



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**MULTIPARAMETRICKÁ FLUORESCENČNÍ
SPEKTROSKOPIE**

MULTIPARAMETRIC FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kata Lacko

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1111/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kata Lacko**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Multiparametrická fluorescenční spektroskopie

Zadání diplomové práce zadání:

1. Seznámit se s vybavením Laboratoře fluorescenční spektroskopie, zejména s časově-rozlišeným spektrofluorimetrem a fluorescenčním mikroskopem.
2. Na základě rešerše navrhnout vhodnou fluorescenční sondu reagující na alespoň dva parametry mikrookolí.
3. Pomocí dostupných přístrojů zjistit v co nejmenším počtu kroků co nejvíce dostupných parametrů fluorescence, dle charakterizace přístroje, pro vzorky s různým mikrookolím.
4. Vyhodnotit možnosti multiparametrického měření s daným laboratorním vybavením.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kata Lacko
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá možnosťami multiparametrickej fluorescenčnej spektroskopie, keďže hlavným cieľom tohto experimentu bolo vyhodnotiť možnosti multiparametrického merania v Laboratóriu fluorescenčnej spektroskopie. Na základe literárnej rešerše bola navrhnutá vhodná fluorescenčná sonda pre tento experiment, SNARF-4F AM, ktorá vykazuje vysokú citlivosť na zmeny pH prostredia. Fluorofor bol rozpustený v roztokoch s rozdielnym pH a tento systém bol skúmaný pomocou časovo rozlíšeného spektrofluorimetra. Metódou TRES (časovo rozlíšené emisné spektrá) boli preskúmané emisné spektrá fluorescenčnej sondy a nájdené emisné maximá. Pomocou parametra poklesu intenzity fluorescencie pri daných vlnových dĺžkach bola vytvorená dekonvolúcia emisného spektra, ktorá poskytovala informácie o dobe života a relatívnom zastúpení jednotlivých stavov fluorescenčnej sondy v roztoku. Neskôr, sonda bola rozpustená v roztokoch s odlišnou hustotou a pH – tento systém slúžil na anizotropické meranie, počas ktorého boli získané jednotlivé korelačno-rotáčne časy fluoroforu. Získané výsledky potom slúžili ako podklad pre multiparametrickú analýzu, ktorá bola vykonaná pomocou fluorescenčného korelačného mikroskopu a spektrografu. Táto kombinácia umožňuje namerať potrebné fluorescenčné parametre v jednom kroku. Bol vytvorený štandardný operačný postup na ovládanie spektrografu. Na základe získaných informácií bola posúdená vhodnosť, presnosť a citlivosť multiparametrickej analýzy.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the possibilities of multiparametric fluorescence spectroscopy, since the main objective of this experiment was to evaluate the possibilities of multiparametric measurements in the fluorescence spectroscopy laboratory. A suitable fluorescence probe was proposed for this type of experiment that shows high sensitivity for pH changes in the environment, SNARF-4F AM, based on a literature research. The fluorophore was dissolved in solutions of different pH and this system was examined using a time-resolved spectrofluorimeter. The method named TRES (time-resolved emission spectra) was used to obtain the emission spectra of the probe and to find the emission maximum. Fluorescence intensity decay measurements as a function of wavelengths allowed to create deconvolution of the emission spectra, which provided information about the fluorescent lifetime and the relative representation of the states of probes in the solution. Later, the probe was dissolved in solutions of different density and pH - this system served for anisotropic measurements, during which the individual correlation-rotational times of the fluorophore were obtained. The obtained results were then used as the basis for multiparametric analysis, which was performed by using a fluorescence correlation microscope and a spectrograph. This combination allows to measure the necessary fluorescence parameters in one step. A standard operating procedure was created for the spectrograph's control. On the basis of the obtained information the suitability, accuracy and sensitivity of the multiparametric analysis were qualified.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Multiparametrická analýza, časovo rozlišená spektroskopie, fluorescenční mikroskopie

KEY WORDS

Multiparametric analysis, time-resolved spectroscopy, fluorescence microscopy

LACKO, K. *Multiparametrická fluorescenční spektroskopie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 84 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť použitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študentky

POĎAKOVANIE

Vyjadrujem poďakovanie vedúcemu diplomovej práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D., Ing. Petre Holínkovej a Ing. Zuzane Adamcovej za cenné rady, usmernenie a profesionálnu úroveň spolupráce pri vypracovaní mojej diplomovej práce.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1. Luminiscencia	10
2.1.1. Fotoluminiscencia	10
2.1.2. Fluorescenčné a fosforescenčné spektrá	11
2.1.3. Nežiarivé procesy	12
2.1.4. Fluorescenčná relaxácia	12
2.1.5. Pravidlá fluorescencie	13
2.1.6. Excitačné a emisné spektrá	14
2.1.7. Fluorescenčná doba života	15
2.2. Fluorescenčná sonda SNARF-4F	17
2.2.1. Vplyv hodnoty pH na fluorescenciu.....	18
2.3. Fluorescenčná anizotropia.....	19
2.3.1. Úvod, základné pojmy a charakteristiky	19
2.3.2. Definícia a základne vzťahy	19
2.3.3. Časovo rozlíšená anizotropia	21
2.3.4. Fundamentálna a limitná anizotropia	21
2.3.5. Meranie fluorescenčnej anizotropie	22
2.4. Fluorescenčná spektroskopia.....	23
2.4.1. Stacionárna fluorescenčná spektroskopia.....	24
2.4.2. Časovo rozlíšená fluorescenčná spektrometria	25
2.4.3. Časovo rozlíšené emisné spektrá.....	29
2.5. Fluorescenčná mikroskopia.....	32
2.5.1. Časovo rozlíšená fluorescenčná mikroskopia	33
2.5.2. Fluorescenčná korelačná mikroskopia	33
2.5.3. Časovo rozlíšený fluorescenčný korelačný mikroskop.....	33
2.5.4. Spektrograf – CCD kamera	35
3. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	38
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	41
4.1. Použité chemikálie	41
4.2. Prístroje a vybavenie	41
4.2.1. METTLER TOLEDO S20 SevenEasy – pH meter.....	41
4.2.2. Aminco Bowman Series 2 – luminiscenčný spektrometer.....	41
4.2.3. Fluorocube – spektrofluorimeter na princípu TCSPC.....	42
4.2.4. MicroTime 200 – konfokálny fluorescenčný mikroskop.....	42
4.2.5. Andor CCD kamera - spektrograf	42
4.2.6. Použité softvéry	43

4.3. Príprava zásobných roztokov a príprava vzoriek	43
4.3.1. Nastavenie prístroja podľa požiadaviek	45
5. VÝSLEDKY A DISKUSIA	47
5.1. Stanovenie vhodného času merania fluorescenčných charakteristík	47
5.2. Prvotné overovanie koncentrácií SNARF-4F AM vo fosfátovom pufri	47
5.3. Emisné spektrum fluorescenčnej sondy pomocou prístroja Fluorocube.....	48
5.3.1. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 6.....	50
5.3.2. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 7.....	52
5.3.3. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 7,4.....	53
5.3.4. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 8.....	55
5.3.5. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 9.....	56
5.4. Stanovenie dôb života pomocou fluorescenčného mikroskopu	59
5.5. Emisné spektrá pomocou kamery Newton.....	61
5.6. Závislosť rotačnej korelačnej doby od hustoty prostredí – časovo rozlíšená anizotropia.	62
5.7. Závislosť rotačnej korelačnej doby od hustoty prostredí – ustálená anizotropia.....	65
6. ZÁVER.....	68
7. POUŽITÁ LITERATÚRA.....	70
8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	77
9. PRÍLOHY	79
9.1. Štandardný operačný postup kamery Newton od firmy Andor Technologies	79
9.2. Ďalšie prílohy	83

1. ÚVOD

Fluorescenčná spektroskopia je rýchla a citlivá metóda, ktorá sa používa na charakterizáciu molekulárnych prostredí a udalostí. Existuje mnoho diagnostických techník a metód na diagnostiku medicínsky dôležitých mikroorganizmov, ako sú baktérie, vírusy, huby alebo rôzne parazity. Avšak, takmer všetky používané metódy vykazujú určité obmedzenia, ako napríklad časová náročnosť, falošné pozitívne alebo falošne negatívne výsledky. V súčasnosti sa objavuje trend využívania fluorescenčnej spektroskopie ako diagnostického a výskumného nástroja v mnohých oblastiach medicínskych vied.

V poslednej dobe veľké množstvo vedeckých štúdií publikovalo úspešnú aplikáciu fluorescenčnej spektroskopie ako diagnostického nástroja pre rôzne baktérie pomocou spektrálnych odtlačkov prsta. Boli napríklad preštudované fluorescenčné profily baktérií zodpovedných za otitis media (čiže zápal stredného ucha) u detí. Táto diagnostická metóda je neinvazívna, rýchla a tým pádom je veľmi sľubným spôsobom, ako určiť konkrétny typ bakteriálnych infekcií [59].

Plesňové infekcie sú tiež časté pri mnohých ochoreniach, ako je napríklad diabetes, určité druhy rakovinových ochorení, endokrinopatie alebo pacienti s predĺženou antibiotickou kúrou či pacienti, ktorí berú imunosupresíva. Diagnóza fungálnej infekcie sa uskutočňuje buď morfológickým vyšetrením húb alebo biochemickými a molekulárno-biologickými technikami. Tieto techniky ale nie vždy vedia rozlíšiť rôzne typy kvasiniek. Spektroskopické techniky využívajú metódu spektrálneho odtlačku prsta, ktorá vykazuje nadmerne presné a spoľahlivé výsledky, tým pádom uľahčuje a urýchľuje diagnostický proces [60].

Fluorescenčné zobrazovacie (*imaging*) techniky sú napríklad používané na jednotlivé bakteriálne bunky za účelom stanovenia aktivity *in vivo* kinázy a transkripcie. Študovaným predmetom môže byť napríklad aj mobilita proteínov alebo lokalizácia bielkovín, bunková adhézia, interakcia typu proteín-proteín [61]. Fluorescenčná mikroskopia umožňuje detegovať napríklad aj parazitické prvky malárií taktiež našla uplatnenie aj v imunochemických oblastiach, umožňuje študovať a charakterizovať protilátky a tým pádom aj rôzne imunologické procesy prebiehajúce v ľudskom organizme [62][63].

Uvedené príklady dokazujú, že fluorescenčné spektroskopické techniky sú veľmi atraktívne, poskytujú spoľahlivé a rýchle údaje a tým pádom sa často používajú okrem iného aj v medicínskych oblastiach. Táto diplomová práca sa zaoberá multiparametrickou fluorescenčnou analýzou. Hlavným cieľom multiparametrickej analýzy je získať čo najviac informácií o skúmanej látke v najmenšom počte krokov a týmto spôsobom zabezpečiť rýchlu analýzu. Emisné spektrá danej sondy v danom prostredí, doba života a anizotropia sú dôležitými fluorescenčnými parametrami, ktoré sú veľmi často predmetom štúdia. Fluorescenčný mikroskop spojený so spektrografom umožňuje tieto fluorescenčné charakteristiky preštudovať v jednom kroku. Avšak, je nevyhnutné získať údaje porovnať aj s inou metodikou a na základe získaných údajov posúdiť presnosť a spoľahlivosť tejto techniky, na tento účel bol vybraný časovo rozlíšený spektrofluorimeter.

Multiparametrická analýza ma veľký potenciál v budúcnosti, pretože uľahčuje a urýchľuje fluorescenčné meranie. Umožňuje získať určitý počet fluorescenčných charakteristík bez manipulácií so skúmaným systémom, čo je veľká výhoda hlavne pri biologických meraniach.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

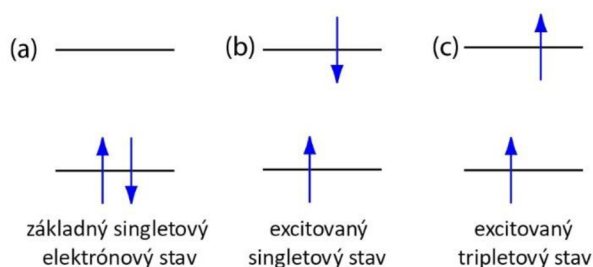
2.1. Luminiscencia

Slovo luminiscencia signalizuje žiarenie emitované materiálom, ktorý bol primárne excitovaný. Emitované žiarenie pochádza z prechodu systému z excitovaného stavu do stavu základného. Luminiscenčné vlastnosti daného materiálu sa charakterizujú pomocou spektroskopických techník, keďže táto metóda umožňuje analyzovať intenzitu a frekvenciu emitovaného, absorbovaného alebo odrazeného žiarenia. Cieľom týchto techník je získať čo najviac informácií o interakcii medzi žiarením a materiálom [1][2].

Luminiscencia sa rozdeľuje podľa charakteru excitácie. Keď luminiscencia bola vyvolaná pôsobením chemickej reakcie, hovoríme o chemoluminiscencii. Termoluminiscencia nastane v prípade, keď daný materiál bol excitovaný termicky, čiže prostredníctvom tepla. Ionizujúce žiarenie má za následok rádioluminiscenciu. Ďalším príkladom je bioluminiscencia, sonoluminiscencia, mechanoluminiscencia, atď. Pre túto prácu je dôležité podrobne popísať luminiscenčný jav nazývaný fotoluminiscencia, kde je excitácia vyvolaná svetelným žiarením, resp. opticky, absorpciou fotónov. Látky, ktoré sú schopné vykazovať fotoluminiscenciu, sú luminofory. Ďalej, luminiscencia sa delí podľa doby dosvitu na tri podkategórie: fluorescencia, fosforescencia a oneskorená fluorescencia [1][3].

2.1.1. Fotoluminiscencia

Prípad, keď dvojica elektrónov sa nachádza v základnom stave a majú navzájom opačný spin, sa nazýva singletový stav. V tomto stave má molekula najnižšiu energiu, nachádza sa v termodynamickom rovnováhe. Keď materiál alebo analyt absorbuje ultrafialové (UV) alebo viditeľné žiarenie (VIS), resp. fotóny, jeden z jeho valenčných elektrónov sa dostane zo základného stavu do excitovaného, pričom zachová svoj spin. Excitovaný elektrón sa po určitom čase deexcituje. Touto deexcitáciou nasleduje návrat do základnej hladiny pomocou rôznych deaktiváčnych procesov. Tieto procesy sú rozdelené do dvoch kategórií: žiarivé a nežiarivé prechody. Pri žiarivých prechodoch vždy dochádza k emisii svetelného kvanta, čiže fotónu. Elektrón sa najprv vráti na najnižšiu vibračne-rotáčnú hladinu, potom nastáva emisia sekundárneho žiarenia. Emisia fotónu zo singletového excitačného stavu na základný singletový stav - alebo všeobecne, medzi akýmkoľvek dvoma energetickými hladinami s rovnakým spinom sa nazýva **fluorescencia**. Pravdepodobnosť fluorescencie je vysoká, priemerná životnosť elektrónu v excitovanom stave je veľmi krátka (10^{-8} až 10^{-5} s), fluorescencia sa preto rozkladá rýchlo – akonáhle je zdroj excitácie odstránený [2][4][5].



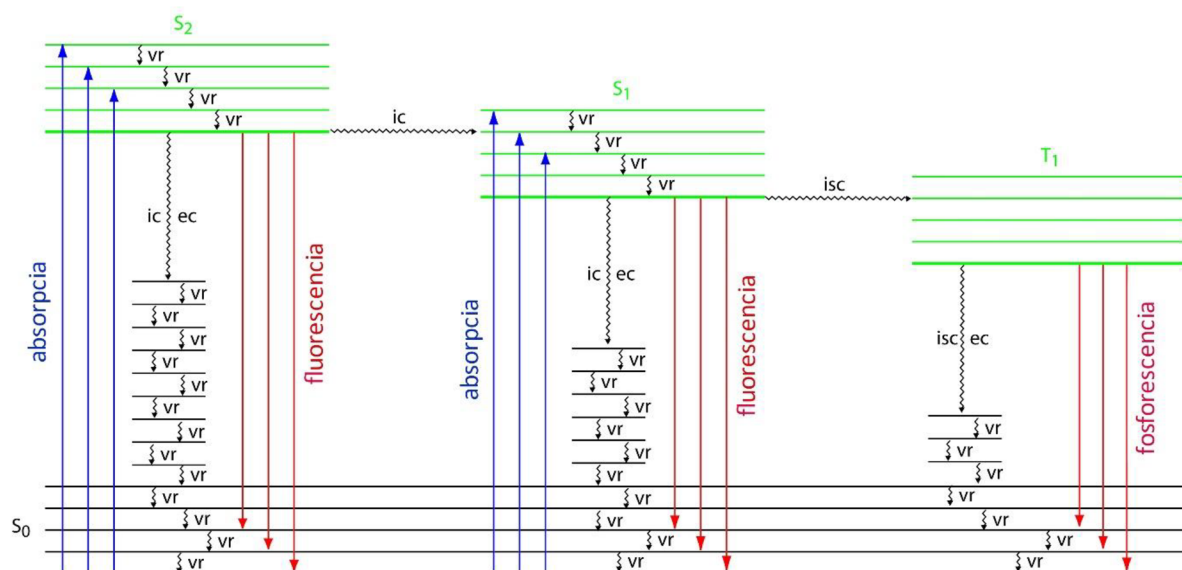
Obrázok 1: Elektrónová konfigurácia pre (a) základný singletový stav, (b) excitovaný singletový stav, (c) excitovaný tripletový stav [vlastná tvorba]

Avšak v niektorých prípadoch je elektrón zo singletového, základného stavu transformovaný do tripletového excitovaného stavu, v ktorom už jeho spin nie je párovaný so základným stavom. Emisia medzi tripletovým excitovaným stavom a singletovým základným stavom, alebo medzi dvoma energetickými hladinami, ktoré majú odlišný spinový stav, sa nazýva **fosforescencia**. Vzhľadom na to, že priemerná životnosť fosforescencie sa pohybuje v rozmedzí od 10^{-4} do 10^4 s, daný materiál je schopný aj po odstránení excitačného zdroja určitý čas vykazovať fosforescenciu. Fosforescencia je pomalšia ako fluorescencia, nakoľko emisia z tripletového stavu je kvantovo zakázaná.

Oneskorená fluorescencia nastáva vtedy, keď elektrón, ktorý bol excitovaný, prejde zo singletového stavu do tripletového a potom sa vráti späť reverzným medzi-systémovým prechodom do pôvodného singletového stavu. Oneskorená fluorescencia vykazuje rovnaké emisné spektrum ako okamžitá fluorescencia, pretože čas dohasínania oneskorenej a okamžitej fluorescencie je takmer identický [2][4].

2.1.2. Fluorescenčné a fosforescenčné spektrá

Pre pochopenie fluorescencie a fosforescencie je potrebné zvážiť, čo sa stane s molekulou po absorpcii fotónov, čiže po excitácii. Predpokladá sa, že molekula pred excitáciou sa nachádza na najnižšej vibračnej energetickej hladine z jej základného elektrického stavu, čo je singletový stav v našom prípade označený ako S_0 . Absorpcia fotónu excituje molekulu – čiže zvýši energiu molekuly, ktorá sa takto dostane na niektorú vyššiu vibračne energetickú hladinu z viacerých, a to buď na prvý excitovaný elektrický stav S_1 , alebo na sekundárny excitovaný stav, označený ako S_2 . Stavy S_1 a S_2 sú striktne singletové stavy, čo znamená, že v tomto stave celkový spin má hodnotu nula a multiplicita stavu je jedna. Ako už bolo uvedené, relaxácia do základného stavu nastane vďaka viacerým mechanizmom, zahrnujúcim emisiu fotónov a neemitujúce procesy. Platí, že najpravdepodobnejšia cesta relaxácie (deaktivácie) je tá s najkratšou dobou života excitovaného stavu [3][5][8].



Obrázok 2: Diagram znázorňuje elektrónové stavy molekuly a prechody medzi elektrónovými stavmi: vr - vibračná relaxácia, ic - vnútorná konverzia, ec - externá konverzia, isc - medzi-systémový prechod. Najnižšia vibračná hladina každého elektrónového stavu (S_0) je

indikovaná hrubou čiarou. S_2 , S_1 sú excitované, singletové stavy a T_1 je excitovaný tripletový stav [vlastná tvorba].

2.1.3. Nežiarivé procesy

Proces, pri ktorom sa molekula relaxuje bez emitovania fotónov, sa nazýva neradiačný alebo nežiarivý prechod. Príkladom neradiačnej deaktivácie je **vibračná relaxácia**, pri ktorej molekula v excitovanom vibračnom stave stratí určité množstvo energií tým, že sa presunie na nižšiu vibračnú hladinu príslušného elektrického stavu. Vibračná relaxácia nastane z dôvodu, že sa vytvorí kontakt medzi excitovanou molekulou a molekulami, ktoré sú v okolí. Excitovaná molekula okamžite po excitácii pridá istú časť svojej energie okolitým molekulám pomocou vibračných a rotačných procesov. Vibračná relaxácia je rýchly proces s priemernou dobou života $<10^{-12}$ s. Vzhľadom na to, že tento mechanizmus je veľmi účinný, molekula sa rýchlo vráti na najnižšiu vibračnú hladinu daného excitovaného stavu.

Ďalšia forma neradiačných deaktivčných procesov je **vnútorná konverzia**, v ktorej molekula, ktorá je na základnej vibračnej hladine daného excitovaného stavu, prechádza priamo na vyššiu vibračnú hladinu nižšieho energetického stavu, ktorý má rovnaký spin. Kombináciou vnútornej konverzie a vibračnej relaxácie sa molekula, ktorá je v excitovanom elektrickom stave, môže vrátiť na základnú hladinu bez emisie fotónu. Veľmi podobný proces neradiačnej deaktivácie je tzv. externá konverzia, v ktorej sa prebytok energie preniesie do rozpúšťadla alebo na iný komponent matice vzorky.

Posledný typ neradiačných procesov je medzi-systémový prechod, v ktorom molekula na základnej vibračnej hladine excitovaného elektrického stavu prechádza na vyššiu energetickú hladinu nižšieho energetického stavu s odlišným spinom. Pri medzi-systémovom prechode sa celý systém posunie do tripletového stavu. Prechod medzi stavmi s odlišnou multiplicitou je spinovo zakázaný. Časť energie sa stratí pri prechode do energeticky nižšieho stavu než je singletový stav. Tento jav spôsobuje, že fosforescencia sa spravidla objavuje v dlhších vlnových dĺžkach než fluorescencia [4][6][8].

2.1.4. Fluorescenčná relaxácia

Fluorescencia nastane, keď molekula, ktorá je v excitovanom stave na najnižšej vibračnej energetickej hladine, sa vráti na nižšiu energetickú hladinu tým, že emituje fotóny. Vzhľadom na to, že molekula sa vráti na nižšiu energetickú hladinu tým najrýchlejším mechanizmom, fluorescencia je zaznamenaná len v prípade, keď je relaxácia efektívnejšia ako kombinácia neradiačných procesov, čiže vnútornej konverzie a vibračnej relaxácii [2][7].

Kvantitatívne vyjadrenie účinnosti fluorescencie je fluorescenčný kvantový výťažok Φ_f , čo je definovaný ako frakcia excitovaného stavu molekúl vracajúcich sa do základného stavu prostredníctvom fluorescencie. Hodnota fluorescenčného kvantového výťažku sa pohybuje v rozmedzí 1 až 0. Keď je hodnota kvantového výťažku 1, každá molekula v excitovanom stave podstúpi fluorescenciu. V prípade, keď je hodnota nulová, ani jedna molekula nevykazuje fluorescenciu [4].

Intenzita fluorescencie I_f je priamo úmerná množstvu radiácie absorbovaného vzorkou, vyznačený ako $P_0 - P_T$, a fluorescenčného kvantového výťažku:

$$I_f = k\Phi_f(P_0 - P_T) \quad (1)$$

kde k je konštanta, ktorá charakterizuje účinnosť zberu a detekciu fluorescenčnej emisie. Pomocou Lambert-Beerov zákona môžeme definovať $P_0 - P_T$:

$$\frac{P_T}{P_0} = 10^{-\epsilon b C} \quad (2)$$

kde C je koncentrácia daného fluorescenčného druhu, ϵ je molárny absorpčný koeficient pri danej vlnovej dĺžke a písmeno b označuje dĺžku dráhy. Kombináciou týchto rovníc dostaneme konečnú formu:

$$I_f = k \cdot \Phi_f P_0 (1 - 10^{-\epsilon b C}) \quad (3)$$

V prípade, keď $\epsilon b C < 0,01$ – čo je veľmi častý prípad, rovnica sa zjednoduší na

$$I_f = 2,303 \cdot k\Phi_f \epsilon b C \cdot P_0 = k' P_0 \quad (4)$$

kde k' je súbor konštánt. Tým pádom intenzita fluorescenčnej emisie sa zvyšuje so zvyšujúcou sa účinnosťou kvantového výťažku, koncentráciou, molárnym absorpčným koeficientom, dĺžkou dráhy a množstvom radiácie zdroja [2][9].

Platí, že väčšina nesubstituovaných, neheterocyklických aromatických zlúčenín vykazuje priaznivý fluorescenčný kvantový výťažok, aj keď substitúcia na aromatickom kruhu môže významne ovplyvniť kvantový výťažok. Napríklad prítomnosť skupín, ktoré priťahujú elektróny, ako je napríklad – NO₂, znižuje kvantový výťažok, prítomnosť elektrón donorov (napr.: -OH skupina) zase zvyšuje hodnotu kvantového výťažku. Fluorescencia sa taktiež zvyšuje v prítomnosti aromatického kruhového systému a v prítomnosti aromatických molekúl s rigidnou planárnou štruktúrou.

Fluorescenčný kvantový výťažok danej molekuly je tiež ovplyvnený vonkajšími premennými, ako je napríklad teplota alebo rozpúšťadlo. Všeobecne platí, že so zvýšenou teplotou sa zníži Φ_f , pretože častejšie zrážky medzi molekulou a rozpúšťadlom zvyšujú externú konverziu. Pokles viskozity rozpúšťadla znižuje hodnotu Φ_f z podobných dôvodov. Keď má daný analyt kyslé alebo bázické funkčné skupiny, zmena pH môže zmeniť štruktúru analytu a tým pádom aj jeho fluorescenčné vlastnosti [2][9].

Počas fluorescencie sa molekula v excitovanom stave môže vrátiť späť na akúkoľvek vibračnú energetickú hladinu v základnom stave. Fluorescencia sa preto vyskytuje v istom rozsahu vlnových dĺžok. Pretože pri fluorescenčnej emisii je zmena energie všeobecne menšia ako pre absorpciu, fluorescenčné spektrum danej molekule je posunuté k vyšším vlnovým dĺžkam ako je absorpčné spektrum [2][8][9].

2.1.5. Pravidlá fluorescencie

Fluorescencia sa riadi tromi pravidlami. Prvý zákon, **Kashovo pravidlo** charakterizuje elektronicky excitované molekuly. Pravidlo hovorí, že emisia fotónov nastane v znateľnom kvantu len z najnižšieho excitovaného stavu danej multiplicity. Kashovo pravidlo je podstatné pre pochopenie emisného spektra excitovanej molekuly. Molekula, ktorá je v základnom

elektrickom stave S_0 absorbuje fotón, v závislosti na vlnovej dĺžke fotónu sa excituje na niektorý vyšší elektrónový stav. Avšak podľa Kashovo pravidla, emisia fotónov – teda v našom prípade fluorescencia – nastane z najnižšej vibračnej hladiny excitovaného stavu S_1 . Pred emisiou fluorescenčného kvanta dochádza k relaxácii vibračnej energie a vnútornej konverzie, tým pádom platí, že emisná vlnová dĺžka je nezávislá od excitačnej vlnovej dĺžky. Výnimky z pravidla vznikajú napríklad v prípade, keď sú energetické rozdiely medzi excitovanými stavmi príliš veľké (príkladom je azulén) [2][10].

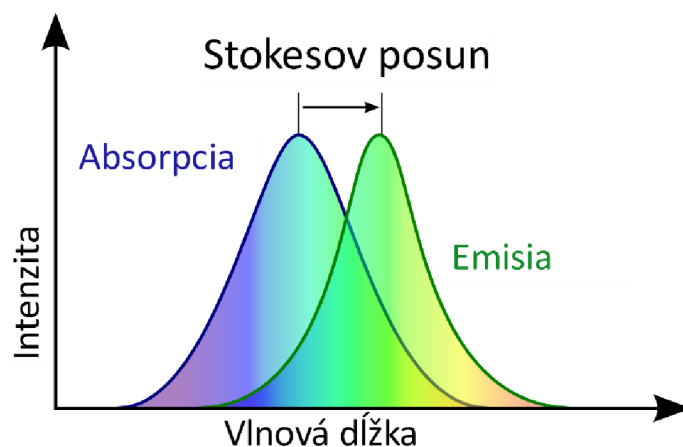
Druhý zákon, s ktorou sa riadi fluorescencia vychádza z Kashovho pravidla. **Vavilovo pravidlo** potvrdzuje, že kvantový výťažok a doba, ktorú molekula strávi v excitovanom stave pri zložitých molekul v roztoku nezávisí od vlnovej dĺžky budiaceho žiarenia. Z toho teda vyplýva, že emisné spektrum fluorescencie nie je závislé od excitačnej vlnovej dĺžky. Opäť existujú výnimky, napríklad páry benzénu [2] [11].

Keď molekula absorbuje fotón, získava energiu a dostane sa do excitovaného stavu. Jeden spôsob, ako molekula relaxuje späť do základného stavu, je emitovanie fotónov, čím stráca energiu (ďalší spôsob zníženia energie je prostredníctvom tepla). Prípade, keď emitovaný fotón má menej energie než absorbovaný fotón, vytvorí sa energetický rozdiel, ktorý sa nazýva Stokesov posun. Tento jav je výsledkom dvoch akcií: vibračná relaxácia alebo rozptýlenie a reorganizácia rozpúšťadla. Fluorofor je dipól obklopený molekulami vody. Keď sa tento fluorofor dostane do excitovaného stavu, jeho dipólový moment sa rýchlo zmení, ale molekuly vody nie sú schopné tak rýchlo sa adaptovať na túto zmenu. Najprv nastane vibračná relaxácia, až potom sa preorientujú molekuly vody (alebo molekuly daného prostredia). **Stokesov zákon** teda hovorí, že vlnová dĺžka emisie pri luminiscencii je väčšia alebo rovnaká ako vlnová dĺžka excitačného svetla, z čoho vyplýva, že emisné spektrum fluoroforov je oproti absorpčnému spektru posunuté k dlhším vlnovým dĺžkam, kde je nižšia energia [2][10][11].

2.1.6. Excitačné a emisné spektrá

Fotoluminiscenčné spektrá sa zaznamenávajú na základe merania intenzity emitovaného žiarenia ako funkcia excitačnej vlnovej dĺžky alebo emisnej vlnovej dĺžky. Excitačné spektrum sa získa monitorovaním emisie pri fixnej vlnovej dĺžke, zatiaľ čo emisná vlnová dĺžka sa mení. Excitačné spektrum poskytuje vhodný spôsob na výber najlepšej excitačnej vlnovej dĺžky pre kvantitatívnu alebo kvalitatívnu analýzu [2][13].

V emisnom spektre sa používa fixná vlnová dĺžka pre excitáciu vzorky a sledovaná je intenzita emitovaného žiarenia ako funkcia vlnovej dĺžky. Daná molekula má iba jedno excitačné spektrum ale dve emisné spektrá, fluorescenčné a fosforescenčné spektrum.



Obrázok 3: Zobrazenie Stokesovho posunu a zrkadlovej symetrie medzi excitačným a emisným spektrom [13].

Pre väčšinu fluoroforov absorpčné spektrum je zrkadlovým obrazom emisného spektra. Tento jav definuje **pravidlo zrkadlovej symetrie**, ktoré hovorí, že absorpcia a emisia z príslušných vibračných hladín majú rovnakú pravdepodobnosť. Nukleárnu konfiguráciu danej molekuly príliš nemení elektronický prechod, tým pádom vzdialenosť medzi vibračnou energetickou hladinou a excitačným stavom zostáva takmer rovnaká ako v základnom stave. Avšak existuje mnoho výnimiek zrkadloveho pravidla z dôvodu, že geometrické usporiadanie atómového jadra v excitovanom a v základnom stave je odlišné [2].

2.1.7. Fluorescenčná doba života

Keď molekula absorbuje fotón, ktorý má dostatočnú energiu, v tomto systéme dôjde k rôznym fotofyzikálnym reakciám, ako je napríklad vnútorná konverzia, vibračná relaxácia, fluorescencia, medzi-systémový prechod (zo singletového do tripletového stavu), alebo fosforescencia. Každý z týchto procesov nastane s určitou pravdepodobnosťou, ktorú charakterizuje konštanta k . Všeobecne platí, že priemerný čas na rozklad pre sadu molekúl z jedného stavu do druhého je recipročne úmerný rýchlosti rozkladu: $\tau = \frac{1}{k}$. Táto priemerná

doba sa nazýva stredná doba života, alebo jednoducho doba života. Táto doba života daného fotofyzikálneho procesu je čas potrebný pre populáciu elektricky excitovaných molekúl N redukovať sa o faktor e . Jednoduchšie povedané, ak je populácia fluoroforov v excitovanom stave, doba života označuje dobu, ktorú molekula potrebuje, aby sa znížila na $\frac{1}{e}$ alebo na

36,8 % pôvodnej populácie. Doba života fotofyzikálnych procesoch má výrazne kolísavú hodnotu, od femtosekúnd pre vnútornú konverziu do nanosekúnd pre fluorescencie a mikrosekúnd alebo sekúnd pre fosforescencie.

Fluorescenčná doba života je intrinická vlastnosť fluorofora, preto nezávisí od spôsobu merania. Doba života môže byť považovaná ako funkcia stavu, pretože tiež nezávisí od počiatkových podmienok ako je napríklad excitačná vlnová dĺžka, doba excitácie, jedno- alebo multifotónová excitácia a hodnotu doby života neovplyvní ani *photobleaching*. Okrem toho, doba života je nezávislá od fluorescenčnej intenzity a koncentrácie fluorescenčnej sondy. Vzhľadom na to, že tento proces je spojený s energeticky nestabilným stavom, doba života je

citlivá na rôzne vnútorné faktory, definované štruktúrou fluorofora a vonkajšími faktormi ako je teplota, polarita alebo prítomnosť fluorescenčných zhasadiel [2][14].

Fluorescenčná doba života sa tradične považuje za kinetický parameter a matematicky je definovaná nasledovne:

$$\frac{-d[A^*]}{dt} = (k_f + k_{nr}) \cdot [A^*] \quad (5)$$

po integrácii tejto rovnice dostaneme vzťah:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (6)$$

A v čase $t = 0$ a τ_s je doba života excitovaného stavu S_1 ,

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}} \quad (7)$$

kde k_f je súčet rýchlostných konštánt radiačných procesov a kumulatívna konštanta k_{nr} pre neradiačné procesy, známe ako zhasacie procesy, $[A^*]$ je koncentrácia excitovaných molekúl A v čase $t = 0$.

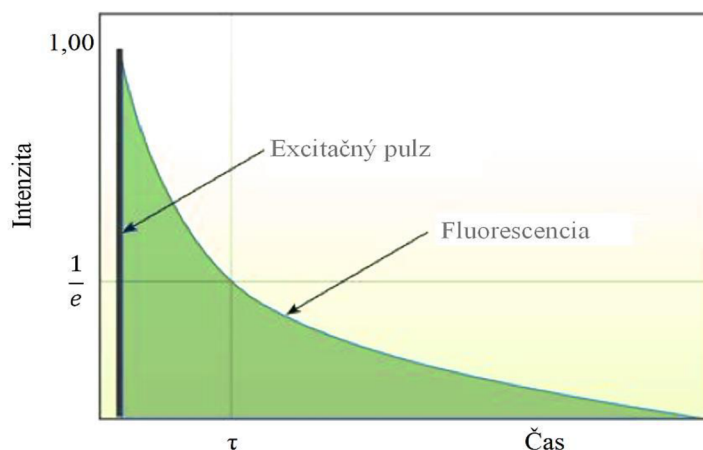
Pre multi-exponenciálnych rozpadoch, každý fluorescenčný rozpad má vlastnú dobu života, ktorá má odlišný význam a je definovaný ako vážený aritmetický priemer. V týchto prípadoch sú dôležité dve parametre: doba života každej zložky a frakčný príspevok každej zložky. Oba parametre sa typicky získajú pomocou matematického spracovania rozpadových kriviek.

$$\bar{\tau} = f_1 \cdot \tau_1 + f_2 \cdot \tau_2 + \dots \quad (8)$$

Intenzita fluorescencie v čase $t = 0$ je priamo úmerná koncentrácii $[A^*]$:

$$I_F(t) = k_f [A^*] = k_f [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (9)$$

Kde f_1 a f_2 sú frakčné príspevky danej zložky, τ_1 a τ_2 reprezentujú jednotlivé doby života každej zložky. Rozdiel medzi jedno-exponenciálnym poklesom a multi-exponenciálnym poklesom je, že v prípade multi-exponenciálneho poklesu používaná fluorescenčná sonda neexistuje len v jednom mikroprostredí, ale v mnohých, ktoré majú odlišné vlastnosti. Môžeme teda predpokladať, že fluorofor v zmesi môže existovať vo viacerých mikroprostrediach, takže doba života sa môže distribuovať[4][14].



Obrázok 4: Schematické znázornenie závislosti fluorescenčnej intenzity na čase, kde τ je fluorescenčná doba života [26]

Okrem stanovovania fluorescenčnej doby života v rôznych biologických a chemických analytoch, táto technika našla cestu do rýchlo sa rozvíjajúcej oblasti molekulárneho zobrazovania. Zobrazovanie fluorescenčnej doby života môže byť vykonané buď priamo, na základe merania doby života v každom pixele, týmto spôsobom sa vygeneruje mapa doby života (*lifetime map*), alebo prostredníctvom časovo riadených experimentov, kde sa určuje intenzita fluorescencie pre každý pixel v krátkom časovom intervale a vygeneruje sa intenzitná mapa (*intensity map*). Meranie fluorescenčnej doby života je veľmi flexibilná metóda, pretože hodnota doby života môže byť určená v akejkoľvek fáze: plyn, kvapalina, pevná látka alebo kombinácia týchto fáz. Môžeme merať/skúmať veľkú škálu systémov; od molekúl po bunky alebo aj ľudský organizmus. Univerzálnosť týchto metód umožňuje používať túto techniku v rôznych oblastiach štúdia, ako napríklad materiálne vedy, umenie, letectvo, poľnohospodárstvo, kriminológia ale najmä sa používa v biologických, chemických a medicínskych oblastiach [14].

2.2. Fluorescenčná sonda SNARF-4F

Všeobecne platí, že SNARF fluorescenčné farbivá sú citlivé na excitáciu. SNARF indikátory majú obaja dvojitú emisnú a dvojitú excitačnú vlastnosť, čo je obzvlášť užitočné pre konfokálnu laserovú skenovaciu mikroskopiu alebo pre prietokovú cytometriu. Fluorescenčná sonda SNARF 4F bola použitá napríklad pre zobrazenie pH v obličkových tkanivách pomocou dvojfotónovej excitačnej mikroskopie, pozorovaný bol emisný posuv, ktorý je závislý od pH.

SNARF-4F je fluorescenčná sonda, ktorá sa často používa na indikáciu pH. Sonda má pK_a okolo 6,4 v závislosti od pH ukazuje významný emisný posuv od žltó-oranžovej po tmavočervenú fluorescenciu v kyslých a zásaditých podmienkach. Táto pH citlivosť umožňuje, aby pomer fluorescenčnej intenzity sondy sa používal na kvantitatívne stanovenie pH, pričom sonda vykazuje dve emisné vlnové dĺžky, a to typicky pri 580 nm a 640 nm [15][16].

Acetomethyl (AM) ester deriváty fluorescenčných indikátorov patria medzi najužitočnejšie skupiny zlúčenín, ktoré sa používajú pre štúdium živých buniek. Modifikácia karboxylových kyselín na AM esterovú skupinu má za následkom vznik nenabitej molekuly, ktorá je v takej forme schopná prenikať bunkovou membránou. Akonáhle sa fluorescenčný indikátor dostane

do vnútra bunky, lipofilné blokujúce skupiny sa odštiepia pomocou nešpecifických esteráz a tento proces vedie k vzniku nabitej formy, ktorá potom uniká z buniek mnohokrát pomalšie ako pôvodná forma látky. Veľmi často má hydrolýza esterifikovaných skupín rozhodujúci význam, vďaka čomu je cieľový ión schopný sa naviazať na molekulu. V niektorých prípadoch je AM ester bezfarebný a nevykazuje žiadne fluorescenčné vlastnosti pred hydrolýzou. Táto vlastnosť je taktiež užitočná pri diagnostikovaní spontánnej hydrolýzy počas skladovania. AM alebo acetátové estery by mali byť rozpustené len v prípade potreby a vždy s použitím vysoko kvalitného, bezvodého dimethylsulfoxida [15].

Kvantifikácia pH je nezávislá od koncentrácie sondy a taktiež nezávisí od intenzity lasera. SNARF-4F je spoľahlivým indikátorom pH mikroprostredia, preto sa v súčasnosti používa na objasnenie úlohy prírodných biofilmov [15][16].

Pomocou fluorescenčnej sondy SNARF 4F bol skúmaný aj intracelulárny pokles pH v myocytoch, ktoré boli umiestené pod krycím sklíčkom. Hodnoty pH v kultivovaných myocytoch boli stanovované po excitácii pri 488 nm pomocou fluorescenčného mikroskopu. Vzhľadom na to, že bunková smrť pod krycím sklíčkom je priamym dôsledkom metabolickej aktivity buniek, pufrová kapacita tenkého filmu pod krycím sklíčkom nemusí byť dostačujúca pre udržanie pH s ohľadom na vysokú metabolickú aktivitu myocytov. Bolo očakávané, že intracelulárne pH myocytov pod krycím sklíčkom sa v priebehu času znižuje. Pre testovanie tejto hypotézy, časť jednovrstvových myocytov, naložených fluorescenčným farbivom, bola posunutá pod krycím sklíčkom. Bolo zistené, že intracelulárne pH sa znížilo počas prvých 10 minút vo väčšine buniek v strednom bode a v stredných oblastiach pod krycím sklíčkom, zatiaľ čo žiadna zmena v pH nebola pozorovaná v hraničnej zóne a v hraničných oblastiach. Za 30 minút hodnota intracelulárneho pH sa znížila rovnomerne a jednotne v bunkách. Výsledky ukazujú, že rýchle a podstatné zníženie intracelulárnej hodnoty pH sa vyskytuje v myocytoch pod krycím sklíčkom počas prvých 60 min, keď nastane acidóza. Intenzita fluorescence sa zvyšuje so zníženou hodnotou pH [17].

2.2.1. Vplyv hodnoty pH na fluorescenciu

Relatívne malé zmeny v pH môžu mať niekedy radikálny vplyv na intenzitu a spektrálne charakteristiky fluorescence. Fluorescencia aromatických zlúčenín s bázičkej alebo kyslým substituovaným kruhom je najcitlivejšia na pH zmeny. Vlnová dĺžka a intenzita emisií sú odlišné pre protónovú a deprotónovú formu zlúčenín. Zmeny emisie danej zlúčeniny sú spôsobené rôznym počtom rezonančných štruktúr, spojených s kyslou a zásaditou formou molekuly. V niektorých prípadoch dodatočné rezonančné formy poskytujú stabilnejší primárne excitovaný stav.

Platí, že väčšina fenolových zlúčenín je fluoreskujúci v neutrálnom a kyslom prostredí, ale v bázičkom prostredí sa tvoria nefluoreskujúce fenolové ióny. Pomocou fluorescenčných schopností niektorých zlúčenín sa deteguje koncový bod pri acidobázičkej titrácii. Príkladom tohto typu zlúčenín je fenolová forma kyseliny 1-naftol-4-sulfónovej. Prídavkom bázy k tejto kyseline sa posunie emisný pás od ultrafialovej oblasti k viditeľnej oblasti spektra, kde môže byť vizuálne detegovaná.

Rozpustený kyslík v roztoku znižuje intenzitu fluorescence dôsledkom fotochemicky vyvolanej oxidácii fluorescenčných druhov. Molekulárny kyslík má paramagnetické vlastnosti,

ktoré spôsobujú zhasanie. Prítomnosť kyslíka podporí medzi-systémový prechod a konverziu excitovaných molekúl do tripletového stavu. Tým pádom paramagnetické vlastnosti zhasia fluorescenciu [2][18][19].

2.3. Fluorescenčná anizotropia

2.3.1. Úvod, základné pojmy a charakteristiky

Meranie ustálenej a najmä časovo rozlíšenej fluorescenčnej anizotropie ponúka veľmi sľubné možnosti pre štúdium molekulárnej orientácie a mobility, ale umožňuje charakterizovať aj procesy, ktoré ich ovplyvňujú. Okrem niektorých špeciálnych prípadov, anizotropia nezávisí od koncentrácie fluorescenčnej sondy v roztoku, tým pádom ani od detegovanej intenzity signálov. Vzhľadom na túto podobnosť so správaním fluorescenčnej doby života (resp. fluorescenčnej životnosti), môžeme považovať anizotropiu za ďalšiu veličinu, ktorá poskytuje informácie o fluorescenčných charakteristikách.

Potenciálne aplikácie zahŕňujú napríklad skúmanie membránovej fluidity/tuhosti, lokálnej mikroviskozity v kvapalinách a polyméroch, interakcie typu proteín – proteín alebo receptor – ligand viazanie, a to všetko na molekulárnej úrovni.

Polarizačná rovina emitovanému fluorescenčnému fotónu je definovaná orientáciou emisného prechodového momentu danej molekuly, čiže orientáciou samotnej molekuly v čase emisie. Stupeň fluorescenčnej polarizácie je vyjadrený ako bezrozmerná veličina, anizotropia, zvyčajne má najvyššiu hodnotu v momente excitácie a po čase táto hodnota klesá. Tzv. anizotropický rozklad je možné pozorovať aj v pevných vzorkách (napr. tuhé, mrazené alebo veľmi viskózne prostredie) v dôsledku intramolekulárnych procesov alebo presunu energie medzi molekulami. Meranie časovo rozlíšenej anizotropie je viac informatívne ako metóda ustálenej anizotropie, ktorá udáva len priemerné hodnoty, bez priameho náhľadu do dynamiky procesu [1][2][22].

2.3.2. Definícia a základne vzťahy

Všeobecne platí, že anizotropia je založená na dvoch koncepciách. Brownov pohyb je vlastne náhodný pohyb častíc rozptýlených v danom prostredí (kvapalina alebo plyn). Molekuly alebo atómy v prostredí sa pod vplyvom tepelného pohybu neustále zrážajú, čo spôsobuje náhodný pohyb častíc. Smer a sila zrážok sú nepredvídateľné, tým pádom poloha častíc je náhodná. Pomocou rotačnej koleračnej doby sa dá charakterizovať pohyb častíc, čo je v podstate čas potrebný pre molekulu otáčať sa 1 radián. Táto koleračná doba je závislá od viskozity, teploty, objemu nanočastice a Boltzmannovej konštanty

$$\Phi_r = \frac{\eta V}{k_B T}. \quad (10)$$

Druhý koncept je fotoselekcia. Keď sa lineárne polarizované svetlo aplikuje na skupinu náhodne orientovaných fluoroforov, väčšina excitovaných molekúl budú tie, ktoré majú vektor absorpčného prechodového momentu orientovaný v rovine elektrického vektora daného budiaceho žiarenia. Molekuly, ktoré nemajú absorpčný prechodový moment v jednej ose s rovinou excitačnej polarizácie, resp. sú orientované kolmo, zostanú v základnom stave. Zhoda elektrického vektora žiarenia a absorpčného prechodového momentu fluorofora ale nemusí byť

úplne presná, excitujú sa aj molekuly, ktoré majú nenulový priemet absorpčného momentu do smeru polarizácie žiarenia [2].

Fluorescenčná anizotropia je jav, pri ktorom svetelné žiarenie emitované fluoroforom má nerovnomernú intenzitu pozdĺž polarizačnej osy. Metóda fluorescenčnej anizotropie umožňuje stanovenie rotačného koleračného času fluorescenčnej sondy, tým pádom poskytuje informácie o pohybe sondy a dynamike konštrukčných prvkov. Fluorescenčná anizotropia môže byť meraná v ustálenom stave (*steady-state*) alebo v časovo rozlíšenom (*time-resolved*), pričom táto metóda poskytuje viac informácií o pohybe a konformačnej dynamike sondy v danom prostredí. Anizotropia (r) je matematicky definovaná ako rozdiel vertikálnej (I_v) a horizontálnej zložky (I_h) polarizačnej fluorescenčnej emisie, ktorá je vydelená celkovou fluorescenčnou emisiou:

$$r = \frac{[I_v - I_h]}{[I_v + 2I_h]} \quad (11)$$

Ustálená anizotropia je v podstate anizotropia pri kontinuálnej excitácii [2][22][23].

2.3.2.1. *G-faktor*

Rovnica č. 11 predpokladá, že hodnoty I_v a I_H sú zaznamenané za rovnakých experimentálnych podmienok (s výnimkou nastavenia polarizačnej emisie, samozrejme). V praxi by to znamenalo konštantnú intenzitu excitovaného žiarenia, rovné akvizíčné intervaly a rovnakú účinnosť detekcie pre vertikálny a horizontálny komponent. Tieto podmienky sú veľmi ťažko splniteľné, preto na výpočet hodnoty fluorescenčnej anizotropie v praxi sa používa nasledujúci vzťah:

$$r(t) = \frac{[VV(t) - G \cdot VH(t)]}{[VV(t) + 2 \cdot G \cdot VH(t)]} \quad (12)$$

kde $VV(t)$ a $VH(t)$ označujú kinetiku fluorescenčného rozkladu meranej vzorky s použitím vertikálneho polarizovaného svetla a detekcie emisných komponentov polarizovaných vertikálne (V) a horizontálne (H). $VV(t)$ je rovnobežný, $VH(t)$ je kolmý polarizačný rozklad a G je korekčný faktor, ktorý je závislý od vlnovej dĺžky emisie a od inštrumentu, kompenzuje polarizačné vychýlenie detekčného systému, tým pádom koriguje rozdiel v citlivosti detekčného kanálu. Hodnotu G -faktora je možné stanoviť excitáciou vzorky horizontálne polarizovaného svetla za konštantných optických podmienok a nastavenie prístroja, tým pádom polarizované svetlo osvetľuje detekčný kanál rovnakým pomerom horizontálne a vertikálne polarizovaným žiarením [2][24].

2.3.2.2. *Magický uhol*

Je dôležité poznamenať, že keď je daná vzorka excitovaná rýchlym polarizovaným laserovým pulzom, môžu byť prítomné tzv. polarizačné efekty, ktoré spôsobujú, že bežný fluorescenčný rozklad sa objavuje zložitejšie, čo často súvisí s depolarizačným efektom. Účinnosť prenosu emisného monochromátoru závisí od polarizácie žiarenia. Stupeň polarizácie vzorky ovplyvňuje celkovú intenzitu fluorescencie, na korekciu tohto javu je nutné pri vertikálnom nastavením excitačného polarizátoru nastaviť emisný polarizátor na magický uhol (MA),

číselná hodnota je $54,7^\circ$ vertikálne. Týmto spôsobom sme schopní odstrániť depolarizačné efekty [2] [24].

2.3.3. Časovo rozlíšená anizotropia

Pri meraní časovo rozlíšenej anizotropie sa používajú pulzové zdroje svetla a obvykle sa získa multiexponenciálna funkcia,

$$r(t) = \sum_j r_{0j} \exp(-t/\theta_j) + r_\infty \quad (13)$$

kde r_0 je fundamentálna anizotropia, θ je rotačná koleračná doba a r_∞ je limitovaná anizotropia. r_0 reprezentuje anizotropiu počiatkovej fotoselekcie absorpčných dipólov, ktoré sú takmer kolineárne s osou budiaceho svetla a uhla medzi absorpčných a emisných dipólov. Teoretická hodnota fluorescenčnej anizotropie závisí od uhlu β medzi absorpčným a emisným prechodovým momentom molekuly fluorofora:

$$r_0 = \frac{1}{5}(3\cos^2\beta - 1). \quad (14)$$

V skutočnosti rotačnému pohybu molekuly zabraňuje rigidné prostredie, preto sa používa limitná anizotropia, ktorá ma vždy menšiu hodnotu ako než teoretická hodnota.

Keď je uhlový pohyb fluorofora brzdený, anizotropia sa rozkladá na nenulovú hodnotu ($r_\infty > 0$). Interpretácia rozkladania v závislosti od času závisí od konkrétneho študovaného model. Je dôležité si uvedomiť, že doba života danej sondy limituje rotačnú koleračnú dobu.

Platí, že kinetiku fluorescenčnej anizotropie je nemožne zaznamenávať priamo, ale je možné ju extrahovať z rozkladu polarizovaných emisných komponentov [2][20][21].

Na výpočet hodnoty časovo rozlíšenej fluorescenčnej anizotropie sa v praxi používa nasledujúca rovnica, ktorá obsahuje korekčný G-faktor:

$$r(t) = \frac{[I_H(t) - G \cdot I_V(t)]}{[I_H(t) + 2G \cdot I_V(t)]}. \quad (15)$$

2.3.4. Fundamentálna a limitná anizotropia

Pod pojmom **fundamentálna anizotropia** r_0 sa odkazuje na anizotropiu pozorovanú pri absencii iných depolarizačných procesov, čiže v prípade, keď fluorofor nevykoná žiadny pohyb. Zmenu fundamentálnej anizotropie s excitačnou vlnovou dĺžkou sa dá interpretovať ako rotáciu absorpčného prechodového momentu. Presnejšie, je to meniacia kontribúcia dvoch alebo viacerých elektrónových prechodov, pričom každý prechod má inú hodnotu β (uhol medzi absorpčným a emisným prechodovým momentom). Platí, že hodnota fundamentálnej anizotropie je nulová, keď $\beta = 54,7^\circ$. Keď uhol presahuje $54,7^\circ$, anizotropia bude mať negatívnu hodnotu, pričom maximum tejto hodnoty ($-0,20$) má v bode $\beta = 90^\circ$. Maximálna hodnota je dosiahnutá v bode $\beta = 0^\circ$, kde $r_0 = 0,40$. Pre akýkoľvek fluorofór, ktorý je náhodne distribuovaný v roztoku, s jedno-fotónovou excitáciou hodnota fundamentálnej anizotropie musí byť medzi $-0,20$ až $0,40$.

Reálna nameraná hodnota anizotropie sa nazýva **limitná anizotropia**. Táto hodnota je vždy menšia ako teoretická hodnota fundamentálnej anizotropie r_0 , pretože v skutočnosti rigidné prostredie zabraňuje, aby molekula vykonala rotačný pohyb [2][23].

2.3.5. Meranie fluorescenčnej anizotropie

Anizotropické merania za zvyčajne vykonávajú štandardnými fluorescenčnými spektrometrami. Laserové lampy emitujú polarizované svetlo, v prípade, keď zdroj žiarenia je luminiscenčná dióda alebo ustálená (*steady-state*) lampa, polarizované svetlo sa dá získať pomocou vysokoúčinných polarizátorov. Fluorescenčná emisia je potom detegovaná druhým polarizátorom, tiež nazývaným ako analyzátor.

V štandardných fluorescenčných spektrometroch excitácia je zvyčajne polarizovaná v zvislom smere k rovine optiky – táto zostava je **L-konfigurácia**. Monochromátor, ktorý sníma emisiu žiarenia, je umiestený kolmo na excitačný lúč. Anizotropia je potom postupne kalkulovaná z nameraných vertikálnych a horizontálnych polarizačných intenzít. U mikroskopoch je bežnou metódou používať dva detektory a polarizačný delič (*beam splitter*), ktorý je vložený medzi polarizátormi.

Prípad, kde je excitačný polarizátor nastavený vo vertikálnom smere pri paralelných a kolmých signáloch a až potom nastavený na horizontálny smer, sa nazýva **T-konfigurácia**. Emisné polarizátory majú rovnaký smer počas celého merania [2][20].

2.3.5.1. Vplyv fluorescenčnej anizotropie na intenzitu fluorescencie a na dobu života

V každom meraní súvisiacom s fluorescenciou – vrátane excitačných a emisných spektier, relatívnu fluorescenčnú intenzitu alebo fluorescenčnú dobu života, atď., s výnimkou fluorescenčnej anizotropie a polarizácie všeobecne platí, že čím vyššia je anizotropia, tým väčšia je hodnota skreslenia pri meraní fluorescenčných charakteristík. Dochádza ku kvantifikovateľnému skresleniu, keď meranie fluorescencie sa vykonáva bez ohľadu na anizotropiu systému a na jej vplyv na výsledky merania.

Bolo matematicky dokázané a empiricky overené, že existuje nekonečný počet kombinácií MA (magický uhol) párov, nie len 0° a $54,7^\circ$. Praktický význam tejto skutočnosti je maximalizácia odstuhu signálu od šumu (SNR – *signal-to-noise ratio*) daného fluorescenčného merania. Voľbou uhla medzi normálnou a charakteristickou laserovou rovinou polarizácie, magickým uhlom pri vstupe sa dá dosiahnuť maximálne využitie excitačného výkonu, čím sa vylepšuje SNR bez nutnosti použitia excitačného polarizátora. Súčasne sa dá výrazne zvýšiť dynamický rozsah výkonu rozsvetlenia, čo umožňuje excitáciu väčších, heterogénne fluoreskujúcich vzoriek. Okrem toho menej energie sa spotrebováva počas merania, čo predlžuje životnosť svetelného zdroja.

Ďalej platí pravidlo, keď emisný magický uhol nie je nastavený, pomer medzi nameranou a celkovou intenzitou definuje vzťah:

$$\frac{\text{DFI}}{\text{TFI}} = \left(\frac{2+r}{3} \right) \quad (16)$$

kde DFI označuje detegovanú fluorescenčnú intenzitu, TFI je celková fluorescenčná intenzita a r označuje anizotropiu. Vplyv tejto odchýlky od proporcionality je pozorovateľný pri každom

fluorescenčnom meraní kde je anizotropia nulová, obzvlášť v prípade viacfázového fluorescenčného prostredia. Všeobecne platí, že biologické médiá sú viacfázové. Rôzne zložky majú odlišné vlastnosti, ako napríklad viskozita, pH, polarizovateľnosť, atď. Na tieto faktory sú fluorescenčné charakteristiky ako doba života, anizotropia, fluorescenčná intenzita, excitačné a emisné spektrá nadmerne citlivé. Diferenciálna intracelulárna distribúcia fluoroforu a rozčlenenie môže produkovať množinu efektívne odlišných fluoroforov s rôznymi spektroskopickými vlastnosťami, a to v dôsledku individuálnych hostiteľských mikroprostredí.

V dôsledku tohto sa môže nastať, že rôzne fluoreskujúce sub-celulárne oblasti môžu mať rôzne emisné spektrá a rôznu anizotropiu. Výsledkom je tým pádom súbor fluorescenčnej anizotropie, čo je v podstate vážená intenzitná hodnota, môže byť závislá od emisnej vlnovej dĺžky. Inými slovami, rôzne emisné skupiny budú vykazovať rôzne hodnoty fluorescenčnej anizotropie. Prakticky odchýlka od proporcionality medzi DFI a TFI bude závislá od emisnej vlnovej dĺžky [36].

2.4. Fluorescenčná spektroskopia

Fluorescenčná spektroskopia je rýchla a citlivá metóda, pomocou ktorej sa dá charakterizovať molekulárne prostredie a udalosti v danej vzorke. Táto technika patrí medzi najpoužívanejšie metodiky štúdia fotoluminiscencie, je to druh elektromagnetickej spektroskopie, ktorá analyzuje emitovanú fluorescenciu. Platí, že každý fluorofor má charakteristické a jedinečné spektrum, z dôvodu, že každý fluorofor emituje fluorescenčné žiarenie pri rôznych vlnových dĺžkach. Vďaka tomu spektroskopické techniky sa často používajú na detekciu mnohých organických zlúčenín, aktívnych látok vo farmaceutických oblastiach alebo na lekársku analýzu zlúčenín.

Mnoho výskumov bolo vykonaných za účelom vyvinutia nových fluorescenčných farbív, napríklad v oblasti forenznej vedy pre vizualizáciu odtlačkov prsta pomocou lasera. Okrem toho fluorimetrická analýza sa používa napríklad pri vývoji nových liečivých látok, pri analýze skla, ropných alebo aj biologických produktov. Táto technika sa často používa ako diagnostický a výskumný nástroj v lekárskej mikrobiológii, v potravinárskych, farmakologických oblastiach, pretože pracuje s vysokou citlivosťou, špecifickosťou a selektívnosťou [27] [28].

Všeobecne platí, že spektrofluorimeter má dva monochromátory na rozdiel od absorpčného fluorimetra. Jeden monochromátor sa používa na úpravu vlnových dĺžok svetla, ktorým sa osvetľuje skúmaná látka, pričom druhý monochromátor má za úlohu vybrať vhodné vlnové dĺžky fluoroforom emitovaného svetla. V prípade absorpčného spektrometra, detektory a optické položky, ktoré osvietia analyzovanú látku, sú usporiadané v jednej osi, pričom u spektrofluorimetra zvyčajne uzavierajú pravý uhol, a to z dôvodu, aby svetlo, ktoré má rovnakú vlnovú dĺžku ako emitované svetlo fluoroforu, nerušil meranie. Intenzita fluorescencie závisí od štruktúry fluoroforu, platí, že organické, planárne, aromatické látky, ďalej látky s konjugovanou dvojitou väzbou v štruktúre vykazujú intenzívnejšiu fluorescenciu, tým pádom sú považované za lepšie fluorofory ako tie, ktoré konjugované dvojité väzby neobsahujú. Intenzita fluorescencie a intenzita žiarivého svetla sú priamo úmerne. Pre výpočet intenzity vykazovaného svetla platí nasledujúci vzorec:

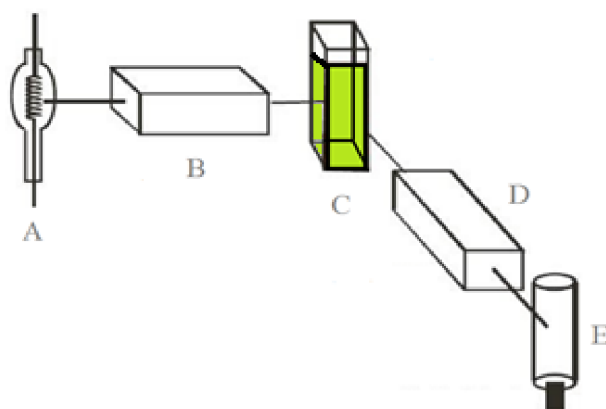
$$I = k \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot C \quad (17)$$

kde k je konštanta zahrňujúca vlastnosti kyvety a nástroja, I_0 signalizuje intenzitu ožiarenia monochromatického svetla, ε označuje hodnotu molárneho absorpčného koeficientu pre danú vlnovú dĺžku a C je koncentrácia skúmanej látky.

Všeobecne platí, že v praxi sa fluorescenčná spektroskopia delí na dve metódy: ustálená alebo tiež stacionárna fluorescenčná spektroskopia a časovo korelačná fluorescenčná spektroskopia [2][28].

2.4.1. Stacionárna fluorescenčná spektroskopia

Ustálená (stacionárna) fluorescenčná spektroskopia je konvenčná a najbežnejšia metóda skúmania fluorescenčných charakteristík. Skúma dlhodobú priemernú fluorescenciu vzorky po osvetlení ultrafialovým, viditeľným alebo infračerveným svetlom. Fluorescenčná sonda spolu so skúmanou látkou je osvetlená nepretržitým, kontinuálnym lúčom. všeobecne platí, že sa sleduje emisné spektrum pri konštantnej vlnovej dĺžke excitácie.



Obrázok 5: Stacionárna spektrometria: všeobecná schéma inštrumentácie: A – výbojka, B – excitačný monochromátor, C – kyveta obsahujúca analyzovanú látku, D – emisný monochromátor, E – fotoelektrický násobič [8]

Obrázok č. 5 všeobecne znázorňuje inštrumentáciu fluorescenčného spektrometra. Analyzovaná látka sa osvetľuje kontinuálnym žiarením, ktoré zabezpečuje vysokotlaková xenónová výbojka (označená ako A). Svetlo je smerované prostredníctvom optického kábla do spektrometra cez veľmi úzky otvor. Xenónová výbojka je schopná emitovať svetlo od 250 nm až do oblasti infračerveného svetla. Emitované svetlo potom dopadne na excitačný monochromátor, čo je optické zariadenie, ktoré prepustí len zvolené úzke pásmo vlnových dĺžok emitovaných xenónovou výbojkou, tým pádom na analyzovanú látku (označená ako C) dopadá len svetlo so žiadanými vlnovými dĺžkami. Tento lúč excituje skúmanú látku, ktorá začne emitovať fluorescenčné žiarenie vo všetkých smeroch. Žiarenie dopadá na emisný monochromátor (D), ktorý je umiestnený za vzorcom a vymedzuje vhodnú vlnovú dĺžku fluorescencie. Obsahuje difrakčnú mriežku, ktorá spôsobuje ohyb svetla. Za emisným monochromátorom je umiestnený fotoelektrický násobič (označený ako E), ktorý deteguje fluorescenčný signál, zosilňuje žiarenie a prevedie získanú informáciu na elektrický prúd, ktorý je úmerný intenzite svetla. Ako výstup merania uvyčajne dostávame emisné a excitačné spektrá [2][29].

2.4.2. Časovo rozlíšená fluorescenčná spektrometria

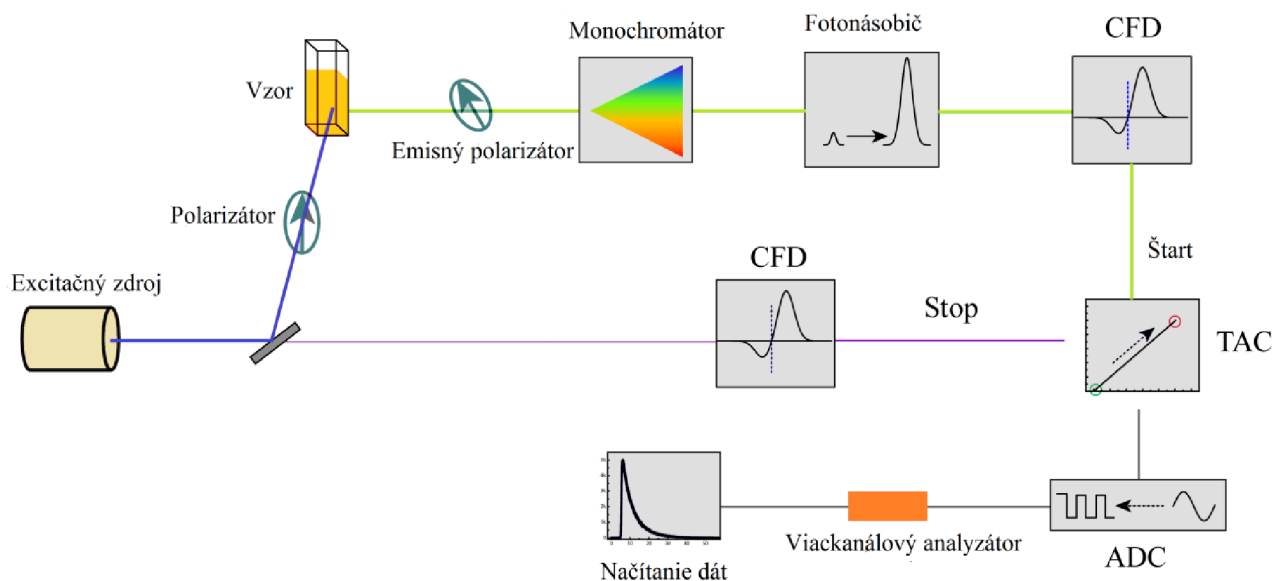
Časovo rozlíšená spektrometria študuje dynamické procesy, ktoré sa odohrávajú v excitovanom stave v chemických zlúčeninách a materiáloch. Časovo rozlíšené údaje poskytujú podstatné informácie o fotofyzikálnych, fotochemických a fotobiologických procesoch prebiehajúcich v mikrosvete materiálov. Na rozdiel od ustálenej, časovo rozlíšená spektroskopia používa pulzný zdroj svetla na štúdium kinetiky relaxačných procesoch. Táto technika umožňuje získať kľúčové parametre o fluorescenčnej emisii, ako napríklad spektrálne profily, pozíciu maximálnej emisie, šírku pásma, kvantový výťažok, reakčný čas, intenzitu píku a pozíciu v čase a najdôležitejšie, fluorescenčný relaxačný čas. Tieto parametre sú veľmi citlivé na zmeny životného prostredia a môžu byť ovplyvnené rôznymi spôsobmi. Napríklad so zvyšujúcou sa polaritou prostredia sa zvyšuje pravdepodobnosť neradiačných procesov, čo má za následok spektrálny posun v emisnom spektre. Tento efekt tiež vedie k zmene kvantového výťažku, tým pádom aj k zmene času rozpadu. Existujú dve fundamentálne časovo rozlíšené techniky, ktoré sa označujú ako pulzná metóda a metóda fázovo modulovaného budiaceho žiarenia.

Pulzná fluorimetria používa veľmi krátky excitačný pulz žiarenia. Fázovo modulovaná fluorimetria zase používa modulované žiarenie pri rôznych frekvenciách, a tak vytvára tzv. harmonickú odozvu vzorky, ktorá je Fourierovou transformáciou odozvy pulzu. Platí, že fázovo modulovaná fluorimetria pracuje vo frekvenčnej doméne, pričom pulzná fotometria v časovej doméne. Oba typy fluorimetra fungujú na rovnakom princípu, líšia sa hlavne v inštrumentácii [2][30].

2.4.2.1. *Pulzná fluorimetria – metóda TCSPC*

Implementácia do časovej domény vyžaduje záznam časovo závislého intenzitného profilu emitovaného svetla po excitácii krátkym bleskovým pulzom, typicky laserovým pulzom. Platí, že za účelom získania hodnôt fluorescenčnej doby života a vyriešenia multiexponenciálnych rozpadov, je nutné dočasne rozložiť zaznamenaný signál. Periodická excitácia z lasera umožňuje rozšírenie zberu dát cez viaceré excitačné a emisné cykly. Pomocou nazbieraných a rozptýlených fotónov sa dá rekonštruovať profil fluorescenčného rozpadu. Na rekonštrukciu sa používa celkové množstvo zhromaždených jedno-fotónových signálov, ktoré boli zbierané počas mnohých cyklov. Metóda TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting, čiže časovo korelované počítanie fotónov) je založená na opakujúcej sa, presne časovanej registrácii jednotlivých fotónov, kde referencia pre načasovanie je zodpovedajúci excitačný signál. Pravdepodobnosť, že sa registruje viac ako jeden fotón za daný cyklus, je nízka, histogram zobrazujúci príchod fotónov za čas reprezentuje časový rozpad. Časovo rozlíšený, analogický záznam (tzv. „single-shot“) sa používa na vytvorenie tohto histogramu cez mnohonásobné opakujúce sa cykly.

V praxi registrácia fotónov pri časovo rozlíšenom fluorescenčnom meraní zahŕňa nasledujúce dôležité kroky: ako prvý je zaznamenaný časový rozdiel medzi fotón emitáciou a korešpondujúcim excitačným pulzom. Pre tento účel oba optické udalosti musia byť prevedené na elektrický pulz. Pre fluorescenčný fotón sa to vykonáva pomocou jedno-fotónového detektora. Pre excitačný pulz sa používa ďalší detektor v prípade, keď nie je žiadny ďalší elektrický synchronizačný signál dodaný priamo laserom. Každá premena na elektrický



Obrázok 6: TCSPC - Časovo korelačné počítanie fotónov: schéma inštrumentácie prístroja

pulz musí striktné zachovať načasovanie signálov. Samotné meranie časového rozdielu sa vykonáva pomocou rýchlej elektroniky, ktorá poskytuje digitálne načasovanie výsledku. Tento výsledok sa potom používa na predloženie do pamäti histogramu tak, aby daná hodnota časovania bola korešpondujúca s danou pamäťovou bunkou, ktorá je týmto spôsobom zvýšená. Každý krok merania je vykonaný rýchlou elektronikou, aby potrebná doba spracovania pre každú udalosť bola čo najkratšia. Po zhromaždení dostatočného množstva signálov, pamäť histogramu môže byť sčítaná a dáta použité napríklad na výpočet fluorescenčnej doby života [2][31][32].

Meranie sa začína generáciou elektrického a optického pulzu v súčasnom čase v zdroji žiarenia. Tento generovaný optický pulz je potom nasmerovaný na diskriminátor (Constant Fraction Discriminator, CFD), ktorý má za úlohu presne určiť čas prichádzajúceho pulzu, a odiaľ do štartovacieho vstupu prevodníka času na amplitúdu (Time-to-Amplitude Converter, TAC).

Medzičasom skúmaný vzorec sa excituje optickým pulzom a následne začína emitovať fotóny, resp. fluorescenciu. Optika musí byť správne naladená tak, aby na fotonásobič dopadol len jeden fotón na jeden excitačný pulz. Elektrický pulz korešpondujúci s emisiou fotónu je smerovaný cez diskriminátor do stôp vstupu prevodníka (TAC). Zatiaľ schodok napätia je generovaný v prevodníku, čo je vlastne napätie, ktoré lineárne rastie s časom. Po obdržaní stopy signálu je schodok napätia prevedený na elektrický pulz, keďže platí, že jeho amplitúda je priamo úmerná oneskoreniu medzi štartom a stop pulzom. Napätie môže byť zosilnené podľa potreby v zosilňovači (Programmable Gain Amplifier, PGA) a následne prevedené na konečnú číselnú hodnotu pomocou analógového digitálneho prevodníka (Analog-to-Digital Converter, ADC) [4][2].

2.4.2.2. Analýza dát TCSPC

Dáta získané pomocou TCSPC sú mierne komplexné a všeobecne platí, že nemôžu byť analyzované použitím grafických metód. Na získanie rozpadových parametrov zo zbieraných dát $D(t)$ je potrebné používať dekonvolučné metódy, použitím znalostí excitačného pulzu $E(t)$.

Z ohľadom na experimentálne dáta z MCA (multichannel analyzer, čiže multikanálový analyzátor) počas experimentu typu SPT (single photon timing, čiže jednofotónové načasovanie) $D(t)$, a inštrumentálne charakteristiky, čiže $P(t)$, ktoré boli získané pri danej vlnovej dĺžke použitím rozptylovej vzorky, platí, že cieľom analýzy dát je získať rozpadovú funkciu $G(t)$. Často funkcie $D(t)$ a $P(t)$ musia byť korigované kvôli meraciemu pozadiu, čo generuje šum detektora alebo svetelné škvrnky v systéme. Zvolená vlnová dĺžka môže mať vplyv na odozvu fotonásobiča – je dôležité tento faktor brať do úvahy a korigovať v mnohých prípadoch [2][33].

Matematická formulácia tohto problému je nasledujúca (je potrebné poznamenať, že táto rovnica je len aproximácia):

$$D(t) = \int P(t') \cdot G(t-t') dt \quad (18)$$

Túto rovnicu (č. 18) sa dá používať za predpokladu, že dáta histogramu sú kontinuálne. Existuje mnoho spôsobov ako vyriešiť túto rovnicu, najčastejšie používanou metódou je metóda nelineárnych najmenších štvorcov. V praxi sa používajú aj iné metódy, ako napríklad metóda momentu, Laplaceova transformácia, metóda maximálneho entropia – ich správnosť a presnosť boli porovnávané. Metóda maximálneho entropia je relatívne nový spôsob analýzy dát a je používaná v mnohých laboratóriách. Avšak Laplaceova transformácia a metóda momentu sú v súčasnosti menej používané metódy na analýzu TCSPC dát.

Metóda nelineárnych najmenších štvorcov zvyčajne zahŕňa linearizáciu *fitting* (tzv. napasovanie, prispôsobovanie) *funkcie* a riešenie podľa matematicko-štatistickej metódy najmenších štvorcov. Pretože táto metóda je štatistická, na presné vyhodnotenie je potrebné veľké množstvo nazbieraných dát. Vo vyhodnocovacej procedúre, výsledky a parametre odvodené z nej by mali byť posudzované na základe fyzikálneho zmysluplného modelu [33][34].

Metóda najmenších štvorcov vytvorí tzv. súbor vykalkulovaných bodov, ktorý opisuje experimentálnu sadu. Vypočítané hodnoty sú potom optimalizované minimalizovaním váženého súčtu štvorcových odchýlok, od experimentálnych. Platí, že rovnica je platná len v prípade, keď Gaussova aproximácia je platná a vypočítaný rozptyl dátového bodu je nulový. Musí byť dostatočný počet nazbieraných dát v MCA, pre vytvorenie Gaussovej štatistiky. Hlavným cieľom metódy nelineárnych najmenších štvorcov je minimalizácia vplyvu zmenou hodnôt parametrov modelu, čiže dosiahnuť najmenší nesúlad medzi nameranými dátami a poprekladanou funkciou:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}$$

kde n označuje celkový počet kanálov, $N(t_k)$ je zaznamenaný počet čísel v danom kanáli k , $N_c(t_k)$ je vypočítaný počet čísel v kanáli k z modelovej predikcie a je premenná $N(t_k)$. χ^2 označuje skutočnú štatistickú hodnotu vázenej premennej najmenších štvorcov, ktorá je v podstate štatistikou rozdelenia pravdepodobnosti chi-kvadrátu. Ale v praxi sa používa, čo je redukovaná

hodnota pôvodnej hodnoty χ^2 . Hodnota redukovaného χ^2 závisí od počtu parametrov preloženej funkcie (p) a od počtu dát (n). Hodnota χ^2 sa vypočíta ako:

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu} \quad (20)$$

kde n je počet nameraných dát, p udáva počet parametrov preloženej funkcie a ν označuje stupne voľnosti. Keďže n má spravidla oveľa väčšiu hodnotu ako p , χ_R^2 má obvykle hodnotu blízko jednej [2][33][34].

V praxi sa používajú rôzne štandardizačné metódy (simplex, Marquardt, analytické, atď.) podľa toho, ktorá metóda poskytuje najpresnejší výsledok, resp. najlepší súlad. Najbežnejší spôsob sa nazýva Marquardt. Pre multiexponenciálny model, minimalizácia χ_R^2 je vykonaná s ohľadom na samotný rozpadový parameter alebo na rozpadový a preexponenciálny faktor (označený ako a_i). V praxi iníciačné možnosti pre rozpadový faktor $G(f)$ sú zvolené používateľom, kde sa stanovuje počiatková funkčná forma rozpadu, ktorá je matematicky vyjadrená nasledovne:

$$G(t) = \sum_{k=1}^n a_k e^{-t/\tau_k} \quad (21)$$

Používajú sa iníciačné predpoklady na determináciu χ_R^2 . Parciálna derivácia vypočítaných bodov, vzhľadom na iníciačné predpoklady, je vypočítaná a tieto hodnoty sú potom používané na rozšírenia linearizovanej funkcie. Táto funkcia umožňuje vytvorenie sady maticových rovníc, ktoré po vyriešení generujú novú sadu inkrementovaných parametrov. Týmto spôsobom sú nové hodnoty re-konvolutované, kým hodnota χ_R^2 konverguje na minimum [2][33].

Metóda nelineárnych najmenších štvorcov poskytuje najspoľahlivejšie výsledky v prípade, ak namerané dáta splňajú nasledujúce podmienky:

- Všetky experimentálne neistoty sú na závislej premennej, čiže na osi y .
- Neistoty na závislej premennej, to znamená, že namerané dáta, majú Gaussovu distribúciu, keďže v strede je správna hodnota.
- Ako na závislej (os y), tak ani na nezávislej (os x) premennej sa nenachádzajú systematické chyby.
- Predpokladaná preložená funkcia je správnym matematickým popisom systému. Nesprávne, nepresné modely neposkytujú vhodné a presné parametre.
- Dátové body sú nezávislé od pozorovania.
- Vždy musí byť dostačujúce množstvo dátových bodov, aby parametre boli predurčené.

V prípade, keď je nesúlad veľmi veľký, naložený model je nevhodný. Tento prípad sa pravdepodobne dá vyriešiť použitím modelu pre viac parametrov poklesu. Platí, že aj systematické chyby v dátach môžu zapríčiniť malé zvýšenie a nesúlad, v tomto prípade môže byť správny používaný model. V skutočnosti sa používajú sofistikované programy na vyhodnocovanie výsledku TCSPC [2].

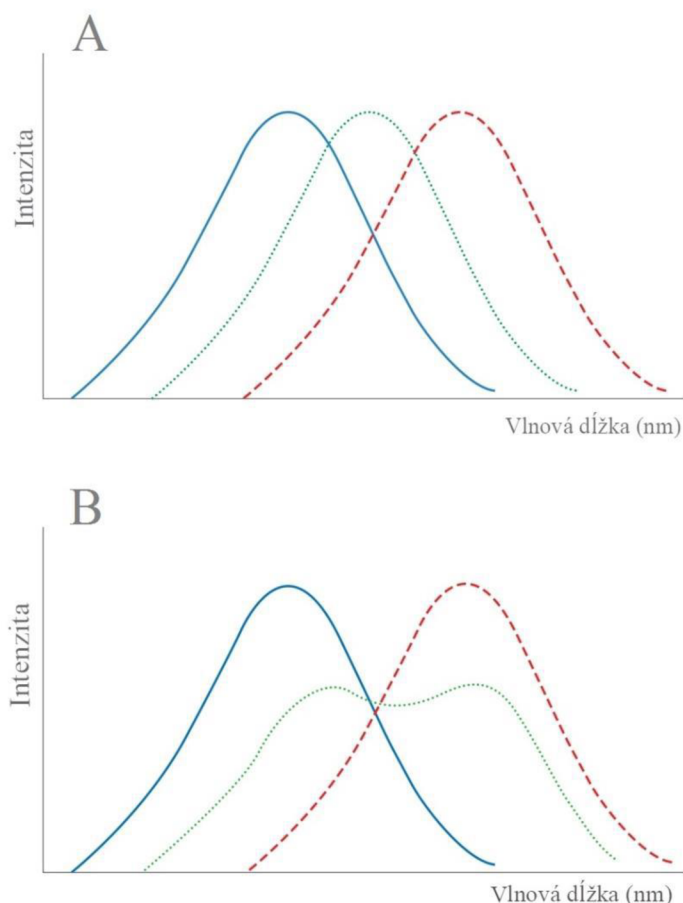
2.4.3. Časovo rozlíšené emisné spektrá

TRES znamená časovo rozlíšené emisné spektrá, ktoré sú v podstate emisné spektrá namerané v určitej krátkej chvíli po pulzovej excitácii. Časovo rozlíšená spektroskopia je široko používaný nástroj vo fotofyzikálnych, fotochemických a fotobiologických oblastiach na skúmanie dynamických procesov a vlastností komplexných systémov. Procesy spojené s excitovaným stavom majú za následok komplexné časovo závislé rozpady, čo znamená, že majú veľký vplyv na emisné spektrá. Okrem iných, napríklad v biologickom výskume je často študovaná odozva daného komplexného systému na externe aplikované rušenie. Používajú sa hlavne spektroskopické merania pri viacerých vlnových dĺžkach na monitorovanie týchto procesov a na sledovanie kinetiky. Tieto tzv. časovo rozlíšené spektrá sa považujú za príklad „niekoľkocestných dát“.

Časovo rozlíšené spektrum je najznámejší príklad dvojsmerných dát, pretože namerané údaje sú súborom meraní v dvoch rozmeroch. Prvá dimenzia je nezávislá experimentálna spektrálna premenná: vlnová dĺžka λ alebo vlnové číslo $\bar{\nu}$, alebo intenzita magnetického poľa B , atď. Druhý rozmer je nezávislá experimentálna premenná na sledovanie spektrálnych zmien, ktorými sú napríklad čas t po excitácii, teplota T , polarizačná závislosť, pH, excitačná vlnová dĺžka alebo koncentrácia zhášadla $[Q]$. Pridanie tretieho rozmeru má za následok trojsmerné dáta. V tomto prípade najčastejšou kombináciou zbieraných dát je napríklad čas, vlnová dĺžka v závislosti od teploty alebo v závislosti od koncentrácie zhášadla [35].

Molekula daného fluoroforu sa dostane do nerelaxovaného stavu hneď po excitácii laserovým lúčom. Keď sa molekula fluoroforu nachádza v tomto stave, zmení svoj dipólový moment, čo má za následok, že rozpúšťadlo v blízkosti fluoroforu sa preorientuje. Zmena dipólového momentu je spôsobená práve excitáciou fluorofora a je možné to sledovať pomocou TRES. Relaxačný proces rozpúšťadla ovplyvňuje napríklad aj teplota, kde platí, že pri vysokej teplote je relaxácia rozpúšťadla rýchlejšia ako emisia. Keď je teplota systému stredná, platí, že emisia žiarenia sa zjaví práve v priebehu relaxačného procesu. Druhým príkladom procesu, ktorý ovplyvňuje emisné spektrum, sú reakcie excitovaného stavu, ako napríklad zmena konformácie vyvolaná práve oddelením náboja, alebo oddelenie náboja.

Ako už bolo uvedené, tieto procesy majú za následok časovo závislé rozpady. Platí, že rozpadová intenzita závisí od pozorovanej vlnovej dĺžky. Rýchlejší rozpad je zaznamenaný v prípade, keď je intenzita daného rozpadu zaznamenaná na strane kratších vlnových dĺžok emisného spektra. Platí, že v tomto prípade zaznamenaný rozpad je rýchlejší ako rozpad celkovej emisie z dôvodu, že excitované fluorofory sú eliminované z pozorovanej vlnovej dĺžky. Na druhej strane emisného spektra, čiže v červenom oblasti sa nachádzajú dlhšie vlnové dĺžky, emitujúce fotóny sú už relaxované. V každom prípade je nutné brať do úvahy, že emisia prebieha náhodne, tým pádom niektoré fluorofory emitujú skôr a iné zase následne. Stanovená rýchlosť rozpadu reprezentuje rýchlosť vyhasnutí a predstavuje vždy len priemernú hodnotu. Fluorofory emitujúce skôr, sa nachádzajú pri krátkych vlnových dĺžkach ale pri vysokých energetických hladinách. Naopak, fluorofory pri dlhých vlnových dĺžkach emitujú žiarenie neskoršie [2].



Obrázok 7: Emisné spektrá – **A**: emisné spektrum zaznamenané okamžite po excitácii, **B**: emisné spektrum zaznamenané neskôršie (relaxované molekuly), modrá – nerelaxovaná molekula, červená- relaxovaná molekula , zelená (uprostred) – posun [2]

Celý proces je demonštrovaný na obrázku č. 7. Prípad, keď emisné spektrum je zaznamenané okamžite po excitácii ($t = 1$ ns). Výsledkom by tak bola nerelaxovaná emisia. Oproti tomu, ak je emisné spektrum sledované neskôršie ($t = 3$ ns), tento čas stačí na to, aby viac molekúl relaxovalo pri dlhších vlnových dĺžkach, čiže celé spektrum by sa posunulo časom k dlhším vlnovým dĺžkam, do červenej oblasti spektra. V medzičasovom intervale ($t = 2$ ns) emisia je pozorovateľná v oboch stavoch. V tomto prípade ale emisné spektrá sú typicky širšie kvôli emisii oboch foriem fluoroforu. Tieto spektrá, reprezentujúce odlišné časy po excitácii, sa nazývajú časovo rozlíšené emisné spektrá. Stanoviť TRES je technicky veľkou výzvou a molekulová interpretácia je rovnako zložitá [2].

2.4.3.1. Multiexponenciálny rozpadový model

Multiexponenciálny rozpad danej zložky pochádza buď z nehomogenity, alebo z rovnováhy. V prípade, keď je príčinou rovnovážny stav, počet zapojených zložiek definuje multiexponenciálny stupeň. Extrémnym prípadom je systém, ktorý má jednu emitujúcu komponentu P , ktorá je reverzibilne spojená s radom ďalších neemisných stavov $h\nu \leftarrow P \leftrightarrow Q \leftrightarrow R$. Ak je tento troj-kompartmenový systém excitovaný, rozpad P spravidla ukazuje troj-exponenciálny pokles. Vzhľadom na to, že P je jediná fluoreskujúca zložka, jej koncentračný profil môže byť priamym spôsobom pozorovaný, tým pádom umožňuje určiť (vzťahy) ďalšie rýchlostné konštanty v tomto komplikovane spojenom systéme.

Je dôležité poznamenať, že v tomto prípade je pozorovaná len jedna zložka, ale sú potrebné tri kompartmenty na charakterizáciu kinetiky. Alternatívna kinetická schéma $Q \leftrightarrow P \leftrightarrow R$, kde je emisný stav P a neemisné stavy Q a R sú spojené, má rovnako za následok troj-exponenciálny pokles P . V prípade, keď je pozorovaná len P emisia, systém je štrukturálne neidentifikovateľný [35].

2.4.3.2. Časovo rozlíšené emisné spektrá a TCSPC

Existuje rad metód, ktoré umožňujú získať TRES, sem patrí aj metóda TCSPC, ktorá dovoľuje získať záznam fotónov prichádzajúcich v danom krátkom časovom intervale. Výstupné impulzy z TAC sú nastaviteľné, tým pádom môžu byť zvolené hodnoty napätia tak, aby boli v danom obmedzenom rozsahu. Vybraný časový rozsah definuje pozorované časové okno. Ohraničené emisné spektrum je potom registrované monochromátorom. Táto metóda ale nevykazuje vysokú efektívnosť, preto nie je vo veľkej miere použitá.

Najčastejšia používaná metóda na zaznamenania TRES je nepriamym spôsobom. Proces sa začína meraním časovo rozlíšených rozpadov pri viacerých vlnových dĺžkach spektra, keďže intenzita rozpadu je priamo závislá od vlnovej dĺžky. Pri kalkulácii TRES sú intenzity rozpadu obvykle analyzované pomocou multi-exponenciálneho modelu:

$$I(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) e^{\left(\frac{-t}{\tau_i(\lambda)}\right)} \quad (22)$$

kde $I(\lambda, t)$ je intenzita rozpadu pri rôznych vlnových dĺžkach, $\alpha_i(\lambda)$ je pre-exponenciálny faktor, $\tau_i(\lambda)$ je čas rozpadu.

Hlavným cieľom je získať parametrizovanú formu pre rozpadovú intenzitu, ktorá je neskôršie použitá pre obnovu TRES. V každom prípade je nevyhnutné určiť hodnotu normalizovanej intenzity na získanie TRES. Normalizovaná intenzita predstavuje stav, kde časovo integrované intenzity pri každej vlnovej dĺžke sú rovné stacionárnej (steady-state) intenzite vlnovej dĺžky. Dostaneme výraz:

$$H(\lambda) = \frac{I_{ss}(\lambda)}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)} \quad (23)$$

kde $H(\lambda)$ reprezentuje novú sadu intenzity rozpadu, $I_{ss}(\lambda)$ označuje intenzitu ustálenej fluorescence. Ďalej platí, že normalizovaná intenzita je rovná súčinu $H(\lambda)$ a $I(\lambda, t)$, čiže:

$$I'(\lambda, t) = H(\lambda) I(\lambda, t) \quad (24)$$

z čoho sa dá odvodiť konečný vzorec pre výpočet TRES následne po excitácii laserovým pulzom, v ľubovoľnom čase (t):

$$I'(\lambda, t) = I_{ss}(\lambda) \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) e^{\left(\frac{-t}{\tau_i(\lambda)}\right)}}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)} \quad (25)$$

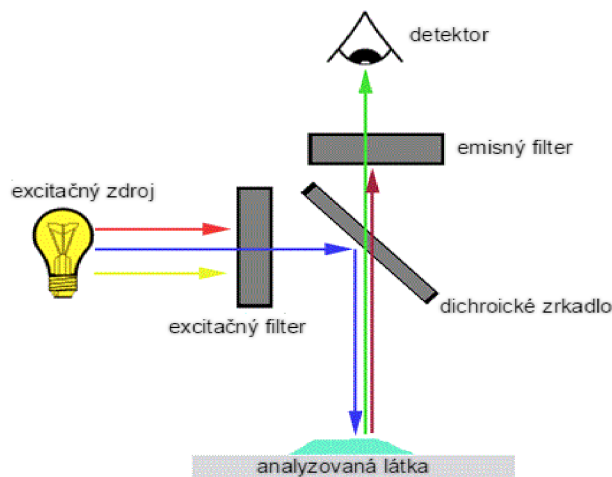
Táto metóda je preferovaná, pretože normalizované hodnoty $I'(\lambda, t)$ sú skutočne funkciou impulznej odozvy. Potenciálne skreslenia sú korigované v dôsledku konvolúcie s funkciou odozvy prístroja. Na určovanie rýchlosti relaxácie a na definovanie charakteru relaxačného procesu sa používa tvar TRES a časová závislosť spektrálnych posunov [2].

2.5. Fluorescenčná mikroskopia

Väčšina technických zlepšení v oblasti mikroskopie v priebehu posledných rokov sa sústredila na zvýšenie kontrastu medzi signálom a pozadím, čiže medzi predmetom záujmu vo vonkajšom prostredí. Fluorescenčná mikroskopia je typickým príkladom, pretože táto metóda umožňuje odhaliť len predmety záujmu, pričom pozadie zostane čierne a nevýrazné. V dôsledku svojej vnútornej selektívnosti, fluorescenčná zobrazovacia technika sa stala hlavnou oporou mikroskopie, hlavne v biologických oblastiach. Počas posledného desaťročia vzniklo veľké množstvo nových fluorescenčných sond, ktoré takto poskytujú nástroj na označenie a zobrazenie prakticky akéhokoľvek biologického systému. Veľký spektrálny rozsah dostupných fluoroforov umožňuje súčasné zobrazovanie rôznych bunkových, subcelulárnych alebo molekulárnych komponentov. Okrem toho práca s fluorescenčnými génovými produktmi, najmä zelených fluorescenčných proteínov, umožňuje geneticky označiť proteínové zložky živých systémov [37].

Fluorescenčný mikroskop je skonštruovaný tak, aby skúmaná látka bola osvetlená jednou vlnovou dĺžkou, a spätočné svetlo by bol odfiltrovaný tak, aby bolo možné zaregistrovať fluorescenciu, ktorá je posunutá k dlhším vlnovým dĺžkam. V poslednej dobe preferovaný prístup na osvetlenie analytu je tzv. *epi-osvetlenie*, čo znamená, že v tejto konfigurácii objektív mikroskopu nielen zobrazuje a zväčšuje skúmanú látku, ale slúži aj ako kondenzátor a osvetľuje ju. Veľkou výhodou tohto prístupu je, že zatiaľ čo excitácia fluoroforu je ekvivalentná pri *epi-* a *transmisných* mikroskopoch, len veľmi malé percento excitovaného svetla, ktoré je reflektované skúmanou látkou, musí byť blokované v spätočnej dráhe svetla v prípade režimu *epi-osvetlenia*. Hlavnou technickou prekážkou tohto prístupu je, že excitované svetlo a fluorescenčná emisia sa prekrývajú vo svetelnej dráhe, tým pádom tento systém vyžaduje zvláštny druh deliča svetla, dichroické zrkadlo na separovanie excitačného a emisného svetla. Dichroické zrkadlá sú málokedy použité bez prítomnosti ďalších dvoch filtrov: excitačný filter, ktorý selektuje excitovanú vlnovú dĺžku, a bariérový filter, ktorý umožňuje prechod späť do detektora iba dlhším vlnovým dĺžkam. Všetky tri typy filtra sú typicky interferenčné filtre, ktoré majú veľmi špecifickú selektívnosť vlnovej dĺžky [37] [39].

Na excitáciu sa zvyčajne používajú ortuťové alebo xenónové výbojky, ale tieto lampy sú drahšie a potenciálne nebezpečné. Xenónová lampa pokrýje vlnové dĺžky v celej UV oblasti, vo viditeľnej a v blízkej infračervenej oblasti, čo je veľká výhoda. Ďalej platí, že objektív ideálneho fluorescenčného mikroskopu má numerickú apertúru. Je to kritickým parametrom objektívu, dôležitejším ako zväčšenie, pretože definuje rozlišovaciu schopnosť a svetelnú účinnosť objektívu. Platí, že čím väčší je polovičný uhol (čiže uhol medzi vertikálnym a maximálne šikmým lúčom, ktorý ešte môže byť sústredený do objektívu), tým sa zväčšuje množstvo vnímaných fotónov a tým väčšie je množstvo svetla, ktoré sa používa na excitáciu skúmanej látky [37] [38].



Obrázok 8: Fluorescenčný mikroskop - schéma stručne reprezentuje hlavné časti prístroja [53]

2.5.1. Časovo rozlíšená fluorescenčná mikroskopia

V oblasti fluorescenčnej mikroskopie, fluorescenčná emisia môže byť charakterizovaná nielen intenzitou a polohou, ale aj dobou života, polarizáciou a vlnovou dĺžkou. Napríklad zobrazenie fluorescenčnej doby života, FLIM (*fluorescent lifetime imaging*) môže zaznamenať fotofyzikálne javy, ktoré sú ťažké, alebo nemôže zaznamenať pomocou snímania fluorescenčnej intenzity. Ďalej, zobrazenie časovo rozlíšenej fluorescenčnej anizotropie dokáže merať a charakterizovať rotačnú mobilitu daného fluorofora v prostredí, v ktorom sa nachádza [40].

2.5.2. Fluorescenčná korelačná mikroskopia

V metóde fluorescenčnej korelačnej mikroskopie (FCS) je sledovaná fluktuácia fluorescenčnej intenzity fluorescenčne značených molekúl, ktoré boli excitované veľmi zaostreným laserovým lúčom. Vzhľadom na vysokú citlivosť táto metóda umožňuje detekciu na úrovni individuálnych molekúl. Týmto spôsobom môžu byť odhalené aj termodynamické výkyvy, ktoré by sa nedali zobraziť pri makroskopickú úrovni. Táto technika môže v podstate poskytnúť informácie o akomkoľvek dynamickom molekulárnom proces v rozsahu od nanosekúnd po dlhšie časy. Informácia sa prejavuje ako zmena intenzity fluorescencie bez nutnosti akejkoľvek poruchy alebo synchronizácie so študovaným systémom. Vďaka špecifickým funkciám je FCS univerzálny nástroj pre biomolekulárne štúdie, ako napríklad štúdium translačnej a rotačnej difúzie, stanovenie koncentrácie alebo hustoty molekúl, determinácia chemickej kinetiky alebo väzobných reakcií [40][46].

2.5.3. Časovo rozlíšený fluorescenčný korelačný mikroskop

Pokroky špičkovej a veľmi špecifickej vedy v mnohých oblastiach často závisia od štúdia individuálnych molekúl. Široké pole štúdia vyžaduje flexibilný prístroj a možnosť prispôbenia sa jednotlivým potrebám.

Konfokálny mikroskop MicroTime 200 je v podstate časovo rozlíšený konfokálny mikroskopický systém, ktorý poskytuje jedno-molekulovú citlivosť.

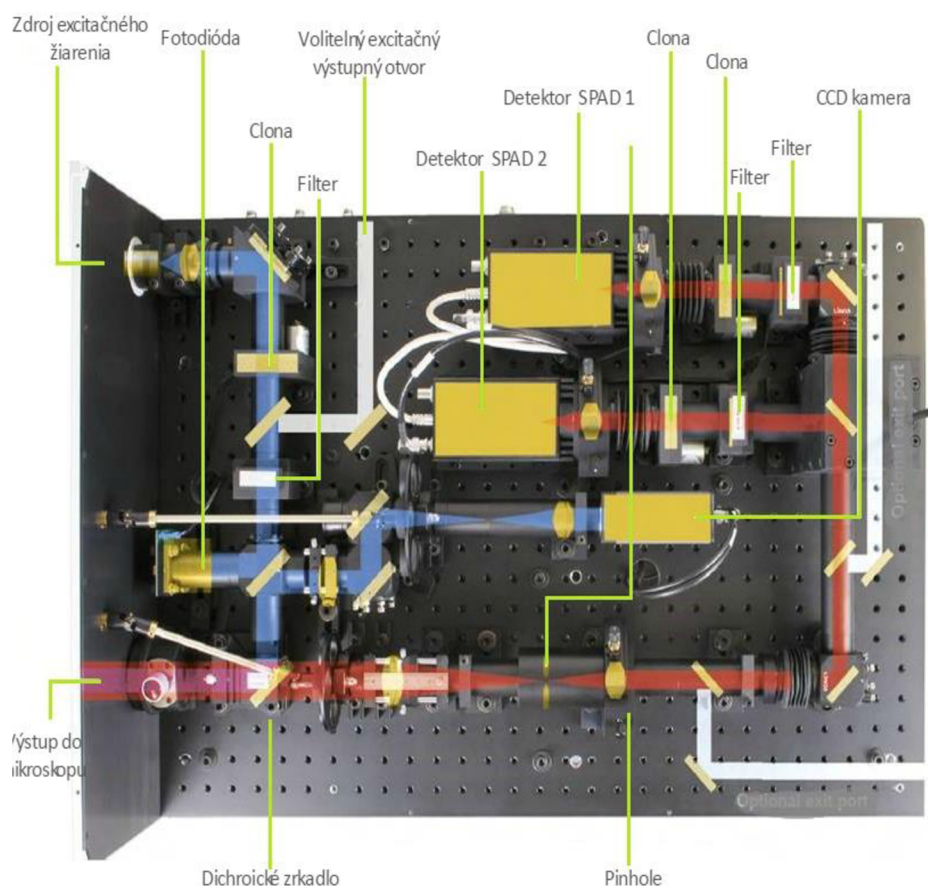
2.5.3.1. *Stručný popis systému*

Excitačný podsystem sa skladá z pulzného diódového lasera a rôznych laserových hláv. K dispozícii sú pikosekundové lasery v rozmedzí od 375 do 640 nm a femtosekundový laser s vlnovou dĺžkou 1030 nm. Výstupový výkon a počet opakovaní sa dá prispôbiť experimentálnym požiadavkám, čo je požadujúce pri meraní fluorescenčnej doby života. Lasery sú riadené pomocou špecifického jeden- alebo multi-kanálového ovládača, ktorý dovoľuje tzv. *multi-color* experimenty. Všetky laserové hlavy sú zahrnuté v laser zlučovacej jednotke, ale do mikroskopu sa dajú umiestniť aj ďalšie excitačné zdroje, napríklad Ti:zafírové lasery pre multifotónovú excitáciu [43] [46][47].

Detekčný subsystem je veľmi citlivý, pretože mikroskop bol vyvinutý špeciálne na jednomolekulárnu detekciu, s výrazne zníženou svetelnou absorpciou. V konfokálnom mikroskope malý otvor tzv. *pinhole* definuje oblasť prepúšťajúceho svetla na detektor. *Pinhole* neprepúšťa svetlo, ktoré neprechádza z oblasti okolo ohniska a týmto spôsobom zlepšuje pomer signál/šum, odfiltruje neostrý signál. *Pinhole* je tým pádom konjugované s ohniskom šošovky. Priemer používaného *pinhole* sa dá meniť podľa požiadaviek a takto optimalizovať optickú hrúbku v danom úseku. Konfokálny detekčný systém v mikroskope sa nachádza v hlavnej optickej jednotke (Main Optical Unit – MOU). V mikroskope sú štyri fotodetektory typu SPAD (Single Photon Avalanche Diode), ktoré sa často používajú pri TCSPC meraní, pretože sú schopné dosiahnuť subnanosekundovú časovú odozvu s vysokou kvantovou účinnosťou a s nízkym šumom. Tieto polovodičové zariadenia zaznamenávajú aj veľmi slabý signál s nízkou intenzitou, ich citlivosť umožňuje meranie na jednofotónovej úrovni. Dopadajúci foton generuje lavínový prúd vďaka mechanizmu nárazovej ionizácie [42][46][47].

Časovo rozlíšená fluorescencia vyžaduje nielen registráciu jednotlivých fotónov, ale aj ich pozíciu v čase, a pre zobrazovacie techniky aj v priestore. Preto bolo vyvinutý spôsob na zapracovanie prichádzajúcich signálov TTTR (Time-tagged Time-resolved). Múd TCSPC zaznamenáva príchod daného fotónu v závislosti od času excitačného pulzu, mód TTTR registruje celkovú dynamiku fluorescencie, pretože čas príchodu všetkých fotónov je zaznamenaný vzhľadom na začiatok experimentu [44][45].

Princíp merania pomocou fluorescenčného mikroskopu MicroTime 200 je nasledujúci; excitačný zdroj, v našom prípade laserový lúč, emituje žiarenie so zvolenou vlnovou dĺžkou. Fotodióda umiestená za excitačným zdrojom registruje intenzitu vysielaného laserového lúča. Tento lúč dopadá na optický systém a na dichroické zrkadlo. Platí, že dichroické zrkadlo má byť zvolené tak, aby excitačné žiarenie so zvolenou vlnovou dĺžkou odrazilo smerom do mikroskopu a naopak fluoroforom emitované žiarenie prepustilo až na detektory. Odrazené žiarenie prechádza objektívom na analyt, kde je skúmaná látka excitovaná a následne emituje fluorescenčné žiarenie. Konfokálny objem je v podstate objem osvetlený excitačným lúčom, v tomto objeme následne dochádza k zberu dát detekcie fluktuatívnej intenzity fluorescencie. Sondou emitované žiarenie potom prechádza späť na dichroické zrkadlo, pokračuje ďalej na emisný filter, ktorý môže byť umiestnený za dichroickým zrkadlom alebo tesne pred detektormi. Pri meraní s dvoma detektormi je vhodné umiestniť filter za dichroickým zrkadlom. Emisný filter v ideálnom prípade odstráni prichádzajúci signál Ramanovho rozptylu. Ďalej emisné žiarenie dopadá cez *pinhole* až na detektory.



Obrázok 9: Schéma prístroja MicroTime 200 - hlavné optické jednotky prístroja a ich popis [52]

2.5.4. Spektrograf – CCD kamera

Moderné digitálne zobrazovacie techniky preukázali užitočnosť vo veľmi rôznych oblastiach od vzdelávania k medicíne, astronómii alebo vede. Napríklad lekárske zobrazovacie (*imaging*) techniky napomáhajú pri diagnostike, liečbe chorôb, ako príklad môžeme uviesť röntgenové žiarenie, nukleárnu magnetickú rezonanciu alebo ultrasonografiu. Tieto digitálne zobrazovacie metódy umožňujú odhaliť to, čo nemôžeme vidieť voľným okom, tým pádom poskytujú nepostrádateľné informácie o skúmanom systéme, vďaka čomu digitálna *imaging* technológia je dnes základnou súčasťou výskumu a vývoja [48].

Technológia Andor patrí medzi vedecké zobrazovacie metódy. Sem patria digitálne kamery, ktoré sa využívajú v rôznych zobrazovacích a spektroskopických aplikáciách.

Elektronické kamery sa používajú na zachytávanie obrazu a na jeho prevod na elektrické signály do mikročipu. Pri tejto technológii sa najčastejšie používa kamera vybavená s CCD snímačom, EMCCD snímačom alebo CMOS, ICCD snímačom. V nasledujúcej kapitole bude popísaná CCD a EMCCD technológia [48][49].

Skratka CCD znamená *Charge-Coupled Device*, čiže nábojovo viazaná súčiastka. CCD snímač pracuje na princípe fotoefektu, ktorý spočíva v tom, že fotóny pri náraze do atómu dokážu previesť niektorý z jeho elektrónov zo základného do excitovaného stavu, pri čom mu odovzdajú energiu. Po osvetlení polovodiča, čiže po dopade fotónov vznikne elektrický náboj a dôjde k presunu náboja po ploche v polovodičových prvkoch. CCD môžeme popísať ako polovodičový prvok, ktorý premieňa svetelné žiarenie na elektrický signál, čiže energiu dopadajúcich fotónov na tok elektrónov. Snímač je v podstate kremíkový čip, ktorého mechanická štruktúra je tvorená veľkým množstvom pravidelne usporiadaných, na svetlo veľmi citlivých obrazových prvkov, nazývaných pixely. V prípade, keď je dostatočné množstvo miniatúrnych prvkov usporiadaných do hustej plošnej štruktúry, vytvorí sa systém, ktorý je schopný snímať obraz. Pri dopade svetelného žiarenia na jeho povrch sa obrazový prvok nabije elektrickým nábojom. S rastúcou intenzitou dopadnutého svetla rastie aj elektrický náboj. Funkciou snímača je premena dopadajúceho svetla na zhľuky viazaných nábojov, akumuláciu nábojov a ich prenos k okrajom čipu tak, aby ich bolo možné spracovávať ako obrazový signál [48][50].

EMCCD kamera je nábojovo viazaná súčiastka vybavená elektrón multiplikátorom. Multiplikátor alebo násobič je vysoko citlivý prístroj, ktorý sa používa na detekciu individuálnych energetických častíc akými sú napríklad elektróny, fotóny alebo ióny. Fotonásobiče sú skonštruované zo sklenenej vákuovej trubice, ktorá obsahuje fotokatódu, niekoľko dynód a anódu. Fotóny dopadajúce na materiál tenkej fotokatódy pri vstupe do prístroja z nej vyrážajú elektróny produkované v dôsledku fotoelektrického javu. Tieto elektróny sú usmerňované fokusačnými elektródami smerom k elektrónovému zosilňovaču. V zosilňovači je elektrónový signál vďaka sekundárnej emisii zosilnený. Zosilnenie je spôsobené kaskádou zrýchlených elektród (dynód), ktoré urýchľujú elektróny na rýchlosť, ktorá im umožňuje generovať pri náraze do dynód nové elektróny, spravidla dvojnásobok pôvodného množstva [50][51].

V týchto detektoroch pixel (snímač tvorený z kremíkovej diódy) je pripojený k regiónu, ktorý slúži ako úložný priestor náboja. Tento región je pripojený k zosilňovaču, ktorý číta množstvo akumulovaného náboja. Dopadajúce fotóny generujú elektronický náboj, ktorý je potom uschovaný v úložnom priestore náboja. V prípade, keď dopadajúce fotóny majú dostatočnú energiu a sú absorbované v regióne, kde dôjde k vyčerpaniu resp. spotrebovaniu, uvoľňuje sa elektrón, ktorý môže byť detegovaný ako náboj. Tieto transmisné a absorpčné vlastnosti kremíka určujú spektrálnu citlivosť detektora.

V CCD sa zvyčajne používa len jeden zosilňovač na rohu celého útvaru a uložený náboj je postupne prevedený cez paralelný register k lineárnemu sériového registru, potom k výstupnému uzlu, ktorý je umiestnený vedľa čítacieho *read-out* zosilňovača.

Výkon CCD snímača posunul hranice v účinnosti detekcie svetla, tento snímač je vysoko citlivý, znižuje šum pri meraní a je schopný zachytávať aj neviditeľné spektrum elektromagnetického žiarenia. Slabinou CCD je skutočnosť, že CCD je v podstate sériový snímač, tým pádom nízky šum je možné dosiahnuť iba na úkor nízkej čítacej rýchlosti. EMCCD snímač ale umožňuje znižovať šum a pracovať pritom s relatívne vysokou rýchlosťou.

EMCCD snímač má v podstate rovnakú štruktúru ako CCD snímač, s prídavkom veľmi dôležitej funkcie. Uložený náboj sa prenáša cez paralelný register k lineárnemu registru presne tak ako pri CCD, ale pred vstupom k výstupnému uzlu je náboj posunutý do dodatočného registra. Tento register slúži ako násobič, v ktorom je náboj zosilnený. Signál tým pádom môže byť zosilnený a šum znížený, čo umožňuje dosiahnuť vyššiu citlivosť EMCCD snímača. CCD a EMCCD snímače majú podobnú štruktúru a podobný čas expozície. Intenzívnejšie CCD kamery sú ale schopné dosiahnuť mimoriadne krátke expozičné časy [49][50].

V obrazovom zosilňovači je umiestená fotosenzitívna plocha nazývaná fotokatóda, ktorá zachytáva dopadajúce fotóny a generuje elektrický náboj. Tento náboj je potom zosilnený a snímaný. Fotokatóda má podobný charakter ako fotosenzitívne oblasti fotonásobiča. Fotonásobiče sú často používané v spektrometroch a v konfokálnom mikroskope. Fotokatóda využíva energiu dopadajúcich fotónov na to, aby uvoľnila elektróny. Uvoľnené elektróny sú potom zrýchlené k elektrónovému multiplikátoru, ktorý sa skladá z radu šikmých trubiek, známych ako *mico-channel plate* alebo mikrokanálový panel. Potenciál zrýchľujúci elektróny umožňuje im získať dostatočnú energiu na to, aby odrazili ďalšie elektróny a tým sa zosilňuje pôvodný signál (viz. nahor odstavec EMCCD kamera). Tento signál potom môže byť detegovaný rôznymi spôsobmi, a to buď priamou detekciou s použitím CCD, alebo nepriamo, pomocou fosforu a CCD.

CCD kamery sú najčastejšie zvolené pre vedecké aplikácie, ktoré vyžadujú citlivosť a dynamický rozsah. Široká škála možností CCD snímača poskytuje perspektívu na výber vhodného senzora s požadujúcimi vlastnosťami a charakteristikami pre veľmi rôzne aplikácie. CCD technológia je pomerne vyspelá a bezkonkurenčná vo vedeckých oblastiach. EMCCD kamera je vhodná v prípade, keď vysoká rýchlosť a citlivosť je hlavnou podmienkou merania – ako napríklad vo fluorescenčnej mikroskopii alebo v ultra-rýchlej spektroskopii [48][50][51].

3. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

V tejto kapitole bola venovaná pozornosť hlavne využívaniu multiparametrickej analýzy v fluorescenčnej chémii a na jej rôzne aspekty a uplatnenie v praxi. Je nutné dodať, že tento typ analýz sa zvyčajne používa na charakterizáciu určitého skúmaného systému a len zriedkakedy je daný experiment zameraný jednoznačne na multiparametrickú analýzu.

Kombinácia konfokálneho mikroskopu so spektrografom, čiže kamerou umožňuje simultánne získať informácie o intenzitnej fluktuácii, fluorescenčných charakteristikách a spektrálnych dátach. Umožňuje tak preskúmať nano-štruktúry a pracovať na úrovni jednej molekuly (*single molecule*). V tejto kapitole sú uvedené príklady použitia multiparametrického analýzy v praxi v súčasnom vedeckom výskume.

Marcelle Köning a **Sebastian Tannert** v roku 2011 publikovali dokument, v ktorom popisali, ako spojili fluorescenčnú mikroskopiu a spektrograf za účelom analýzy jednomolekulového systému.

Používali fluorescenčnú sondu Atto655, ktorá bola imobilizovaná na skle. Na začiatku bolo nutné vykonať FLIM analýzu, čiže Fluorescence Lifetime Imaging – zobrazovanie fluorescenčnej doby života, aby molekula na povrchu skla mohla byť identifikovaná. Molekula sa objavuje ako limitná difrakčná škvrna s fluorescenčnou dobou života približne 4 ns. Niektoré škvrny môžu byť zobrazené s čiernymi čiarami, čo typicky spôsobuje tzv. blikajúce správanie jednotlivých molekúl fluoroforu. Časová krivka fluorescenčnej intenzity ukazuje blikajúce sa správanie jednotlivých molekúl v milisekundovom časovom rozsahu.

Z rovnakého súboru údajov bol vytvorený TCPSC histogram, pomocou ktorého sa presne vykalkulovala fluorescenčná doba života. Samozrejme, aj iné fluorescenčné údaje môžu byť vykalkulované, ako napríklad anizotropia alebo FRET, v závislosti od konfiguračného nastavenia experimentu. Pretože počas tohto experimentu spektrograf bol pripojený k mikroskopu, bolo nutné fluorescenčné žiarenie rozdeliť tak, aby bolo možné súčasne merať fluorescenčné charakteristiky a spektrálne údaje. Fluorescenčná frakcia bola nasmerovaná na spektrograf použitím 20/80 *beamsplitter* (delič lúčov), kde 80 % fluorescenčného žiarenia ide na spektrograf. Pretože detegované fotóny sú rozložené v spektrálnych kanáloch kamery, bol zvolený integračný čas, ktorý zabezpečuje ešte prijateľný šum počas merania. Tento čas bol stanovený na 3 s.

Získané výsledky potvrdili, že spojenie kamery s fluorescenčným mikroskopom otvorí nové perspektivy v oblasti jednomolekulového štúdia. Výsledky potvrdzujú vysokú citlivosť tejto metódy. V závislosti od kontextu daného štúdia, daná časť fluorescencie môže byť použitá na získanie spektrálnych dát. Táto kombinácia navyše umožňuje pozorovať spektrálne údaje v závislosti od času alebo porovnávanie spektra rôznych molekúl [56].

Christian Blum, **Alfred J. Meixner** a **Vinod Subramaniam** publikovali článok o fotofyzikálnej štúdií zelených fluorescenčných proteínov typu *Aequorea* pomocou spektrálne rozlíšenej jednomolekulovej spektroskopie. Je známy fakt, že varianty zeleného fluorescenčného proteínu typu *Aequorea* (GFP) sa vyskytujú vo vzájomne nepremenniteľných, spektroskopicky odlišných formách, ktoré sú ale zatemnené pre bežné spektroskopické techniky, ktoré sú vykonané pri laboratórnej teplote. Analýzou rôznych variantov zelených

fluorescenčných proteínov, konkrétne EYFP a EGFP, pomocou spektrálne rozlíšenej jednomolekulovej spektroskopii sa podarilo zaznamenať spektroskopicky rôzne formy a proteíny a dynamicky monitorovať prechody medzi týmito formami pri laboratórnej teplote.

Okrem prevládajúcej B-formy EYFP bolo detegované modré posunutie I-formy, pritom táto forma bola doteraz pozorovaná len pri kryogénnych teplotách. Prechod medzi týmito formami bola tiež registrovaná. Ďalej pre EYFP a pre EGFP identifikovali tri ďalšie doposiaľ neznáme formy s červeným fluorescenčným posunom. Medzi dominantnými formami a červeno-posunutými formami je tzv. „tmavý čas“. Tento tmavý čas naznačuje existenciu nefluoreskujúceho medziproduktu. Spektrálna poloha novoidentifikovaných foriem s červeným posunom a ich tvorba cez nefluorescenčný medziprodukt naznačuje, že tieto stavy môžu predstavovať potenciálnu fotoaktiváciu pozorovanú v hromadných experimentoch.

Všetky jednomolekulové experimenty boli vykonané pri laboratórnej teplote v prírodných podmienkach. Obrázky znázorňujúce intenzitu fluorescencie boli získané rastrovým snímaním vzorky a intenzita emisie bola zaznamenaná pomocou lavínovej fotodiódy. Zo získaných obrázkov boli selektované odlišne fluorescenčné škvrny na spektrálnu analýzu. Fluorescenčné spektrá boli získané pomocou spektrometra a chladenou CCD kamerou. Boli zaznamenávané spektrálne sekvencie ako rýchla následnosť jednomolekulových fluorescenčných spektier až do konečného vyblednutia molekúl. Akvizičný čas na každé spektrum bola jedna sekunda.

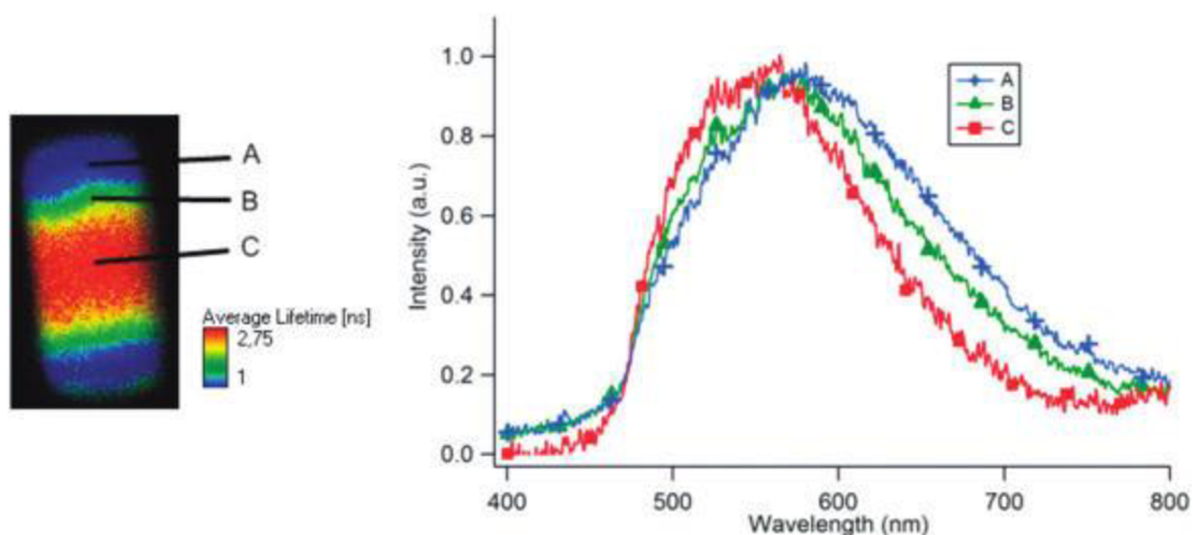
Ukázalo sa, že spektrálne rozlíšená jednomolekulová spektroskopia dokáže identifikovať spektrálne odlišnú podmnožinu, napriek tomu, že tieto formy GFP sú takmer nerozlíšiteľné. Kombinácia FLIM a spektrografu vykazuje veľmi presné výsledky a vysokú citlivosť, ktorá dovoľuje zaznamenávať aj malé spektrálne zmeny. Fluorescenčné proteíny sa prejavujú ako spektrálne veľmi dynamické systémy, ktoré vykazujú intenzitné zmeny príslušných spektier ako aj spektrálne prepínanie na danú, spektrálne jasne odlišnú formu. Pozorovaná spektrálna dynamika a všestrannosť sú prejavom vnútornej pružnosti a variability v bielkovinovom prostredí obklopujúceho chromofora, ktorý možno pozorovať len na úrovni jednej molekuly v dôsledku priemerovania súborov počas hromadných experimentoch [57].

Frank Stracke, Stefan Becker a spol. publikovali článok, v ktorom študovali dvojité a viacúrovňové spektrálne prepínanie jednotlivých polystyrénových molekúl. V jednotlivých molekulách fluorescenčného farbiva PI a DAPI v polystyréne boli pozorované rôzne spínacie procesy so skokmi medzi dvomi alebo viacerými spektrálnymi stavmi. Spínacie procesy boli zistené v temporálnych trajektóriách takmer každého spektrálneho parametra. Pomocou fluorescenčných a hlavne spektroskopických metód boli vykonané štatistické analýzy rozloženia skokových šírok a korelácie medzi nimi. Týmto spôsobom bolo možné rozlišovať medzi vonkajšími a vnútornými mechanizmami, ktoré aktivujú spínaciu dynamiku aj bez predpokladu o povahe samotného mechanizmu. Ďalej pomocou multiparametrickej analýzy bolo dokázané, že fluorescenčné sondy PI a DAPI sa správajú značne odlišne v prípade jednomolekulovej spektroskopie napriek tomu, že vo veľkom objeme vykazujú takmer identické chovanie.

Pri tomto experimente používali zase kombináciu fluorescenčného konfokálneho mikroskopu spojeného so spektrografom. Táto metóda je natoľko citlivá, že je schopná detegovať na molekulovej úrovni fluorescenčné žiarenie. Pomocou CCD kameryvedci boli

schopní identifikovať rôzne odlišné spektrálne stavy jednotlivých molekúl. Princípy tohto štúdia sa dajú ľubovoľne preniesť do akéhokoľvek host'-hostiteľského systému, pomôžu takto charakterizovať dynamické správanie luminiscenčných častíc. Platí, že štúdium dynamiky väčšieho počtu molekúl týmto spôsobom má v budúcnosti veľký potenciál, hlavne pre presnú analýzu a podrobnejší popis dynamických procesov fluorescenčných farbív prostredníctvom multiparametrickej analýzy a štatistickej identifikácie vnútorne riadeného prepínania, ale aj pre štúdium špecifickej dynamiky polymérov [56].

Zaujímavý článok publikovali **Cheng-Che-Chu, Guillaume Raffy** a spol. o štúdiu supramolekulárnych fullerénov schopných sebazostavovania prostredníctvom interakcií vodíkových väzieb. Používali fluorescenčný mikroskop, pomocou ktorého stanovili fluorescenčnú dobu života používanej sondy, ktorá bola naložená do kryštálovej štruktúry fullerénov. Sonda vykazovala nehomogénnu distribúciu dôb života, čo naznačoval tri odlišné nanografické prostredia v rámci kryštálu.



Obrázok 10: Fluorescenčná sonda naložená do kryštálu vykazuje nehomogénnu distribúciu dôb života. Pomocou spektrografu boli identifikované emisné spektrá odlišných emisných druhov, označených ako A, B, C [58].

Normalizované emisné spektrá získané pomocou spektrografu ukazujú odlišnú intenzitu fluorescenčného žiarenia rôznych emisných druhov fluorofora. Táto distribúcia naznačuje, že štruktúra kryštálu nie je homogénna, avšak poskytuje priestrané dutiny [58].

Na základe rôznych publikácií môžeme skonštatovať, že multiparametrická analýza fluorescenčných charakteristík poskytuje rýchle a spoľahlivé výsledky. Táto metóda a kombinácia mikroskop-spektrograf umožňuje vykonať veľmi citlivé merania, a charakterizovať daný systém na molekulovej úrovni. Multiparametrická analýza sa považuje za veľmi mnohostrannú a univerzálnu techniku, ktorá umožňuje spojiť odlišné technológie, ako napríklad FLIM, FRET, TCSPC alebo anizotropické metódy so spektrálnymi technikami, a to všetko v jednom kroku bez manipulácie so skúmaným systémom.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Použité chemikálie

Tabuľka 1: Použité chemikálie

<i>Hydroxid sodný</i>	NaOH M_w : 39,99 g · mol ⁻¹	PENTA č. šarže: 1905160514 CAS: 011-002-00-6
<i>Dihydrogénfosforečnan draselný</i>	KH ₂ PO ₄ M_w : 139,09 g · mol ⁻¹	Lach:ner č. šarže: PP/2009/00261 CAS: 231-913-4 Life Technologies
<i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i>	(CH ₃) ₂ SO M_w : 78,13 g · mol ⁻¹	č. šarže: P35379 CAS: 67-68-5
<i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i>	(CH ₃) ₂ SO M_w : 78,13 g · mol ⁻¹	Life Technologies č. šarže: S23921
<i>SNARF-4F</i>	C ₃₂ H ₂₄ FNO ₉ M_w : 585,54 g · mol ⁻¹	Life Technologies č. šarže: S23921
<i>Voda čistená (Mili Q) Glycerol</i>	Prístroj: PURELAB – flex	Milipore academic

4.2. Prístroje a vybavenie

4.2.1. METTLER TOLEDO S20 SevenEasy – pH meter

pH meter typu *SevenEasy* je jednokanálový prístroj určený pre rutinné meranie pH a vodivosti. Je dôležité, aby prístroj bol kalibrovaný pred meraním, kalibrácia sa uskutočňuje pomocou roztoku pufru so známym pH (najčastejšie to je pH 7), pretože pufr bude udržiavať svoju hodnotu pH aj v prípade prítomnosti kontaminácie. Rozsah merania v prípade merania vodivosti: -1999 až 1999 mV s presnosťou a rozlíšením 1 mV. V prípade merania pH: 0,00 až 14,00 (pH škála) s presnosťou a rozlíšením 0,01. pH meter používa polymérnu elektródu s otvoreným krytom a portom, čo zabezpečuje voľný tok iónov a tým pádom rýchlu odozvu aj vo veľmi hustých roztokoch. Elektróda je odolná voči tlaku a pracuje pri teplote od -5 až 110° C, čo umožňuje meranie pri rôznych dávkovacích cykloch. Tento typ elektródy nemôže byť naplnený, tým pádom údržba je veľmi jednoduchá.

4.2.2. Aminco Bowman Series 2 – luminiscenčný spektrometer

Vysokovýkonný fluorescenčný spektrometer Aminco Bowman (*ThermoFisher*) pracuje s duálnym svetelným zdrojom, vďaka osvetľovaciemu systému, konfigurácii (L a T) a horizontálnej geometrii lúča je tento spektrometer relatívne citlivý a tým pádom je schopný zaznamenať aj pomerne nízku intenzitu fluorescencie. Pracuje xenónovou výbojkou s rozsahom vlnových dĺžok od 220 do 850 nm, s presnosťou ±0,50 nm. Rýchlosť skenovania sa pohybuje

v rozmedzí od 3 do 6000 nm/min, ako detektor sa používa fotoelektrický násobič. Luminiscenčný spektrometer Aminco Bowman sa používalo na sledovanie fluorescenčnej intenzity počas doby hydrolýzy sondy – sonda SNARF-4F vykazuje fluorescenciu až po hydrolýze sondy v roztoku.

4.2.3. Fluorocube – spektrofluorimeter na princípu TCSPC

Fluorocube od firmy *Horiba Scientific* je luminiscenčný spektrofluorimeter pracujúci na princípe TCSPC. Tento prístroj používa ako zdroj žiarenia sadu nanosekundovej LED laserovej diódy, tým pádom umožňuje prácu s rôznymi vlnovými dĺžkami, od 260 do 740 nm. Excitačný zdroj pracuje s frekvenciou 1MHz. TBX pikosekundový fotón-detektor modul zabezpečuje, aby systém detegoval s vysokým rozlíšením, 20 ps/kanál. Elektronika umožňuje merať v rozsahu od pikosekúnd do sekúnd, v závislosti od excitačného zdroja. Systém zahŕňa aj emisný monochromátor, ktorý prepúšťa len vybraný úsek spektra, tým pádom umožňuje meranie časovo rozlíšených emisných spektier. Systém obsahuje rôzne filtre a polarizátory umožňujúce merať anizotropiu. Rozsah dôb života je od 10^{-10} do 10^{-6} s. Fluorocube umožňuje merať kvapalné aj pevné vzorky. Kvapalné vzorky môžu byť počas merania premiešané.

4.2.4. MicroTime 200 – konfokálny fluorescenčný mikroskop

Prístroj MicroTime 200 od firmy PicoQuant s konfokálnym mikroskopom Olympus IX71 je kompletný konfokálny systém s laserovou a multikanálovou detekčnou jednotkou. Diódy umožňujú excitáciu v širokom rozsahu od 375 do 640 nm (resp. 1030 nm v prípade femtosekundového laseru). Prístroj obsahuje sadu dichroických zrkadiel a 4 detektory typu SPAD, dva v hlavnej časti prístroja a dva vo vedľajšej časti. Systém umožňuje pracovať v TCSPC a TTR režimu pre skúmanie dynamiky FCS a FLIM. Počas merania sú k dispozícii rôzne filtre, *long pass* a *short pass*. Pre každé meranie je potrebné vybrať vhodný filter. Piezo (tlakový) skenovací režim umožňuje 2D a 3D zobrazenie dôb života a presné určenie danej polohy. Ďalej, systém obsahuje dva voliteľné výstupné porty pre ďalší hardvér, napríklad spektrograf.

4.2.5. Andor CCD kamera - spektrograf

Andor kamera je v podstate konvenčný CCD detekčný systém, optimalizovaný pre vysokovýkonné spektroskopické aplikácie. Kamera typu Newton od firmy Andor Technologies je schopná zaznamenať 1600 spektra za sekundu, chladič pracuje až do -100° C. Kamera sa používa na veľmi rýchle meranie v ultrafialovej, viditeľnej a blízkej infračervenej oblasti spektra. Prístroj má vysoké rozlišovacie schopnosti ($13,5 \times 13,5$ μ m pixelov). Pracuje s frekvenciou 3 MHz, rýchlosť snímania pixelov je 12,9 μ s. Výkon zosilňovača sa reguluje pomocou softvéru podľa potreby. QE, čiže kvantová účinnosť sa pohybuje medzi 80 až 95 %. Kvantová účinnosť definuje pravdepodobnosť detekciu fotónu pri určitej vlnovej dĺžke. V prípade tejto kamery platí, že nízky šum je možné dosiahnuť iba na úkor nízkej čítacej rýchlosti.

4.2.6. Použité softvéry

Tabuľka 2: Použité prístroje a programy

Aminco Bowman Series 2	AB2 (<i>ThermoFisher</i>)	získanie spektier ustálenej fluorescencie
Fluorocube	DataStation v2.4 (HORIBA Jobin Yvon Inc.)	získanie dát meraných metódou TCSPC, anizotropické meranie
	DAS6 (HORIBA Jobin Yvon Inc.)	analýza poklesu intenzity fluorescencie, analýza anizotropických meraní
Microtime 200	Symphotime 64 (PicoQuant)	analýza a získanie dát meraných metódou TCSPC, anizotropické meranie
Newton Kamera	Solis (i) (Andor Technologies)	získanie fluorescenčných emisných spektier

4.3. Príprava zásobných roztokov a príprava vzoriek

Zásobné roztoky pufrův s 5 rôznymi pH boli pripravené použitím NaOH a KH_2PO_4 rozpusteným v Mili Q vode. Podľa teoretických výpočtov sa zistilo potrebné množstvo NaOH a KH_2PO_4 , vypočítané množstvo bolo navážené na analytických váhach tak, aby výsledná koncentrácia roztokov bola približne 0,05 M v 500 ml roztoku. Roztoky boli miešané 30 minút na magnetickom miešadle. Hodnota pH sa overila na pH metri typu METTLER TOLEDO S20 *SevenEasy*. Týmto postupom nachystané pufrův boli ďalej skladované v tme pri laboratórnej teplote.

Podľa predošlých meraní na prístroji Fluorocube bola experimentálne stanovená optimálna koncentrácia fluorescenčnej sondy v roztoku. Táto najvhodnejšia koncentrácia bola stanovená na 10^{-6} M. Tým pádom fluorescenčné charakteristiky sondy SNARF-4F budeme sledovať pri rovnakej koncentrácii.

Vzorky SNARF-4F výrobca Life Technologies dodáva v ampulách, každá ampula obsahuje 50 μg vzorky (viz. prílohy). Zásobný roztok sondy bol pripravený pridaním potrebného množstva dimethylsulfoxida ku 50 μg sondy. Zásobný roztok je nutné skladovať v chladničke, bez prítomnosti svetla, ampulka musí byť pevne zazátkovaná.

Zo zásobného roztoku bol odpipetovaný príslušný objem tak, aby v 4 ml roztoku pufru bola výsledná koncentrácia fluorescenčnej sondy SNARF-4F 10^{-6} M. Týmto postupom nachystané vzorky boli skladované pri laboratórnej teplote, v tme.

Následne boli pripravené zásobné roztoky glycerínu s rôznymi pH, podľa tabuľky:

Tabuľka 3: Zásobné roztoky glycerínu

pH	Objemový zlomok glycerínu [%]
6	30
	40
	50
7	30
	40
	50
9	30
	40
	50

Pri príprave roztoku glycerínu sa používali predom nachystané zásobné roztoky fosfátových pufrov. Najprv pomocou pH metra METTLER TOLEDO *S20 SevenEasy* bolo overené pH zásobného roztoku, ďalej bolo odpipetované potrebné množstvo pufru a potrebné množstvo glycerínu (99,9%) tak, aby výsledný objem zásobného roztoku bol 50 ml a výsledný objemový zlomok glycerínu v roztoku by bol 30 %, 40 % a 50 %.

Po nachystaní zásobných roztokov glycerínu bolo nutné overiť pH na pH meteri a v prípade potreby korigovať pH na presnú hodnotu. Vzorky boli 30 minút miešané na magnetickom miešadle a uchované pri laboratórnej teplote bez prítomnosti slnečného svetla.

Použitím glycerínových zásobných roztokov s rôznym pH boli nachystané vzorky obsahujúce fluorescenčnú sondu SNARF-4F. Zo zásobného roztoku sondy s DMSO bol odpipetovaný príslušný objem do vialiek a následne bol pridaný 4 ml glycerínový roztok s patričným pH a objemový zlomok.

Tabuľka 4: *Pripravené zásobné roztoky*

Zásobný roztok	pH	Podmienky skladovania	Koncentrácia [%]
SNARF-4F v DMSO	×	4°C, v tme	
Fosfátový pufor	6	Laboratórna teplota, bez prítomnosti svetla	×
	7		
	7,4		
	8		
	9		
Glycerínový roztok	6		30, 40, 50
	7		30, 40, 50
	9		30, 40, 50

4.3.1. Nastavenie prístroja podľa požiadaviek

V prvom rade bolo nutné získať emisné a excitačné spektrá fluorescenčnej sondy typu SNARF-4F, pretože tieto údaje sú podstatné pre nasledujúce meranie. Na tento účel bol použitý luminiscenčný spektrometer Aminco Bowman Series 2. Kvapalné vzorky boli merané v štandardných kremenných kyvetách. Spektrá boli skúmané po 1 nm s použitím bandpass filtru. Citlivosť prístroja bola regulovaná automaticky, v prípade slabej odozvy bol zapnutý režim vysokého napätie (800 V). Rýchlosť skenovaniu bola nastavená na 5 nm/s. Pomocou spektrometra bol stanovený excitačný a emisný rozsah sondy:

Tabuľka 5: *Fluorescenčné vlastnosti fluoroforu*

Rozsah excitačného spektra	350 – 650 nm
Rozsah emisného spektra	540 – 750 nm
Ideálna excitačná vlnová dĺžka	488 nm alebo 530 nm
Maximum fluorescenčnej emisie	580 nm a 640 nm

Správnosť nameraného rozsahu emisného spektra bola overená na prístroji Fluorocube. Časovo rozlíšené fluorescenčné merania tiež prebiehali na zariadení na prístroji Fluorocube pri laboratórnej teplote. Pri meraní kvapalných vzorcov je vždy nutné stanoviť signál lampy, čiže prompt pomocou koloidného kremíka (ludox), pričom emisný monochromátor bol nastavený na vlnovú dĺžku použitej nanoLED diódy.

Experiment prebiehalo v reverznom režime, najprv bola nameraná odozva prístroja pre nasledujúcu dekonvolúciu. V prípade veľmi vysokých fluorescenčných intenzít je nutné použiť neutrálne filtre podľa potreby. Všetky kvapalné vzorky boli merané pomocou nanoLED diódy s vlnovou dĺžkou 508 nm a dĺžkou pulzu 1,2 ns. Počas meraní bol excitačný polarizátor

nastavený na 0° a emisný polarizátor na magický uhol, čiže $54,75^\circ$. Meškanie signálu bolo nastavené (coaxial delay) na 65 ns, rozsah TAC bol nastavený na 100 ns, synchronizačné meškanie (sync. delay) na 50 ns, počet nameraných fotónov v maxime poklesu (peak preset) bol nastavený na 10 000, pričom na krajoch emisného spektra počet fotónov bol zmenený na 5000 – v tomto prípade bolo nutné urobiť nový prompt. Opakovacia frekvencia diódy (repetition rate) bola nastavená na 1 MHz. V kvapalných roztokoch bol pokles intenzity fluorescence meraný od 530 nm do 750 nm s krokom 10 nm v štandardnej kremennej kyvete.

Fluorescenčný mikroskop MicroTime 200 bol použitý v režime TCSPC na meranie fluorescenčných dôb života. Na excitáciu sa používal laser s vhodnou vlnovou dĺžkou, v našom prípade s 510 nm. Frekvencia laseru počas experimentu bola 40 MHz a intenzita sa pohybovala okolo hodnoty $6 \mu\text{W}$. Na základe spektrálnych charakteristík používanej fluorescenčnej sondy SNARF-4F bola zvolená vhodná kombinácia excitačného laseru a emisného filtra pre jednotlivé experimenty. Počas meraní bol použitý emisný filter 550/49. Bolo nutné vylúčiť pík Ramanovho rozptylu vo vodných roztokoch. Doba záznamu sa pohybovala v rozmedzí 6 až 12 minút, na základe odozvy skúmanej látky. Analyt bol nanesený na čisté sklíčko pomocou automatickej pipety, sklíčko bol upevnené v držiaku a umiestené na príslušný stolík nad objektívom.

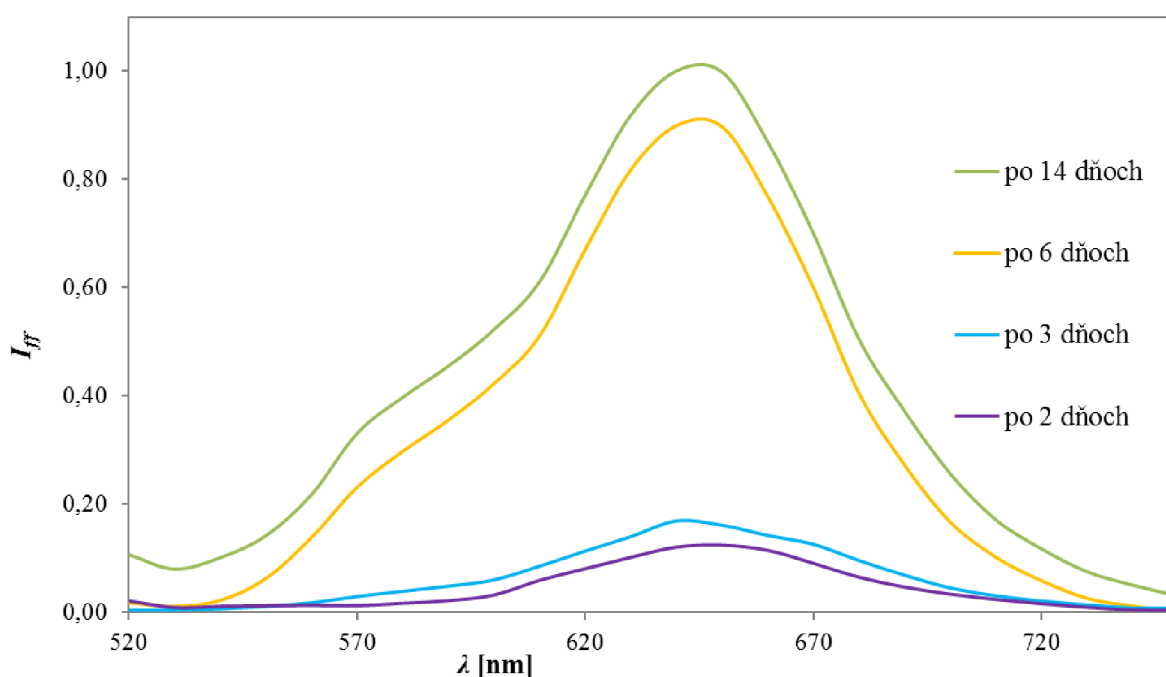
Spektrograf je priamo spojený s fluorescenčným mikroskopom. Po manuálnom zapnutí je nutné nastaviť teplotu ochladzovania, v našom prípade na -80°C a počkať, kým systém dosiahne zvolenú hodnotu. Okrem iných, cieľom tejto práce bolo experimentálne zistiť vhodné nastavenie spektrografu a na základe získaných informácií vytvoriť štandardný operačný postup na ovládanie tohto prístroja, tým pádom podrobnejší popis nastavenia a operačný postup je priložený ako príloha v tomto dokumente.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1. Stanovenie vhodného času merania fluorescenčných charakteristík

Fluorescenčná sonda SNARF-4F AM je pH citlivá sonda, určená primárne pre aplikáciu v živých bunkách. Nabitá forma danej sondy nie je schopná prestúpiť do bunky, preto je nutné chemicky modifikovať fluorescenčné farbivo tak, aby molekula bola neutrálna. Táto forma ale nie vždy vykazuje fluorescenciu. Až po transporte sondy do vnútra buniek je neutrálna forma farbiva pomocou nešpecifických endogénnych bunkových esteráz premenená na nabitú formu. Tým pádom nehydrolyzovaná forma fluorescenčných farbív obsahujúcich AM esterovú skupinu nevykazuje fluorescenciu – len hydrolyzovaná forma sondy fluoreskuje.

Pretože náš experiment neprebíha vnútri buniek, fluorescenčné farbivo nevykazuje fluorescenciu okamžite. Hydrolyzuje sa v roztoku postupne, tým pádom bolo potrebné sledovať intenzitu fluorescencie a stanoviť čas, kedy sonda vykazuje najintenzívnejšiu fluorescenciu, resp. dostačujúcu na meranie fluorescenčných charakteristík. Po nachystaní roztoku so sondou bola sledovaná intenzita fluorescencie pomocou stacionárnej fluorescencie v rôznych časových intervaloch: okamžite po nachystaní, 12 hodín po nachystaní, 24 hodín, 48 hodín, 72 hodín atď. Pomocou tohto experimentu bolo dokázané, že sonda SNARF-4F AM vykazuje najvýhodnejšiu fluorescenciu v roztoku po 14 dňoch. Táto informácia je esenciálna pre nasledujúce merania.



Obrázok 11: Graf znázorňuje zmenu fluorescenčnej intenzity v závislosti na čase v roztoku o pH 7,4

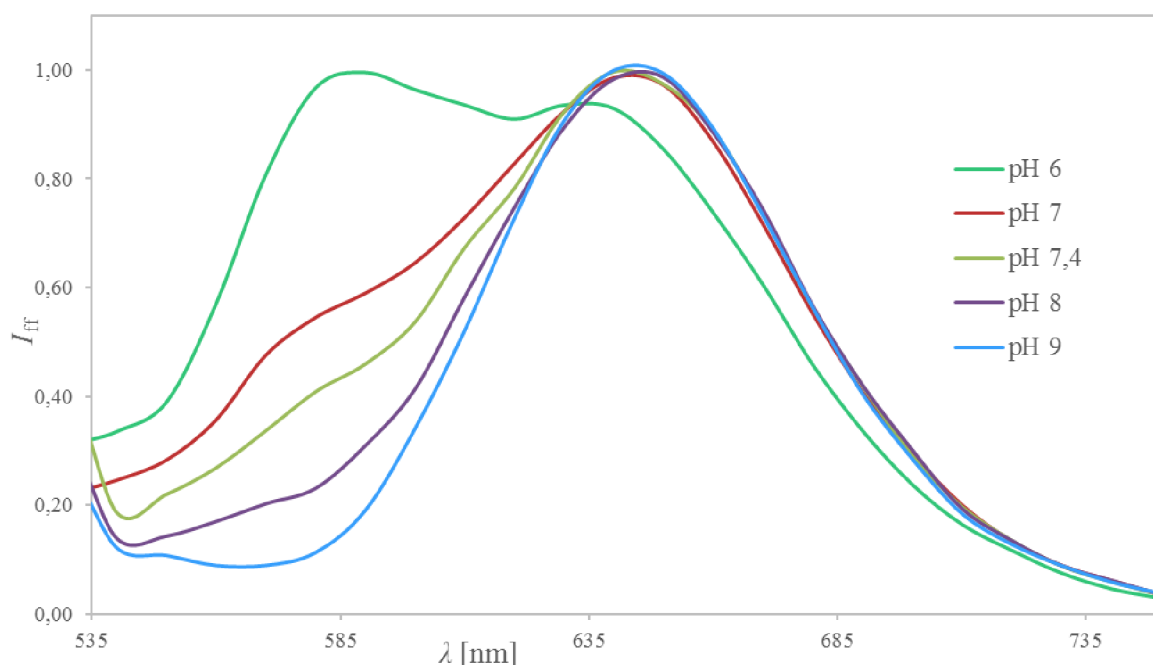
5.2. Prvotné overovanie koncentrácií SNARF-4F AM vo fosfátovom pufrí

V pôvodne nachystanom fosfátovom pufrí bola rozpustená fluorescenčná sonda SNARF-4F. V tomto experimentu pH fosfátového pufru nehrá dôležitú rolu, tým pádom bolo zvolené ľubovoľné pH. Pretože cieľom tohto experimentu bolo stanoviť vhodnú koncentráciu sondy pre meranie, roztok so sondou bol pripravený vo viacerých koncentráciách, konkrétne: 10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, $8 \cdot 10^{-6}$ M. Pomocou stacionárnej fluorescencie boli namerané excitačné a

emisné spektrá vzorky, na základe obdržaných výsledkov sa usúdilo, že najvhodnejší roztok pre tento experiment je roztok s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6}$ M. Optimálna koncentrácia znamená, že pri koncentrácii $8 \cdot 10^{-6}$ M v systéme nevznikajú nežiaduce agregáty sondy a intenzita fluorescence je dostatočujúca a umožňuje rýchlejší zber dát.

5.3. Emisné spektrum fluorescenčnej sondy SNARF-4F AM pomocou prístroja Fluorocube

V prvom rade bolo nutné namerať emisné spektrá fluorescenčnej sondy v roztokoch s rôznym pH pomocou prístroja Fluorocube. Tieto hodnoty slúžia hlavne na overovanie správnosti a prirovnaní nameraných dát pomocou spektrografu Newton. Ďalším cieľom tohto experimentu bolo zistiť, ako sa mení tvar emisného spektra v závislosti od zmeny pH v prostredí, kde sa nachádza sonda. Emisné spektrum bol namerané po 1 nm, všetky vzorky boli namerané trikrát, bola použitá vypočítaná priemerná hodnota na znázornenie dát.

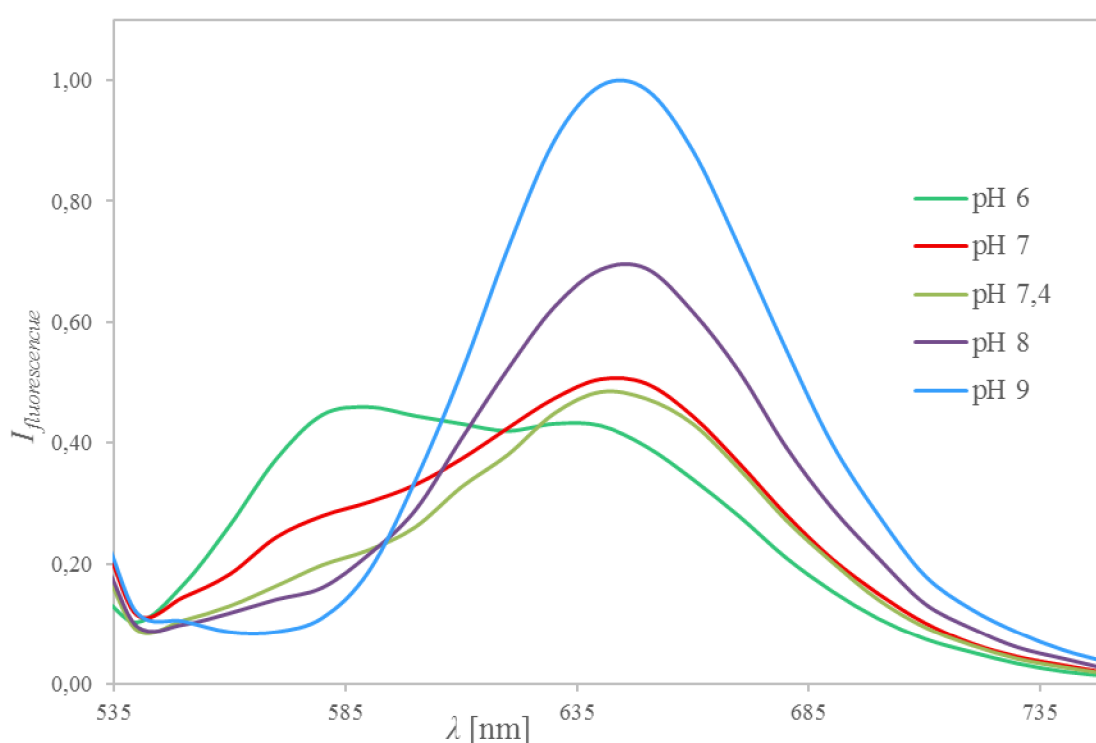


Obrázok 12: Normalizované emisné spektrá sondy SNARF-4F v roztoku pri rôznych pH

Emisné spektrum sondy ukazuje, že SNARF-4F vykazuje fluorescenciu v rozsahu 540 nm až 750 nm. Je dôležité poznamenať, že fluorescenčné farbivo mení tvar svojho emisného spektra v závislosti od pH. V mierne kyslom prostredí má sonda dve emisné maximá, a to pri 580 nm a 640 nm, pričom platí, že pri vlnovej dĺžke 580 nm sonda vykazuje intenzívnejšiu fluorescenciu ako v menej energetickej oblasti emisného spektra. Platí ale, že so zvyšujúcim sa pH hodnota intenzity emisného maxima v bode 580 nm začne klesať, pri pH 8 už vôbec nie je prítomné toto emisné maximum – dominuje emisné maximum pri 640 nm. Môžeme skonštatovať, že sonda reaguje na zmenu pH prostredia posunom emisného spektra (resp. maxima). Všeobecne platí, že tieto spektrálne posuny umožňujú tzv. pomerové štúdium alebo meranie, pričom pomer fluorescence pri dvoch rôznych vlnových dĺžkach je nezávislý od celkovej koncentrácie sondy, od *photobleaching* (fotochemická deštrukcia fluoroforov) alebo od inštrumentálnych podmienok, ktorými sú napríklad dĺžka optickej dráhy, excitačná intenzita alebo citlivosť detektora.

Je veľmi pravdepodobné, že sonda SNARF-4F AM má v roztoku dve formy, protonovanú (AH^*) a deprotonovanú (A^*), a to vďaka protolytickým procesom odohrávajúcim sa v prostredí. Protonovaná forma sondy, čiže AH^* je viac prítomná v kyslom prostredí, pričom deprotonovaná forma v zásadnom, preto pri zvyšujúcom pH sa znižuje fluorescenčná intenzita emitovaná protonovanou formou sondy – pri vysoko zásadných pH (8 alebo 9) už vôbec nie je prítomný tento emisný druh sondy, fluorescenčné žiarenie emituje len deprotonovaná, zásadná forma. Pomocou nameraných výsledkov môžeme odvodiť, že intenzita protonovanej a deprotonovanej formy sondy je rovnaké pri pH približne 6,4. Protolytické rovnováhy odohrávajúce v excitovanom stave sú často odlišné od tých, ktoré sa odohrávajú v základnom stave, pretože pri excitácii sa odohrávajú procesy súvisiace s redistribúciou napätia [55].

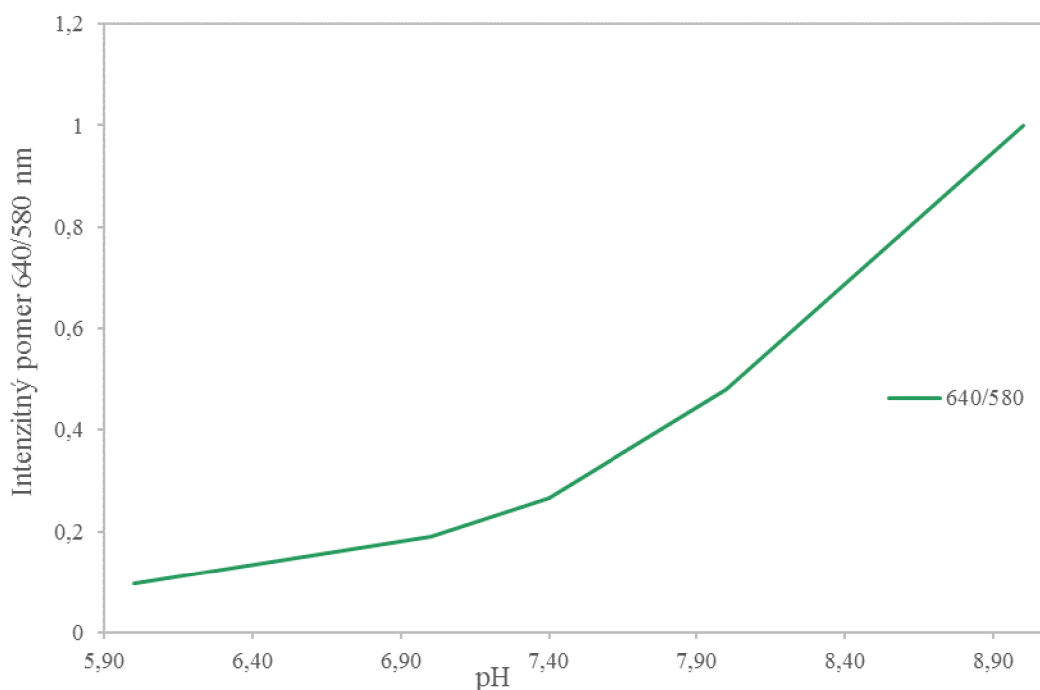
Intenzita fluorescence je tiež závislá od pH prostredia, čo potvrdzuje nasledujúci grafikon:



Obrázok 13: Schéma znázorňuje závislosť fluorescenčnej intenzity sondy SNARF-4F AM od pH prostredia

Intenzita fluorescence sa so zvyšujúcou sa hodnotou pH zvyšuje. Táto vlastnosť sondy sa dá využívať napríklad v prípade, keď cieľom danej štúdie je charakterizovať rôzne organely s odlišným pH – takto intenzita fluorescence v kyslých organeloch bude menej intenzívna.

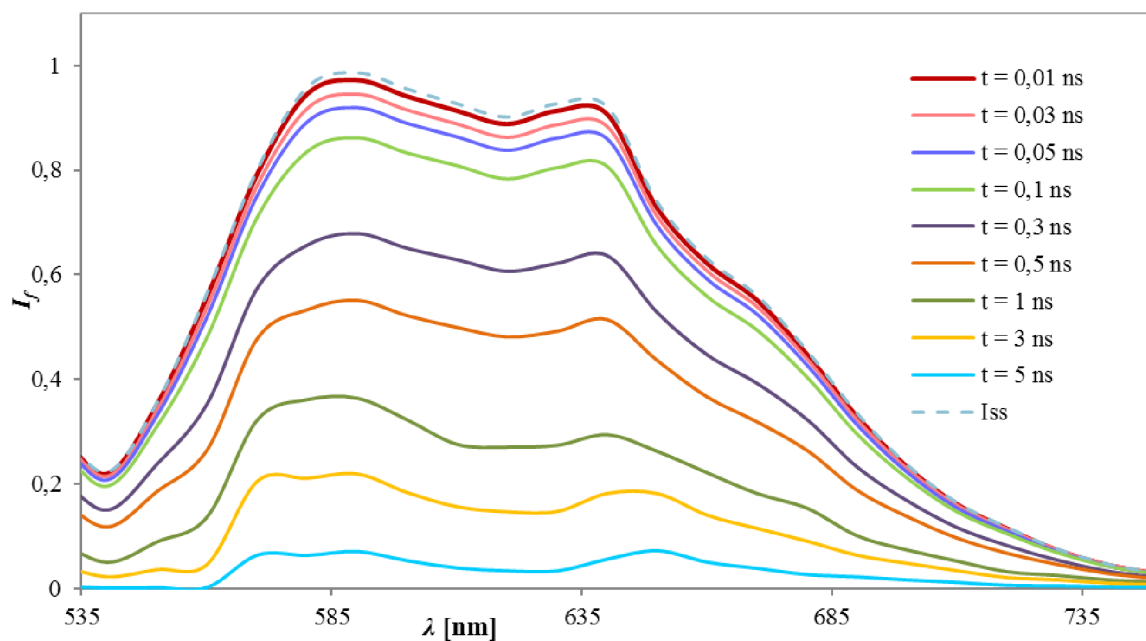
Napríklad v prípade determinácie pH v biofilmoch, pomer emisnej intenzity pri 640 nm a 580 nm hrá dôležitú rolu. Napríklad 640/580 nm tiež ukazuje na fakt, že tento emisný pomer je proporcionálny k pH prostredia.



Obrázok 14: Schéma znázorňujúca korešpondujúce pomery intenzít pri vlnovej dĺžke 640 nm a 580 nm – emisný pomer je proporcionálny k pH

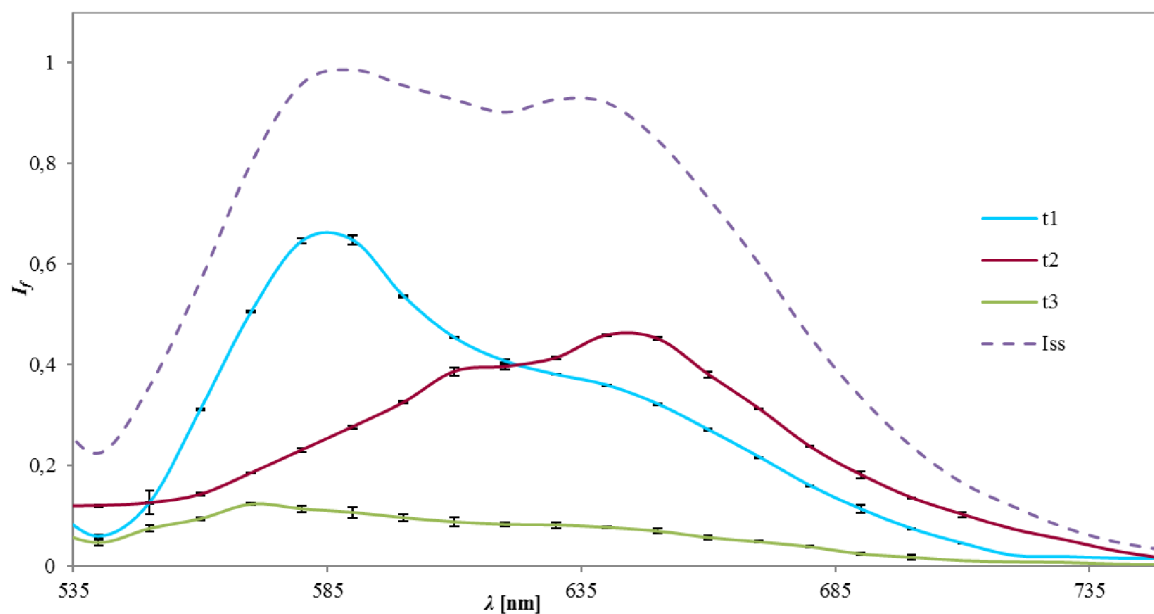
5.3.1. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 6

Najskôr bol preskúvaný $8 \cdot 10^{-6}$ M roztok fluorescenčnej sondy v prostredí s rôznym pH. Táto koncentrácia sondy umožňovala relatívne rýchly zber dát. Namerané emisné spektrá boli používané na rekonštrukciu časovo rozlíšených emisných spektier. Na základe nameraných dát bolo vytvorené TRES fluorescenčnej sondy v každom roztoku s odlišným pH.



Obrázok 15: TRES - SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v pufrí s pH 6

TRES vykazuje dva emisné píky, pričom emisný pík pri kratších vlnových dĺžkach vykazuje malé odchýlenie od 580 nm až do 590 nm. Pri dlhších časoch sa maximum vyskytuje pri 580 nm, ale pri kratších časoch (0,5 až 0,01 ns) sa blíži k vlnovej dĺžke 590 nm. Druhý emisný pík sa nachádza pri 640 nm. Poklesy intenzity fluorescence sú uvedené s presnosťou ± 5 nm, pretože emisné spektrum od 520 nm do 750 nm bolo namerané s krokom 10 nm. I_{ss} je intenzita fluorescence nameraná pomocou metódy stacionárnej fluorescenčnej spektroskopie. Vodné prostredie je málo viskózne, čo znamená, že čas relaxácie rozpúšťadla nie je porovnateľný s fluorescenciou.



Obrázok 16: Dekonvolúcia emisného spektra SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v roztoku s pH 6

Získané poklesy intenzity fluorescence pri jednotlivých vlnových dĺžkach s krokom 10 nm umožnili vytvoriť dekonvolúciu emisného spektra fluorescenčnej sondy. Dekonvolúcia preukázala, že SNARF-4F AM má v pufrí tri emisné druhy. Emisný druh číslo 1 (označený ako $t1$) má najintenzívnejšie relatívne nastúpenie, jeho maximum emisie sa nachádza pri 580 nm. Hodnota intenzity emisie postupne klesá so zvyšujúcou sa hodnotou vlnovej dĺžky, avšak okolo 640 nm vykazuje malú odchýlku – intenzívnejšiu emisiu. Tento emisný druh je dominujúci až do 620 nm. Emisný druh číslo 2 (označený ako $t2$) je tiež prítomný v celom emisnom spektre, avšak do 620 nm má menej intenzívnejšiu emisiu žiarenia ako emisný druh číslo 1. Od 620 nm až do 750 nm dominuje druhá emisná forma sondy, pričom jej emisné maximum sa nachádza v bode 640 nm. Tretí emisný druh má veľmi malé relatívne zastúpenie, napriek tomu je prítomný v celom emisnom spektre, maximum emisie vykazuje pri 580 nm. Intenzita tejto emisnej formy sondy potom postupne klesá.

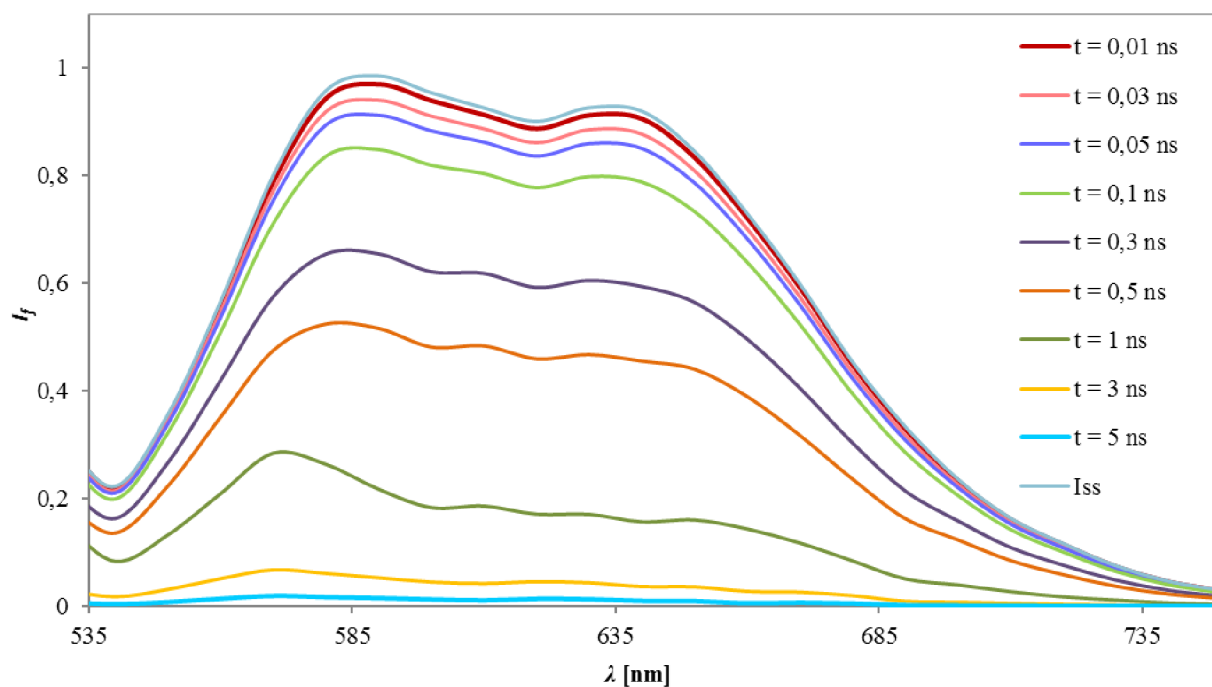
Doba života prvej emisnej formy bola stanovená na $\approx 0,40$ ns (jej hodnota sa pohybovala v rozmedzí 0,38 až 0,42 ns). Tento emisný druh pravdepodobne vykazuje protonovaná forma sondy AH^* , ktorá má emisné maximum pri kratších vlnových dĺžkach spektra. Druhá emisná forma, intenzívnejšia pri dlhších vlnových dĺžkach, je tým pádom deprotonovaná forma sondy A^* , ktorá je intenzívna pri vysokých pH. Priemerná doba života tejto formy sondy bola stanovená na $\approx 0,73$ ns. Tretí emisný druh sondy má tiež emisné maximum v bode 580 nm, čo

naznačuje, že ide o protonovanú formu sondy, ktorá sa prejavuje intenzívnejšie v kyslom prostredí. Priemerná doba života tretej emisnej formy bola stanovená na 2,80 ns.

Na základe nameraných a vypočítaných dát môžeme skonštatovať, že fluorescenčná sonda SNARF-4F AM má v pufrí s pH tri emisné druhy, pričom dva emisné druhy sú prítomné v roztoku v protonovej forme. Jedna forma má veľmi krátku fluorescenčnú dobu života, ale vykazuje intenzívnejšiu emisiu ako druhá, ktorej doba života je dlhšia.

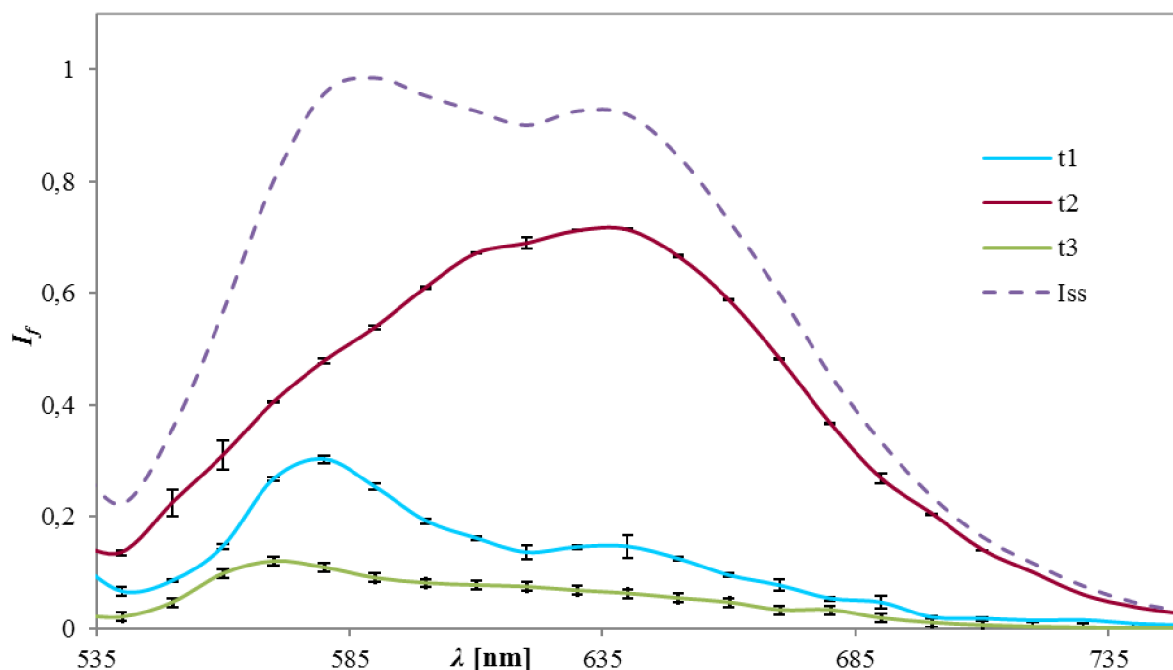
5.3.2. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 7

Na základe nameraných dát bolo zostrojené emisné TRES, ktoré vykazuje dva emisné píky, podobne ako sonda v roztoku s pH 6. Je dôležité poznamenať, že v čase 3 ns a 5 ns po excitácii emisné maximum pri 640 nm je menej preukázateľné. Maximum emisie pri kratších vlnových dĺžkach sa v pozorovaných časových intervaloch posunulo od 580 nm do 585 nm, ale je nutné dodať, že údaje skrývajú chybu ± 5 nm, pretože emisné spektrum bolo vyhodnocované s krokom 10 nm. Posun môže byť spôsobený úbytkom fluorescencie v kratších časoch. TRES ukazuje, že v roztoku dochádza k reakcii sondy, ktorá vykazuje tzv. model dvoch stavov. Príslušné píky sú prítomné pri približne 580 nm a 640 nm, pričom druhý pik je slabší a po čase sa mierne vytráca.



Obrázok 17: TRES – SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v pufrí s pH 7

Dekonvolúcia emisného spektra na jednotlivé komponenty ukázala tri emisné druhy a celkom tri odlišné doby života. V tomto prípade už ale emisný druh označený ako číslo 2 je najintenzívnejší v celom spektre. Tento emisný druh je pravdepodobne deprotonovaná, bázičná forma A^* , ktorá má dobu života približne 0,70 ns, maximum emisie vykazuje pri 640 nm. Emisný druh číslo 1 a 3 sú protonované kyslé formy sondy, ktoré vykazujú intenzívnu fluorescenciu na modrej strane emisného spektra. Doby života boli stanovené na $\tau_1 \approx 0,38$ ns a $\tau_2 \approx 1,75$ ns.

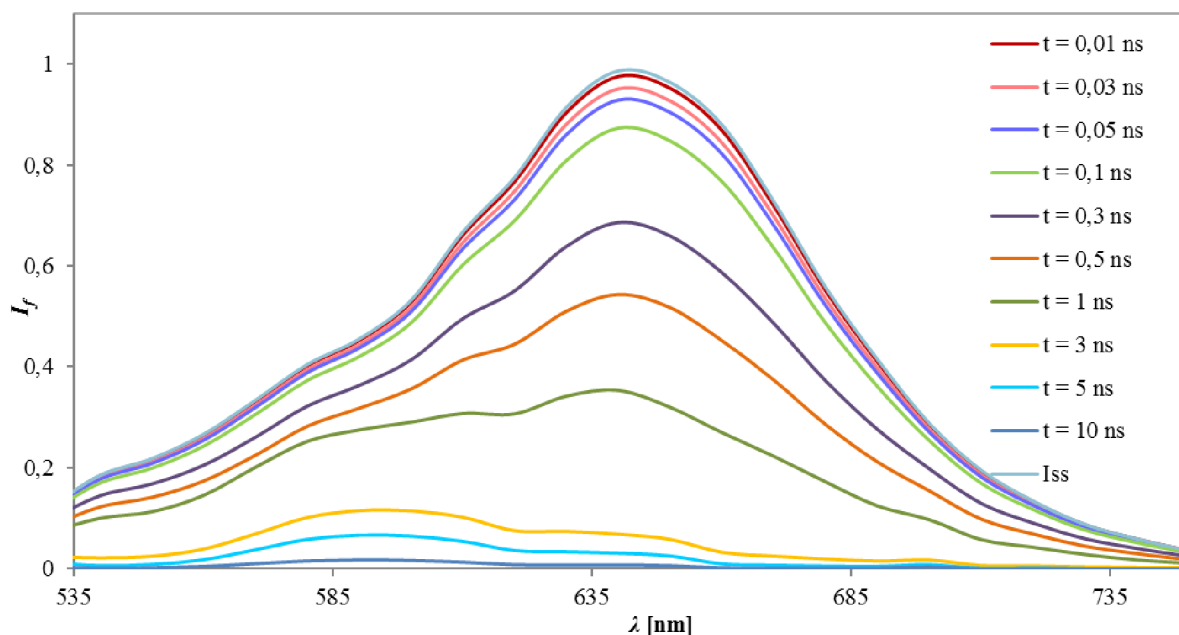


Obrázok 18: Dekonvolúcia emisného spektra SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v roztoku s pH 7

Graf znázorňuje, že v prípade pH 7 dominujúci emisný druh je označený ako t2 – čiže dominuje bázičná forma sondy. Emisný druh t1 je menej intenzívny, vykazuje maximum pri 580 nm, emisný druh t3 má najmenšiu intenzitu a jeho maximum emisie je posunuté do 575 nm.

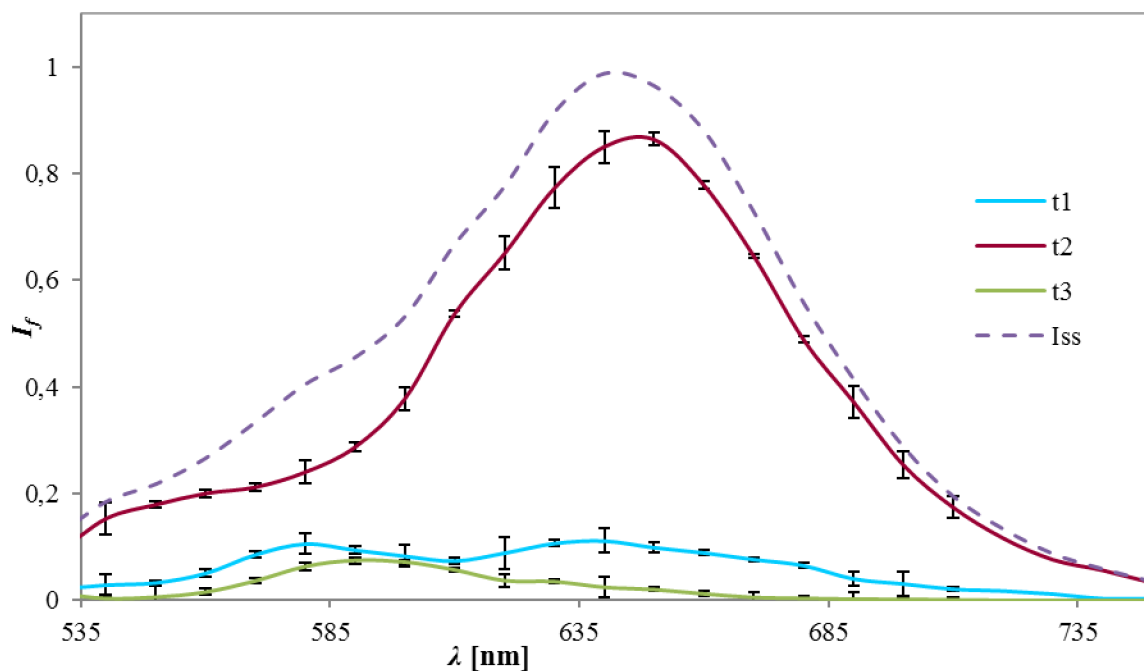
5.3.3. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 7,4

Pomocou nameraných údajov bol zostrojený TRES v časoch 0,01 až 10 ns fluorescenčného farbiva SNARF-4F v roztoku s pH 7,4. Tvar časovo rozlíšeného emisného spektra sa zmenil – TRES nevykazuje dva veľmi rozlíšiteľné emisné maxima, pretože pík pri 580 nm je menej rozpoznateľný a intenzívny ako v predošlých prípadoch. V dlhších časoch (3, 5, 10 ns) je emisný pík posunutý na približne 590 nm. Platí ale, že spektrum bolo namerané s krokom 10 nm, čo spôsobuje chybu ± 5 nm. Tento posun môže taktiež spôsobiť úbytok fluorescence pochádzajúci od fluorofora, ktorý má dlhšiu dobu života a vykazuje fluorescenciu na modrej strane emisného spektra. Na základe vyhodnotených dát môžeme usúdiť, že v pH 7,4 v excitovanom stave reagovala sonda, avšak mierne odlišne ako v kyslom prostredí.



Obrázok 19: TRES – SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6} M$) v pufrí s pH 7,4

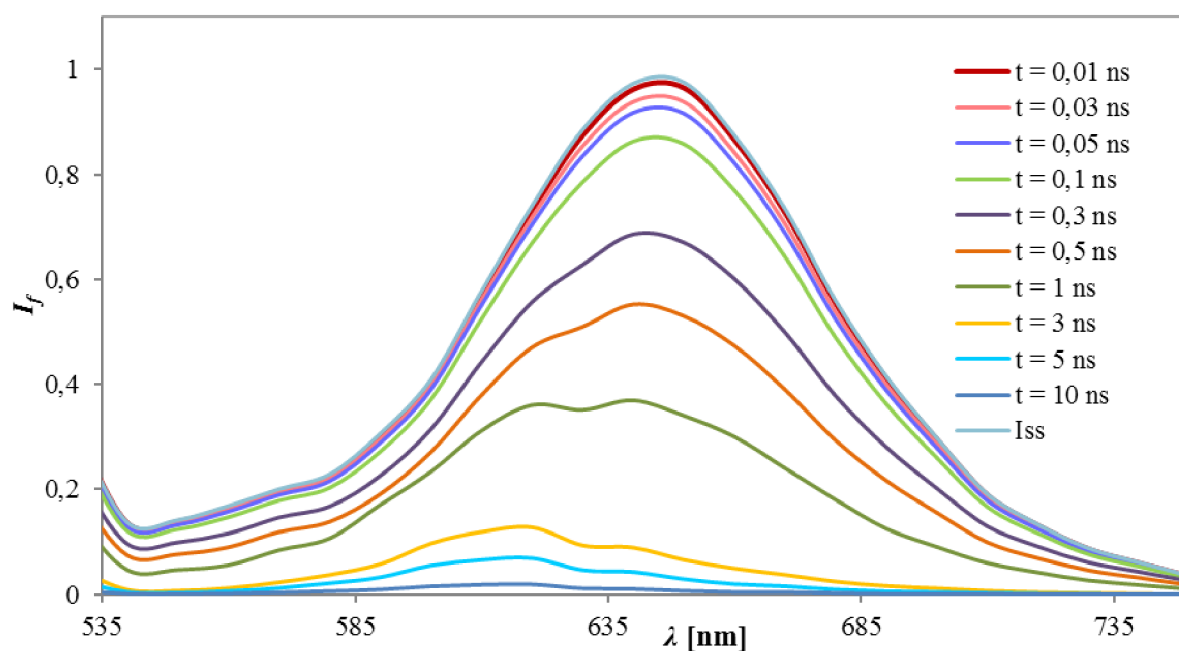
Dekonvolúcia emisného spektra potvrdila predpoklad, že sonda má stále tri emisné druhy a tri odlišné doby života v roztoku, avšak protónové formy fluorofora sú čím ďalej tým menej intenzívnejšie. Dominujúca deprotonovaná forma má fluorescenčnú dobu života približne 0,80 ns, čo znamená, že doba života tejto formy v pH 7,4 sa predlžovala. Emisný druh označený ako t1 je menej intenzívna ako deprotonovaná forma, maximum vykazuje v bode 580 nm a 640 nm, jeho stanovená doba života je 0,45 ns. Tretia, najmenej intenzívna forma fluorofora má maximum emisie v bode približne 590 nm, napriek tomu, že jej intenzita je veľmi mala, táto forma je prítomna v celom spektre. Doba života tretej formy bola stanovená na cca 3,50 ns. Výsledky potvrdzujú, že v pufrí s pH 7,4 všetky tri emisné formy sondy vykazujú dlhšiu fluorescenčnú životnosť.



Obrázok 20: Dekonvolúcia emisného spektra SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v roztoku s pH 7,4

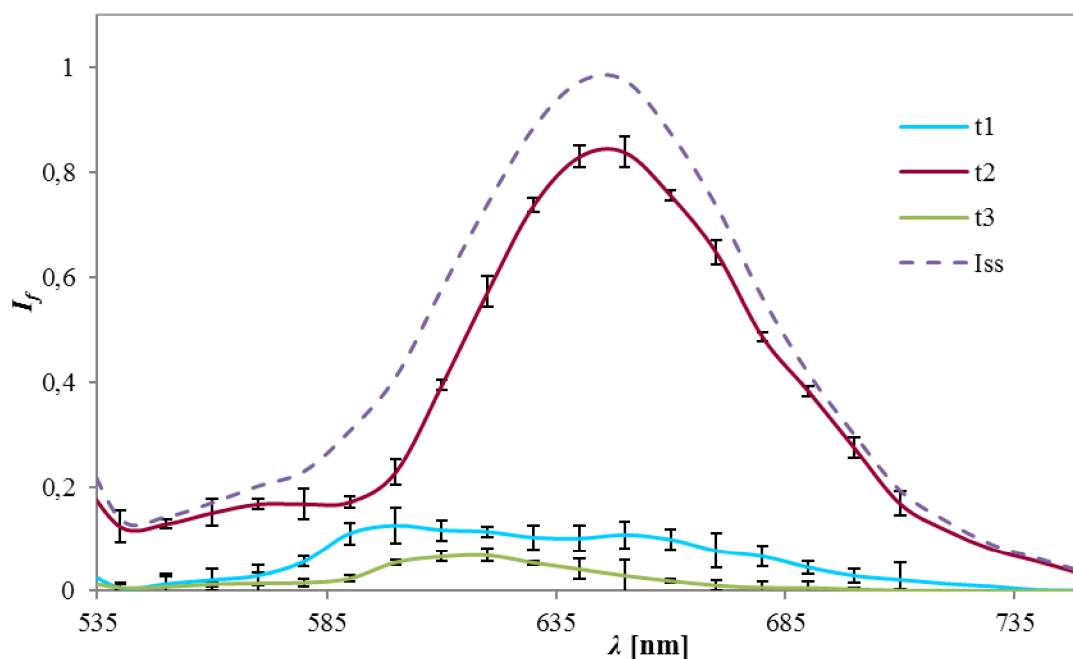
5.3.4. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 8

TRES v bázičkom prostredí s pH 8 vykazoval veľkú zmenu tvaru oproti predošlým príkladom. Emisné maximum pri 580 nm takmer zmizlo, v spektre nie je prítomný tento emisný pík. Dominuje emisný pík posunom maxima z 640 na 630 nm. V tomto prípade môže ísť o kontinuálny model alebo taktiež model dvoch, poprípadе troch stavov. Pretože vodné prostredie je málo viskózne, tým pádom pravdepodobnejší sa javí model troch stavov.



Obrázok 21: TRES – SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v pufrí o pH 8

Dekonvolúciou emisného spektra sme potvrdili predpoklad, že v roztoku sú prítomné tri emisné druhy fluorescenčnej sondy – avšak intenzita protónových foriem klesá so zvyšujúcou sa hodnotou pH.

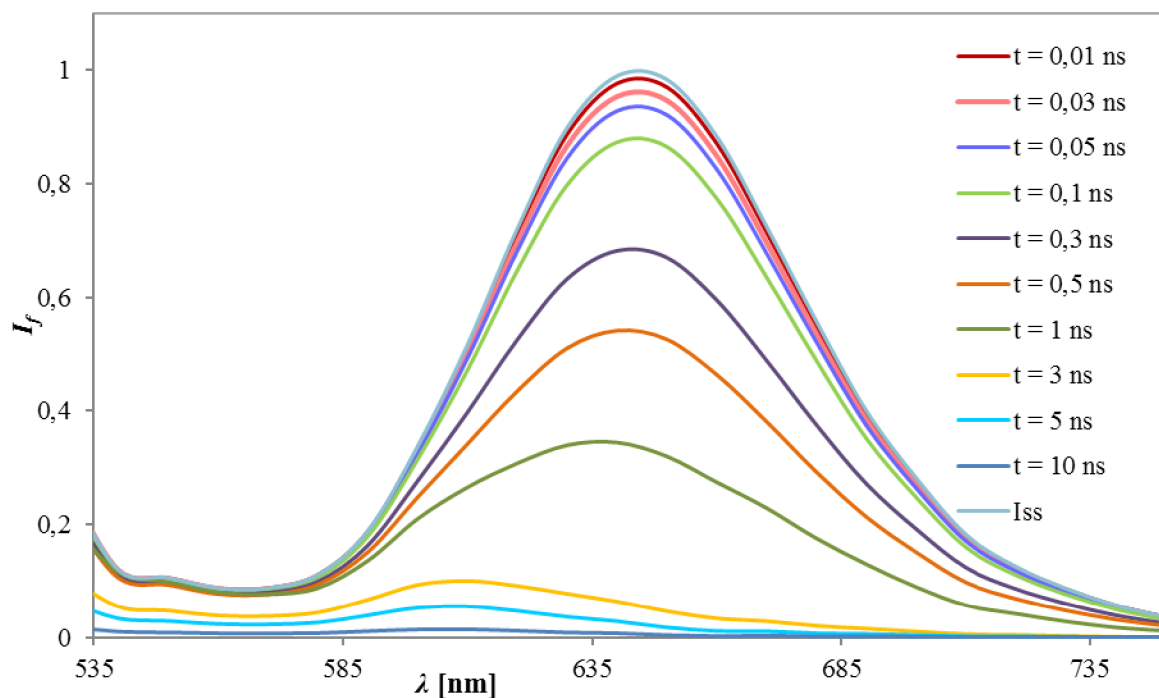


Obrázok 22: Dekonvolúcia emisného spektra SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v roztoku o pH 8

Pomocou dekonvolúcie emisného spektra sa potvrdilo, že ide o model troch stavov. Ako bolo predpokladané, emisný stav sondy označený ako t2 dominuje, ma vysokú intenzitu fluorescence, jeho maximum emisie sa nachádza pri 640 nm. Fluorescenčná doba života tejto formy bola stanovaná približne na 0,80 ns. Kyslé formy sondy sú stále prítomné v roztoku, avšak emitujú relatívne malo intenzívne. Najdlhšia doba života stanovená približne na 3,50 ns emituje na červenej strane spektra veľmi slabo, ale stále je prítomný aj tento emisný druh sondy. Doba života formy t1 bola stanovaná na 0,45 ns.

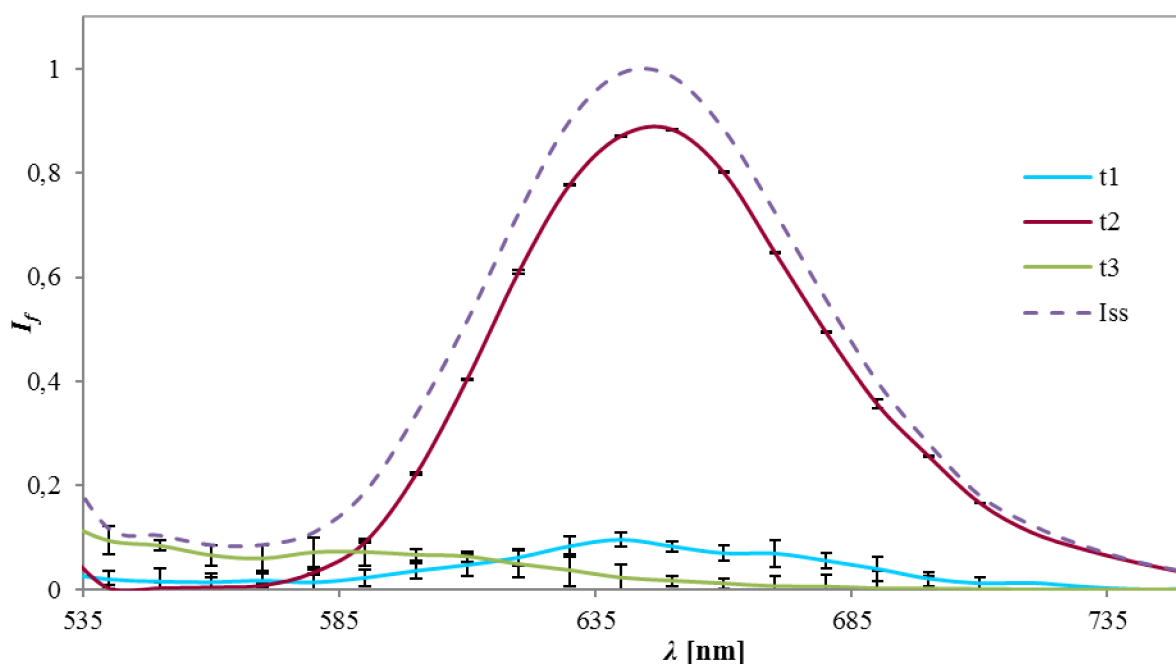
5.3.5. Časovo rozlíšené emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku s pH 9

Sonda sa správala veľmi podobne ako v pufrí s pH 8, TRES vykazuje jedno emisné maximum v bode 640 nm. Maximum TRES sa v pozorovanom časovom intervale posunulo od 640 nm k 620 nm s chybou ± 5 nm. Tento veľký posun emisného maxima môže spôsobovať úbytok fluorescence fluorofora v odlišnom stave.



Obrázok 23: TRES – SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v pufrí s pH 9

Dekonvolúcia emisného spektra ukázala, že napriek tomu, že sonda má stále tri rozličné emisné formy, v roztoku s pH 9 sa správa do istej miery inak ako v predchádzajúcich príkladoch. A to hlavne preto, lebo forma označená ako t1, ktorá zatiaľ mala najintenzívnejšiu emisiu pri 580 nm, teraz má emisné maximum pri 640 nm, presne ako deprotonovaná forma sondy A*. Podľa týchto výsledkov môžeme skonštatovať, že vo veľmi zásaditom prostredí s pH 9 fluorofor bude mať v roztoku dve deprotonované, zásadité formy emitujúce na červenej strane spektra, pričom protonovaný emisný druh označený ako t3 bude mať maximum emisie pri 580 nm, čiže na modrej strane emisného spektra.



Obrázok 24: Dekonvolúcia emisného spektra SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v roztoku s pH 9

Najintenzívnejší emisný druh má dobu života stanovenú na približne 0,80 ns, emisný druh označený ako t1 má približne 0,40 ns. Hodnota doby života tretej formy sondy označenej ako t3 je približne 3,50 ns. Graf potvrdzuje predpoklad, že v pufrí s pH 9 sú prítomné dve bázické, deprotonované formy sondy a jedna kyslá forma emitujúca na modrej strane emisného spektra. Vo vodných roztokoch spravidla platí, že prostredie okolo fluorofora nie je dostatočne viskózne na to, aby relaxácia rozpúšťadla bola časovo porovnateľná alebo dlhšia v porovnaní s fluorescenciou.

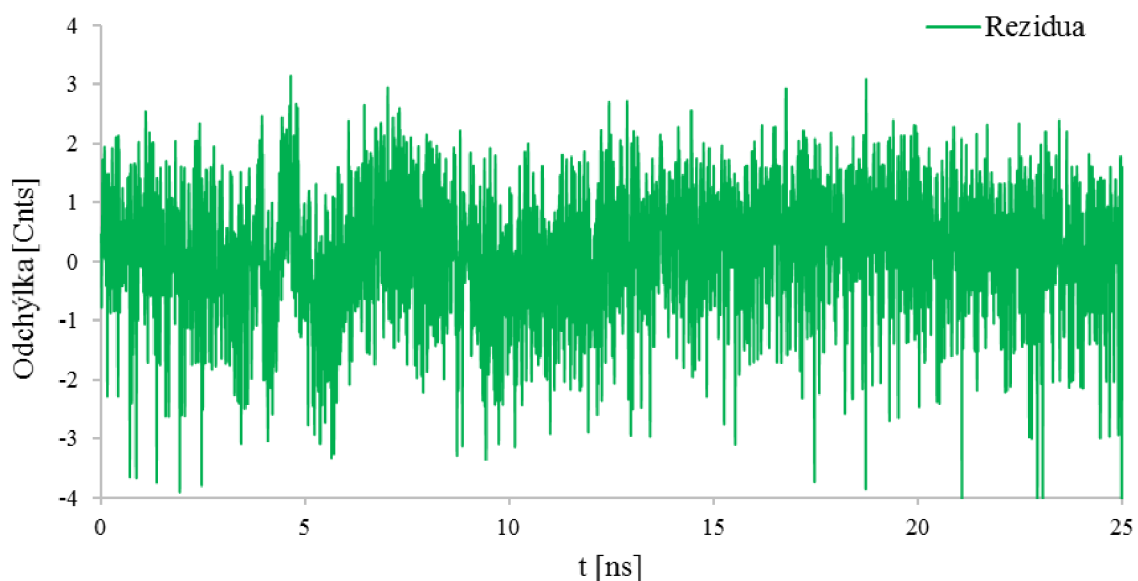
Je veľmi pravdepodobné, že absorpčné spektrum protonovanej a deprotonovanej formy sondy je mierne odlišné, a to kvôli odlišnej stabilizácii vo svojom okolí. Tým pádom excitačná vlnová dĺžka hrá tiež dôležitú rolu v tomto prípade a má vplyv na emisné spektrum. Platí napríklad, že keď je daná forma sondy v LE (local excited) stave, na excitáciu je potrebné používať žiarenie s mierne vyššou energiou než na excitáciu formy, ktorá je v stave ICT (intramolecular charge transfer). V našom prípade je dôležitým faktorom aj molárny absorpčný koeficient. Hodnota molárneho absorpčného koeficientu sa mení v závislosti od excitačnej vlnovej dĺžky. Molárny absorpčný koeficient (MAK) protonovanej formy AH* pri excitácii s 410 nm má nižšiu hodnotu ako MAK deprotonovanej formy. Avšak pri excitácii s 514 nm hodnota MAK protonovanej formy je dvakrát vyššia ako deprotonovanej [55].

Ako už bolo spomenuté, protolytické rovnováhy v excitovanom stave sú často odlišné od odohrávajúcich sa v základnom stave. Tieto zmeny v rovnováhu tiež môžu spôsobiť zmenu v emisnom spektre alebo posun emisného maxima. Fluorescenčná intenzita ako funkcia pH striktne sleduje koncentráciu danej formy sondy. Keď je koncentrácia deprotonovanej formy sondy v roztoku vysoká, tento druh bude vykazovať najintenzívnejšiu fluorescenciu. Ďalej platí, že fluorescenčné doby života so zvyšujúcou sa hodnotou pH vykazovali mierne predĺženie.

5.4. Stanovenie dôb života pomocou fluorescenčného mikroskopu

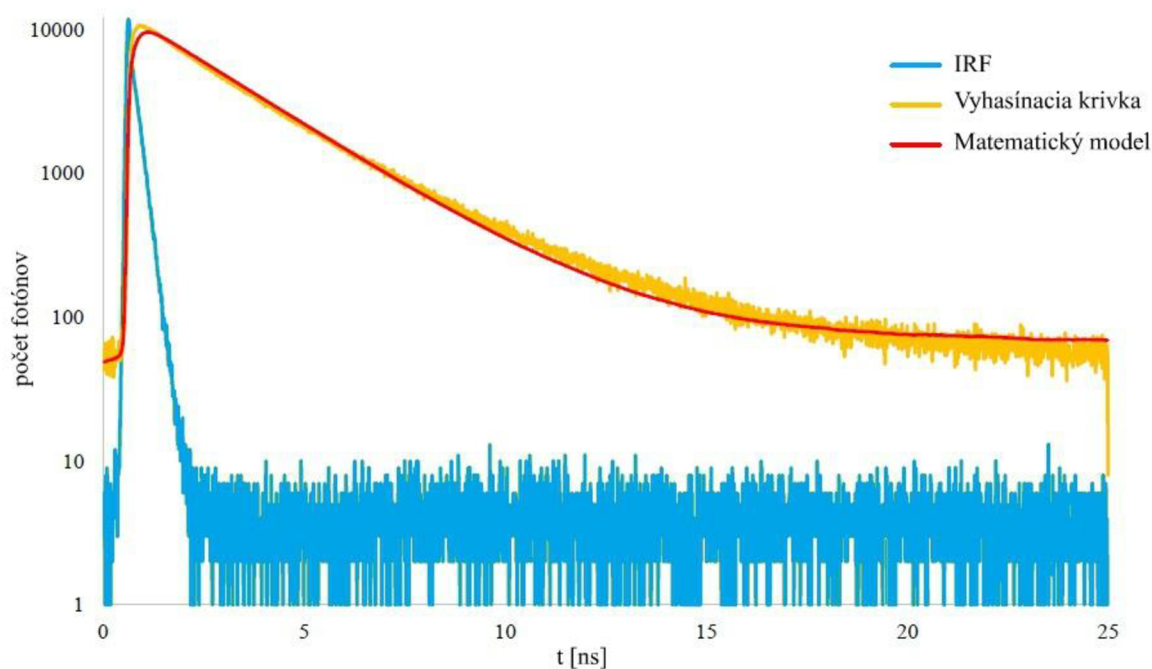
Tento experiment je súčasťou multiparametrickej analýzy, kde cieľom je získať v jednom kroku čo najviac informácií o študovanom systéme. Doby života fluorescenčnej sondy SNARF-4F AM a jej emisné spektrá boli preskúmané pomocou časovo rozlíšenej spektroskopie. Tieto esenciálne údaje (a ešte viac) sa ale dajú získať v jednom kroku pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Získané údaje je podstatné porovnať a na základe toho posúdiť relevanciu a presnosť multiparametrickej analýzy.

Výsledkom mikroskopického experimentu je TCSPC histogram, ktoré je potom prekladaný pomocou metódy rekonvolúcie multiexponenciálnym modelom. Program, ktorý ovláda vyhodnocovanie, je *SymPhoTime 64*, tiež pracuje s metódou nelineárnych najmenších štvorcov. Je dôležité poznamenať, že pri vyhodnocovaní je podstatné súčasne sledovať dva parametre. Prvý parameter je χ^2 a druhým parametrom je samotná reziduálna analýza. Platí skutočnosť, keď skúmaný systém má dva alebo viac dôb života, v reziduálnej analýze bude vidieť systematickú odchýlku. Táto odchýlka spôsobuje, že rozloženie bodov nebude presne nasledovať osu x , pretože rozloženie nebude celé náhodné. Keď nastane tento prípad, je nutné pridať ďalší parameter, v našom prípade ide o ďalšiu dobu života. Tým pádom budeme vyhodnocovať ďalej multiexponenciálny model.



Obrázok 25: Schéma znázorňuje príklad reziduálnej analýzy pre triexponenciálnu krivku, SNARF-4F AM ($8 \cdot 10^{-6}$ M) v roztoku s pH 6

Platí, že pri každom experimente je nutné namerať odozvu prístroja, čiže IRF. IRF má na začiatku krátku a vysokú intenzitu, ktorá strmo klesne a zbytok je len šum. Pri vyhodnocovaní je nutné IRF odčítať. Príklad tejto krivky je uvedený na obrázku číslo 26.



Obrázok 26: Schéma uvedená ako príklad: Rekonvólcia vyhasínacej krivky, ktorá je označená žltó. Táto krivka je potom položená matematickým modelom (označený červeno). IRF sa pre analýzu odčíta.

Platí, že v prípade multiexponenciálneho modelu, keďže je pridaný ďalší parameter, pri vyhodnocovaní musíme počítať s ďalšou veličinou. Táto veličina označená ako A definuje relatívne zastúpenie pridaného parametra (v našom prípade dobu života) v skúmanom systéme. Pri vyhodnocovaní sa počíta s jednotlivými dobami života a ich relatívnym zastúpením, s priemernou hodnotou dôb života, s príslušnou intenzitou fluorescence – čo je v podstate integrál pod jednotlivými monoexponenciálnymi závislosťami. Namerané výsledky sú uvedené v tabuľke.

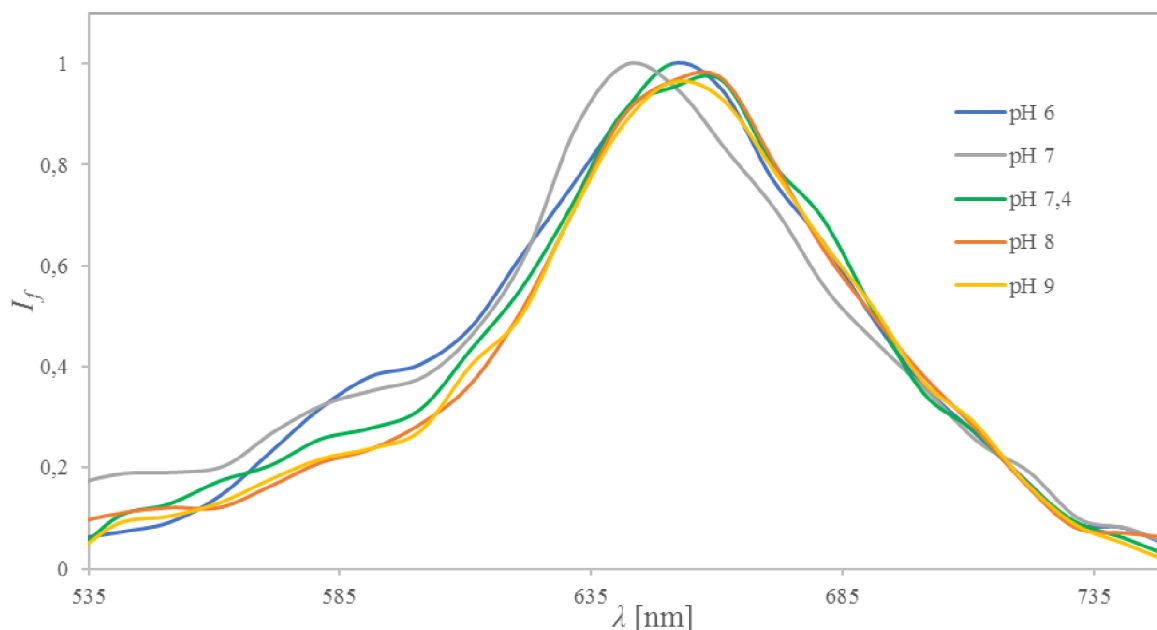
Tabuľka 6: Priemerné fluorescenčné doby života SNARF-4F AM v roztokoch s rôznym pH

	Doba života τ_1	Doba života τ_2	Doba života τ_3
pH 6	$0,33 \pm 0,0045$	$0,67 \pm 0,0097$	$2,78 \pm 0,029$
pH 7	$0,40 \pm 0,0028$	$0,71 \pm 0,011$	$3,12 \pm 0,046$
pH 7,4	$0,48 \pm 0,0048$	$0,75 \pm 0,014$	$3,55 \pm 0,019$
pH 8	$0,50 \pm 0,0035$	$0,80 \pm 0,0082$	$3,75 \pm 0,0042$
pH 9	$0,50 \pm 0,0026$	$0,86 \pm 0,01$	$3,80 \pm 0,0047$

Namerané údaje potvrdili, že najdlhšia doba života má najmenšie relatívne zastúpenie v roztoku a doba života označená ako τ_2 má najväčšie relatívne zastúpenie. Na základe výsledkov, môžeme potvrdiť predpoklad, že sonda má tri doby života v roztoku, čiže tri emisné druhy, pričom sonda v roztoku je prítomná tak v protonovanej ako aj v deprotonovanej forme.

5.5. Emisné spektrá pomocou kamery Newton

Najdôležitejšou súčasťou multiparametrického experimentu je pripojiť CCD kameru Newton, nakalibrovať a nastaviť kameru tak, aby sa dala používať počas mikroskopických meraní. Cieľom tohto experimentu bolo vytvoriť štandardný operačný postup na ovládanie kamery, na základe vytvoreného postupu namerať emisné spektra sondy SNARF-4F AM, porovnať získané výsledky a na základe porovnání posúdiť použiteľnosť presnosti tejto metódy.



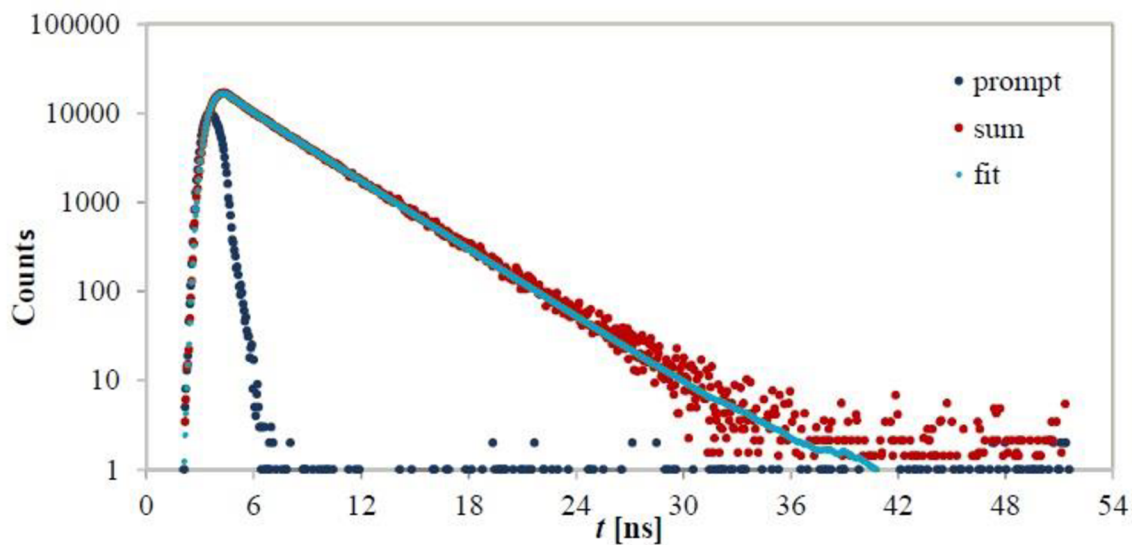
Obrázok 27: Graf znázorňuje emisné spektrum fluorescenčnej sondy SNARF-4F AM v roztokoch s rôznym pH. Koncentrácia sondy v každom roztoku je $8 \cdot 10^{-6}$ M.

Ako obrázok číslo 8 znázorňuje, fluorescenčné farbivo emituje žiarenie v rovnakom rozsahu ako to bolo namerané pri predošlých meraní. Pri pH 6, 7 a 7,4 sú prítomné dva emisné maximá, avšak maximum pri 580 nm je menej rozlíšiteľné ako pri predchádzajúcom meraní. Pri vysokých pH 8 a 9 už nie je prítomný tento emisný pík pri 580 nm, sonda vykazuje jedno emisné maximum, a to pri približne 640 nm. Nevýhodou tejto metódy je, že kamera je veľmi citlivá na vonkajšie podmienky. Malá zmena v externých podmienkach môže spôsobovať nepresnosti, preto je nutné kalibrovať kameru pred experimentom a počas experimentu už nevykonávať žiaden pohyb.

Veľkou výhodou tohto zariadenia je, že umožňuje namerať emisné spektrum danej sondy v tzv. online režime a je schopné namerať spektrum okamžite, tým pádom poskytuje rýchle výsledky. Na základe tohto experimentu môžeme považovať túto metódu za spoľahlivú a obzvlášť rýchly spôsob meranie emisného spektra. Umožňuje získať okamžité výsledky a spolupracovať s mikroskopom pri multiparametrických meraniach. Avšak platí, že nadpriemerná rýchlosť merania má za následok menšiu citlivosť prístroja. Cieľom tejto práce je na základe získaných vedomostí počas práce s kamerou vypracovať štandardný operačný postup na ovládanie tohto zariadenia, tento postup je priložený medzi prílohami.

5.6. Závislosť rotačnej korelačnej doby od hustoty prostredí – časovo rozlíšená anizotropia

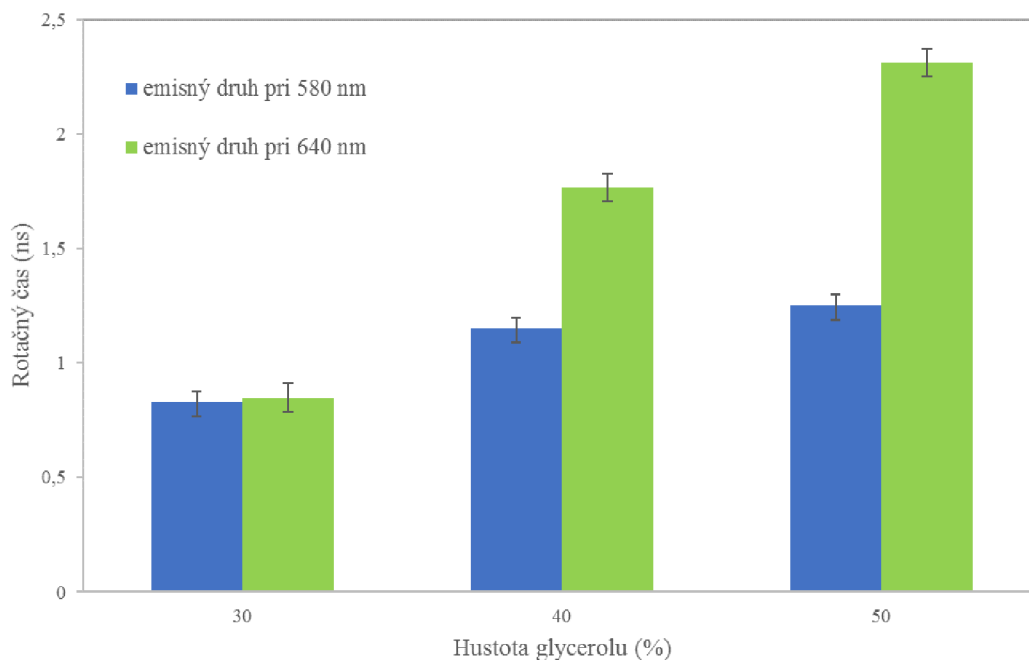
Na charakterizáciu časovo rozlíšenej fluorescence sa používalo roztok glycerolu s rôznou koncentráciou. V tomto roztoku bola rozpustená fluorescenčná sonda tak, aby výsledná koncentrácia sondy bola $8 \cdot 10^{-6}$ M. Na analýzu dát získaných pomocou časovo rozlíšenej fluorescence sa používa program DAS6 Fluorescence Decay Analysis od firmy Horiba. Na vyhodnocovanie sa používa rekonvolučná analýza.



Obrázok 28: Ako príklad na vyhodnocovanie je uvedený graf, kde prompt označuje odozvu lampy, sum je suma jednotlivých fluorescenčných poklesov a fit označuje preložení funkciu

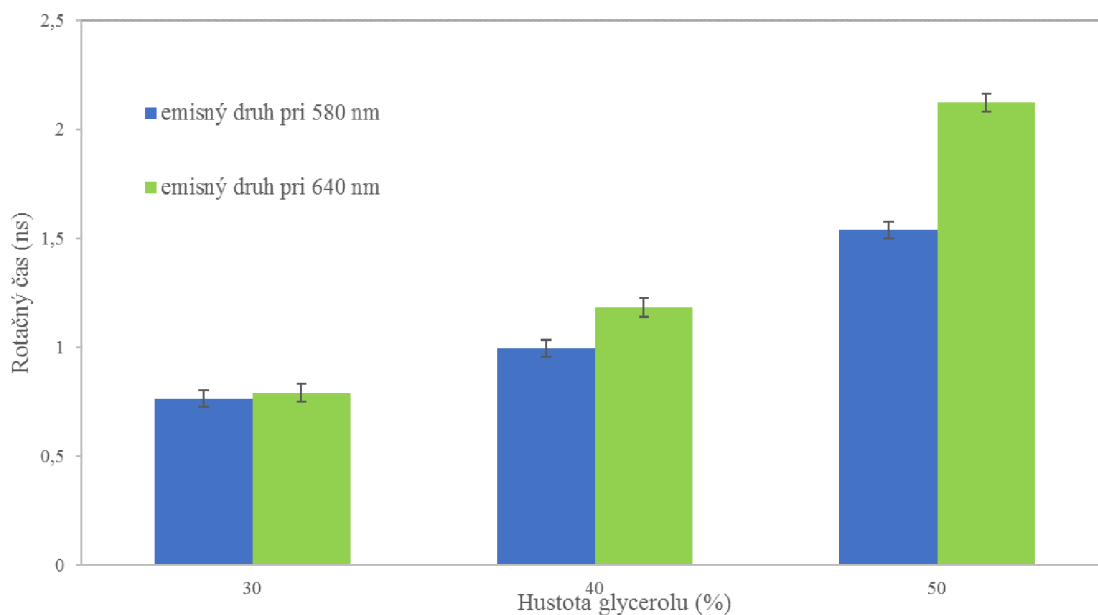
Najskôr je nevyhnutné analyzovať sumu nameraných dát s využitím matematického modelu. V prípade fluorescenčnej sondy SNARF-4F je nutné používať mnohoexponenciálny matematický model, konkrétne triexponenciálny model, pomocou ktorého sa získajú rotačné časy. Priemerný rotačný čas je vypočítaný následne.

Bolo očakávané, že s rastúcou viskozitou prostredia (v našom prípade ide o zmes glycerínu a fosfátového pufru) sa bude zvyšovať hodnota fluorescenčnej anizotropie. Pretože sonda má dva emisné maximá v spektre, hodnota anizotropie bola sledovaná pri 580 nm a 640 nm, čiže pri vlnových dĺžkach, kde sonda emituje najintenzívnejšie.



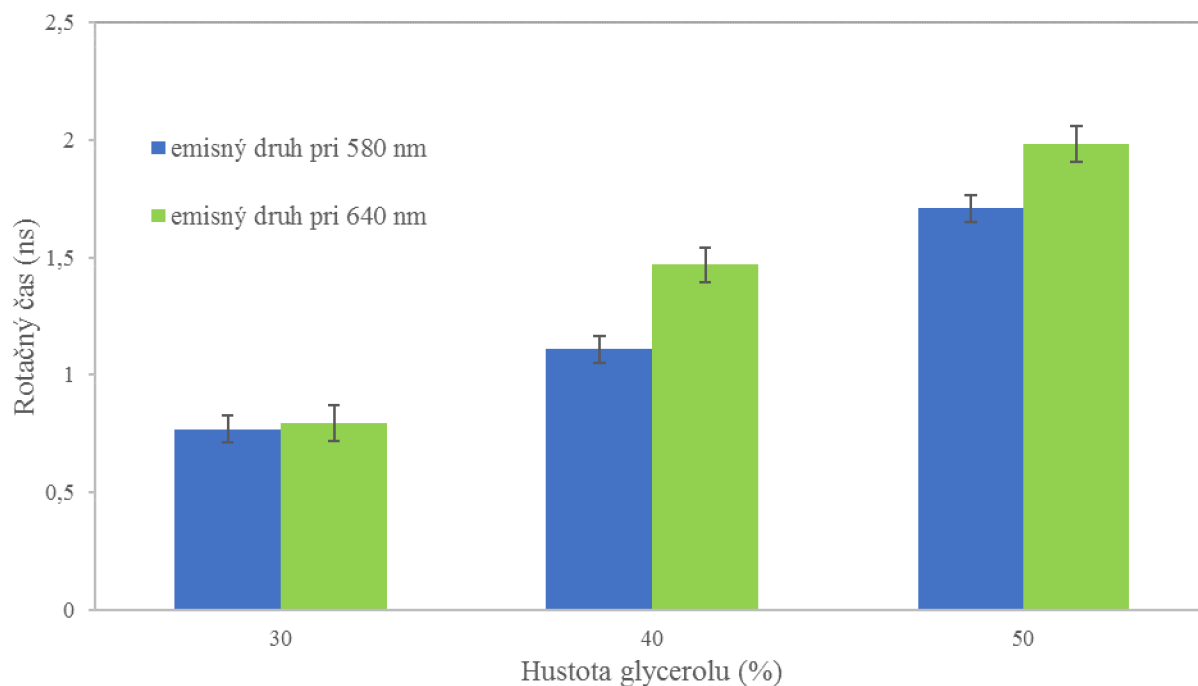
Obrázok 29: Histogram znázorňuje závislosť rotačného času od hustoty glycerolu s pH 6

Očakávanie, že rotačný čas sondy v roztoku bude stúpať so zvyšujúcou sa hustotou glycerolu, sa potvrdilo. Rotačné korelačné časy pri 580 nm a 640 nm v 30 % roztoku sú veľmi podobné, priemerná rotačná doba pri 580 nm je približne 0,827 ns, pri 640 nm táto hodnota je približne 0,848 ns, čo znamená, že emisný druh pri 640 nm má vyššiu hodnotu rotačného času. V 40 % roztoku hodnota rotačnej doby pri 640 nm náhle narastie, priemerná hodnota bude cca 1,767 ns, avšak hodnota pri 580 nm nevykazuje taký náhly prírastok, priemerná hodnota rotačného času bola stanovená na 1,105 ns, zatiaľ čo rotačný čas pri 640 nm je cca 35% vyššia. V 50 % glycerolovom roztoku rozdiel medzi rotačnými časmi pri 580 nm a 640 nm je ešte väčší, pri 580 nm približná hodnota bola stanovená na 1,225 ns, pri emisnej vlnovej dĺžke 640 nm bola 2,313 ns, čo je cca o 46 % vyššia hodnota ako pri 580 nm. Rotačné doby pri 580 nm nevykazovali veľký a strmý prírastok, čo znamená, že tento emisný druh sondy má stále kratšiu rotačnú dobu v roztoku, čiže nie je pevne viazaná, môže voľne rotovať. Emisný druh vykazujúci fluorescenciu pri 640 nm je pri vyšších hustotách výrazne menej pohyblivý. V 30 % roztoku sú emisné formy sondy takmer rovnako pohyblivé, avšak emisný druh vykazujúci fluorescenciu pri 640 nm pri vyšších hustotách vykazuje výrazne menšiu pohyblivosť a dlhší rotačný čas.



Obrázok 30: Histogram znázorňuje závislosť rotačného času od hustoty glycerolu s pH 7

V roztoku s pH 7 sonda všeobecne vykazuje menšie hodnoty rotačného času. V 30 % roztoku pri 580 nm je rotačná korelačná doba stanovená na 0,763 ns, pri 640 nm 0,791 ns. Tento rozdiel nie je výrazne veľký, avšak hodnoty sú menšie ako v roztoku s pH 6. V 40 % roztoku približná hodnota rotačnej doby je pri 580 nm 0,995 ns, pri 640 nm 1,183 ns – tento rozdiel je už väčší ako v predošlom prípade, avšak systém nevykazuje náhly prírastok. V najhustejšom roztoku (50 %) je priemerná hodnota rotačného času pri 580 nm 1,539 ns, pri 640 nm je 2,125 ns. V tomto prípade bol zaznamenaný najväčší rozdiel medzi rotačnými časmi, pretože rotačná doba pri 640 nm je cca o 27 % väčšia, čo je stále menší rozdiel ako bolo namerané v predošlom experimentu v roztoku s pH 6. Na základe nameraných dát môžeme skonštatovať, že rotačný čas sondy rastie so zvyšujúcou sa hustotou v roztoku, avšak v kyslom prostredí emisný druh sondy emitujúci pri 640 nm vykazuje väčšiu hodnotu rotačného času. Emisný druh vykazujúci fluorescenciu pri 580 nm má naopak v bázičkom prostredí dlhší rotačný čas. Z toho môžeme usúdiť, že tento emisný druh pri nízkych hodnotách pH rotuje voľnejšie v roztoku.



Obrázok 31: Histogram znázorňuje závislosť rotačného času od hustoty glycerolu s pH 9

Podľa očakávania, fluorescenčné farbivo vykazuje väčší rotačný čas so zvyšujúcou sa hustotou prostredia. Rotačný čas emisnej formy pri 580 nm bol stanovený na približne: 0,768 ns (v 30 % roztoku), 1,109 ns (v 40 % roztoku), 1,708 ns (v 50 % roztoku). Tieto hodnoty sú väčšie ako rotačné časy namerané pri pH 6 a 7, avšak nie je zaznamenaný prudký nárast. Emisný druh vykazujúci fluorescenciu pri 640 nm má rotačné doby života približne: 0,796 ns (v 30 % roztoku), 1,467 ns (v 40 % roztoku), 1,982 ns (v 50 % roztoku). Rotačné korelačné doby tejto emisnej formy pozorovateľne klesajú so zvyšujúcou sa hodnotou pH, čo môže znamenať, že v bázičných pH je táto forma sondy menej viazaná v roztoku, tým pádom môže vykonať voľný rotačný pohyb.

Pomocou nameraných výsledkov a ich relatívnou amplitúdou sa vypočíta priemerný rotačný korelačný čas sondy v roztoku.

5.7. Závislosť rotačnej korelačnej doby od hustoty prostredí – ustálená anizotropia

Hlavným cieľom multiparametrickej analýzy je v čo najmenšom počte krokov získať čo najviac fluorescenčných parametrov. Pomocou fluorescenčného mikroskopu sa nám podarilo namerať v jednom kroku emisné spektra danej sondy súčasne s fluorescenčnými dobami života v roztokoch, ktoré mali rôzne mikrookolie. Avšak je možné namerať okrem týchto charakteristík aj iné parametre, ako je napríklad fluorescenčná anizotropia. Je nutné poznamenať, že mikroskop pracuje na základe metódy ustálenej fluorescencie. Pred meraním je nutné vypočítať G-faktor a získanú hodnotu zadať do systému.

Priemerné rotačné korelačné časy sa následne vypočítajú podľa nasledujúcej rovnice, ktorú uvádza výrobca v manuáli *SymPhoTime64*:

$$\frac{(D_{\parallel} \cdot G) - D_{\perp}}{(D_{\parallel} \cdot G) + 2 \cdot D_{\perp}} \quad (26)$$

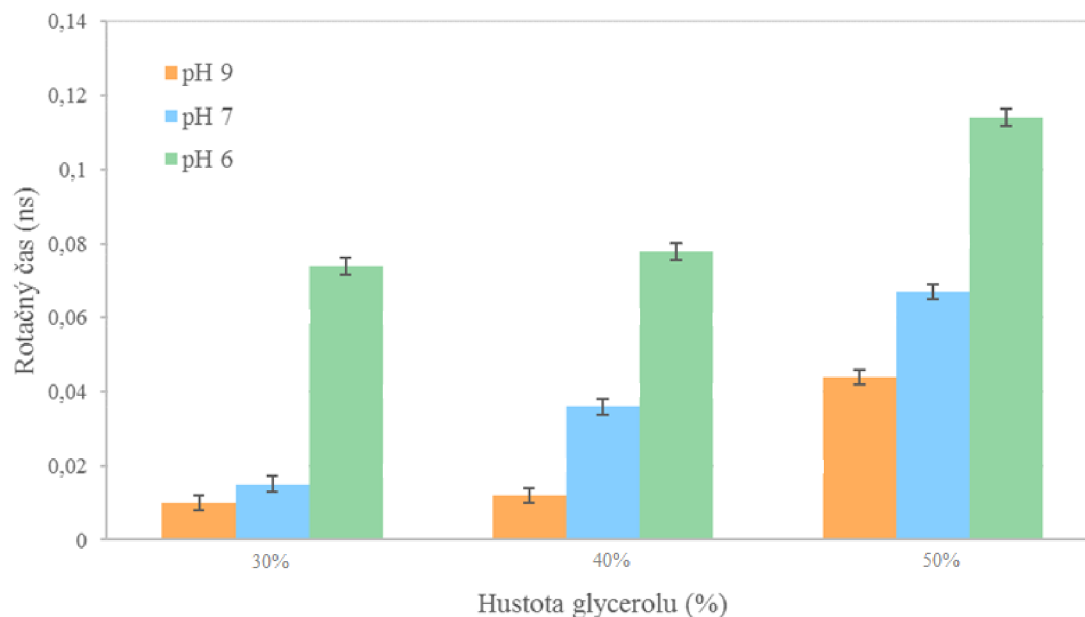
Kde D_{\parallel} označuje paralelnú fluorescenčnú intenzitu zaznamenanú detektorom, D_{\perp} označuje vertikálnu fluorescenčnú intenzitu, ktorá bola zaznamenaná detektorom, a G označuje G-faktor.

Po dosadení do tohto vzorca bola stanovená priemerná rotačná korelačná doba sondy.

Tabuľka 7: Stanovené priemerné rotačné časy sondy SNARF-4F AM

	pH 6	pH 7	pH 9
30%	0,074 ± 0,00125 [ns]	0,015 ± 0,00074 [ns]	0,010 ± 0,02696 [ns]
40%	0,078 ± 0,00124 [ns]	0,036 ± 0,00163 [ns]	0,012 ± 0,00060 [ns]
50%	0,114 ± 0,00134 [ns]	0,067 ± 0,00045 [ns]	0,044 ± 0,00219 [ns]

Ako namerané výsledky ukazujú, potvrdilo sa očakávanie: hodnota priemernej rotačnej doby stúpa so zvyšujúcou sa hustotou roztoku. Platí avšak, že so zvyšujúcou sa hodnotou pH hodnota rotačného času klesá. Týmto meraním sa potvrdili predom namerané „kontrolné“ údaje, tým pádom môžeme tento *multiparametrický* experiment považovať za úspešnú a presnú metódu na získanie viac fluorescenčných charakteristík v jednom kroku.



Obrázok 32: Histogram znázorňujúci závislosť rotačného času sondy v roztoku s rôznym pH od hustoty prostredia

Na základe nameraných dát pomocou ustálenej anizotropie môžeme skonštatovať, že fluorofor SNARF-4F AM v roztoku s pH 6 vykazuje najväčšie rotačné časy, čo znamená, že v kyslom prostredí vykazuje menšiu pohyblivosť. So zvyšujúcou sa hodnotou pH klesá hodnota rotačnej doby, molekuly sondy sa pohybujú voľnejšie v roztoku, vykazujú kratšie rotačné časy. Na základe TRES bolo zistené, že pri vysokých bázičkových pH dominuje deprotonovaná forma

fluorescenčnej sondy A*, ktorá (podľa uvedených anizotropických výsledkov) vykonáva rýchly rotačný pohyb, táto forma voľne rotuje, pravdepodobne nie je viazaná v roztoku. Pravdepodobne malé štruktúrne zmeny molekuly sondy môžu spôsobovať zmenu viskozity mikroprostredia okolo molekúl fluorofora. Tieto malé zmeny môžu byť potom detegované napríklad pomocou anizotropických meraní, tým pádom multiparametrická analýza môže poskytovať vzácne informácie okrem iných aj o blízkom prostredí obklopujúcom danú fluorescenčnú sondu.

6. ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zoznámiť sa s vybavením Laboratória fluorescenčnej spektroskopie, hlavne s časovo rozlíšeným spektrofluorimetrom a fluorescenčným mikroskopom a na základe získaných informácií vyhodnotiť možnosti multiparametrického merania pomocou dostupných techník.

Bolo nevyhnutné navrhnuť fluorescenčnú sondu, ktorá je vhodná na tento typ analýzy a reaguje na aspoň dva parametre mikrookolí. Na základe vykonanej rešerše bolo navrhnuté fluorescenčné farbivo SNARF-4F AM, pretože táto sonda je schopná reagovať na zmeny pH v prostredí, často sa používa pri biologických meraniach a je schopná preniknúť do vnútra buniek. Posledná vlastnosť má veľký potenciál v budúcnosti z dôvodu, že v súčasnosti na našej fakulte prebieha práca súvisiaca so štúdiom bakteriálnych buniek typu *Cupriavidus necator*. Fluorescenčná sonda SNARF-4F AM vykazuje vyhovujúce vlastnosti na analýzu bakteriálnych buniek, tým pádom by teoreticky mohla byť použitou sondou na štúdium a charakterizáciu týchto organizmov.

Aby sa dali vyhodnotiť možnosti multiparametrického merania na našej fakulte, bolo najprv nutné skúmané fluorescenčné parametre porovnať s výsledkami získanými pomocou inej metódy a podľa nameraných údajov posúdiť vhodnosť, presnosť a citlivosť. Študované fluorescenčné parametre boli: emisné spektrá, fluorescenčné doby života a fluorescenčná anizotropia. Najprv bolo nutné tieto údaje namerať a vyhodnotiť výsledky pomocou časovo rozlíšenej spektrometrie. Táto metóda je už dobre známa, avšak neposkytuje možnosť multiparametrickej analýzy, čiže neumožňuje všetky parametre namerať v jednom kroku bez manipuláciou so skúmanou látkou. Namerané výsledky potom boli použité hlavne na posúdenia vhodnosti multiparametrickej analýzy na fluorescenčnom mikroskopy.

SNARF-4F AM vykazuje pri nízkych pH emisné spektrum obsahujúce dve maximá, a to pri 580 nm a 640. So zvyšujúcou sa hodnotou pH sa znižuje intenzita emisného maxima pri 580 nm. Ďalej bola vykonaná TRES analýza a následne dekonvolúcia emisného spektra, podľa ktorého boli definované tri odlišné emisné druhy fluorofora. SNARF-4F má v roztoku deprotonovanu formu, ktorá má priemerne krátku dobu života a má najintenzívnejšiu emisiu pri 640 nm, a dve protónové formy, ktoré vykazujú maximum emisie pri približne 580 nm. Samozrejme v roztokoch s odlišným pH boli zaznamenané menšie zmeny, ktoré sú podrobnejšie popísané v príslušnej kapitole, avšak pre vyhodnotenie multiparametrickej analýzy tieto podrobné výsledky nie sú esenciálne. Ďalej bolo vykonané anizotropické štúdium, kde bola stanovená priemerná rotačná doba sondy, avšak spektrofluorimeter vykazuje časovo rozlíšené anizotropické výsledky. Počas tohto merania sa potvrdilo predpoklad, že so zvyšujúcou sa hustotou roztoku sa zvyšuje rotačný čas sondy. Platí ale, že so zvyšujúcou sa hodnotou pH prostredia klesá hodnota rotačného času, čiže sonda v roztoku vykazuje väčšiu pohyblivosť.

Namerané výsledky slúžili na porovnanie s výsledkami získanými pomocou fluorescenčného mikroskopu. K mikroskopu bol pripojený spektrograf, pomocou ktorého boli namerané emisné spektra sondy a súčasne bola vykonaná TCSPC analýza a potom anizotropická analýza. Výsledky boli porovnateľné s výsledkami získanými pomocou časovo rozlíšeného spektrometra. Boli namerané tri doby života sondy, ktoré mali takmer rovnaké

hodnoty ako pri predchádzajúcom meraní. Emisné spektrá namerané pomocou spektrografu vykazovali rovnaké výsledky a potvrdilo sa, že so zvyšujúcou sa hodnotou pH klesá intenzita fluorescencie pri 580 nm emisného spektra. Dôležitou súčasťou tejto práce bolo zoznámiť sa s nastavením spektrografu a na základe získaných informácií vytvoriť štandardný operačný postup a popísať kalibráciu tohto zariadenia. Anizotropické merania potvrdili predpoklad, že so zvyšujúcou sa hustotou stúpa hodnota rotačného času. Navyše potvrdila sa aj druhá konklúzia, ktorá definuje, že sonda v nízkych pH má nižší rotačný čas, čiže je viac pohyblivá ako v bázičných roztokoch. Okrem TCSPC a anizotropickej analýzy dá sa vykonať na mikroskopy aj FLIM alebo FRET analýza, a to všetko v jednom kroku, avšak tieto typy analýz pre túto prácu neboli podstatné.

Na základe získaných informácií sa dá skonštatovať, že pomocou fluorescenčného mikroskopu a spektrografu sa dá vykonať na našej fakulte multiparametrická analýza, ktorá poskytuje presne a spoľahlivé výsledky porovnateľné aj s inými technikami, avšak týmto spôsobom sa dajú merať tieto fluorescenčné charakteristiky v jednom kroku a výsledky sú dostupné ihneď. V budúcnosti by sa dali tieto informácie používať napríklad na analýzu bakteriálnych buniek, kde je dôležitým faktorom aj rýchlosť vykonania merania.

7. POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1]VALEUR, Bernard a Mário N. BERBERAN-SANTOS. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education* [online]. 2011, 88(6), 731-738 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1021/ed100182h. ISSN 00219584. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed100182h>
- [2]LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
- [3]VÁMOSI, György. *Luminiscencia* [online]. Pécs, 2006 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.zipernowsky.hu/~naszlaci/alapok+hardver/fluoreszcenia_hu.pdf. Přednáška. Ziperowsky Károly MSZ.
- [4]VALEUR, Bernard. Molecular Fluorescence. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-276-0024-8.
- [5]KUMAR, C. S. S. R. a Hao. JING. *UV-VIS and photoluminescence spectroscopy for nanomaterials characterization*. Columbia, USA: Springer Science, 2013. Springer reference. ISBN 978-3-642-27593-7.
- [6]BERNARD VALEUR, Mário Nuno Berberan-Santos. Molecular fluorescence: principles and applications. 2nd ed. Weinheim [Germany]: Wiley-VCH, 2012. ISBN 978-352-7328-376.
- [7]Elumalai, P., Atkins, P., de Paula, J. Atkins' Physical Chemistry, Oxford University Press, 2002. ISBN 0-19-879285-9
- [8]BERGOU, János, János EROSTYÁK, László KOZMA a Ferenc PINTÉR. *Általános Fizika III.: Fénytan - Relativitáselmélet - Atomhéjfizika*. Pécs: Dialóg-Campus Kiadó, 2004. ISBN 9639542008.
- [9]LAIDLER, Keith James. *Chemical kinetics*. 3rd ed. New York: Harper & Row, c1987. ISBN 0060438622.
- [10] KITAI, Adrian. *Luminescent materials and applications*. Hoboken, NJ: John Wiley, c2008. ISBN 0470985682.
- [11] GUILBAULT, George G. *Practical fluorescence*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker, c1990. ISBN 0824783506.
- [12] SUHLING, Klaus, Paul M. W. FRENCH a David PHILLIPS. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences* [online]. 2005, 4(1), 13- [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.1039/b412924p. ISSN 1474905x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b412924p>

- [13] ALBANI, Jihad René. *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. ISBN 9781405138918.
- [14] BEREZIN, Mikhail Y. a Samuel ACHILEFU. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews* [online]. 2010, 110(5), 2641-2684 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1021/cr900343z. ISSN 00092665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr900343z>
- [15] Product Information: SNARF® pH Indicators. ThermoFisher [online]. 29851 Willow Creek Road, Eugene, USA: Molecular Probes, Inc., 2003 [cit. 2016-10-19]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01270.pdf>
- [16] HUNTER, R. C. a T. J. BEVERIDGE. Application of a pH-Sensitive Fluoroprobe (C-SNARF-4) for pH Microenvironment Analysis in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005, 71(5), 2501-2510 [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2501-2510.2005. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.5.2501-2510.2005>
- [17] PITTS, K. R. Coverslip hypoxia: a novel method for studying cardiac myocyte hypoxia and ischemia in vitro. *American Journal of Physiology* [online]. 2004, 287(4), H1801-H1812 [cit. 2016-10-26]. DOI: 10.1152/ajpheart.00232.2004. ISBN 10.1152/ajpheart.00232.2004. Dostupné z: <http://ajpheart.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpheart.00232.2004>
- [18] SKOOG, Douglas A. a Donald M. WEST. *Principles of instrumental analysis*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders College, 1980. ISBN 0030211611.
- [19] HARRIS, Daniel C. a Michael D. BERTOLUCCI. *Symmetry and spectroscopy: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy*. New York: Dover Publications, 1989. ISBN 048666144X.
- [20] Picoquant. *Picoquant* [online]. Berlin, Germany: PicoQuant, 2017 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/applications/category/life-science/fluorescence-anisotropy-polarization>
- [21] Picoquant. *Picoquant* [online]. Berlin, Germany: PicoQuant, 2017 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/applications/category/life-science/fluorescence-anisotropy-polarization>
- [22] YENGO, Christopher M a Christopher L BERGER. Fluorescence anisotropy and resonance energy transfer: powerful tools for measuring real time protein dynamics in a physiological environment. *Current Opinion in Pharmacology* [online]. 2010, 10(6), 731-737 [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.1016/j.coph.2010.09.013. ISSN 14714892. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489210001517>

- [23] GRADINARU, Claudiu C., Denys O. MARUSHCHAK, Masood SAMIM a Ulrich J. KRULL. Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells. *The Analyst* [online]. 2010, 135(3), 452- [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.1039/b920242k. ISSN 00032654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b920242k>
- [24] BYDDER, Mark, Andres RAHAL, Gary D. FULLERTON a Graeme M. BYDDER. The magic angle effect: A source of artifact, determinant of image contrast, and technique for imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* [online]. 2007, 25(2), 290-300 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1002/jmri.20850. ISBN 10.1002/jmri.20850. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.20850>
- [25] FIXLER, D., Y. NAMER, Y. YISHAY a M. DEUTSCH. Influence of Fluorescence Anisotropy on Fluorescence Intensity and Lifetime Measurement: Theory, Simulations and Experiments. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* [online]. 2006, 53(6), 1141 - 1152 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1109/TBME.2006.873539. ISBN 10.1109/TBME.2006.873539. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1634508/>
- [26] ISS: focus and discover. TERPETSCHNIG, Ewald a David M. JAMESON. ISS. Fluorescence Lifetime (FLT) [online]. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: http://www.iss.com/resources/research/technical_notes/K2CH_FLT.html
- [27] *Applications of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 2014, 7(Special 5) [cit. 2017-03-29]. ISSN 0974-2115.
- [28] GALBÁCS, Zoltán, Gábor GALBÁCS a Pál SIPOS. *Műszeres analitikai kémiai laboratóriumok gyakorlatok*. Szeged: JATEPress, 2008. ISBN 3159780000537
- [29] WELJIE, Aalim M. a Hans J. VOGEL. Steady-State Fluorescence Spectroscopy. *Calcium-Binding Protein Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 2002-1-25, s. 075 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1385/1-59259-184-1:075. ISBN 1592591841. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-184-1:075>
- [30] DAS, B B, Feng LIU a R R ALFANO. Time-resolved fluorescence and photon migration studies in biomedical and model random media. *Reports on Progress in Physics* [online]. 1997, 60(2), 227-292 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1088/0034-4885/60/2/002. ISSN 00344885. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0034-4885/60/i=2/a=002?key=crossref.f526cdb99d4bcda93e753c17dcda6b70>
- [31] O'Connor, D.V.O., Phillips, D., "Time-correlated Single Photon Counting", Academic Press, London, 1984
- [32] WAHL, Michael. *Time-Correlated Single Photon Counting* [online]. Berlin, Germany, 2014 [cit. 2017-03-30]. Technical note. PicoQuant GmbH. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspec.pdf

- [33] F. EATON, David. Recommended methods for fluorescence decay analysis. *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. Great Britain, 1990, **62**(8), 1631-1648 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.147.7445&rep=rep1&type=pdf>
- [34] CHANG, Ching-Wei, Dhruv SUD a Mary-Ann MYCEK. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Digital Microscopy*. 2007, č. 3, s. 495-524. DOI: 10.1016/S0091-679X(06)81024-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X06810241>
- [35] VAN STOKKUM, Ivo H.M., Delmar S. LARSEN a Rienk VAN GRONDELLE. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2004, **1657**(2-3), 82-104 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1016/j.bbabi.2004.04.011. ISSN 00052728. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272804001094>
- [36] FIXLER, D., Y. NAMER, Y. YISHAY a M. DEUTSCH. Influence of Fluorescence Anisotropy on Fluorescence Intensity and Lifetime Measurement: Theory, Simulations and Experiments. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* [online]. 2006, **53**(6), 1141 - 1152 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1109/TBME.2006.873539. ISBN 10.1109/TBME.2006.873539. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1634508/>
- [37] ICHTMAN, Jeff W. a José-Angel CONCHELLO. Fluorescence microscopy. *Nature Methods* [online]. 2005, **2**(12), 910-919 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1038/nmeth817. ISSN 15487091.
- [38] ASWANI, Kavita, Tushare JINADASA a Claire M. BROWN. Fluorescence Microscopy Light Sources. *Microscopy Today* [online]. 2012, **20**(04), 22-28 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1017/S1551929512000399. ISSN 15519295. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1551929512000399
- [39] YUSTE, Rafael. Fluorescence microscopy today. *Nature Methods* [online]. 2005, **2**(12), 902-904 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1038/nmeth1205-902. Dostupné z: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v2/n12/full/nmeth1205-902.html>
- [40] SUHLING, Klaus, Paul M. W. FRENCH a David PHILLIPS. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences* [online]. 2005, **4**(1), 13- [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.1039/b412924p. ISSN 1474905x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b412924p>
- [41] PRAMANIK, Aladdin a Jerker WIDENGREN. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* [online]. 35. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2006, s. 463-477 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1002/3527600906.mcb.200300170. ISBN 3527600906. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600906.mcb.200300170>

- [42] Tummala, Kakathi, "Single Photon Avalanche Diode" (2015). *2015 IPFW Student Research and Creative Endeavor Symposium*. 68.
http://opus.ipfw.edu/stu_symp2015/68
- [43] LI, Li-Qiang a Lloyd M. DAVIS. Single photon avalanche diode for single molecule detection. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1993, **64**(6), 1524-1529 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1063/1.1144463. ISSN 00346748. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1144463>
- [44] M. Prummer, C. Hübner, B. Sick, B. Hecht, A. Renn, U.P. Wild, Single-molecule identification by spectrally and time-resolved fluorescence detection, *Anal. Chem.* 72, 433-447 (2000)
- [45] ORTHAUS-MÜLLER, Sandra a Michael WAHL. *Time Tagged Time-Resolved Fluorescence Data Collection in Life Sciences: Technical Note*. Berlin, Germany, 2014. Dostupné také z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/14528/technote_tttr.pdf
- [46] *MicroTime 200: Brochure*. Berlin, Germany, 2014. Dostupné také z: https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/microtime200_brochure.pdf
- [47] KAPUSTA, Peter a Michael WAHL. *FLCS - Fluorescent Lifetime Correlation Spectroscopy: Application Note*. Berlin, Germany, 2006. Dostupné také z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7272/appnote_flcs.pdf
- [48] How It Works: The Charged-Coupled Device, or CCD. *Journal of Young Investigators* [online]. 2001, **3**(1) [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: <http://www.if.ufrgs.br/~marcia/ccd.pdf>
- [49] Andor Technology: an Oxford Instruments company. *Andor Technology* [online]. Belfast, Northern Ireland: Andor Technology Limited, 2017 [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: www.andor.com
- [50] ZWORYKIN, V.K. a J.A. RAJCHMAN. The Electrostatic Electron Multiplier. *Proceedings of the IRE* [online]. 1939, **27**(9), 558-566 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1109/JRPROC.1939.228753. ISSN 00968390. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1686994/>
- [51] GOUKASSIAN, Samuel. *Method for fabricating electron multipliers*. 1995. USA. US 5624706 A. Uděleno 29. apr. 1997. Zapsáno 15. máj 1995.
- [52] MicroTime 200. *PicoQuant* [online]. 1999 [cit. 2016-03-18]. Dostupné z: <http://www.picoquant.com/products/category/fluorescence-microscopes/microtime-200-time-resolved-confocal-fluorescence-microscope-with-unique-single-molecule-sensitivity>

- [53] Microscopy: Fluorescence microscopy. Jic.ac.uk [online]. Norwich, UK: John Innes Centre 2017, 2017 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_6.htm
- [54] LACKO, K. : *Chování hydrofilní fluorescenční sondy Oregon Green 488 v prostředí hydrogelu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 54 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [55] MARCOTTE, Nathalie a Albert M. BROUWER. Carboxy SNARF-4F as a Fluorescent pH Probe for Ensemble and Fluorescence Correlation Spectroscopies. *J. Phys. Chem. B* [online]. American Chemical Society, 2005, **109**(23), 11819-11828 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1021/jp0510138. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0510138>
- [56] KÖNING, Marcelle a Sebastian TANNERT. Resolve Time and Spectral Information Simultaneously: Spectrograph Add-on the MicroTime 200. Berlin, Germany, 2011. PicoQuant GmbH.
- [57] BLUM, Christian, Alfred J. MEIXNER a Vinod SUBRAMANIAM. Room Temperature Spectrally Resolved Single-Molecule Spectroscopy Reveals New Spectral Forms and Photophysical Versatility of Aequorea Green Fluorescent Protein Variants. *Biophysical Journal* [online]. 2004, **87**(6), 4172-4179 [cit. 2017-04-21]. DOI: 10.1529/biophysj.104.049452. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349504738813>
- [58] STRACKE, Frank, Christian BLUM, Stefan BECKER, Klaus MÜLLEN a Alfred J MEIXNER. Two and multilevel spectral switching of single molecules in polystyrene at room temperature. *Chemical Physics* [online]. 2004, **300**(1-3), 153-164 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1016/j.chemphys.2004.01.019. ISSN 03010104. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301010404000394>
- [59] Sorrell, M. J., Tribble, J., Reinisch, L., Werkhaven, J. A. and Ossoff, R. H. (1994), Bacteria identification of otitis media with fluorescence spectroscopy. *Lasers Surg. Med.*, 14: 155–163. doi:10.1002/1096-9101(1994)14:2<155::AID-LSM1900140208>3.0.CO;2-L
- [60] Rippon JW. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. 3. W.B. Saunders Co.; 1988. p. 808.
- [61] MEYER, Pablo a Jonathan DWORKIN. Applications of fluorescence microscopy to single bacterial cells. *Research in Microbiology* [online]. 2007, 158(3), 187-194 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1016/j.resmic.2006.12.008. ISSN 09232508. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250807000137>
- [62] KAWAMOTO, F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. *The Lancet* [online]. 1991, 337(8735), 200-202 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1016/0140-6736(91)92159-Y. ISSN 01406736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014067369192159Y>

[63] IRVINE, W. J. GASTRIC ANTIBODIES STUDIED BY FLUORESCENCE MICROSCOPY. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences* [online]. 1963, 48(4), 427-438 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1113/expphysiol.1963.sp001685. ISSN 00335541. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.1963.sp001685>

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

ADC	analógový digitálny prevodník
AM	acethomethyl
CCD	nábojovo viazaná súčiastka
CFD	diskriminátor
CMOS	doplňujúci sa kov-oxid polovodič
DAPI	4',6-diamidín-fenylindol
DFI	detegovaná fluorescenčná intenzita
DMSO	dimethylsulfoxid
EGFP	vylepšený zelený fluorescenčný proteín
EMCCD	nábojovo viazaná súčiastka vybavená elektrón multiplikátorom
EYFP	vylepšený žltý fluorescenčný proteín
FCS	fluorescenčná korelačná spektroskopia
FLIM	<i>fluorescent lifetime imaging</i>
FRET	<i>Fröster resonance energy transfer</i>
GFP	zelený fluorescenčný proteín
ICCD	intenzívna nábojovo viazaná súčiastka
ICT	<i>intramolecular charge transfer</i>
IRF	odozva prístroja
LED	elektroluminiscenčná dióda
MA	magický úhol
MAK	molárny absorpčný koeficient
MCA	multikanálový analyzátor
Mili Q	voda čistená prístrojom PURELAB-flex
MOU	hlavná optická jednotka
PGA	zosilňovač
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových iónov v roztoku
PI	propídium jodid
SNR	<i>signal-to-noise ratio</i>
SPAD	<i>single photon avalanche diode</i> - typ fotodetektorov
SPT	jednofotónové načasovanie
TAC	prevodník času na amplitúdu
TCSPC	časovo korelované čítanie fotónov
TFI	celková fluorescenčná intenzita
TRES	časovo rozlíšené emisné spektrá

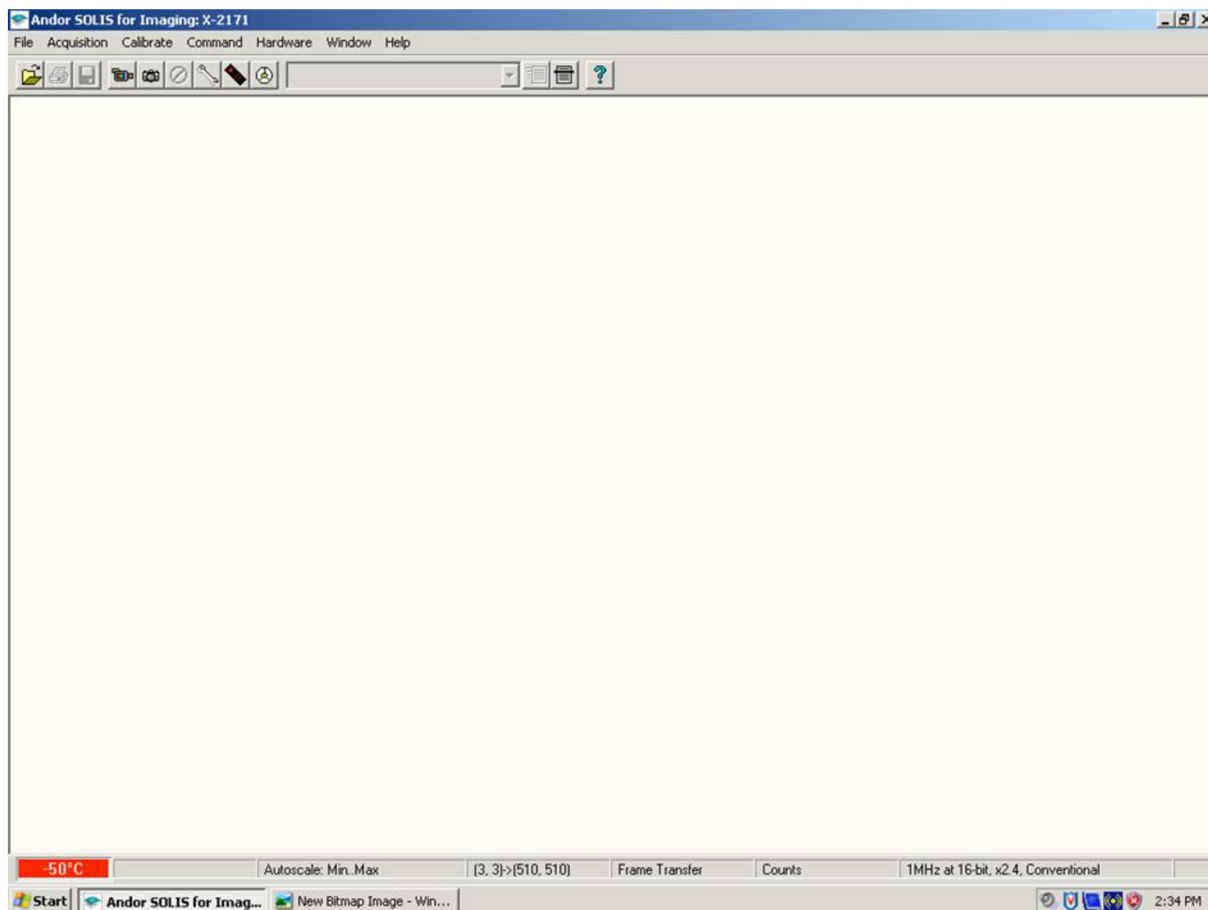
TTTR *time-tagged time-resolved*: spôsob na spracovanie prichádzajúcich signálov
UV ultrafialové žiarenie
VIS viditeľné svetlo

9. PRÍLOHY

9.1. Štandardný operačný postup kamery Newton od firmy Andor Technologies

Dôležitou súčasťou tejto diplomovej práce je zhrnúť postup merania so spektroskopickým detektorom Newton CCD. Detektor ovládame pomocou programu Andor iXon.

Po zapnutí počítača uvidíme na pracovnej ploche odkaz na softvér Andor iXon. Kliknutím na ikonu sa otvorí program, pomocou ktorého nastavíme žiadané podmienky meranie. Potvrdíme spustenie programu, na obrazovke sa objaví obrázok prezentovaný na obrázku číslo 33.



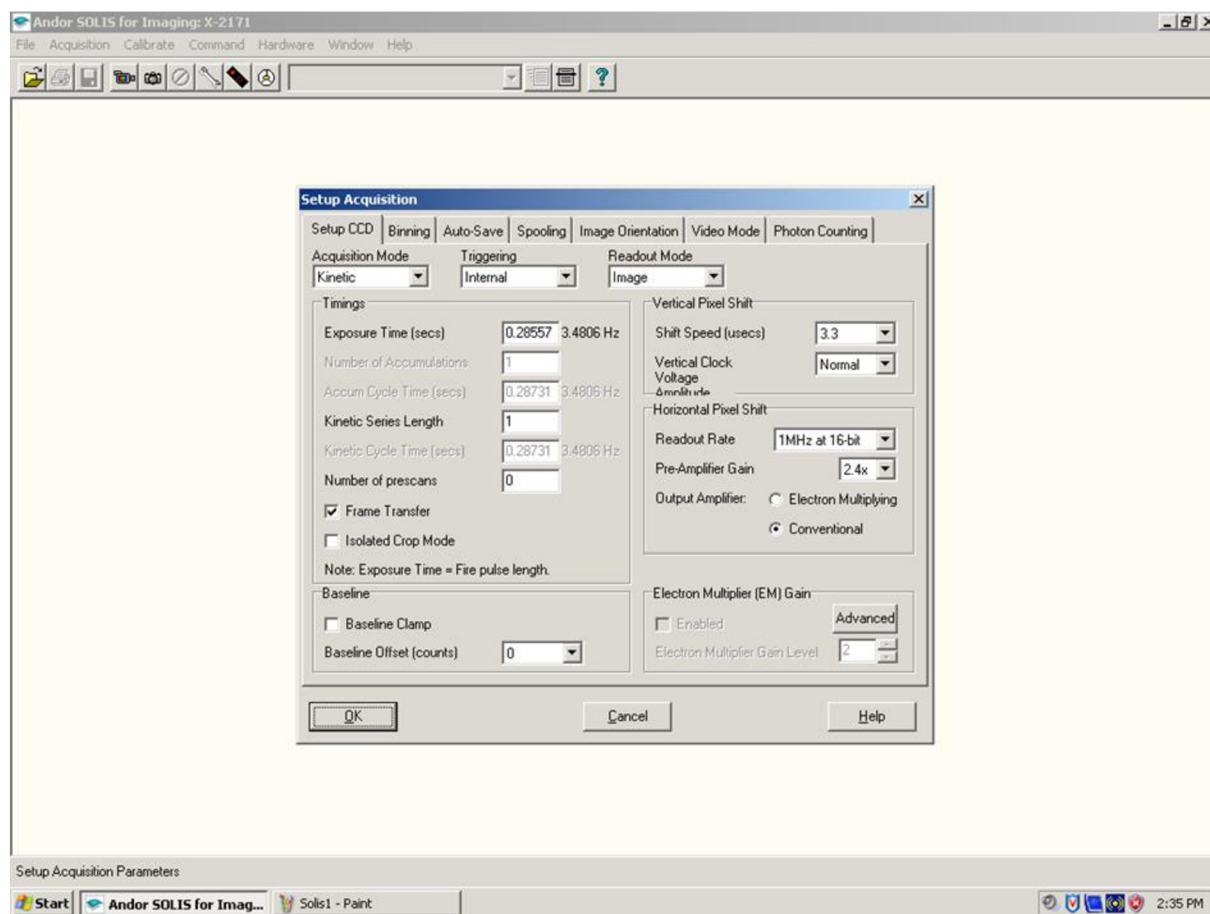
Obrázok 33: Program Andor iXon

Je nutné poznamenať, že predbežne nastavený konfiguračný súbor je načítaný automaticky, čo spôsobuje, že kamera sa začne chladiť a všetky uzávierky sa zatvoria. (V prípade, keď tento konfiguračný program chceme modifikovať, jednoducho nastavíme softvérové parametre podľa nášho výberu, potom prepíšeme *.cfg* súbor pod *File* → *Configuration File*.)

Teplota sa zobrazuje v ľavom dolnom rohu, pričom červené pole indukuje neustálenú teplotu a modré pole ustálenú. Len v prípade ustálenej teploty môžeme začať merať.

Ak chceme zbierať dáta, uzávierky musia byť otvorené. Klikneme na *Hardware* → *Shutter Control* a zaistíme, že inertné uzávierky sú nastavené na trvalo otvorený mód.

Pre nastavenie žiadanych parametrov merania klikneme na ikonu, ktorá zobrazuje biely francúzsky kľúč, alebo na *Acquisition* → *Setup Acquisition* menu. Typicky sa zobrazuje okienko znázornené na obrázku číslo 34.



Obrázok 34: Okienko *Setup Acquisition* umožňuje nastaviť podmienky merania

Doba expozície (*exposure time*), počet expozícií (*number of exposures*) a rýchlosť čítacieho zosilňovača (*readout rate amplifier*) sú hodnoty, ktoré sú zvyčajne zmenené medzi snímkami.

Triggering, čiže spúšťanie by malo byť nastavené na vnútorný (*internal*) v prípade, keď máte v pláne pracovať so snímkami vytvorenými pomocou softvéru Solis. Externý štart zvolíte v prípade, keď chcete, aby kamera vytvorila tzv. dátové kocky obsahujúce určitý počet snímkov, špecifikovaný programom Solis. Vo väčšine prípadov sa používa vnútorný režim.

Rýchlosť presunu (*shift speed*) určuje čas posunu elektrónov na CCD riadok. Softvér umožňuje vybrať hodnotu, čím umožňuje zbierať dáta rýchlejšie, ale s rýchlosťou sa zvyšuje pravdepodobnosť straty niektorých elektrónov.

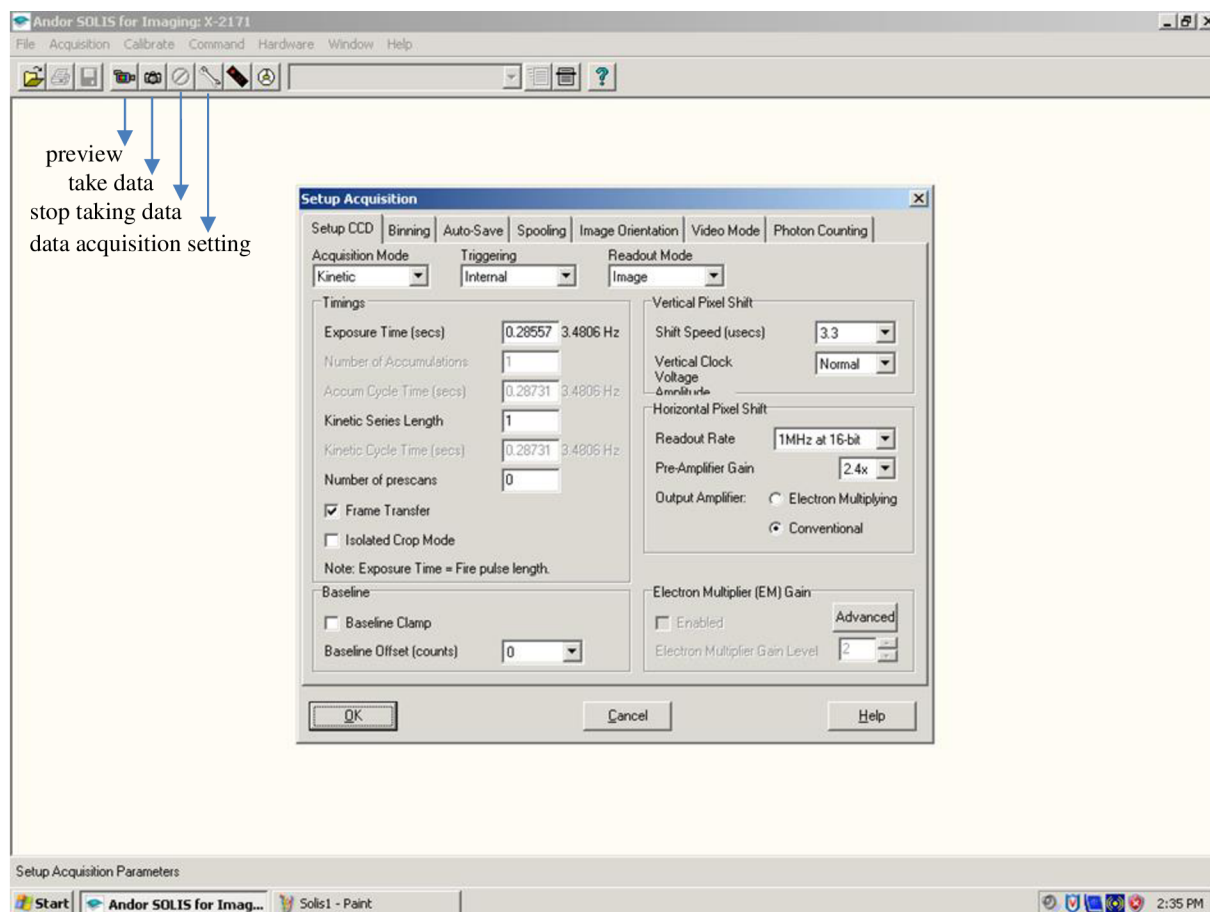
„*Readout rate*“, čiže rýchlosť odčítania umožňuje selekciu zosilňovača: 1 MHz (konvenčné a násobič elektrónov EM), 3 MHz (konvenčné a EM), 5 MHz (EM) alebo 10 MHz (EM). Je dôležité poznamenať, že rýchlejšie čítanie znamená aj vyšší šum. EM mód môže fungovať pri deaktivovanom násobiči elektrónov (EM), týmto spôsobom sa zabezpečuje, že lavinové zosilňovacie procesy nebudú ohrozené, avšak meranie v tomto režime sa neodporúča, pretože EM musí byť dostatočne vysoký, aby kompenzoval vysoký čítací šum, a tak prekročil faktor šumu v týchto režimoch. Z tohto dôvodu sa neodporúča používať ani veľmi nízke hodnoty EM.

Sčítacie zosilnenie (*Readout gain*) v e/ADU je selektované voľbou “*Pre-amplifier gain*”, čo znamená predzosilňovač. Hodnoty korešpondujúce s uvedenými číslami sú špecifikované v technických brožúrach.

Počet predbežných skenovaní (*number of prescans*) by mal byť nastavený na nenulovú hodnotu v prípade, keď chceme zabezpečiť, aby prvá snímka každej uloženej kocky neobsahovala reziduálny signál. Predbežný skenovací mód sa nepoužíva pri zákrytových alebo časovo špecifických meraniach. Zvyčajne sa ruší prvý dátový rámec v priebehu analýzy.

Je potrebné skontrolovať, aby okienko „*Frame Transfer*“ bol označené a týmto postupom zaistiť, aby kamera fungovala bez problémov. Snímky (*.fits*) sa dajú otvoriť pomocou softvéru Solis (zoznam *File*) alebo v ds9.

Pre zobrazenie dát (zobrazenie snímok bez uloženia) je potrebné kliknúť na ikonu videokamery s označením „*preview*“ (predbežné zobrazenie) na obrázku č. 35. Ikona označená ako STOP zastaví predbežné zobrazenie.

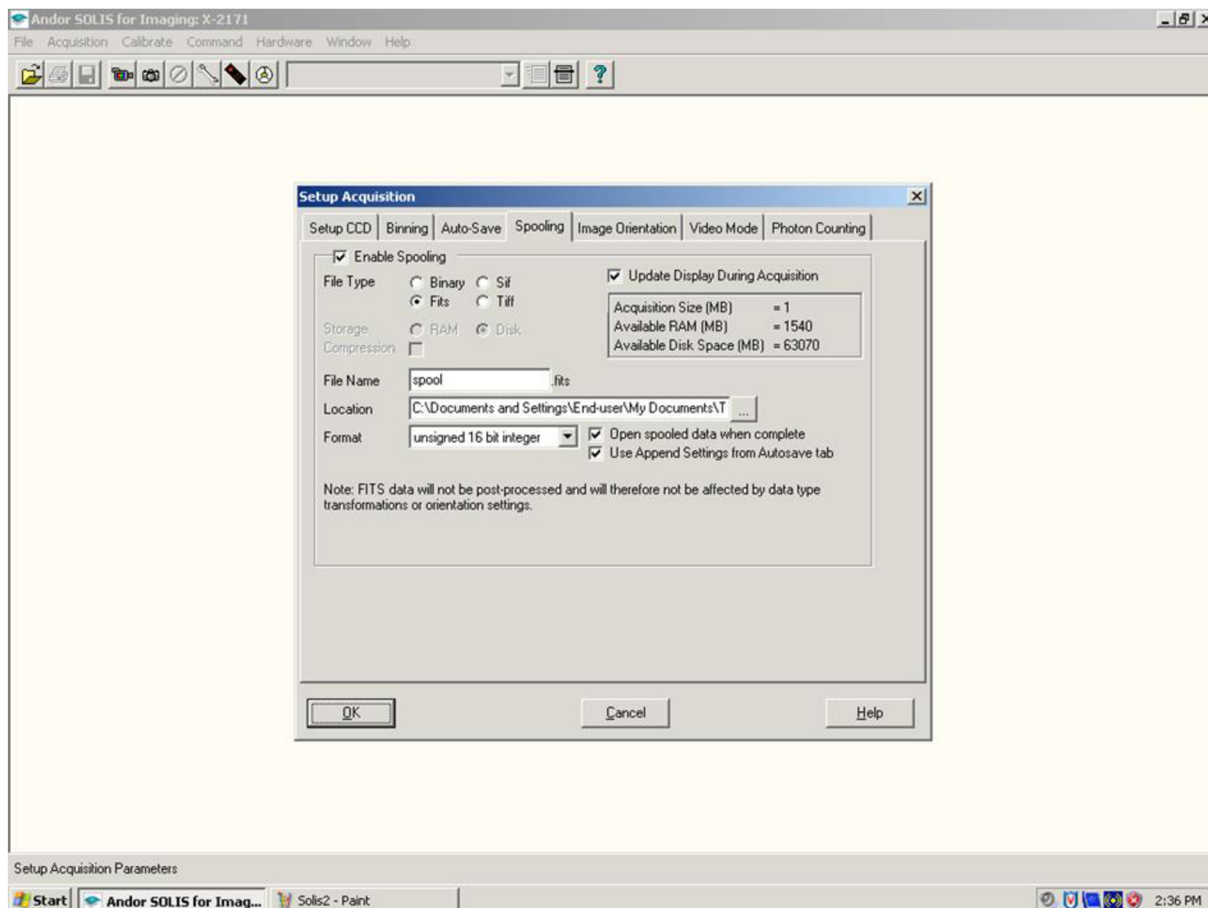


Obrázok 35: Ikony na rýchle ovládanie merania – zber dát a ukončenie zberu dát

Pre zber dát je potrebné kliknúť na ikonu fotoaparátu. Kliknutím na STOP tlačidlo ukončíme zber dát.

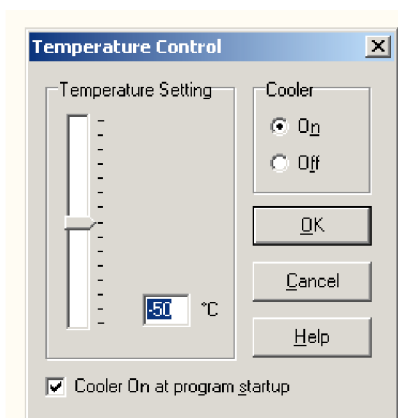
Poznámka: Konfiguračný súbor je aktuálne nastavený na automatické zaradovanie, uloženie a postupné očíslovanie dátových súborov. Keď túto automatickú funkciu (*autospool*) chceme vypnúť, je potrebné zmeniť nastavenie. Bez automatického zaradovania každá nameraná snímka spolu s možnosťou pomenovania a uloženia by mala byť zobrazená bezprostredne.

Pre automatické zaradovanie a pomenovanie dát prejdite do okna *Setup Acquisition* a kliknete na zaradovanie (*spooling*) a/alebo na automatické uloženie (*auto-save*). V prípade, keď zvolíte “*Use Append Setting from Autosave tab*”, zaradené dáta budú zhromaždené do dátovej kocky a pomenované budú prostredníctvom vybraného/vytvoreného vzoru, ktorý ste vytvorili v položke *auto-save*.



Obrázok 36: Možnosti uloženia zbieraných dát

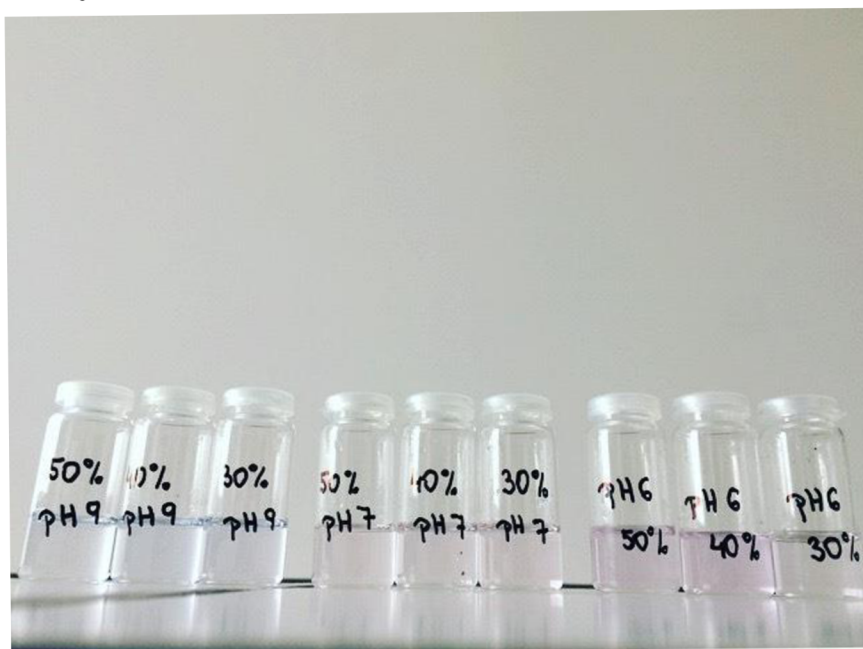
V prípade, keď chcete zmeniť chladiace nastavenie, je potreba kliknúť na *Hardware* → *Temperature Control* (regulácia teploty). Tu môžete nastaviť žiadanú teplotu, jednoducho uveďte číselnú hodnotu alebo v °C, alebo nastavte hodnotu na škále. Chladič by mal byť zapnutý a okienko “on at program startup“ by malo byť označené.



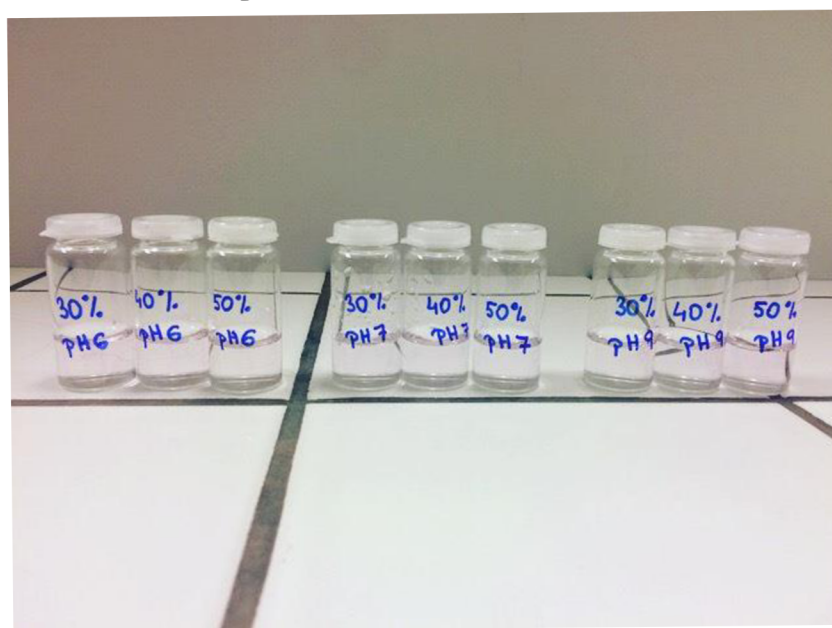
Obrázok 37: Chladiace nastavenie kamery

Pri ukončení merania je nutné vypnúť softvér, jednoducho kliknutím *File* → *Close* (zavrieť). Ventilátor kamery môže fungovať ďalej v prípade, keď počítač, ktorý ovláda softvér, zostane zapnutý, preto sa odporúča vypnúť celý systém pri dokončení experimentu, resp. na noc.

9.2. Ďalšie prílohy



Obrázok 38: Pripravené zásobné roztoky sondy s rôznym pH



Obrázok 39: Pripravené zásobné roztoky sondy s rôznym pH



Obrázok 40: Fluorescenčná sonda SNARF-4F AM v ampulke