



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

FLUORESCENČNÍ TŘÍPÁSMOVÝ READER

THE TRI-BAND FLUORESCENT READER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Denisa Škrabalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka: **Denisa Škrabalová**
Studijní program: Strojírenství
Studijní obor: Základy strojního inženýrství
Vedoucí práce: **Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.1111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Fluorescenční třípásmový reader

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Fluorescenční readery jsou přístroje určené k analýze fluorescenčních barviv. Tato práce bude zaměřena na testování a úpravy třípásmového fluorescenčního readeru pro fluorofory Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 647.

Cíle bakalářské práce:

- 1) Proměřit samotné fluorofory komerčním monochromátorem
- 2) Pomocí stávající optické soustavy readeru pořídit a vyhodnotit snímky fluoroforů
- 3) Provést a vyhodnotit spektrální analýzu propustnosti optické soustavy readeru
- 4) Vytvořit optickou simulaci vlastní soustavy readeru, případně pro ni vytvořit konstrukční návrh

Seznam doporučené literatury:

HIBBS, A. R. Confocal microscopy for biologists. Springer Science & Business Media, 2004.

FUKA, J. a HAVELKA, B. Optika a atomová fyzika: fyzikální kompendium pro vysoké školy. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1961.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2016/17

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce pojednává o problematice testování a návrhu laboratorního optického přístroje nazývaného třípásmový fluorescenční reader, jenž je určený pro fluorofory Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 a Alexa Fluor 647. Obsahuje teoretickou část s klíčovými vědomostmi nejenom z oblasti přírodních věd, jakými jsou fyzika, chemie, biologie, ale také současné technické možnosti, které jsou nezbytné pro zpracování praktické části. V praktické části se nachází vypracování cílů bakalářské práce, kterými jsou měření a vyhodnocení zkoumaných vzorků pomocí monochromátoru, pořízení a vyhodnocení snímků pomocí stávající soustavy, sestavení spektrální analýzy propustnosti, tvorba a simulace vlastního řešení soustavy a vytvoření konstrukčního návrhu. Po proměření vzorků a přístroje i vytvoření simulace, byl zhotoven mechanický model sestavy readeru.

SUMMARY

This bachelor thesis deals with the issue of laboratory testing and design of an optical instrument called a tri-band fluorescent reader, which is designed for fluorophores Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 and Alexa Fluor 647. It contains a theoretical part with key knowledge not only in the natural sciences, such as physics, chemistry, biology, but also the current technical capabilities that are necessary for the practical part. In the practical part is drafting the objectives of the thesis, which are the measurement and evaluation of the samples examined using a monochromator, acquisition and evaluation of images using the existing system, build spectral analysis throughput, create a simulation of custom solutions and create a system engineering design. The mechanical model of the reader assembly was made after measuring the samples and the device and creating the simulation.

KLÍČOVÁ SLOVA

fluorescenční reader, fluorescence, Jablonského diagram, fluorofory, spektrální analýza, excitace, emise, ELISA.

KEYWORDS

fluorescence reader, fluorescence, Jablonski diagram, fluorophores, spectral analysis, excitation, emission, ELISA.

ŠKRABALOVÁ, D. *Fluorescenční třípásmový reader*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2017, 46 s., Vedoucí bakalářské práce Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s pomocí a odborným vedením pana Ing. Zbyňka Dostála, Ph.D. Všechny podklady, ze kterých jsem při psaní čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Použité obrázky, tabulky a grafy jsou ocitovány nebo mnou vytvořeny.

.....

V Brně 1. dubna 2017.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Zbyňkovi Dostálovi, Ph.D. za pomoc, vedení, odborné rady a konzultace při psaní bakalářské práce.

Obsah

Úvod	3
1 Fluorescence	5
1.1 Historický úvod	5
1.2 Aplikace fluorescence	5
1.3 Popis a definice fluorescence	5
1.4 Jablonského diagram	6
1.5 Charakterizace fluorescence	7
2 Fluorofory	11
2.1 Vnitřní fluorofory	11
2.2 Vnější fluorofory	11
2.2.1 Fluorescenční značky	11
2.2.2 Fluorescenční sondy	12
2.3 Ztráta fluorescence	12
3 Metoda ELISA	15
4 Fluorescenční reader	17
4.1 Rešerše fluorescenčních readerů	17
4.2 Optická soustava fluorescenčního readeru	17
5 Proměření vybraných fluoroforů dostupnými přístroji	19
5.1 Fluorofory Alexa Fluor Dyes	19
5.2 Měření na readeru Synergy H1	19
5.3 Snímky fluoroforů pořízené pomocí stávající optiky readeru firmy BioVendor Instruments	21
5.4 Spektrální analýza propustnosti stávající optické soustavy readeru firmy BioVendor Instruments	25
5.5 Vyhodnocení měření stávající optické soustavy readeru	25
6 Návrh vlastní optické soustavy readeru	29
6.1 Návrh soustavy readeru	29
6.2 Optická simulace soustavy readeru v programu Zemax	30
6.2.1 Osvětlovací část	30
6.2.2 Zobrazovací část	31
6.3 Spektrální analýza propustnosti navržené optické soustavy readeru	35
6.4 Konstrukční návrh	37
Závěr	39
Dodatek A	41

Úvod

Předmětem této práce je testování a úprava třípásmového fluorescenčního readeru, který je určen pro vybrané fluorofory. Fluorescenční readery jsou optické přístroje sloužící ke kvalitativní fluorescenční spektrální analýze fluorescenčních barviv obsahujících fluorofory v různých koncentracích.

Práce je dělená do dvou částí. Prvou je teoretická část pojednávající o podstatě, charakteristice a využití fluorescence. Věnuje se problematice fluoroforů, jejich využití při výzkumu a vývoji v různých vědních oblastech, výskytu v přírodě a potřebě uměle vytvářet látky s vlastností fluorescence a vlastnostem jednotlivých často využívaných fluoroforů. Obsahuje rešerši na téma fluorescenční readery. Jsou představeny modely readerů, jak pro detekci fluorescence, absorbance, luminiscence a dalších specifických veličin a jevů, tak i multifunkční, které jsou v současnosti komerčně dostupné. Druhá část je praktická a byla vytvořena na základě požadavků zadávající firmy BioVendor Instruments.

Hlavními cíli práce bylo:

- **Proměřit samotné fluorofory komerčním monochromátorem.**
- **Pomocí stávající optické soustavy readeru pořídit a vyhodnotit snímky fluoroforů.**
- **Provést a vyhodnotit spektrální analýzu propustnosti optické soustavy readeru.**
- **Vytvořit optickou simulaci vlastní soustavy readeru, případně pro ni vytvořit konstrukční návrh.**

1 Fluorescence

1.1 Historický úvod

Počátky sledování fluorescence se datují již do období středověku, kdy se začaly zpracovávat rostlinné extrakty pro lékařské účely. Pro vytvoření medikamentů byly rostliny často dováženy z exotických krajín louhovány ve vodě, která díky rozpuštění látek schopných fluorescence získala barevný nádech. Popis tohoto úkazu podal španělský lékař a botanik Nicolás Monardes v roce 1565. Posléze se pokusům s těmito látkami věnovalo velké množství vědců. O podrobný popis a zavedení termínu fluorescence se zasloužil irský matematik a fyzik George Gabriel Stokes v roce 1852 [1].

1.2 Aplikace fluorescence

V současné době se s fluorescenčním jevem možné setkat prakticky na každém kroku. Při použití běžných a snadno dostupných zdrojů světla jako výbojek a LED diod [2]. Častou a důležitou aplikací fluorescence je jak v laboratorní biomedicině (například studium DNA, farmaceutický průmysl), tak i při studiu přírodních pochodů, které budou nastíněny v části 3, která se zabývá jednotlivými fluorofory užívaných pro zviditelnění struktur látek. V přírodních vědách jakými jsou chemie, fyzika, biologie je fluorescence důležitým nástrojem pro analýzu složení a dalších vlastností vzorků.

Významnou aplikací fluorescence v oborech lékařství a materiálového inženýrství [3, 4] jsou metody spektroskopie. Významná odvětví spektroskopie jsou fluorescenční korelační spektroskopie [5] a rentgenová fluorescence [6]. Fluorescenční spektroskopie je stále se rozvíjející vědní obor, který se snaží o získání efektivnější analýzy vzorků.

Do kategorie přístrojů založených na principu fluorescence látek a jeho detekci je možné zařadit různé modifikace spektrofluorometrů, fluorescenčních mikroskopů, fluorescenčních skenerů (sem se řadí i fluorescenční readery) a průtokových cytometrů [7].

1.3 Popis a definice fluorescence

Aby bylo možné popsat a definovat samotnou fluorescenci, je důležité se nejprve věnovat pojům, jako jsou atom, molekula a foton. Atom, skládající se z kladně nabitého jádra a záporně nabitého elektronového obalu, je elementární stavební částice hmoty. Podle modelu kvantové mechaniky atomu, je elektronový obal tvořen záporně nabitými elektrony, jež obklopují jádro atomu v orbitalech. Jednotlivé orbitaly charakterizuje hlavní kvantové číslo popisující jeho energii. Přechody mezi orbitaly jsou doprovázeny excitací a emisí fotonů. Termín foton zavedl americký chemik Gilbert Newton Lewis v roce 1926 [8]. Jedná se o elementární částici elektromagnetického záření neboli světla s danou energií. Pokud atom excituje určité množství fotonů, alespoň jeden elektron přeskočí z orbitalu o nižším hlavním kvantovém čísle, tedy s nižší energií, na orbital o vyšším hlavním kvantovém čísle, tedy s vyšší energií. Naopak když elektron přechází z orbitalu s vyšší energií na orbital s nižší energií, musí emitovat foton, jehož energie je rozdíl energií obou orbitalů [9].

Jsou-li atomy vázány do molekuly, mohou elektrony v rámci molekuly přecházet mezi jejími jednotlivými energetickými hladinami, navíc díky kmitavému pohybu vázaných atomů dochází k přechodům mezi jejími vibračními stavy v rámci jednoho energetického stavu molekuly. Tento přechod je opět doprovázený změnou energie, ale tato změna je o mnoho nižší, než je změna energie mezi jednotlivými energetickými hladinami a dále bude označován jako relaxace vibrační energie [9].

Díky znalostem pojmu atom, molekula a foton je nyní možné definovat samotnou fluorescenci. Fluorescence je schopnost látky pohlcovat elektromagnetické záření o určité vlnové délce a vyzařovat elektromagnetické záření o vlnové délce vyšší, tedy o nižší energii než byla energie pohlcovaného světla. Průběh fluorescence se dělí do tří skupin: na excitaci, relaxaci vibrační energie na nejnižší hladinu excitace a emisi. Dalším fotoluminiscenčním jevem je fosforescence [9], která bude také blíže představena v následující části.

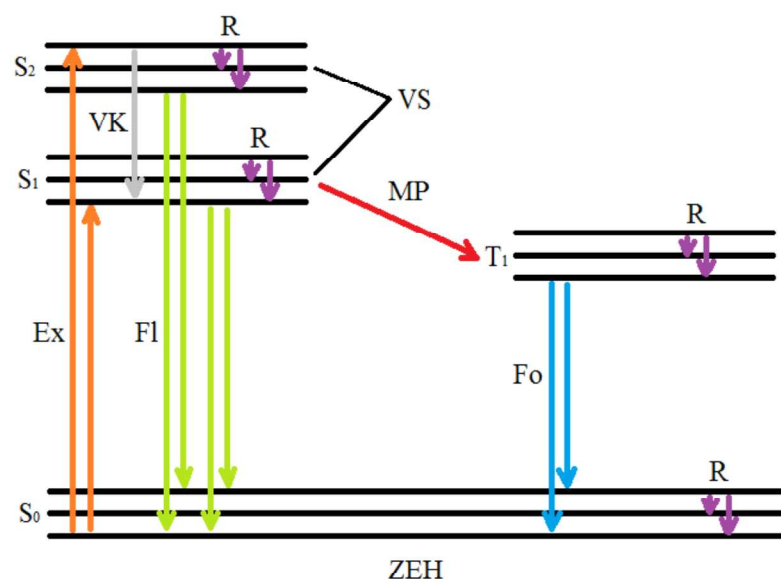
1.4 Jablonského diagram

Průběhem absorpce a emise fotonů látkou se zabýval polský profesor Alexander Jablonski [10], který je označován za otce fluorescenční spektroskopie. Základem je energetický tzv. Jablonského diagram, který je grafickou interpretací energetických hladin a přechodů mezi nimi. Pomocí diagramu, znázorněném na obr. 1 [3], je možné sledovat absorpci určitého kvanta energie, kdy se molekula dostane z rovnovážné singletní hladiny S_0 do některé excitované singletní elektronové hladiny S_n a případně pak následkem mezisystémového přechodu do tripletní elektronové hladiny T_n . Aby se molekula mohla dostat do tripletního stavu, musí elektron podstoupit spinovou konverzi, kdy elektron získá opačný spin [3].

Molekula nacházející se v excitovaném stavu má vyšší energii. Aby se dostala do základní energetické hladiny S_0 musí ztratit energii. Toho může docílit buď zářivým, nebo nezářivým energetickým přechodem. Zářivého přechodu je docíleno pomocí emise fotonu (fluorescence nebo fosforescence). Nezářivé přechody představuje vnitřní konverze, mezisystémový přechod (viz obr. 1 [3]) a relaxace vibrační energie. K ní dochází, pokud se snižuje energie, ale molekula si zachovává svůj určitý singletní nebo tripletní stav. Doba trvání nezářivých přechodů je nižší než u zářivých přechodů. Pro fluorescenci se uvádí jako typická hodnota řádově 10^{-8} s, u fosforescence je typická delší doba trvání v řádech milisekund až sekund [3]. Fluorescence umožňuje přesun z excitovaného singletního stavu do základního singletního stavu. K fosforescenci může dojít až po spinové konverzi, kdy se molekula nachází v excitovaném tripletním stavu a následně přechází opět do základního singletního stavu [7].

Vedle fluorescence a fosforescence je možné sledovat i tzv. zpožděnou fluorescenci. Ta je charakteristická přechodem z excitovaného singletního stavu, ale během přechodu přejde molekula na určitou dobu do tripletního stavu. Doba trvání celého přechodu je tedy delší, než by tomu bylo u fluorescence, ale emisní spektrum odpovídá fluorescenci [7].

Při fluorescenci se emituje záření podle Kashova pravidla z nejnižší možné hladiny S_1 , na kterou se molekula dostane relaxací vibrační energie a vnitřní konverzí [7]. Emisní spektra jsou dle Vavilovova zákona nezávislá na vlnové délce excitace [7].



Obrázek 1: Schéma Jablonského diagramu. Převzato a upraveno z [3]. Ex - excitace, Fl - fluorescence, Fo - fosforescence, VK - vnitřní konverze, VS - vibrační stavy, MP - mezi-systémový přechod, R - relaxace, ZEH - základní energetická hladina.

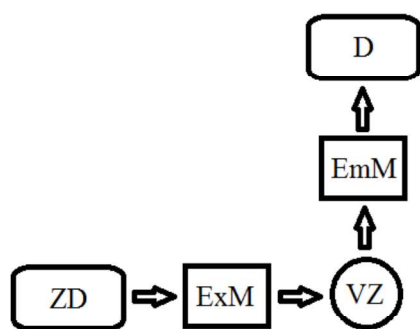
1.5 Charakterizace fluorescence

Látku lze charakterizovat pomocí excitačního a emisního spektra. Excitační spektrum ukazuje relativní účinnost různých vlnových délek dopadajícího záření na fluoreskující molekulu. Po absorpci záření, začne fluoreskující molekula emitovat záření neodpovídající vlastnostem původního absorbovaného záření. Jestliže určíme relativní rozložení vlnových délek tohoto emitovaného záření, získáme emisní spektrum [6].

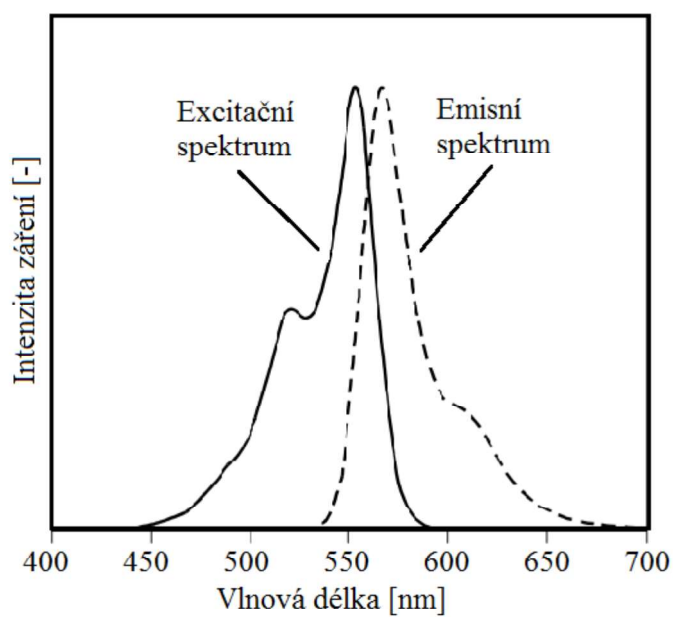
Aby bylo možné získat excitační a emisní spektrum, je do měřicí optické soustavy (viz obr. 2) vložen proměnný excitační monochromátor složený z excitačních filtrů a proměnný emisní monochromátor složený z emisních filtrů. Při měření excitačního, případně emisního spektra je emisní, případně excitační monochromátor nastaven fixně a na excitačním, případně emisním monochromátoru se nastavují jednotlivé vlnové délky a sleduje se příslušné spektrum. Zobrazením emisního a excitačního spektra do jednoho grafu získáme fluorescenční spektrum. Např. fluorescenční spektrum barviva Alexa Fluor 555 je ukázáno na obr. 3 [11]. Při analýze spekter lze určit ztrátu energie vznikající na fluoreskující molekule a tím vzniklý Stokesův posun, který vyjadřuje rozdíl vlnových délek mezi peaky excitačního a emisního spektra viz obr. 4 [7, 12].

Důležitým parametrem při hodnocení vlastností fluoreskující molekuly je kvantový výtěžek, který se pohybuje v intervalu 0 až 1 a který vyjadřuje schopnost vyvolat fluorescenci. Stanovuje se podílem množství vyzářených fotonů k množství pohlcených fotonů [12].

Dalším důležitým parametrem je intenzita fluorescence, která je definována jako počet fotonů pohybujících se v určitém směru za jednotku času. Lze ji stanovit pomocí kvan-



Obrázek 2: Schéma měření excitačního a emisního spektra. ZD - zdroj světla, ExM - excitační monochromátor, D - detektor, EmM - emisní monochromátor, VZ - vzorek.



Obrázek 3: Fluorescenční spektrum barviva Alexa Fluor 555 [11].

tového výtěžku, který je vynásoben danou intenzitou absorpce fotonů [7].

Čas, po který molekula existuje v konkrétním excitovaném stavu od absorpce po emisi fotonů, úzce souvisí s nezářivými přechody a stanovuje dobu dohasínání fluoreskující molekuly [7].

Polarizované záření je charakteristické vektorem elektrické intenzity, který kmitá v jedné rovině. Pokud by nepohybující se molekula absorbovala toto světlo, pak by také vyzařovala výrazně polarizované záření. V normálních podmínkách se molekuly pohybují a různě se natáčí při pohlcování záření a proto se objevují různé elektrické intenzity ve více rovinách [3].

2 Fluorofory

Látky vyznačující se schopností fluorescence se označují jako fluorofory. Jednotlivé fluorofory charakterizuje přesně dané absorpční a excitační maximum. Ta jsou ovlivněna strukturou látky (například počtem benzenových jader) [12].

Fluorofory je možné rozdělit podle jejich původu do dvou skupin, na vnitřní (intrinsic, vlastní) a vnější (extrinsic, nevlastní). Skupinu vnitřních fluoroforů tvoří přirozeně se objevující fluorescenční látky ve vzorku. Vnější fluorofory se uměle přidávají tak, aby se docílilo požadovaných fluorescenčních vlastností vzorku [7].

2.1 Vnitřní fluorofory

Mezi zástupce této třídy patří aminokyseliny, kofaktory enzymů, cytochromy, chlorofyl, hemoglobin, myoglobin, peroxidáza, zelený fluorescenční protein, fytofluory, fykobiliproteiny a další. Aminokyseliny zajišťují fluorescenci proteinů v ultrafialovém pásmu spektra a to zejména aromatický tryptofan (největší podíl – důležitá indolová skupina), dále pak tyrozin a fenylalanin (nejmenší podíl) [7]. Oblast viditelného spektra můžeme sledovat například u chlorofylu a kofaktorů enzymů – nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu (NADPH), flavin adenin dinukleotid (FAD), pyridoxal fosfát, riboflavin a flavin mononukleotid (FMN) [7]. Pomocí vnitřní fluorescence chlorofylu se provádí studium rostlin, hlavně sledování procesu zvaného fotosyntéza. Dále slouží například při rozborech vody – přítomnost fytoplanktonu [3].

2.2 Vnější fluorofory

Jestliže sledovaný vzorek nemá potřebnou intenzitu fluorescence pro měření (probíhá slabá nebo neprobíhá žádná fluorescence), je možné na něj navázat tzv. nevlastní fluorofory a docílit tím kvalitnějšího pozorování chování daného systému. Důraz je kladen především na to, aby přidání fluoroforu do vzorku mělo minimální vliv na funkci biologického systému. Dalšími požadavky jsou stabilita při ozařování a vysoká intenzita fluorescence [12].

Podle charakteru chemické vazby, kterou mezi sebou vytváří fluorofor a molekula, se dělí na fluorescenční značky (silná kovalentní vazba) a fluorescenční sondy (slabá nekovalentní vazba). Při kovalentní vazbě dojde ke sdílení jednoho nebo více párů elektronů. Pokud nedojde ke sdílení elektronů, nastává vazba nekovalentní.

Fluorofory mohou, ale i nemusí mít vliv na kvantový výtěžek fluorescence. Látky, které se vyznačují tím, že zachovávají kvantový výtěžek jsou aplikované ve fluorescenční cytochemii a [7]. Naopak existují fluorofory, které po zavedení do systému velmi mění kvantový výtěžek a závisí na prostředí, ve kterém se nachází [7].

2.2.1 Fluorescenční značky

Jak již byla zmíněno je fluorescenční značka vázaná pomocí nepřímé kovalentní vazby s molekulami například proteinů, peptidů, ligandů a oligonukleotidů. Používají se v imu-

nologii, histochemii, afinitní chromatografii a dalších vědních oborech [7].

Mezi nejpoužívanější značky v imunofluorescenčních metodách patří Fluorescein (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) – zelené barvivo, Rhodamine (Tetramethylrhodamine Isothiocyanate, TRITC) – červené barvivo a Diamidin Fenyldiol (DAPI) – modré barvivo [12]. Dalšími zástupci jsou Cyanine Dyes. Značí se Cy (například Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7), mají vyšší kvantový výtěžek než Fluorescein a Rhodamin, ale nižší Stokesův posun [12]. Obsahují nasycené heterocykly a další aromatická jádra. Alexa Fluor Dyes [11] jsou popsány v části 2.3.

Nově objevené fluorofory bóru se objevují pod označením BODIPY. Disponují vyšším kvantovým výtěžkem fluorescence na úkor nízkého Stokesova posuvu [7]. Výhodou je také nezávislost na polaritě a na pH.

2.2.2 Fluorescenční sondy

Oproti fluorescenčním značkám se vyskytuje mezi fluorescenční sondou a vzorkem přímá nekovalentní vazba. Následkem takové reakce může dojít a mnohdy i dochází ke změně fluorescenčních vlastností. Sondy se převážně vážou na buněčnou stěnu, buněčnou membránu nebo nukleovou kyselinou [12].

Množství doposud zaevidovaných sond je řádově v tisících [7]. Membránové fluorescenční sondy se využívají při zkoumání přechodu molekul přes danou membránu [13], pohybu lipidů v buňce [14], reakce membrány na přítomnost léčiv [15], recyklace synaptosomů [16] nebo mikroviskozity membrán [17]. Důležité jsou lipidové sondy. Řadí se sem například Pyrene, Dansyl, různé fosfolipidy a další. Ke studiu nukleových kyselin jsou určeny fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny. Oproti membránovým sondám, které se vážou na nepolární uhlovodíkový řetězec, se zde může uskutečnit vazba na různých místech. Při studiu chromozomů se často využívá Acridine Orange (pro DNA) [18], Acridine Orange (pro RNA) [19], Ethidium Bromide [20] nebo Propidium Iodide [21]. Existují fluorescenční sondy pro zjištění polaritě prostředí (1-anilinaftalén-8-sulfonát, 2-ptoluidinaftalén-6-sulfonát) [22], pro stanovení membránového potenciálu (Merocyanine, Carbocyanine, styrylové sondy, atd.) [23] nebo také sondy pro stanovení přenosu energie mezi akceptorem a donorem [24].

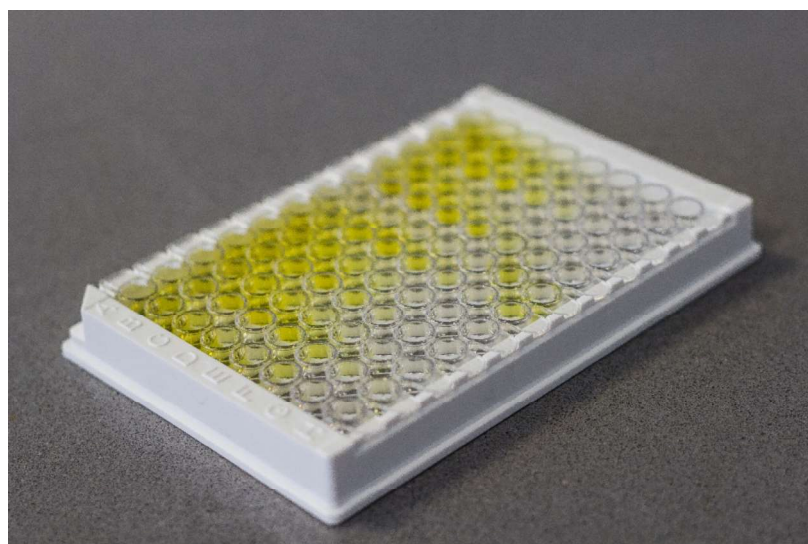
2.3 Ztráta fluorescence

Pokud dochází ke snižování kvantového výtěžku fluorescence, při zachování fluorescenčního emisního spektra, nastává tzv. zhášení fluorescence. Zhášení může mít dvě příčiny. Prvou z nich je zhášení fluoroforu sebou samým (samozhášení), které může nastat při pozorování vzorku o vysoké koncentraci fluorescenčního barviva, případně vysoké hustotě značení vzorku. Druhou příčinou zhášení je styk se zhášející látkou. Pokud dojde ke styku fluoroforu se zhášející látkou, nastává buď dynamické (srážkové) nebo statické zhášení. Statické zhášení se projevuje chemickou změnou molekul. U dynamického zhášení chemická změna neprobíhá, fluorofor se ze stavu o vyšší energii dostává do stavu nejnižšího (základního) s absencí záření [7].

Dalším procesem, při kterém dochází ke ztrátě fluorescence je proces fotovybělování (photobleaching). Při intenzivním ozáření může dojít k nevratným změnám ve struktuře fluoroforu, které mohou vyústit až do celkového vybělení. Fluorofor pak není schopen emitovat záření [12].

3 Metoda ELISA

Mezi hlavní imunochemické metody patří imunoeseje [25], imunoblotování [26], imunoprecipitace [27], imunoafinitní chromatografie [28] a imunosenzory [29]. V této práci bude blíže pojednáváno o metodách imunoeseje, mezi které patří i metoda ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Tyto metody lze rozdělit podle různých hledisek, například na homogenní a heterogenní. Homogenní metoda je jednodušší a nevyžaduje oddělení vázané a volné značené protilátky nebo antigenu, protože navázání protilátky na antigen ovlivní intenzitu signálu. Heterogenní metoda se vyznačuje navázáním jednoho z reaktantů (antigenu nebo protilátky) na pevný nosič (například na mikrotitrační destičku (viz obr. 5) nebo zkumavku), který usnadňuje oddělení vázaných a volných značených reaktantů. Oddělení reaktantů je nutné, protože interakce neovlivňuje intenzitu signálu. Ke značení reaktantů může být použit buď radioisotop (RIA - Radio Immuno Assay), enzym (EIA - Enzyme Immuno Assay) nebo fluoreskující barvivo.



Obrázek 4: Pevný nosič, mikrotitrační destička.

ELISA slouží pro diagnostiku protilátek. Jedná se o imunochemickou metodu se značenými reaktanty, přesněji o heterogenní enzymovou immunoanalýzu, která je založena na specifické interakci antigenu¹ s protilátkou², kdy je stanoveno množství jednoho z reaktantů. Do dané směsi se přidá substrát³, který je katalyzován navázaným enzymem s protilátkou nebo antigenem, kde jeden z nich je zakotven na pevný nosič. Enzym je vázán pomocí kovalentní vazby na protilátku nebo antigen. Výsledkem reakce je pak fluoreskující směs, jehož koncentrace je úměrná jednomu ze členů reakce. Pomocí spektrofotometrie nebo fluorescence je testováno, zda ve zkoumané směsi jsou nebo naopak nejsou protilátky pro daný antigen a lze takto například stanovit přítomnost patogenů v organismu [30, 31].

¹Makromolekula, která je vyhodnocena organismem jako nevlastní.

²Molekula, jenž po navázání s antigenem vyvolá obranou reakci před cizí látkou.

³Chemická látka, která reaguje s enzymem a tím změní svoji barvu.

Metoda ELISA se dělí na nekompetitivní (sendvičovou) a kompetitivní. Při nekompetitivní metodě je neanalyzovaná látka v nadbytku. Na protilátku, která je navázána na pevný nosič, je navázán antigen a následně je na tento antigen navázána sekundární protilátka, tímto se vytvoří tzv „sendvič“. Při kompetitivní metodě je vždy nadbytek antigenu. Neznačený a značený antigen soutěží o omezený počet míst na protilátkách. Další dělení metody ELISA je na přímou a nepřímou metodu. Přímá metoda ELISA slouží ke stanovení přítomnosti antigenu nebo antígeno. Vyznačuje se reakcí značené protilátky s neznačeným antigenem nebo značeného antigenu s neznačenou protilátkou. Nepřímá metoda ELISA umožňuje stanovit přítomnost i koncentraci protilátek ve vzorku. Při této metodě se prvně váže antigen s protilátkou a následně se přidá sekundární značená protilátka [31, 32]. Metody ELISY jsou použity při přípravě vzorků.

4 Fluorescenční reader

Díky rozvoji biomedicíny v oblasti vývoje a výzkumu, poptávka po fluorescenčních readerech stoupá. Konkurence ve výrobě readerů je nemalá, proto se firmy snaží přicházet s inovacemi v oblasti finanční dostupnosti a multidetekčnosti readerů. Na dnešním trhu lze nalézt jak přístroje pracující na bázi detekce konkrétního děje (například fluorescence, luminiscence, absorpce), tak i multidetekční readery. Ve vývoji a výzkumu v moderní biomedicině našly readery rozšířené uplatnění a to v různých modifikacích dle specifických požadavků. V této práci je věnováno nejvíce pozornosti fluorescenčnímu readeru, jehož základním principem je měření emise záření po jeho absorpci vzorkem o různých vlnových délkách, díky čemuž lze detekovat vlastnosti zkoumaného vzorku.

4.1 Rešerše fluorescenčních readerů

Fluorescenční readery jsou záležitostí moderní doby. Na konci 20. století se objevilo několik návrhů optické soustavy přístroje na zkoumání luminiscenčních jevů. Jednoduché schéma soustavy složené z čoček a zrcadel proběhlo optimalizací. V roce 1999 je v Německu publikován patent na optický systém readeru [33], který je určený pro mikrotitrační destičky. Tento optický systém umožňoval měřit nejenom fluorescenci, ale také absorpci a luminiscenci. Typické schéma dnešních readerů je publikováno v roce 2007 v patentu na reader [34] také pro mikrotitrační destičky. Nejrozšířenějšími readery současnosti jsou readery pro mikrotitrační destičky, jejichž počet jamek se pohybuje v rozmezí 6 - 384, podle zvoleného modelu readeru. Firmy nabízí širokou škálu modelů fluorescenčních a multidetekčních readerů. Multidetekční readery umožňují uživateli flexibilní měření vzorků, například měření fluorescence, absorpce, luminiscence, a další. Readery mohou být specifikovány pro konkrétní fluorofory. V takovém případě je pro každý fluorofor vytvořena konfigurace excitačního a emisního filtru a dichroického zrcadla. U multidetekčních readerů se častěji vyskytují monochromátory, které umožňují upravit spektrum bílého světla na požadovanou vlnovou délku. Součástí readeru bývá inkubátor na vzorky s možností zvolit teplotu inkubace.

Významnou pozici na poli firem, které se zabývají laboratorními přístroji, je firma BioTek [35] nabízející jak fluorescenční readery, tak i multidetekční readery. Mezi konkurenční firmy v oblasti laboratorních přístrojů patří firma Tecan [36] a firma Lonza [37]. Firma Lonza se věnuje nejenom vývoji readerů ale především je světovým dodavatelem v oblasti farmaceutického průmyslu. Mezi lídry na poli diagnostiky patří firma Thermo Fisher Scientific [38]. Firmou specializující se na vývoj a výrobu readerů pro mikrotitrační destičky je BMG Labtech [39], která disponuje nejšířší nabídkou readerů.

4.2 Optická soustava fluorescenčního readeru

Typické schéma fluorescenčního readeru je zobrazen na obr. 5 [40]. Rozsah vlnových délek záření je dán charakterem konkrétně zvoleného zdroje ZD. Mezi přírodní zdroje světla lze zařadit například chemické reakce nebo výboje elektrického proudu. Za umělé zdroje

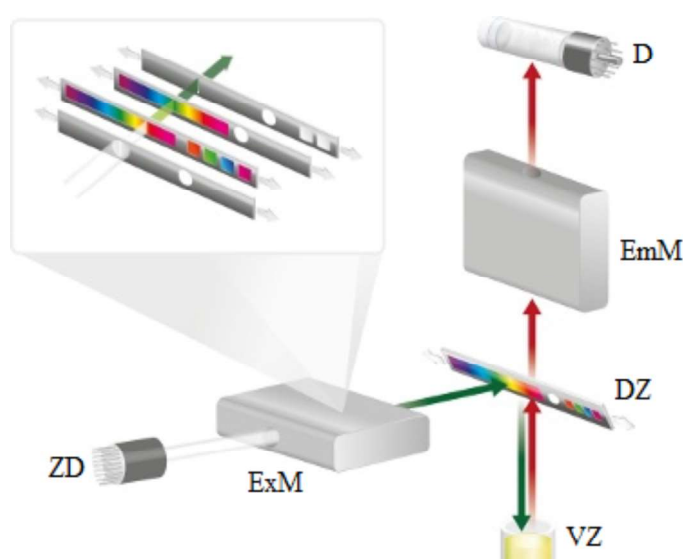
se považují zářivky, výbojky, žárovky, lasery a diody. Podle rozměrů lze zdroje rozlišit jako bodové, plošné a prostorové zdroje světla [41].

Široké spektrum vlnových délek světla je pomocí excitačního monochromátoru ExM a v něm obsažených filtrů zúženo na menší interval vlnových délek, tedy na paprsek světla o charakteristické vlnové délce. V monochromátorech lze použít velké množství optických filtrů zhotovených z různých materiálů. Jedná se o filtry z barevného skla [42], interferenční (excitační a emisní) [43], disperzní [44] a v neposlední řadě polarizační filtry [45].

Filtry zajišťují, aby na vzorek VZ dopadal vybraný svazek světla dle požadovaného rozsahu vlnových délek a aby do detektoru D bylo propouštěno pouze fluorescenční záření osvětleného vzorku.

Protože je nutné oddělit emisní (fluorescenční) a excitační světlo, je do optické soustavy vloženo dichroické zrcadlo DZ. Pomocí interference světla na rozhraní dvou vrstev o různých indexech lomu dokáže efektivně propouštět emisní světlo do detektoru D a odrážet excitační světlo na vzorek VZ. Dichroické zrcadlo DZ se umísťuje pod úhlem 45° .

Propojení optické soustavy readeru s řídicím systémem je uskutečněno pomocí detektoru D, kterým bývá fotodioda, fotonásobič (PhotoMultiplier Tube - PMT) nebo Charge Coupled Device (CCD) [46]. Pomocí něj dochází k předávání spektrálních informací o emisním záření uživateli.



Obrázek 5: Schéma fluorescenčního readeru [40]. ZD - zdroj světla, ExM - excitační monochromátor, D - detektor, EmM - emisní monochromátor, DZ - dichroické zrcadlo, VZ - vzorek.

5 Proměření vybraných fluoroforů dostupnými přístroji

Vybrané fluorofory Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 a Alexa Fluor 647 byly proměřeny pomocí readeru Synergy H1 společnosti BioTek [35] a nafoceny stávající optikou readeru firmy BioVendor Instruments.

5.1 Fluorofory Alexa Fluor Dyes

Jedná se o sulfonované deriváty Rhodaminu, které byly navrženy pro imunofluorescenční testy tak, aby bylo dosaženo oproti běžným fluoroforům vysoké intenzity fluorescence – vysoký jas barviva a nízký jas pozadí. Vyznačují se vysokým kvantovým výtěžkem – svítivostí a i zesílenou fotostabilitou, která umožňuje delší dobu snímání vzorku (nejstabilnější fotostabilita ze známých fluoroforů), možnosti použití širokého rozmezí pH a v neposlední řadě dobrou rozpustností ve vodě. Umožňují výběr ze širokého rozsahu maxim excitačního záření, která se pohybují v rozmezí 402 – 784 nm a širokého rozsahu maxim emisního záření 421 – 814 nm (viz tab. 1). Označení jednotlivých fluoroforů je dáno vlnovou délkou excitačního maxima. Největšího kvantového výtěžku je dosaženo u Alexa Fluor 488, jehož hodnota může dosahovat až 0,92. Využívají se jako fluorescenční značky při zkoumání vzorků tkání, živých buněk, fixovaných preparátů a dalších [11, 12, 47].

Tabulka 1: Charakteristické hodnoty excitačního a emisního spektra fluoroforů Alexa Fluor [47].

Fluorofor	Maximum excitačního spektra [nm]	Maximum emisního spektra [nm]
Alexa Fluor 488	495	519
Alexa Fluor 555	555	565
Alexa Fluor 647	650	668

5.2 Měření na readeru Synergy H1

Pro ověření schopnosti fluorescence jednotlivých fluoroforů při excitaci určitou vlnovou délkou jsem proměřila fluorofory Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 a Alexa Fluor 647 pomocí komerčního readeru Synergy H1 společnosti BioTek [35], který pomocí spektroskopie ultrafialového a viditelného spektra umožňuje měřit intenzitu fluorescence. Pro měření byly nanášeny do jamek mikrotitrační destičky neředěné a logaritmičtě ředěné fluorofory. Pro kontrolu bylo do prvního řádku také nanášeno čisté rozpouštědlo (voda), které nevyzařuje fluorescenční záření. Takto připravené destičky byly následně proměřeny, kde byla zvolena hodnota excitace a emise dle tab. 1 [47].

Tabulka 2: Maximum excitačního spektra 490 nm, maximum emisního spektra 525 nm, uvedené hodnoty v RFU.

Maximum excitačního spektra 490 nm, maximum emisního spektra 525 nm			
Koncentrace barviva	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 555	Alexa Fluor 647
0 % (kontrola)	32	26	33
100 %	7494	42	106
10 %	5660	34	47
1 %	3216	35	26
0,1 %	699	30	33
0,01 %	86	36	25
0,001 %	44	41	34
0,0001 %	34	40	45

Tabulka 3: Maximum excitačního spektra 550 nm, maximum emisního spektra 580 nm, uvedené hodnoty v RFU.

Maximum excitačního spektra 550 nm, maximum emisního spektra 580 nm			
Koncentrace barviva	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 555	Alexa Fluor 647
0 % (kontrola)	5	7	6
100 %	14	17824	40
10 %	0	6656	20
1 %	5	1456	6
0,1 %	3	300	3
0,01 %	0	384	4
0,001 %	5	209	4
0,0001 %	4	2	5

Tabulka 4: Maximum excitačního spektra 645 nm, maximum emisního spektra 675 nm, uvedené hodnoty v RFU.

Maximum excitačního spektra 645 nm, maximum emisního spektra 675 nm			
Koncentrace barviva	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 555	Alexa Fluor 647
0 % (kontrola)	1	0	0
100 %	0	0	531
10 %	0	0	196
1 %	0	2	53
0,1 %	0	0	6
0,01 %	0	0	0
0,001 %	1	0	2
0,0001 %	0	1	0

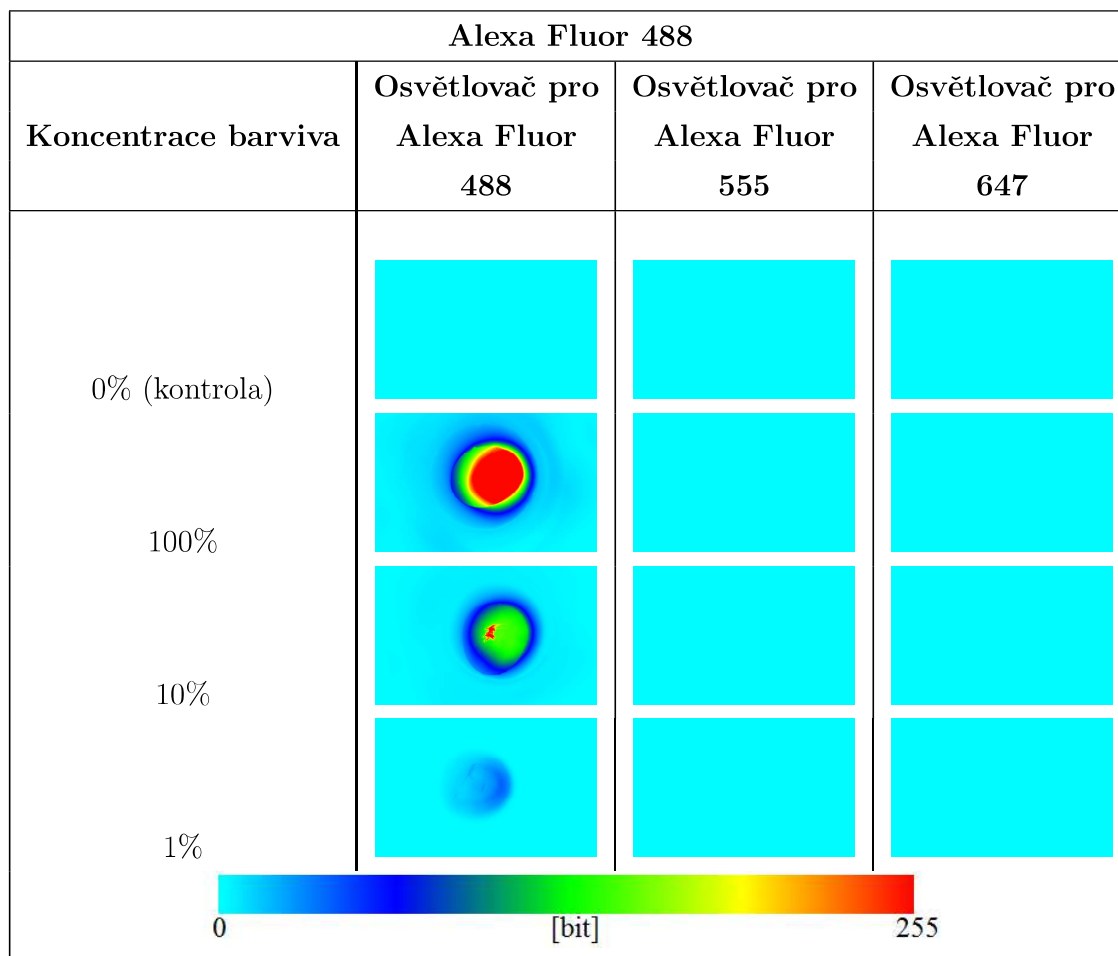
Pro fluorofor Alexa Fluor 488 byla zvolena hodnota excitačního peaku 490 nm a hodnota emisního peaku 525 nm, pro fluorofor Alexa Fluor 555, resp. Alexa Fluor 647 byla zvolena hodnota excitačního peaku 550 nm, resp. 645 nm a hodnota emisního peaku 580 nm, resp. 675 nm. Při takto zvolených parametrech je nejvyšší intenzita fluorescence při všech měřeních zaznamenána dle očekávání právě u daného fluoroforu (viz tab. 2 - 4) a klesá s klesající koncentrací fluoroforu. Naměřené hodnoty jsou v jednotkách RFU (Relative Fluorescence Units). U ostatních fluoroforů se objevuje slabá fluorescence, ale ve srovnání s daným fluoroforem se dá považovat za zanedbatelnou. Tato slabá fluorescence je důsledkem charakteru excitační a emisní křivky ve fluorescenčním spektru. Kontrola proběhla úspěšně, u rozpouštědla nebyla naměřena téměř žádná fluorescence. Tyto naměřená data odpovídají charakteristickému chování fluoroforů, mezi které patří snižování intenzity fluorescence s klesající koncentrací a existence fluorescence při správně zvolené hodnotě excitačního a emisního peaku pro každý fluorofory.

5.3 Snímky fluoroforů pořízené pomocí stávající optiky readeru firmy BioVendor Instruments

Účelem tohoto měření je vyhodnocení správnosti sestavení stávající optické soustavy. Do jamek mikrotitrační destičky byly opět naneseny neřaděné, logaritmičky řaděné fluorofory Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 a Alexa Fluor 647 a pro kontrolu rozpouštědlo (voda). Pomocí stávající optické soustavy byly pořízeny snímky jednotlivých jamek. Pokud došlo k excitaci fluoroforu odpovídalo záření jamky intenzitě excitačního záření. Pokud fluorescence nenastala, na snímku bylo vidět pouze tmavé pozadí. Snímek jamky s vodou by tedy také měly vykazovat pouze tmavé pozadí. Zdroj excitačního světla stávající optické soustavy tvořily tři LED diody, jež byly zvoleny na základě excitačních spekter z předchozího měření (viz část 6.2). Pro každý fluorofor byla použita jedna LED dioda,

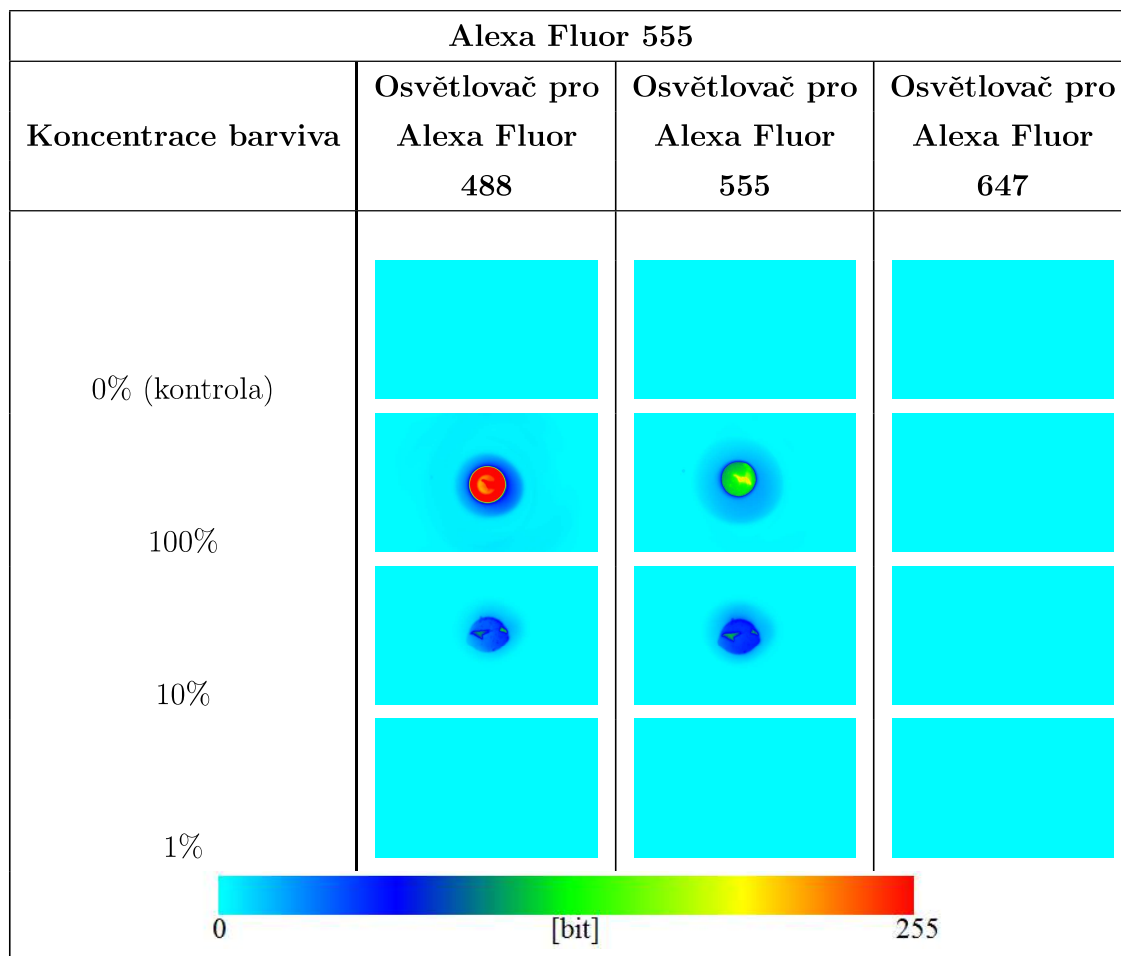
kteřá vykazovala nejlepší vlastnosti a optimální výsledky. Záření produkované LED diodou prochází excitačním filtrem a následně dopadá na vzorek. Soustavu LED diody a jí příslušejícímu filtru budeme označovat jako osvětlovač. Přehled získaných výsledků je zobrazen v tab. 5 – 7. Aby bylo možné snímky porovnat, byla na detektoru nastavena stejná expozice pro všechna měření.

Tabulka 5: Snímky fluoroforu Alexa Fluor 488, barvy jsou v nepravých barvách stupnice hall2.

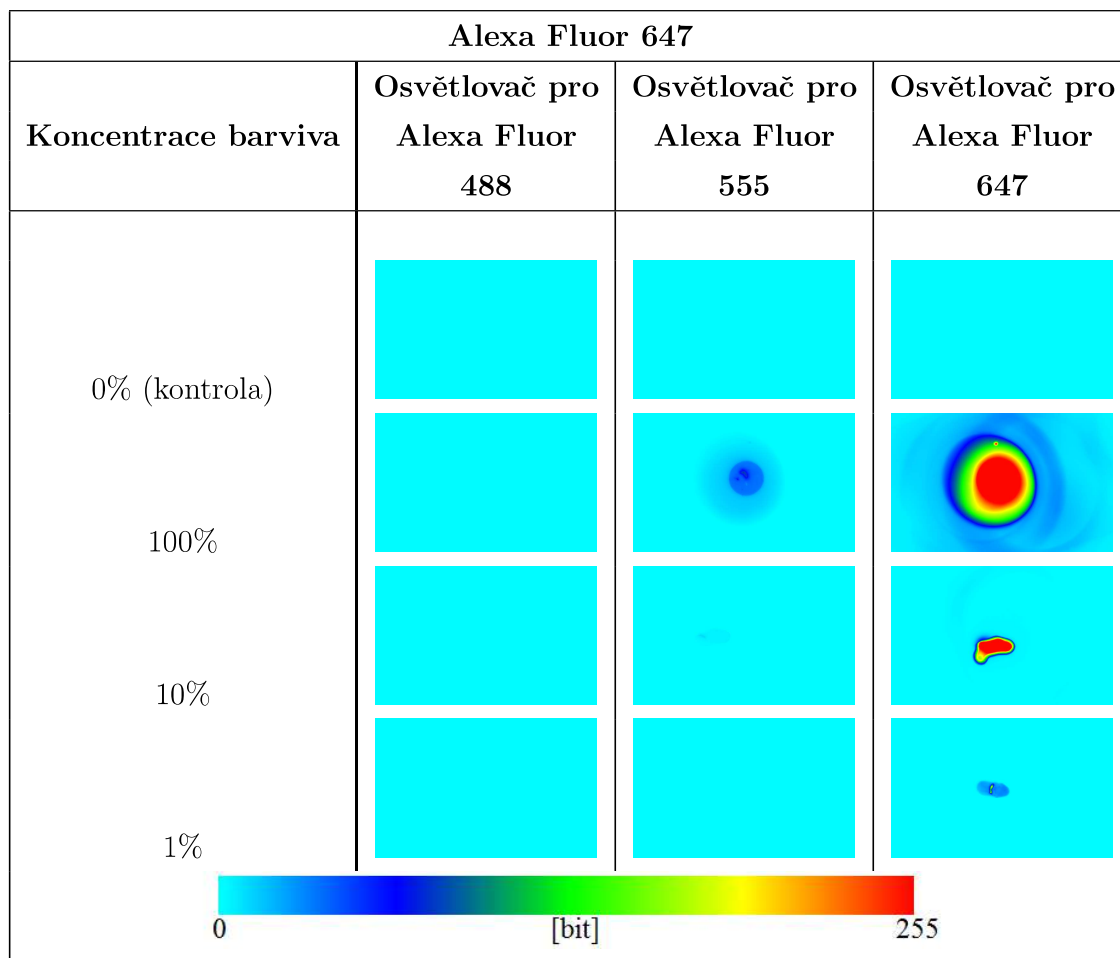


Ze snímků fluoroforů Alexa Fluor 488 (viz tab. 5) je patrné, že fluorescence se projevila pouze při použití osvětlovače pro Alexa Fluor 488. Nejvyšší intenzita byla zaznamenána u jamky s nejvyšší koncentrací a klesala s klesající koncentrací, což odpovídá výsledkům z předchozí části 6.2. Obdobné výsledky se objevily u fluoroforu Alexa Fluor 647, které znázorňuje tab. 7. Snímky fluoroforů Alexa Fluor 555 (viz tab. 6) a Alexa Fluor 647 (viz tab. 7) ukazují fluorescenci i při osvětlení osvětlovači pro Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 555 u Alexa Fluor 555 a osvětlovači pro Alexa Fluor 555 a Alexa Fluor 647 u Alexa Fluor 647, což je nežádoucí. Tato skutečnost může být částečně způsobena charakterem emisního spektra jednotlivých fluoroforů, protože průběh těchto křivek ve fluorescenčním spektru nelze upravit, je proto nutné upravit spektrální propustnost použitého emisního filtrů. Ve stávající optice readeru je jednotný emisní filtr pro všechny fluorofory. Výsledky

Tabulka 6: Snímky fluoroforu Alexa Fluor 555, barvy jsou v nepravých barvách stupnice hall2.



Tabulka 7: Snímky fluoroforu Alexa Fluor 647, barvy jsou v nepravých barvách stupnice hall2.



ukazují na nutnost změny návrhu stávající optické soustavy. Z tohoto měření vyplývá, že návrh nové optické soustavy readeru se bude týkat úpravy spektrální propustnosti readeru a úpravy excitačního spektra osvětlovačů tak, aby docházelo k excitaci a následné fluorescenci právě jednoho fluoroforu, pro který je osvětlovač navržen. Kontrola pomocí rozpouštědla u všech měření byla v pořádku, ve snímcích bylo patrné pouze tmavé pozadí. Následující měření je věnováno spektrální analýze propustnosti stávající optické soustavy readeru.

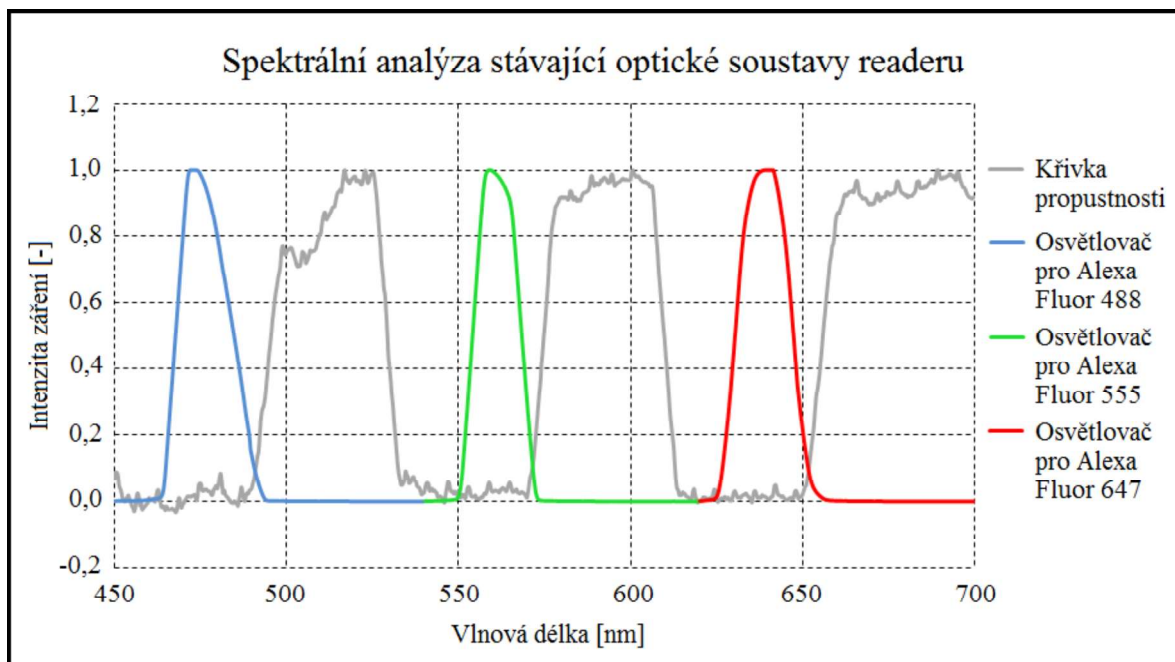
5.4 Spektrální analýza propustnosti stávající optické soustavy readeru firmy BioVendor Instruments

Pomocí spektrometru jsem získala křivky excitace a emise a sestavila spektrální analýzu propustnosti optické soustavy readeru. Pro každou LED diodu a excitační filtr byla naměřena jedna křivka excitace. Vybranou LED diodou byla prosvícena osvětlovací část optické soustavy stávajícího readeru a změřena spektrální analýza každého osvětlovače. Abych získala křivku propustnosti zobrazovací části, zvolila jsem jako zdroj světla bílé světlo, díky kterému jsem pokryla všechny vlnové délky potřebné k sestavení spektrální analýzy. Naměřené hodnoty byly normovány, jelikož zdroj bílého světla měl nižší výkon než použité LED diody a tudíž maximální hodnota intenzity fluorescence u osvětlovačů byla o několik řádů vyšší než u zdroje bílého světla. Hodnoty intenzity záření u zdroje bílého světla pro měření nejsou směrodatné, jelikož slouží pouze k získání emisní křivky. Naměřená data byla zpracována do jednoho grafu závislosti intenzity záření na vlnové délce pro jednotlivé osvětlovače. Při měření se v místnosti eliminovaly ostatní zdroje světla, aby záření zachycené detektorem pocházelo pouze od zvoleného osvětlovače u měření excitačního spektra a zdroje bílého světla při měření propustnosti. Tak bylo možné zaznamenat průběhy jednotlivých křivek bez vnějších vlivů.

Osvětlovač je zdrojem záření o úzkém rozsahu vlnové délky, proto je v grafu vidět zřetelný peak, který ukazuje její nejvyšší intenzitu (viz obr. 7). Poloha peaku by měla odpovídat vlnové délce uvedené na jednotlivých LED diod. Při měření excitačního spektra byl naměřen velmi nepatrný šum, z toho lze usoudit, že všechny osvětlovače propouští natolik vysoký výkon, že vnější vlivy jsou zanedbatelné. Průběh křivky propustnosti ve všech případech vykazuje poměrně vysoký šum, který je způsoben díky již zmíněnému nízkému výkonu zdroje bílého světla a normování křivek spektra. Při samotném měření fluorescenčním readerem je nežádoucí, aby se do detektoru dostalo excitační záření. Z obrázků je patrné, že ve všech případech se podařilo pomocí třípásmového emisního filtru toto záření z velké části eliminovat. Z tohoto měření lze usoudit, že z hlediska propustnosti optické soustavy, je optická soustava navržena správně.

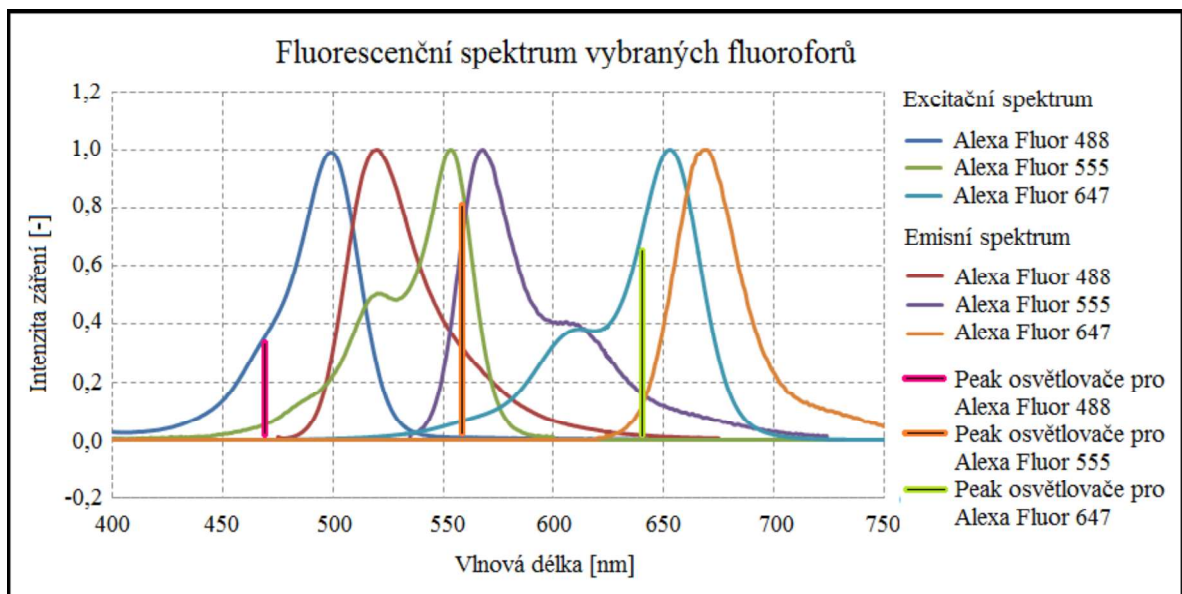
5.5 Vyhodnocení měření stávající optické soustavy readeru

Každý fluorofor má danou pološířku excitačního peaku. Pokud se křivka excitačního spektra fluoroforu přesně nebo částečně překrývá se spektrem jemu určenému osvětlovači,



Obrázek 6: Spektrální analýza stávající optické soustavy readeru, hodnoty normovány.

dochází k žádané fluorescenci. Ovšem z výsledků měření v části 5.3 vyplývá, že dochází k nežádoucí excitaci fluoroforů i jiným osvětlovačem. Na obr. 7 jsou znázorněná spektra vybraných fluoroforů a maxima spekter osvětlovačů pro ně navržených. Z obrázku je patrné, že při použití osvětlovače pro Alexa Fluor 488 dojde k překrytí excitačního spektra fluoroforů Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 555. Podobně u osvětlovače pro Alexa Fluor 555 dojde k překrytí excitačního spektra fluoroforů Alexa Fluor 555 a Alexa Fluor 647. Jakmile pak dojde k fluorescenci fluoroforu, do detektoru se dostává i nežádoucí emisní záření, protože třípásmový emisní filtr propouští všechna emisní záření vybraných fluoroforů. Tato skutečnost odpovídá snímkům z měření v části 5.3. V návrhu nové optické soustavy readeru je nutné navrhnout osvětlovač tak, aby nedocházelo k těmto překryvům, tudíž aby docházelo k fluorescenci pouze zkoumaného fluoroforu. Překryvy je možné eliminovat vhodně zvoleným excitačním filtrem s užším spektrem. I kdyby k nežádoucí fluorescenci jiného fluoroforu došlo, pomocí vhodně zvoleného emisního filtru bude propuštěno emisní záření pouze od požadovaného fluoroforu. Proto ve vlastní optické soustavě readeru bude místo třípásmového emisního filtru navržen jednopásmový emisní filtr pro každý fluorofor.



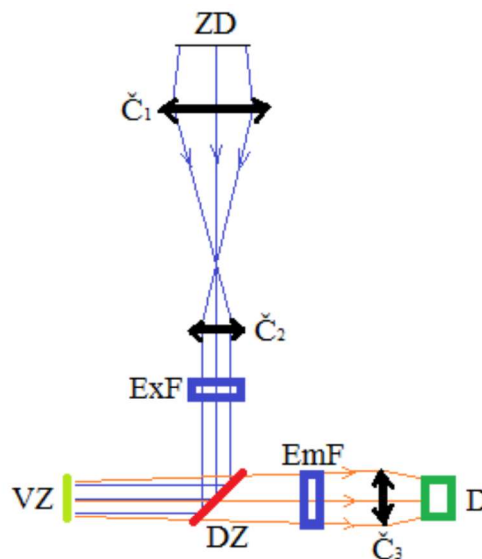
Obrázek 7: Fluorescenční spektrum vybraných fluoroforů a maxima spekter osvětlovačů pro ně navržených, hodnoty normovány.

6 Návrh vlastní optické soustavy readeru

Na základě měření propustnosti optické soustavy readeru a měření samostatných fluoroforů bylo zjištěno, že je potřebné optimalizovat osvětlovače pro jednotlivé fluorofory, aby nedocházelo k překrývání jejich spektra s excitačními spektry více fluoroforů. Byl proto zvolen širokospektrální zdroj světla (fluorescenční výbojka) tak, aby pokryl excitační spektra všech fluoroforů. Aby se omezila excitace nežádoucích fluoroforů i jiným excitačním filtrem a zabránilo se prostupu emisního světla tohoto fluoroforu na detektor, byla zvolena sestava s výměnnými jak excitačními, tak i emisními filtry. Při řešení vlastní soustavy readeru byly zvažovány dvě varianty návrhu soustavy.

6.1 Návrh soustavy readeru

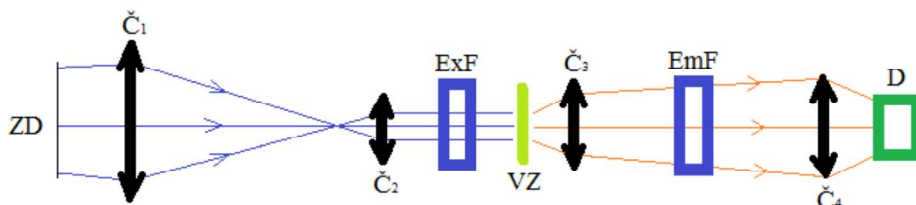
Optické komponenty soustavy tvoří zdroj světla ZD, čočky \check{C}_{1-4} , optické filtry ExF a EmF, dichroické zrcadlo DZ a detektor D. Schéma první varianty návrhu je zobrazeno na obr. 8. Rozbíhavé paprsky vyvolané zdrojem světla ZD jsou pomocí dvou spojných čoček \check{C}_{1-2} usměrněny na rovnoběžný svazek paprsků, který je dále veden přes excitační filtr ExF. Excitační filtr ExF upraví interval vlnových délek svazku a pomocí dichroického zrcadla DZ je svazek paprsků odražen na vzorek VZ, kde je buzena fluorescence. Vzorek VZ se tak stává sekundárním zdrojem světla a svazek emisního světla prochází dichroickým zrcadlem DZ a emisním filtrem EmF, který odrazí excitační světlo a propustí pouze emisní světlo. Následně emisní světlo prochází spojnou čočkou \check{C}_3 , která je navržena tak, aby fluorescenční obraz vzorku vznikl v rovině detektoru D (kamera).



Obrázek 8: První varianta návrhu soustavy readeru. ZD - plošný zdroj světla, \check{C}_{1-3} - spojně čočky, ExF - excitační filtr, VZ - vzorek, DZ - dichroické zrcadlo, EmF - emisní filtr, D - detektor.

Na rozdíl od první varianty, se ve druhé variantě návrhu soustavy readeru nevyužívá

odraz světla pomocí dichroického zrcadla DZ (viz obr. 9). Excitační světlo dopadá na povrch vzorku VZ, který je nanesený na dně jamky mikrotitrační destičky. Emisní světlo prochází dnem mikrotitrační destičky a pomocí dvou čoček \check{C}_{3-4} je vytvořen obraz vzorku v rovině detektoru D (kamera).



Obrázek 9: Druhá varianta návrhu soustavy readeru. ZD - plošný zdroj světla, \check{C}_{1-4} - spojné čočky, ExF - excitační filtr, VZ - vzorek, EmF - emisní filtr, D - detektor.

Pro každý fluorofor je navržen excitační ExF a emisní EmF filtr. Filtry jsou upevněny na revolverové hlavici, aby bylo možné je měnit pro jednotlivé fluorofory. Obě varianty byly posuzovány jak z optického, tak i konstrukčního hlediska. Z hlediska konstrukční náročnosti je první varianta jednodušší. Pro vybraný fluorofor by byla sestavena fluorescenční kostka, která by se skládala z dichroického zrcadla DZ a excitačního ExF a emisního EmF filtru. Tudíž při změně jednoho dílu (kostky) by bylo dosaženo výměny všech tří komponentů. Protože je čočka \check{C}_3 umístěná daleko od vzorku VZ, zachytí menší množství záření. Tato varianta tedy vykazuje nižší kvalitu pozorování. Druhá varianta je konstrukčně náročnější, protože dochází zvláště k výměně excitačního ExF a emisního EmF filtru. V této variantě se nevyužívá odrazu paprsků, tudíž není potřeba použít dichroické zrcadlo DZ. Díky čočce tři \check{C}_3 , která je těsně za vzorkem VZ, je zachyceno větší množství záření od vzorku VZ. Pro vlastní optickou soustavu readeru jsem zvolila druhou variantu, která přinese vyšší kvalitu pozorování.

6.2 Optická simulace soustavy readeru v programu Zemax

Soustava readeru se skládá z osvětlovací a zobrazovací části. Obě části jsou navrhovány nezávisle.

6.2.1 Osvětlovací část

Při navrhování osvětlovací části bylo důležité celým svazkem světla zdroje ZD a osvětit vzorek VZ. Protože průměr jamky mikrotitrační destičky, kde je nanesen vzorek VZ, je 7 mm, je vhodné kolimátorem složeným z čoček \check{C}_{1-2} vytvořit svazek o průměru cca $D_2 = 8$ mm. Zvolené komponenty soustavy byly vybrány z katalogů firem, které se zabývají prodeje optického příslušenství. Zdrojem světla ZD byla zvolena fluorescenční lampa s xenonovou výbojkou (SLS401) o vlnovém pásmu 240 - 2400 nm s výkonem 1,3 W s aperтурой $D_Z = 35$ mm a divergencí $3,5^\circ$ od firmy Thorlabs [48]. Achromatické čočky \check{C}_{1-2}

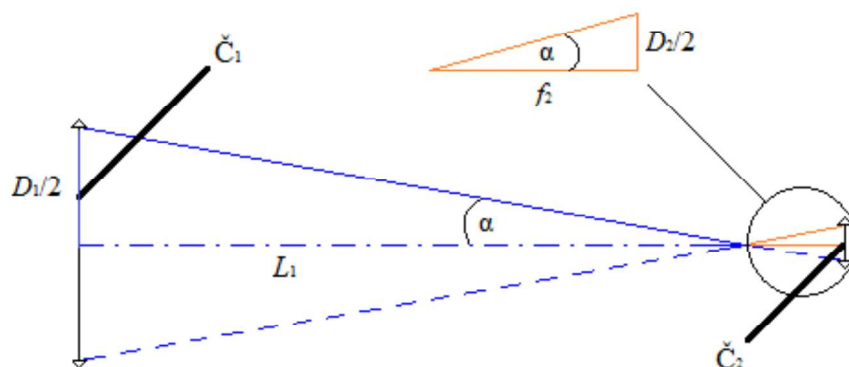
byly hledány tak, aby jejich propustnost byla v rozmezí vlnových délek pro dané fluoro-fory. Tato navržená soustava byla postupně namodelována v programu Zemax. Čočka Č₁ (AC508-100-A-ML) je vybrána z katalogu firmy Thorlabs [48]. Jedná se o dvoupalcovou čočku s ohniskovou vzdáleností $f_1 = 100$ mm a s aperturou $D_1 = 45,06$ mm, která při použití zvoleného zdroje světla ZD vytváří svazek paprsků se sečnou vzdáleností $L_1 = 123,57$ mm (viz obr. 10) a s konvergencí α :

$$\tan(\alpha) = \frac{D_1}{2 \cdot L_1} = \frac{22,53}{123,57} = 0,1823,$$

$$\alpha = 10,33^\circ.$$

Pak lze stanovit pro požadavek kolimovaného osvětlujícího svazku ohniskovou vzdálenost f_2 čočky Č₂ podle vzorce:

$$f_2 = \frac{D_2}{2 \cdot \tan(\alpha)} = \frac{4,00}{0,1823} = 21,94 \text{ mm}$$



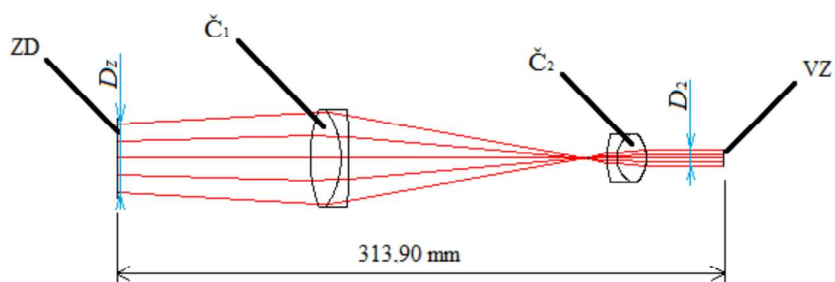
Obrázek 10: Výpočet parametrů čočky Č₂. Č₁₋₂ - spojné čočky.

Na základě výpočtu a možností dostupných čoček byla čočka Č₂ zvolena jednopalcová (65-553) s ohniskovou vzdáleností $f_2 = 25$ mm od firmy Edmund Optics [49], která vytváří kolimovaný svazek o reálném průměru $D_2 = 8,26$ mm. Schéma osvětlovací části vytvořené programem Zemax je na obr. 11 a optické parametry jsou uvedeny v tab. 8.

Získanou hodnotu koncentrace energie excitačního světla ve vzorku VZ lze vyčíst z obr. 12. Při osvětlení oblasti o poloměru 4,2 mm bylo dosaženo hodnoty koncentrace energie okolo 96 %. Ztráty energie jsou tedy poměrně nízké.

6.2.2 Zobrazovací část

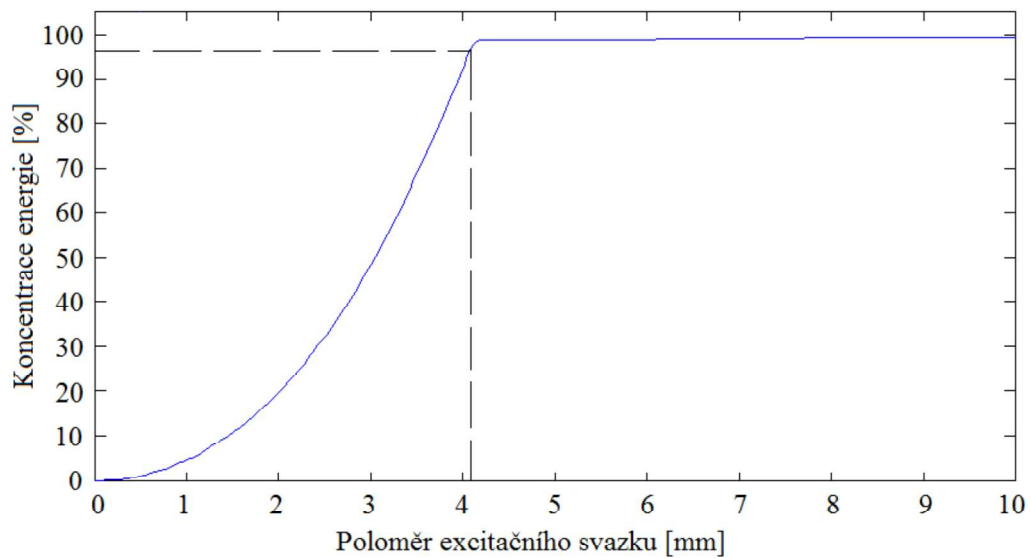
Účelem zobrazovací části optické soustavy je zobrazit fluorescenční obraz vzorku VZ na rovinu detektoru kamery D (viz obr. 13). Vzorek VZ o průměru 7 mm se stává sekundárním zdrojem světla a vytváří rozbíhavý svazek světla. Vzorek VZ je vložen do ohniskové roviny čočky Č₃, díky čemuž je za ní vytvořen systém rovnoběžných svazků paprsků. Detektor



Obrázek 11: Návrh osvětlovací části. ZD - plošný zdroj světla, \check{C}_{1-2} - spojné čočky, VZ - vzorek. Optické parametry osvětlovací části jsou uvedeny v tab. 8.

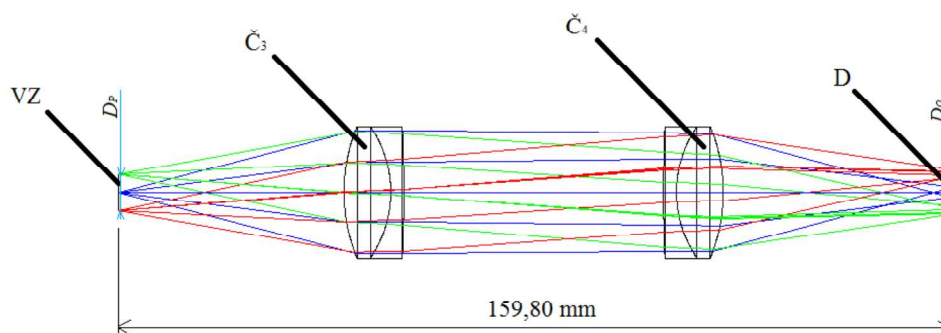
Tabulka 8: Optické parametry osvětlovací části.

Povrch	Komentář	Rádus [mm]	Tloušťka [mm]	Materiál	Volná apertura [mm]
1	Zdroj ZD	-	286,12	-	35,00
2	Čočka \check{C}_1	71,10	16,00	N-BAF10	50,80
3	Čočka \check{C}_1	-44,20	4,00	SF10	50,80
4	Čočka \check{C}_1	-363,10	123,57	-	50,80
5	-	-	10,00	-	0,57
6	Čočka \check{C}_2	41,70	5,00	N-SF6	25,00
7	Čočka \check{C}_2	13,84	15,33	N-BASF64	25,00
8	Čočka \check{C}_2	-18,85	40,00	-	25,00
9	Vzorek VZ	-	-	-	8,27



Obrázek 12: Koncentrace energie v závislosti na poloměru excitačního svazku v rovině vzorku VZ.

D, kamera byla vybrána z katalogu firmy Basler [50]. Jedná se o CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) kameru (107383) určenou pro fluorescenční mikroskopy s rozlišením 2448 x 2048 pixelů a velikostí pixelu 3,45 x 3,45 μm . Při takto zvolených parametrech, je optická soustava navržena tak, aby velikost předmětu $D_P = 7$ mm a velikost obrazu D_O byly v poměru 1:1. Tohoto poměru je dosaženo pomocí dvou shodných jednopalcových čoček \check{C}_{3-4} (AC254-050-A-ML) od firmy Thorlabs [48], které mají ohniskovou vzdálenost 50 mm. Schéma zobrazovací části vytvořené programem Zemax je na obr. 13 a optické parametry jsou uvedeny v tab. 9.



Obrázek 13: Návrh zobrazovací části. VZ - vzorek, \check{C}_{3-4} - spojné čočky, D - detektor. Optické parametry zobrazovací části jsou uvedeny v tab. 9.

Díky vadám optického zobrazení vychází reálná velikost obrazu $D_O = 5,92$ mm a také dochází ke zhoršení kvality obrazu. Jelikož reader je určený k detekci intenzity záření a není u něj kladen takový důraz na kvalitu obrazu, tyto vady nejsou směrodatné a je

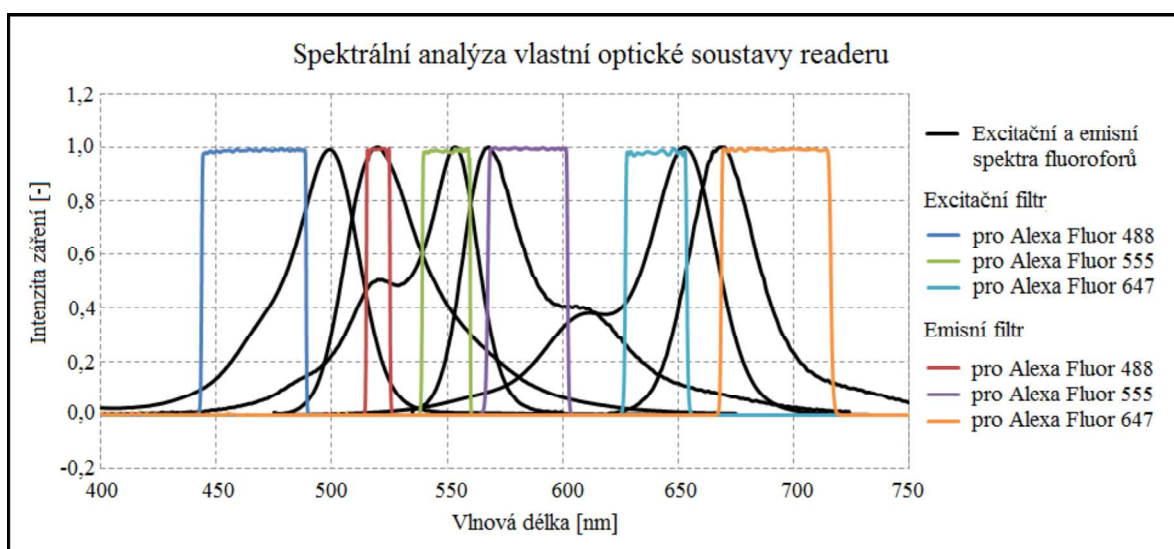
možné je zanedbat.

Tabulka 9: Optické parametry zobrazovací části.

Povrch	Komentář	Rádus [mm]	Tloušťka [mm]	Materiál	Volná apertura [mm]
1	Vzorek VZ	-	43,40	-	7,00
2	Čočka Č ₃	33,30	9,00	N-BAF10	25,40
3	Čočka Č ₃	-22,30	2,50	SF10	25,40
4	Čočka Č ₃	-291,10	50,00	-	25,40
5	Čočka Č ₄	291,10	2,50	SF10	25,40
6	Čočka Č ₄	22,30	9,00	N-BAF10	25,40
7	Čočka Č ₄	-33,30	43,40	-	25,40
8	Detektor D	-	-	-	5,92

6.3 Spektrální analýza propustnosti navržené optické soustavy readeru

Jak již bylo zmíněno, je nezbytné zoptimalizovat osvětlovač pro jednotlivé fluorofory. Jelikož ve vlastní optické soustavě readeru je zvolen širokospektrální zdroj světla, je důležité vhodně zvolit excitační filtry. Excitační a emisní filtry jsou zvoleny jednopalcové od firmy Semrock [51], která se specializuje na optické filtry. Excitační filtry byly zvoleny tak, aby docházelo k excitaci pouze vybraného fluoroforu. Pro fluorofor Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 555 bylo obtížné vybrat excitační filtry, protože docházelo k překrytí spektra excitačního filtru s excitačním spektrem více fluoroforů (viz obr. 14). Tento překryv jsem se snažila co nejvíce eliminovat. Tam kde nebylo možné zabránit překryvu, bylo nezbytné zvolit emisní filtr, který propustí pouze emisní záření vybraného fluoroforu.



Obrázek 14: Spektrální analýza navržené optické soustavy readeru, hodnoty normovány. Propustnosti vlnových délek jednotlivých filtrů jsou uvedeny v tab. 10.

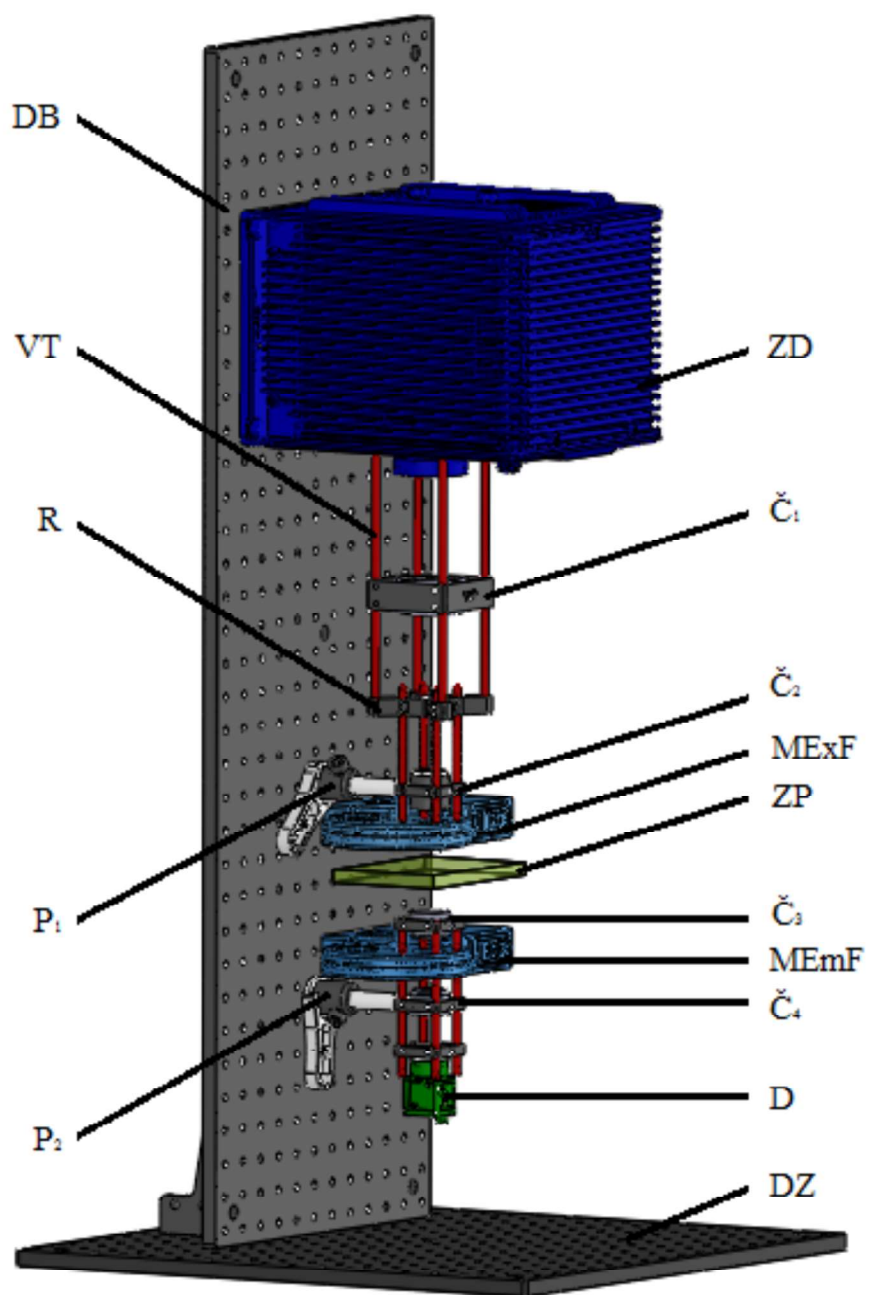
Tabulka 10: Propustnosti vlnových délek jednotlivých filtrů.

Zvolený filtr	Propustnost vlnových délek [nm]
Excitační filtr pro Alexa Fluor 488	446,0 – 486,0
Emisní filtr pro Alexa Fluor 488	517,5 – 522,5
Excitační filtr pro Alexa Fluor 555	541,5 – 556,5
Emisní filtr pro Alexa Fluor 555	570,5 – 599,5
Excitační filtr pro Alexa Fluor 647	630,0 – 650,0
Emisní filtr pro Alexa Fluor 647	672,0 – 712,0

6.4 Konstrukční návrh

Takto navržená optická soustava fluorescenčního readeru je vymodelována v programu SolidWorks (viz obr. 15). Soustava se skládá z optické soustavy a mechanických prvků. Modely jednotlivých dílů soustavy jsou volně dostupné ke stažení na webových stránkách daných firem. Většina mechanických prvků je zvolena od firmy Thorlabs [48], která nabízí klecové systémy se širokou škálou možností upínání jednotlivých komponentů soustavy. Komponenty optické soustavy jsou spojeny pomocí vodících tyčí VT, které zajišťují lineární vedení optické soustavy. Pomocí redukce R je zajištěn přechod z dvoupalcové na jednopalcovou optiku. Aby bylo možné měnit excitační a emisní filtry, jsou do soustavy vloženy dva šestipoziční měniče filtrů MExF a MEmF (FW102C) s revolverovou hlavou od firmy Thorlabs [48]. Po zohlednění tekutosti vzorku jsem zvolila vertikální osvětlení dopadající na horizontálně umístěný vzorek, který je na obrázku znázorněn jako zástavbový prostor pro mikrotitrační destičku ZP. Stolek vzorku VZ není zakreslen, protože lze použít stávající stolek firmy BioVendor Instruments. Optická soustava je připevněna pomocí podpěr P_{1-2} a šroubů k boční desce DB. Jelikož soustava bude zabudovaná ve skříni přístroje a nebude k ní volný přístup, je nezbytné najustovat zobrazení optickou soustavu tak, aby vznikl zaostřený obraz vzorku na detektoru a najustovat kolimovaný svazek osvětlení optické soustavy. Toho bude docíleno pomocí správného osového ustavení čoček readeru.

Toto je pouze optická soustava, která bude doplněna elektrickými zařízeními a dalšími komponenty. Celá soustava bude následně zabudovaná do skříňe přístroje. Seznam dílů optické soustavy je uveden v dodatku A.



Obrázek 15: Konstrukční návrh soustavy readeru. DB - boční deska, DZ - základní deska, ZD - zdroj světla, Č₁₋₄ - spojné čočky v objímkách, VT - vodící tyče, R - redukce 30 mm na 60 mm, P₁₋₂ - podpěry, ZP - zástavbový prostor pro mikrotitrační destičku, MExF - měnič excitačních filtrů, MEmF - měnič emisních filtrů, D - detektor (CMOS kamera).

Závěr

Předmětem této práce bylo otestovat stávající optickou soustavu třípásmového fluorescenčního readeru firmy BioVendor Instruments a navrhnout její optimalizaci pro vybrané fluorofory.

Při měření jednotlivých fluoroforů na komerčním readeru Synergy H1 byla ověřena jejich schopnost fluorescence při excitaci vhodně zvolenou vlnovou délkou. Pomocí stávající optické soustavy readeru byly pořízeny snímky jednotlivých fluoroforů. Ze snímků bylo patrné, že je nutné upravit spektrální propustnost readeru tak, aby při zvolení určitého osvětlovače byla zaznamenána fluorescence pouze vybraného fluoroforu. Při měření spektrální analýzy propustnosti soustavy readeru bylo zjištěno, že navržené kombinace LED diody a excitačního filtru pro jednotlivé fluorofory umožňovaly fluorescenci i nežádoucích fluoroforů, protože třípásmový emisní filtr propustil na detektor kamery emisní záření od všech fluoroforů, u kterých proběhla fluorescence. Na základě těchto měření byla vytvořena nová optická soustava readeru. Hlavními změnami nové soustavy readeru oproti stávající soustavě je využití širokospektrálního zdroje světla namísto LED diod a navržení jednopásmových emisních filtrů namísto třípásmového. Takto navržená soustava eliminuje záznam fluorescence nežádoucích fluoroforů, což byl hlavní problém stávající soustavy readeru. Pomocí programu Zemax byla vytvořena optická simulace osvětlovací a zobrazovací části, aby bylo docíleno kvality obrazu optické soustavy. Optická soustava readeru je složena z komponentů, které jsou vybrány z katalogů specializovaných firem. Navržená optická soustava byla doplněna mechanickými prvky a vymodelována v programu SolidWorks.

Navržená optická soustava je určena pro fluorofory Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 a Alexa Fluor 647. Díky širokospektrálnímu zdroji světla je ale možné měřit i jiné fluorofory, než pro které je soustava navržena, což u stávající optické soustavy nebylo možné. Stačí do soustavy vložit vhodné excitační a emisní filtry. Excitační a emisní filtry jsou umístěny na dvou šestimístných revolverových hlavicích, tudíž je možné vložit až šest excitačních a šest emisních filtrů, což umožňuje rozšíření využitelnosti readeru.

Dodatek A

Tabulka 11: Kusovník konstrukčního návrhu readeru.

Položka	Ks	Název	Výrobce - katalogové číslo
1	1	Zdroj světla ZD	Thorlabs - SLS401
2	1	Kamera D	Basler - 107383
3	2	Měnič filtrů	Thorlabs - FW102C
4	4	Držák optiky 30 mm	Thorlabs - CP02
5	1	Držák optiky 60 mm	Thorlabs - LCP01T
6	1	Redukce 30 mm na 60 mm	Thorlabs - LCP02
7	1	Čočka Č ₁	Thorlabs - AC508-100-A-ML
8	1	Čočka Č ₂	Thorlabs - 65-553
9	2	Čočka Č _{3,4}	Thorlabs - AC254-050-A-ML
10	4	Vodící tyče 1"VT	Thorlabs - ER1
11	4	Vodící tyče 3"VT	Thorlabs - ER3
12	4	Vodící tyče 4"VT	Thorlabs - ER4E
13	4	Vodící tyče 8"VT	Thorlabs - ER8
14	2	Podstavec	Thorlabs - PH30E/M
15	2	Optická tyč	Thorlabs - TR2
16	2	Upínací vidlice	Thorlabs - CF125C/M
17	1	Boční deska DB	Thorlabs - MB1236
18	1	Základní deska DZ	Thorlabs - MB18
19	1	Úhlový držák	Thorlabs - AP90RL
20	1	Adaptér s vnějšími závity	Thorlabs - SM1A39
21	1	Šroub M6 x 1,0	Thorlabs - SH6MS10
22	1	Excitační filtr pro Alexa Fluor 488	Semrock - FF01-466/40-25
23	1	Emisní filtr pro Alexa Fluor 488	Semrock - FF01-520/5-25
24	1	Excitační filtr pro Alexa Fluor 555	Semrock - FF01-549/15-25
25	1	Emisní filtr pro Alexa Fluor 555	Semrock - FF01-585/29-25
26	1	Excitační filtr pro Alexa Fluor 647	Semrock - FF01-640/20-25
27	1	Emisní filtr pro Alexa Fluor 647	Semrock - FF01-692/40-25

Literatura

- [1] ACUÑA, A. U., AMAT-GUERRI, F. Early history of solution fluorescence: the *Lignum nephriticum* of Nicolás Monardes in *Fluorescence of supermolecules, polymers, and nanosystems* Springer 2007 s. 3–20.
- [2] GESSMANN, F. E. S. T., KIM, J. K. *Light emitting diodes* Wiley Online Library 2005.
- [3] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy* Springer Science & Business Media 2013.
- [4] VALEUR, B., BERBERAN-SANTOS, M. N. *Molecular fluorescence: principles and applications* John Wiley & Sons 2012.
- [5] PECORA, R. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy* Springer Science & Business Media 2013.
- [6] NORRISH, K., CHAPPELL, B. W. X-ray fluorescence spectrometry *Physical methods in determinative mineralogy* 1977, s. 201–272.
- [7] FIŠAR, Z. Fluorescenční spektroskopie v neurověděch 2009 URL: <http://www1.lf1.cuni.cz/%7Ezfishar/fluorescence/Default.htm>[cit.2007-06-19].
- [8] JENSEN, W. B. Gilbert N. Lewis *Encyclopædia Britannica* 2010 URL: <https://www.britannica.com/biography/Gilbert-N-Lewis>.
- [9] PRASAD, P. N. *Introduction to biophotonics* John Wiley & Sons 2004.
- [10] GRABOWSKI, Z. R. Memorial address for Aleksander Jabłoński (1898–1980) *Journal of Luminescence* ročník 24 1981, s. xxv – ISSN 0022-2313 Doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2313\(81\)90206-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2313(81)90206-4) URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022231381902064>.
- [11] Alexa Fluor Products URL: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alexa-fluor/alexa-fluor-products.html> [online].
- [12] HIBBS, A. R. *Confocal microscopy for biologists* Springer Science & Business Media 2004.
- [13] XU, X.-H. N., BROWNLOW, W. J., KYRIACOU, S. V., a kol. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging *Biochemistry* ročník 43, č. 32 2004, s. 10400–10413.
- [14] FALLER, R. Molecular modeling of lipid probes and their influence on the membrane *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* ročník 1858, č. 10 2016, s. 2353–2361.

- [15] GARLAND, M., YIM, J. J., BOGYO, M. A Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application *Cell Chemical Biology* ročník 23, č. 1 2016, s. 122 – 136 ISSN 2451-9456 Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.12.003> URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451945615004699>.
- [16] WHITTAKER, V. P. Thirty years of synaptosome research *Journal of neurocytology* ročník 22, č. 9 1993, s. 735–742.
- [17] HAIDEKKER, M. A., LING, T., ANGLO, M., a kol. New fluorescent probes for the measurement of cell membrane viscosity *Chemistry & biology* ročník 8, č. 2 2001, s. 123–131.
- [18] LERMAN, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines *Journal of molecular biology* ročník 3, č. 1 1961, s. 18–30.
- [19] KAPUSCINSKI, J., DARZYNKIEWICZ, Z., MELAMED, M. R. Luminescence of the solid complexes of acridine orange with RNA *Cytometry Part A* ročník 2, č. 4 1982, s. 201–211.
- [20] LEPECQ, J. B., PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical—chemical characterization *Journal of molecular biology* ročník 27, č. 1 1967, s. 87–106.
- [21] KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining *The Journal of cell biology* ročník 66, č. 1 1975, s. 188–193.
- [22] BUSCHMANN, H. J., WOLFF, T. Fluorescence of 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate in solid macrocyclic environments *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* ročník 121, č. 2 1999, s. 99–103.
- [23] COHEN, L. B., SALZBERG, B. M. Optical measurement of membrane potential in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, ročník 83 Springer 1978 s. 35–88.
- [24] HA, T., ENDERLE, T., OGLETREE, D. F., a kol. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996.
- [25] ENGVALL, E. [28] Enzyme immunoassay ELISA and EMIT *Methods in enzymology* ročník 70 1980, s. 419–439.
- [26] NI, D., XU, P., GALLAGHER, S. Immunoblotting and immunodetection *Current protocols in molecular biology* 2016, s. 10–8.
- [27] KUO, M.-H., ALLIS, C. D. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein: DNA associations in a chromatin environment *Methods* ročník 19, č. 3 1999, s. 425–433.

- [28] LIVINGSTON, D. M. [91] Immunoaffinity chromatography of proteins *Methods in enzymology* ročník 34 1974, s. 723–731.
- [29] CAMPBELL, A. M. *Monoclonal antibody and immunosensor technology: the production and application of rodent and human monoclonal antibodies* ročník 23 Elsevier 1991.
- [30] ELISA 2008 Doi:ISSN18046517 URL: <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=ELISA&oldid=303566>.
- [31] Imunochemické metody 2008 Doi:ISSN18046517 URL: http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Imunochemick_metody&oldid=350283.
- [32] NAVRÁTILOVÁ, J. Optimalizace detekce enzymu myeloperoxidasy v lidské plasmě metodou ELISA [online] 2010 URL: [DostupnzWWW<http://is.muni.cz/th/269287/prif_b/](http://is.muni.cz/th/269287/prif_b/) bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, Lukáš Kubala.
- [33] VÖLCKER, M., LIEGEL, J., GULCH, M. Optical array system and reader for microtiter plates u.S. Patent No 6,686,582, 2004.
- [34] RUSHBROOKE, J. G. Microplate reader u.S. Patent No 7,170,597, 2007.
- [35] BIOTEK, INC. [Online], 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.biotek.com.
- [36] TECAN TRADING AG [Online], 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.tecan.com.
- [37] LONZA [Online], 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.lonza.com.
- [38] THERMO FISHER SCIENTIFIC, INC. [Online], 2016 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.thermofisher.com.
- [39] BMG LABTECH [Online], 2016 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.bmglabtech.com.
- [40] Fluorescence plate readers 2016 URL: <http://www.bmglabtech.com/en/products/fluorescence-plate-readers/> [online].
- [41] FUKA, J., HAVELKA, B. *Optika a atomová fyzika: fyzikální kompendium pro vysoké školy* Státní pedagogické nakladatelství 1961.
- [42] YOKOGAWA, S., BURGOS, S. P., ATWATER, H. A. Plasmonic color filters for CMOS image sensor applications *Nano Letters* ročník 12, č. 8 2012, s. 4349–4354.
- [43] SIESLER, H. W., OZAKI, Y., KAWATA, S., a kol. *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications* John Wiley & Sons 2008.
- [44] RAJPOOT, M. K. Dispersion analysis of Robert–Asselin type filters for linear non-dispersive and dispersive systems *Computers & Fluids* ročník 130 2016, s. 49–83.

- [45] MONTALBETTI, J. F., KANASEWICH, E. R. Enhancement of teleseismic body phases with a polarization filter *Geophysical Journal International* ročník 21, č. 2 1970, s. 119–129.
- [46] KYUSHIMA, H., HASEGAWA, Y., ATSUMI, A., a kol. Photomultiplier tube of new dynode configuration *IEEE transactions on nuclear science* ročník 41, č. 4 1994, s. 725–729.
- [47] VANCELLS, J. C. Validated Alexa Fluor® secondaries for guaranteed performance *Abcam plc.* 1998-2017 URL: <http://www.abcam.com/secondary-antibodies/validated-alexa-fluor-secondaries-for-guaranteed-performance>.
- [48] THORLABS, INC. [Online], 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.thorlabs.com.
- [49] EDMUND OPTICS, INC. [Online], 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.edmundoptics.com.
- [50] BASLER, INC. [Online], 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.baslerweb.com.
- [51] SEMROCK, INC. [Online], 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: www.semrock.com.