

'n Onderzoek na
enkeldeeltjie-nasporingsmetodes
vir fotosintetiese komplekse

deur

Bertus van Heerden

Voorgelê ter gedeeltelike vervulling van die vereistes vir die graad

Magister Scientiae

in die Fakulteit Natuur- & Landbouwetenskappe

Universiteit van Pretoria

Pretoria

Studieleier: Prof. Tjaart P.J. Krüger

8 Februarie 2021



UNIVERSITEIT VAN PRETORIA
UNIVERSITY OF PRETORIA
YUNIBESITHI YA PRETORIA

Samevatting

Fotosintese is die direkte bron van energie vir lewe op Aarde. Hierdie proses begin met die opvang van fotone deur ligoestingskomplekse, soos ligoestingskompleks II (LHCII) in plante en fikobilisoom in sianobakterieë. Hierdie sisteme se kombinasie van komplekse, individuele gedrag en sterk foto-aktiwiteit maak dit 'n goeie teken vir enkelmolekule-spektroskopie (SMS). Standaard-SMS-benaderings gebruik egter 'n omgewing wat 'n swak weerspieëling is van die natuurlike een. In besonder word 'n deeltjie tipies geïsoleer en vasgeheg aan 'n oppervlak. 'n Tegniek wat in staat is om 'n deeltjie in die opsporingsvolume te hou sonder om die omliggende omgewing te versteur is reële-tyd enkeldeeltjie-nasporing (SPT). In hierdie verhandeling word die onderliggende teorie rondom SPT ondersoek en toegepas. Voorlopige eksperimentele ontwikkeling word ook beskryf. Statistiese modellering en dinamiese simulaties is gebruik om die teoretiese verrigting van verskillende metodes te vergelyk. Die orbitaal- en ruitersprongmetodes asook MINFLUX is vergelyk, en beide fluoressensiegebaseerde en interferometriese verstrooiing (iSCAT)-benaderings is ondersoek. Daar is bevind dat die ruitersprong-metode die vinnigste diffusie kan naspoor, terwyl MINFLUX die beste presisie het, hoewel slegs vir stadige deeltjies. Om iSCAT en fluoressensie te vergelyk, is verskeie biologiese voorbeelde beskou, insluitend deeltjies wat op sigself fluoresseer, asook deeltjies met 'n fluoresserende merker. Die relatiewe sukses van iSCAT in vergelyking met fluoressensie is afhanklik van die deeltjiegrootte, fotofisiese eienskappe van die fluorofoor, en die fluorofoor-digtheid. Die uitbreiding van 'n SMS-opstelling vir enkeldeeltjie-nasporing word ook beskryf. Dit sluit in hardeware- en sagtewareontwikkeling asook voorlopige toetse en metings. Toekomsvooruitsigte word ook bespreek.

Abstract

Photosynthesis is the direct source of energy for life on Earth. This process begins with the absorption of photons by light harvesting complexes, such as light harvesting complex II (LHCII) in plants and phycobilisome in cyanobacteria. These systems' combination of complex, individual behaviour and high photoactivity make it a good target for single-molecule spectroscopy (SMS). However, standard SMS approaches utilise an environment that badly resembles the natural one. In particular, a particle is typically isolated and attached to a surface. A technique that is capable of keeping a particle in the detection volume without disturbing the surrounding environment is real-time single particle tracking (SPT). In this dissertation, the underlying theory around SPT is investigated and applied. Preliminary experimental development and testing are also described. Statistical modeling and dynamic simulations were used to compare the theoretical performance of different methods. The orbital, knight's tour and MINFLUX methods were compared, and both fluorescence-based and iSCAT approaches were investigated. It was found that the knight's tour method can track the fastest diffusion, while MINFLUX has the best precision, albeit only for slow particles. To compare iSCAT and fluorescence, various biological examples were considered, including intrinsically fluorescing particles and particles with a fluorescent label. The relative success of iSCAT compared to fluorescence is dependent on the particle size, photophysical properties of the fluorophore, and the fluorophore density. The extension of an SMS setup for single-particle tracking is also described. This includes hardware and software development, as well as preliminary testing and measurements. Future prospects are also discussed.

Verklaring

Ek, Bertus van Heerden, verklaar dat die verhandeling, wat ek hiermee voorlê vir die graad *Magister Scientiae* by die Universiteit van Pretoria, my eie werk is en nie voorheen voorgelê is deur my vir 'n graad by hierdie of enige ander tersiêre instelling nie.

Geteken: _____

Datum: 8 Februarie 2021

Aan my ouers

Bedankings

Dis werklik 'n voorreg om 'n studieleier soos Prof. Krüger te hê. Sonder sy kundigheid, geduld, toewyding en aanmoediging sou ek beslis nie hierdie projek kon voltooi nie. Aan die res van die biofisikagroep, baie dankie vir die interessante en behulpsume gesprekke en vir konstruktiewe terugvoer. In besonder bedank ek vir Joshua Botha en Farooq Kyeyune vir alles wat hulle my geleer het oor SMS.

Vir finansiële ondersteuning bedank ek Prof. Krüger, Prof. Diale, die NRF en die Suid Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns. Ek bedank ook die ALC vir die geleentheid om die 2019 Studente-werkswinkel by te woon.

Aan my ouers, Jan en Janie, baie dankie vir julle onvoorwaardelike liefde en ondersteuning en dat julle my altyd aangemoedig het in my wetenskaplike belangstelling. Baie dankie aan my suster, Albertien, en Leandro Bezuidenhout, dit was lekker om saam met julle te bly die afgelope twee jaar. Baie dankie aan Johan de Bruin, vir fantastiese vriendskap maar ook vir baie waardevolle gesprekke oor my werk. Ek bedank ook al my ander familie en vriende vir hul liefde en ondersteuning. Aan Imre Laubscher, baie dankie vir jou liefde, eindelose ondersteuning en dat jy altyd daar was, veral wanneer dit nie so goed gegaan het nie.

Al my dank aan die Almagtige God, vir die wonders van die skepping en die verstand om dit te kan verstaan, maar ook vir die hoop op 'n nuwe skepping.

*Physics is really nothing more than a search
for ultimate simplicity, but so far all we have
is a kind of elegant messiness.*

A Short History of Nearly Everything

BILL BRYSON

Inhoudsopgawe

Voorwerk	i
Inhoudsopgawe	vii
Lys van figure	ix
1 Inleiding	1
1.1 Fotosintese	1
1.1.1 Lig-afhanklike reaksies	3
1.1.2 Lig-onafhanklike reaksies	5
1.1.3 Ligoestingskomplekse	6
1.2 Enkeldeeltjie-nasporing	9
1.2.1 Enkelmolekule-spektroskopie	9
1.2.2 Diffunderende deeltjies	11
1.3 Statistiek	13
1.4 Beheerteorie	14
1.4.1 Diskretisering	17
1.4.2 Kalmanfilter	18
1.4.3 Lineêre Kwadratiese Reguleerder	20

2	Teorie	21
2.1	Inleiding	21
2.1.1	Posisiebepaling	22
2.2	Statiese Lokalisering	28
2.2.1	Fluoresensie	29
2.2.2	iSCAT	33
2.3	Dinamiese Simulasie	40
2.3.1	Beheerstelsel-ontwerp	40
2.3.2	Resultate	43
2.3.3	Bespreking	48
2.4	Gevolgtrekking	50
3	Eksperiment	52
3.1	Eksperimentele opstelling	52
3.1.1	SMS-opstelling	52
3.1.2	SPT-funksionaliteit	54
3.2	Sagteware	56
3.2.1	LabVIEW-kode	58
3.3	Monstervoorbereiding	59
3.4	Eksperimentele ontwikkeling	61
3.5	Volgende stappe	63
4	Opsomming	66
A	Lys van afkortings	68
	Bibliografie	70

Lys van figure

1.1	TEM-mikrofoto van <i>Synechocystis</i>	3
1.2	Elektrontransportketting in die tilakoïedmembraan	5
1.3	Calvin-Benson-Bassham siklus	6
1.4	Struktuur van LHCII	8
1.5	PSII C ₂ S ₂ M ₂ -superkompleks in plante	8
1.6	Skematiese diagram van 'n fikobilisoom	9
1.7	Konfokale mikroskopie	12
1.8	Blokdiagram van 'n stelsel	15
1.9	Blokdiagram van 'n ooplusbeheerstelsel	16
1.10	Blokdiagram van 'n terugvoerbeheerstelsel	16
1.11	Blokdiagram van 'n terugvoerbeheerstelsel met 'n Kalmanfilter	17
2.1	Orbitaalskandeerpatroon	23
2.2	Gemiddelde intensiteit by 'n vaste afstand vanaf die middelpunt van rotasie	24
2.3	Ruitersprong-skandeerpatroon	25
2.4	MINFLUX-skandeerpatroon	26
2.5	CRB langs die x-as, orbitaalmetode	31
2.6	CRB langs die x-as, ruitersprong-metode	32
2.7	CRB langs die x-as, MINFLUX	32
2.8	CRB langs die x-as vir verskillende metodes	33

2.9	CRB langs die x-as, orbitaalmetode met iSCAT-lokalisering	36
2.10	Eendimensionele lokalisering met 'n Gaussiese bundel	37
2.11	CRB as 'n funksie van die aantal fotone vir iSCAT en fluoressensie . . .	39
2.12	Gesimuleerde traprespons van die verhoog	40
2.13	Goeie nasporingstrajek	45
2.14	Trajek van 'n 'amper-nagespoorde' deeltjie	46
2.15	Nasporingsfout as 'n funksie van die diffusiekoëffisiënt	47
2.16	Nasporingsfout vir fluoressensie en iSCAT	48
2.17	Nasporingsfout vir fluoressensie en iSCAT, hoër beligtingsintensiteit . .	49
3.1	Skematiese diagram van die SMS-opstelling	54
3.2	Opstelling om bundelskandering te bewerkstellig	56
3.3	Vloediagram van hooftoestandmasjien	58
3.4	Vloediagram van metingskode	60
3.5	Gemete Gaussiese bundelprofiel	61
3.6	Intensiteit-tydspoor vir diffusie	62
3.7	Autokorrelasiefunksie, stilstaande bundel	63
3.8	Autokorrelasiefunksie, roterende bundel	64

Hoofstuk 1

Inleiding

1.1 Fotosintese

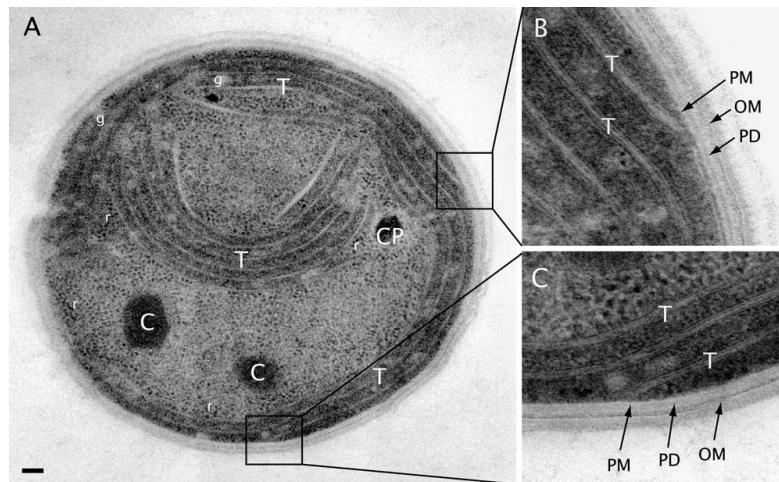
Fotosintese is die belangrikste biologiese proses op Aarde. Dit is omdat lewende organismes 'n lae-entropie-toestand moet handhaaf, wat slegs moontlik is met 'n konstante vloeï van energie [1]. Die son bestraal die aarde teen 173 PW [2], wat omtrent 99.97 % van die totale energie-inset is - die hittevloei vanaf die binnekant van die aarde is omtrent 47 TW [3]. Die son is nie net die uiteindelijke bron van energie vir lewe nie, dit is ook die direkte bron daarvan. Behalwe vir 'n relatief klein aantal spesies wat in ekstreme toestande, soos byvoorbeeld diep in die oseaan, voorkom, is alle outotrofe (organismes wat energie ontgin uit nie-organiese stowwe) afhanklik van sonlig. Die energie van die son word deur hierdie organismes in chemiese energie omgeskakel, waarna dit uiteindelik in die voedselketting opbeweeg. Fotosintese gebeur in groen plante, sowel as baie soorte alge en bakterieë. Die meeste fotosintetiese organismes het die vermoë om CO_2 vas te lê, d.w.s. dit om te skakel na (energie-digte) organiese molekules. Dit vorm deel van die koolstofsiklus, omdat organismes wat hoër op in die voedselketting is, weer hierdie CO_2 vrystel wanneer hulle die produkverbindinge van fotosintese verbrand. Die organisme

wat verantwoordelik is vir die meeste CO₂-vaslegging is sianobakterieë [4]. Die naam verwys na die blougroen kleur van meeste spesies (*kyanós* is Grieks vir blou). Sianobakterieë beslaan egter 'n hele filum en baie spesies is nie blougroen nie. Die kleur kom vanaf pigmente genaamd fikobiliene sowel as chlorofil en karotenoïedes. Die spesifieke kombinasie van hierdie pigmente bepaal die kleur, wat byvoorbeeld ook rooibruin of geelgroen kan wees. Sianobakterieë was die eerste organismes wat suurstofproduserende (oksigeniese) fotosintese ontwikkel het, 2.7 miljard jaar gelede. Dit het uiteindelik gelei tot 'n suurstofryke atmosfeer, sowel as 'n osoonlaag wat UV-strale uitfilter. Dit het landplante en -diere in staat gestel om te floreer [5].

Daar is twee benodighede vir die vaslegging van CO₂: energie en reduseerkrag ('n elektronskenker). Sommige bakterieë gebruik waterstofsulfied of waterstof as 'n primêre elektronskenker, terwyl plante, alge en sianobakterieë water gebruik [6]. Hierdie stowwe is nie sterk elektronskenkers nie en dus neem dit energie om hierdie reaksie te bewerkstellig. Fotosintese vind plaas in drie stappe: (1) sonligenergie word vasgevang en terselfdertyd word 'n (swak) elektronskenker geoksideer (as die elektronskenker water is, gaan dit gepaard met die produksie van suurstof); (2) hierdie energie word gebruik vir die sintese van adenosientrifosfaat (ATP) ('n bron van energie) en nikotienamied-adeniendinukleotiedfosfaat (NADPH) ('n sterk elektronskenker); en (3) die ATP en NADPH word gebruik om CO₂ om te skakel na organiese molekules. Die eerste twee fases staan bekend as die lig-afhanklike reaksies, terwyl die derde stap gebeur in 'n proses genaamd die Calvin-siklus. Die lig-afhanklike reaksies kan gesien word as die omskakeling van 'n moeilik bruikbare energiebron (sonlig) en 'n swak elektronskenker (water, waterstof of waterstofsulfied) na 'n maklik bruikbare energiebron (ATP) en 'n sterk elektronskenker (NADPH).

Die sianobakterie *Synechocystis* PCC6803 word beskou as 'n modelorganisme vir fotosintese [7]. Dit is 'n eensellige bakterie wat, soos alle sianobakterieë, oksigeniese fotosintese uitvoer. Soos alle sianobakterieë (en die chloroplaste van groen plante),

bevat dit interne membraanstrukture bekend as tilakoïede. Die binnekant van die membraan staan bekend as die lumen, terwyl die buitekant van die membraan bekend staan as die stroma (die stroma is aaneenlopend met die sitoplasma van die sel) [8]. Die lig-afhanklike reaksies vind plaas in die tilakoïedmembraan self, terwyl die Calvin-siklus plaasvind in die stroma.



Figuur 1.1: TEM-mikrofoto van *Synechocystis* [9].

1.1.1 Lig-afhanklike reaksies

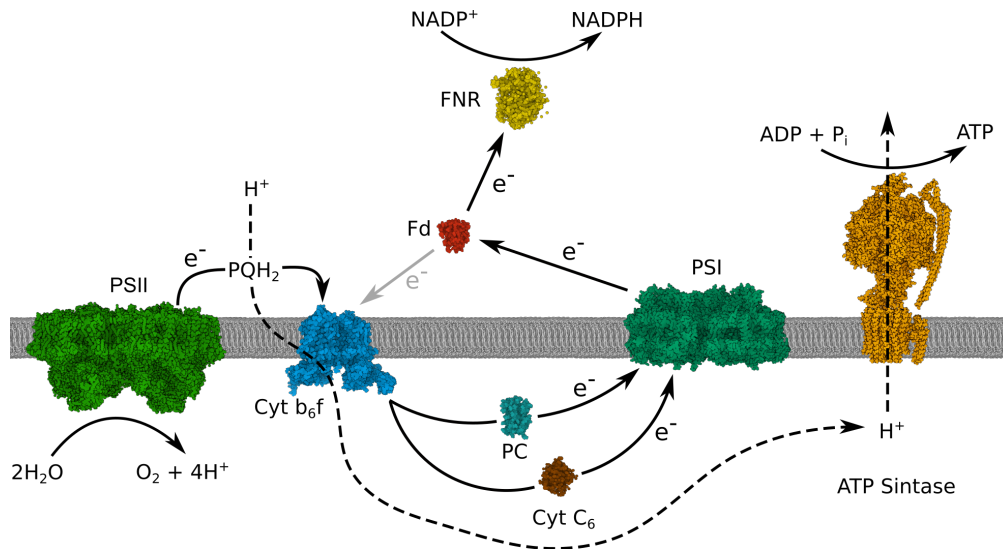
Hierdie afdeling en die volgende een is gebaseer op die beskrywing in Madigan *et al.* (2012) [6] behalwe waar ander bronne gegee word. Die lig-afhanklike reaksies vind in die tilakoïedmembraan plaas (Fig. 1.2) en is basies dieselfde in alle suurstof-produiserende organismes (plante, alge en sianobakterieë). Daar is 'n elektrontransportketting wat bestaan uit drie proteïenkomplekse, fotosisteam I en II (PSI en PSII), sowel as sitochroom (Cyt) b_6f . Fotosisteme bestaan uit reaksiesentrums, waar ladingoordrag gebeur, sowel as ligoestingskomplekse wat fotone absorbeer en na die reaksiesentrum oordra. Beide hierdie komponente bestaan uit pigmente vasgevang in 'n proteïen-en-lipied-raamwerk. Die proses begin

by PSII. Wanneer 'n foton geabsorbeer word deur enige pigment in die kompleks, word die energie binne-in die kompleks gekanaliseer tot by die 'spesiale paar', twee chlorofil-molekules genaamd P680 (omdat dit lig absorbeer by 680 nm). Hierdie opgewekte molekules dra dan 'n elektron oor na feofitien. Die P680⁺ wat so gevorm word, is die kragtigste biologiese oksideermiddel wat bekend is, en word gebruik om water te hidroliseer, soos hieronder bespreek.

Die ontvanger vir die elektrone wat PSII verlaat, is kinoon. Elke kinoon ontvang twee elektrone en hierdie gereduseerde kinoon staan bekend as plastokinon (aangedui as PQ). Dit bind met twee protone uit die stroma om plastokinol (PQH₂) te vorm, wat weer bind aan Cyt b₆f. Deur middel van 'n stel redoksreaksies genaamd die Q-siklus [10] word die elektrone vanaf PQH₂ oorgedra na een van twee proteïene, naamlik plastosianien (pC) of Cyt c₆. Albei hierdie proteïene word gevind in sianobakterieë en meeste groen alge, terwyl slegs eersgenoemde gevind word in plante en sommige alge [11,12]. Die protone vanaf PQH₂ word in die lumen vrygestel. Vir elke elektron oorgedra, word daar dus 'n proton gepomp vanaf die stroma na die lumen. Plastosianien of Cyt c₆ dra die elektron oor na fotosisteam 1. PSI se reaksiesentrum (spesifiek nog 'n spesiale paar, P700), ontvang die elektron vanaf pC. Hier word heelwat energie bygevoeg, deur middel van opwekkingsenergie vanaf ligoestingskomplekse, en die elektron word oorgedra na ferredoksien (Fd), aan die stromale kant van die tilakoïedmembraan. Twee ferredoksienmolekules dra dan elk hul elektron oor na 'n NADP⁺ molekule plus 'n proton om NADPH te vorm, gekataliseer deur ferredoksien-NADP-reduktase (FNR). Hier kan daar ook elektrone teruggevoer word na Cyt b₆f, vir die produksie van ATP sonder NADPH (omdat ATP vir ander metaboliese prosesse ook gebruik word en nie net vir koolstoffiksering nie).

Die Cyt b₆f-protonpomp, sowel as die NADP⁺-reduksie, dra albei by tot 'n protongradiënt oor die tilakoïedmembraan. Die protone beweeg van die lumen af

na die stroma deur 'n ensiem genaamd ATP-sintase, wat die vloei van protone gebruik om ADP te fosforileer na ATP, met 3-4 protone wat gebruik word vir die produksie van een ATP.

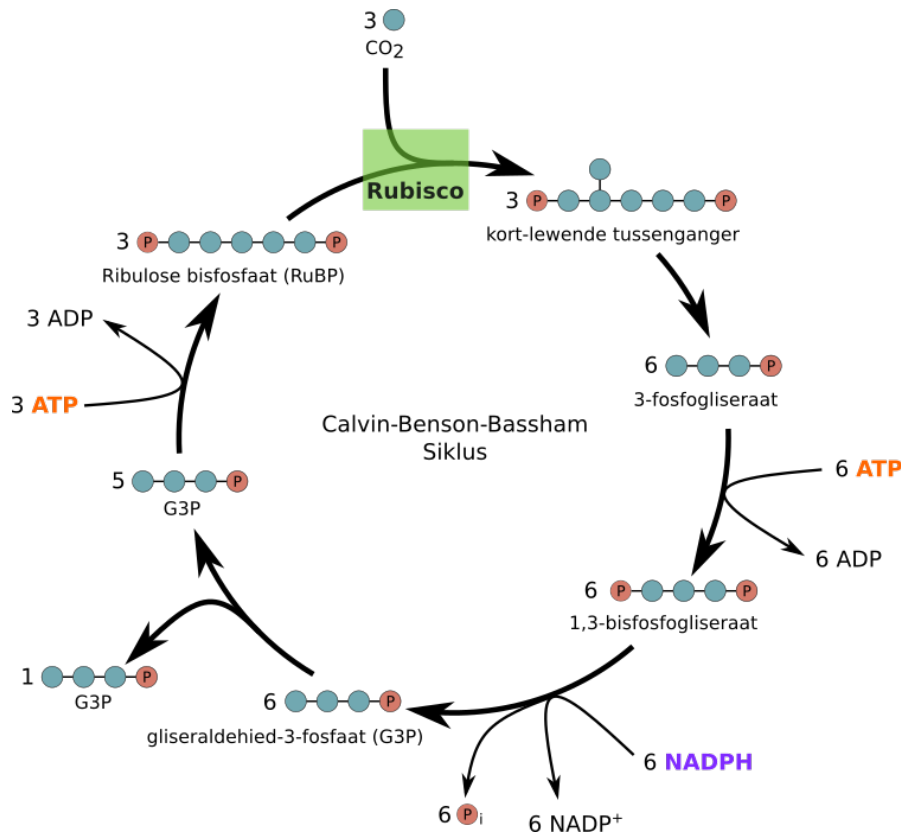


Figuur 1.2: Elektrontransportketting in die tilakoïedmembraan.

1.1.2 Lig-onafhanklike reaksies

Die ATP en NADPH wat geproduseer word deur die lig-afhanklike reaksies word gebruik om 'n proses aan te dryf wat bekend staan as die Calvin-Benson-Bassham-siklus, ook bekend as die Calvin-siklus (Fig. 1.3). Dit begin met die reaksie van ribulose-bisfosfaat (RuBP) met CO_2 , 'n reaksie wat gekataliseer word deur 'n ensiem genaamd ribulose-bisfosfaat karboksilase (RuBisCo). CO_2 reageer in 'n 1:1 stoïchiometriese verhouding met RuBP. Om die siklus beter te verstaan beskou ons egter 3 CO_2 molekules. Die reaksie met RuBP lewer 3 hoogs onstabiele seskoolstof-verbindinge wat ontbind om 6 molekules van 3-fosfogliseraat te vorm. Elkeen van hierdie molekules word dan gefosforileer deur 'n ATP en produseer 1,3-bisfosfogliseraat. Dit word gereduseer deur NADPH en vorm gliseraldehyd-3-fosfaat

(G3P). Vyf uit elke ses G3P molekules word gebruik om 3 RuBP te hergenerereer, deur met nog 3 ATP-molekules te reageer. Die oorblywende G3P kan gebruik word om onder andere glukose te vervaardig. Daardeur is die 3 koolstofatome waarmee ons begin het nou vasgelê.



Figuur 1.3: Calvin-Benson-Bassham siklus.

1.1.3 Ligoestingskomplekse

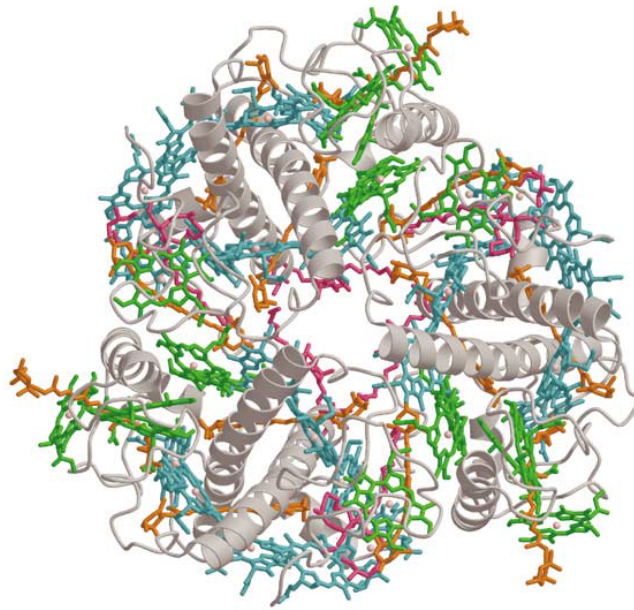
Die reaksiesentrums van PSI en PSII is op hul eie ten volle funksioneel. Op hul eie is hulle egter nie baie effektief met die absorpsie van fotone nie. Om hierdie rede is hulle gekoppel aan ligoestingskomplekse - groot komplekse wat baie pigmente bevat. As enige van hierdie pigmente 'n foton absorbeer, kan die energie na die

reaksiesentrum oorgedra word en sodoende word die effektiwiteit van ligopvangs grootliks verbeter. Ligoestingskomplekse het ook die vermoë om energieoordrag te reguleer, en kan onder hoë ligintensiteite die hoeveelheid energie wat na die reaksiesentrum oorgedra word afskaal, en daardeur fotoskade beperk [13].

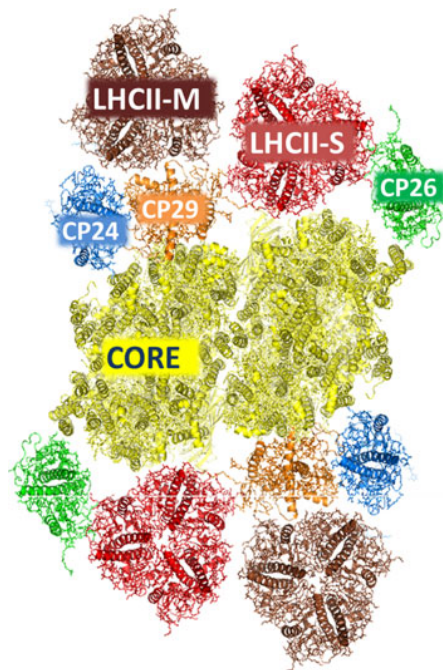
Die reaksiesentrums van PSI en PSII is bykans identies tussen verskillende organismes [14]. Daarteenoor is daar baie variasie in die ligoestingskomplekse. In plante is die hoofligoestingskompleks van PSII byvoorbeeld ligoestingskompleks II (LHCII). Dit bevat chlorofil a en b sowel as karotenoïedes en is binne-in die tilakoïedmembraan geleë. In groen swael- en groen nie-swaelbakterieë is daar groot antennestrukture genaamd chlorosome, wat bestaan uit bakteriochlorofil-stafies wat nie in 'n proteïenmatriks omsluit is nie. In *Synechocystis* en ander sianobakterieë, sowel as rooi alge, is die hoofantennekompleks die fikobilisoom. Dit is 'n wateroplosbare kompleks wat op die oppervlak van die tilakoïedmembraan gevind word [15].

LHCII is drievoudig simmetries (trimeries) met drie amper identiese subeenhede (monomere) (Fig. 1.4). Elke monomeer bestaan uit die volgende pigmente: 8 chlorofil a, 6 chlorofil b en 4 karotenoïedes: 2 luteïen, 1 neoxantien en 1 violaxantien [16,17]. Dit is binne-in die tilakoïedmembraan geleë, tesame met die reaksiesentrums en bykomstige ligoestingskomplekse (Fig. 1.5). Behalwe daarvoor dat hulle ook lig absorbeer, is hierdie bykomstige komplekse belangrik vir oordrag van energie vanaf LHCII na die kern.

Fikobilisoom bind pigmente genaamd fikobiliene, waarvan vier soorte in sianobakterieë voorkom: fiko-eritrobilien, fikosianobilien, fiko-urobilien en fikobiliviolen. Die pigmente bind aan fikobiliproteïene, waarvan daar 3 hoofsoorte is: fiko-eritriene, fikosianiene en allofikosianien [20]. In *Synechocystis* word slegs laasgenoemde twee gevind. Die struktuur van die *Synechocystis*-fikobilisoom is halfmaanvormig, met 'n kern van allofikosianien en radiale stafies van fikosianien, sien Fig. 1.6. Daar is

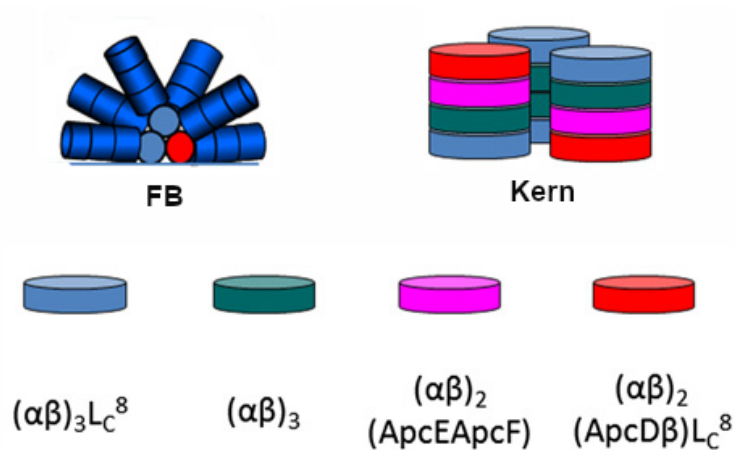


Figuur 1.4: Struktuur van LHCII met aangedui chlorofil a (siaan), chlorofil b (groen) en karotenoïedes (oranje) [18].



Figuur 1.5: PSII $C_2S_2M_2$ -superkompleks in plante. Die twee kernkomplekse bevat die reaksiesentrums en dit word omring deur LHCII en die kleinere ligoestingskomplekse CP24, CP29 en CP26 [19].

ses stafies wat elk bestaan uit drie heksameriese skywe wat identies is, maar wel verskillende skakelproteïene tussenin het. Daar is dus 6 kopieë van elke heksameer-skakelproteïenkombinasie in die kompleks, met 18 pigmente elk. Die kern het drie silinders wat elk bestaan uit vier trimere (met ses pigmente elk), waarvan daar vier soorte is, soos getoon in Fig. 1.6 [21]. Die fikobilisoom is 'n massiewe proteïenkompleks: in *Synechocystis* is dit $60 \times 60 \times 12 \text{ nm}^3$ en dit bind 'n merkwaardige 396 fikosianobiliene! [22]. Die fikobilisoom is wateroplosbaar en sit bo-op die tilakoïedmembraan. Energie word gekanaliseer na die middel, vanwaar dit na die fotosisteam oorgedra word.



Figuur 1.6: Skematiese diagram van 'n fikobilisoom, met die komponente van die kern aangedui. α en β dui die α^{APC} en β^{APC} polipeptiede aan. L_C^8 is 'n skakelproteïen, terwyl ApcE en ApcD polipeptiede is wat α^{APC} vervang en ApcF 'n polipeptied is wat β^{APC} vervang. Aangepas uit [21].

1.2 Enkeldeeltjie-nasporing

1.2.1 Enkelmolekule-spektroskopie

Optiese spektroskopie is 'n besonder nuttige manier om ligoestingskomplekse te bestudeer, aangesien hulle baie foto-aktief is. Fluoresensie-spektroskopie behels

die beligting van die monster met bv. 'n laser en die waarneem van die resulterende fluoressensie. Hierdie eksperiment behels egter gewoonlik die waarneem van die gemiddelde gedrag van 'n baie groot aantal individuele komplekse. Die komplekse se individuele gedrag is baie kompleks en nie gesinkroniseer met ander komplekse nie. Hierdie gedrag gaan dus maklik verlore in 'n ensemble-meting. Daarom is dit baie waardevol om die komplekse individueel te bestudeer. 'n Tegniek wat dit regkry, is enkelmolekule-spektroskopie (SMS). Hierdie tegniek is al suksesvol toegepas op 'n verskeidenheid van fotosintetiese sisteme, insluitend dié van pers bakterieë [23], groen swaembakterieë [24], sianobakterieë [25] en groen plante [26].

Daar is twee basiese benodighede vir enkelmolekule-spektroskopie. Eerstens moet 'n enkele fluoressente deeltjie belig word, en tweedens moet die resulterende fluoressensie waargeneem word.

Om aan die eerste vereiste te voldoen moet 'n baie klein gebied belig word. Vir dié doeleinde word 'n laser en 'n mikroskoopobjektief gebruik. As 'n vlakgolf deur die objektief gefokus word, produseer dit 'n Airy-patroon, en die eerste-orde maksimum het 'n radius wat afhang van die golflengte (λ) sowel as die objektief se sg. numeriese lensopening (NA), en word gegee deur

$$r \approx 0.61 \frac{\lambda}{NA}.$$

Die objektief in ons opstelling het byvoorbeeld 'n NA van 1.45 wat beteken dat met 'n goeie laserbundel en 'n golflengte van 630 nm ons (in die afwesigheid van enige aberrasies) 'n Airyskyf kan behaal met 'n radius van 260 nm. Om 'n enkele kompleks waar te neem, moet ons dan net die (baie suiwer) monster genoegsaam verdun, waarna die komplekse toegelaat word om aan 'n substraat (bv. 'n glaskyfie) vas te heg, met die gemiddelde afstand tussen komplekse heelwat groter as die gefokusde laserkol.

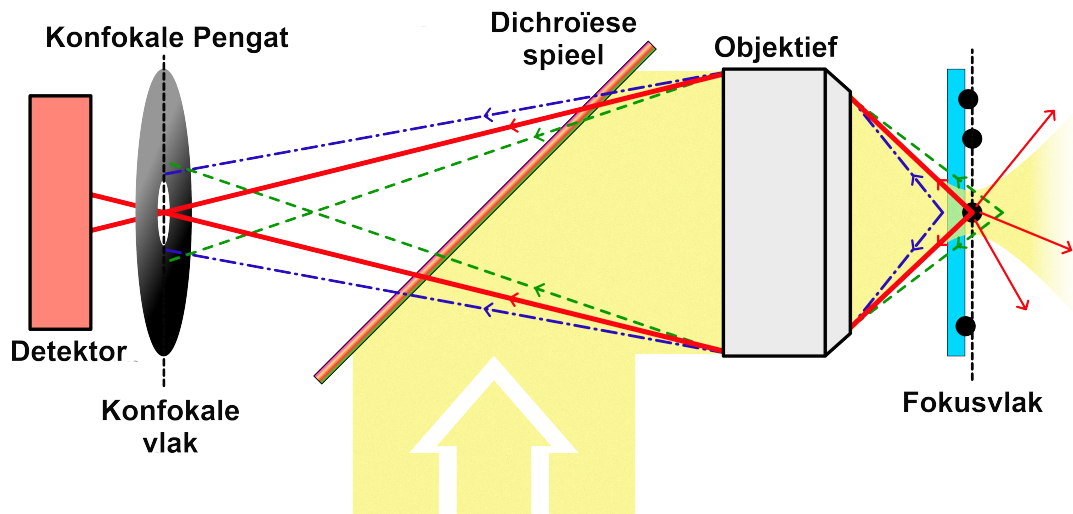
Die tweede vereiste is moeiliker om te realiseer. Die fluoressensie vanaf 'n enkele kompleks is 'n besondere swak sein en is 'n paar ordegrottes kleiner as

die agtergrond. Daarom benodig mens dus beide 'n sensitiewe detektor sowel as 'n manier om die sein-tot-agtergrondverhouding te verbeter. Wat die detektor betref, gebruik ons opstelling twee soorte: vir die meet van fluoressensie-intensiteit en -leeftyd word 'n enkelfoton-stortingsdiode (SPAD) gebruik, wat enkele fotone waarneem met hoë sensitiwiteit en tydresolusie, en vir die meet van fluoressensie-spektra word 'n hoogs sensitiewe CCD-kamera gebruik, nadat die fotone deur 'n diffraksierooster ruimtelik volgens energie versprei word. Die grootste bron van agtergrondruis is terugverstrooiing van die opwekkingslig. Die meeste hiervan word uitgefilter deur 'n dichroïese spieël en 'n fluoressensiefilter, wat albei slegs lang golflengtes deurlaat. 'n Belangrike verdere tegniek is die gebruik van 'n konfokale pengat (Fig. 1.7), wat as volg funksioneer: die fluoressensie kom vanaf 'n puntbron by die fokus van die objektief, terwyl omtrent al die agtergrond uit fokus is. Deur 'n baie klein pengat by die ander fokusvlak (die konfokale vlak agter die objektief) te plaas, word slegs die fluoressensie deurgelaat en sodoende word die sein-tot-ruisverhouding grootliks verbeter.

1.2.2 Diffunderende deeltjies

Enkelmolekule-spektroskopie soos hierbo bespreek het verskeie nadele wanneer dit toegepas word op ligoestingskomplekse. In besonder is die omgewingstoestande in standaard SMS 'n swak weerspieëling van die natuurlike omgewing. Dit beperk tot 'n groot mate die relevansie van die resultate oor die gedrag van die proteïensisteme onder natuurlike toestande. Een belangrike manier waarop die standaard SMS-omgewing van die natuurlike een verskil, is die feit dat die komplekse geïsoleer en vasgeheg is aan 'n oppervlak. As SMS toegepas kan word op vry diffunderende deeltjies, sal dit moontlik wees om ligoestingskomplekse te bestudeer in 'n omgewing wat naby aan in-vivo is.

Die tegniek wat gebruik word om vry diffunderende deeltjies te bestudeer,



Figuur 1.7: Konfokale mikroskopie. Die soliede geel verteenwoordig die opwekkingslig. Die rooi lyne verteenwoordig die sein vanaf die monster, wat in fokus is. Die blou en groen stippellyne verteenwoordig lig wat nie vanaf die fokus kom nie, en dus deur die konfokale pengan geblokkeer word. Aangepas uit [27].

staan bekend as enkeldeeltjie-nasporing (SPT). Die term verwys eintlik na 'n wye verskeidenheid van tegnieke wat verskillende toepassings het. Vir ons doeleindes kan ons die tegnieke in twee hoofkampe verdeel. Eerstens is daar tegnieke wat slegs poog om die beweging van 'n deeltjie te meet. Hierdie tegnieke kan beskou word as gevorderde mikroskopie. Tweedens is daar tegnieke wat toelaat dat spektroskopiese metings gedoen word op 'n diffunderende deeltjie. Hierdie tegnieke berus op 'n terugvoerlus wat die posisie van die deeltjie meet en dit dan herposisioneer in die fokus van die laserbundel. Tegnieke wat in hierdie kategorie val is onder andere die ABEL-val [28], die tetrahedron-opsporingsvolume [29], orbitale nasporing [30], 3D-multiresolusie-mikroskopie [31], en iSCAT [32], sowel as die onlangse TSUNAMI [33] en MINFLUX [34].

In Hoofstuk 2 word verskeie tegnieke in diepte bespreek.

1.3 Statistiek

Hierdie afdeling is gebaseer op Silvey (1975) [35]. Die beraming van 'n onbekende waarde is 'n algemene probleem in statistiek. In werklikheid is alle eksperimentele groothede eintlik (moontlik baie presiese) beramings. Ons beskou hier 'n spesifieke geval van hierdie probleem, naamlik die beraming van 'n parameter θ van 'n verdeling P_θ . 'n Eenvoudige voorbeeld sou wees die bepaling van die gemiddelde lengte van 'n groot groep mense deur middel van 'n steekproef. Ons aanvaar byvoorbeeld dat die lengtes van mense beskryf word deur die normaalverdeling $P_{\mu,\sigma}$, met μ en σ onderskeidelik die gemiddeld en standaardafwyking. Ons meet dan N mense se lengtes $\bar{l} = \{l_1, l_2, \dots, l_N\}$. Die gemiddeld hiervan is natuurlik 'n beraming van μ . As ons nog 'n steekproef doen ('n ander waarde van \bar{l}), sal ons egter 'n ander beraming kry van μ . In die algemeen staan die funksie $\hat{\mu}(\bar{l}) = \frac{1}{N} \sum \bar{l}$ bekend as 'n *beramer* van μ , terwyl die waarde van $\hat{\mu}(\bar{l})$ vir 'n spesifieke \bar{l} 'n *beraming* is van μ . Die beramer $\hat{\mu}$ is self ook 'n stogastiese veranderlike met 'n spesifieke verdeling, aangesien dit vanuit 'n ewekansige steekproef bereken word. Ons kan dus die verwagte waarde $E(\hat{\mu})$ sowel as die variansie $\text{var}(\hat{\mu})$ van $\hat{\mu}$ beskou. As $E(\hat{\mu}) = \mu$, dan sê ons dat die beramer *onsydig* is. Die variansie van 'n beramer kan beskou word as 'n aanduiding van hoe 'goed' die beramer is (hoe kleiner die variansie is, hoe beter). Ons kan dus vir enige verdeling P_θ vra wat die 'beste' beramer is vir θ . Dus verkry ons die konsep van 'n *minimumvariensie-onsydige beramer*. In praktyk bestaan daar nie altyd so 'n beramer nie, maar daar is egter 'n kragtige stelling, naamlik die Cramér-Rao-ongelykheid:

Stelling 1 *Laat $P_\theta : \theta \in \Theta$ 'n familie van verdelings wees in 'n steekproefruimte X , met θ 'n reële parameter in 'n interval Θ . Neem aan dat P_θ gedefinieer word deur 'n digtheidsfunksie $p(x, \theta)$ vir alle θ , met $x \in X$. Dan, onderhewig aan sekere reëlmatigheidsvoorwaardes, voldoen die variansie van enige onsydige beramer $\hat{\theta}$ van*

θ aan die ongelykheid:

$$\text{var}(\hat{\theta}) \geq \frac{1}{E \left[\left(\frac{\partial}{\partial \theta} \ln p(x, \theta) \right)^2 \right]}.$$

Hierdie stelling verskaf vir ons 'n manier om 'n ondergrens te kry vir die variansie van enige onsydige beramer, en dit plaas dus 'n perk op die presisie waarmee 'n beraming van θ gedoen kan word. Die term $E \left[\left(\frac{\partial}{\partial \theta} \ln p(x, \theta) \right)^2 \right]$ staan bekend as die Fisher-inligting I_θ , aangesien dit 'n aanduiding is van die hoeveelheid inligting wat die gemete veranderlike x verskaf oor die parameter θ . Dit kan bewys word (gegeve reëlmatigheidsvoorwaardes) dat:

$$I_\theta = E \left[-\frac{\partial^2}{\partial \theta^2} \ln p(x, \theta) \right]. \quad (1.1)$$

Verder kan die Fisher-inligting veralgemeen word vir 'n parametervektor $\theta \in \mathbb{R}^s$. In hierdie geval is die Fisher-inligting 'n $s \times s$ matriks F_θ waarvan die i, j -de komponent gelyk is aan:

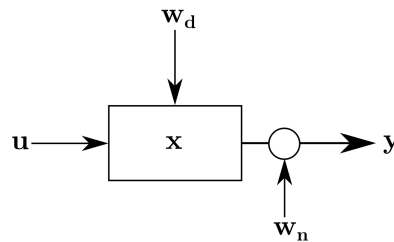
$$E \left[-\frac{\partial^2 \ln p(x, \theta)}{\partial \theta_i \partial \theta_j} \right], \quad (1.2)$$

weereens gegewe reëlmatigheidsvoorwaardes. In hierdie geval stel die Cramér-Rao-ongelykheid dat as $\hat{\theta}$ 'n onsydige beramer is van θ , dan sal die variansiematriks daarvan, die $s \times s$ -matriks $E[(\hat{\theta} - \theta)(\hat{\theta} - \theta)^\top]$, só wees dat $\text{var}(\hat{\theta}) - F_\theta^{-1}$ positief semi-definiet is. In hierdie sin is F_θ^{-1} dus 'n 'ondergrens' vir die variansiematriks van $\hat{\theta}$.

1.4 Beheerteorie

'n Dinamiese stelsel is 'n tyd-afhanklike stel veranderlikes $\mathbf{x}(t)$ wat beskryf kan word deur differensiaalvergelykings met tydafgeleides. Die term word ook gebruik om te verwys na die fisiese proses wat deur middel van hierdie wiskundige model beskryf word. In beheerteorie word gewoonlik gewerk in terme van 'n stelsel $\mathbf{x}(t)$

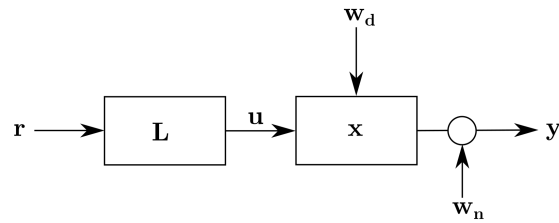
waarvan die dinamika bepaal word deur een of meer insetveranderlikes $\mathbf{u}(t)$. Verder bepaal die stelsel se dinamika een of meer uitsetveranderlikes $\mathbf{y}(t)$, en is dit ook onderhewig aan versteurings $\mathbf{w}_d(t)$. Verder is daar ook ruis $\mathbf{w}_n(t)$ in die meting van $\mathbf{y}(t)$. Dit kan voorgestel word met 'n blokdiagram (Fig. 1.8).



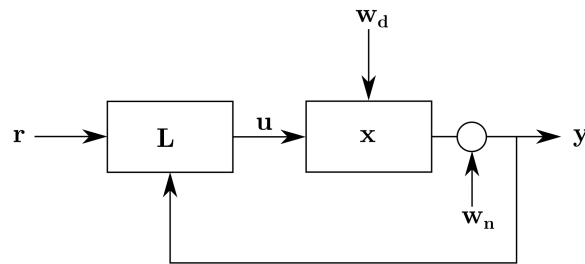
Figuur 1.8: Blokdiagram van 'n stelsel met toestand \mathbf{x} , inset \mathbf{u} , versteurings \mathbf{w}_d , ruis \mathbf{w}_n en uitset \mathbf{y} .

Die eenvoudigste vorm van beheer is sogenaamde oplusbeheer (Fig. 1.9). Hier word die inset bepaal deur die beheerder gebaseer op gegewe doelwitte tesame met 'n model van die stelsel. In geslotelusbeheer of terugvoerbeheer word die uitsetveranderlikes gemeet en gebruik om beheer toe te pas (Fig. 1.10). Dit het die groot voordeel dat daar beide vir versteurings vergoed word, sowel as vir gedrag wat afwyk vanaf die model (wat altyd in 'n werklike stelsel gevind word). Terugvoerbeheer is natuurlik 'n alombekende verskynsel, beide in mensgemaakte en natuurlike stelsels. Eenvoudige voorbeelde sluit in 'n termostaat in 'n oond of waterverwarmer, of die aanpassing in die oog van die grootte van die pupil by die hoeveelheid invallende lig.

Beheerteorie is grootliks ontwikkel rondom lineêre stelsels, dit wil sê stelsels wat deur lineêre differensiaalvergelykings beskryf word. Dit is omdat daar kragtige wiskundige metodes bestaan om lineêre stelsels te analiseer. Die stelsels in ingenieurswese-toepassings is ook baiekeer ontwerp om lineêre dinamika te toon. Verder, omdat daar tipies 'n spesifieke toestand is waarin die stelsel gehou moet



Figuur 1.9: Blokdiagram van 'n oplusbeheerstelsel. Hier bepaal die beheerder \mathbf{L} die inset \mathbf{u} gebaseer op die gewenste resultaat \mathbf{r} .



Figuur 1.10: Blokdiagram van 'n terugvoerbeheerstelsel. Die beheerder \mathbf{L} bepaal die inset \mathbf{u} deur die gemete uitset \mathbf{y} te vergelyk met die gewenste resultaat \mathbf{r} .

word, kan selfs 'n nie-lineêre stelsel rondom daardie punt gelineariseer word.

Die standaardvorm vir 'n lineêre stelsel is:

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{B}\mathbf{u} + \mathbf{w}_d \quad (1.3)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{C}\mathbf{x} + \mathbf{w}_n, \quad (1.4)$$

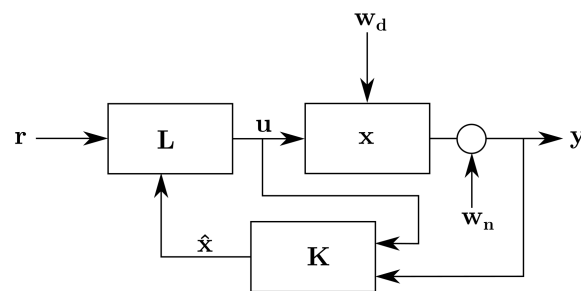
waar \mathbf{x} die toestandvektor is, \mathbf{u} die inset is, \mathbf{y} die gemete uitset is en \mathbf{w}_d en \mathbf{w}_n onderskeidelik versteurings (ook bekend as prosesruis) en metingsruis verteenwoordig. Ons aanvaar dat \mathbf{A} , \mathbf{B} en \mathbf{C} konstant is in tyd.

Die beheerder is tipies ook 'n lineêre stelsel, byvoorbeeld met die vorm:

$$\mathbf{u} = -\mathbf{L}\mathbf{x}. \quad (1.5)$$

Daar is verskeie maniere om 'n geskikte waarde vir \mathbf{L} te verkry. In hierdie verhandeling gaan ons gebruik maak van 'n beheerwet genaamd 'n *lineêre kwadratiese*

reguleerder, wat verder bespreek word in Par. 1.4.3. Let wel dat die beheerder gebruik maak van die ware toestand \mathbf{x} , maar dit wat ons direk meet is die uitset \mathbf{y} . In besonder het die ruis \mathbf{w}_n moontlik 'n groot impak op die doeltreffendheid van die beheer, as ons nie daarvoor vergoed nie. Dit is die doel van die *Kalmanfilter*. Gegewe 'n lineêre stelsel met Gaussiese proses- en metingsruis, is die Kalmanfilter 'n manier om die ware toestand \mathbf{x} te beraam. Dit kan met 'n blokdiagram voorgestel word soos in Fig. 1.11, en word verder bespreek in Par. 1.4.2.



Figuur 1.11: Blokdiagram van 'n terugvoerbeheerstelsel met 'n Kalmanfilter. Die Kalmanfilter, aangedui deur \mathbf{K} , vergelyk die meting \mathbf{y} met die verwagte toestand (gebaseer op die inset \mathbf{u}) en verkry 'n beraming van die werklike toestand $\hat{\mathbf{x}}$, wat deur die beheerder \mathbf{L} gebruik word om terugvoer toe te pas.

1.4.1 Diskretisering

Beide die beheerwet sowel as die Kalmanfilter word in 'n digitale rekenaar geïmplementeer. 'n Rekenaarprogram is egter noodwendig 'n diskrete-tydstelsel. Dus skakel ons nou die kontinue-tydstelsel in Vgls. (1.3) en (1.4) om na 'n diskrete-tydstelsel. Hierdie afleiding is gebaseer op Simon (2006) [36]. Die algemene oplossing vir die stelsel in Vgls. (1.3) en (1.4) is:

$$\mathbf{x}(t) = e^{\mathbf{A}(t-t_0)}\mathbf{x}(t_0) + \int_{t_0}^t e^{\mathbf{A}(t-\tau)}\mathbf{B}\mathbf{u}(\tau)d\tau. \quad (1.6)$$

Ons kies nou 'n diskrete tydstep $t = t_k$ en laat $t_0 = t_{k-1}$ (die vorige diskrete tydstep). Ons aanvaar ook dat $\mathbf{A}(\tau)$, $\mathbf{B}(\tau)$ en $\mathbf{u}(\tau)$ by benadering konstant is in

die integrasieinterval. Dan verkry ons:

$$\mathbf{x}(t_k) = e^{\mathbf{A}(t_k - t_{k-1})} \mathbf{x}(t_{k-1}) + \int_{t_{k-1}}^{t_k} e^{\mathbf{A}(t_k - \tau)} \mathbf{B} \mathbf{u}(\tau) d\tau \quad (1.7)$$

$$= e^{\mathbf{A}(t_k - t_{k-1})} \mathbf{x}(t_{k-1}) + \int_{t_{k-1}}^{t_k} e^{\mathbf{A}(t_k - \tau)} d\tau \mathbf{B} \mathbf{u}(\tau), \quad (1.8)$$

aangesien \mathbf{B} en $\mathbf{u}(\tau)$ konstant is in die integrasieinterval. Nou definieer ons $\Delta t = t_k - t_{k-1}$ en $\alpha = \tau - t_{k-1}$ en verkry:

$$\mathbf{x}(t_k) = e^{\mathbf{A}\Delta t} \mathbf{x}(t_{k-1}) + \int_0^{\Delta t} e^{\mathbf{A}(\Delta t - \alpha)} d\alpha \mathbf{B} \mathbf{u}(t_k) \quad (1.9)$$

$$= e^{\mathbf{A}\Delta t} \mathbf{x}(t_{k-1}) + e^{\mathbf{A}\Delta t} \int_0^{\Delta t} e^{-\mathbf{A}\alpha} d\alpha \mathbf{B} \mathbf{u}(t_k) \quad (1.10)$$

$$\mathbf{x}_k = \mathbf{F} \mathbf{x}_{k-1} + \mathbf{G} \mathbf{u}_k. \quad (1.11)$$

Weereens gebruik ons die benadering dat \mathbf{u} konstant is en dus is $\mathbf{u}(\tau) = \mathbf{u}(t_k)$. Die matrikseksponensieel $e^{\mathbf{A}\Delta t}$ kan bereken word met die Taylor-uitbreiding:

$$e^{\mathbf{A}\Delta t} = \mathbf{I} + \mathbf{A}\Delta t + \frac{(\mathbf{A}\Delta t)^2}{2!} + \dots, \quad (1.12)$$

wat dit maklik maak om \mathbf{F} te bereken (by benadering). As \mathbf{A} omkeerbaar is, dan word die integraal oor $e^{-\mathbf{A}\tau}$ gegee deur:

$$\int_0^{\Delta t} e^{-\mathbf{A}\tau} d\tau = (\mathbf{I} - e^{-\mathbf{A}\Delta t}) \mathbf{A}^{-1}, \quad (1.13)$$

en \mathbf{G} word dus gegee deur:

$$\mathbf{G} = e^{\mathbf{A}\Delta t} \int_0^{\Delta t} e^{-\mathbf{A}\tau} d\tau \mathbf{B} \quad (1.14)$$

$$= \mathbf{F} (\mathbf{I} - e^{-\mathbf{A}\Delta t}) \mathbf{A}^{-1} \mathbf{B} \quad (1.15)$$

$$= (\mathbf{F} - \mathbf{I}) \mathbf{A}^{-1} \mathbf{B}. \quad (1.16)$$

1.4.2 Kalmanfilter

Om die Kalmanfilter te implementeer benodig ons ook die proses- en metingsruis-kovariansies \mathbf{D} en \mathbf{N} . Die volledige afleiding van die Kalmanfilter val buite die

bestek van hierdie verhandeling, maar die basiese beginsel is as volg: Die toestand \mathbf{x}_k word eers ‘voorspel’ gebaseer op \mathbf{x}_{k-1} en die dinamikamodel (dit word genoem die *a priori*-beraming). Daarna word die voorspelling ‘opgedateer’ gebaseer op die meting \mathbf{y}_k (dit word genoem die *a posteriori*-beraming.) Die relatiewe groottes van \mathbf{D} en \mathbf{N} bepaal die relatiewe gewig van onderskeidelik die *a priori*-beraming en die meting op die *a posteriori* beraming. As ons byvoorbeeld ’n stelsel het met baie metingsruis maar min versteurings, gaan die Kalmanfilter minder gewig gee aan die meting en die toestandberaming gaan meestal wees wat die dinamika voorspel. As ons ’n stelsel het met min metingsruis maar baie versteurings sal die filter weer meer gewig gee aan die meting. Die Kalmanfilter is wiskundig gebaseer op ’n kleinstekwadraat-minimering en verskaf (solank die ruis Gaussies is) die *optimale* beraming van die werklike toestand. Behalwe vir die toestand \mathbf{x} beraam ons ook die toestandkovariansie \mathbf{P} , wat die onsekerheid verteenwoordig in die beraming van \mathbf{x} . In elke iterasie word die *a priori*-beraming gegee deur [36]:

$$\bar{\mathbf{x}}_k = \mathbf{F}\mathbf{x}_{k-1} + \mathbf{B}\mathbf{u}_k \quad (1.17)$$

$$\bar{\mathbf{P}}_k = \mathbf{F}\mathbf{P}_{k-1}\mathbf{F}^\top + \mathbf{D}, \quad (1.18)$$

waarna die *a posteriori*-beraming gegee word deur:

$$\mathbf{K}_k = \bar{\mathbf{P}}_k \mathbf{C}^\top (\mathbf{C}\bar{\mathbf{P}}_k \mathbf{C}^\top + \mathbf{N})^{-1} \quad (1.19)$$

$$\mathbf{x}_k = \bar{\mathbf{x}}_k + \mathbf{K}_k (\mathbf{y}_k - \mathbf{C}\bar{\mathbf{x}}_k) \quad (1.20)$$

$$\mathbf{P}_k = (\mathbf{I} - \mathbf{K}\mathbf{C})\bar{\mathbf{P}}_k. \quad (1.21)$$

Die beginwaardes \mathbf{x}_0 en \mathbf{P}_0 is die aanvanklike toestand en die aanvanklike toestandkovariansie gebaseer op ons aanvanklike kennis oor die toestand. \mathbf{K}_k staan bekend as die Kalmanversterking, en dit bepaal hoe groot die invloed van die meting is op die toestandberaming, soos gesien kan word in Vgl. (1.20).

1.4.3 Lineêre Kwadratiese Reguleerder

Hierdie afdeling is gebaseer op Brogan (1991) [37]. Met 'n beraming vir die ware toestand, kan ons 'n terugvoerbeheerder bekend as 'n lineêre kwadratiese reguleerder gebruik om terugvoer toe te pas op die verhoog. Die LQR is 'n beheerwet in die vorm:

$$\mathbf{u}_k = -\mathbf{L}\mathbf{x}_k.$$

Die wiskundige basis vir die LQR-beheerder is dieselfde as vir die Kalmanfilter, en ons gaan weereens nie die afleiding hier insluit nie. Ons gaan wel hier aanvaar (anders as met die Kalmanfilter) dat ons by 'n ewewigstoestand werk en die verrigtingsindeks minimeer wat gedefinieer word as:

$$J = \sum_{k=0}^{\infty} (\mathbf{x}_k^{\top} \mathbf{Q} \mathbf{x}_k + \mathbf{u}_k^{\top} \mathbf{R} \mathbf{u}_k),$$

waar \mathbf{Q} en \mathbf{R} die LQR-gewigte genoem word. Hierdie gewigte word gekies volgens die toepassing en is analoog aan \mathbf{D} en \mathbf{N} van die Kalmanfilter. Basies verskaf \mathbf{Q} die 'koste' van 'n ongewenste toestand terwyl \mathbf{R} die 'koste' van beheerinsat verteenwoordig. Die gewenste respons word dus gebalanseer met die beperkings op beheeruitset.

Die waarde van \mathbf{L} wat J minimeer word gegee deur:

$$\mathbf{L} = (\mathbf{R} + \mathbf{B}^{\top} \mathbf{W} \mathbf{B})^{-1} \mathbf{B}^{\top} \mathbf{W} \mathbf{A},$$

waar \mathbf{W} die oplossing is vir die diskrete tyd-Riccativergelyking:

$$\mathbf{W} = \mathbf{A}^{\top} \mathbf{W} \mathbf{A} - (\mathbf{A}^{\top} \mathbf{W} \mathbf{B})(\mathbf{R} + \mathbf{B}^{\top} \mathbf{W} \mathbf{B})^{-1} (\mathbf{B}^{\top} \mathbf{W} \mathbf{A}) + \mathbf{Q}.$$

Die res van die verhandeling is as volg ingedeel: Hoofstuk 2 beskou verskeie metodes vir enkeledeeltjie-nasporing vanuit 'n teoretiese oogpunt. Die hoofresultate van die verhandeling word ook daar uiteengesit. Hoofstuk 3 bespreek voorlopige eksperimentele ontwikkeling en toetsing, wat die grondslag lê vir verdere eksperimentele werk. Daarna volg 'n opsomming in Hoofstuk 4.

Hoofstuk 2

Teorie

Hierdie hoofstuk vergelyk verskillende SPT-metodes vanuit 'n teoretiese oogpunt. Eerstens word die statistiek ontwikkel in Par. 1.3 toegepas om die beste moontlike verrigting vir elke metode te bepaal, waarna dinamiese simulاسies bespreek word wat gebaseer is op die beheerteoriekonsepte in Par. 1.4.

2.1 Inleiding

Die kern van reële-tyd SPT is 'n beheerstelsel wat die beweging van 'n deeltjie meet en 'n korrektiewe beweging toepas om die deeltjie terug te skuif na die middelpunt van die waarnemingsvolume. Daar is dus drie komponente van so 'n stelsel. Die 'sensor' wat die deeltjie se posisie meet, die beheerstelsel self en die uitset wat die korrektiewe beweging toepas. Laasgenoemde twee komponente is eenvoudiger as die eerste een en hulle word kortliks hieronder bespreek.

Uitset Die mees algemeen gebruikte uitset-aandrywer vir die waarneem van deeltjies in oplossing is 'n piëso-elektriese verhoog [38]. Dit is vinnig en presies, met nanometer-akkuraatheid en 'n responstyd van omtrent 1 ms. Piëso-elektriese

toestelle het ook 'n lineêre respons, wat dit maklik maak om te modelleer en te beheer. 'n Belangrike alternatief is die ABEL-val [28, 39], wat baie vinniger is. Dit is egter ongeskik vir gebruik in 'n lewende sel.

Beheerstelsel Die beheerstelsel in SPT is tipies gebaseer op optimale beheerteorie [40–42], en die eksperimentele implementering hang meestal af van die berekeningspoed wat benodig word. 'n Tafelrekenaar met 'n standaardbedryfstelsel kan tipies 'n betroubare lus uitvoer met 'n periode van 1 ms. Vinniger responstye kan bereik word deur 'n reëletyd-bedryfstelsel, mikrobeheerder of veld-programmeerbare hekopstelling (field-programmable gate array of FPGA). Laasgenoemde opsie is die beste en 'n gewilde keuse [34, 43, 44]. Enige beheeralgoritme kan natuurlik op enige van hierdie stelsels geïmplementeer word. Die gewildste benadering wat gebruik word om 'n algoritme saam te stel is gebaseer op die Kalmanfilter, soos bespreek in Par. 1.4.2.

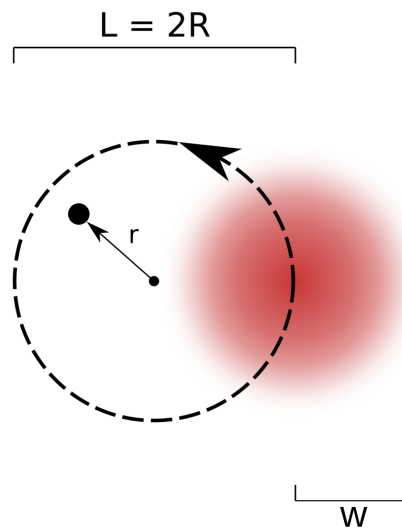
2.1.1 Posisiebepaling

Die aspek van SPT waarin daar die meeste variasie voorkom, is die bepaling van die deeltjieposisie. Die metodes wat fluoressensie gebruik kan as volg verdeel word: Patroonopwekking, gemodifiseerde opsporing, en beeldgebaseer [38]. In hierdie verhandeling fokus ek op die eerste soort.

Patroonopwekking werk breedweg as volg: 'n Opwekkingsbundel wat verander oor tyd, word gebruik. Die deeltjie se posisie kan dan afgelei word uit die resulterende tyd-afhanklike variasie in die fluoressensie-sein. In twee dimensies is daar drie belangrike metodes, naamlik die orbitaalmetode, die ruitersprong-metode en MINFLUX. Hierdie metodes is tot dusver meestal toegepas deur gebruik te maak van fluoressensie, maar ek gaan ook 'n tegniek genaamd interferometriese verstrooiing (iSCAT) [45] beskou, wat strooilig gebruik.

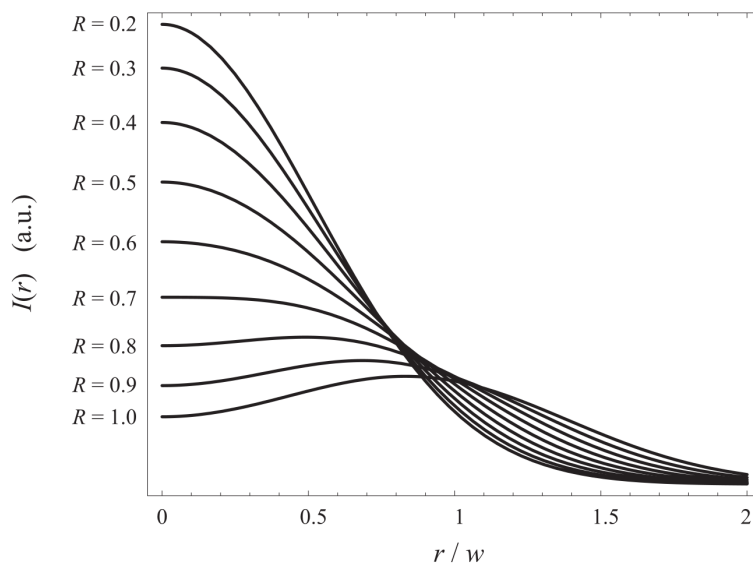
Orbitaalmetode

Die orbitaalmetode werk deur 'n Gaussiese laserkol in 'n sirkel rondom die deeltjie te beweeg (Fig. 2.1). Enige beweging van die deeltjie vanaf die middel veroorsaak 'n sinusvormige variasie in die fluoressensie-intensiteit (solank die omwentelings-frekwensie vinnig genoeg is). Die amplitude en fase hiervan word gebruik om die posisie in die x-y-vlak te bepaal [30,40,46]. Die gemiddelde intensiteit as 'n funksie van die afstand na die middel word getoon in Fig. 2.2. Vir groot waardes van die rotasieradius R kom 'n lokale minimum in die middel voor. Die grootste waarde van R wat 'n maksimum in die middel het is $R = w/\sqrt{2} \approx 0.7w$ met w die bundelradius, en dit word beskou as die optimale waarde [47].



Figuur 2.1: Orbitaalskandeerpatroon met bundelradius w en nasporingslengte L . 'n Deeltjie is getoon by 'n afstand r vanaf die middelpunt van die skandeerpatroon.

Met 'n gemete fluoressensie-sein $\Gamma(t)$ en hoekfrekwensie $\omega_0 = 2\pi/T$ met T die rotasieperiode, kan aangetoon word [40] dat 'n beraming van die posisie gegee word



Figuur 2.2: Gemiddelde intensiteit by 'n vaste afstand vanaf die middelpunt van rotasie, vir verskillende waardes van die rotasieradius R [46].

deur:

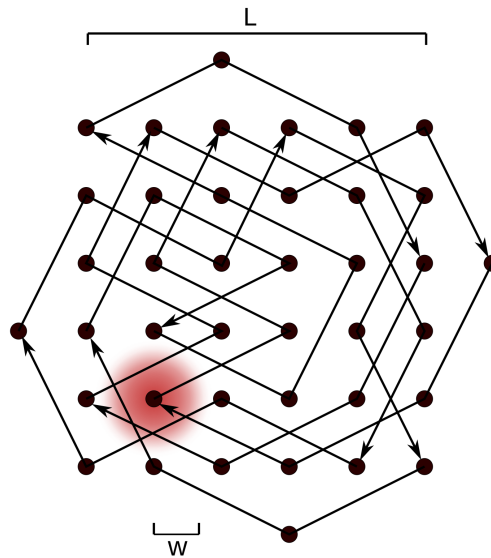
$$\hat{x} = \frac{w^2 \int_0^T \Gamma(t) \cos(\omega_0 t) dt}{2r \int_0^T \Gamma(t) dt} \quad (2.1)$$

$$\hat{y} = \frac{w^2 \int_0^T \Gamma(t) \sin(\omega_0 t) dt}{2r \int_0^T \Gamma(t) dt}. \quad (2.2)$$

Ruitersprong-metode

Die Ruitersprong-metode behels ook 'n Gaussiese laserkol, maar die kol word oor 'n rooster van punte geskandeer, met die gebruik van 'n ruitersprongpatroon om eweredige dekking te kry (Fig. 2.3). Die bundelradius en roosterspasiëring word gekies om 'n eenvormige intensiteit in die sentrale gebied van die rooster te verseker (die middelste 4×4 punte in Fig. 2.3). Die tipiese implementasie van hierdie metode behels 'n skandering wat vinnig genoeg is dat op die meeste een foton by elke punt waargeneem word. Die gemete posisie word dan aanvaar om die laaste punt te wees waar 'n foton waargeneem is [42]. Dit is ook dan die rede vir die gebruik van 'n ruitersprongpatroon in plaas van skandering van 'n kant af - aangesien 'n volledige

skandering nie hoef plaas te vind voor die volgende terugvoerstep nie, is dit beter om 'n patroon te gebruik wat deurentyd die hele skandeergebied besoek.



Figuur 2.3: Ruitersprong-skandeermethode met bundelradius w en nasporingslengte L .

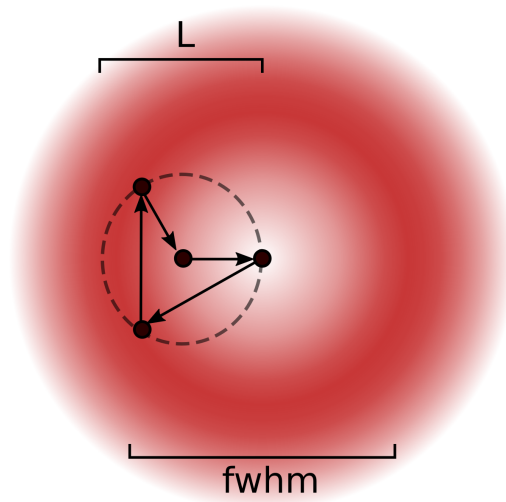
MINFLUX

MINFLUX is 'n metode wat 'n opwekkingsminimum gebruik (tipies deur middel van 'n kransvormige laserkol) om die deeltjie se posisie te ondersoek (Fig. 2.4). Die gebruik van 'n minimum beteken dat die totale aantal waargenome fotone geminimeer word wanneer die deeltjie in die middel is, in teenstelling met die ander twee metodes waar die aantal fotone gemaksimeer word. Die resultaat hiervan is dat meer inligting uit elke waargenome foton onttrek word [34, 48]. Dit kan as volg intuïtief verstaan word: Die waarneming van selfs één foton by 'n sekere bundelposisie (in die afwesigheid van agtergrondtellings) beteken dat die deeltjie nie by daardie posisie is nie. Hoe verder die deeltjie is, hoe meer tellings word waargeneem (solank die deeltjie binne die skandeergebied is). Die radiale

intensiteitsprofiel van die bundel word gegee deur:

$$I(r) = A_0 4e \ln 2 \frac{r^2}{fwhm^2} e^{-4 \ln 2 \frac{r^2}{fwhm^2}}, \quad (2.3)$$

met A_0 die piekintensiteit en $fwhm$ 'n bundelgrootte-parameter (dit is nie werklik die halfwaardewydte nie; ek gebruik hierdie benaming om konsekwent te wees met Balzarotti *et al.* (2017) [34]).



Figuur 2.4: MINFLUX-skandeerpatroon met nasporsingslengte L en bundelgrootte-parameter $fwhm$.

Met \bar{r}_{b_i} die posisievektor van die bundelmiddelpunt by punt i en n_i die aantal fotone wat by daardie posisie waargeneem is, definieer ons:

$$\hat{p}_i = \frac{n_i}{\sum_j n_j} = \frac{n_i}{N}. \quad (2.4)$$

Die posisieberaming word gegee deur:

$$\hat{r} = -\frac{1}{1 - \frac{L^2 \log(2)}{fwhm^2}} \left(\sum_{j=0}^1 \beta_j \hat{p}_0^j \right) \sum_{i=1}^3 \hat{p}_i \cdot \bar{r}_{b_i}, \quad (2.5)$$

waar ons die parameters kies as $\beta_0 = 1.27$ en $\beta_1 = 3.8$ [34]. Hierdie parameters is semi-empiries bepaal.

iSCAT

Interferometriese verstrooiing of iSCAT verskil van die voorgenoemde metodes deurdat dit gebruik maak van strooilig eerder as fluoressensie. In besonder word die interferensie van die verstrooide en weerkaatste lig gebruik, aangesien hierdie sein sterker is as die suiwer strooilig-sein vir klein deeltjies. Die beginsel is as volg [45]: 'n Invallende veld E_i skep 'n verstrooide veld E_s vanaf die deeltjie asook 'n weerkaatste veld E_r vanaf 'n intervlak, byvoorbeeld die glas-water intervlak van 'n nabygeleë dekglas. Hierdie velde interfereer, sodat die waargenome intensiteit I_{det} gegee word deur:

$$I_{det} \propto |E_r + E_s|^2 = |E_r|^2 + 2|E_r||E_s| \cos \theta + |E_s|^2. \quad (2.6)$$

E_r word bepaal deur die reflektiwiteit r van die intervlak, sodat $E_r = rE_i$. E_s word bepaal deur die komplekse verstrooiingskoëffisiënt s , sodat $E_s = sE_i$, en θ is die faseverskil tussen die weerkaatste en verstrooide veld. As ons aanvaar dat die deeltjie belig word deur 'n laserkol met oppervlakte A , kan ons s vind uit die verstrooiingsdeursnit σ_{scat} : $|s|^2 = \sigma_{scat}/A$. Dan word Vgl. (2.6):

$$I_{det} \propto |rE_i + sE_i|^2 = |E_i|^2(r^2 + 2r|s| \cos \theta + |s|^2). \quad (2.7)$$

Vir 'n klein deeltjie is die suiwer verstrooiingsterm $|E_i|^2|s|^2$ weglaatbaar in vergelyking met die interferensieterm $|E_i|^2r|s| \cos \theta$. Die meting word egter oorheers deur die weerkaatsingsterm $|E_i|^2r^2$. Omdat hierdie term konstant behoort te bly, kan ons dit beraam deur die agtergrondtellings N_{bkg} te meet wanneer daar geen deeltjie in die waarnemingsvolume is nie. Die uiteindelige iSCAT-meting word dan gemaak

in terme van die kontras C_f , gedefinieer as:

$$C_f = \left| \frac{N_{det} - N_{bkg}}{N_{bkg}} \right|, \quad (2.8)$$

waar N_{det} die waargenome aantal fotone tydens die meting is.

Let op dat hierdie metode in wese net 'n ander bron van fotone is en dat die posisiebepaling dus steeds met 'n verskeidenheid van metodes gedoen kan word. Die metode is tot dusver meestal deur middel van 'n kamera toegepas [45, 49, 50], maar dit is ook onlangs toegepas deur middel van 'n ruitersprongskandering [51].

Om hierdie metodes te vergelyk, stel ek eers die teoretiese presisie van elke metode vas deur middel van statistiese analise, waarna ek die metodes vergelyk met 'n dinamiese simulasie.

2.2 Statiese Lokalisering

As 'n deeltjie stadig genoeg beweeg relatief tot die terugvoerbandwydte, kan dit benader word as staties tydens een siklus. Dit is daarom sinvol om die akkuraatheid vas te stel waarmee 'n statiese deeltjie se posisie bepaal kan word. Gegewe 'n oneindige aantal fotone, kan enige metode natuurlik 'n presiese akkuraatheid behaal. Wat ons dus wil vasstel is die akkuraatheid gegewe 'n beperkte aantal fotone. Dit kan gedoen word deur gebruik te maak van die Cramér-Rao-ongelykheid soos bespreek in Par. 1.3. Vir fluoressensie-gebaseerde metodes kan die CRB bereken word soos beskryf in [34]. Die belangrikste aspekte van die afleiding word hieronder weergegee. Vir iSCAT is 'n aangepaste benadering nodig, aangesien die onsekerheid in die meting oorheers word deur die weerkaatsingstellings. Dit word verder bespreek in Par. 2.2.2.

2.2.1 Fluorensensie

Ons beskou 'n deeltjie by 'n posisie $\bar{r}_m \in \mathbb{R}^d$ belig deur 'n aantal verskillende ligintensiteite $\{I_0(\bar{r}), \dots, I_{K-1}(\bar{r})\}$, met 'n resulterende versameling $\bar{n} = \{n_0, n_1, \dots, n_{K-1}\}$ fluorensensiefotone per beligting. Die totale aantal fluorensensiefotone word dan gegee deur:

$$N = n_0 + n_1 + \dots + n_{K-1}. \quad (2.9)$$

Die waarskynlikheid van die meting \bar{n} word gegee deur multinomiale statistiek:

$$P(\bar{n}|N) = \frac{N!}{n_0! \dots n_{K-1}!} \prod_{i=0}^{K-1} p_i^{n_i}, \quad (2.10)$$

met die komponente van die parametervektor \bar{p} gegee deur:

$$p_i = \frac{I_i}{\sum_{j=0}^{K-1} I_j}, \quad (2.11)$$

met $0 \leq i \leq K-1$. Die \hat{p}_i gedefinieer in Vgl. (2.4) is 'n beraming van hierdie waarde.

Aangesien ons 'n konstante N aanvaar, is die aantal onafhanklike fotonmetings n_i en parameters p_i gelyk aan $K-1$. Die resultaat is dat die voorwaardelike waarskynlikheid van \bar{n} gegewe N gegee word deur:

$$P(\bar{n}|N) = \frac{N!}{n_0! \dots n_{K-1}!} \left(\prod_{i=0}^{K-2} p_i^{n_i} \right) \left(1 - \sum_{j=0}^{K-2} p_j \right)^{n_{K-1}}, \quad (2.12)$$

met $p_{K-1} = 1 - \sum_{j=0}^{K-2} p_j$.

Die algemene uitdrukking vir die Fisher-inligting is (Vgl. (1.2))

$$\{F_{\bar{\theta}}\}_{ij} = E \left[-\frac{\partial^2}{\partial \theta_i \partial \theta_j} \ln p(x, \theta) \right], \quad (2.13)$$

met θ 'n parametervektor wat ons wil beraam en $p(x, \theta)$ die waarskynlikheid van die meting x , gegewe die parameter θ . In hierdie geval is $x = \bar{n}$, $\theta = \bar{p}$ en $p(x, \theta) = P(\bar{n}|\bar{p}) = P(\bar{n}|\hat{N})$. Die Fisher-inligting $F_{\bar{p}}$ word dus gegee deur:

$$\{F_{\bar{p}}\}_{ij} = E \left(-\frac{\partial^2}{\partial p_i \partial p_j} \ln P(\bar{n}|\hat{N}) \right) \text{ met } i, j \in [0, \dots, K-2], \quad (2.14)$$

wat lei na:

$$\{F_{\bar{p}}\}_{ij} = N \left(\frac{1}{p_{K-1}} + \delta_{ij} \frac{1}{p_i} \right) \text{ met } i, j \in [0, \dots, K-2]. \quad (2.15)$$

Die resultaat in terme van posisie, $F_{\bar{r}_m}$, word gegee deur:

$$F_{\bar{r}_m} = \mathcal{J}^{*\top} F_{\bar{p}} \mathcal{J}^*, \quad (2.16)$$

met $\mathcal{J}^* \in \mathbb{R}^{(K-1) \times d}$ die Jacobiaanmatriks van die transformasie vanaf die \bar{r} -ruimte na die gereduseerde \bar{p} -ruimte. Dit lei uiteindelik na:

$$F_{\bar{r}_m} = N \sum_{i=0}^{K-1} \frac{1}{p_i} \begin{bmatrix} \left(\frac{\partial p_i}{\partial r_{m1}} \right)^2 & \cdots & \frac{\partial p_i}{\partial r_{m1}} \frac{\partial p_i}{\partial r_{md}} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial p_i}{\partial r_{md}} \frac{\partial p_i}{\partial r_{m1}} & \cdots & \left(\frac{\partial p_i}{\partial r_{md}} \right)^2 \end{bmatrix}, \quad (2.17)$$

wat in twee dimensies gegee word deur:

$$F_{\bar{r}_m} = N \sum_{i=0}^{K-1} \frac{1}{p_i} \begin{bmatrix} \left(\frac{\partial p_i}{\partial x} \right)^2 & \frac{\partial p_i}{\partial x} \frac{\partial p_i}{\partial y} \\ \frac{\partial p_i}{\partial y} \frac{\partial p_i}{\partial x} & \left(\frac{\partial p_i}{\partial y} \right)^2 \end{bmatrix}. \quad (2.18)$$

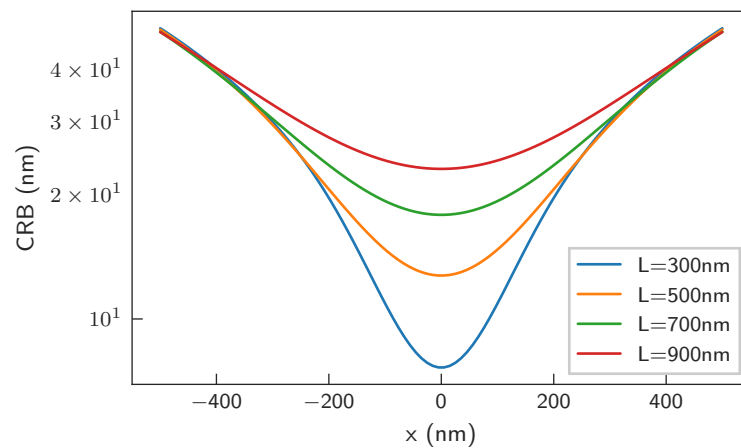
Die Cramér-Rao ondergrens (CRB) op die kovariansiematriks $\Sigma(\bar{r}_m)$ word gegee deur $\Sigma_{CRB} = F_{\bar{r}_m}^{-1}$. In ons resultate gebruik ons die rekenkundige gemiddeld van die eiewaardes van hierdie matriks:

$$\tilde{\sigma}_{CRB} = \sqrt{\frac{1}{d} \text{Sp}(\Sigma_{CRB})}. \quad (2.19)$$

Vir die berekening van die CRB vir die orbitaalmetode is gebruik gemaak van 60 eweredig gespaseerde skandeerpunte. Vir MINFLUX en die ruitersprong-metode is gebruik gemaak van die patrone in Fige. 2.3 en 2.4. Die matriks in Vgl. (2.18) is vir elke metode bereken met die simboliese wiskunde-Python-programbiblioteek `sympy`. 'n Baie handige funksie in hierdie programbiblioteek is `lambdify`. Dit laat 'n mens toe om 'n simboliese funksie (in hierdie geval die volledige uitdrukking vir $\tilde{\sigma}_{CRB}$) te omskep in 'n numeriese funksie, met die belangrike parameters, soos L

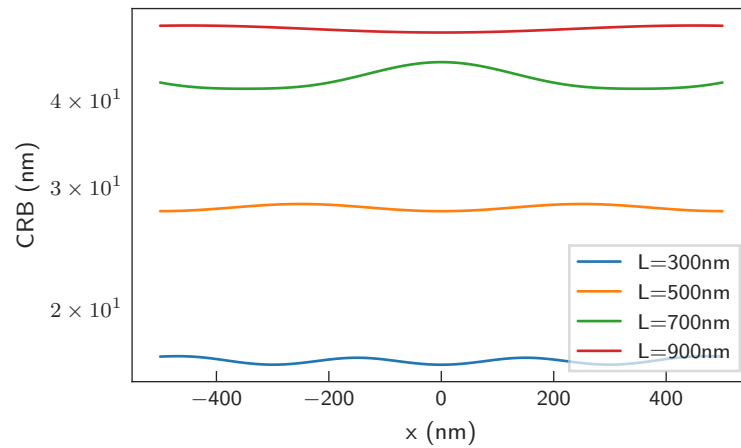
en w , as insette. Hierdie funksie kan dan gerangskik word ('serialize') - in Python gedoen met `pickle` - en in 'n lêer gestoor word. Dus hoef die tydsame simboliese wiskunde net een keer vir elke patroon gedoen te word.

Die resultate vir die fluoressensiemetodes word gegee in Fige. 2.5 tot 2.7, vir verskillende waardes van die nasporningslengte L ($N = 100$ fotone). Vir die orbitaalmetode is die bundelradius geskaal met L om die relasie $L = 2w/\sqrt{2}$ te behou. Vir die ruitersprong-metode is die roosterspasiëring gekies sodat $L = 3.75w$, met die patroon in Fig. 2.3. Vir hierdie metodes is daar dus 'n ondergrens op L wat gestel word deur die diffraksielimiet, wat nie die geval is vir MINFLUX nie.

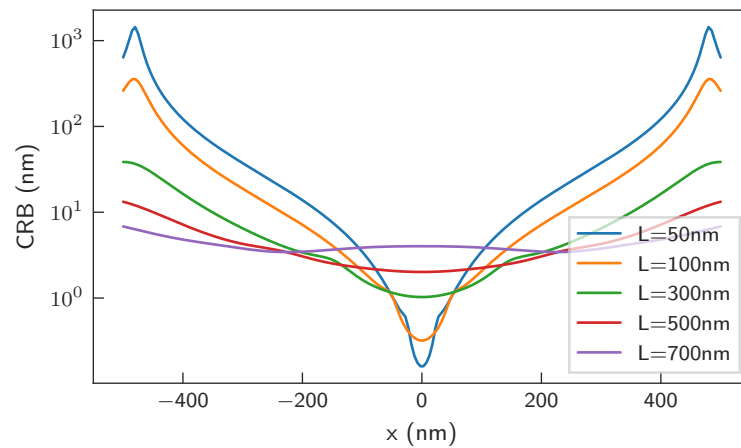


Figuur 2.5: CRB langs die x-as vir verskillende L-waardes, orbitaalmetode.

Vir die orbitaalmetode (Fig. 2.5) is die kenmerke dat die CRB laer is in die middel as aan die buitekant van die skandergebied en dat die presisie beter is (in die middel) vir kleiner waardes van L . Die ruitersprong-metode (Fig. 2.6) het 'n baie plat CRB, te danke aan die eweredige beligting. Hier is daar ook 'n verbetering in presisie vir kleiner L , sonder 'n noemenswaardige verskil in die vorm van die CRB-kromme. Vir MINFLUX (Fig. 2.7) is daar weereens 'n kleiner CRB in die middel by kleiner L , maar terselfdertyd 'n groter CRB aan die buitekant van die

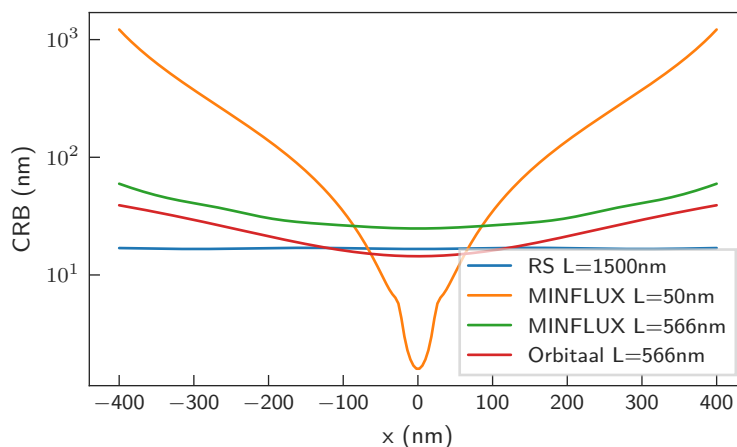


Figuur 2.6: CRB langs die x-as vir verskillende L-waardes, ruitersprong-metode.



Figuur 2.7: CRB langs die x-as vir verskillende L-waardes, MINFLUX.

skandeergebied. Hier sien ons ook 'n groot variasie in die vorm van die CRB as 'n funksie van posisie. Vir al drie metodes is daar dus 'n algemene afname in die CRB in die middel soos wat die skandeergebied verklein word. By MINFLUX is hierdie verskil egter groter, hoofsaaklik omdat ons hier die skandeergebied heelwat kleiner kan maak, aangesien ons nie deur die diffraksielimiet beperk word nie. Hierdie verbetering in presisie in die middel gaan egter gepaard met 'n verswakte presisie aan die buitekant van die skandeergebied. Die vergelykende figuur (Fig. 2.8) dui aan



Figuur 2.8: CRB langs die x-as vir verskillende metodes.

dat MINFLUX wel meer inligting per foton lewer, maar ten koste van 'n verkleinde skandeeromvang. As die skandeer-omvang dieselfde is as dié van die orbitaalmetode, is die verrigting vergelykbaar. Die grootte van die skandergebied is fundamenteel vir suksesvolle nasporing van diffunderende deeltjies. As die deeltjie te vinnig uit die nasporingvolume diffundeer, kan dit nie nagespoor word nie. Die implikasie is dus dat MINFLUX goed behoort te wees vir presiese nasporing van stadige deeltjies, terwyl die ruitersprong-metode die beste behoort te wees vir vinnige deeltjies.

2.2.2 iSCAT

Die CRB-berekening vir fluoressensie is gebaseer op die aanname van 'n spesifieke aantal waargenome fotone en 'n spesifieke sein-tot-agtergrond verhouding. Hierdie benadering is nie geskik vir iSCAT nie, aangesien in hierdie geval die onsekerheid hoofsaaklik bepaal word deur die Poissonruis van die weerkaatsingstellings. As ons aanvaar dat die weerkaatsingstellings hoog en Poisson-verdeel is, is dit maklik om aan te toon dat die variansie in die meting van die interferensietellings gelyk is aan $2N_{int}/C_f$ (sien Vgl. (2.8)), waar N_{int} die aantal interferensietellings is. Siende dat C_f tipies minder as 5% is, is hierdie variansie relatief groot in vergelyking met die

gemiddeld. Dit beteken dat die presisie van die posisiemeting baie sterker beïnvloed word deur hierdie faktor as by fluoressensiemetodes. Om hierdie rede moet ons vir iSCAT die CRB-berekeninge aanpas (in [34] is slegs fluoressensie beskou).

Soos by fluoressensie beskou ons 'n deeltjie by 'n posisie $\bar{r}_m \in \mathbb{R}^d$ belig deur 'n aantal verskillende ligintensiteite $\{I_0(\bar{r}), \dots, I_{K-1}(\bar{r})\}$, met 'n resulterende versameling $\bar{n} = \{n_0, n_1, \dots, n_{K-1}\}$ interferensiefotone per beligting. Die totale aantal interferensiefotone word dan gegee deur:

$$N_{int} = n_0 + n_1 + \dots + n_{K-1}. \quad (2.20)$$

As hierdie grootheid groot genoeg is, sal dit by benadering Gaussies wees met gemiddeld \hat{N}_{int} en standaardafwyking σ_N . Dan kan ons n_i benader as Gaussies met verwagte waarde $p_i \hat{N}_{int}$ en standaardafwyking $p_i \sigma_N$, met weereens:

$$p_i = \frac{I_i}{\sum_{j=0}^{K-1} I_j}, \quad (2.21)$$

met $0 \leq i \leq K - 1$.

Die resultaat is dat die voorwaardelike waarskynlikheid van \bar{n} gegewe \hat{N}_{int} gegee word deur:

$$P(\bar{n}|\hat{N}_{int}) = \prod_{i=0}^{K-1} \frac{\exp -\frac{1}{2} \left(\frac{n_i - \hat{N}_{int} p_i}{\sigma_N p_i} \right)^2}{\sigma_N p_i \sqrt{2\pi}}, \quad (2.22)$$

met $p_{K-1} = 1 - \sum_{j=0}^{K-2} p_j$. Die Fisher inligting $F_{\bar{p}}$ word dus gegee deur:

$$\{F_{\bar{p}}\}_{ij} = E \left(-\frac{\partial^2}{\partial p_i \partial p_j} \ln P(\bar{n}|\hat{N}_{int}) \right) \text{ met } i, j \in [0, \dots, K - 2], \quad (2.23)$$

wat lei na:

$$\{F_{\bar{p}}\}_{ij} = \frac{\hat{N}_{int}^2 - \sigma_N^2}{\sigma_N^2} \left(\frac{1}{p_{K-1}^2} + \delta_{ij} \frac{1}{p_i^2} \right) \text{ met } i, j \in [0, \dots, K - 2], \quad (2.24)$$

wat verskil van die uitdrukking vir fluoressensie in die N -afhanklike faktor sowel as die kwadraat op p_i . Die resultaat in terme van posisie is:

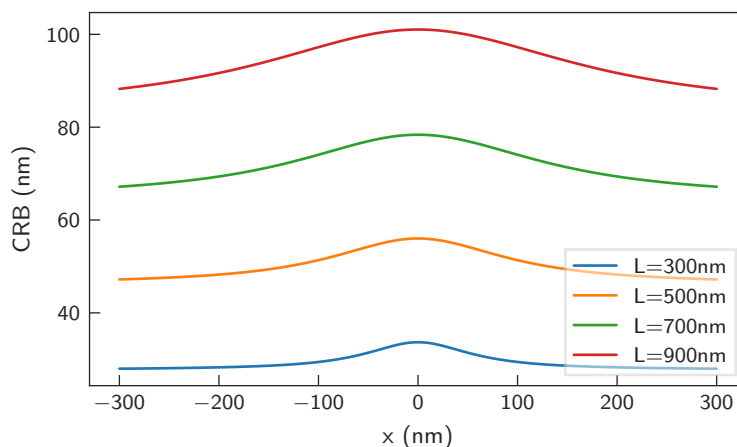
$$F_{\vec{r}_m} = \frac{\hat{N}^2 - \sigma_N^2}{\sigma_N^2} \sum_{i=0}^{K-1} \frac{1}{p_i^2} \begin{bmatrix} \left(\frac{\partial p_i}{\partial r_{m1}} \right)^2 & \cdots & \frac{\partial p_i}{\partial r_{m1}} \frac{\partial p_i}{\partial r_{md}} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial p_i}{\partial r_{md}} \frac{\partial p_i}{\partial r_{m1}} & \cdots & \left(\frac{\partial p_i}{\partial r_{md}} \right)^2 \end{bmatrix}. \quad (2.25)$$

In ons resultate gebruik ons weereens die grootheid:

$$\tilde{\sigma}_{CRB} = \sqrt{\frac{1}{d} \text{Sp}(\Sigma_{CRB})}, \quad (2.26)$$

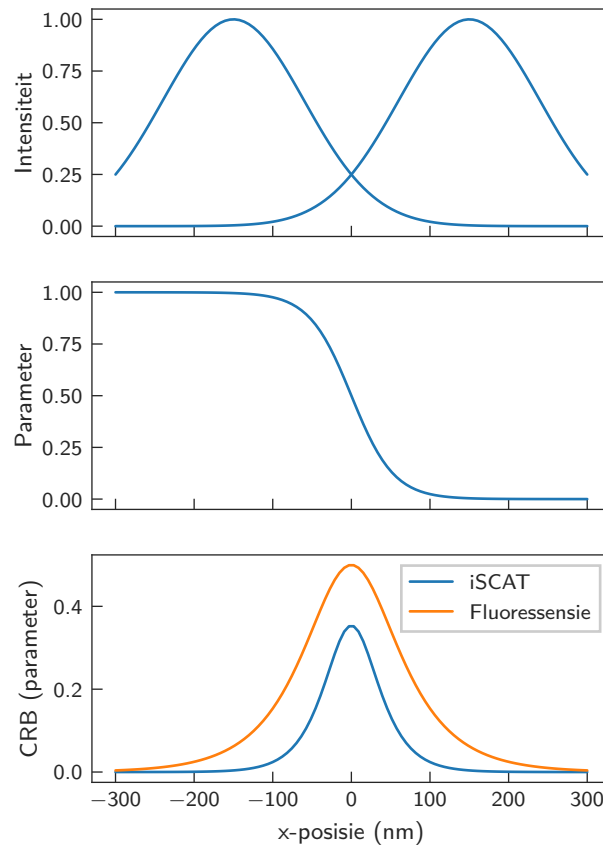
met $\Sigma_{CRB} = F_{\vec{r}_m}^{-1}$.

Die resultaat vir die orbitaalmetode word gegee in Fig. 2.9, met $\hat{N} = 100$ fotone en $C_f = 1\%$. Die belangrikste verskil tussen hierdie resultaat en die een vir fluoressensie (Fig. 2.5) is die vorm van die CRB-kromme, wat in hierdie geval 'n maksimum in die middel het. Om te verstaan hoekom dit so is, beskou Fig. 2.10, waar die parametervektor (Vgl. (2.21)) getoon word as 'n funksie van posisie in een dimensie (middelste paneel), tesame met die CRB van die parametervektor self (onderste paneel). Vir duidelikheid toon ek ook die bundelposisies (boonste paneel). Die CRB vir die parametervektor het 'n maksimum in die middel vir beide fluoressensie en iSCAT (die spesifieke waardes is nie hier belangrik nie, slegs die vorm van die kromme). Met ander woorde, die onsekerheid van die parametervektorberaming is die grootste in die middel. Die rede vir die minimum in die posisie-CRB met fluoressensie, is te danke aan die feit dat die parameterfunksie 'n maksimum negatiewe helling in die middel het, wat as teenwig dien vir die onsekerheid in die parameter self (let op die afgeleidematriks in Vgls. (2.17) en (2.25)). As gevolg van die kwadratiese afhanklikheid van die parameter by iSCAT (Vgl. (2.24)), weeg hierdie onsekerheid in hierdie geval sterker en is daar 'n maksimum in die middel vir posisie ook.



Figuur 2.9: CRB langs die x-as vir verskillende L-waardes, orbitaalmetode met iSCAT-lokalisering.

As ons fluoressensie- en iSCAT-metodes direk met mekaar wil vergelyk, moet ons twee faktore bepaal vir 'n spesifieke monster. Eerstens, die relatiewe aantal fluoressensie- en iSCAT-tellings by 'n vaste beligtingsintensiteit, en tweedens, die gemiddelde iSCAT-kontras. Die gemiddelde kontras is direk eweredig aan $2\sqrt{\sigma_{scat}}$, met σ_{scat} die verstrooiingsdeursnit. Die verhouding van iSCAT-tellings tot fluoressensie-tellings N_{scat}/N is direk eweredig aan $2\sqrt{\sigma_{scat}}/\sigma_{abs}\Phi_f$, met σ_{abs} en Φ_f die absorpsiedeursnit en fluoressensie-kwantumopbrengs onderskeidelik. Monsters wat deur albei metodes nagespoor sou kon word sluit in gemerkte proteïene sowel as proteïene wat op sigself fluoresseer. Ons beskou vier voorbeelde: MI-virus gemerk met QD 525, GFP (EGFP-mutant), LHCII vanaf plante ('n membraanproteïen) en fikobilisoom (FB) uit *Synechocystis* PCC6803 ('n wateroplosbare proteïen). Ons kan die verstrooiingsdeursnit beraam deur middel van die formules $\alpha = 3V(n_s^2 - n_m^2)/(n_s^2 + 2n_m^2)$ en $\sigma_{scat} = \frac{8}{3}\pi^3\alpha^2(\lambda/n_m)^{-4}$, met V die voorwerp se volume, n_s die brekingsindeks van die voorwerp, n_m die brekingsindeks van die omliggende medium en λ die golflengte van die inkomende lig. Die waardes word getoon in Tab. 2.1. Vir MIV-QD word aanvaar dat die deeltjie sferies is met radius 73 nm. Vir FB is die vorm halfskyfvormig met radius 30 nm en dikte 10 nm. Vir LHCII is die



Figuur 2.10: Eendimensionele lokalisering met 'n Gaussiese bundel. Die bundel word tussen twee posisies geskandeer aan weerskante van die deeltjie by 'n posisie $x = 0$ nm. Boonste paneel: posisies van die bundel vir die twee beligtings. Middelste paneel: parametervektor as 'n funksie van posisie. Let op die maksimum negatiewe helling in die middel. Onderste paneel: CRB van die parametervektor (nie posisie nie) vir iSCAT en fluoressensie.

vorm silindries met radius 3.65 nm en hoogte 4.5 nm. LHCII in 'n wasmiddelmisel is ook beskou, aangesien dit 'n algemene manier is om LHCII in 'n oplossing te bestudeer. In hierdie geval is die lengte van 'n n-dodesiel- β -D-maltosied (β -DM) molekule (2.3 nm) by die effektiewe radius gevoeg. GFP is silindries met radius 1.2 nm en hoogte 4.2 nm. In elke geval is die effektiewe radius soos aangedui die radius van 'n sfeer met dieselfde volume as die deeltjie. Die piek-absorpsiegolflengtes is

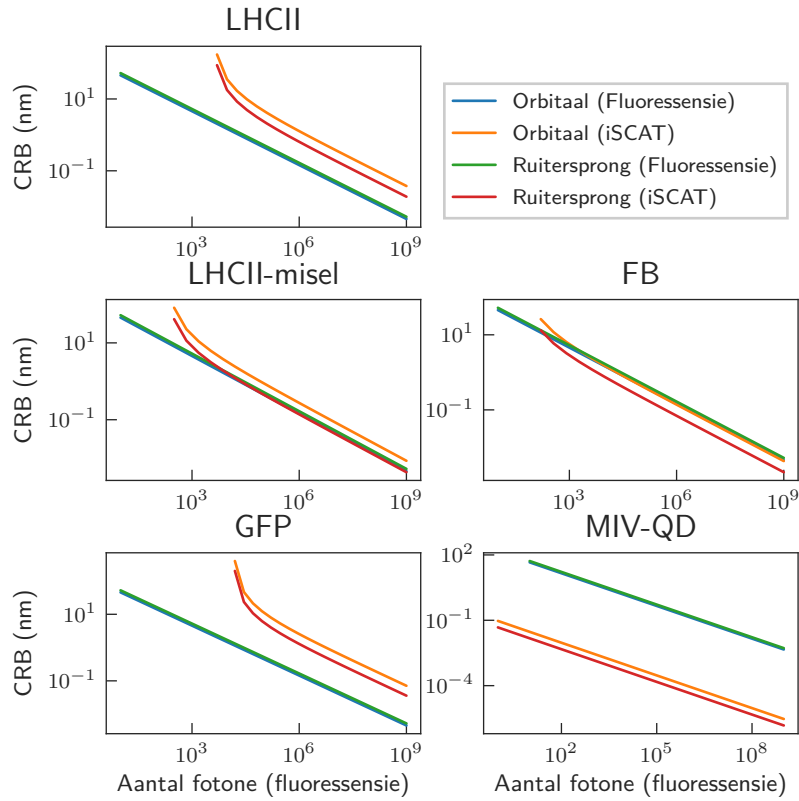
gebruik. Vir FB is die absorpsiedeursnit bereken deur die afsonderlike komponente se deursnitte bymekaar te tel volgens die aantal komponente van elke soort (ses van elke heksameer en die trimere soos getoon in Fig. 1.6).

Die CRB as 'n funksie van waargenome fotone word getoon in Fig. 2.11 vir iSCAT en fluoressensie. Die aantal fotone getoon is vir fluoressensie. Vir iSCAT is die aantal fotone meer, met verskillende verhoudings vir die verskillende monsters, soos getoon in die laaste kolom van Tab. 2.1 (daar is aanvaar dat dieselfde beligtingsintensiteit vir fluoressensie en iSCAT gebruik word). Dit is duidelik dat vir baie groot deeltjies soos 'n virus, iSCAT 'n aantal ordegrottes meer presies is as fluoressensie-gebaseerde lokalisering, terwyl vir 'n relatief klein fluoresserende deeltjie soos GFP, fluoressensie-gebaseerde lokalisering meer presies is. LHCII en FB is tussen hierdie uiterstes, en vir hierdie monsters is die twee metodes vergelykbaar. In die geval van LHCII, vervierdubbel die misel die volume, wat 'n heelwat groter iSCAT-presisie tot gevolg het. Die resultaat vir LHCII in 'n SMA-nanoskyf sal iewers tussen die resultate vir suiwer trimeer en 'n wasmiddelmisel wees, met 'n ekwivalente radius van 5 nm [52]. As ons suiwer LHCII en FB vergelyk, vind ons dat iSCAT meer presies is by laasgenoemde. Dit is vanweë die laer pigmentdigtheid by FB, wat 'n kleiner absorpsiedeursnee tot gevolg het vergeleke met die fisiese grootte van die proteïen. Die vorm van die kromme vir iSCAT is as gevolg van die faktor $\hat{N}_{int}^2 - \sigma_N^2 / \sigma_N^2$ in die Fisher-inligtinguitdrukking (Vgl. (2.25)), wat naastenby gelyk is aan $\hat{N}_{int}^2 / \sigma_N^2$ vir groot waardes van \hat{N}_{int} . Daarom, omdat $\hat{N}_{int}^2 / \sigma_N^2 \propto \hat{N}_{int}$, het ons dieselfde afhanklikheid as vir fluoressensie, by hoë tellings.

'n Belangrike verdere punt is dat dit moontlik is om iSCAT te doen by enige golflengte en dus kan 'n golflengte gebruik word waar die monster nie sterk absorbeer nie. Dit beteken dat 'n hoër beligtingsintensiteit gebruik kan word sonder fotoskade, wat sal lei tot 'n verbeterde presisie.

monster	radius (nm)	n_s	λ (nm)	σ_{scat} (μm^2)	σ_{abs} (μm^2)	Φ_f	C_f	N_{int}/N
MIV-QD	73 [53]	1.42 [54]	350	8.16×10^{-4}	2.72×10^{-7} [55]	0.15 [55]	0.057	1.4×10^6
PB	15 [15]	1.576 [56]	621	4.40×10^{-8}	1.81×10^{-5} [57–60]	0.68 [56]	4.2×10^{-4}	33
LHCII	3.6 [61]	1.54 [62]	435	2.58×10^{-11}	8.06×10^{-7} [63]	0.26 [64]	1.02×10^{-5}	48
LHCII-misel	5.9 [61]	1.54 [62]	435	4.99×10^{-10}	8.06×10^{-7} [63]	0.26 [64]	4.47×10^{-5}	213
GFP	1.7 [65]	1.55 [66]	488	2.92×10^{-13}	2.14×10^{-8} [67]	0.60 [67]	1.08×10^{-6}	84

Tabel 2.1: Berekeningswaardes vir verskillende monsters met betrekking tot iSCAT.

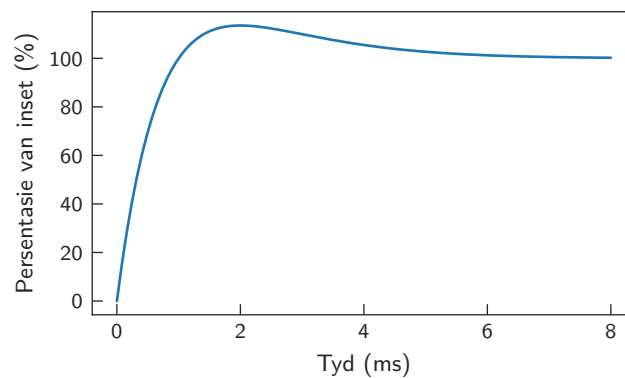


Figuur 2.11: CRB as 'n funksie van die aantal fotone vir beide iSCAT en fluoressensie, vir verskillende monsters by dieselfde beligtingsintensiteit. Die x-as wys fluoressensietellings - iSCAT-tellings is hoër volgens die verhouding getoon in Tab. 2.1.

2.3 Dinamiese Simulasie

2.3.1 Beheerstelsel-ontwerp

Om die metodes se dinamiese verrigting te vergelyk, is die hele beheerstelsel numeries gesimuleer. Daar word aanvaar dat die verhoog 'n lineêre respons het, wat 'n algemene kenmerk is van piëso-elektriese toestelle. Eenvoudigheidsomhalwe kies ons 'n tweedeorde-vergelyking met 'n traprespons soortgelyk aan dié van 'n regte verhoog (Fig. 2.12). Ons werk ook in een dimensie en implementeer uiteindelik twee identiese beheerders vir die twee dimensies, aangesien vir beide diffusie en die verhoogbeweging die twee dimensies se dinamika onafhanklik is van mekaar.



Figuur 2.12: Gesimuleerde traprespons van die verhoog.

Die vergelyking vir die verhoogbeweging is:

$$\ddot{x}_s + 2\dot{x}_s + x_s = 2\dot{u} + u, \quad (2.27)$$

met x_s die verhoogposisie en u die insetposisie.

Die standaardvorm vir 'n lineêre stelsel is (Vgls. (1.3) en (1.4)):

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{Ax} + \mathbf{Bu} + \mathbf{w}_d \quad (2.28)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{Cx} + \mathbf{w}_n. \quad (2.29)$$

As ons Vgl. (2.27) in hierdie vorm wil hê, met $\mathbf{u} = u$ en $\mathbf{y} = y$ die gemete posisie, dan verkry ons dat die toestandvektor gelyk is aan:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_s \\ \dot{x}_s + 2x_s - 2u \end{bmatrix}, \quad (2.30)$$

met die stelsel wat gegee word deur:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} -2 & 1 \\ -1 & 0 \end{bmatrix} \quad \mathbf{B} = \begin{bmatrix} 2 \\ 1 \end{bmatrix} \quad \mathbf{C} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \end{bmatrix}. \quad (2.31)$$

Dit is nodig om die inset by die toestandvektor te voeg, aangesien daar nie afgeleides aan die regterkant van Vgl. (2.28) is nie. As ons die deeltjie se posisie x_p by die toestandvektor byvoeg, word dit:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_p \\ x_s \\ \dot{x}_s + 2x_s - 2u \end{bmatrix}, \quad (2.32)$$

en aangesien x_p slegs afhang van die diffusie, word die stelsel:

$$\dot{\mathbf{x}} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -2 & 1 \\ 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} \mathbf{x} + \begin{bmatrix} 0 \\ 2 \\ 1 \end{bmatrix} u + \begin{bmatrix} \sqrt{2D} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \xi(t) \quad (2.33)$$

$$y = \begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 \end{bmatrix} \mathbf{x} + w_n, \quad (2.34)$$

waar D die 2-dimensionele diffusiekoëffisiënt is, ξ 'n witruis (Gaussiese) proses is met gemiddeld 0 en variansie 1, en w_n 'n foutterm is wat meestal die resultaat is van Poissonruis wat deur die metingsproses voortplant. Ons kies ook \mathbf{C} sodat y 'n meting is van die relatiewe posisie $x_p - x_s$.

Om 'n diskrete beheerder te implementeer, moet ons, soos bespreek in Par. 1.4.1, die stelsel omskakel na 'n diskrete-tyd-stelsel in die vorm:

$$\mathbf{x}_k = \mathbf{F}\mathbf{x}_{k-1} + \mathbf{G}\mathbf{u}_k, \quad (2.35)$$

met

$$\mathbf{F} = e^{\mathbf{A}\Delta t} = \mathbf{I} + \mathbf{A}\Delta t + \frac{(\mathbf{A}\Delta t)^2}{2!} + \dots \quad (2.36)$$

Vir ons doeleindes is die eerste orde genoeg (Δt is klein genoeg):

$$\mathbf{F} = \mathbf{I} + \mathbf{A}\Delta t \quad (2.37)$$

$$= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 - 2\Delta t & \Delta t \\ 0 & -\Delta t & 0 \end{bmatrix}. \quad (2.38)$$

\mathbf{G} word gegee deur:

$$\mathbf{G} = (\mathbf{F} - \mathbf{I})\mathbf{A}^{-1}\mathbf{B} \quad (2.39)$$

$$= \begin{bmatrix} 0 \\ 2\Delta t \\ \Delta t \end{bmatrix}. \quad (2.40)$$

waar ons \mathbf{A} en \mathbf{B} vanuit Vgl. (2.31) gebruik, en 'n nul voeg by die term wat ooreenstem met die deeltjieposisie, aangesien dit nie direk deur die inset beïnvloed word nie.

Om die Kalmanfilter te implementeer, benodig ons ook die proses- en metingsruis-kovariansies. Die prosesruis-kovariansie word eenvoudig gegee deur:

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} 2D & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad (2.41)$$

terwyl die metingsruis-kovariansie N 'n skalaar is wat empiries verstel moet word, om die oordrag van ruis vanuit die intensiteitsmeting in ag te neem asook om te vergoed vir ander bronne van onsekerheid (in 'n werklike eksperiment). Die Kalmanfilter word geïmplementeer met Vgls. (1.17) tot (1.21).

Met 'n beraming vir die ware toestand, kan ons 'n LQR-beheerder gebruik om terugvoer toe te pas op die verhoog, soos beskryf in Par. 1.4.3.

Die verrigtingsindeks wat geminimeer word, word as volg gedefinieer:

$$J = \sum_{k=0}^{\infty} (\mathbf{x}_k^{\top} \mathbf{Q} \mathbf{x}_k + \mathbf{u}_k^{\top} \mathbf{R} \mathbf{u}_k) = \sum_{k=0}^{\infty} (\mathbf{x}_k^{\top} \mathbf{Q} \mathbf{x}_k + R u_k^2),$$

waar \mathbf{Q} en \mathbf{R} die LQR-gewigte is en ons in ag neem dat u_k 'n skalaar is. \mathbf{Q} word gekies as:

$$\mathbf{Q} = \begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 \\ -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

sodat:

$$\mathbf{x}_k^{\top} \mathbf{Q} \mathbf{x}_k = (x_p - x_s)^2 + \dot{x}_s^2 + 2(2x_s - 2u)\dot{x}_s + (2x_s - 2u)^2,$$

en hierdie uitdrukking word dus geminimeer (in die ideale toestand is dit 0, aangesien $u = x_p = x_s$ en $\dot{x}_s = 0$), terwyl R 'n kosteparameter is, wat gebruik word om die beheerder meer of minder aggressief maak, en wat empiries verstel moet word.

2.3.2 Resultate

Die beheerstelsel is gebruik om 'n dinamiese simulasie van elke metode te doen, deur Vgl. (2.33) numeries te integreer in twee dimensies. Die fluoressensie- of verstrooiingsintensiteit is bereken volgens die deeltjieposisie tesame met Poisson-ruis. Posisieberamings vir die orbitaalmetode en MINFLUX is bereken volgens onderskeidelik Vgls. (2.1) en (2.2) en Vgl. (2.5). Vir die ruitersprong-metode, het ons om konsekwent te wees 'n soortgelyke beraming as vir MINFLUX gebruik, naamlik:

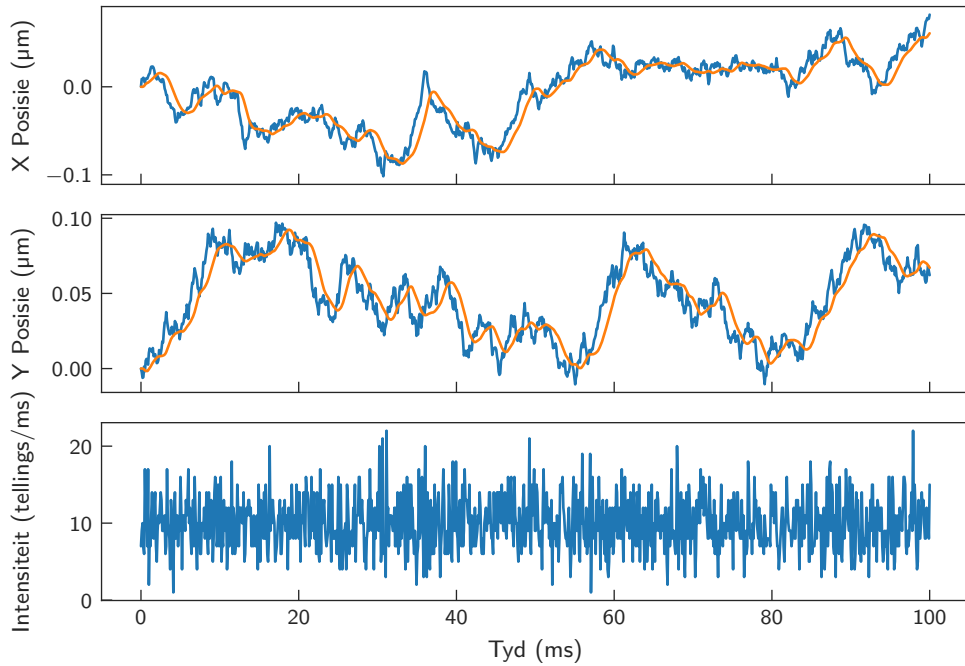
$$\hat{r} = \sum_{i=1}^{40} \hat{p}_i \cdot \bar{r}_{b_i}. \quad (2.42)$$

Die parameters wat ons gebruik het is as volg: vir die orbitaal- en ruitersprongmetodes is $w = 400$ nm, vir MINFLUX is $L = 50$ nm en $\text{fwhm} = 500$ nm. Vir al die metodes is 'n skanderefrekwensie van $f = 3.125$ kHz gebruik, en die terugvoer is teen dieselfde frekwensie toegepas (sodat elke stap in die ruitersprongpatroon presies $8 \mu\text{s}$ neem en elke stap in die MINFLUX-patroon presies $80 \mu\text{s}$ neem). Die relatiewe beligtingsintensiteit is geskaal sodat al die metodes 'n gemiddelde fluoressensieintensiteit het van $\Gamma_0 = 12$ tellings/ms. Die simulasies is gedoen in Python, met die belangrikste funksies geïmplementeer in Cython vir spoed. Dit is 'n uitbreiding vir Python wat dit moontlik maak om statiese tipering te gebruik, asook om die kode te vertaal (d.m.v. 'n omskakeling na C-kode). 'n Tydstap van $1 \mu\text{s}$ is gebruik, en die bewegingsvergelykings is met die vierdeorde-Runge-Kutta metode geïntegreer. 'n Tipiese nagespoorde trajek word getoon in Fig. 2.13 (diffusiekoëffisiënt $1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). Die verhoog volg die diffusie goed en die intensiteit toon slegs Poissonruis. 'n 'Amper nagespoorde' trajek word getoon in Fig. 2.14 waar die diffusiekoëffisiënt $50 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ is. Hier is die stelsel nie in staat om vinnig genoeg te reageer nie en is daar groot variasies in die gemete intensiteit soos die deeltjie in en uit die beligtingsbundel beweeg (die deeltjie sal uiteindelik heeltemal ontsnap). Deur baie sulke simulasielopies te doen vir verskillende waardes van die diffusiekoëffisiënt D , kan ons die gemiddelde nasporingsfout bereken. Dit word gedefinieer vir 'n trajek oor tyd τ as:

$$e_\tau = \frac{1}{\tau} \int_0^\tau \sqrt{(x_p(t) - x_s(t))^2 + (y_p(t) - y_s(t))^2} dt. \quad (2.43)$$

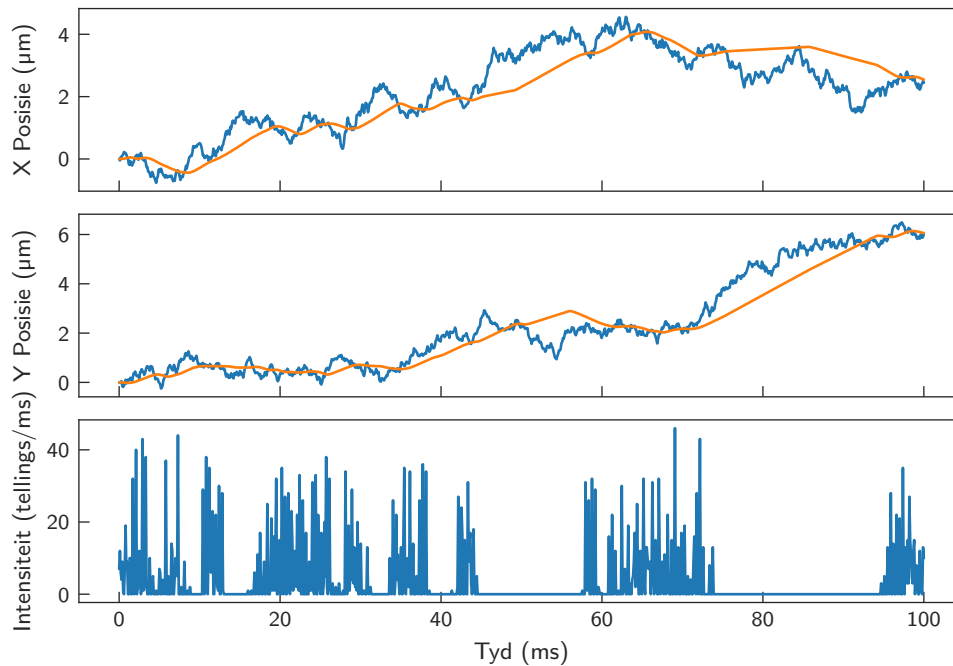
Fluoressensie

Ons beskou eers die fluoressensiemetodes soos getoon in Fig. 2.15. Vir elke waarde van D is 5 lopies gedoen van 100 ms. Baie inligting kan uit hierdie resultaat onttrek word. Eerstens het elke metode 'n 'nagespoorde'- en 'n 'nie-nagespoorde'-



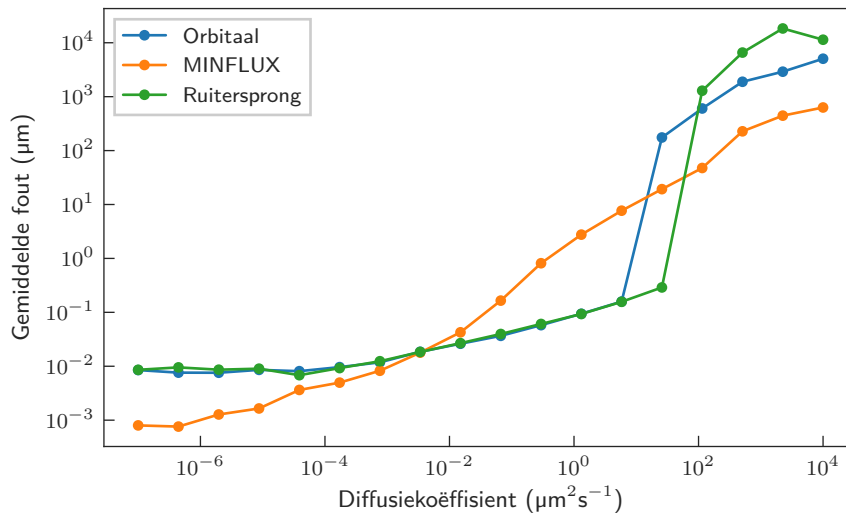
Figuur 2.13: Goeie nasporingstrajek. Die blou kromme toon die deeltjieposisie terwyl die oranje kromme die verhoogposisie toon. Die onderste paneel toon die fluoressensie-intensiteit.

gedeelte. Eersgenoemde kom voor aan die linkerkant van die grafiek en stem ooreen met 'n kleiner fout. In laasgenoemde toon die nasporingsfout nagenoeg die vrye-deeltjie-statistiek: $e_{\tau} = \sqrt{2D\tau}$. Vir die orbitaal- en ruitersprongmetodes is daar 'n skerp afsnypunt tussen hierdie gebiede. Vir MINFLUX is die oorgang meer geleidelik. Dit gebeur rondom die punt waar 'n deeltjie deur die nasporingsvolume diffundeer met 'n diffusietyd van $T = 1/f$ en is dus afhanklik van die grootte van die skandergebied. Tweedens is daar 'n verskil in die presisie van die nasporing vir verskillende metodes. By 'n stadige tydskaal is MINFLUX meer presies. Dit kan verstaan word deur middel van vergelyking met Fig. 2.8. Wanneer die deeltjie goed nagespoor word, bly dit binne die sentrale gebied waar die MINFLUX beraming baie goed is. By vinniger tydskaal word meer tyd spandeer in die 'middelgebied' waar die verrigting soortgelyk is aan die orbitaal- en ruitersprong-metodes. MINFLUX het ook die laagste afsnypunt, aangesien 'n klein skandergebied nodig is vir goeie



Figuur 2.14: Trajek van 'n 'amper nagespoorde' deeltjie. Die blou kromme toon die deeltjieposisie terwyl die oranje kromme die verhoogposisie toon. Die onderste paneel toon die fluoressensie-intensiteit.

akkuraatheid. Die rede vir die meer geleidelike oorgang by MINFLUX is moontlik as gevolg van die feit dat die skandeergebied (50 nm) klein is relatief tot die bundel (500 nm). Daar word dus nog fotone waargeneem wanneer die deeltjie net buite die skandeergebied is, wat gebruik kan word om die deeltjie terug te bring. Daar is inderwaarheid méér fotone wanneer die deeltjie buite die skandeergebied is, te danke aan die kransvormige bundelprofiel. Die ruitersprong-metode is nie meer presies as die orbitaalmetode nie, aangesien die bundelgrootte en -vorm dieselfde is. Dit het wel die grootste skandeergebied en dus ook die hoogste afsnypunt, wat beteken dat vinniger deeltjies daardeur nagespoor kan word.



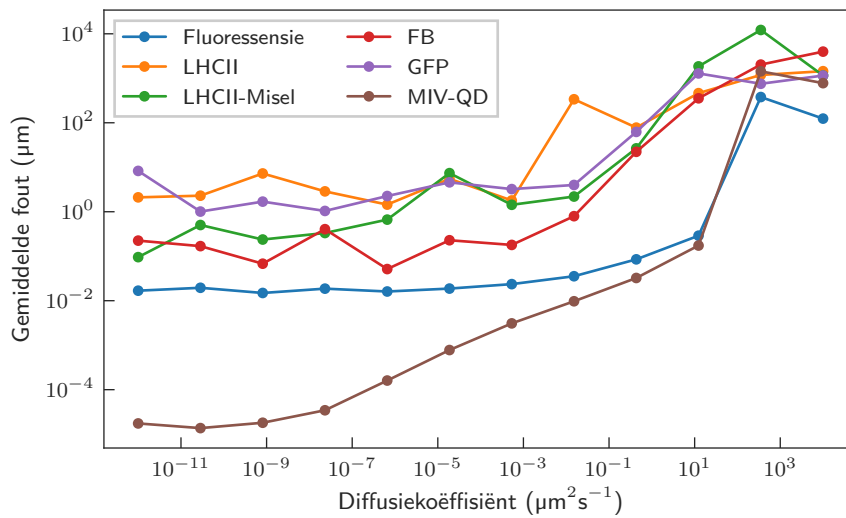
Figuur 2.15: Vergelyking van die nasporingsfout as 'n funksie van die diffusiekoëffisiënt vir verskillende fluoressensiemetodes.

iSCAT

'n Vergelyking tussen iSCAT en fluoressensie vir die verskillende monsters soos vroeër bespreek word getoon in Fig. 2.16 (die orbitaalmetode is gebruik). Eenvoudigheidsomthelwe aanvaar ons 'n konstante fluoressensie-intensiteit van 10 tellings/ms vir al die monsters, aangesien ons slegs belangstel in die relatiewe verrigting van iSCAT teenoor fluoressensie-gebaseerde lokalisering. Dus is daar net een kromme vir fluoressensie. Vir iSCAT is die gemiddelde kontras en aantal tellings bereken volgens die verhouding in Tab. 2.1 (Vir FB sou daar bv. 450 interferensietellings/ms en $450 \div 4.2 \times 10^{-4} = 107 \times 10^4$ agtergrondtelling/ms). Die werklike kontras is bereken (met Vgl. (2.8)) deur Poissonruis te aanvaar vir die agtergrond sowel as die interferensietellings. Hierdie kontraswaardes is dan gebruik vir die posisieberamings met dieselfde vergelykings as vir fluoressensie, met die kontras wat die plek neem van die fluoressensie-intensiteit. Vir elke waarde van D is 5 lopies gedoen van 100 ms, behalwe vir FB en LHCII in 'n misel, waarvoor dit nodig was om 50 lopies te doen om 'n goeie gemiddeld te kry (omdat hierdie deeltjies op die grens is van

naspoorbaar).

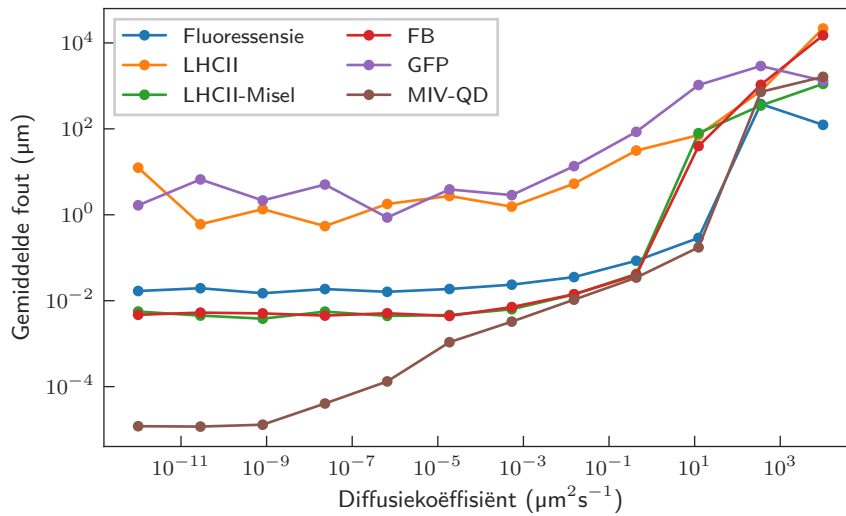
Die algemene tendens in Fig. 2.16 is dieselfde as in Fig. 2.11. Vir LHCII en GFP is daar by hierdie intensiteit (die ekwivalent van 10 000 fluoressensietellings per sekonde) nie regtig nasporing nie (daar is 'n fout van $\sim 1 \mu\text{m}$). LHCII in 'n misel en FB blyk net-net nie naspoorbaar te wees nie, blykende uit die feit dat die krommes baie onreëlmatig is. MIV-QD is naspoorbaar met 'n heelwat beter presisie as fluoressensie. Wanneer die iSCAT-beligtingsintensiteit verdubbel word (Fig. 2.17), is beide LHCII en FB wel naspoorbaar, met 'n ietwat beter presisie as vir fluoressensie.



Figuur 2.16: Vergelyking van die nasporingsfout as 'n funksie van die diffusiekoëffisiënt vir verskillende monsters met fluoressensie en iSCAT-lokalisering (orbitaalmetode). 'n Konstante fluoressensie-intensiteit word aanvaar en daar is dus net een kromme vir fluoressensie, terwyl die ander krommes vir iSCAT is.

2.3.3 Bespreking

Die diffusiekoëffisiënte van die monsters wat ons beskou het is as volg: GFP in sitoplasma is $D = 30 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ [68], vir LHCII in die membraan is $D = 8.4 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$



Figuur 2.17: Vergelyking van die nasporingsfout as 'n funksie van die diffusiekoëffisiënt vir verskillende monsters met fluoressensie en iSCAT-lokalisering (orbitaalmetode). 'n Konstante fluoressensie-intensiteit word aanvaar en daar is dus net een kromme vir fluoressensie, terwyl die ander krommes vir iSCAT is. Die beligtingsintensiteit vir iSCAT is hier 2 keer meer as vir Fig. 2.16.

[69], vir FB bo-op die membraan is $D = 3 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [70] en vir MIV in water vind ons $D = 3.4 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ uit die Stokes-Einsteinvergelyking. Wat fluoressensie betref is die monsters dus almal naspoorbaar met die ruitersprongmetode soos hier beskou, terwyl GFP te vinnig is vir die orbitaalmetode en MIV op die grens is. LHCII en FB is naspoorbaar met die orbitaalmetode en behoort ook naspoorbaar te wees met MINFLUX, alhoewel daar nie 'n voordeel sou wees bo die ander twee metodes nie. LHCII is op die grens waar MINFLUX se presisie beter word.

LHCII in 'n misel en FB is naspoorbaar met iSCAT by 'n beligtingsintensiteit wat slegs twee keer meer is as wat vir fluoressensie gebruik sou kon word. Alhoewel iSCAT vir die nasporing van MIV potensieel baie meer presies kan wees, is die diffusie daarvan te vinnig om noodwendig hierdie voordeel te kan benut. Daar is egter baie veranderlikes betrokke by 'n eksperiment, en vir hierdie simulasies is sekere aannames eenvoudigheidsonthalt gemaak, spesifiek dieselfde beligtingsintensiteit

en golflengte vir fluoressensie en iSCAT, asook die omgewing van die monster (bv. water vir MIV). Vir 'n werklike eksperiment sal die haalbare fotontellings verskillend wees vir verskillende monsters. Die maksimum moontlike beligtingsintensiteit sal ook afhang van die monster en die golflengte wat gebruik word, maar sal potensieel heelwat hoër wees vir iSCAT, wat baie beter presisie sal verskaf. Vir verdere navorsing sou simulaties gedoen kon word om vir elke monster te bepaal watter parameters optimaal is. Beide die absorpsie- en verstrooiingsdeursnitte hang af van golflengte, en dus is die optimale situasie vir elke monster 'n kombinasie van nasporingsmetode, golflengte en beligtingsintensiteit.

2.4 Gevolgtrekking

Die orbitaalmetode is aanvanklik gedemonstreer in 2004 en is relatief eenvoudig en bekostigbaar om te implementeer. Die ruitersprong-metode is ontwikkel in 2010, spesifiek as 'n verbetering op die orbitaalmetode vir die naspoor van vinnige diffusie. Uit hierdie studie is dit duidelik dat hierdie oogmerk bereik is, met 'n toename in die maksimum naspoorbare waarde van D . Dit moet genoem word dat hierdie metode baie meer kompleks en duur is om te implementeer as die orbitaalmetode, te wyte aan 'n baie vinniger laserskandeerspoed en meer komplekse beheerhardeware. MINFLUX is geskep om nasporingsakkuraatheid te verbeter. Dit slaag in hierdie doel, maar ten koste van 'n stadiger nasporingspoed. Die diffusiegebied waar MINFLUX nuttig is is redelik klein, en dit is daarom 'n superresolusietegniek eerder as 'n tegniek vir enkeleeltjienasporing. Dit is ook meer kompleks om te implementeer as die orbitaalmetode, alhoewel dit nie so 'n vinnige skandeerspoed benodig soos die ruitersprong-metode nie, aangesien dit net 4 punte behels (die spoed waarmee die bundel geskandeer word is een van die belangrikste faktore met betrekking tot die koste van 'n patroonbeligtingsopstelling). Die iSCAT-konsep

bestaan al net so lank soos fluoressensie-gebaseerde SPT, maar dit is eers onlangs geïmplementeer met 'n patroonbeligtingsbenadering. Die metode se groot voordele is dat dit nie-fluoreserende deeltjies kan naspoor en dat dit vir seker monsters heelwat verbeterde akkuraatheid toon. Dit, tesame met 'n relatief eenvoudige implementering, behoort te verseker dat hierdie tegniek baie belangrik sal wees vir die toekoms van enkeldeeltjienasporing.

Hoofstuk 3

Eksperiment

In hierdie hoofstuk kyk ons na die eksperimentele toepassing van enkeleeltjienasporing gebaseer op die orbitaalmetode met fluoressensie. Die doel van hierdie werk is voorlopige toetsing en ontwikkeling, wat die grondslag vorm vir opvolgwerk gemik op resultate. Ek bespreek die harde- en sagtewareontwikkeling, asook verdere stappe wat nodig is om by eksperimentele resultate uit te kom.

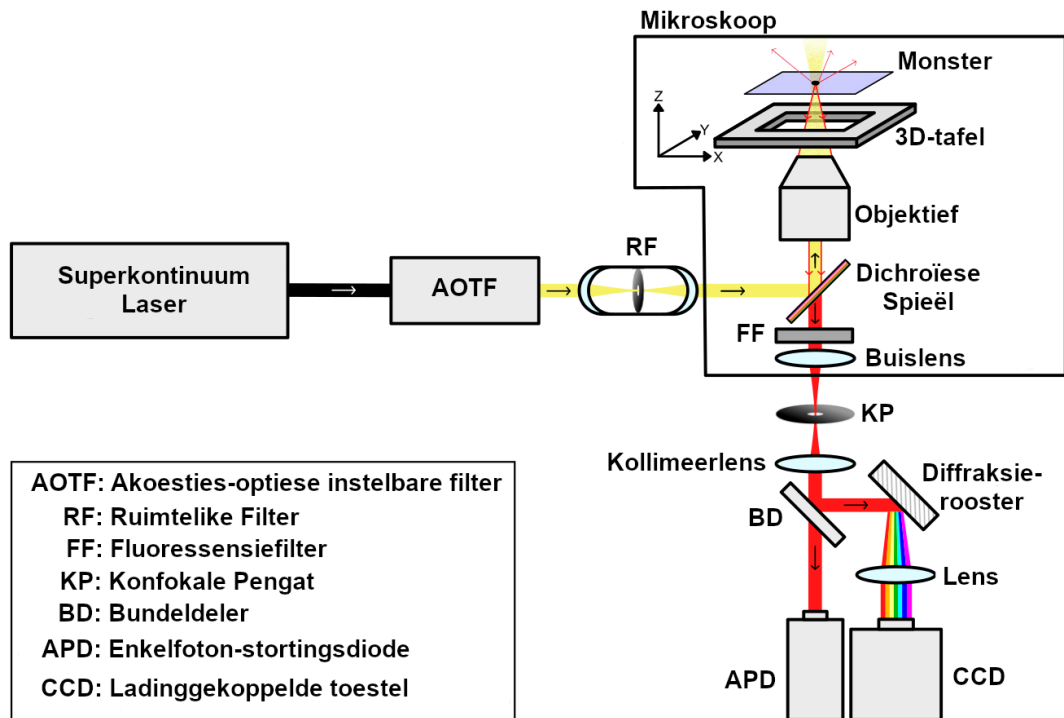
3.1 Eksperimentele opstelling

3.1.1 SMS-opstelling

Die SPT-funksionaliteit is geïmplementeer as 'n toevoeging tot 'n bestaande SMS-opstelling, wat eers beskryf sal word (Fig. 3.1). Die ligbron is 'n Fianium superkontinuumlaser (C400-4-PP) met 'n uitsetspektrum van 420 nm tot 2200 nm, 'n pulswydte van 6 ps en 'n verstelbare puls-herhalingsfrekwensie tot en met 40 MHz. Die uitset hiervan gaan via 'n vesel na 'n akoesties-optiese instembare filter (AOTF). Dit word gebruik om tot en met 8 verskillende golflengtes te selekteer met 'n bandwydte van 2-7 nm. Hierna word die bundel deur 'n ruimtelike filter gestuur om 'n meer Gaussiese ruimtelike intensiteitsprofiel te kry. Ná die ruimtelike filter

gaan die bundel na 'n Nikon Eclipse Ti-E/B omgekeerde mikroskoop waar dit deur 'n dichroïese spieël weerkaats word na die objektief. Die dichroïese spieël weerkaats lig met 'n golflengte korter as 'n sekere afsnypunt en laat lig met 'n langer golflengte deur. Met 'n gepaste afsnypunt word die opwekkingslig dus weerkaats terwyl fluoressensie deurgelaat word. Die objektief is 'n Nikon CFI Plan Apochromat λ -reeks $100\times$ olie-dompelings objektief met 'n numeriese lensopening van 1.45. Die monster word geplaas op 'n glasmikroskoopshyfie wat gemonteer word op 'n Mad City Labs (MCL) Nano-LPS200 nanopositioneringsverhoog. Die fluoressensie vanaf die monster word deur die objektief opgevang en gaan deur die dichroïese spieël. Daarna word dit deur die buislens van die mikroskoop gefokus op die konfokale pengat, waarna die lig deur 'n fluoressensiefilter gaan. Hierdie filter het dieselfde afsnypunt as die dichroïese spieël en dit is tipies nog skerper. Die kombinasie van die twee filters sorg dat byna alle opwekkingslig uitgefilter word. Hierna gaan die bundel deur 'n kollimasielens waarna daar verskillende detektor-opsies is, naamlik twee enkelfoton-stortingsdiodes (SPAD's) en 'n spektrograaf bestaande uit 'n diffraksierooster, lens en lading-gekoppelde toestel (CCD)-kamera. Die SPAD's is 'n Micro Photon Devices PD-050-CTE sowel as 'n Excelitas SPCM-AQRH-16. Eersgenoemde het 'n vinniger tydrespons terwyl laasgenoemde stadiger is maar 'n beter sensitiwiteit het. Die CCD-kamera is 'n Andor iXon₃. Vir hierdie studie is slegs die sensitiewe SPAD gebruik.

Die SPAD's se uitsette gaan na 'n tydgekorreleerde enkelfotontelling (TCSPC) PCI-kaart van Becker & Hickl (BH) (SPC-130-EM). Dit is 'n apparaat wat 'n baie presiese meting kan doen van die tyd tussen twee insetpulsse (ons s'n se tydkanaalwydte is 12 ps). Deurdat daar vir elke laserpuls ook 'n elektroniese puls gegenereer word (deur middel van 'n ingeboude fotodiode in die laser), kan ons die tyd meet tussen 'n laserpuls en 'n waargenome foton. Dit kan dan gebruik word om fluoressensieleefte te bepaal. Die absolute arriveertye word ook gemeet en hieruit



Figuur 3.1: Skematiese diagram van die SMS-opstelling. Aangepas uit [27].

kry ons intensiteitinligting. Die inset na die kaart is via 'n 8-kanaal roeteerder (BH HRT-82), wat beteken dat daar tot en met 8 verskillende insette kan wees.

3.1.2 SPT-funksionaliteit

Die eerste verandering wat gemaak is aan die opstelling, is om 'n helium-neonlaser met 'n skoon Gaussiese bundel te gebruik (JDSU 1137P). Die Fianium het heelwat aberrasies en is dus nie baie geskik vir SPT nie, veral nie tydens die ontwikkelingsfase van die eksperiment nie. Die laser het 'n bundeldeursnit van 0.8 mm en 'n uitsetdrywing van 7 mW. Die bundel gaan eerstens deur 'n teleskoop bestaande uit 'n 25 mm en 100 mm lens om die bundel $4\times$ te vergroot (na 3.2 mm deursnee), sowel as neutrale-digtheidsfilters om die drywing af te bring na ~ 10 nW. Daarna gaan dit deur 'n opstelling wat die bundelafwyking bewerkstellig. Dit is gebaseer

op Cohen en Moerner (2008) [28] en werk as volg (Fig. 3.2): Die einddoel is om 'n bundel te hê wat gekollimeer is en deur die agterste fokus van die objektief gaan. Só 'n bundel sal die objektief parallel aan die optiese as verlaat en by die voorste fokusvlak fokus (ons kan aan die bundel dink asof dit 'n enkele straal is). Die afstand d tussen die gefokusde bundel en die optiese as word bepaal deur die hoek θ tussen die inkomende bundel en die optiese as ($d = f_o \tan \theta$ met f_o die fokale lengte van die objektief). Die sirkelvormige patroon in die optiese as word dus verkry deur hierdie hoek in twee dimensies te varieer. Deur 'n lens l_2 'n afstand $2f_2$ vanaf die agterste fokusvlak van die objektief te plaas, verkry ons dat die invalshoek van hierdie lens ook gelyk is aan θ . Ons kan dus die afwykingspieël 'n afstand $2f_2$ voor l_2 plaas. Al wat nou nodig is, is dat die bundel fokus by die voorste fokusvlak van l_2 , en vir dié doeleinde gebruik ons die lens l_1 met fokale lengte $f_1 > f_2$. In ons eksperiment is $f_1 = 2f_2 = 1000$ mm en die twee lense vorm dus 'n teleskoop wat die bundel $2\times$ verklein na 1.6 mm deursnee. Die objektief het 'n fokale lengte $f_o = 2$ mm en die verwagte radius van die gefokusde laserkol is dus:

$$w = \frac{2\lambda f_o}{\pi D} \quad (3.1)$$

$$= \frac{2 \times 633 \text{ nm}}{\pi} \times \frac{2 \text{ mm}}{1.6 \text{ mm}} \quad (3.2)$$

$$= 504 \text{ nm}, \quad (3.3)$$

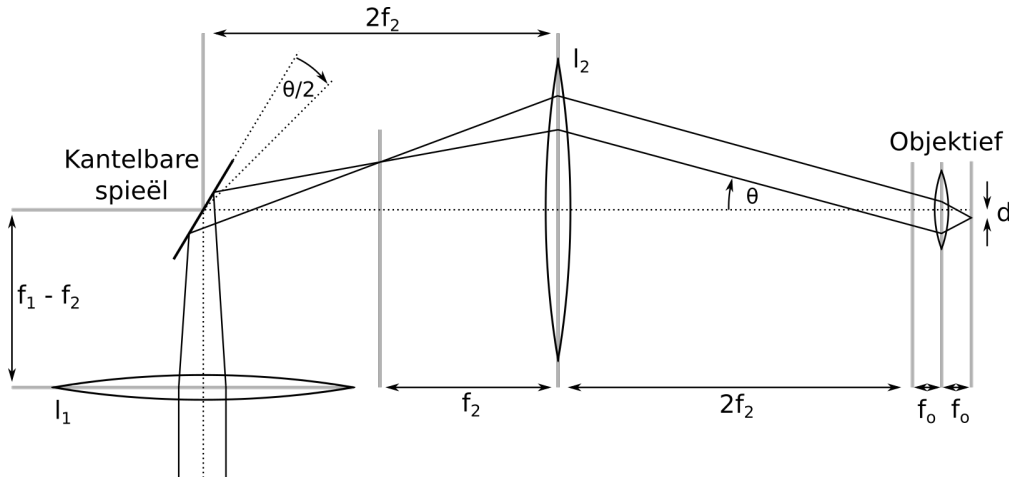
en die konfokale parameter (dubbel die Rayleigh-lengte) is:

$$b = \frac{2\pi w^2}{\lambda} \quad (3.4)$$

$$= 2.6 \text{ } \mu\text{m}. \quad (3.5)$$

Vir die afwyking van die bundel gebruik ons 'n Physik Instrumente (PI) S-331.5SH piëso-elektriese twee-as kantelbare spieël. Dit het 'n maksimum-afwykingshoek van 5 mrad en 'n maksimumfrekwensie van 2000 Hz (vir afwykingshoek ~ 1 mrad).

Dit word aangedryf deur 'n beheerder met 'n ingeboude hoogspanningsversterker (PI E500).



Figuur 3.2: Opstelling om bundelskandering te bewerkstellig (nie op skaal nie). In ons opstelling is $f_1 = 1000$ mm, $f_2 = 500$ mm en $f_o = 2$ mm.

3.2 Sagteware

Vir die sagteware-ontwikkeling is gebruik gemaak van National Instruments LabVIEW. Dit is omdat LabVIEW sekere baie handige kenmerke het. Dit is byvoorbeeld goed geskik vir parallelisering, en dit het heelwat ingeboude toets-en-metingsfunksionaliteit. Verder het meeste toets-en-metingsapparate (insluitend al die toerusting in ons opstelling) LabVIEW-sagteware beskikbaar. Daar is ook 'n groot hoeveelheid bestaande LabVIEW-kode vir die opstelling, waarvan party hergebruik is vir die SPT-sagteware. 'n LabVIEW-program staan bekend as 'n 'Virtual Instrument' of VI, ook wanneer dit as 'n subroetine gebruik word. 'n Tipiese LabVIEW-VI maak dus gebruik van verskeie sub-VI's. Daar kan ook subroetines gebruik word in die vorm van 'n dinamiese-skakel programbiblioteek (DLL), net soos in meeste ander programmeertale.

Daar is 3 stukke hardeware waarmee daar gekommunikeer moet word. Die PI-beheerder, die MCL-verhoog en die BH-TCSPC-kaart. Die PI-beheerder maak gebruik van teksgebaseerde kommunikasie wat via USB geskied. Dit het ook 'n ingeboude geheue wat golfvorms kan stoor. Daar hoef dus net deur middel van 'n paar opdragte 'n golfvorm gedefinieer te word, waarna die beheerder dit vir 'n onbepaalde tyd sal uitset. Vir die doeleindes van SPT word daar eenvoudig twee sinusgolwe in die twee kanale van die beheerder ingestel (90° uitmekaar), en dit word uitgeset vir so lank as wat die eksperiment voortduur.

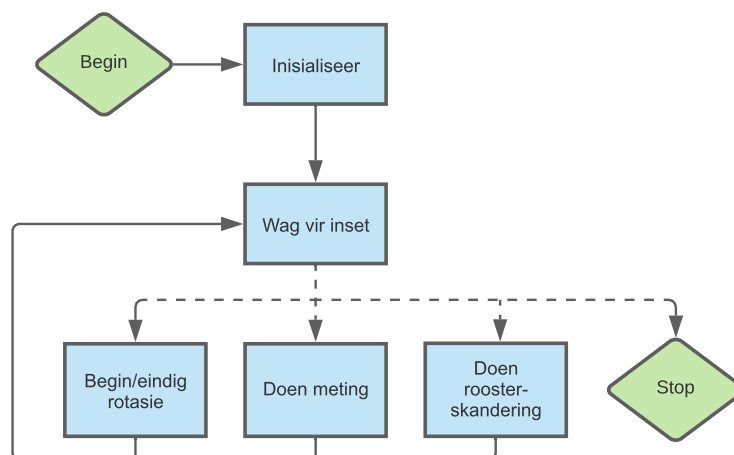
Die MCL-verhoog se kommunikasie geskied via DLL's wat deur MCL verskaf is. Die funksionaliteit wat SPT benodig is baie eenvoudig, en behels slegs die oombliklike lees en skryf van posisies.

Die intervlak met die BH-kaart geskied ook deur middel van DLL's, maar vir die SPT sagteware is gebruik gemaak van VI's wat voorheen deur Joshua Botha ontwikkel is en wat die rou data wat die BH-funksies lewer verwerk na 'n meer bruikbare formaat.

Die mees komplekse aspek van die SPT-sagteware is die verkryging van posisie-inligting uit die waargenome fotodata. Vir hierdie doeleinde is dit natuurlik nodig om die tyd-inligting van die fotodata te sinkroniseer met die beweging van die laserbundel (en dus die kantelbare spieël). Omdat die beweging van die spieël direk beheer word deur die PI-beheerder, en nie gegeneer word deur die SPT-sagteware nie, benodig ons 'n sinkronisasie-sein. Dit neem die vorm aan van TTL-pulse wat op vasgestelde punte in die golfvorm deur die PI-beheerder uitgeset word. Ons kan hierdie uitset direk in die BH-roeteerder invoer (dit is juis vir doeleindes soos hierdie dat die roeteerder 8 kanale het). Dit het tot gevolg dat die BH-kaart *kwasi-fotone* met presiese tydinligting waarneem.

3.2.1 LabVIEW-kode

Die algemene ontwerp van die sagteware is in die vorm van 'n grafiese gebruikersintervlak (GUI). Die struktuur van die kode volg 'n patroon bekend as 'n toestandmasjien (ook bekend as 'n eindige toestand-outomaat). Dit is 'n fundamentele konsep in rekenaarwetenskap en een van die mees algemene patrone in LabVIEW-sagteware-ontwikkeling. In ons kode kan dit voorgestel word soos in Fig. 3.3. As die program begin word, word daar eerstens 'n inisialisering gedoen, waar hoofsaaklik getoets word of alle nodige hardeware gereed is. Dan gaan die program na 'n wagtoestand, vanwaar dit na een van verskeie toestande kan gaan, gebaseer op die inset van 'n gebruiker. Die bundelrotasie kan begin of beëindig word, 'n meting kan gedoen word of 'n roosterskandering kan gedoen word.



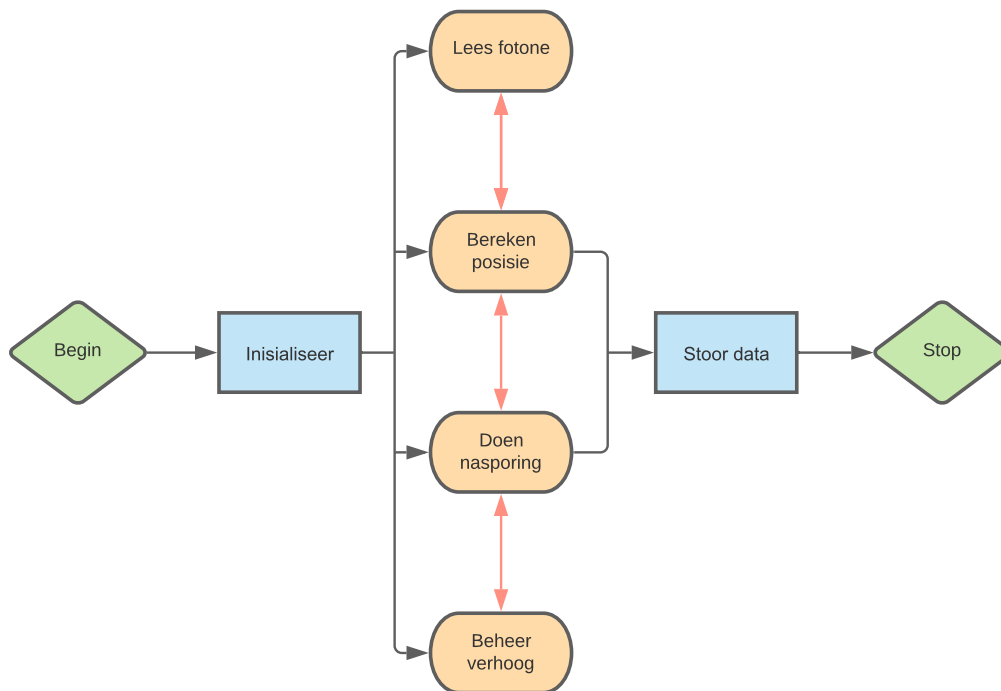
Figuur 3.3: Vloediagram van die SPT-sagteware wat die toestandmasjien-ontwerp voorstel. Die groen diamante stel die begin en einde van die algoritme voor, terwyl blou reghoeke funksies voorstel wat uitgevoer word. Die stippel-pyle dui aan dat slegs een van die moontlike roetes op 'n slag gevolg word.

Die belangrikste en mees komplekse gedeelte van die kode is die uitvoer van die SPT-meting (die roosterskanderingskode is ook kompleks, maar is voorheen

ontwikkel deur Joshua Botha). Vir hierdie proses is gebruik gemaak van LabVIEW se kragtige paralleliseringsvermoë. Die algemene struktuur van die kode word aangedui in Fig. 3.4, waar die ronde oranje reghoeke lusse voorstel wat in parallel uitgevoer word. Die eerste lus is verantwoordelik vir die lees van fotondata, die tweede bereken 'n posisieberaming, die derde een bereken die nodige bewegings vir nasporing en die vierde lus kommunikeer met die verhoog. Die parallelisering stel ons in staat om die kode op 'n sinvolle manier onder te verdeel, sonder die tipiese kompleksiteit wat gewoonlik in ander programmeertale met parallelle kode gepaardgaan. Die eerste lus kommunikeer met die BH-kaart om binêre data uit te lees en skakel dit om na fotondata (aankomstye en kanaalinligting). Hierdie data word gestuur na die posisieberekeningslus, wat die kwasi-fotontye gebruik om die werklike fotontye in te deel, waarna Vgls. (2.1) en (2.2) gebruik word om 'n posisieberaming te bereken. Die posisieberaming word gestuur na die nasporningslus, waar die beheeruitset bereken word. Op hierdie stadium is die Kalmanfilter en LQR-beheerder nog nie geïmplementeer nie, en ons gebruik 'n eenvoudige proporsionele beheerder. Die relatiewe posisieberaming word vermenigvuldig met 'n verstelbare versterkingswaarde (0.7 is wat ons tans gebruik). Dit word dan getel by die vorige verhoogposisie en die nuwe posisie word na die verhoogbeheerlus gestuur. Die verhoogbeheer word in 'n aparte lus toegepas, hoofsaaklik sodat 'n gebruiker tydens 'n meting met die hand 'n bewegingsopdrag kan uitvoer. Dit is baie nuttig vir toetsing.

3.3 Monstervoorbereiding

Die monster wat ons gebruik het, is fluoësserende krale (FluoSpheres™ F8807, Invitrogen). Dit is polistereendeeltjies (ons s'n is 200 nm in deursnee) wat bedek is met 'n groot hoeveelheid kleurstof en wat baie sterk fluoësseer sonder om vinnig



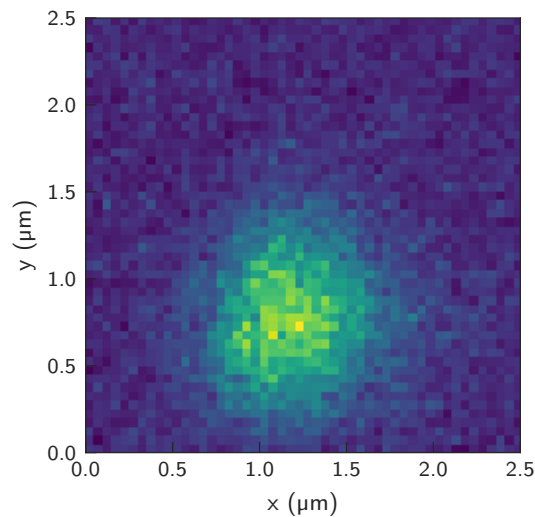
Figuur 3.4: Vloediagram van die kode vir 'n SPT-meting. Groen diamante stel die begin en einde van die algoritme voor, blou reghoeke stel funksies voor wat eenmalig uitgevoer word en ronde oranje reghoeke stel parallele lusse voor. Die rooi pyle dui deurlopende data-oordrag aan.

fotoverbleiking te ondergaan (in ons eksperimente bestraal ons tipies dieselfde kraal vir tientalle minute sonder enige afname in fluoressensie). Hierdie deeltjies heg gereedelik aan glas, veral as daar sout (ons gebruik MgCl_2) by die oplossing gevoeg word. Die sout stel positiewe ione vry, wat aanhegting verbeter. Om aanhegting te voorkom en agtergrondsein te verminder, maak ons die glas skoon deur dit te sonikeer vir 10 min. elk in asetoon, etanol en gedeïoniseerde water. Die monster word verdun tot ~ 0.1 nM konsentrasie, waarna 'n ~ 3 μL druppel op 'n mikroskoop-dekglas geplaas word, met nog 'n dekglas bo-op. Die resulterende laag vloeistof is 1 μm – 10 μm diep (ons kan dit bepaal deur te kyk na die objektiefposisie wanneer die fokus by die onderste en boonste glas-water-intervlakke is). 'n Diepte van 1 μm is minder as die konfokale parameter van die bundel, en die diffusie kan

dus as tweedimensioneel beskou word.

3.4 Eksperimentele ontwikkeling

Die eerste stap was om die grootte van die gefokusde bundel te bepaal, sodat ons die afwykingshoek kon bereken vir die bundelskandering. Dit word gedoen deur 'n vasgehegte kraal deur die fokus te skandeer en die fluoressensie-intensiteit te meet (sonder 'n konfokale pengat). Die gemete profiel word getoon in Fig. 3.5, en 'n passing gee 'n bundelradius van $w = 718$ nm ($1/e^2$ -wydte), ietwat groter as die verwagte waarde. Dit gee dan $R = w/\sqrt{2} = 508$ nm (Par. 2.1.1). Die afwykingshoek is dus $\theta = \tan^{-1}(d/f_o) = \tan^{-1}(508 \times 10^{-9}/2 \times 10^{-3}) = 0.254$ mrad.

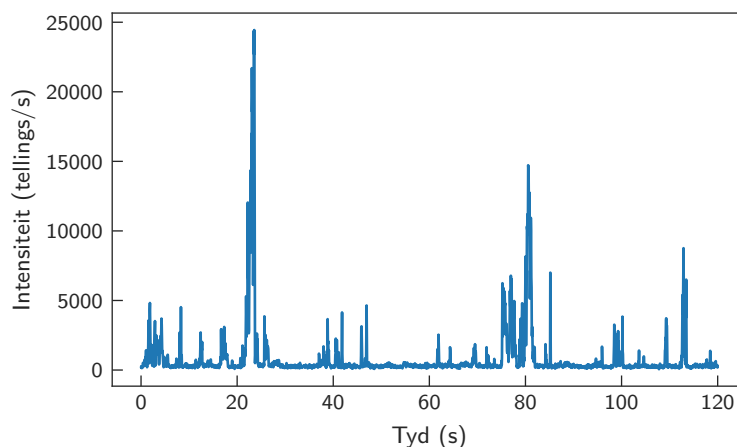


Figuur 3.5: Gemete Gaussiese bundelprofiel, verkry deur 'n 200 nm fluoresserende kraal oor 'n rooster te skandeer en die fluoressensie te meet. 'n Passing van die data gee 'n bundelradius van $w_0 = 718$ nm.

Die volgende stap was om voorlopige fluoressensiekorrelasie-spektroskopie (FCS) metings te doen. FCS is 'n tegniek wat tipies toegepas word op diffunderende deeltjies en wat onder andere diffusie-inligting verskaf [71]. Dit behels die berekening

van die outokorrelasiefunksie $G(\tau)$, gedefinieer as:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1, \quad (3.6)$$



Figuur 3.6: Gemete fluoressensie-intensiteit oor tyd vir diffunderende krale in waterige oplossing met 'n stilstaande laserbundel.

met $I(t)$ die intensiteit as 'n funksie van tyd t en skerp hakies wat die gemiddeld aandui. 'n Voorbeeld van 'n intensiteit-tydspoor met diffunderende deeltjies word getoon in Fig. 3.6. Aangesien ons data in die vorm van fotonarriveertye is, bereken ons die korrelasiefunksie direk uit hierdie tye, deur middel van die Python-programbiblioteek `pycorrelate`, wat die algoritme in [72] gebruik. Hierdie algoritme is 'n uitbreiding van die 'multi-tau'-algoritme wat willekeurige tydindelings toelaat (die 'multi-tau' algoritme vereis logaritmiese tydindelings en tradisionele algoritmes gebruik lineêre indelings). Die verwagte korrelasiefunksie vir 2D diffusie is [73]:

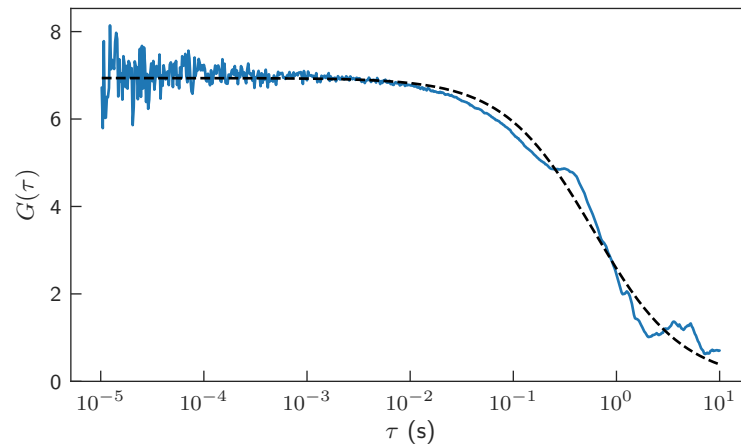
$$G_0 = \frac{1}{\bar{N}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}, \quad \tau_D = \frac{w^2}{4D}, \quad (3.7)$$

met \bar{N} die gemiddelde aantal deeltjies in die meetvolume, τ_D die diffusie tyd, w die bundelradius en D die diffusiekoëffisiënt. Vir die roterende bundel met radius r en

hoekfrekwensie ω_0 is die verwagte korrelasiefunksie [73]:

$$G_r = G_0(\tau) \exp \left[-2 \frac{r^2}{w^2} \left(\frac{1 - \cos \omega_0 \tau}{1 + \tau/\tau_D} \right) \right]. \quad (3.8)$$

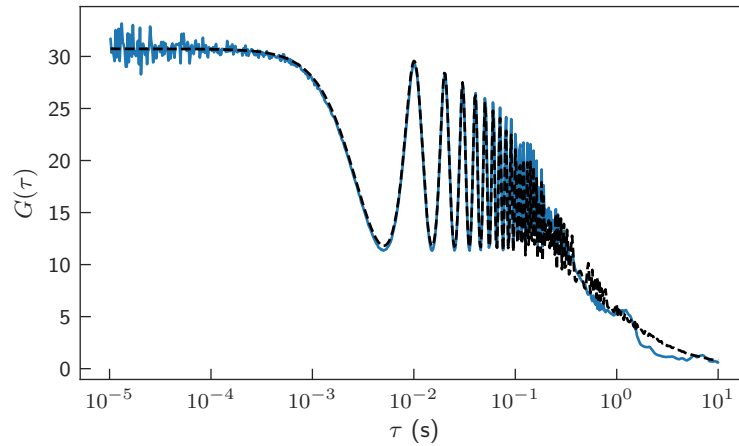
In Fig. 3.7 word 'n outokorrelasiefunksie getoon vir diffusie in 'n stilstaande bundel, terwyl Fig. 3.8 'n outokorrelasiefunksie toon vir diffusie in 'n roterende bundel. Hierdie is net voorlopige metings en die belangrikste inligting wat ons hieruit kan leer is dat die diffusietyd van 0.2 s–0.6 s beslis naspoorbaar is met ons opstelling.



Figuur 3.7: Eksperimentele outokorrelasiefunksie (soliede blou kurwe) vir diffunderende krale in 'n dun laag water, tesame met passing volgens Vgl. (3.7) (swart stippellyn). Die passing gee $\bar{N} = 0.14$ en $\tau_D = 0.59$ s.

3.5 Volgende stappe

Die volgende stap is om 'n vasgehegte deeltjie 'na te spoor'. Dit beteken dat ons 'n deeltjie vind deur middel van roosterskandering, waarna ons die meting begin met die deeltjie iewers in die roterende bundel. As die nasporing werk, sal die deeltjie na die middel van die bundel beweeg en 'n konstante posisie handhaaf. 'n



Figuur 3.8: Eksperimentele autokorrelasiefunksie (soliede blou kurwe) vir diffunderende krale in 'n dun laag water met 'n roterende bundel. Die eksperimentele passing volgens Vgl. (3.8) (swart stippellyn) gee $\bar{N} = 0.03$, $\tau_D = 0.26$ s en $r^2/w^2 = 0.24$.

Probleem iewers in die opstelling of kode kan lei tot ossillasies of selfs dat daar vanaf die deeltjie wegbeweeg word. Hierna wil ons graag 'n bewegende deeltjie volg en 'n maklike manier is as volg: die MCL-beheerder het 'n analoë inset wat gesom word met die posisie ontvang oor USB (1 V stem ooreen met 20 μm). Deur hierdie inset te koppel aan 'n seingenerator kan ons 'n deterministiese 'beweging' uitvoer. 'n Suksesvolle lopie word dan gekenmerk deur 'n konstante posisie, aangesien die beheerder die analoë inset presies uitkanselleer.

Sodra ons vasgehegte deeltjies suksesvol kan naspoor, sal die volgende stap wees om sogenaamde 'naspornings-FCS' te doen [74]. Dit is 'n eksperiment wat iets tussen werklike nasporing en vry-diffusie-FCS is. Dit sal baie nuttige inligting verskaf wat ons kan gebruik om die nasporningsvermoë te verbeter. Sodra ons suksesvolle nasporing het van fluoressente krale, kan ons aanbeweeg na ligoestingskomplekse, waar daar verskeie moontlikhede is vir navorsing, waarvan twee in die nabye toekoms kan gebeur: een is die naspoor van 'n ligoestingskompleks naby 'n plasmoniese nanoantenne, soortgelyk aan [75], wat 'n natuurlike uitbreiding is van vorige navorsing deur ons groep [76]. 'n Ander een is SMS-eksperimente op

ligoestingskomplekse in 'n membraan, met behulp van 'n Langmuir-Blodgett-trog. Daar is ook eksperimentele verbeterings wat beplan word - 'n belangrike een is die saamstel van 'n vinniger beheerder vir die verhoog, wat die naspoor van vinniger diffusie sal moontlik maak.

Hoofstuk 4

Opsomming

Fotosintese is noodsaaklik vir lewe, en vind plaas in verskeie organismes. Die eerste stap in hierdie proses is die opvang van fotone deur ligoestingskomplekse. Daar is 'n groot verskeidenheid hiervan, insluitend LHCI in plante en fikobilisoom in sianobakterieë. Hierdie sisteme toon komplekse, individuele gedrag wat nie gesinkroniseer is met ander komplekse nie. Hierdie feit, tesame met die komplekse se foto-aktiwiteit, beteken dat enkelmolekule-spektroskopie 'n goeie manier is om ligoestingskomplekse te bestudeer. Die omgewingstoestande in standaard-SMS is egter 'n swak weerspieëling van die natuurlike omgewing en in besonder is die deeltjies gewoonlik vasgeheg aan 'n oppervlak. Enkeldeeltjie-nasporing kan gebruik word om hierdie beperking te oorkom.

In hierdie verhandeling is die onderliggende teorie van SPT ondersoek en toegepas. Alhoewel die fokus op ligoestingskomplekse is, is die resultate toepaslik op enige nanodeeltjies. Die voorlopige eksperimentele ontwikkeling wat hierby aansluit is ook beskryf.

Hoofstuk 2 het verskillende SPT-tegnieke ondersoek, gebaseer op fluoressensie en interferometriese verstrooiing, vir verskillende biologiese voorbeelde, insluitend die ligoestingskomplekse hierbo genoem. Analitiese berekeninge is gedoen om

Cramér-Rao ondergrense te bereken, wat die beste moontlike presisie aandui vir 'n spesifieke metode en monster. Dinamiese simulaties is ook gedoen om hierdie resultate te bevestig. Daar is bevind dat die ruitersprong-metode die vinnigste is, terwyl MINFLUX 'n beter presisie behaal solank die diffusie stadig genoeg is. Die orbitaalmetode is tussen hierdie metodes, vinniger as MINFLUX en met 'n soortgelyke presisie as die ruitersprong-metode, alhoewel dit stadiger is. Hierdie metode is wel goedkoper en eenvoudiger om te implementeer en behoort gebruik te kan word op LHCII en FB. iSCAT is 'n metode wat op verstrooiing gebaseer is en dus meer fotone beskikbaar stel om nasporing mee te doen. Vir sekere monsters verskaf iSCAT 'n beter presisie as fluoressensie, by dieselfde beligtingsintensiteit. Hierdie studie is die eerste om 'n aantal metodes op albei hierdie maniere te vergelyk. Die teorie wat ontwikkel is vir iSCAT is ook nuut. Die analise wat ontwikkel is kan ook uitgebrei word na ander metodes en monsters, wat dit baie nuttig behoort te maak vir enige iemand wat 'n SPT eksperiment wil doen.

Hoofstuk 3 beskryf die voorlopige toetsing en ontwikkeling van 'n SPT-opstelling gebaseer op fluoressensie en wat gebruik maak van die orbitaalmetode. Die harde- en sagtewareontwikkeling word bespreek, sowel as voorlopige eksperimente en toekomsvooruitsigte.

Bylae A

Lys van afkortings

ATP	Adenosientrifosfaat	(Adenosine triphosphate)
CCD	Ladinggekoppelde toestel	(Charge coupled device)
CRB	Cramér-Rao-grens	(Cramér-Rao bound)
Cyt	Sitochroom	(Cytochrome)
DLL	Dinamiese-skakel- programbiblioteek	(Dynamic-linked library)
FNR	Ferredoksien-NADP-reduktase	(Ferredoxin-NADP-reductase)
Fd	Ferredoksien	(Ferredoxin)
G3P	Gliseraldehyd-3-fosfaat	(Glyceraldehyde-3-phosphate)
GFP	Groen fluoesserende proteïen	(Green fluorescent protein)
GUI	Grafiese gebruikersintervlak	(Graphical user interface)
LHCII	Ligoestingskompleks II	(Light harvesting complex II)
LQR	Lineêre kwadratiese reguleerder	(Linear quadratic regulator)
MIV	Menslike immuuniteitsgebrek virus	(Human immunodeficiency virus)
NADPH	Nikotienamied- adeniendinukleotiedfosfaat	(Nicotianamide adenine dinucleo- tide phosphate)
PB	Fikobilisoom	(Phycobilisome)
pC	Plastosianien	(Plastocyanine)
PCI	Randkomponent tussenskakel	(Peripheral component intercon- nect)

PQ	Plastokinoon	(Plastoquinone)
PQH ₂	Plastokinol	(Plastoquinol)
PSI/II	Fotosistiem I/II	(Photosystem I/II)
QD	Kwantumpunt	(Quantum dot)
RuBP	Ribulose-bifosfaat	(Rubilose biphosphate)
RuBisCo	Ribulose-bifosfaat karboksilase	(Ribulose biphosphate carboxy- lase)
SMS	Enkelmolekule-spektroskopie	(single molecule spectroscopy)
SPAD	Enkelfoton-stortingsdiode	(Single photon avalanche diode)
SPT	Enkeldeeltjie-nasporing	(Single particle tracking)
TCSPC	Tydgekorreleerde enkelfotontel- ling	(Time-correlated single photon counting)
TTL	Transistor-transistor-logika	(Transistor-transistor logic)

Bibliografie

- [1] Morowitz, Harold J.: *Foundations of Bioenergetics*. Academic Press, New York, 1978, ISBN 978-0-12-507250-2.
- [2] Archer, David: *Global Warming: Understanding the Forecast*. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J, 2e uitgawe, 2012, ISBN 978-0-470-94341-0.
- [3] Davies, J. H. en Davies, D. R.: *Earth's Surface Heat Flux*. *Solid Earth*, 1(1):5–24, 2010, ISSN 1869-9510. <https://doi.org/10.5194/se-1-5-2010>.
- [4] Zehr, J. P. en Kudela, R. M.: *Photosynthesis in the Open Ocean*. *Science*, 326(5955):945–946, 2009, ISSN 0036-8075, 1095-9203. <http://doi.org/10.1126/science.1181277>, besoek op 2019-05-08.
- [5] De Marais, D. J.: *Evolution. When Did Photosynthesis Emerge on Earth?* *Science* (New York, N.Y.), 289(5485):1703–1705, 2000, ISSN 0036-8075. <http://doi.org/10.1126/science.289.5485.1703>.
- [6] Madigan, Michael T. (redakteur): *Brock Biology of Microorganisms*. Benjamin Cummings, San Francisco, 13e uitgawe, 2012, ISBN 978-0-321-64963-8 978-0-321-72675-9.
- [7] Gwizdala, Michal: *In Vitro and in Vivo Characterisation of the OCP-Related Photoprotective Mechanism in the Cyanobacterium Synechocystis PCC6803*. PhD verhandeling, Université Paris Sud, Paris XI, 2012.

- [8] Vermaas, Wim FJ: *Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria*. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2001, ISBN 978-0-470-01617-6 978-0-470-01590-2. <http://doi.org/10.1038/npg.els.0001670>.
- [9] Liberton, Michelle, Howard Berg, R., Heuser, John, Roth, Robin en Parkrasi, Himadri B.: *Ultrastructure of the Membrane Systems in the Unicellular Cyanobacterium Synechocystis Sp. Strain PCC 6803*. *Protoplasma*, 227(2-4):129–138, 2006, ISSN 0033-183X, 1615-6102. <http://doi.org/10.1007/s00709-006-0145-7>.
- [10] Crofts, Antony R.: *The Q-Cycle — a Personal Perspective*. In Govindjee, Beatty, J. Thomas, Gest, Howard en Allen, John F. (redakteurs): *Discoveries in Photosynthesis*, Advances in Photosynthesis and Respiration, bladsye 479–499. Springer Netherlands, Dordrecht, 2005, ISBN 978-1-4020-3324-7. https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9_46.
- [11] Liu, LuNing: *Distribution and Dynamics of Electron Transport Complexes in Cyanobacterial Thylakoid Membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(3):256–265, 2016, ISSN 0006-3002. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.010>.
- [12] Torrado, Alejandro, Ramírez-Moncayo, Carmen, Navarro, José A., Mariscal, Vicente en Molina-Heredia, Fernando P.: *Cytochrome C6 Is the Main Respiratory and Photosynthetic Soluble Electron Donor in Heterocysts of the Cyanobacterium Anabaena Sp. PCC 7120*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1860(1):60–68, 2019, ISSN 0005-2728. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.11.009>.

- [13] Demmig-Adams, Barbara, Garab, Gyözö, III, William W. Adams en Govindjee (redakteurs): *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer Netherlands, 2014, ISBN 978-94-017-9031-4. <http://doi.org/10.1007/978-94-017-9032-1>.
- [14] Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruij, J., Nield, J., Boonstra, A. F., Barber, J. en Rögner, M.: *Supramolecular Structure of the Photosystem II Complex from Green Plants and Cyanobacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(1):175–179, 1995, ISSN 0027-8424. <http://doi.org/10.1073/pnas.92.1.175>.
- [15] Arteni, Ana A., Ajlani, Ghada en Boekema, Egbert J.: *Structural Organisation of Phycobilisomes from Synechocystis Sp. Strain PCC6803 and Their Interaction with the Membrane*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1787(4):272–279, 2009, ISSN 0005-2728. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.009>.
- [16] Standfuss, Jörg, Terwisscha van Scheltinga, Anke C, Lamborghini, Matteo en Kühlbrandt, Werner: *Mechanisms of Photoprotection and Nonphotochemical Quenching in Pea Light-Harvesting Complex at 2.5 Å Resolution*. The EMBO Journal, 24(5):919–928, 2005, ISSN 0261-4189, 1460-2075. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600585>.
- [17] Liu, Zhenfeng, Yan, Hanchi, Wang, Kebin, Kuang, Tingyun, Zhang, Jiping, Gui, Lulu, An, Xiaomin en Chang, Wenrui: *Crystal Structure of Spinach Major Light-Harvesting Complex at 2.72 Å Resolution*. Nature, 428(6980):287–292, 2004, ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://doi.org/10.1038/nature02373>.

- [18] Dingle, Ashton: *Determining the Energy Pathways in Light Harvesting Complex II Using Femtosecond Laser Techniques at Two Excitation Wavelengths*. BSc (Hons) Projekverslag, Rhodes University, 2014.
- [19] van Amerongen, Herbert en Croce, Roberta: *Light Harvesting in Photosystem II*. *Photosynthesis Research*, 116(2):251–263, 2013, ISSN 1573-5079. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9824-3>.
- [20] Glazer, Alexander N.: [31] *Phycobiliproteins*. In *Methods in Enzymology*, volume 167 van *Cyanobacteria*, bladsye 291–303. Academic Press, 1988. [https://doi-org.uplib.idm.oclc.org/10.1016/0076-6879\(88\)67034-0](https://doi-org.uplib.idm.oclc.org/10.1016/0076-6879(88)67034-0).
- [21] Tian, Lijin, Gwizdala, Michal, van Stokkum, Ivo H.M., Koehorst, Rob B.M., Kirilovsky, Diana en van Amerongen, Herbert: *Picosecond Kinetics of Light Harvesting and Photoprotective Quenching in Wild-Type and Mutant Phycobilisomes Isolated from the Cyanobacterium Synechocystis PCC 6803*. *Biophysical Journal*, 102(7):1692–1700, April 2012, ISSN 00063495. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349512002901>, besoek op 2021-02-07.
- [22] MacColl, Robert: *Cyanobacterial Phycobilisomes*. *Journal of Structural Biology*, 124(2-3):311–334, 1998, ISSN 1095-8657. <http://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4062>.
- [23] Schlau-Cohen, G. S., Wang, Q., Southall, J., Cogdell, R. J. en Moerner, W. E.: *Single-Molecule Spectroscopy Reveals Photosynthetic LH2 Complexes Switch between Emissive States*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27):10899–10903, 2013, ISSN 0027-8424, 1091-6490. <http://doi.org/10.1073/pnas.1310222110>.
- [24] Saga, Yoshitaka, Wazawa, Tetsuichi, Mizoguchi, Tadashi, Ishii, Yoshiharu, Yanagida, Toshio en Tamiaki, Hitoshi: *Spectral Heterogeneity in Sin-*

- gle Light-Harvesting Chlorosomes from Green Sulfur Photosynthetic Bacterium Chlorobium Tepidum*. *Photochemistry and Photobiology*, 75(4):433–436, 2002, ISSN 1751-1097. [http://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750433SHISLH2.0.CO2](http://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750433SHISLH2.0.CO2).
- [25] Gwizdala, Michal, Berera, Rudi, Kirilovsky, Diana, van Grondelle, Rienk en Krüger, Tjaart P. J.: *Controlling Light Harvesting with Light*. *Journal of the American Chemical Society*, 138(36):11616–11622, 2016, ISSN 0002-7863, 1520-5126. <http://doi.org/10.1021/jacs.6b04811>.
- [26] Krüger, Tjaart P. J., Wientjes, Emilie, Croce, Roberta en van Grondelle, Rienk: *Conformational Switching Explains the Intrinsic Multifunctionality of Plant Light-Harvesting Complexes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33):13516–13521, 2011, ISSN 0027-8424. <http://doi.org/10.1073/pnas.1105411108>.
- [27] Botha, Joshua: *Using Single Molecule Spectroscopy to Study Fast Photoprotective Processes in Plants*. Meesters tesis, Universiteit van Pretoria, 2016. <http://hdl.handle.net/2263/60864>.
- [28] Cohen, Adam E. en Moerner, W. E.: *Controlling Brownian Motion of Single Protein Molecules and Single Fluorophores in Aqueous Buffer*. *Optics Express*, 16(10):6941, 2008, ISSN 1094-4087. <http://doi.org/10.1364/OE.16.006941>.
- [29] Wells, Nathan P., Lessard, Guillaume A., Goodwin, Peter M., Phipps, Mary E., Cutler, Patrick J., Lidke, Diane S., Wilson, Bridget S. en Werner, James H.: *Time Resolved 3D Molecular Tracking in Live Cells*. *Nano letters*, 10(11):4732–4737, 2010, ISSN 1530-6984. <http://doi.org/10.1021/nl103247v>.

- [30] Kis-Petikova, Katarina en Gratton, Enrico: *Distance Measurement by Circular Scanning of the Excitation Beam in the Two-Photon Microscope*. *Microscopy Research and Technique*, 63(1):34–49, 2004, ISSN 1059-910X. <http://doi.org/10.1002/jemt.10417>.
- [31] Welsher, Kevin en Yang, Haw: *Imaging the Behavior of Molecules in Biological Systems: Breaking the 3D Speed Barrier with 3D Multi-Resolution Microscopy*. *Faraday Discussions*, 184(0):359–379, 2015, ISSN 1364-5498. <http://doi.org/10.1039/C5FD00090D>.
- [32] Kukura, Philipp, Ewers, Helge, Müller, Christian, Renn, Alois, Helenius, Ari en Sandoghdar, Vahid: *High-Speed Nanoscopic Tracking of the Position and Orientation of a Single Virus*. *Nature Methods*, 6(12):923–927, 2009, ISSN 1548-7105. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1395>.
- [33] Perillo, Evan P., Liu, Yen Liang, Huynh, Khang, Liu, Cong, Chou, Chao Kai, Hung, Mien Chie, Yeh, Hsin Chih en Dunn, Andrew K.: *Deep and High-Resolution Three-Dimensional Tracking of Single Particles Using Non-linear and Multiplexed Illumination*. *Nature Communications*, 6:7874, 2015, ISSN 2041-1723. <http://doi.org/10.1038/ncomms8874>.
- [34] Balzarotti, Francisco, Eilers, Yvan, Gwosch, Klaus C., Gynnå, Arvid H., Westphal, Volker, Stefani, Fernando D., Elf, Johan en Hell, Stefan W.: *Nanometer Resolution Imaging and Tracking of Fluorescent Molecules with Minimal Photon Fluxes*. *Science*, 355(6325):606–612, 2017, ISSN 0036-8075, 1095-9203. <http://doi.org/10.1126/science.aak9913>.
- [35] Silvey, S. D.: *Statistical Inference*. Chapman and Hall/CRC, London, 1975, ISBN 978-0-412-13820-1.

- [36] Simon, Dan: *Optimal State Estimation: Kalman, H_∞ , and Nonlinear Approaches*. John Wiley & Sons, Ltd, 1e uitgawe, 2006. <http://doi.org/10.1002/0470045345>.
- [37] Brogan, William L: *Modern Control Theory*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1991, ISBN 978-0-13-590415-2 978-0-13-589763-8.
- [38] Hou, Shangguo, Johnson, Courtney en Welsher, Kevin: *Real-Time 3D Single Particle Tracking: Towards Active Feedback Single Molecule Spectroscopy in Live Cells*. *Molecules*, 24(15):2826, 2019. <http://doi.org/10.3390/molecules24152826>.
- [39] Wang, Quan en Moerner, W. E.: *An Adaptive Anti-Brownian Electrokinetic Trap with Real-Time Information on Single-Molecule Diffusivity and Mobility*. *ACS Nano*, 5(7):5792–5799, 2011, ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/nn2014968>.
- [40] Berglund, A.J. en Mabuchi, H.: *Feedback Controller Design for Tracking a Single Fluorescent Molecule*. *Applied Physics B*, 78(5):653–659, 2004, ISSN 1432-0649. <https://doi.org/10.1007/s00340-004-1426-5>.
- [41] Shen, Zhaolong en Andersson, Sean B.: *LQG-Based Tracking of Multiple Fluorescent Particles in Two-Dimensions in a Confocal Microscope*. 2009 American Control Conference, bladsye 1682–1687, 2009. <http://doi.org/10.1109/ACC.2009.5160593>.
- [42] Wang, Q. en Moerner, W. E.: *Optimal Strategy for Trapping Single Fluorescent Molecules in Solution Using the ABEL Trap*. *Applied Physics. B, Lasers and Optics*, 99(1-2):23–30, 2010, ISSN 0946-2171. <http://doi.org/10.1007/s00340-009-3843-y>.

- [43] Fields, Alexander P. en Cohen, Adam E.: *Electrokinetic Trapping at the One Nanometer Limit*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(22):8937–8942, 2011, ISSN 0027-8424, 1091-6490. <http://doi.org/10.1073/pnas.1103554108>.
- [44] Hou, Shangguo, Lang, Xiaoqi en Welsher, Kevin: *Robust Real-Time 3D Single-Particle Tracking Using a Dynamically Moving Laser Spot*. Optics Letters, 42(12):2390, 2017, ISSN 0146-9592, 1539-4794. <http://doi.org/10.1364/OL.42.002390>.
- [45] Lindfors, K., Kalkbrenner, T., Stoller, P. en Sandoghdar, V.: *Detection and Spectroscopy of Gold Nanoparticles Using Supercontinuum White Light Confocal Microscopy*. Physical Review Letters, 93(3):037401, 2004. <http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.037401>.
- [46] Enderlein, J.: *Tracking of Fluorescent Molecules Diffusing within Membranes*. Applied Physics B, 71(5):773–777, 2000, ISSN 0946-2171, 1432-0649. <http://doi.org/10.1007/s003400000409>.
- [47] Berglund, A.J. en Mabuchi, H.: *Performance Bounds on Single-Particle Tracking by Fluorescence Modulation*. Applied Physics B, 83(1):127–133, 2006, ISSN 1432-0649. <https://doi.org/10.1007/s00340-005-2111-z>.
- [48] Eilers, Yvan, Ta, Haisen, Gwosch, Klaus C., Balzarotti, Francisco en Hell, Stefan W.: *MINFLUX Monitors Rapid Molecular Jumps with Superior Spatiotemporal Resolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(24):6117–6122, 2018, ISSN 0027-8424, 1091-6490. <http://doi.org/10.1073/pnas.1801672115>.
- [49] Gemeinhardt, André, McDonald, Matthew P., König, Katharina, Aigner, Michael, Mackensen, Andreas en Sandoghdar, Vahid: *Label-Free Imaging of*

- Single Proteins Secreted from Living Cells via iSCAT Microscopy*. Journal of Visualized Experiments, (141):58486, 2018, ISSN 1940-087X. <http://doi.org/10.3791/58486>.
- [50] Jacobsen, Volker, Stoller, Patrick, Brunner, Christian, Vogel, Viola en Sandoghdar, Vahid: *Interferometric Optical Detection and Tracking of Very Small Gold Nanoparticles at a Water-Glass Interface*. Optics Express, 14(1):405–414, 2006, ISSN 1094-4087. <http://doi.org/10.1364/OPEX.14.000405>.
- [51] Squires, Allison H., Lavania, Abhijit A., Dahlberg, Peter D. en Moerner, W. E.: *Interferometric Scattering Enables Fluorescence-Free Electrokinetic Trapping of Single Nanoparticles in Free Solution*. Nano Letters, 19(6):4112–4117, 2019, ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01514>.
- [52] Pandit, Anjali, Shirzad-Wasei, Nazhat, Wlodarczyk, Lucyna M., van Roon, Henny, Boekema, Egbert J., Dekker, Jan P. en de Grip, Willem J.: *Assembly of the Major Light-Harvesting Complex II in Lipid Nanodiscs*. Biophysical Journal, 101(10):2507–2515, 2011, ISSN 0006-3495. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.055>.
- [53] Briggs, John A.G., Wilk, Thomas, Welker, Reinhold, Kräusslich, Hans Georg en Fuller, Stephen D.: *Structural Organization of Authentic, Mature HIV-1 Virions and Cores*. The EMBO Journal, 22(7):1707–1715, 2003, ISSN 0261-4189. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg143>.
- [54] Pang, Yuanjie, Song, Hanna en Cheng, Wei: *Using Optical Trap to Measure the Refractive Index of a Single Animal Virus in Culture Fluid with High Precision*. Biomedical Optics Express, 7(5):1672–1689, 2016, ISSN 2156-7085. <http://doi.org/10.1364/BOE.7.001672>.

- [55] Wu, Yang, Lopez, Gabriel P., Sklar, Larry A. en Buranda, Tione: *Spectroscopic Characterization of Streptavidin Functionalized Quantum Dots*. Analytical Biochemistry, 364(2):193–203, 2007, ISSN 0003-2697. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2007.02.007>.
- [56] Grabowski, Jozef en Gantt, Elisabeth: *PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF PHYCOBILIPROTEINS FROM PHYCOBILISOMES: FLUORESCENCE LIFETIMES, QUANTUM YIELDS, AND POLARIZATION SPECTRA*. Photochemistry and Photobiology, 28(1):39–45, 1978, ISSN 0031-8655, 1751-1097. <http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1978.tb06927.x>.
- [57] Glazer, Alexander N.: *Phycobilisome a Macromolecular Complex Optimized for Light Energy Transfer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics, 768(1):29–51, 1984, ISSN 03044173. [http://doi.org/10.1016/0304-4173\(84\)90006-5](http://doi.org/10.1016/0304-4173(84)90006-5).
- [58] Lundell, Daniel J. en Glazer, Alexander N.: *Molecular Architecture of a Light-Harvesting Antenna. Structure of the 18 S Core-Rod Subassembly of the Synechococcus 6301 Phycobilisome*. Journal of Biological Chemistry, 258(2):894–901, 1983, ISSN 0021-9258. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818331351>.
- [59] Lundell, D. J. en Glazer, A. N.: *Molecular Architecture of a Light-Harvesting Antenna. Core Substructure in Synechococcus 6301 Phycobilisomes: Two New Allophycocyanin and Allophycocyanin B Complexes*. Journal of Biological Chemistry, 258(2):902–908, 1983, ISSN 0021-9258, 1083-351X. <http://www.jbc.org/content/258/2/902>.
- [60] Yu, Myeong Hee, Glazer, Alexander N. en Williams, Robley C.: *Cyanobacterial Phycobilisomes. Phycocyanin Assembly in the Rod Substructures of Anabaena*

- Variabilis Phycobilisomes*. Journal of Biological Chemistry, 256(24):13130–13136, 1981, ISSN 0021-9258. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818430177>.
- [61] Wei, Xuepeng, Su, Xiaodong, Cao, Peng, Liu, Xiuying, Chang, Wenrui, Li, Mei, Zhang, Xinzheng en Liu, Zhenfeng: *Structure of Spinach Photosystem II–LHCII Supercomplex at 3.2 Å Resolution*. Nature, 534(7605):69–74, 2016, ISSN 1476-4687. <http://doi.org/10.1038/nature18020>.
- [62] Gruszecki, Wieslaw I, Grudzinski, Wojciech, Banaszek-Glos, Agnieszka, Matula, Magdalena, Kernen, Peter, Krupa, Zbigniew en Siewlewiesiuk, Jan: *Xanthophyll Pigments in Light-Harvesting Complex II in Monomolecular Layers: Localisation, Energy Transfer and Orientation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1412(2):173–183, 1999, ISSN 0005-2728. [http://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00055-9](http://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00055-9).
- [63] Gruber, J. Michael, Scheidelaar, Stefan, van Roon, Henny, Dekker, Jan P., Killian, J. Antoinette en van Grondelle, Rienk: *Photophysics in Single Light-Harvesting Complexes II: From Micelle to Native Nanodisks*. In Enderlein, Jörg, Gregor, Ingo, Gryczynski, Zygmunt K., Erdmann, Rainer en Koberling, Felix (redakteurs): *SPIE BiOS*, bladsy 97140A, San Francisco, California, United States, 2016. <http://doi.org/10.1117/12.2211588>.
- [64] Duffy, Christopher D. P., Ruban, Alexander V. en Barford, William: *Theoretical Investigation of the Role of Strongly Coupled Chlorophyll Dimers in Photoprotection of LHCII*. The Journal of Physical Chemistry B, 112(39):12508–12515, 2008, ISSN 1520-6106. <https://doi.org/10.1021/jp804571k>.
- [65] Ormö, Mats, Cubitt, Andrew B., Kallio, Karen, Gross, Larry A., Tsien, Roger Y. en Remington, S. James: *Crystal Structure of the Aequorea*

- Victoria Green Fluorescent Protein*. *Science*, 273(5280):1392–1395, 1996, ISSN 0036-8075, 1095-9203. <http://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392>.
- [66] Karl, Markus, Meek, Andrew, Murawski, Caroline, Tropf, Laura, Keum, Changmin, Schubert, Marcel, Samuel, Ifor D. W., Turnbull, Graham A. en Gather, Malte C.: *Distributed Feedback Lasers Based on Green Fluorescent Protein and Conformal High Refractive Index Oxide Layers*. *Laser & Photonics Reviews*, 14(6):2000101, 2020, ISSN 1863-8899. <http://doi.org/10.1002/lpor.202000101>.
- [67] Patterson, G H, Knobel, S M, Sharif, W D, Kain, S R en Piston, D W: *Use of the Green Fluorescent Protein and Its Mutants in Quantitative Fluorescence Microscopy*. *Biophysical Journal*, 73(5):2782–2790, November 1997, ISSN 0006-3495. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1181180/>, besoek op 2020-07-13.
- [68] Swaminathan, R, Hoang, C P en Verkman, A S: *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, ISSN 0006-3495. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78835-0](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78835-0).
- [69] Consoli, Elena, Croce, Roberta, Dunlap, David D en Finzi, Laura: *Diffusion of Light-Harvesting Complex II in the Thylakoid Membranes*. *EMBO Reports*, 6(8):782–786, 2005, ISSN 1469-221X. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400464>.
- [70] Sarcina, Mary, Tobin, Mark J. en Mullineaux, Conrad W.: *Diffusion of Phycobilisomes on the Thylakoid Membranes of the Cyanobacterium Sy-*

- nechococcus 7942: *EFFECTS OF PHYCOBILISOME SIZE, TEMPERATURE, AND MEMBRANE LIPID COMPOSITION*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50):46830–46834, 2001, ISSN 0021-9258, 1083-351X. <http://doi.org/10.1074/jbc.M107111200>.
- [71] Elson, Elliot L.: *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Past, Present, Future*. *Biophysical Journal*, 101(12):2855–2870, 2011, ISSN 0006-3495. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.012>.
- [72] Laurence, Ted A., Fore, Samantha en Huser, Thomas: *Fast, Flexible Algorithm for Calculating Photon Correlations*. *Optics Letters*, 31(6):829–831, 2006, ISSN 1539-4794. <http://doi.org/10.1364/OL.31.000829>.
- [73] Digman, Michelle A., Brown, Claire M., Sengupta, Parijat, Wiseman, Paul W., Horwitz, Alan R. en Gratton, Enrico: *Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope*. *Biophysical Journal*, 89(2):1317–1327, 2005, ISSN 0006-3495. <http://doi.org/10.1529/biophysj.105.062836>.
- [74] Berglund, Andrew J. en Mabuchi, Hideo: *Tracking-FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy of Individual Particles*. *Optics Express*, 13(20):8069–8082, 2005, ISSN 1094-4087. <http://doi.org/10.1364/OPEX.13.008069>.
- [75] Xin, Ling, Lu, Mo, Both, Steffen, Pfeiffer, Markus, Urban, Maximilian J., Zhou, Chao, Yan, Hao, Weiss, Thomas, Liu, Na en Lindfors, Klas: *Watching a Single Fluorophore Molecule Walk into a Plasmonic Hotspot*. *ACS Photonics*, 6(4):985–993, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.8b01737>.
- [76] Kyeyune, Farooq, Botha, Joshua L., van Heerden, Bertus, Malý, Pavel, Grondelle, Rienk van, Diale, Mmantsae en Krüger, Tjaart P. J.: *Strong Plasmonic Fluorescence Enhancement of Individual Plant Light-Harvesting*

Complexes. *Nanoscale*, 11(32):15139–15146, 2019, ISSN 2040-3372. <http://doi.org/10.1364/OPEX.13.008069>.