla (*zero padding*) siten, että sen leveys ja korkeus ovat vastaavasti $2X$ ja $2Y$. Näin määriteltynä $G_{\text{DFT}}(\xi, \psi)$ vastaa numeerisen tarkkuuden rajoissa täysin raa'an voiman määritelmää $G_{\text{raaka}}(\xi, \psi)$. Korrelaatioteoreema ja yhtälö (25) on johdettu tarkemmin liitteessä A.3.

Autokorrelaation laskeminen yhtälöstä (25) käyttäen yhtälöitä (26) ja (27) ei vielä paranna Fourier-muunnokseen perustuvan algoritmin nopeutta verrattuna raa'an voiman algoritmiin (sama aikavaativuus). DFT voidaan kuitenkin toteuttaa käyttäen ns. nopean Fourier-muunnoksen algoritmeja (*fast Fourier transform*, FFT), joiden avulla kaksiulotteisen DFT:n (ja yhtälön (25)) aikavaativuus on $O(XY \log(X) \log(Y))$. FFT:tä käyttämällä kokeellinen autokorrelaatio voidaan näin ollen laskea merkittävästi nopeammin kuin raa'an voiman algoritmilla.

3 Kokeelliset menetelmät

3.1 Nikon A1R⁺

Tämän työn mittaukset tehtiin Jyväskylän yliopiston Nanotiedekeskuksen so-luviljelytiloihin joulukuussa 2013 asennetulla Nikon A1R⁺ CLSM-järjestelmällä (kuva 10). Mittaukset suoritettiin ilmastoidussa huoneessa vakioämpötilassa 23 °C. Skannausyksikkö ja mikroskooppi olivat värinäeristetyllä pöydällä (1,5×1 m STable, Supertech). Virittävänä aallonpituutena käytettiin argon-laserin (35-IMA-840-019, CVI Melles Griot) 488 nm:n emissioaistaa. Laserputken jännite oli 19,3 mW, ja lasersäteen voimakkuus säädettiin 2,96 %:iin maksimista akusto-optisella säädettävällä suotimella (*acousto-optical tunable filter*, AOTF). Skannausyksikössä käytettiin 405/488-emissiosuodinta, ja skannaus suoritettiin galvanometripeileillä. Rasterikuvan rivien skannaaminen tehtiin samansuuntaisesti vasemmalta oikealle. Mikroskooppina käytettiin Nikon Eclipse Ti-E -mikroskooppia, jossa skannausyksiköstä tuleva valo fokuoitiin näytteeseen 60× ($NA = 1,2$) vesimimmersion-objektiivilla (CFI Plan Apochromat VC, Nikon). Näytteestä emittoituva fluoresenssivalo kerättiin saman objektiivin kautta takaisin skannausyksik-



Kuva 10. Jyväskylän yliopiston Nanotiedekeskuksen Nikon A1R⁺ CLSM-järjestelmä.

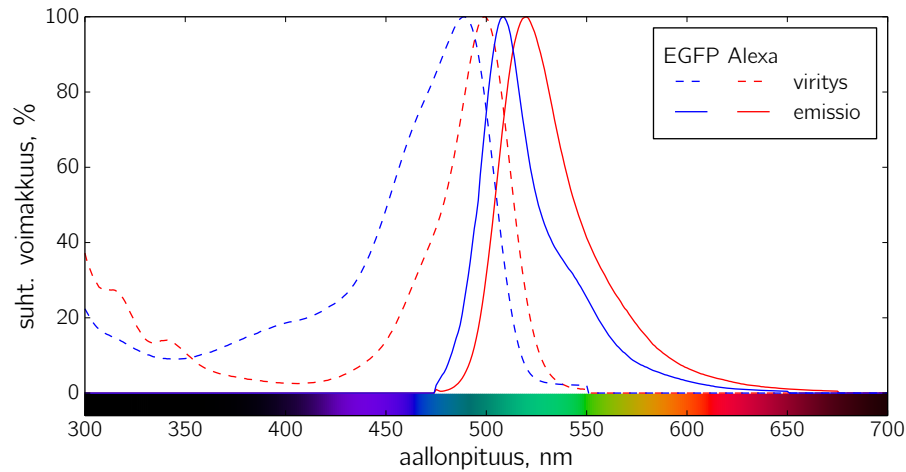
köön, jossa konfokaalisulkijan läpimitaksi asetettiin $39,6 \mu\text{m}$ (valmistajan aallonpituudelle ja objektiiville ohjeistama arvo). Ilmaisinyksikössä valo taitettiin 540 nm ylipäästöpeilillä $515/30 \text{ nm}$ kaistanpäästösuotimen läpi kanavan 1 GaAsP -ilmaisimelle. Ilmaisimen herkkyys (HV) pidettiin arvossa 80 , ja havaintojen kynysarvo ($Offset$) asetettiin nolnaan. Signaalia mitattiin analogisesti; tässä työssä ilmoitetut fluoresenssin voimakkuuden arvot ovat verrannollisia ilmaisimen tuotamaan anodivirtaan [32]. Järjestelmää käytettiin Windows 7 PC:lle asennetun NIS Elements -ohjelmiston kautta (versio 4.20.01, Laboratory Imaging).

3.2 Liuosmittaukset

Suurin osa tämän työn mittauksista tehtiin käyttäen fluoroforina *E*-kolibakteereista eristettyä polyhistidiinileimattua parannettua vihreää fluoresoivaa proteiinia (*his-tagged enhanced green fluorescent protein*, His-EGFP). Mitatut EGFP-näytteet sisälsivät 1% BSA:ta (*bovine serum albumin*), jolla estettiin proteiinin tarttumista borosilikaattikyvetin (155411 , Lab-tek) sisäpintaan (alhainen BSA-pitoisuus ei vaikuta EGFP:n diffuusiokertoimeen [58]). Viskositeettia ja diffuusion nopeutta säädeltiin muuttamalla liuoksen glyserolipitoisuutta [59]. Kaikissa mittauksissa konfokaalitila kohdistettiin noin $200 \mu\text{m}$:n etäisyydelle kyvettilasin yläpinnasta. Mittauksissa käytettyjen näytteiden tilavuus oli $200 \mu\text{l}$.

Toinen käytetty fluorofori oli Alexa Fluor 488 (A20000, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Ennen mittauksia Alexa 488:n annettiin olla veteen liuenneena vähintään 24 tuntia sukkinimidyyliesterien hydrolysoitumiseksi [60]. Alexa 488:n ja EGFP:n viritys- ja emissiospektrit on esitetty kuvassa 11. Molempien fluorofoorien mittaamiseen käytettiin samoja mittauseräparametreja, ja fluoroforeja mitattiin aina vuorotellen laitteiston sisäisten muutosten, kuten lämpötilan, vaikutusten minimoimiseksi.

Liuosten fluoroforipitoisuudet määritettiin Nanodrop ND-1000 spektrofotometrillä käyttäen absorptiokertoimina EGFP:lle $55\,000 \frac{1}{\text{M cm}}$ [61] ja Alexa 488:lle $73\,000 \frac{1}{\text{M cm}}$ [62]. RICS-mittauksia varten liuokset laimennettiin ionivaihdetulla vedellä pitoisuuksiin 53 nM (EGFP) ja 55 nM (Alexa 488), jolloin konfokaalitilassa samanaikaisesti havaittujen fluorofoorien määrä oli noin 10 .



Kuva 11. EGFP:n ja Alexa 488:n viritys- ja emissiospektrit [63]. EGFP:n viritys- ja emissiomaksimien aallonpituudet ovat 489 ja 508 nm, ja Alexa 488:n vastaavasti 499 ja 520 nm.

3.3 RICS-analyysi

Mikroskoopilla otetut rasterikuvat rajattiin kohdassa 4.1.2 esitetyllä tavalla skannausnopeuden muutosten vaikutusten torjumiseksi. Kuvista laskettiin yhtälön (20) mukaiset kokeelliset autokorrelaatiot itse kirjoitetulla Python-/Cython-ohjelmalla [64, 65] käyttäen kohdassa 2.6 esitettyä FFT-menetelmää. Fouriermuunnosten laskeminen toteutettiin pyFFTW-kirjastolla [66]. Laskennan nopeuttamiseksi kuvien käsittely ja erityisesti autokorrelaation normalisointi toteutettiin Cython-ohjelmointikielellä ja käyttäen NumPy-kirjaston [67] luokkia ja metodeja. Autokorrelaatiot laskettiin yksiulotteisena ($\psi = 0$), koska mitattujen fluoroforien diffuusionopeus oli huomattavasti suurempaa kuin y -akselilla käytetyt skannausnopeudet.

Teoreettisen mallin sovitusta varten yhtälöön (21) lisättiin vakiotermin kuvaamaan mittausten taustakohinaa. Sovitus toteutettiin SciPy-kirjaston [68] ODR-algoritmeilla. Autokorrelaatioille lasketut keskihajonnat pysyivät korrelaatioajan suhteen likimain vakiona, joten sovituksessa ei käytetty ylimääräistä mittauspisteiden painotusta. Riippuen mittausparametreista ilmaisimen korrelaation vaikutusta pyrittiin vähentämään poistamalla sovitettavasta datasta lyhyimpiä korrelaatioaikoja vastaavia pisteitä.

4 Tulokset

4.1 Nikon A1R⁺:n soveltuvuus RICS-mittauksiin

4.1.1 Mittausparametrit

RICSin kannalta tärkeiden mittausparametrien säätömahdollisuudet on toteutettu A1R⁺:ssa melko hyvin. Pienin käytännöllinen pikselin koko on 0,2 nm, mikä vastaa konfokaalitalan kokoon ($w \approx 300$ nm) nähden melkein paikallaan pysyvää mittausta. RICS-mittauksessa voidaan näin ollen käyttää lähes FCS:ää vastaavaa ylinäytteistystä. Pikselin koon maksimiarvo riippuu käytetystä resoluutiosta (esim. 64 pikselin resoluutiolla 3,28 μm tai 4096 pikselin resoluutiolla 0,05 μm), mutta suurennuskertoimen (*zoom*) säätö mahdollistaa pikselin koon valinnan erittäin joustavasti. Suurennuskertoimen mahdolliset arvot ovat $1000/n$, missä n on kokonaisluku väliltä [1,1000].

Käytettävissä olevat resoluutiot kasvavat 64:stä (64×64 pikseliä) kahden potensseina 4096:een asti. A1R⁺:lla voidaan täten tarkastella teoriassa suurtakin aluetta pikselin koon ollessa melko pieni. Esimerkiksi pikselin koon arvolla 50 nm ja resoluutiolla 1024 voidaan kattaa näytteestä läpimitaltaan yli 50 μm :n suorakulmainen alue.

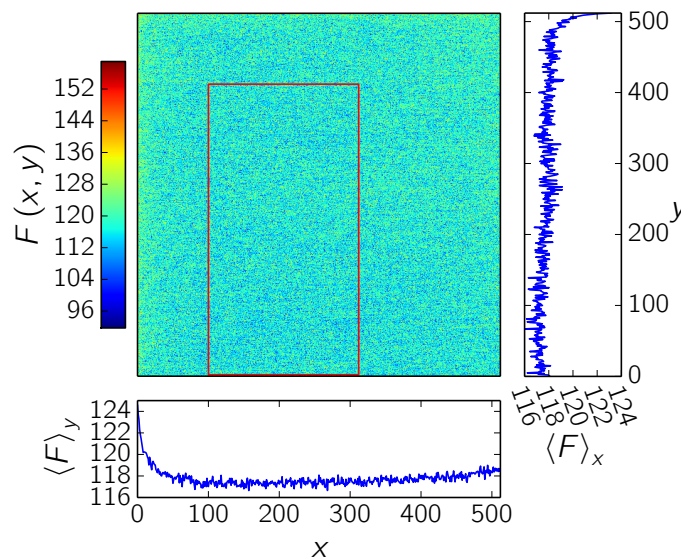
Pikselin valotusajan säätäminen ei A1R⁺:ssa ole yhtä joustavaa, sillä mahdolliset valotusajan arvot riippuvat valitusta resoluutiosta merkittävästi. Esimerkiksi resoluution 4096 käyttäminen RICS-sovelluksiin on erittäin rajoittunutta, koska valotusajaksi voi valita vain hyvin pieniä arvoja 1 ja 1,5 μs . Käytetyllä ilmaisimella kyseiset valotusajat olisivat aivan liian lyhyitä riittävän signaalin mittaamiseksi, minkä lisäksi diffuusiomittauksissa skannausnopeuden pitämiseksi tarpeeksi matalana pikselin koko pitäisi asettaa erittäin pieneksi (ks. kohta Optimaalinen skannausnopeus sivulla 19). Valotusajan ja resoluution välinen riippuvuus estää näin ollen suurimpien resoluutioiden käytön RICS-mittauksissa.

Pienemmillä resoluutioilla mahdollisia valotusaikoja on enemmän ja pidempiä. Esimerkiksi resoluutiolla 512 on mahdollista valita 7 eri valotusajasta väliltä 2,2–117 μs . Yhtään tiettyä valotusajan arvoa ei ole kahdella eri resoluutiolla, minkä vuoksi eri resoluutioilla saatuja tuloksia ei voida täysin vertailla keskenään. RICS-mittausten kannalta valotusajoissa on kuitenkin riittävästi valinnanvaraa, sillä resoluutio ei lopulta vaikuta muuhun kuin yhden kuvan mittauspisteiden määrään (ja skannausnopeuteen, ks. kohta 4.1.2).

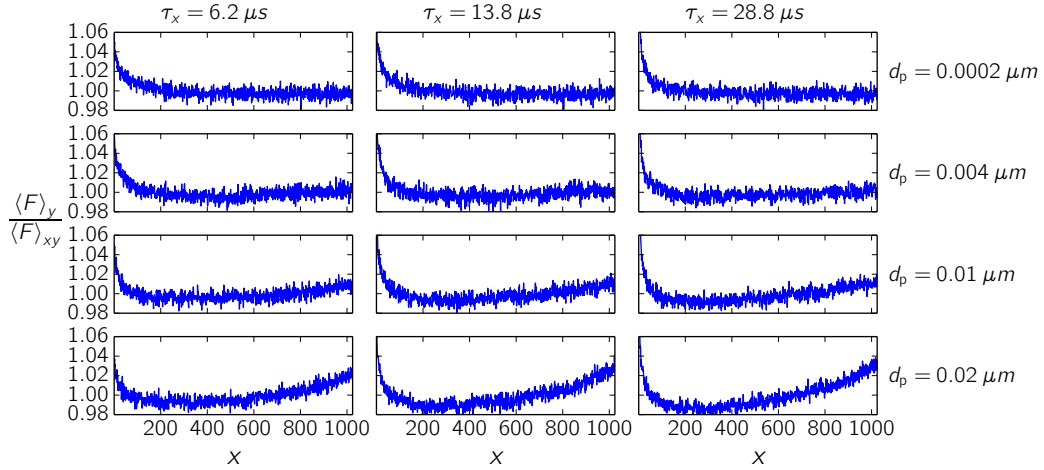
RICS-menetelmällä voidaan suorittaa mittauksia myös yksiulotteisesti skannaamalla näytettä vain yhtä vaakasuuntaista viivaa pitkin (kohta 2.5). Viivakuvaus on mahdollista myös A1R⁺:lla, mutta ominaisuus on RICSin kannalta käytännössä hyödytön, koska pikselin koko on tällöin lukittu maksimiarvoonsa. A1R⁺:lla on kuitenkin mahdollista myös kaistakuvaus, jossa rasterikuvan korkeuden voi valita käytettävissä olevista resoluutioista (vähintään 32 pikseliä). Rasterikuvaukseen verrattuna kaistakuvauksella saavutetaan viivakuvauksen tavoin paikallisempi mittaus mahdollistaen kuitenkin pikselin koon säädettävyyys. Paikallisuutta voidaan toisaalta lisätä myös tavallisessa rasterikuvauksessa tekemällä korrelaatioanalyysi vain tietystä osasta kuvaa.

4.1.2 Skannausnopeuden muuttuminen

Rasterikuvauksen aikana tapahtuvia konfokaalitalan liikenopeuden muutoksia käsiteltiin kohdassa 2.5.3. Ilmiön tutkimiseksi A1R⁺:lla korkean pitoisuuden EGFP-liuosta kuvattiin vaihtelemalla skannaavien peilien liikkeeseen vaikuttavien mitausparametrien arvoja (resoluutio, valotusaika ja pikselin koko). Mitattuja fluoresenssin voimakkuusjakaumia on esitetty kuvissa 12 ja 13.



Kuva 12. EGFP-liuoksesta (53 nM) kuvatun 100 rasterikuvan (resoluutio 512) fluoresenssin voimakkuuskeskiarvo $F(x,y)$ ja x - sekä y - akselien suhteen lasketut keskiarvot $\langle F \rangle_x$ ja $\langle F \rangle_y$. Mittausparametrit olivat $\tau_x = 9,5 \mu s$ ja $d_p = 20$ nm. Kuvaan on merkitty myös esimerkkirajaus, jota voitaisiin käyttää merkittävimpien skannausnopeuden muutosten vaikutusten poistamiseksi.



Kuva 13. EGFP-liuksesta (167 nM) mitatut normitetut keskimääräiset fluoresenssin voimakkuusjakaumat x -suunnassa kolmella eri valotusajan τ_x ja neljällä eri pikselin koon d_p arvolla. Jokainen jakauma on keskiarvo 20 erillisestä rasterikuvasta.

Virheettömässä mittauksessa homogeenisesta liuksesta kuvatussa rasterikuvassa fluoresenssin keskimääräinen voimakkuus on täysin tasainen. A1R⁺:lla otetuissa kuvissa voimakkuus kuitenkin kasvaa erityisesti kuvan vasemmalla ja oikealla reunalla, mikä osoittaa selkeästi skannausnopeuden muuttumisen. Pystysuunnassa voimakkuusjakauman havaittiin olevan suhteellisen tasainen, ja jakauma y -akselilla pysyi lähes samana huolimatta mittaussparametreista. Nopeammalla x -akselilla parametreja muuttamalla pystyttiin vaikuttamaan merkittävästi voimakkuusjakauman käyttäytymiseen (kuva 13).

Resoluution kasvaessa (pikselin koko ja valotusaika pysyvät vakiona) lasersädettä ohjaavat peilit kääntyvät suuremman kulman yhden viivan skannaamiseksi. A1R⁺:ssa keskimääräisen fluoresenssin voimakkuusjakauman tasaisuuden havaittiin riippuvan suhteellisen vähän kuvan resoluutiosta. Jakauman tasaisuus x -suunnassa oli kuitenkin selkeästi verrannollinen kuvan resoluutioon niin, että tasaisen alueen osuus kuvasta oli suurin pienimmillä resoluutioilla. Resoluution kasvaessa toisaalta myös mittauspisteiden määrä kasvaa, ja tasaisena pysyvän alueen koon havaittiin pysyvän käytännössä vakiona.

Pikselin koon vaikutukset x -suunnan voimakkuusjakaumaan ovat vastaavasti selitettävissä skannaavien peilien dynamiikalla. Resoluution suurenemisen tavoin peili kääntyy pikselin koon kasvaessa suuremman kulman, jolloin epätasaisen alueen osuus kasvaa (ks. kohta Konfokaalitalan nopeuden muutokset sivulla 21). Seu-

rauksena nopeuden muutoksista aiheutuvat kuvan sisäiset valotusajan muutokset korostuvat kuvan reunoilla (kuva 13).

Ottaen huomioon, että valotusajan vaikutus skannausnopeuteen on sama kuin pikselin koolla (skannausnopeus $= \frac{d_p}{\tau_x}$), valotusajan vaikutusta skannausnopeuden epätasaisuuteen voidaan pitää yllättävän vähäisenä. Fluoresenssin voimakkuusjakauman ja valotusajan välisen riippumattomuuden perusteella voidaan päätellä, että skannausnopeuden epätasaisuuteen ei vaikuta niinkään skannausnopeus itse, vaan enemmänkin kokonaiskulma, jonka skannauspeilit kääntyvät kuvan sisällä. Ottaen huomioon myös resoluution vaikutukset voidaan yleisesti todeta, että A1R⁺:lla toteutetuissa mittauksissa skannauspeilien kuvansisäisen kääntymiskulman kasvu johtaa suurempiin vaihteluihin mitatussa fluoresenssijakaumassa.

Skannausnopeuden muutoksista aiheutuvat kuvansisäiset erot mitatussa fluoresenssin voimakkuudessa pysyivät kaikissa tapauksissa alle 10 %:ssa tasaisena pysyvän alueen keskimääräisestä voimakkuudesta. Muutosten vaikutusta mittauksista laskettavaan autokorrelaatioon voidaan tarkastella mittauksessa havaittujen fluktuaatioiden avulla. Esimerkiksi 7 %:n poikkeama valotusajassa johtaa yhtäsuureen virhetulkintaan fluktuaatioiden kestossa, ja lisäksi valotusajan aiheuttamat erot fluoresenssin voimakkuudessa johtavat virheelliseen fluktuaatioiden painottamiseen kokeellisessa autokorrelaatioissa. Tästä syystä autokorrelaatio tulisi laskea ainoastaan siitä rasterikuvan osasta, jossa konfokaalitilan kiihtyvyys on vähäisintä ja mitattu fluoresenssi pysyy likimain vakiona. Esimerkkirajaus on esitetty kuvassa 12.

4.1.3 GaAsP-ilmaisimien

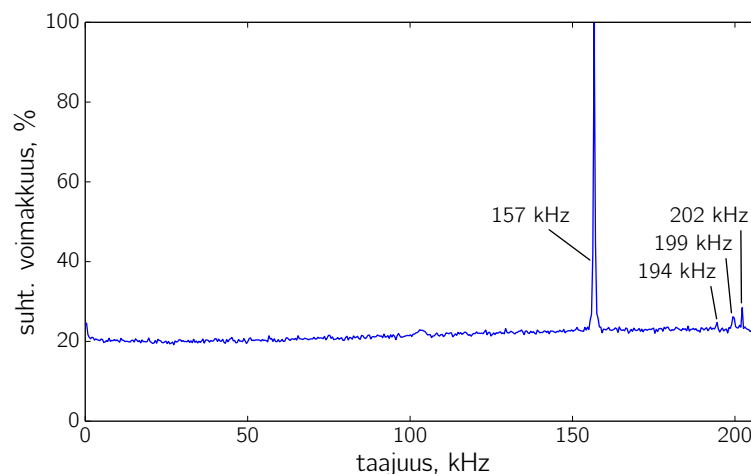
Mittauksissa käytetyn GaAsP-valomonistinputken tuottaman signaalin mittaaminen on A1R⁺:ssa toteutettu analogisesti (ks. kohta 2.5.3). Fotonilaskentaa ei ilmaisimella ole tehty mahdolliseksi, mikä osoittautui yhdeksi merkittävimmistä RICS-mittauksia rajoittavista tekijöistä. Kaikissa järjestelmällä tehdyissä mittauksissa voidaan näin ollen olettaa olevan jonkin verran ilmaisimen korrelaatiota, minkä vuoksi tuloksia ei täysin pystytty varmentamaan.

Ilmaisimesta peräisin olevan häiriösignaalin käyttäytymistä tarkasteltiin tekeillä mittauksia ilman näytettä. Virittävä laser kytkettiin pois päältä, konfokaalisulkija pienennettiin minimiin ja ilmaisimelle valoa ohjaavat peilit käännettiin

pois. Huone pimennettiin ja mikroskoopilla kuvattiin 20 rasterikuvaa resoluutiolla 1024 eri valotusajoilla.

Valotusajalla $2,4 \mu\text{s}$ mitatun signaalin taajuuspektri on esitetty kuvassa 14. Taustakohinan lisäksi kuvaajasta voidaan erottaa selkeä noin 157 kHz:ssä oleva taajuuspiikki sekä kolme pienempää noin 200 kHz:n piikkiä. Korkeimman taajuuspiikin voimakkuuden ja taajuuden havaittiin madaltuvan huomattavasti valotusajan kasvaessa, joten sen merkitystä voidaan pitää vähäisenä suuremmilla valotusajoilla ($>5 \mu\text{s}$). Heikompien 200 kHz:n piikkien voimakkuus oli kuitenkin likimain riippumaton valotusajasta, joten niitä vastaavien, jaksonajaltaan noin $5 \mu\text{s}$ värähtelyjen, voidaan olettaa olevan läsnä useimmissa mittauksissa ja vaikuttavan kokeelliseen autokorrelaatioon.

Valkoisesta kohinasta poikkeavien taajuuskomponenttien fysikaalista alkuperää ei tämän työn puitteissa kyetty tarkemmin selvittämään. Koska mitattu signaali sisälsi käytännössä ainoastaan ilmaisimen tuottamaa häiriötä ilman todellisia havaittuja fotoneja, taajuuspiikeissä voi olla kysymys esimerkiksi analogisen signaalinkäsittelyn aiheuttamasta virhesignaalista. Ilmaisimen korrelaatiota voidaan tällöin yrittää vähentää esimerkiksi valitsemalla valotusaika moninkertaisesti suuremmaksi kuin ilmaisimesta aiheutuvien värähtelyjen jaksonaika, jolloin ilmaisin ehtii paremmin normalisoitua mittauspisteiden välillä. Havaittujen ilmaisimen värähtelyjen aikaskaalaa vastaavien flukтуаatioiden autokorrelaatiotarkasteluun



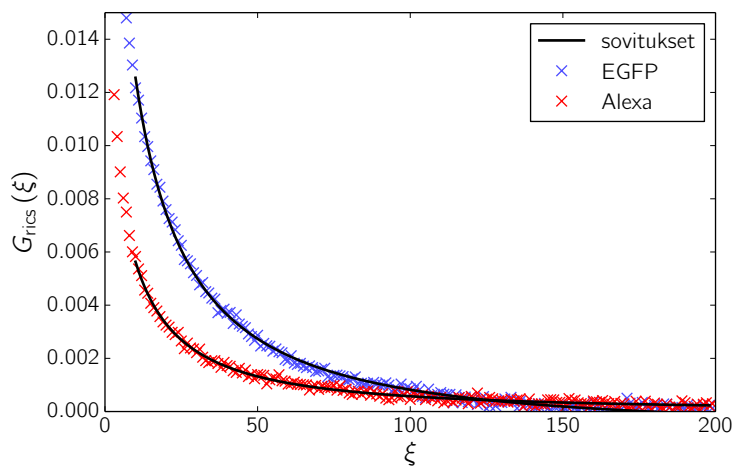
Kuva 14. Valotusajalla $2,4 \mu\text{s}$ mitatun pimeän kohinan taajuuspektrin (Fourier-komponenttien jakauman) keskiarvo 20:sta resoluutiolla 1024 otetusta kuvasta.

tulee joka tapauksessa suhtautua varauksella, ja ilmaisimen korrelaation voidaan olettaa häiritsevän esimerkiksi nopeasti diffundoituvien fluoroforien mittaamista.

Taajuuspiikkien lisäksi ilmaisimen käyttäytymisessä havaittiin myös toinen epätarkkuutta aiheuttava tekijä. Eri käyttökertojen välillä saattoi olla moninkertaisia vaihteluja ilmaisimelle mitatussa pimeän kohinan tasossa. Kohinan muuttuminen on valmistajan mukaan käytetylle ilmaisintyypille normaalia, mikä tekee esimerkiksi pimeän kohinan karakterisoinnista vaikeaa. Yksittäisten mittausten aikana merkittäviä muutoksia ei tässä työssä havaittu, mutta eri aikoina suoritettuja mittauksia ei ilmiön vuoksi voida pitää täysin vertailukelpoisina. Mikäli pimeästä kohinasta tehtyjä mittauksia on tarkoitus käyttää esimerkiksi varsinaisten mittaustulosten sisältämien virheiden korjaukseen, tulisi ilmaisimen tuottama virhesignaali tästä syystä määrittää ajallisesti mahdollisimman lähellä itse näytteestä tehtäviä mittauksia.

4.1.4 Liuosmittaukset

A1R⁺:n RICS-soveltuvuuden tutkimiseksi verrattiin toisiinsa EGFP- ja Alexa 488-liuoksista kuvattuja rasterikuvia. Kuvista lasketut kokeelliset autokorrelaatiot ja yhtälön (21) sovitukset on esitetty kuvassa 15. Alexa 488:sta otetusta kuvasta laskettuun autokorrelaatioon tehtiin sovitus parametrien $\langle n \rangle$, w suhteen kiinnittäen



Kuva 15. EGFP- ja Alexa 488 -näytteistä lasketut kokeelliset autokorrelaatiot (yhtälö (20)) ja yhtälön (21) sovitukset. Näytteistä otettiin 10 kuvaa resoluutiolla 1024, valotusajalla 13,8 μ s ja pikselin koolla 10 nm. Keskimääräinen havaitun fluoresenssin voimakkuus oli noin 100.

diffuusiokerroin kirjallisuusarvoon $414 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ [12] (ja rakenneparametri k arvoon 3 [1]). Saatua w :n arvoa käytettiin sitten EGFP:n autokorrelaation sovituksessa diffuusiokertoimen määrittämiseksi.

Koska mittausparametrit ovat kummassakin mittauksessa samat, EGFP:lle tällä tavalla määritetyn diffuusiokertoimen pitäisi RICS-menetelmän teoreettisten oletusten nojalla olla lähellä kirjallisuusarvoa $87 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ [69]. Sovituksesta saatu EGFP:n diffuusiokertoimen arvo $280 \pm 40 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ poikkeaa tästä kuitenkin merkittävästi. Vastaavia tuloksia, joissa sovitetut diffuusiokertoimien arvot eivät vastanneet teoreettisia arvioita, saatiin muissakin mittauksissa ja riippumatta mittausparametreista. Toisinaan teoreettisen autokorrelaatiofunktion sovittaminen tyydyttävästi kokeelliseen dataan oli jopa mahdotonta, vaikka diffuusiokerroin olisi kiinnitetty kirjallisuusarvoonsa. Mittausten voidaan täten olettaa sisältävän systemaattista virhettä.

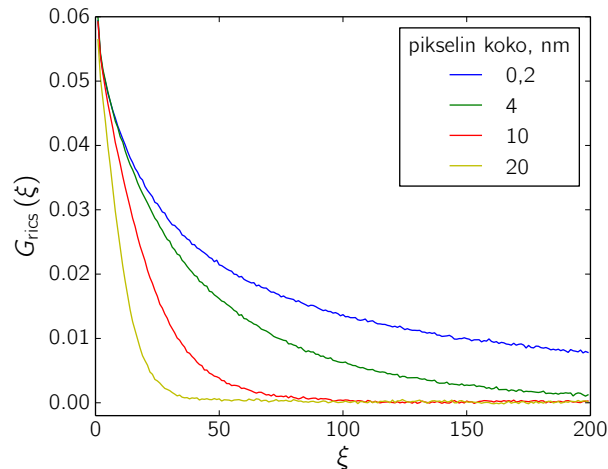
Mahdollisia virhelähteitä ovat esimerkiksi ilmaisimen korrelaatio ja virheelliset oletukset näytteiden ominaisuuksista. Aggregoitumisesta johtuva Alexa 488:n diffuusiokertoimen lasku on kuitenkin epätodennäköistä alhaisen pitoisuuden ja hyvän vesiliukoisuuden vuoksi. Diffuusiota nopeuttavat rakenteelliset muutokset EGFP:ssä eivät myöskään voi selittää poikkeamaa, koska ne samalla estäisivät fluoresenssin. Fluoresenssin sammumisen mahdollisuus suljettiin pois sovittamalla autokorrelaatioon artikkelissa Widengren ym. (1996) [28] esitetyllä tavalla korjattu autokorrelaatiofunktio; sammumista kuvaavalle aikavakiolle ei sovitukselta saatu positiivisia arvoja. Kohdassa 4.1.3 havaittuja GaAsP-ilmaisimen ja analogisen signaalinkäsittelyn aiheuttamia vääristymiä ja korrelaatioita voidaan näin ollen pitää todennäköisimpänä syynä mittaustulosten virheellisyydelle.

4.2 Yleisiä huomioita RICS-menetelmästä

4.2.1 Pikselinsisäinen skannausliike

Pikselinsisäisen skannausliikkeen (ks. kohta 2.5.3) vaikutusta mittaustuloksiin kehitettiin tekemällä mittauksia 53 nM EGFP-liuokselle eri pikselin koon arvoilla. EGFP:n diffuusion hidastamiseksi liuos sisälsi 55 m-% glyserolia, joka yhtälön (6) mukaisesti pienentää diffuusiokerrointa noin 8-kertaisesti puhtaaseen veteen verrattuna [59]. Teoreettiseksi diffuusiokertoimeksi saadaan tällöin $11,2 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$.

Kokeelliset autokorrelaatiot neljällä eri pikselin koon arvolla tehdyille mittaukselle on esitetty kuvassa 16. Yhtälö (21) sovitettiin autokorrelaatioihin konfokaa-



Kuva 16. Kokeellisen autokorrelaation (yhtälö (20)) käyttäytyminen neljällä eri pikselin koolla. Jokaisella pikselin koolla näytteestä (53 nM EGFP, 55 m-% glyseroli) otettiin 20 kuvaa resoluutiolla 1024 ja valotusajalla 13,8 μ s.

lisäteen w suhteen kiinnittäen diffuusiokerroin teoreettisesti määritettyyn arvoon. Sovituksista saadut konfokaalisäteen arvot olivat tällöin selkeästi verrannollisia pikselin kokoon, mikä viittaisi pikselinsisäisen skannausliikkeen konfokaalitiilaa suurentavaan vaikutukseen (ks. kuva 8).

Saatujen tulosten uskottavuus on kuitenkin kyseenalainen, sillä niiden mukaan konfokaalisädettä kymmenen kertaa pienempi pikselin koon kasvu johtaisi konfokaalisäteen kaksinkertaistumiseen. Tehdyissä sovituksissa oli myös nähtävissä systemaattista poikkeamaa kokeellisesta autokorrelaatiosta, minkä perusteella teoreettinen yhtälö ei täysin kuvannut kokeellisia tuloksia. Ottaen lisäksi huomioon kohdissa 4.1.3 ja 4.1.4 käsitellyt virhelähteet ja teoreettisista arvioista merkittävästi poikkeavat tulokset, kuvan 16 autokorrelaatioiden voidaan olettaa olevan samalla tavoin virheellisiä. Sovituksista saaduista ristiriitaisista tuloksista ei täten voida tehdä tarkkoja päätelmiä pikselin koon vaikutuksista konfokaalitiilan muotoon ja RICS-mittauksiin.

4.2.2 Skannausnopeuden optimointi

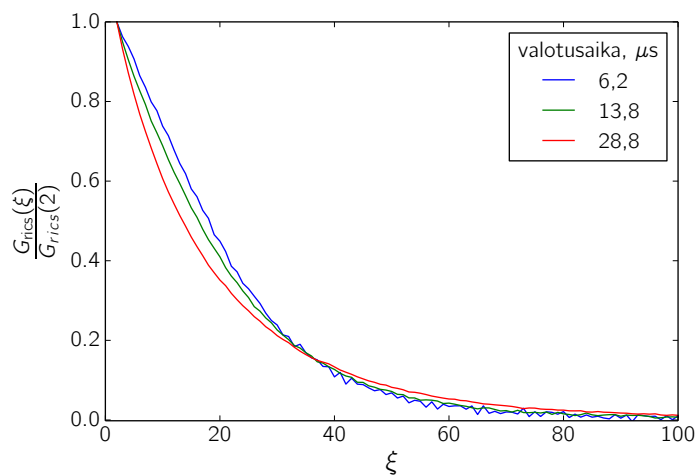
Pikselin koko

Skannausnopeuden merkitystä autokorrelaation käyttäytymiseen tutkittiin samalla glyseroli-EGFP-liuoksella kuin kohdassa 4.2.1. Pikselin koon vaikutus on esitetty kuvassa 16. Kuvaajista nähdään kuinka autokorrelaatio kapenee kääntäen

verrannollisesti pikselin kokoon nähden. Käyttäytyminen vastaa teoreettista yhtälöä (21), jossa pikselin koko d_p vaikuttaa ainoastaan eksponentin skaalautumiseen kertoimessa $g_s(\xi)$. Pienemmillä pikselin koon arvoilla eksponentin vaikutus autokorrelaatiofunktion muotoon on vähäisempi. Tällä ns. FCS-rajalla konfokaalisäteen w kiinnittäminen teoreettisen funktion sovituksessa on huomattavasti tärkeämpää, koska autokorrelaatio riippuu käytännössä vain suhteesta $\frac{D}{w^2}$. Autokorrelaatiofunktion (21) sovittaminen esimerkiksi kuvan 16 autokorrelaatioihin sekä w :n että diffuusiokertoimen D suhteen toimi vain kahdella suuremmalla pikselin koolla. Kaikissa tapauksissa w :n kiinnittäminen oli kuitenkin edellytys tulosten välisten erojen ja virhearvioiden pitämiseksi kohtuullisina, johtuen esimerkiksi konfokaalitalan muodon approksimaatioista.

Valotusaika

Valotusajan vaikutus mittauksista laskettuihin autokorrelaatioihin on esitetty kuvassa 17. Koska pikselin koko on mittauksissa vakio, kuvaajien erot johtuvat ainoastaan diffundoituvien fluoroforien käyttäytymisestä ajan suhteen. Pidemmillä valotusajoilla autokorrelaatio laskee alussa nopeammin ja lopussa hitaammin. Fluoroforit diffundoituvat toisin sanoen nopeammin pois konfokaalitalasta ja flukтуаatiot ovat lyhyitä verrattuna valotusaikaan, mutta myöhemmin yksittäisellä



Kuva 17. Kokeellisen autokorrelaation (yhtälö (20)) käyttäytyminen kolmella eri valotusajalla. Autokorrelaatiot on normalisoitu käyttäytymiserojen erottumiseksi. Jokaisella valotusajalla näytteestä (53 nM EGFP, 55 m-% glyseroli) otettiin 20 kuvaa resoluutiolla 1024 ja pikselin koolla 10 nm.

fluoroforilla on pitkästä valotusajasta johtuen suurempi todennäköisyys aiheuttaa korrelaatiota. Kaksisuuntaisesta vaikutuksesta johtuen valotusaika soveltuu paremmin autokorrelaation amplitudin ja signaalikohina-suhteen säätämiseen kuin keskenään korreloivien mittauspisteiden määrän muuttamiseen (vrt. pikselin koko).

Optimaalinen skannausnopeus

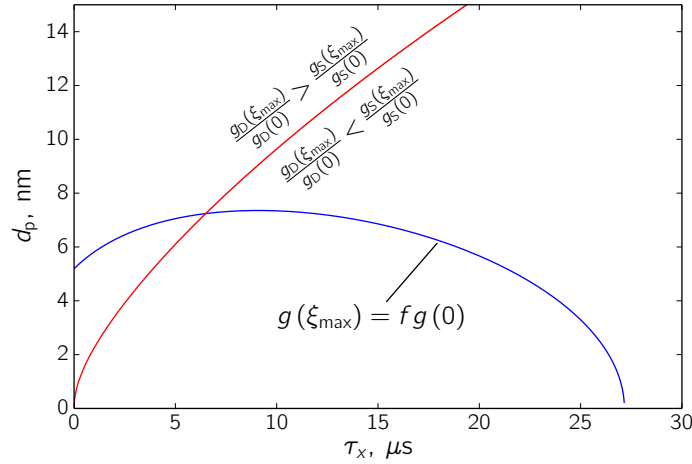
Diffuusiokertoimen määrittystä varten skannausnopeuteen vaikuttaville mittausparametreille voidaan asettaa kaksi tavoitetta. Ensinnäkin autokorrelaation käyttäytymisen tulee olla sellaista, että teoreettisen funktion sovittaminen voidaan tehdä mahdollisimman tarkasti. Toiseksi, luotettavaa sovitusta varten diffuusiio- ja skannausnopeuksien tulee vastata toisiaan (ks. kohta 2.5.2).

Yhtälön (21) sovittamisen kannalta kokeellisen autokorrelaation sisältämä tieto mitatusta järjestelmästä riippuu autokorrelaation käyttäytymisestä. Sekä liian nopea että liian hidas autokorrelaation lasku johtavat diffuusiokertoimen määrittelyn epätarkkuuteen. Optimaaliset mittausparametrien arvot voidaan täten määrittellä esimerkiksi niin, että niillä tehdyssä mittauksessa autokorrelaatio laskee sopivan määrän määrittelyvälillä $[\xi_{\min}, \xi_{\max}]$. Arvojen määrittämiseksi voidaan teoreettisesta autokorrelaatiofunktioista (yhtälö (21), $\psi = 0$) nyt johtaa yhtälö

$$d_p = \frac{w}{\xi_{\max}} \sqrt{\left(1 + \frac{4D}{w^2} \tau_x \xi_{\max}\right) \ln \left[f \left(1 + \frac{4D}{w^2} \tau_x \xi_{\max}\right) \sqrt{1 + \frac{4D}{w^2} k^{-2} \tau_x \xi_{\max}} \right]}, \quad (28)$$

missä ξ_{\max} on sen siirtymän arvo, jolla $g(\xi_{\max}) = fg(0)$. Yhtälön avulla voidaan määrittää mittausparametrit sen perusteella, miten autokorrelaatiofunktion halutaan käyttäytyvän. Esimerkiksi jos autokorrelaatiofunktion on tarkoitus laskea 5 %:iin ($f = 0,05$) siirtymän arvolla $\xi_{\max} = 100$, yhtälöstä (28) saadaan optimaalinen skannausnopeus $d_p(\tau_x)$ tietylle diffuusiokertoimen arvolle. Yhtälön (28) kuvaaja on esitetty kuvassa 18.

Kuvasta 18 voidaan nähdä, kuinka pikselin kokoa pitää odotetusti kasvattaa valotusajan kasvaessa, jotta skannausnopeus pysyisi autokorrelaatiofunktion kannalta optimaalisena. Pidemmällä valotusajoilla verrannollisuus kääntyy kuitenkin päinvastaiseksi, koska autokorrelaatiota ei ensisijaisesti vähennä konfokaalitalan liike vaan fluoroforien nopea diffundoituminen pois konfokaalitalasta. Jos valo-



Kuva 18. Yhtälöiden (28) (sininen) ja (29) (punainen) kuvaajat. Parametrien arvot ovat $\xi_{\max} = 100$, $f = 0,05$, $D = 100 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, $w = 300 \text{ nm}$ ja $k = 3$.

tusaikaa pidennetään lisää, on pikselin kokoa näin ollen pienennettävä autokorrelaation nopean laskun estämiseksi.

Toinen kuvaajasta esille tuleva asia on pikselin koon äärellinen minimiarvo lyhyillä valotusajoilla. Hyvin pienillä pikselin koon arvoilla diffuusion aiheuttama autokorrelaatio laskee toisin sanoen erittäin hitaasti, koska konfokaalitila pysyy käytännössä paikallaan, vaikka valotusaika olisi lähellä nollaa. Tästä syystä liian suuresta ylinäytteistyksestä ei ole sovituksen kannalta hyötyä, mikäli resoluutiota ei voida kasvattaa ja autokorrelaatiota laskea useammalla siirtymän ξ arvolla ($\xi \ll X$ yhtälössä (20)).

Kohdassa 2.5.2 todettiin, että erityisesti diffuusiokertoimen määrittämisen kannalta diffuusio- ja skannausnopeuksien vastaavuus on tärkeää. Autokorrelaation kokonaiskäyttäytymisen lisäksi sovitusnopeuden tarkkuuteen vaikuttavat näin ollen myös autokorrelaatiofunktion diffuusiota ja skannausliikettä kuvaavien kertoimien $g_D(\xi)$ ja $g_S(\xi)$ (yhtälöt (22) ja (23)) suhteelliset erot. Skannausnopeutta on tällöin tarkasteltava sen perusteella, miten funktiot $g_D(\xi)$ ja $g_S(\xi)$ käyttäytyvät toistensa suhteen. Kuvaan 18 on tästä syystä piirretty kuvaaja, joka toteuttaa yhtälön

$$\frac{g_D(\xi_{\max})}{g_D(0)} = \frac{g_S(\xi_{\max})}{g_S(0)} \quad (29)$$

eri skannausnopeuksilla. Kuvaaja koostuu toisin sanoen pisteistä, joissa kertoimien $g_D(\xi)$ ja $g_S(\xi)$ suhteelliset muutokset ovat yhtäsuuret kohdassa ξ_{\max} . Ku-

vaajan yläpuolella kertoimen $g_S(\xi)$ voidaan tulkita olevan merkitsevämpi kuin kertoimen $g_D(\xi)$, ja diffuusiokertoimen vaikutuksen vastaavasti pienempi (ks. kohta 2.5.2).

Kuvan 18 perusteella optimaalinen skannausnopeus voidaan nyt valita useammasta (τ_x, d_p) -parista riippuen mittaukseen liittyvistä vaatimuksista ja laitteiston rajoitteista. Esimerkiksi jos halutaan maksimoida pikselin kokoa (ks. kohta 2.5.2), kannattaa valita diffuusion nopeutta ja käytettyä resoluutiota vastaavan kuvaajan (yhtälö (28)) lakipiste. Valitsemalla parametrit yhtälön (29) kuvaajan alapuolelta voidaan samalla varmistaa, ettei liian suuri skannausnopeus heikennä diffuusiosta aiheutuvaa korrelaatiokäyttäytymistä ja diffuusiokertoimen määrittämisen tarkkuutta.

4.2.3 Kommentteja SimFCS-ohjelmistosta

Itse kirjoitetun ohjelman ohella mittaustulosten analysointia kokeiltiin SimFCS-ohjelmistolla (versio 3.0) [70], joka on yksi käytetyimmistä RICS-analyysin mahdollistavista ohjelmistoista. SimFCS tukee hyvin eri mittaustilanteita ja esimerkiksi solunsisäisten kohteiden mittaamisessa tärkeää kiinteän komponentin poistamista [1], mutta monipuolisuudestaan huolimatta ohjelman käyttö avoimeen koodiin verrattuna on joiltain osin yllättävän rajoittunutta. Esimerkiksi kuvan ja analysoitavan alueen resoluutio on SimFCS:ssä rajattu arvoihin 32, 64, 128 ja 256, mikä Nikon A1R⁺:lla tehdyissä liuosmittauksissa rajoitti merkittävästi hyödynnettävissä olevaa kuvausaluetta (A1R⁺:n käytännöllinen maksimiresoluutio on 2048). Suuret kuvat pitää tästä syystä rajata tai jakaa pienempiin osiin, vaikka algoritmin kannalta resoluutiolla ei aikavaativuuden lisäksi ole merkitystä.

Toinen ongelmallinen tekijä SimFCS:ssä oli sovitettavien parametrien virhearvioinnin puuttuminen. Vaikka parametrien virhearviot eivät ole täysin verrannollisia todellisiin virheisiin (kohta 2.4.1), ovat ne silti erittäin tärkeitä suureita sovituksen ja mittauksen laatua arvioitaessa. Virheet jätetään huomiotta useissa muissakin FCS-ohjelmistoissa, ja autokorrelaation sovittaminen erikseen on usein ainoa keino kattavamman virhetarkastelun tekemiseksi.

5 Päätelmät

Tässä työssä tarkasteltiin RICS-menetelmän teoreettisia lähtökohtia ja käytiin läpi yksityiskohtaisesti siihen liittyviä kokeellisia ja laskennallisia periaatteita. Lisäksi määritettiin Nikon A1R⁺-järjestelmän soveltuvuus fluoroforien diffuusioker-toimien mittaamiseen RICS-menetelmällä.

Nikon A1R⁺:n soveltuvuus RICS-mittauksiin

Suurimmilta osin Nikon A1R⁺:n havaittiin soveltuvan hyvin RICS-mittauksiin. Mittausparametrien säätömahdollisuudet on järjestelmässä toteutettu melko joustavasti, mikä mahdollistaa monipuolisten mittausten tekemisen. Järjestelmässä todettiin kuitenkin olevan myös muutamia puutteita, joiden huomioiminen RICS-mittausten suunnittelussa ja analyysissä on tärkeää.

Merkittävin RICS-mittauksia rajoittava tekijä oli käytetty GaAsP fotonilmaisim, jonka aiheuttama vääristymä esti nopeiden flukтуаatioiden tarkkaa mittaamista. A1R⁺:lla ei tästä syystä pystytty luotettavasti mittaamaan esimerkiksi EGFP:n tai muiden nopeasti diffundoituvien fluoroforien diffuusiota. Vastaavilla järjestelmillä, joissa fluoresenssia mitataan analogisesti, ollaan kuitenkin menestyksellisesti mitattu hidasta diffuusiota ja muita flukтуаatioita [55, 56]. Esimerkiksi suhteellisen suurikokoisten hiukkasten diffuusion mittaamisen viskoosissa nesteessä voidaan olettaa olevan riippumatonta myös A1R⁺:n ilmaisimen häiriöstä. Mikäli järjestelmää haluttaisiin hyödyntää nopeampien flukтуаatioiden karakterisointiin, olisi fluoresenssin mittaaminen käytännössä tehtävä fotonien digitaalisen mittaamisen (fotonilaskennan) mahdollistavalla ilmaisimella. Muidenkin ilmaisimen virhetekijöiden, kuten ajoittain muuttuvan kohinatason, vuoksi tarkemman ilmaisimen käyttö RICS-mittauksissa olisi kannattavaa.

Toinen esille tullut epäkohta A1R⁺:ssa oli skannausnopeuden kuvansisäiset muutokset. Järjestelmässä on käytettävissä kahdentyyppisiä skannauspeilejä, galvanometripeilit ja resonanssipeilit, joista ensimmäinen on tarkoitettu tarkkaan ja jälkimmäinen nopeaan kuvantamiseen [71]. Tavanomaiseen konfokaalikuvantamiseen skannauspeilit soveltuvat erinomaisesti, mutta RICS-menetelmän kannalta galvanometripeileilläkin havaittiin suhteellisen suurta kuvansisäistä nopeuden vaihtelua. Skannausnopeuden muutokset rajoittavat mittausparametrien valintaa merkittävästi, ja tulosten luotettavuutta varten suurimpien muutosten rajaaminen pois mitatuista kuvista on välttämätöntä. Joillakin mittausparametreilla x -

suuntainen skannaus ei pysynyt tasaisena yhdessäkään kohdassa kuvaa. Muutokset olivat vähäisimpiä pienimmillä pikselin koon arvoilla, joten myös tämän vuoksi Nikon A1R⁺-järjestelmä soveltuu paremmin suhteellisen hitaan diffuusion mittamiseen.

RICS-menetelmästä

RICSiä voidaan tänä päivänä pitää jo melko vakiintuneena korrelaatio spektroskopiamenetelmänä, jonka käyttö eri sovelluksissa yleistyy jatkuvasti [16, 49]. Tästä huolimatta menetelmään havaittiin liittyvän joitakin huomionarvoisia seikkoja, joita ei aikaisemmissa julkaisuissa ole tiettävästi mainittu tai joihin ei ole kiinnitetty yhtä perusteellisesti huomiota.

Ehkä merkittävin esille tullut RICS-menetelmää koskeva asia oli pikselinsäinen skannausliike. Huolimatta ilmiön selkeästä vaikutuksesta konfokaalitalan muotoon aihetta ei tiettävästi ole käsitelty yhdessäkään RICSiin liittyvässä artikkelissa. Hyväksi pikselin kooksi ollaan kuitenkin esitetty jopa 50 %:a konfokaalisäteestä [17], minkä voidaan olettaa johtavan merkittäviin konfokaalitalan muodon poikkeamiin. Ottaen lisäksi huomioon kohdassa 2.3.2 käsitellyt approksimaatiot, RICS-menetelmässä konfokaalitalan muotoa kuvaavia teoreettisia malleja ja parametreja tulee pitää enintään likimääräisinä arvioina. Ilmiön vaikutuksia mittaus tuloksiin ei tässä työssä pystytty kokeellisesti todentamaan, mutta jatkossa niiden perusteellisempi tutkiminen ja jopa mahdollinen huomioiminen teoreettisessa tarkastelussa voisi parantaa merkittävästi RICS-menetelmän johdonmukaisuutta.

RICS-menetelmän yksi eduista on mahdollisuus suorittaa mittaukset kaupallisilla CLSM-järjestelmillä, mikä parantaa olennaisesti menetelmän saatavuutta ja monipuolisuutta. On kuitenkin erikoista, ettei tässä työssä käsiteltyjä kuvansiäisiä skannausnopeuden muutoksia ole yleensä mainittu menetelmää hyödyntäneiden tutkimusten yhteydessä, vaikka konfokaalitalan liikuttamiseen käytetään yleisesti samoja mekanismeja [31]. Toisin sanoen joko A1R⁺:n skannauspeilien toiminta on toteutettu keskimääräistä epätarkemmin tai myös muut kaupallisilla laitteistoilla tehdyt RICS-mittaukset sisältävät tämän ylimääräisen virhetekijän. Ennen RICSin soveltamista millään CLSM-järjestelmällä skannausnopeuden käyttäytymisen määrittäminen olisi tässä työssä tehtyjen havaintojen perusteella erittäin suositeltavaa.

Kolmas tarkasteltu RICS-menetelmän yksityiskohta oli skannausnopeuden optimointi. Skannausnopeutta pyrittiin käsittelemään käytännöllisestä näkökulmasta niin, että mittauksista lasketut kokeelliset autokorrelaatiot sisältäisivät mahdollisimman paljon tietoa itse kuvattavista flukтуаatioista. Skannausnopeudelle johdettiin teoreettiset yhtälöt (28) ja (29), joiden avulla optimaaliset mittausparametrien arvot voidaan määrittää mitattavan järjestelmän ominaisuuksien perusteella. Vastaavanlaista analyttistä mallia ei aikaisemmin olla esitetty, joten sen soveltuminen eri tilanteisiin vaatii vielä laajempaa varmistusta. Diffuusiomittauksissa periaatteen avulla voidaan kuitenkin määrittää ainakin ohjeellisia arvoja.

Kirjallisuus

- [1] M. A. Digman, C. M. Brown, P. Sengupta, P. W. Wiseman, A. R. Horwitz ja E. Gratton. Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope. *Biophysical journal*, 89(2):1317–1327, 2005.
- [2] M. A. Digman ja E. Gratton. Imaging barriers to diffusion by pair correlation functions. *Biophysical journal*, 97(2):665–673, 2009.
- [3] D. Magde, E. Elson ja W. W. Webb. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System – Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705–708, 1972.
- [4] E. L. Elson. Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells. *Traffic*, 2(11):789–796, 2001.
- [5] O. Krichevsky ja G. Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports on Progress in Physics*, 65(2):251, 2002.
- [6] N. L. Thompson, A. M. Lieto ja N. W. Allen. Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(5):634–641, 2002.
- [7] C. Pieper, K. Weiß, I. Gregor ja J. Enderlein. Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Fluorescence Fluctuation Spectroscopy (FFS)*, 518:175–204, 2008.
- [8] M. Brinkmeier, K. Dörre, J. Stephan ja M. Eigen. Two-beam cross-correlation: a method to characterize transport phenomena in micrometer-sized structures. *Analytical chemistry*, 71(3):609–616, 1999.
- [9] T. Dertinger ja V. Pacheco. Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: A new tool for accurate and absolute diffusion measurements. *ChemPhysChem*, 8:433–443, 2007.
- [10] F. Cardarelli ja E. Gratton. In vivo imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes by pair correlation functions. *PLoS One*, 5(5):e10475, 2010.

- [11] K. M. Berland, M. Keith, P. T. So ja E. Gratton. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment. *Biophysical Journal*, 68(2):694–701, 1995.
- [12] P. Schwille ja Z. Petrášek. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical journal*, 94(4):1437–1448, 2008.
- [13] J. Ries ja P. Schwille. Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical journal*, 91(5):1915–1924, 2006.
- [14] N. O. Petersen. Scanning fluorescence correlation spectroscopy. I. Theory and simulation of aggregation measurements. *Biophysical Journal*, 49(4):809–815, 1986.
- [15] M. A. Digman, P. Sengupta, P. W. Wiseman, C. M. Brown, A. R. Horwitz ja E. Gratton. Fluctuation correlation spectroscopy with a laser-scanning microscope: exploiting the hidden time structure. *Biophysical Journal: Biophysical Letters*, 88(5):L33–L36, 2005.
- [16] M. A. Digman, M. Stakic ja E. Gratton. Raster image correlation spectroscopy and number and brightness analysis. *Fluorescence Fluctuation Spectroscopy (FFS)*, 518:121, 2012.
- [17] C. M. Brown, R. B. Dalal ja B. Hebert. Raster image correlation spectroscopy (RICS) for measuring fast protein dynamics and concentrations with a commercial laser scanning confocal microscope. *Journal of microscopy*, 229:78–91, 2008.
- [18] M. J. Rossow, J. M. Sasaki, M. A. Digman ja E. Gratton. Raster image correlation spectroscopy in live cells. *Nature protocols*, 5(11):1761–1774, 2010.
- [19] J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp ja A. Kenworthy. Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(6):444–456, 2001.
- [20] J. Lippincott-Schwartz, N. Altan-Bonnet ja G. H. Patterson. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biology*, 5(S):S7–S14, 2003.

- [21] M. J. Saxton ja K. Jacobson. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 26(1):373–399, 1997.
- [22] P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell biochemistry and biophysics*, 34, 2001.
- [23] K. Bacia ja P. Schwille. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods*, 29(1):74–85, 2003.
- [24] J. Widengren, U. Mets ja R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(36):13368–13379, 1995.
- [25] A. Penzkofer, W. Falkenstein ja W. Kaiser. Vibronic relaxation in the S1 state of rhodamine dye solutions. *Chemical Physics Letters*, 44(1):82–87, 1976.
- [26] C. E. Housecroft ja E. C. Constable. *Chemistry*. Pearson Prentice Hall, 2006.
- [27] P. S. Dittrich ja P. Schwille. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis. with one- and two-photon excitation. *Applied Physics B*, 73(8):829–837, maaliskuu 2001.
- [28] J. Widengren ja R. Rigler. Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Bioimaging*, 4(3):149–157, 1996.
- [29] A. Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der physik*, 322(8):549–560, 1905.
- [30] T. L. Bergman ja F. P. Incropera. *Fundamentals of Heat and Mass Transfer*. Wiley, 2011.
- [31] J. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, 2010.
- [32] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2007.
- [33] F. R. Connor. *Wave transmission*. E. Arnold, 1972.

- [34] M. Marrocco. Fluorescence correlation spectroscopy of diffusion probed with a Gaussian-Lorentzian spatial distribution. *Chemical Physics Letters*, 449(1-3):227–230, 2007.
- [35] P. Kask, R. Günther ja P. Axhausen. Statistical accuracy in fluorescence fluctuation experiments. *European biophysics journal*, 25(3):163–169, 1997.
- [36] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren ja P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal*, 22(3):169–175, 1993.
- [37] S. T. Hess ja W. W. Webb. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 83(4):2300–2317, 2002.
- [38] K. Berland ja G. Shen. Excitation saturation in two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Applied optics*, 42(27):5566–5576, 2003.
- [39] G. Nishimura ja M. Kinjo. Systematic error in fluorescence correlation measurements identified by a simple saturation model of fluorescence. *Analytical chemistry*, 76(7):1963–1970, 2004.
- [40] I. Gregor, D. Patra ja J. Enderlein. Optical saturation in fluorescence correlation spectroscopy under continuous-wave and pulsed excitation. *ChemPhysChem*, 6(1):164–170, 2005.
- [41] D. S. Banks ja C. Fradin. Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. *Biophysical journal*, 89(5):2960–2971, 2005.
- [42] K. Schätzel, M. Drewel ja S. Stimac. Photon correlation measurements at large lag times: improving statistical accuracy. *Journal of Modern Optics*, 35(4):711–718, 1988.
- [43] S. Saffarian ja E. L. Elson. Statistical analysis of fluorescence correlation spectroscopy: the standard deviation and bias. *Biophysical journal*, 84(3):2030–2042, 2003.
- [44] E. Petrov. Derivation of expressions for the FCS correlation function. *Supplementary material for the F-Praktikum*, 2005.

- [45] F. H. C. Marriott ja J. A. Pope. Bias in the estimation of autocorrelations. *Biometrika*, 41(3-4):390–402, 1954.
- [46] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra ja J. Fitter. Statistical analysis of diffusion coefficient determination by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of fluorescence*, 15(3):415–422, 2005.
- [47] T. Wohland, R. Rigler ja H. Vogel. The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical journal*, 80(6):2987–2999, 2001.
- [48] T. Dertinger, A. Loman ja B. Ewers. The optics and performance of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Optics Express*, 16(19):1915–1924, 2008.
- [49] M. A. Digman ja E. Gratton. Lessons in fluctuation correlation spectroscopy. *Annual review of physical chemistry*, 62:645, 2011.
- [50] R. G. Driggers. *Encyclopedia of Optical Engineering*, sarjassa *Dekker Encyclopedias Series*. Dekker Encyclopedias Series 1. Marcel Dekker, 2003.
- [51] M. Höbel ja J. Ricka. Dead-time and afterpulsing correction in multiphoton timing with nonideal detectors. *Review of scientific instruments*, 2326(1994), 1994.
- [52] J. Enderlein ja I. Gregor. Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, 033102(2005), 2005.
- [53] J. Ries, Z. Petrášek, A. J. García-Sáez ja P. Schwille. A comprehensive framework for fluorescence cross-correlation spectroscopy. *New Journal of Physics*, 12(11):113009, 2010.
- [54] R. B. Dalal ja M. A. Digman. Determination of particle number and brightness using a laser scanning confocal microscope operating in the analog mode. *Microscopy research and technique*, 81(October 2007):69–81, 2008.
- [55] E. Gielen, N. Smisdom ja M. Vandeven. Measuring diffusion of lipid-like probes in artificial and natural membranes by raster image correlation spectroscopy (RICS): use of a commercial laser-scanning. *Langmuir*, 25(12):5209–5218, 2009.

- [56] P. D. J. Moens. Fluorescence correlation spectroscopy, raster image correlation spectroscopy, and number and brightness on a commercial confocal laser scanning microscope with analog detectors (Nikon C2). *Microscopy research and technique*, c(4):377–388, 2011.
- [57] J. O. Smith. *Mathematics of the Discrete Fourier transform (DFT): with music and audio applications*. BookSurge Publishing, 2007.
- [58] N. Muramatsu ja A. P. Minton. Tracer diffusion of globular proteins in concentrated protein solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(5):2984–2988, 1988.
- [59] N. E. Dorsey. Properties of ordinary water-substance. 1940.
- [60] Invitrogen. Technical Tip: Greater Control and More Reaction Time with SDP Ester, 2007.
- [61] S. R. McRae, C. L. Brown ja G. R. Bushell. Rapid purification of EGFP, EYFP, and ECFP with high yield and purity. *Protein expression and purification*, 41:121–127, 2005.
- [62] Alexa Fluor 488 NHS Ester (Succinimidyl Ester). <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A20000>, joulukuu 2014.
- [63] Life Technologies Fluorescence SpectraViewer. <https://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, joulukuu 2014.
- [64] Python 2.7.6. <http://www.python.org/>, joulukuu 2014.
- [65] Cython 0.20.1. <http://www.cython.org/>, joulukuu 2014.
- [66] PyFFTW 0.9.2. <https://pypi.python.org/pypi/pyFFTW>, joulukuu 2014.
- [67] NumPy 1.8.2. <http://www.numpy.org/>, joulukuu 2014.
- [68] SciPy 0.13.3. <http://www.scipy.org/>, joulukuu 2014.

- [69] R. Swaminathan, C. P. Hoang ja A. S. Verkman. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical journal*, 72(4):1900–1907, 1997.
- [70] SimFCS. <http://www.lfd.uci.edu/globals/>, joulukuu 2014.
- [71] J. M. Larson, S. A. Schwartz ja M. W. Davidson. Resonant Scanning in Laser Confocal Microscopy. <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/resonantscanning.html>, joulukuu 2014.

A Yhtälöiden johtaminen

A.1 Teoreettinen autokorrelaatiofunktio homogeeniselle diffuusiolle

Yhtälön johtaminen homogeenista diffuusiota kuvaavalle teoreettiselle autokorrelaatiolle RICS-mittauksessa voidaan aloittaa autokorrelaation määritelmästä

$$g(\tau) \equiv \frac{\langle \delta F(0) \delta F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2}, \quad (\text{A.1})$$

missä $F(t)$ on havaittu fluoresenssi ajanhetkellä t , ja

$$\delta F(t) \equiv F(t) - \langle F \rangle \quad (\text{A.2})$$

on fluoresenssin poikkeama otoskeskiarvosta $\langle F \rangle$.

Teoreettisessa tarkastelussa keskitetyn lasersäteen voimakkuusjakaumaa approksimoidaan fokuksisteessä Gaussisena funktiona

$$I(\mathbf{r}) = I_0 \exp \left[-\frac{2}{w^2} \left(r_x^2 + r_y^2 + k^{-2} r_z^2 \right) \right], \quad (\text{A.3})$$

missä I_0 , w , ja k ovat vakioita. Mitattavan diffuusiojärjestelmän fluoroforipitoisuuden oletetaan lisäksi olevan alhainen, jolloin äärellisen tilavuuden sisällä samanaikaisesti olevien fluoroforien määrä noudattaa Poissonin jakaumaa [44]. Saturaatiota, triplettisiirtymiä ja fluoresenssin sammumista ei oteta huomioon, jolloin $F(t)$ on suoraan verrannollinen maksimivoimakkuuteen I_0 . Havainnointitodennäköisyyden oletetaan olevan paikasta riippumaton.

Havaittu fluoresenssi saadaan nyt fluoroforipitoisuuden $C(\mathbf{r}, t)$ avulla yhtälöstä

$$F(t) = Q \int d^3\mathbf{r} I(\mathbf{r}) C(\mathbf{r}, t), \quad (\text{A.4})$$

missä $\int d^3\mathbf{r}$ tarkoittaa integrointia paikkakoordinaattien $\mathbf{r} = r_x \hat{\mathbf{i}} + r_y \hat{\mathbf{j}} + r_z \hat{\mathbf{k}}$ yli (karteesisille yksikkövektoreille $\hat{\mathbf{i}}$, $\hat{\mathbf{j}}$ ja $\hat{\mathbf{k}}$). Vakio Q kuvaa fluoroforien kvanttituottoa (*quantum yield*), emittoituneen fluoresenssivalon vaimenemista ennen ilmaisimia sekä ilmaisimien kvanttitehokkuutta (*quantum efficiency*).

Havaitun fluoresenssin keskiarvo saadaan nyt integroimalla yhtälö (A.3),

$$\begin{aligned}\langle F \rangle &= Q \langle C \rangle \int d^3\mathbf{r} I(\mathbf{r}) \\ &= Q \langle C \rangle \sqrt{\frac{\pi^3}{2}} k w^3.\end{aligned}\quad (\text{A.5})$$

Fluoresenssin poikkeamalle (A.2) saadaan vastaavasti yhtälö

$$\delta F(t) = Q \int d^3\mathbf{r} I(\mathbf{r}) \delta C(\mathbf{r}, t), \quad (\text{A.6})$$

missä $\delta C(\mathbf{r}, t) \equiv C(\mathbf{r}, t) - \langle C \rangle$ on fluoroforipitoisuuden poikkeama keskiarvosta $\langle C \rangle$. Sijoittamalla yhtälö (A.6) yhtälöön (A.1) voidaan autokorrelaatio ilmoittaa nyt muodossa

$$g(\tau) = \frac{Q^2}{\langle F \rangle^2} \iint d^3\mathbf{r} d^3\mathbf{r}' I(\mathbf{r}) I(\mathbf{r}') \langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \rangle, \quad (\text{A.7})$$

josta on nyt ratkaistava pitoisuuspoikkeamien tulon keskiarvo

$$\langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \rangle. \quad (\text{A.8})$$

Diffuusiota kuvaavan analyttisen ratkaisun johtaminen voidaan aloittaa diffuusioyhtälöstä

$$\partial_t C(\mathbf{r}, t) = D \nabla_{xyz}^2 C(\mathbf{r}, t), \quad (\text{A.9})$$

missä diffuusiokerroin D oletetaan ajasta ja paikasta riippumattomaksi vakioksi. Operaattori ∂_t on osittaisderivaatta ajan suhteen ja $\nabla_{xyz} \equiv \partial_x + \partial_y + \partial_z$ on operaattori, joka sisältää osittaisderivaatat paikkakoordinaattien suhteen. Merkintä ∇_{xyz}^2 tarkoittaa pistetuloa $\nabla_{xyz} \cdot \nabla_{xyz} = \partial_x^2 + \partial_y^2 + \partial_z^2$. RICS-menetelmää varten yhtälöön (A.9) on lisättävä konfokaalitalan liikkeen vaikutusta kuvaava termi, jolloin saadaan differentiaaliyhtälö

$$\partial_t C(\mathbf{r}, t) = \left(D \nabla_{xyz}^2 + \mathbf{v}_{xy} \cdot \nabla_{xy} \right) C(\mathbf{r}, t), \quad (\text{A.10})$$

missä \mathbf{v}_{xy} on (x, y) -tasossa liikkuvan konfokaalitalan nopeus. Yhtälön (A.8) ratkaisemiseksi yhtälö (A.10) voidaan kirjoittaa myös pitoisuuspoikkeaman $\delta C(\mathbf{r}, t)$

suhteen muodossa

$$\partial_t \delta C(\mathbf{r}, t) = \left(D \nabla_{xyz}^2 + \mathbf{v}_{xy} \nabla_{xy} \right) \delta C(\mathbf{r}, t) . \quad (\text{A.11})$$

Yhtälö (A.11) voidaan nyt ratkaista Fourier-muunnoksen avulla, jonka määritelmä on

$$\mathcal{F}(f(\mathbf{r})) = \tilde{f}(\boldsymbol{\mu}) \equiv (2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\mathbf{r} e^{i\boldsymbol{\mu}\mathbf{r}} f(\mathbf{r}) , \quad (\text{A.12})$$

missä e on Neperin luku ja i on imaginaariyksikkö. Fourier-käänteismuunnos määritellään vastaavasti

$$f(\mathbf{r}) \equiv (2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-i\mathbf{r}\boldsymbol{\mu}} \tilde{f}(\boldsymbol{\mu}) . \quad (\text{A.13})$$

Fourier-muunnoksella yhtälö (A.11) saadaan muotoon

$$\begin{aligned} (2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\mathbf{r} e^{i\boldsymbol{\mu}\mathbf{r}} \partial_t \delta C(\mathbf{r}, t) &= (2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\mathbf{r} e^{i\boldsymbol{\mu}\mathbf{r}} \left[\left(D \nabla_{xyz}^2 + \mathbf{v}_{xy} \nabla_{xy} \right) \delta C(\mathbf{r}, t) \right] \\ \partial_t \delta \tilde{C}(\boldsymbol{\mu}, t) &= - \left(D \boldsymbol{\mu}^2 + i \mathbf{v}_{xy} \boldsymbol{\mu}_{xy} \right) \delta \tilde{C}(\boldsymbol{\mu}, t) , \end{aligned} \quad (\text{A.14})$$

missä on käytetty Fourier-muunnoksen ominaisuutta

$$\mathcal{F}(\partial_x^n f(x)) = (-i\boldsymbol{\mu})^n \tilde{f}(\boldsymbol{\mu}) . \quad (\text{A.15})$$

Fourier-muunnettu diffuusioyhtälö (A.14) on nyt ensimmäisen kertaluvun tavallinen differentiaaliyhtälö, jonka ratkaisu on

$$\delta \tilde{C}(\boldsymbol{\mu}, t) = \delta \tilde{C}(\boldsymbol{\mu}, 0) e^{-\left(D \boldsymbol{\mu}^2 + i \mathbf{v}_{xy} \boldsymbol{\mu}_{xy} \right) t} , \quad (\text{A.16})$$

josta saadaan käänteisellä Fourier-muunnoksella itse diffuusioyhtälön (A.11) ratkaisuksi

$$\delta C(\mathbf{r}', t) = (2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-i\mathbf{r}'\boldsymbol{\mu}} \delta \tilde{C}(\boldsymbol{\mu}, 0) e^{-\left(D \boldsymbol{\mu}^2 + i \mathbf{v}_{xy} \boldsymbol{\mu}_{xy} \right) t} , \quad (\text{A.17})$$

missä

$$\delta \tilde{C}(\boldsymbol{\mu}, 0) = (2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\mathbf{r}'' e^{i\boldsymbol{\mu}\mathbf{r}''} \delta C(\mathbf{r}'', 0) . \quad (\text{A.18})$$

Sijoittamalla yhtälö (A.17) yhtälöön (A.8) saadaan pitoisuuspoikkeamien tulo keskiarvo muotoon

$$\begin{aligned} \langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \rangle &= (2\pi)^{-3} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-i\mathbf{r}'\boldsymbol{\mu}} e^{-(D\boldsymbol{\mu}^2 + i\mathbf{v}_{xy}\boldsymbol{\mu}_{xy})\tau} \\ &\quad \times \int d^3\mathbf{r}'' e^{i\boldsymbol{\mu}\mathbf{r}''} \langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}'', 0) \rangle, \end{aligned} \quad (\text{A.19})$$

missä tulo keskiarvo $\langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}'', 0) \rangle$ on nyt ajasta riippumaton. Tulo saa arvon 0 kaikilla $\mathbf{r} \neq \mathbf{r}''$, koska kahden eri pisteen välillä ei voi olla välitöntä korrelaatiota. Tulo voidaan täten esittää muodossa

$$\begin{aligned} \langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}'', 0) \rangle &= \langle (\delta C)^2 \rangle \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'') \\ &= \langle C \rangle \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}''), \end{aligned} \quad (\text{A.20})$$

jossa Poissonin jakaumaa noudattavana muuttujana fluoroforien pitoisuuskeskiarvo täyttää ehdon $\langle C \rangle = \langle (\delta C)^2 \rangle$.

Sijoittamalla yhtälö (A.20) yhtälöön (A.19) saadaan

$$\begin{aligned} \langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \rangle &= (2\pi)^{-3} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-i\mathbf{r}'\boldsymbol{\mu}} e^{-(D\boldsymbol{\mu}^2 + i\mathbf{v}_{xy}\boldsymbol{\mu}_{xy})\tau} \\ &\quad \times \int d^3\mathbf{r}'' e^{i\boldsymbol{\mu}\mathbf{r}''} \langle C \rangle \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'') \\ &= \frac{\langle C \rangle}{(2\pi)^3} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-i\boldsymbol{\mu}(\mathbf{r}-\mathbf{r}')} e^{-(D\boldsymbol{\mu}^2 + i\mathbf{v}_{xy}\boldsymbol{\mu}_{xy})\tau}, \end{aligned} \quad (\text{A.21})$$

joka voidaan sijoittaa autokorrelaatiota kuvaavaan yhtälöön (A.7). Tällöin saadaan

$$\begin{aligned} g(\tau) &= \frac{Q^2}{\langle F \rangle^2} \iint d^3\mathbf{r} d^3\mathbf{r}' I(\mathbf{r}) I(\mathbf{r}') \frac{\langle C \rangle}{(2\pi)^3} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-i\boldsymbol{\mu}(\mathbf{r}-\mathbf{r}')} e^{-(D\boldsymbol{\mu}^2 + i\mathbf{v}_{xy}\boldsymbol{\mu}_{xy})\tau} \\ &= \frac{Q^2 \langle C \rangle}{\langle F \rangle^2 (2\pi)^3} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-(D\boldsymbol{\mu}^2 + i\mathbf{v}_{xy}\boldsymbol{\mu}_{xy})\tau} \int d^3\mathbf{r} e^{-i\boldsymbol{\mu}\mathbf{r}} I(\mathbf{r}) \int d^3\mathbf{r}' e^{i\boldsymbol{\mu}\mathbf{r}'} I(\mathbf{r}') \\ &= \frac{Q^2 \langle C \rangle}{\langle F \rangle^2} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-(D\boldsymbol{\mu}^2 + i\mathbf{v}_{xy}\boldsymbol{\mu}_{xy})\tau} \tilde{I}(\boldsymbol{\mu})^2, \end{aligned} \quad (\text{A.22})$$

missä $\tilde{I}(\boldsymbol{\mu})$ on lasersäteen voimakkuusjakauman $I(\boldsymbol{r})$ (yhtälö (A.3)) Fourier-muunnos

$$\begin{aligned}\tilde{I}(\boldsymbol{\mu}) &= (2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\boldsymbol{r} e^{i\boldsymbol{\mu}\boldsymbol{r}} I(\boldsymbol{r}) \\ &= \frac{I_0 k w^3}{8} \exp\left[-\frac{w^2}{8} (\mu_x^2 + \mu_y^2 + k^2 \mu_z^2)\right].\end{aligned}\quad (\text{A.23})$$

Sijoittamalla yhtälöt (A.5) ja (A.23) yhtälöön (A.22) autokorrelaatiofunktio saadaan muotoon

$$\begin{aligned}g(\tau) &= \frac{Q^2 \langle C \rangle}{\left(Q \langle C \rangle I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} k w^3\right)^2} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-(D\boldsymbol{\mu}^2 + i\boldsymbol{v}_{xy}\boldsymbol{\mu}_{xy})\tau} \\ &\quad \times \left[\frac{I_0 k w^3}{8} \exp\left[-\frac{w^2}{8} (\mu_x^2 + \mu_y^2 + k^2 \mu_z^2)\right] \right]^2 \\ &= \frac{1}{(2\pi)^3 \langle C \rangle} \int d^3\boldsymbol{\mu} \exp\left[-\left(\frac{w^2}{4} + D\tau\right) \mu_x^2 + i\tau v_x \mu_x \right. \\ &\quad \left. - \left(\frac{w^2}{4} + D\tau\right) \mu_y^2 + i\tau v_y \mu_y - \left(\frac{k^2 w^2}{4} + D\tau\right) \mu_z^2\right],\end{aligned}\quad (\text{A.24})$$

joka on olennaisesti tulo kolmesta ns. Gaussisesta integraalista muotoa

$$\int dx e^{-ax^2+bx} = \sqrt{\frac{\pi}{a}} \exp\left(\frac{b^2}{4a}\right). \quad (\text{A.25})$$

Aputulosta (A.25) käyttäen homogeenista diffuusiota kuvaavan autokorrelaatiofunktion analyttiseksi ratkaisuksi saadaan lopulta yhtälö

$$\begin{aligned}g(\tau) &= \frac{1}{(2\pi)^3 \langle C \rangle} \frac{\pi}{\frac{w^2}{4} + D\tau} \sqrt{\frac{\pi}{\frac{k^2 w^2}{4} + D\tau}} \exp\left[-\frac{(v_x^2 + v_y^2) \tau^2}{4\left(\frac{w^2}{4} + D\tau\right)}\right] \\ &= \left[\langle C \rangle \pi^{\frac{3}{2}} k w^3 \left(1 + \frac{4D\tau}{w^2}\right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{k^2 w^2}} \right]^{-1} \exp\left[-\frac{\boldsymbol{v}_{xy}^2 \tau^2}{w^2 + 4D\tau}\right] \\ &= \left[\langle n \rangle \left(1 + \frac{4D\tau}{w^2}\right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{k^2 w^2}} \right]^{-1} \exp\left[-\frac{(\|\boldsymbol{v}_{xy}\| \tau)^2}{w^2 + 4D\tau}\right],\end{aligned}\quad (\text{A.26})$$

missä

$$\langle n \rangle \equiv \langle C \rangle V_{\text{eff}} \quad (\text{A.27})$$

on efektiivisen mittaustilavuuden

$$V_{\text{eff}} \equiv \pi^{\frac{3}{2}} k w^3. \quad (\text{A.28})$$

sisällä olevien fluoroforien keskimääräinen lukumäärä.

RICS-mittauksessa korrelaatioaika τ määräytyy pikselin valotusajan τ_x ja kahden peräkkäisen rivin välisen ajan τ_y mukaan yhtälöstä

$$\tau(\xi, \psi) = \tau_x \xi + \tau_y \psi, \quad (\text{A.29})$$

missä kokonaisluvut ξ ja ψ kuvaavat kahden pikselin välistä siirtymää x - ja y -suunnassa. Myös konfokaalitalan siirtymä $\|\mathbf{v}_{xy}\|$ τ voidaan esittää ξ :n ja ψ :n funktiona yhtälöllä

$$\|\mathbf{v}_{xy}\| \tau = d_p \sqrt{\xi^2 + \psi^2}, \quad (\text{A.30})$$

missä d_p on neliönmuotoisen pikselin läpimitta. RICS-mittausta vastaavan teoreettisen autokorrelaatiofunktion lopulliseksi muodoksi saadaan täten

$$g(\xi, \psi) = \left[\langle n \rangle \left(1 + \frac{4D\tau(\xi, \psi)}{w^2} \right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau(\xi, \psi)}{k^2 w^2}} \right]^{-1} \exp \left[-\frac{d_p^2 (\xi^2 + \psi^2)}{w^2 + 4D\tau(\xi, \psi)} \right]. \quad (\text{A.31})$$

A.2 Diffuusioyhtälön Greenin funktio ja keskimääräinen neliösiirtymä

Diffuusioyhtälön (A.9) Greenin funktio on yhtälön ratkaisu $C(\mathbf{r}, t)$ alkuehdolla

$$C(\mathbf{r}, 0) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'), \quad (\text{A.32})$$

missä deltafunktio $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$ täyttää määritelmän mukaisesti ehdot

$$\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \begin{cases} \infty, & \text{kun } \mathbf{r} = \mathbf{r}' \\ 0, & \text{kun } \mathbf{r} \neq \mathbf{r}' \end{cases} \quad (\text{A.33})$$

ja

$$\int d^3\mathbf{r} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = 1. \quad (\text{A.34})$$

Greenin funktion analyttinen muoto voidaan johtaa sijoittamalla lähtöjakauma (A.32) diffuusioyhtälön (A.9) ratkaisuun (A.17), jolloin saadaan

$$\begin{aligned} C(\mathbf{r}, t) &= (2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-i\mathbf{r}\boldsymbol{\mu}} \left[(2\pi)^{-\frac{3}{2}} \int d^3\mathbf{r}'' e^{i\mathbf{r}''\boldsymbol{\mu}} \delta(\mathbf{r}'' - \mathbf{r}') \right] e^{-Dt\boldsymbol{\mu}^2}, \\ &= (2\pi)^{-3} \int d^3\boldsymbol{\mu} e^{-Dt\boldsymbol{\mu}^2 - i(\mathbf{r} - \mathbf{r}')\boldsymbol{\mu}}, \end{aligned} \quad (\text{A.35})$$

mistä aputuloksen (A.25) avulla saadaan Greenin funktiolle yhtälö

$$C(\mathbf{r}, t) = \mathcal{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) = (4\pi Dt)^{-\frac{3}{2}} \exp\left[\frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2}{4Dt}\right]. \quad (\text{A.36})$$

Mielivaltaiselle fluoroforien lähtöjakaumalle $C(\mathbf{r}', 0)$ Greenin funktio antaa nyt diffuusioyhtälön ratkaisun superpositiona yhtälöstä

$$C(\mathbf{r}, t) = \int d\mathbf{r}' \mathcal{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) C(\mathbf{r}', 0). \quad (\text{A.37})$$

Yhtälö (A.36) vastaa myös pisteestä \mathbf{r}' lähtevän hiukkasen sijainnin todennäköisyysjakaumaa ajanhetkellä t . Diffundoituvan hiukkasen keskimääräinen neliösiirtymä MSD saadaan tällöin kaavasta

$$\begin{aligned} MSD(t) &= \langle (\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}')^2 \rangle \\ &= \frac{\int d^3\mathbf{r} (\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2 C(\mathbf{r}, t)}{\int d^3\mathbf{r} C(\mathbf{r}, t)} \\ &= \frac{\int d^3\mathbf{r} (\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2 (4\pi Dt)^{-\frac{3}{2}} \exp\left[\frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2}{4Dt}\right]}{\int d^3\mathbf{r} (4\pi Dt)^{-\frac{3}{2}} \exp\left[\frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2}{4Dt}\right]}, \end{aligned} \quad (\text{A.38})$$

joka aputulosten (A.25) ja

$$\int dx x^2 e^{-ax^2} = \frac{\sqrt{\pi}}{2a^{\frac{3}{2}}} \quad (\text{A.39})$$

avulla saadaan muotoon

$$MSD(t) = 6Dt. \quad (\text{A.40})$$

Mielivaltaiselle määrälle d diffuusion vapausateita yhtälö (A.40) voidaan vastavasti johtaa muotoon

$$MSD(t) = 2dDt. \quad (\text{A.41})$$

A.3 Korrelaatioteoreema ja autokorrelaatio diskreetin Fourier-muunnoksen avulla

Kahden diskreetin kaksiulotteisen signaalin f ja h välisen korrelaation määritelmä on

$$(f \star h)_{mn} = \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} \overline{f_{xy}} h_{x+m, y+n}, \quad (\text{A.42})$$

missä X ja Y ovat signaalien dimensiot. Korrelaatioteoreeman mukaan korrelaatio voidaan laskea diskreetin Fourier-muunnoksen DFT avulla yhtälöstä

$$(f \star h)_{mn} = DFT_{mn}^{-1} \left[\overline{DFT(ZP(f))} DFT(ZP(h)) \right], \quad (\text{A.43})$$

missä DFT on muotoa

$$DFT_{kl}(f) = \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} f_{xy} \exp \left[-i2\pi \left(\frac{xk}{X} + \frac{yl}{Y} \right) \right] \quad (\text{A.44})$$

ja käänteinen DFT muotoa

$$DFT_{kl}^{-1}(f) = \frac{1}{XY} \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} f_{xy} \exp \left[i2\pi \left(\frac{xk}{X} + \frac{yl}{Y} \right) \right]. \quad (\text{A.45})$$

Ylleviivaus tarkoittaa kompleksikonjugaattia ja merkintä $ZP(f)$ signaalin mitauspisteiden täydentämistä nolilla (*zero padding*) siten, että sen dimensiot ovat $2X$ ja $2Y$.

Korrelaatioteoreema voidaan johtaa tekemällä Fourier-muunnos yhtälölle (A.42), jolloin saadaan

$$\begin{aligned} DFT_{kl}(f \star h) &= \sum_{m=0}^{X-1} \sum_{n=0}^{Y-1} (f \star h)_{mn} \exp \left[-i2\pi \left(\frac{mk}{X} + \frac{nl}{Y} \right) \right] \\ &= \sum_{m=0}^{X-1} \sum_{n=0}^{Y-1} \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} \overline{f_{xy}} h_{x+m, y+n} \exp \left[-i2\pi \left(\frac{mk}{X} + \frac{nl}{Y} \right) \right]. \end{aligned} \quad (\text{A.46})$$

Tekemällä summausindekseihin sijoitukset $m = m - x$ ja $n = n - y$ saadaan edelleen

$$\begin{aligned}
DFT_{kl}(f \star h) &= \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} \overline{f_{xy}} \sum_{m=x}^{X-1+x} \sum_{n=y}^{Y-1+y} h_{mn} \exp \left[-i2\pi \left(\frac{(m-x)k}{X} + \frac{(n-y)l}{Y} \right) \right] \\
&= \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} \overline{f_{xy}} \exp \left[i2\pi \left(\frac{xk}{X} + \frac{yl}{Y} \right) \right] \\
&\quad \times \sum_{m=x}^{X-1+x} \sum_{n=y}^{Y-1+y} h_{mn} \exp \left[-i2\pi \left(\frac{mk}{X} + \frac{nl}{Y} \right) \right]. \tag{A.47}
\end{aligned}$$

Koska signaalin indeksointi on syklinen (modulo X tai modulo Y), yhtälö (A.47) saadaan muotoon

$$\begin{aligned}
DFT_{kl}(f \star h) &= \sum_{x=0}^{X-1} \sum_{y=0}^{Y-1} \overline{f_{xy}} \exp \left[-i2\pi \left(\frac{xk}{X} + \frac{yl}{Y} \right) \right] \\
&\quad \times \sum_{m=0}^{X-1} \sum_{n=0}^{Y-1} h_{mn} \exp \left[-i2\pi \left(\frac{mk}{X} + \frac{nl}{Y} \right) \right] \\
&= \overline{DFT_{kl}(f)} DFT_{kl}(h), \tag{A.48}
\end{aligned}$$

josta käänteisellä Fourier-muunnoksella päädytään korrelaatioteoreemaan (A.43). Käytännössä korreloitavat signaalit on täydennettävä nolilla, jotta syklistä indeksoinnista huolimatta mittauspisteiden järjestys pysyisi samana.

Autokorrelaatio voidaan määritellä korrelaation (A.42) erikoistapauksena, jossa korreloitavat signaalit ovat samat. Korrelaatioteoreeman nojalla lineaarinen autokorrelaatio voidaan nyt esittää diskreetin Fourier-muunnoksen avulla muodossa

$$(f \star f)_{mn} = DFT_{mn}^{-1} \left[\overline{DFT(ZP(f))} DFT(ZP(f)) \right]. \tag{A.49}$$