



Tvorba biosenzorů pomocí metody laser induced forward transfer

Bakalářská práce

Studijní program: B3944 – Biomedicínská technika
Studijní obor: 3901R032 – Biomedicínská technika
Autor práce: **Jan Ševčík**
Vedoucí práce: Ing. Jiří Jelínek, Ph.D.





Creation of biosensors using method laser induced forward transfer

Bachelor thesis

Study programme: B3944 – Biomedical Technology
Study branch: 3901R032 – Biomedical Technology

Author: **Jan Ševčík**
Supervisor: Ing. Jiří Jelínek, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan Ševčík**
Osobní číslo: **D15000015**
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**
Studijní obor: **Biomedicínská technika**
Název tématu: **Tvorba biosenzorů pomocí metody laser induced forward transfer**
Zadávací katedra: **Fakulta zdravotnických studií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíle práce:

Shromáždit základní poznatky o metodě LIFT a biosenzorech.

Vypracovat rešerši shrnující základní informace o biosenzorech a metodě LIFT, která bude porovnána s podobnými metodami.

Zpracování a vyhodnocování dat z realizovaných měření.

Teoretická východiska (včetně výstupu z BP):

Nalezení vhodného laserového nastavení pro přenos vrstvy zlata z jednoho materiálu na jiný.

Vytvoření biosenzoru, pomocí metody LIFT.

Výzkumné otázky:

Práce má za předpoklady porovnat metodu LIFT z dalšími podobnými metodami a nalézt optimální nastavení laseru pro přenos zlaté vrstvy z jedné vrstvy na jinou. Nově vytvořená vrstva bude sloužit k vytvoření biosenzoru.

Metoda:

Laboratorní měření

Technika práce, vyhodnocení dat:

Vypracování teoretické rešerše shrnující dosavadní poznatky týkající se biosenzorů a metody LIFT.

Místo a čas realizace výzkumu:

Laboratoře HiLASE Centrum Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Za Radnicí 828, 252 41 Dolní Břežany.


Vzorek:

Předmětem výzkumu je vytvoření biosenzoru s menší detekční plochou, než která se nyní používá.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy: 50 - 70
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury: viz příloha

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jiří Jelínek, Ph.D.**
Ústav mechatroniky a technické informatiky
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Jan Vanda, Ph.D.**
Fyzikální ústav Akademie věd ČR
Ostatní konzultanti: **prof. Ing. Aleš Richter, CSc.**
Ústav mechatroniky a technické informatiky
Datum zadání bakalářské práce: **1. srpna 2016**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2017**




Mgr. Marie Froňková
pověřena vedením fakulty

V Liberci dne 30. listopadu 2016

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

- SINGH, S. C. a kol. *Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. ISBN 978-3-527-32715-7.
- DUAOCASTELLA, M. a kol. Laser-induced Forward Transfer of Liquids for Miniaturized Biosensors Preparation. *Journal of Laser Micro/Nanoengineering*. 2008, 3(1), 1-4. Dostupné také z: <http://www.jlps.gr.jp/jlmn/upload/8ff90736c3226b4de15c8eb3c24acc41.pdf>
- TSENG, M. L., a kol. Fast Fabrication of a Ag Nanostructure Substrate Using the Femtosecond Laser for Broad-Band and Tunable Plasmonic Enhancement. *ACS Nano*. 2012, 6(6), 5190-5197. ISSN 1936-0851. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn300947n>
- COLINA, M. a kol. DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005, 20(8), 1638-1642. ISSN 0956-5663. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566304003720>
- FEINAEUGLE, M. a kol. Time-resolved shadowgraph imaging of femtosecond laser-induced forward transfer of solid materials. *Applied Surface Science*. 2012, 258(22), 8475-8483. ISSN 0169-4332. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433212007556>
- ČEJKA, Marek. *Optimalizace tvorby tenkých vrstev kovových materiálů*. Brno, 2014. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav elektrotechnologie. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=85267
- SHAW-STEWARD, J. a kol. Laser-Induced Forward Transfer of Polymer Light-Emitting Diode Pixels with Increased Charge Injection. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2011, 3(2), 309-316. ISSN 1936-0851. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261274>
- VANDA, Jan a kol. Comparative LIDT measurements of optical components for high-energy HiLASE lasers. *High Power Laser Science and Engineering*. 2016, 4, e11. ISSN 2052-3289. Dostupné také z: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/13E9CB94CE7B327E54FB9A0757D46E05/S2095471916000116a.pdf>
- lidt-measurements-of-optical-components-for-high-energy-hilase-lasers.pdf
- PALLA-PAPAVLU, Alexandra a kol. Laser induced forward transfer for materials patterning. *Romanian Reports in Physics*. 2011, 63(Supplement), 1285-1301. ISSN 1841-8759. Dostupné také z: http://rrp.infim.ro/2011_63_supliment/art13Palla.pdf
- DENTON, M. a kol. Spatially correlated microthermography maps threshold temperature in laser-induced damage. *Journal of Biomedical Optics*. 2011, 16(3), 036003-1. ISSN 1560-2281. Dostupné také z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1166739>
- TSENG, M. L. a kol. Fabrication of phase-change chalcogenide Ge₂Sb₂Te₅ patterns by laser-induced forward transfer. *Optics Express*. 2011, 19(18), 16975-16984. ISSN 1094-4087. Dostupné také z: https://www.osapublishing.org/oe/fulltext.cfm_uri=oe-19-18-16975&id=221884
- CHATZIPETROU, M. a kol. Biosensors by means of the laser induced forward transfer technique. *Applied Surface Science*. 2013, 278(14), 250-254. ISSN 0169-4332. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433212020223>

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 4.5.2017

Podpis:



Anotace:

Bakalářská práce je zaměřena na přípravu biosenzorů pomocí laserové metody laser induced forward transfer (zkráceně LIFT). V této práci je stručný úvod hlavně do oblasti LASERů, tenkých vrstev a samotné metody přenosu. Dále je v práci ukázána možnost využití metody LIFT pomocí v minulosti provedených testů a pro porovnání metoda Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation. Poznatky jsou dále použity v praxi pro přenos zlata, jakožto dobrého vodiče, na podložní sklíčko, které funguje jako izolant.

Klíčová slova : LIFT, laser, biosenzor, tenké vrstvy

Annotation

Bachelor thesis is focused on the preparation of biosensors by means of laser methods, laser induction of forward transmission (abbreviated LIFT). In this paper is a brief introduction mainly to LASER, thin layers and transfer methods themselves. Furthermore, the use of LIFT methods using past tests and Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation methods is demonstrated. The findings are furthermore used in practice for transferring gold as a good conductor to a slide which acts as an insulator.

Keywords: LIFT, laser, biosensor, thin film

Děkuji Ing. Jiřímu Jelínkovi, Ph.D. za vedení této bakalářské/diplomové práce, za cenné rady, podněty a připomínky. Současně mé poděkování patří pracovníkům výzkumného centra HiLASE, jmenovitě především Ing. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za pomoc a dozor při měření porovnávacích hodnot, a za důležité rady a informace aplikované v této práci a velmi přínosné pro další studium.

Obsah

Seznam zkratek.....	12
Úvod.....	13
1 Lasery	14
1.1 Princip laserů	14
1.2 Vlastnosti laserového svazku	15
1.3 Základní dělení laserů.....	15
2 Tenké vrstvy.....	17
3 Metoda Laser Induced Forward Transfer	19
3.1 Historie metody Laser Induced Forward Transfer	19
3.2 Princip metody Laser Induced Forward Transfer	19
3.3 Experimenty	21
3.3.1 Šablonovací proces	21
3.3.2 Použité materiály	22
3.3.2.1 Biomolekuly.....	22
3.3.2.2 Roztok DNA	22
3.3.3 Výsledky experimentů.....	23
3.3.3.1 Biomolekuly a liposomy.....	23
3.3.3.2 DNA vzory	25
4 Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation	26
5 Experimentální část.....	27
5.1 Cíle.....	27
5.2 Metodika výzkumu	27
5.3 Příprava vzorků.....	27
5.4 Použité lasery	29
5.4.1 Použitý laser pro samotný přenos	29

5.4.2	Použitý laser pro vytvoření masky na ořez svazku	31
5.5	Ovlivnitelné parametry	34
5.6	Výsledky měření	36
5.6.1	Zlatá vrstva	36
5.6.2	Laboratorní sklíčka	37
5.6.3	Křemíková destička	39
	Diskuze	42
	Závěr	44
	Seznam použité literatury.....	445
	Seznam obrázků	448
	Seznam příloh.....	449

Seznam zkratek

Apod.	A podobně
Atd.	A tak dále
CW	Continual wave
CD	Compact disc
ČVUT	České Vysoké Učení Technické
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
HiLASE	High average power pulsed LASERs
LASER	Light amplification by stimulated emission radiation
LIFT	Laser induced forward transfer
LW	Laser writening
MAPLE	Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation
Mj.	Mimo jiné
MTR	Material laser recordings
Obr.	Obrázek
SDS	Dodecylsulfát sodný
SW	Software
TP	Triazen polymer
UV	Ultraviolet

Úvod

Předmětem této bakalářské práce, je zvoleno téma, které je zaměřeno na přípravu biosenzorů pomocí laserové metody laser induced forward transfer zkráceně LIFT (pod zkratkou využívána i ve zbytku bakalářské práce). Nejprve bude seznámení a stručný úvod do oblasti LASERŮ a tenkých vrstev. Následně budou již další oblasti věnovány samotné metodě LIFT.

Téma, resp. metoda LIFT, byla vybrána jako jedna z možností pro tvorbu biosenzorů, jenž se již dnes uplatňují hlavně v klinické diagnostice např. při stanovení nejrůznějších složek nacházejících se v krvi (např. urea, cukr apod), či k detekci metabolických procesů. Je to velmi zásadní posun v medicíně a lékařství, právě pro důkladné, precizní a správné stanovení diagnózy, což je velice důležité pro nasazení rychlé a účinné léčby. Pomocí laserové techniky je možno vytvořit užší detekční plochy, což nám následně může pomoci pro vytvoření biosenzoru_s možností změřit více složek najednou za stávající šířky biosenzoru. Vzhledem ke svým fyzikálním vlastnostem byly jako vhodné materiály vybrány zlato a mikrospokické podložní sklo. Hlavní parametrem pro výběr zlata byla jeho velká elektrická vodivost $4,5 \cdot 10^7$ S/m [1], a s tím související i jeho nízká rezistivita, která je $0,0235 \mu\Omega \cdot m$ [2]. Podložní sklo bylo zvoleno jako příjemce přenášené zlaté vrstvy, jelikož je ideálním izolantem, z čehož vyplývá, že elektrický proud nevede a minimalizuje tudíž ovlivnění výsledku měření na jiném senzoru na témže skle. Později byla ještě pro výzkumný účel použita křemíková destička. Ta však není izolant a její elektrická vodivost je v hodnotách $4 \cdot 10^2$ S/m [3] a rezistivitu $3 \cdot 10^3 \Omega \cdot m$ [3]. Zásadní roli, zde ovšem sehrává skutečnost, která není příznivá, protože při jejím použití by mohlo dojít k ovlivňování výsledků, což by mohlo zkreslit konečné hodnoty a závěr celého výzkumu.

1 Lasery

Slovo LASER je zkratka z anglického Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation a znamená „zesilování světla stimulovanou emisí záření“. Laser tak obecně označuje optický zesilovač, jenž generuje elektromagnetické záření pomocí procesu stimulované emise fotonů.

Základem laseru je aktivní prostředí. Toto prostředí je nějakým způsobem buzeno (opticky, elektricky apod.). Nabuzením tohoto prostředí dodáváme do laseru energii. Tato energie je potom pomocí procesu stimulované emise vyzářena v podobě laserového svazku. K tomu je zapotřebí ještě pomocí odrazných zrcadel (jedno 100%, druhé polopropustné) vytvořit tzv. optický rezonátor. [4]

1.1 Princip laseru

Obecně můžeme říci, že aktivní prostředí vždy obsahuje element, který se může nacházet v základním stavu s nižší energií nebo v excitovaném (vybuzeném) stavu s vyšší energií. Tímto elementem je nejčastěji atom, ale není tomu tak vždy (může to být např. vibrační stav molekuly, chemická vazba apod.). Pro tuto chvíli je důležité, že při přechodu z vyššího do nižšího energetického stavu tento element vyzáří foton (kvantum elektromagnetického záření). Tento zářivý přechod se děje spontánně sám od sebe a prostředí má vždy snahu být ve stavu s co nejnižší energií – ve stavu termodynamické rovnováhy. Právě díky buzení tento stav porušíme a převedeme aktivní prostředí do excitovaného stavu, kdy je většina našich elementů ve stavu s vyšší energií (tento stav se nazývá inverze populace).

Teprve v tuto chvíli můžeme energii dodanou aktivnímu prostředí přeměnit na laserový svazek (proud fotonů) pomocí procesu stimulované emise, který je zobrazen na obrázku níže. Jedná se v podstatě o lavinovitý efekt, kdy nám foton dopadající na excitovaný atom způsobí (stimuluje) jeho přechod z horní na dolní energetickou hladinu a při tom dojde k emisi dalšího fotonu. [4]

1.2 Vlastnosti laserového svazku

Důležité je, že při procesu stimulované emise má dopadající a emitovaný foton stejnou energii (frekvenci), stejný směr, polarizaci a fázi. Z toho plynou základní tři vlastnosti laseru, které ho odlišují od jiných zdrojů záření. Svazek laseru je:

Kolimovaný (tj. nerozbíhá se)

Monochromatický („jednobarevný“, tj. generované fotony mají stejnou frekvenci resp. vlnovou délku)

Koherentní (generované fotony jsou tzv. ve fázi jak časové tak prostorové) [4]

1.3 Základní dělení laserů

Nejčastěji se setkáte s dělením laserů podle typu aktivního prostředí:

Plynové lasery

Aktivním prostředím je zde plyn, který lze budít různými způsoby – elektricky, radiofrekvenčními vlnami, opticky atd. Typickým představitelem je např. HeNe (helium neonový) a CO₂ laser, který je v průmyslu velmi dobře známý v řezacích aplikacích. [4]

Pevnolátkové lasery

Aktivní prostředí je pevná látka, nejčastěji monokrystal. Buzení je nejčastěji optické a to buď výbojkami, nebo laserovými diodami. Typickým představitelem je Nd:YAG (prostředí je monokrystal yttrium aluminium granátu dopovaného atomy neodymu). Nd:YAG se v průmyslu používá hlavně pro laserové řezání, značení a svařování. [5]

Vláknové lasery

Speciální typ pevnolátkových laserů, kde aktivní prostředí tvoří optické vlákno dopované nejčastěji atomy erbia (Er) nebo yterbia (Yr). Buzení je pomocí laserových diod, jejich záření je do aktivního vlákna přivedeno opět optickým vláknem. Jedná se o tzv. vlákno-vlákno architekturu a laser díky tomu neobsahuje žádné opto-mechanické prvky jako zrcadla apod. Výkony dnes dosahují až 100kW. V dnešní době se jedná o nejmodernější technologii

pro průmyslové řezání, svařování a značení a podíl vláknových laseru na trhu neustále stoupá.
[5]

Polovodičové (Diodové) lasery

Aktivním prostředím je elektricky čerpaná polovodičová laserová dioda. Diodové laser se pohybují od výkonu miliwattů až do kilowattů. Tyto lasery mají vysokou účinnost, ale trpí nízkou kvalitou výstupního svazku. Mohou být miniaturních rozměrů (nízké výkony) a používají se v CD/DVD přehrávačích, laserových tiskárnách apod. Diodové lasery s vysokým výkonem se v průmyslu používají zejména na svařování (kovů i plastů) a kalení.
[5]

Excimerové lasery

Speciální třída plynových laserů buzených elektrickým výbojem. Aktivní elementem, který generuje záření je tzv. excimer (speciální molekula, kde je jedna z jejích složek v excitované stavu). Tyto lasery pracují v ultrafialové oblasti (UV) oblasti a jejich hlavní použití je ve fotolitografii v polovodičovém průmyslu a jiných aplikacích, kde je zapotřebí vlnové délky z UV oblasti a vysokých energií v pulsu. [5]

Další možná dělení laserů

Dalším možné dělení laserů je podle typu výstupního svazku. Zde je základní dělení na kontinuální (CW) a pulsní lasery. CW laser generuje souvislý výstupní výkon (zejména řezání, kalení,...), pulsní laser naopak generuje laserové pulsy. Pulsní lasery se dále dělí podle typu jakým je puls generován. V průmyslu je nejčastěji používáno tzv. Q-spínání, kdy laser generuje pulsy s délkou v řádu ns (zejména pro značení, gravírování) nebo pomocí pulsního buzení (např. výbojkami) s pulsy v řádech ms (pro laserové svařování).

Speciální třídou jsou pak tzv. ultra-rychlé (ultrafast) lasery, které generují pulsy v řádech ps a fs (až 10-15s!), které nejsou v průmyslu zatím příliš rozšířeny kvůli jejich ceně, nicméně jsou do budoucna ideální pro mikro-obráběcí aplikace.

2 Tenké vrstvy

Tenká vrstva je materiál o tloušťce od několika nanometrů až po několik mikrometrů, který je vytvořený na základním materiálu (podložce-substrátu). Tenké vrstvy mohou mít buď amorfni, polykrystalickou nebo monokrystalickou strukturu.

Deponované tenké vrstvy je třeba chápat jako systém, neboť vrstva pro svoji tloušťku dosahuje, společně se substrátem, specifických vlastností a chování. Samotné tenké vrstvy mají na rozdíl od objemových materiálů rozdílné vlastnosti, a to nejen z důvodu svojí tloušťky, ale i následkem depozičních procesů, které lze označit jako nerovnovážné a iniciující vznik metastabilních fází.

Pro zajištění požadovaných vlastností je nutné věnovat pozornost všem složkám tvořícím systém, což jsou v zásadě vždy tři části – tenká vrstva, mezivrstva (rozhraní) a substrát.

Adheze je schopnost dvou různých materiálů spolu přilnout a je i velmi důležitou vlastností systému tenká substrát – vrstva. Bez kvalitního adhezního spojení dochází k degradaci systému. Jedním z dějů, které podstatně ovlivňují adhezi, jsou předdepoziční přípravy substrátu.

Před depoziční přípravy substrátu jsou všechny procesy, které předcházejí vlastní deposici tenké vrstvy (např. na nástroj ve strojírenství), jakkoliv ovlivňují čistotu, morfologii a chemické složení povrchu substrátu. Což jsou především – úprava řezných hran, chemické čištění substrátu, iontové čištění substrátu a odpovlakování.[6]

Aplikace tenkých vrstev: [7]

- Elektronika Záznamová digitální média, fotočlánky, monitory, tranzistory, detekční vrstvy chemických senzorů
- Elektrotechnika vodiče, kontakty
- Strojírenství zvyšují otěruvzdornost nebo tvrdost, ochrana proti korozi
- Optika ochrana proti UV záření nebo poškrábání, antireflexní vrstvy
- Dekorační technika

Přehled zjišťovaných vlastností tenkých vrstev, se kterými se setkáváme ve fyzice tenkých vrstev:

- | | |
|---|-----------------------------------|
| Elektrické vlastnosti: | - elasticita |
| - vodivost | Morfologické vlastnosti: |
| - odolnost | - krystalická nebo amorfní podoba |
| - dielektrická konstanta | - rovinnost |
| - dielektrická síla | - mikrostruktura |
| - polarizace | - povrchová topografie |
| - permitivita | Optické vlastnosti: |
| | - index lomu |
| | - absorpce |
| | - spektrální charakteristiky |
| Teplotní vlastnosti: | |
| - koeficient teplotní roztažnosti | Chemické vlastnosti: |
| - tepelná vodivost | - složení |
| | - nečistoty |
| Mechanické vlastnosti: | - odolnost proti korozi a erozi |
| - vnitřní, zbytkový a kompozitní napětí | |
| - tvrdost | |

Tenké vrstvy lze je použít k povrchové úpravě skla či průhledných fólií jako odporové vrstvy sloužící k vyhřívání Jouleovým teplem, ke svádění nežádoucích elektrostatických nábojů z nevodivých povrchů, či jako transparentní elektrody, k plochým zobrazovacím prvkům a k solárním článkům. [8]

3 Metoda Laser Induced Forward Transfer

3.1 Historie metody Laser Induced Forward Transfer

Laserový indukovaný přenos vpřed (zkr. LIFT z angl. Laser Induced Forward Transfer), jako jedna z metod, byl rozsáhle studován kvůli své schopnosti nanášet nanostruktury různých materiálů na různé substráty přijímače. [9] Původně se LIFT přímé psaní různé barvy na skleněný podklad pro grafický průmysl. Tehdy to bylo nazýváno laserové psaní (zkr. LW, z ang. Laser writing) nebo také materiálové laserové nanášení (zkr. MTR z ang. material laser recording). V roce 1986 provedl J.Bohandy pokus s uložení měděné kovové vrstvy na podložku z křemenného skla stejným způsobem pod vakuem, a nazval jej laser induced forward transfer. O dva roky později, stejná skupina prokázala stejný proces, avšak za atmosférických podmínek. [10]

Přenos vrstev pomocí LIFT byl zkoumán na excimerových laserech s vlnovou délkou např. 193 nm (typ laseru ArF), 222 nm (typ laseru KrCl), 248 nm (typ laseru KrF), 308 nm (typ laseru XeCl), 351 nm (typ laseru XeF). [13]

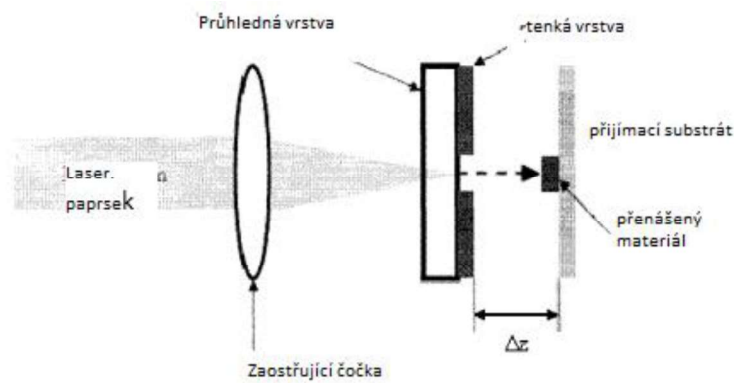
3.2 Princip metody Laser Induced Forward Transfer

Při metodě LIFT dochází k odstranění drobného množství materiálu, který je uložen na tenkém filmu, působením laserového impulsu a usazen na receptorový substrát umístěný rovnoběžně s filmem (viz obrázek 1 a obrázek 2). [11] Dopadající laserový paprsek se šíří průhledným nosičem předtím, než jsou fotony absorbovány zadní plochou filmu. Nad určitou prahovou hodnotou přicházející energie laseru se materiál vytlačuje z cílového zdroje a katapultuje směrem k přijímací ploše, která je umístěna buď v těsné blízkosti nebo dokonce ve styku s donorovým filmem. [12] Tato technika se ukázala jako vhodná pro tisk vzorů z různých materiálů např. zlato, hliník, titan, wolfram, nikl, germanium / selen, chrom, platina, oxidy (např. oxid hlinitý, oxid indinový, oxid vanadičtý, oxid zinečnatý), a vysokoteplotní supravodiče.

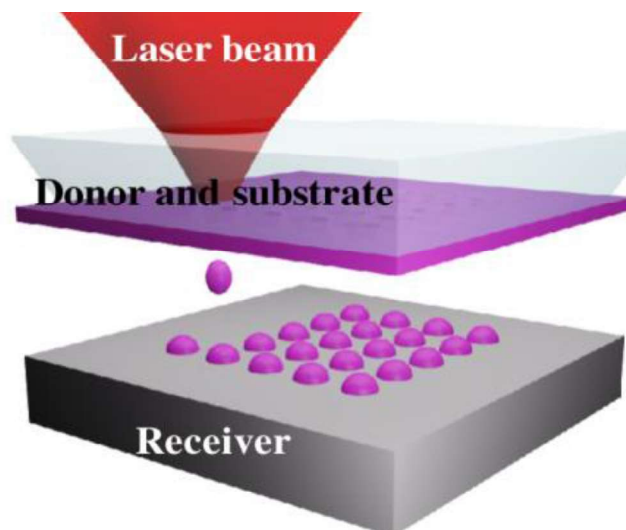
LIFT se dobře hodí i pro tisk "měkkých" materiálů (některé v kapalném stavu), např. proteiny, DNA, buňky, i tkáně. Konvenční LIFT se dobře hodí pro přenos kovu, ale v případě měkkých, nebo citlivých materiálů, jako jsou výše zmíněné DNA, buňky apod.

energetické laserové impulsy, může dojít k poškození těchto materiálů, a následně vést ke ztrátě funkčnosti, např. v případě proteinů, nebo poškození strukturální integrity jako v případě buněk nebo jiných biomolekul. [14]

Ve většině studií byly přenášeny materiály titan, zlato, platina, chrom. Tyto kovové vrstvy mají významné výhody, např. jsou biokompatibilní a snadno se uloží jako tenké filmy. Nevýhodou však je, že v převedeném materiálu se mohou nacházet určité nečistoty, kvůli neúplnému odpaření. Jako alternativu ke kovovým vrstvám, jsou UV citlivé fotopolymery, jako jsou například triazen polymery (TP). Tyto vrstvy jsou vhodné kvůli tomu, že při ozáření laserem dojde k účinnému odpaření již při absorbování velmi nízké laserové energie, a rozloží zcela do těkavého, či plynného fragmentu. [14]



Obrázek 1: Ilustrace principu metody LIFT [16]



Obrázek 2: Ilustrace výsledku ve 3D [15]

Velmi zjednodušeně se dá říci, že přenos probíhá ve třech krocích:

Odstranění tenké vrstvy ze substrátu dárce

Přenos tenkého filmu pod atmosférickým tlakem

Ukládání filmu na akceptor [16]

3.3 Experimenty

3.3.1 Šablonovací proces

Přenosu bylo dosaženo použitím jednotlivých pulzů z XeCl excimerového laseru (vlnová délka 308 nm, délka pulzu 30 ns, opakovací frekvence 1 Hz), ArF excimerový laser (délka pulzu 25 ns, opakovací frekvence 1 Hz) a Nd: YAG laser (vlnová délka 266 nm, 6 ns trvání impulsu a 2 Hz opakovací frekvence). Impulsní lasery (XeCl 308nm, ArF 193 nm, Nd: YAG 266 nm) byly řízeny klapkou. Intenzita paprsku byla ovládána motorovými dlouhými deskami.

Vzorek byl umístěn kolmo k laserovému paprsku. Paprsek tak ovlivňoval přenášený materiál přes substrát, jímž bylo křemenné sklo. Pulzní energie byla měřena pyroelektrickým elektroměrem. Držák vzorku byl namontován na motorizovaném x, y, z držáku. Celý systém byl řízen z počítače pomocí programu LabVIEW, který umožňoval vytvořit matici bodů pro každý vzorek, nastavení energie a počtu impulsu. Nastavení pro experimenty prováděné s Nd: YAG laserem byla stejná, kromě toho, že byly provozovány ručně. LIFT byl realizován umístěním substrátu přijímače před dárce. Převod různých materiálů byl proveden na pečlivě očištěné sklíčko. Proces přenosu různých materiálů byl zkoumán buď v kontaktu, nebo s mezerou oddělující dárce a desky přijímače. V tomto případě, byly podložky s definovanou tloušťkou umístěny na okraje mezi těmito dvěma substráty a sešroubovány do držáku vzorku. Rozpěrky byly buď skleněné krycí sklíčka (40 um), Si (400 um), nebo broušené sklo (1 mm nebo 2 mm). [17]

3.3.2 Použité materiály

3.3.2.1 Biomolekuly

Předběžné experimenty metody LIFT s kapalným stavem biomolekul se provádí na volných biomolekulách v roztoku, která se skládala ze směsi destilované vody a glycerol v koncentraci 10 až 70% (v / v), povrchově aktivní látky plus SDS rozpuštěný v koncentraci 2 mg/ml. [17] Tento roztok byl použit v objemovém množství 50%, aby se zabránilo odpařování během přípravy a manipulace s tenkou vrstvou kapaliny s obsahem biomolekul. Bylo rovněž nezbytné přidat povrchově aktivní činidlo (již výše zmíněné dodecylsulfát sodný-SDS), vedlejším efektem byla i lepší smáčitelnost roztoku na kovovém filmu. [18]

3.3.2.2 Roztok DNA

DNA použita pro nanášení byla extrahována z myších buněk (buněčné linie 3T3). Aby se odstranily buňky z tkáňové kultury, byl k extrakci DNA byl použit trypsin. Buňky byly poté centrifugovány po dobu 10 minut při teplotě 100 ° C (1200 otáček za minutu). Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v PBS. Pelet byl znovu resuspendován v 10 ml DNA pufru a buňky se opět centrifugovaly po dobu 10 minut při 1200 otáčkách za minutu. [17]

Roztok byl inkubován přes noc při teplotě 45 ° C, předtím byl roztok centrifugován po dobu 15 minut při 3 000 otáčkách za minutu. Potom se k DNA přidá NaCl (400 ul) a provede se centrifugování při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a k vysrážené DNA byl přidán etanol. Nakonec byla DNA izolována do sterilní skleněné pipety. [11]

3.3.3 Výsledky experimentů

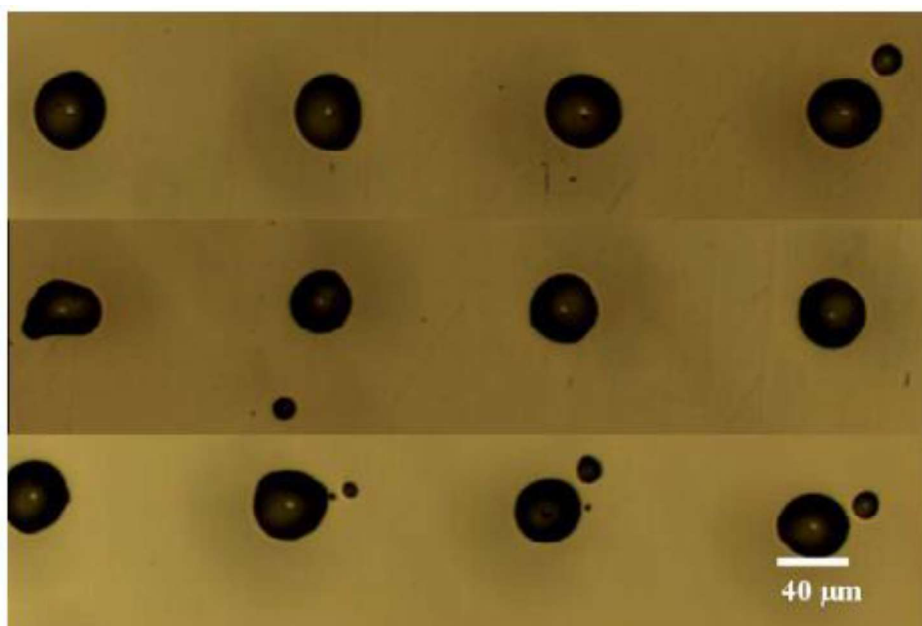
3.3.3.1 Biomolekuly a liposomy

Vliv laserového toku byl zkoumán jak pro typy laseru ArF, a XeCl laserové systémy s biomolekulami, stejně jako s roztoky obsahující liposomy. Pro tyto experimenty, se vzdálenost mezi cílem a přijímačem udržuje konstantní na 400 μm , a tloušťka vrstvy kapaliny byla 10 μm .

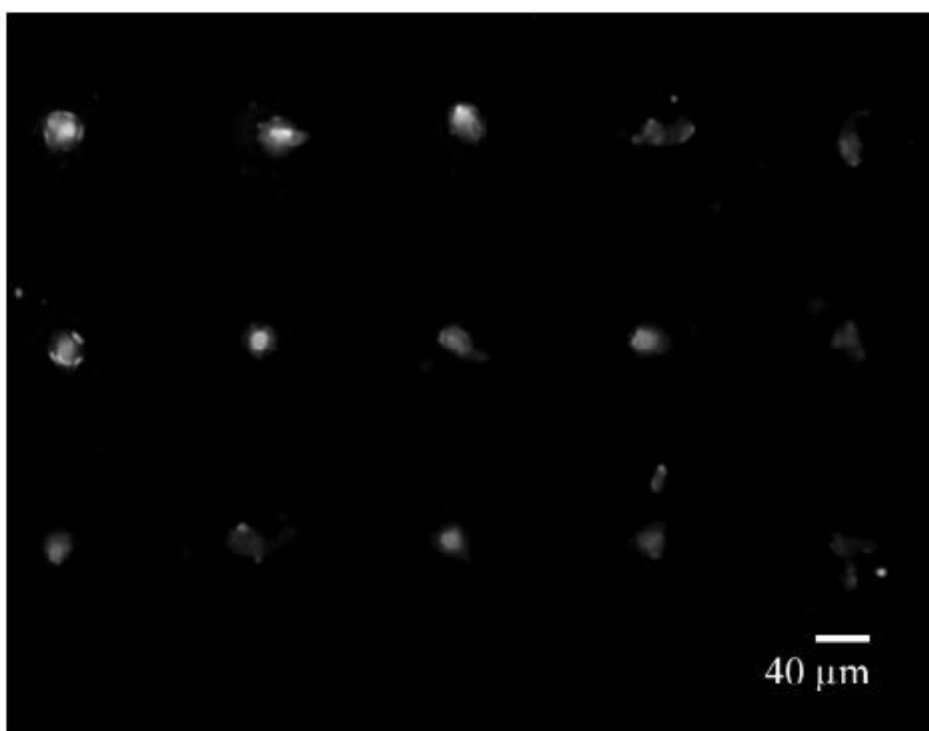
V případě ozáření při 193 nm a tloušťce TP 60 nm nebyly získány pravidelné převedené vzory, vznikaly jen takové nepravidelné kapky. V tomto případě TP vrstva byla pravděpodobně příliš tenká a nechránila snadno poškoditelnou biomolekulu. Pro ozařování laserem ArF a s TP vrstvami silnější než 150 nm, jsou získány pravidelné kapičky.

Další experiment s typem laseru XeCl, jehož laserový svazek pracující při 308 nm, vlnové délky dokazuje, že lze získat kruhové kapky s dobře definovaným obrysem již při vrstvě silné TP 60 nm. V optické mikroskopii je obraz uložen na lipozomovém mikročipu (obrázek 3). Kromě toho, pomocí mikroskopové fluorescence lze určit, zda byla při laserovém přenosu poškozena integrita liposomu (obrázek 4). Všechny přenášené kapky jsou pravidelně uspořádán, některé mají náhodně rozmístěné malé kapičky kolem sebe. Převedené kapičky jsou dobře definovány a kompaktní bez viditelných změn morfologie nebo nečistoty z TP.

Dalším aspektem, který stojí za zmínku, je průměr kapiček, který se zvyšuje s vyšující se energií laserového impulsu. [17]



Obrázek 3: Optická mikroskopie mikročipu (liposom: glycerol, 50:50) [17]



Obrázek 4: fluorescenční mikroskopie obrazu mikročipu získaného z 10 um silné vrstvy kapaliny [17]

3.3.3.2 DNA vzory

Přenos DNA roztoků (při 266 nm), s titanovou vrstvou tloušťky 60 nm byl analyzován na tloušťce kapalně vrstvy 10 μm a konstantní vzdálenosti mezi cílem a přijímačem 400 μm . Kromě toho byla zkoumána i kvantifikace zachování biologické aktivity roztoku DNA po přenosu. V případě ozáření při 266 nm, byly převedeny pravidelné vzory DNA

Mechanismus, který se podílí na přenosu roztoku DNA s ohledem na interakci laser->materiál lze popsat následujícím způsobem: dopadající energie laseru interaguje s absorpční vrstvou na titanu. Při nízkých intenzitách energie, jsou procesy týkající se jednoduchých excitací projevovány nízkými tepelnými účinky, a dochází pouze k menší odchylce od cíle místa přenosu, tím dochází na absorpční vrstvě k přeměně energie v materiálu. V tomto případě, tím jak se zvyšuje hustota energie, zvyšuje se i absorpční hloubka, to má za následek větší objem interakce a zvýšení tepelného účinku na absorpčním materiálu. I při nízkých hustotách energie, může dojít k vyvolání tepelných účinků, to však závisí na citlivosti absorpčního materiálu. Tím se vysvětluje i pokus s DNA, kdy je kapalina s obsahem DNA v kontaktu s kovovou vrstvou. Kapalina se vlivem tepla odpaří a je vyloučena na absorpční materiál. Pomocí digitálního zobrazení elektroforézou na agarozovém gelu je vidět, že činnost roztoku DNA byla zachována pouze pro laser absorbované energie až 3 mJ / cm^2 ve srovnání s kontrolním roztokem DNA. [17]

4 Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation

Technika známá jako Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation (zkr. MAPLE) byla vyvinuta koncem 90. let u americké námořní výzkumné laboratoře, aby se zajistila jemnější impulzní laserový odpařovací proces pro polymery. Technika MAPLE byla úspěšně použita k ukládání tenkých a rovnoměrných vrstev chemoselektivních polymerů, stejně jako organických sloučenin, jako jsou jednoduché uhlohydráty a jejich polymery. V MAPLE obsahuje laserový cíl zmrzlou matici, která sestává z roztoku polymerní sloučeniny rozpuštěné v relativně těkavém rozpouštědle. Koncentrace rozpouštědla a rozpuštěné látky jsou zvoleny tak, aby se materiál, který je předmětem zájmu, mohl úplně rozpustit a aby se vytvořil zředěný homogenní roztok. Cílem je, aby většina laserové energie byla původně absorbována spíše rozpouštědlem než rozpuštěnou látkou. Molekuly rozpuštěné látky a rozpouštědla jsou odváděny z cílové oblasti laserovým impulsem. Jakmile jsou molekuly na povrchu substrátu, vytvořit film. V MAPLE je cíl chlazený, aby zmrazil roztok matrice.

V procesu MAPLE není polymer nebo organická molekula záměrně ionizována a je shromažďována na substrátu. V MAPLE zmrazený cíl obvykle obsahuje <5% (m/m) rozpuštěného materiálu (Polymer nebo biomateriál, který má být uložen). Tudiž každá molekula je obklopena a tudíž chráněna velkým množstvím rozpouštědla nebo matrice. Tato konfigurace snižuje jak tepelné, tak fotonické poškození polymeru nebo biomateriálu v roztoku během používání laseru. Laserová energie je typicky nastavena mezi 0,01 a 1,0 J/cm², v závislosti na použitém materiálu a použitém rozpouštědle. Vklady se mohou provádět při tlaku pohybujícím se od vakua do 70 Pa a za přítomnosti inertních nebo reaktivních plynů na pozadí.

Parametry zpracování MAPLE jsou následující: kompozice cílové matice, cíl a substrát, teplota, vzdálenost od cíle k substrátu, typ pozadí, laserová vlnová délka, plynulost laseru, trvání laserového pulsu a laserová opakovací frekvence. [19]

Hlavní nevýhodou oproti LIFT tedy je náročnost podmínek k použití. Jedná se především o nutnost prvek chladit, či zmrazit.

Výhodou je možnost využití díky speciální komory měnit podmínky a nespoléhat se tedy pouze na atmosférické podmínky.

5 Experimentální část

5.1 Cíle

V rámci tématu této bakalářské práce je naším cílem přenést zlatou vrstvu, která je na jednom laboratorním sklíčku, na sklíčko druhé, které je čisté. Vzhledem k počtu neúspěšných pokusů s laboratorními sklíčky byly provedeny i pokusy s křemíkovými destičkami. Dále, byly vybrány na přenos jednotlivé tečky. Díky tomu bylo možno s jedním sklíčkem s napařenou zlatou vrstvou pracovat déle, jelikož se přenášelo méně materiálu než-li kdyby bylo použito přímo linek.

5.2 Metodika výzkumu

Měření resp. tvorba a výzkum probíhala v laboratořích Fyzikálního ústavu Akademie věd České republiky v novém centru HiLASE (High average power pulsed LASERs) patřící mezi nejmodernější centra v Evropě. Až na výjimky docházelo i na témže místě k měření a skenování vzorků. Jako vzorky byly původně vybrána pouze klasická laboratorní sklíčka, na která byla naprášena vrstva zlata v tloušťce přibližně 50 μ m. V průběhu měření bylo rozhodnuto ještě pro použití křemíkové destičky, která vykazovalo lepší adhezni podmínky pro zlatou vrstvu, nežli laboratorní sklíčko.

5.3 Příprava vzorků

S pozlacením sklíček nám pomohl tým z fakulty jaderné fyziky při ČVUT v Praze. Pro pozlacení se použila obyčejná laboratorní sklíčka a naprašovačka od firmy JEOL, do které by vložen zlatý disk. Sklíčka bylo nutno před vložením do naprašovačky řádně očistit. I přes řádné očištění alkoholem, tak během doby trvání výzkumu k degeneraci zlaté vrstvy. Dalším důležitým a nezbytným faktem poškození vrstvy, které se projevilo ztmavnutím na několika místech, bylo i jejich uskladnění. Naše vzorky byly umístěny pouze v plastových Petriho miskách, což bylo nedostačné. Pro následné nové hodnocení bych doporučil nejlépe prachu

vzdorné pouzdro a zajištění vůči otřesům. Otázkou je zda-li časový úsek, vymezený pro toto měření, by neměl být kratší, a tím by se předešlo případné degeneraci zlaté vrstvy.

Laboratorní sklíčka byla vložena do přístroje k naprašování, tzv. naprašovačky (obrázek 5). V té se ze zlatého disku uvolnily atomy zlata, jenž postupně klesla na sklíčka (obrázek 6). Tloušťka zlaté vrstvy byla přibližně $50\mu\text{m}$. Na užších krajích sklíček byla o něco tenčí z důvodu horšího putování iontů u okrajů nádoby. Za úvahu stojí fakt, zdali by došlo k odlišným hodnotám, v případě, že by byla vrstva zlata stejnostranně rozložena, a jak je možno toto stejnostranné rozložení zlaté vrstvy zajistit.



Obrázek 5: Použitá naprašovačka k nanesení zlata na podložní sklíčka [20]



Obrázek 6: Podložní sklíčka s naprašovanou zlatou vrstvou [20]

5.4 Použité lasery

Pro tvorbu masky, která byla potřebná k ořezu laserového svazku, který vysílal laser typu Omron MX-AI2030 (laser použitý trvale při tvorbě biosenzoru), byl použit laser modelu TruMark 3000. Jelikož energie laserového svazku byla vysoká, byla pomocí laseru modelu TruMark 3000 vytvořena v počerněné hliníkové folii maska, která zúžila tento laserový svazek, čímž se snížila i energie použita pro přenos zlaté vrstvy z pozlaceného sklíčka.

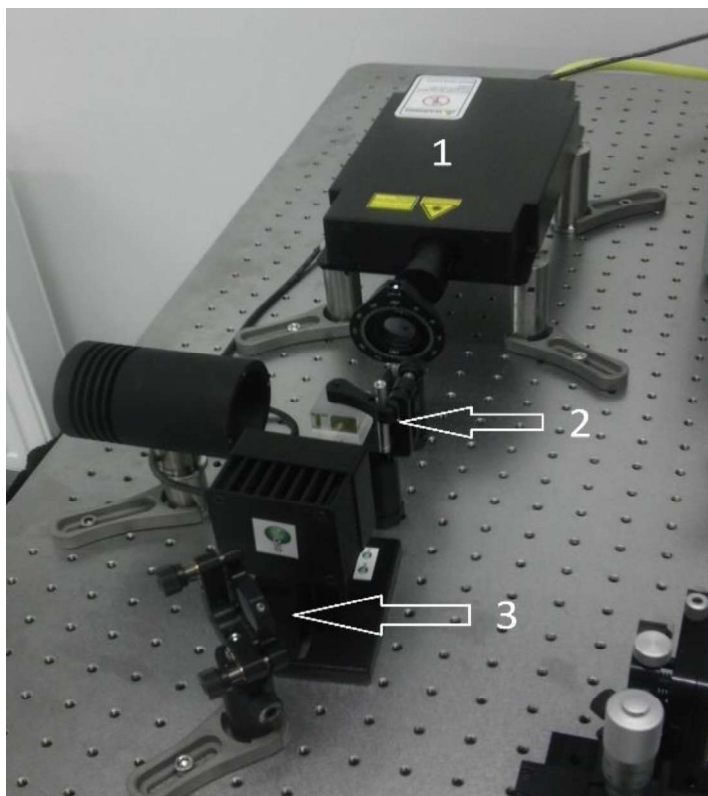
5.4.1 Použitý laser pro samotný přenos

Námi používaný laser značky OMRON modelu MX-AI2030 series měl průměrný výstupní výkon 20W s opakovací frekvencí nastavitelnou od 10 do 1000kHz. Díky svému výkonu je řazen do bezpečnostní třídy IV (viz Příloha A) a je nutné s ním pracovat pod dozorem proškolené osoby, nebo být proškolen pro práci s lasery. Šířka jednoho pulzu byla 3ns, přičemž v nastavení se dalo vybrat z 16 různých možností opakování. Možnosti se lišili v počtu pulsů (1,2,3,4,6,8 pulsů), v délce intervalu mezi jednotlivými pulsy (13, 20. nebo 26ns), či v jejich intenzitě (každý puls stejný, či trojúhelníkový náběh). Námi bylo vyhodnoceno jako neoptimálnější nastavení frekvence 10kHz. Při pokusech bylo využito především nastavení, kdy se aplikoval pouze jeden pulz (single shot).

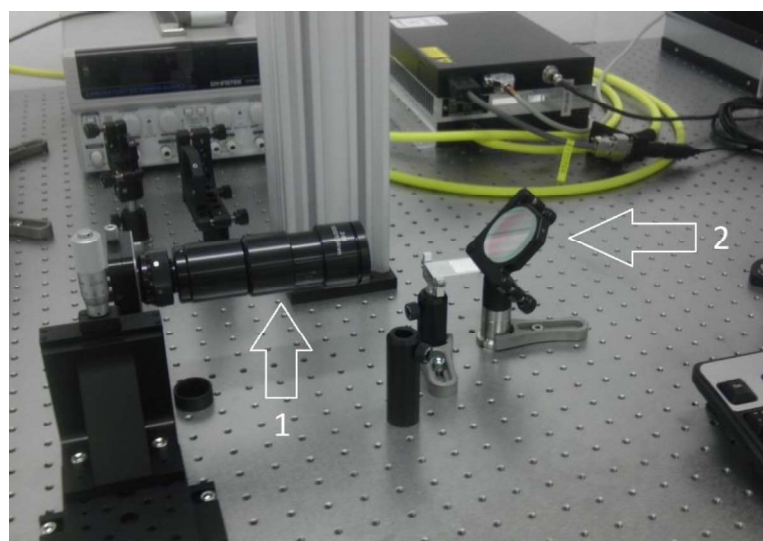
V měřicí soustavě se dále objevily optické a optomechanické prvky, mezi které patří polarizační kostka, odrazová zrcátka, fokuzér, motorizovaná zaměřovací hlava a podložní stolec (obrázek 7, obrázek 8, str. 30 a obrázek 9 str. 31).

- Polarizační kostka poskytovala možnost odfiltrování nežádoucích vln z laserového svazku (původně nepolarizované světlo) a propustila pouze požadovaný směr vlnění v laserovém svazku.
- Odrazová zrcátka umožňovala zmenšit pracovní prostor na menší plochu a usnadnit tedy i práci.
- Fokuzér je důležitý pro rozšíření původního laserového svazku
- Zaměřovací hlava se skládá ze vstupního otvoru, motorizovaného odrazového zrcátka ovládaného přes SW v počítači a čočky na výstupu; přes SW možno nastavit vzor pro požadovaný výsledek a SW sám nastaví polohu zrcátka

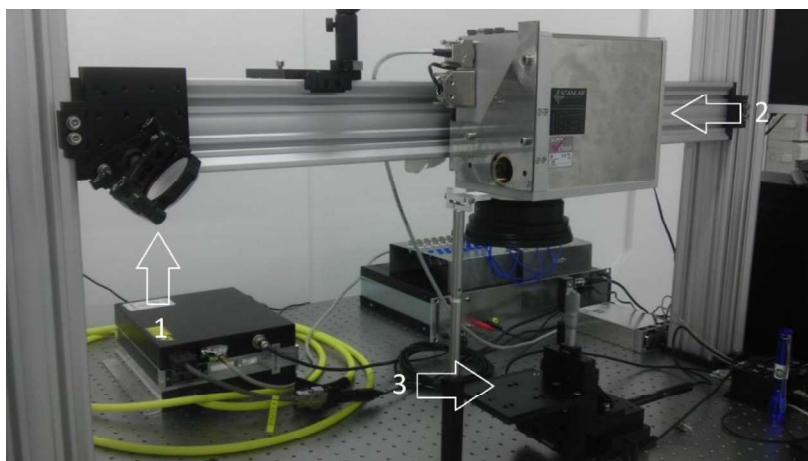
- Podložní stůl slouží k nastavení polohy vzorků, osa x a y motorizované, osa z se nastavoval manuálně



Obrázek 7: Měřicí soustava (1 – laser, 2 – polarizační kostička, 3 – odrazové zrcátko) [20]



Obrázek 8: Měřicí soustava (1 – fokuzér, 2 – odrazové zrcátko) [20]



Obrázek 9: Měřicí soustava (1 – odrazové zrcátko, 2 – motorizovaná zaměřovací hlava, 3 – podložní stůl) [20]

5.4.2 Použitý laser pro vytvoření masky na ořez svazku

Jelikož se použitý svazek jevil jako silný, tak při měření bylo rozhodnuto zkusit zmenšit energii svazku pomocí zúžení laserového svazku přes masku. Pro omezení svazku existuje více možností, např. clona, rozdělovač svazku tzv. splitter (nevyužité svazky je potřeba kvůli bezpečnosti zachytit), či filtry. Pro vytvoření masky, která nám ořízla laserový svazek, byl použit laser TruMark 3000 (obrázek 10, str. 32) umístěný v TruMark Station 5000 (obrázek 11, str. 32). Důvodem pro využití masky byla mimo jiné, že při použití této metody je minimálně ovlivněn laserový svazek.

Tento laserový systém byl ovládán přes SW v počítači a umožňoval zobrazování přenášeného vzoru na vzorek ještě před samotným použitím laseru. Díky umístění laseru v TruMark Station nebylo nutné pro práci používat jakékoliv speciální pomůcky. Po spuštění laseru došlo k uzavření systému pomocí víka, které zamezovalo zranění, či poškození okolí laserovým svazkem.

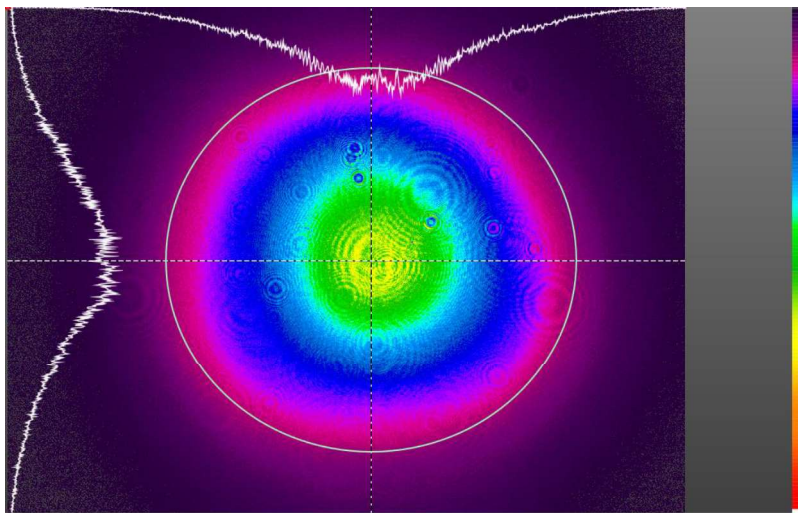


Obrázek 10: Laser TruMark 3000 [20]

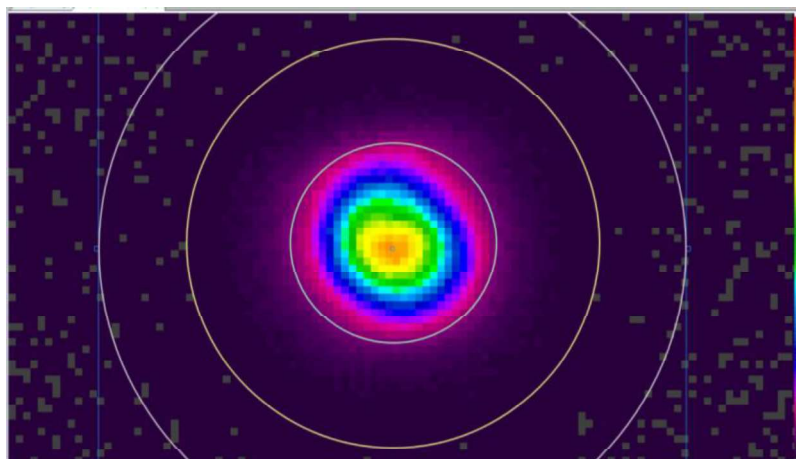


Obrázek 11: Pracovní stanice TruMark Station 5000 [20]

Na základě ořezání na přibližně polovinu (obr 12, obr 13) průměru původního svazku bylo dosaženo asi 1000x slabšího výkonu ve svazku (Viz výsledky Příloha B).



Obrázek 12: Původní svazek [20]



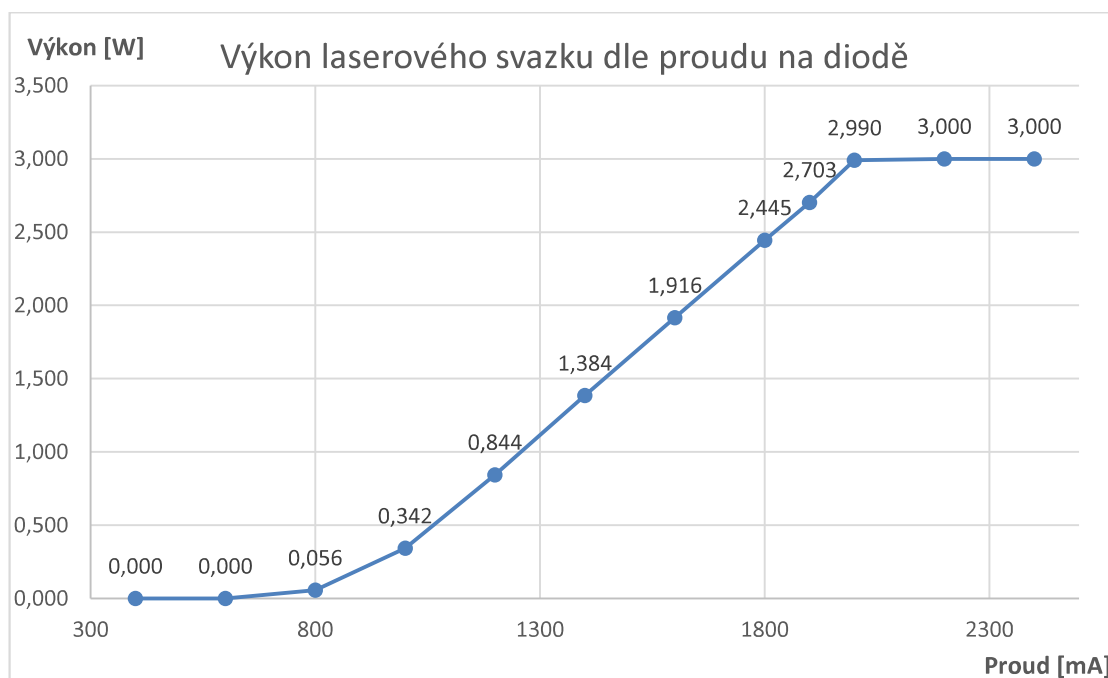
Obrázek 13: Svazek po použití masky (šedý kruh označuje původní velikost) [20]

5.5 Ovlivnitelné parametry

Měření probíhalo v laboratořích, do které nebylo nutno oblékat žádné zvláštní oblečení. Pouze z bezpečnostních důvodů bylo nutno mít laserové ochranné brýle. Mikroskop pro zjišťování výsledků se nacházel v tzv. čistých prostorách (sály se zvýšenou čistotou prostředí dle parametrů norem ISO viz příloha C), kam se již mohlo vcházet jen zásadně v oděvu minimalizujícím uvolňování prachových částic do ovzduší.

Jelikož s laserem pracovalo více lidí, bylo nutné po každé opět precizně nastavit naši konfiguraci soustavy a zaměřit. Po tomto zaměření bylo možné již přikročit k samotnému přenášení zlaté vrstvy.

Samotný proud použitý pro čerpání diody se nastavoval přes software počítače, který byl umístěn v blízkosti soustavy a určený pouze pro ovládání laseru, zaměřovacích motorizovaných zrcadel, zařízení pro posun podstavce v ose x,y.. Tento proud určoval i výkon na výstupu. Laserový svazek se na výstupu začal objevovat přibližně při 700mA a na 2000mA měl své maximum výkonu (viz Graf 1). Pro přenos zlaté vrstvy naprášené na podložním sklíčku se využívalo celého intervalu zjištěného proudu (700mA a na 2000mA).



Graf 1: Naměřený výkon v závislosti na použitém proudu [20]

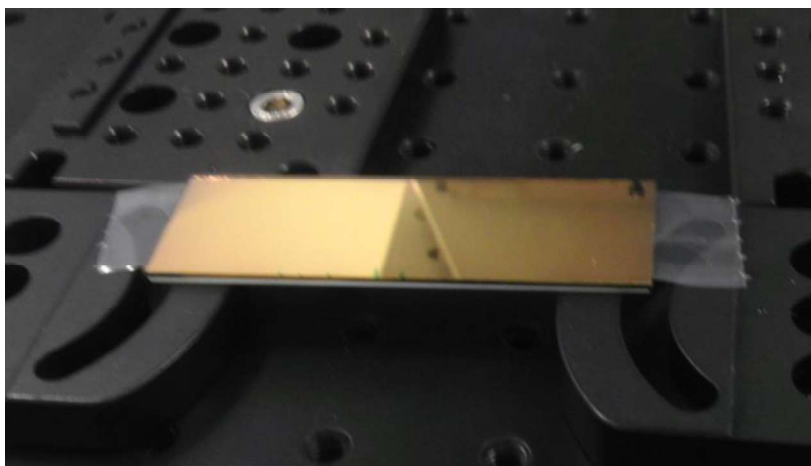
Další faktor, který bylo možné nastavit, byl počet pulsů v laserovém svazku. Laser typu Omron MX-AI2030 umožňoval nastavení mezi jedním, dvěma, třemi, čtyřmi, šesti, či

osmy pulsy. Pro naše měření bylo použito modu jednoho pulsu. Při pokusech s více pulsy došlo vlivem drobných otřesů k posunu zasažené oblasti, a to by vedlo k rozšíření a většímu roztřepení přenášeného vzorku, což bylo pro nás nežádoucí.

Poslední měnitelnou vlastností laseru byla doba vysílání laserového svazku - expozice. Při měření průběhu laseru na osciloskopu bylo zjištěno, že každých cca 50 μ s se na výstupu objeví jeden puls. Proto ve většině případů bylo použito nastavení na 45 μ s.

Další faktory, jenž se mohly měnit, byla výška stolku, na kterém byl vzorek položen, resp. jeho vzdálenost od poslední čočky a mezera mezi sklíčkem se zlatou vrstvou a sklíčkem přijímacím. Pomocí posunu podložní stolku v horizontální rovině jsme dostali vzorek blíže, či dále od ohniska. Tím se měnila i šířka svazku využitého pro přenos zlaté vrstvy (v ohnisku užší, nežli mimo něj), a současně došlo k rozložení energie do větší plochy, tudíž i k menšímu zahřátí zlaté vrstvy, a z toho vyplývá, že okraje v místě odpaření zlaté vrstvy nebyly tak roztřepené (vizuálně připomínající poškození plechu po průstřelu kulky).

Po většinu doby měření byla nechávána podložní sklíčka v přímém kontaktu, tj. bez mezery mezi nimi. V průběhu měření bylo několikrát vyzkoušeno i vytvoření mezery mezi těmito sklíčky pomocí kousků polyethylenových sáčků (obrázek 14), papíru apod. Ale zjištěnou skutečností bylo, že tato změna měření téměř neovlivnila a výsledky se pod mikroskopem jevíly velmi podobné, takže sklíčka byla dále nechávána v přímém kontaktu.



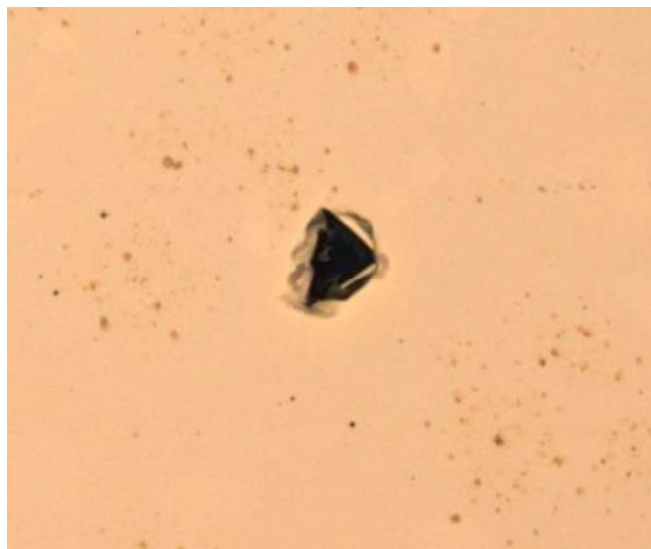
Obrázek 14: Sklíčka s vytvořenou mezerou pomocí polyethylenových sáčků [20]

5.6 Výsledky měření

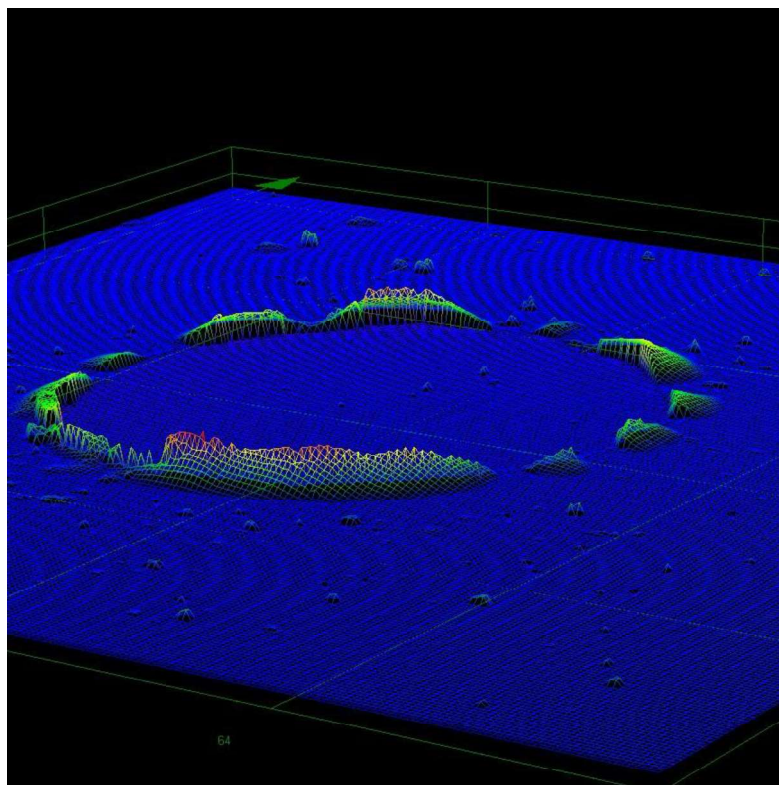
Na vyhodnocování výsledků byl použit mikroskop Olympus OLS 4000. Tento mikroskop disponuje mimo klasického optického režimu i režim s laserovým snímáním. Vše (kromě hrubého zaostření) se ovládá pomocí SW v počítači a umožňuje okamžité uložení aktuálně prohlíženého obrázku, či nastavení snímané oblasti, kterou je potřeba naskenovat.

5.6.1 Zlatá vrstva

Podložní sklíčka potažená zlatou vrstvou byla testována v několika výškových úrovních a to v ohnisku laserového svazku, a i mírně mimo ohnisko (přibližně 3mm nad ohniskem) a výrazněji mimo ohnisko (přibližně 10mm nad ohniskem), přičemž v každém výškovém nastavení podložního stolku, byl na laseru nastavován čerpací proud od 700mA do 1700mA. Pod hranicí proudu 700mA byla interakce mezi laserovým svazkem a naprášenou zlatou vrstvou téměř nulová. Pokud k nějaké interakci došlo, tak se většinou projevila jako naříznutí vrstvy a případně vlivem teploty a stavu zlaté vrstvy došlo i ke zkroucení okrajů v místech naříznutí zlaté vrstvy (obrázek 15). Nad horní hranicí proudu (1700mA) docházelo k výraznějšímu poškození jak sklíčka potaženého zlatou vrstvou, tak i sklíčka, na které měla být zlatá vrstva přenesena a docházelo i k poškozování křemíkové destičky (hlavně při proudech 1900-2000mA).



Obrázek 15: Zlatá vrstva po neúplném odpaření (použito 750mA) [20]



Obrázek 16: Povrch pozlaceného sklíčka po odpaření vrstvy (použit 1000mA) [20]

5.6.2 Laboratorní sklíčka

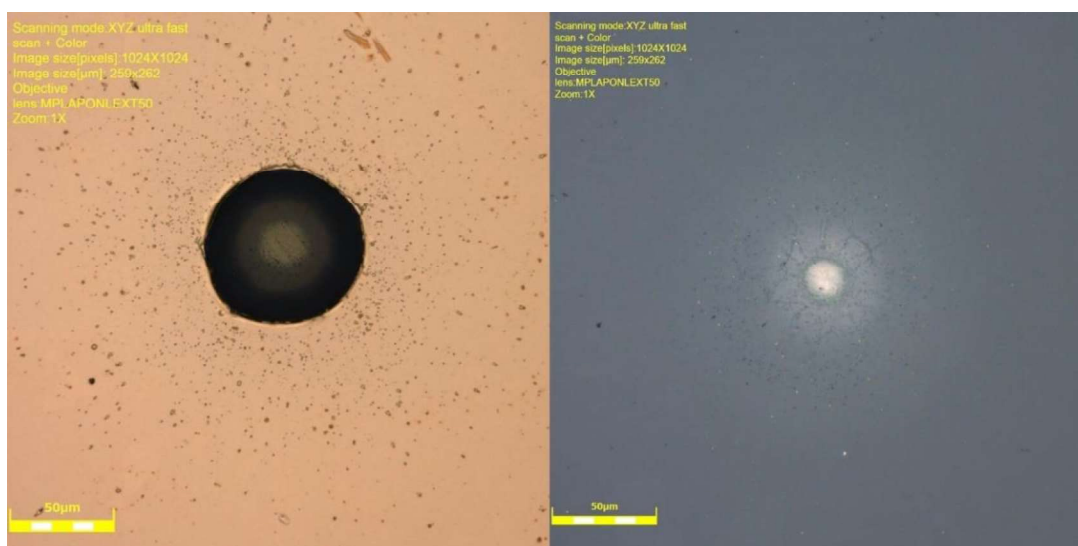
Jak již bylo psáno na začátku experimentální části, u laboratorního sklíčka docházelo při přenosu k potížím. Tyto potíže se projevily neschopností přenést zlatou vrstvu na druhé sklíčko v alespoň v minimálně požadovaných parametrech. Problém byl v energii laserového svazku, kdy energie postačující pro přenos zlaté vrstvy, resp. odpaření zlaté vrstvy z původního sklíčka byla dostatečná avšak přijímací sklíčko již poškozovalo. Při přímém kontaktu sklíčka se zlatou vrstvou a sklíčka, na které měla být zlatá vrstva přenesena docházelo, že se na přijímacím sklíčku zachytával pouze zlatý prach (obrázek 16) vzniklý při odloupení zlaté vrstvy na prvotním sklíčku. Při vytvoření mezery mezi sklíčkem se zlatou vrstvou a přijímacím (řádově v μm) se již téměř zlatý prach neusazoval. Pro obě varianty přenosu zlaté vrstvy s mezerou i bez však platí stejný závěr, a to, že vrstva přenášeného zlata nebyla schopna se pevně spojit s podložním sklíčkem.



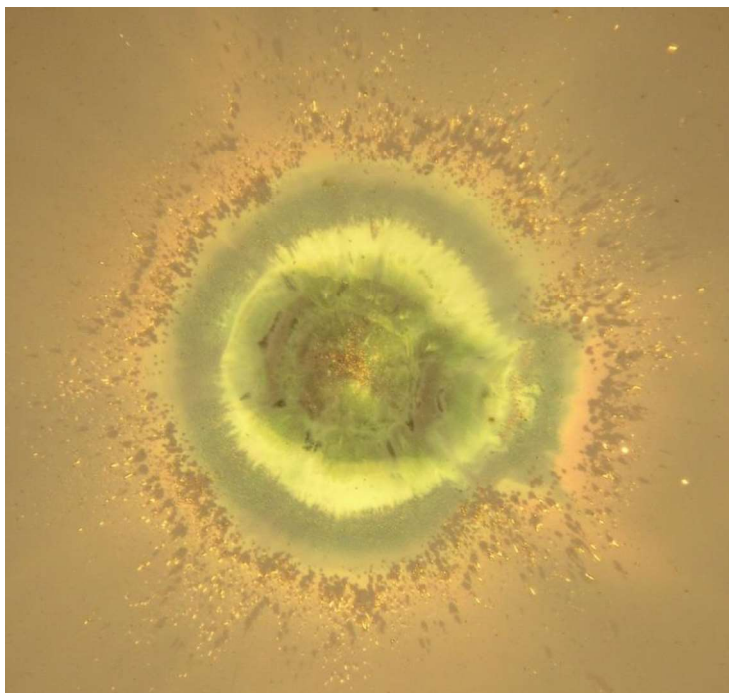
Obrázek 17: Výsledek pro čerpací proud 1600mA při umístění vzorku v ohnisku laserového svazku (50x zvětšeno) [20]

Další problém nastával při proudech okolo 1600mA a výš, kdy na podložním sklíčku již docházelo k poškozování jeho struktury (Obrázek 18), aniž by se v místě poškození vrstva zlata usadila, což už byl nežádoucí stav. Na obrázek 19 (str. 39) je i vidět, že kolem poškození sklíčka

se usazoval pouze zlatý prach.



Obrázek 18: Výsledek pro čerpací proud 1700mA při umístění vzorku v ohnisku laserového svazku (50x zvětšeno) [20]

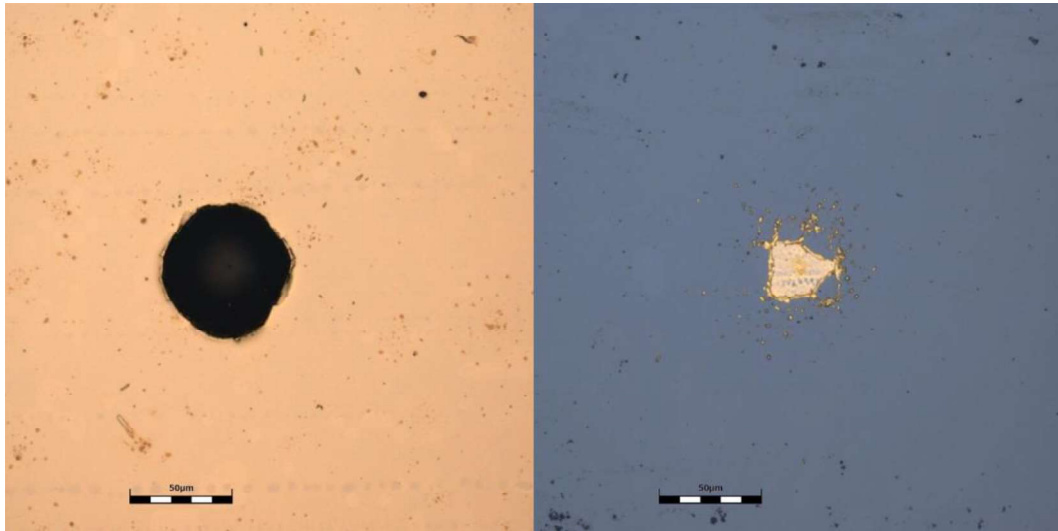


Obrázek 19: Poškození podložního sklíčka pro čerpací proud 1900mA (100x zvětšeno) [20]

5.6.3 Křemíková destička

Křemíková destička spolu s přenášenou zlatou vrstvou již vykazovala lepší adhezivní vlastnosti než-li podložní sklo a zlatá vrstva.

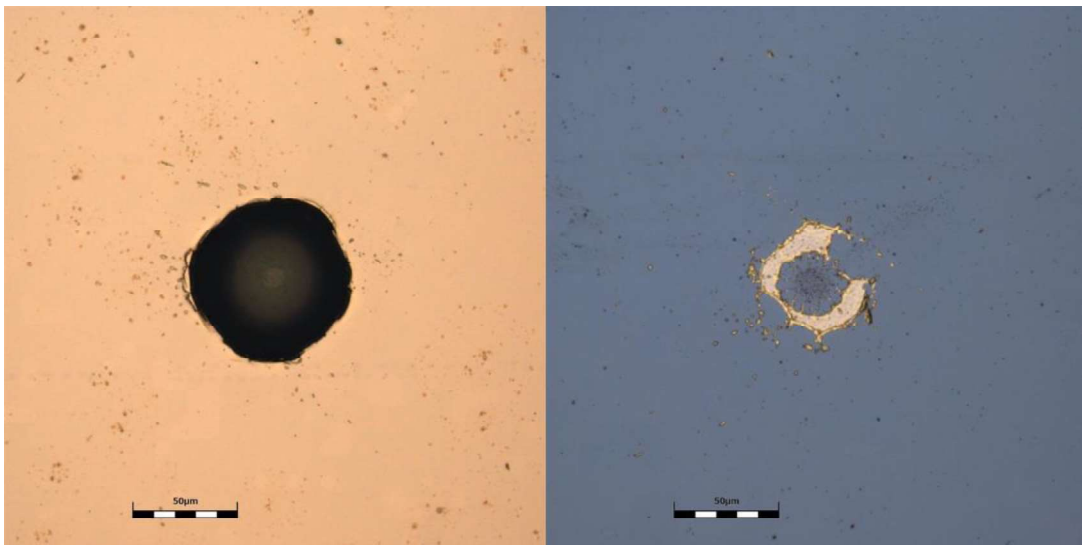
Při použití čerpacího proudu pod přibližně 1600mA docházelo k přenosu několika zrníček zlata, které netvořily žádný ustálený tvar, což bylo způsobeno pravděpodobně postupným odchlípnutím zlaté vrstvy z původního sklíčka, která se vlivem působení laserového svazku postupně rozpadala. Hodnota čerpacího proudu okolo 1750mA se projevila jako nejlepší ve spojení s posunem podložního stolku mimo ohnisko laserového svazku o 3mm. Přenesená vrstva zlata včetně svého okraje téměř kopíruje otvor vzniklý na původním sklíčku. (obrázek 20, str. 40)



Obrázek 20: Výsledek pro křemíkovou destičku, čerpací proud 1750mA, vzorek mimo ohnisko (zvětšení 100x) [20]

Při použití vyššího čerpacího proudu, začínala být energie laserového svazku pro přenos vysoká a docházelo k nedokonalému přenosu zlaté vrstvy. Tato vrstva se “stáhla“ po hraně laserového svazku, přičemž vzniklý tvar měl ve svém středu prostor bez přenesené zlaté vrstvy..

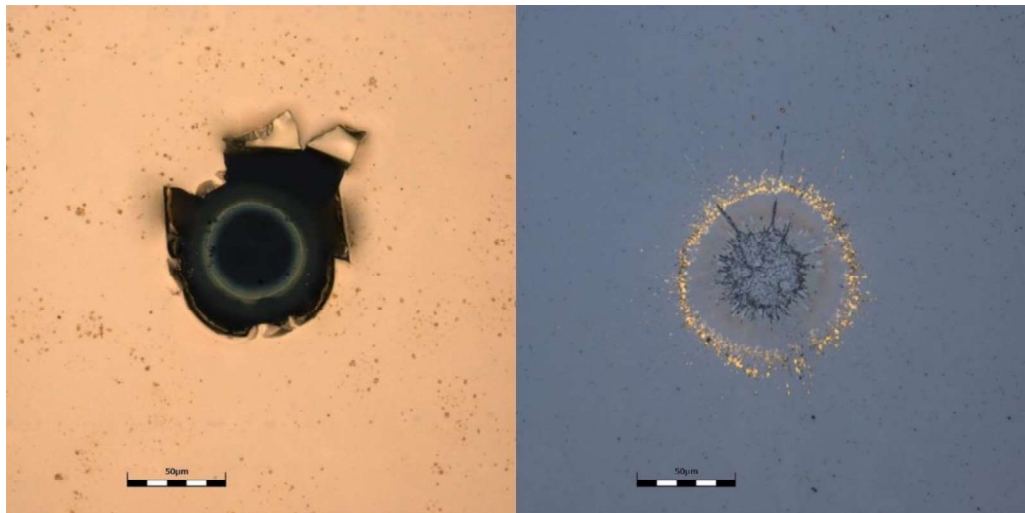
Na obrázek 21, je patrné již počínající poškození struktury křemíkové destičky přibližně ve středu obrazce. Při použití měřicí sestavy odpovídal téměř obrys přenesené vrstvy zlata obrysu na původním sklíčku, avšak není vyplněn střed.



Obrázek 21: Výsledek pro křemíkovou destičku, čerpací proud 1750mA, vzorek mimo ohnisko (zvětšení 100x) [20]

Při použití stejného nastavení jako v minulém případě pouze s rozdílem polohy podstavného stolku, kdy stejný vzorek byl umístěn do ohniska laserového svazku je vidět očekávaná výrazná změna ve výsledku přenosu zlaté vrstvy. Je vidět, že laserový svazek byl již silný natolik, že se odpařila větší plocha zlaté vrstvy, než-li byla plocha předpokládaná. Spolu s tímto nastavením, došlo i k většímu poškození křemíkové destičky a zlatá vrstva vytvořila opět kruh s poškozením uprostřed. Při porovnání vypáleného obrysu a obrazce na křemíkové destičce je však vidět, že pravděpodobně díky přímému kontaktu laserový svazek rozprostřel zlatou vrstvu skoro v dokonalém kruhu (viz obrázek 22) na křemíkové destičce..

Při použití adekvátně sníženého čerpacího proudu se zlatá vrstva přenesla, avšak bez vytvoření plného kruhu, ale pouze jeho okraje. Ani ostatní měření stejného nastavení měřící soustavy, kdy se měnil pouze čerpací proud na laserové diodě v rozmezí 950mA – 2000mA se změnou po 50mA nepřinesly kladné výsledky. Jediné, k čemu po celou dobu docházelo, bylo zvětšování průměru přenesené vrstvy zlata a postupné poškozování křemíkové struktury uvnitř tohoto kruhu vytvořeného zlatou vrstvou.



Obrázek 22: Výsledek pro křemíkovou destičku, čerpací proud 2000mA, vzorek v ohnisku (zvětšení 100x) [20]

Diskuze

Těmito pokusy byla snaha dosáhnout vytvoření základní struktury pro budoucí tvorbu laserových bioseznorů. Z důvodu snížení spotřeby finančně náročného materiálu byly využívány jednobodové přenosy zlaté vrstvy, přičemž při nalezení optimálního nastavení měřicí soustavy by došlo ke změně přenášeného vzoru zlaté vrstvy z bodu na linii (přímku, úsečku, linku apod.) . Na strukturu linií by pak byla aplikována bioreakční vrstva na jednom konci a převodník zobrazující, resp. přenášející výstupní signál na konci druhém.

Oproti výše popsanému původnímu předpokladu se nepodařilo naplnit původní cíle, jenž byly od práce očekávány. Problém čněl hlavně v přichycení zlaté vrstvy z původního podkladního sklíčka na sklíčko druhé. Námi očekávanému výsledku se přiblížil až přenos na křemíkovou destičku. Ta byla použita hlavně pro testování, zda se vrstva zlata skutečně přenesla, nebo jestli energie na její odtržení z původního podstavného sklíčka je tak silná, že se zlatá vrstva odpaří a rozprostře do prostoru v podobě mikrokapiček. Při dohledaných pokusech (viz kapitola 3) docházelo téměř bezproblémovému přenosu různých materiálů a přenesená vrstva odpovídala přibližně vrstvě odpařené z původního zdroje.

Díky použití křemíku bylo zjištěno, že pravděpodobně po drobných korekcích jsme schopni zlatou vrstvu přenést v podobě námi žádané. Aby byl výsledek co nejpodobnější očekávání, tak by korekce měřicí soustavy spočívala hlavně v úpravě čerpacího proudu procházejícího laserovou diodou v řádech jednotek, maximálně desítek mA, případně drobné úpravě vzájemné polohy vzorku (podkladové sklíčko se zlatou vrstvou a sklíčko na které tuto vrstvu budeme přenášet) a ohniska laserového svazku.

Aplikací křemíku bylo potvrzeno, že k přenosu zlaté vrstvy skutečně dojde, avšak pro budoucí použití, je křemík nevhodný, vzhledem ke své schopnosti jakožto polovodič vést elektrický proud. To by mohlo následně ovlivňovat měřené signály jenž biosenzor zaznamená a vnášet do měřicího systému vysokou chybu na výstupu hodnot. Jedna z možností jak křemíku využít na původní předpoklad (biosenzor tvořený ze skla s naprášenou zlatou vrstvou, který bude držet na skle) a minimalizovat ovlivnění měřeného signálu by byla, že přijímací podkladové sklíčko by bylo potaženo úzkými pruhy křemíkové vrstvy, která by však neměla být o moc širší než přenášená zlatá vrstva. To však přináší nutnost umístit následně přenášenou vrstvu zlata na přesně vymezený prostor křemíkem na podkladovém sklíčku.

Eventuálně je možno hledat chybu i v typu použité laboratoře. Ve vyhledaných pokusech nebyl zmíněn typ čistoty prostředí (čisté prostory dle norem ISO) v laboratoři. Jelikož měření probíhalo v laboratoři, do které není potřeba speciálního oděvu, krom bezpečnostních brýlí, je i možné, že i přes snahu udržet veškeré použité vzorky v bezprašném obalu, se nám na ně dostaly prachové částice, které měření mohly ovlivnit.

Jedno z největších nepřesností měření bylo však pravděpodobně způsobeno neúmyslně, námi samými. Jelikož s laserem pracovaly i další výzkumné týmy, muselo být před každým samotným měřením provedeno nové nastavení měřicí soustavy na náš experiment. Jelikož toto nastavení měřicí soustavy nezůstávalo stále stejné, byly zanášeny do nastavování drobné neúmyslné změny. Jejich důsledkem mohlo být, že přes stejný čerpací proud a vzdálenost vzorku od poslední čočky v měřicí soustavě, byly výsledky mírně odlišné oproti předchozím měřením.

Vzhledem k výše popsaným důvodům, kde mohly chyby vzniknout, do budoucna by bylo vhodné otestovat, zda a případně jak velký vliv má typ laboratoře na měření. Mohlo by se požadovat i nepoužívání dalšího laserového systému (izolovaná laboratoř pouze s jedním laserovým přístrojem), ale v klasickém provozu je tento požadavek téměř nereálný. Nejdůležitější však bude nalézt vhodný materiál, který bude kombinovat stálost a izolační vlastnosti podkladového sklíčka a přilnavost křemíkové destičky a současně by se nejednalo o vzácný, či finančně náročný materiál. Tím může být jiný druh skla než laboratorní sklíčko, či nějaká tvrzená plastická hmota, která je schopna snášet velké rozmezí a rozpětí vlivů.

Závěr

V této bakalářské práci byla snaha vytvořit biosensor, nebo aspoň jeho základní strukturu na kterou už by se jen aplikovala bioreakční vrstva, na laboratorním sklíčku. Přístroje by měly být v budoucnu na stejnou šířku dnešních biosenzorů schopny měřit více parametrů. Došlo by případně ke snížení zátěže pro organismus pacienta a ke snížení počtu přístrojů nutných k měření, a s tím související snížení finančních nákladů

Teoretická část shrnula základní poznatky o laserech, biosenzorech a představila metodu LIFT vč. příkladů použití. Praktická část zahrnovala již samotná měření a výsledky.

Oproti očekávání ale měření nevycházelo podle časového plánu. Původně mělo být použito pouze klasické podkladové sklíčko, avšak po stálých nezdarech s přenosem zlaté vrstvy, kdy docházelo k pře nastavování mj. šíře laserového svazku pomocí hliníkové masky sloužící pro ořez používaného laserového svazku, množství pulsů v laserovém svazku, délce expozice, či vzdálenosti obou podkladových sklíček mezi sebou, bylo přistoupeno k použití křemíkové destičky a měření bylo opakováno. S křemíkovou destičkou bylo dosaženo lepších výsledků, čímž bylo potvrzeno, že zlatá vrstva se dá přenést a při určité korekci i ve tvaru, který byl očekáván.

Největším problémem se ukázala pravděpodobně adheze laboratorních sklíček, kdy nebylo možné zlatou vrstvu na tato sklíčka nanést. Zlatá vrstva nebyla schopna se s podložním sklíčkem naplno spojit. Při přímém kontaktu není možné přesně říci, zda se zlatá vrstva přenesla. Ve variantě, že se na podložním sklíčku zlatá vrstva uchytila, dojde pravděpodobně k nedostatečně silné vazbě (spojení materiálů mezi sebou), která oba materiály u sebe udrží. Následně, při oddělení obou sklíček od sebe, se patrně vlivem proudění vzduchu (při transportu podložního sklíčka zpět do skladovacího boxu), zlatá vrstva odloupne a na podkladním sklíčku zůstanou pouze drobné částičky zlatého prachu, které se uchytily. Při vytvoření mezery mezi podkladními sklíčky se stejně jako v předchozím případě nelze s úplnou jistotou určit zda se zlatá vrstva přenesla, ale je zde větší pravděpodobnost, že k tomuto přenosu nedojde.

Seznam použité literatury

1 Zlato, chemický prvek Au, popis a vlastnosti. *Periodická soustava prvků*. 2009. Dostupné z: <http://www.prvky.com/79.html>

2 MIKULČÁK, Jiří. *Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. 3. vyd. Praha: Prometheus, 2007. Pomocné knihy pro žáky (Prometheus). ISBN 80-85849-84-4.

3 Křemík, chemický prvek Si, popis a vlastnosti. *Periodická soustava prvků*. 2009 Dostupné z: <http://www.prvky.com/14.html>

4 JELÍNEK, Miroslav. *Vytváření tenkých vrstev laserem mechanismus PLD, hybrid-PLD, MAPLE* [přednáška]. Kladno: České vysoké učení technické, Fakulta biomedicínského inženýrství, 21.4.2014

5 KOŘÁN, Pavel. Seriál na téma lasery - základní princip laseru a jejich dělení. LAO - PRŮMYSLOVÉ SYSTÉMY S.R.O. *Lao – Lasery a Optika* [online]. Praha, [cit. 2017-04-03]. Dostupné z: <http://www.lao.cz/lao-info-49/serial-na-tema-lasery---zakladni-princip-laseru-a-jejich-deleni-127>

6 BACH, Hans a Dieter KRAUSE. *Thin Films on Glass*. Berlin. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. ISBN 978-3-662-03475-0.

7 ČEJKA, Marek. *Optimalizace tvorby tenkých vrstev kovových materiálů*. Brno, 2014. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav elektrotechnologie. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=85267

8 ŠAVEL, Josef. *Elektrotechnologie: Materiály, technologie a výroba v elektronice a elektrotechnice*. Vyd. 4. Praha: BEN – technická literatura, 2006. ISBN 978-80-7300-1.

9 GONG, Hanmo a kol. Gold nanoparticle transfer through photothermal effects in a metamaterial absorber by nanosecond laser, *Scientific Reports*. 2014,4, 6080. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <https://www.nature.com/articles/srep06080>

10 BOHANDY, J., B. KIM a F. ADRIAN. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser, *Journal of Applied Physics*. 1986, 60(4), 1538–1539. ISSN 1089-7550. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.337287>

11 M. COLINA a kol., DNA deposition through laser induced forward transfer, *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 20(8), str. 1638-1642. ISSN 0956-5663. Dostupné také z: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566304003720

12 Singh, Saul C. a kol. *Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers*. Chichester: John Wiley, 2012. ISBN 978-3-527-32715-7.

13 ESROM, Hilmar a kol. New approach of a laser-induced forward transfer for deposition of patterned thin metal films, *Applied Surface Science*. 1995, 86(1-4), str. 202-207. ISSN 0169-4332. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169433294003858>

14 BANKS, David P. a kol. Femtosecond laser-induced forward transfer for the deposition of nanoscale, transparent, and solid-phase materials [přednáška v rámci konference]. In: *Proceedings of LAMP2009 - the 5th International Congress on Laser Advanced Materials Processing, 29.6 – 2.7.2009, Kobe*. Dostupné též z: <http://www.orc.soton.ac.uk/publications/45xx/4542.pdf>

15 Tseng, Ming L. a kol. Fabrication of phase-change chalcogenide Ge₂Sb₂Te₅ patterns by laser-induced forward transfer, *Optics Express*. 2011, 19(18), str. 16975-16984. ISSN 1094-4087. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-19-18-16975&id=221884>

16 SNAH, Ankur. *Interference Assisted Laser Induced Forward Transfer for Line Patterning*. Montreal, 2008. Diplomová práce. Concordia University, Mechanical and Industrial Engineering. Dostupné také z: <http://spectrum.library.concordia.ca/976250/1/MR45475.pdf>

17 PALLA-PAPAVLU, Alexandra a kol. Laser induced forward transfer for materials patterning, *Romanian Reports in Physics*. 2011, **63**(Supplement), 1285-1301. ISSN 1841-8759. Dostupné také z: http://rrp.infim.ro/2011_63_supliment/art13Palla.pdf

18 FERNÁNDEZ-PRADAS, Juan M. a kol. Laser-induced forward transfer of biomolecules, *Thin Solid Films*. 2014, 27-30. ISSN 0040-6090. Dostupné také z: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040609003016432#

19 PIQUÉ, Alberto. The Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation (MAPLE) process: origins and future directions, *Applied Physics A*. 2011, **105**(3), 517-528. ISSN 1432-0630 Dostupné také z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00339-011-6594-7>

20 Archiv Autora

21 ČSN EN 60825-1. *Bezpečnost laserových zařízení - Část 1: Klasifikace zařízení a požadavky*. ed 3 Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.

22 ČSN EN ISO 14644-1. *Čisté prostory a příslušné řízené prostředí – Část 1: Klasifikace čistoty vzduchu podle koncentrace částic*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2016.

Seznam obrázků

- Obrázek 1: Ilustrace principu metody LIFT
- Obrázek 2: Ilustrace výsledku ve 3D (12)
- Obrázek 3: Optická mikroskopie mikročipu (liposom: glycerol, 50:50)
- Obrázek 4: fluorescenční mikroskopie obrazu mikročipu získaného z 10 um silné vrstvy kapaliny
- Obrázek 5: Použitá naprašovačka k nanesení zlata na podložní sklíčka
- Obrázek 6: Podložní sklíčka s naprášenou zlatou vrstvou
- Obrázek 7: Měřicí soustava (1 – laser, 2 – polarizační kostička, 3 – odrazové zrcátko)
- Obrázek 8: Měřicí soustava (1 – fokuzér, 2 – odrazové zrcátko)
- Obrázek 9: Měřicí soustava (1 – odrazové zrcátko, 2 – motorizovaná zaměřovací hlava, 3 – podložní stolec)
- Obrázek 10: Laser TruMark 3000
- Obrázek 11: Pracovní stanice TruMark Station 5000
- Obrázek 12: Původní svazek
- Obrázek 13: Svazek po použití masky (šedý kruh označuje původní velikost)
- Obrázek 14: Sklíčka s vytvořenou mezerou pomocí polyethylenových sáčků
- Obrázek 15: Zlatá vrstva po neúplném odpaření (použito 750mA)
- Obrázek 16: Povrch pozlaceného sklíčka po odpaření vrstvy (použit 1000mA)
- Obrázek 17: Výsledek pro čerpací proud 1600mA při umístění vzorku v ohnisku laserového svazku (50x zvětšeno)
- Obrázek 18: Výsledek pro čerpací proud 1700mA při umístění vzorku v ohnisku laserového svazku (50x zvětšeno)
- Obrázek 19: Poškození podložního sklíčka pro čerpací proud 1900mA (100x zvětšeno)
- Obrázek 20: Výsledek pro křemíkovou destičku, čerpací proud 1750mA, vzorek mimo ohnisko (zvětšení 100x)
- Obrázek 21: Výsledek pro křemíkovou destičku, čerpací proud 1750mA, vzorek mimo ohnisko (zvětšení 100x)
- Obrázek 22: Výsledek pro křemíkovou destičku, čerpací proud 2000mA, vzorek v ohnisku (zvětšení 100x)
- Obrázek 23: Naměřené hodnoty před ořezání laserového svazku
- Obrázek 24: Naměřené hodnoty po ořezání laserového svazku

Seznam příloh

Příloha A - Dělení laserů dle ČSN EN 60825-1 ed 3.

Příloha B - Naměřené hodnoty před a po ořezání laserového svazku

Příloha C - Norma ISO 14644-1

Příloha A – Dělení laserů dle ČSN EN 60825-1 ed 3.

Třída 1. Lasery, které jsou bezpečné za provozních podmínek, které lze předpokládat s dostatečně velkou pravděpodobností, včetně podmínek sledování svazku pomocí optických přístrojů. [21]

Třída 1M. Lasery vyzařující v rozsahu vlnových délek od 302,5 nm do 4 000 nm, které jsou bezpečné za provozních podmínek, které lze předpokládat s dostatečně velkou pravděpodobností, ale mohou být nebezpečné, jestliže uživatel použije pro sledování uvnitř svazku optické přístroje. [21]

Třída 2. Lasery vyzařující viditelné záření v rozsahu vlnových délek od 400 nm do 700 nm, u kterých je ochrana zraku za normálních okolností zajištěna fyziologickými reakcemi zahrnujícími i mrkací reflex. Tato reakce může být považována za dostatečnou pro zajištění adekvátní ochrany za provozních podmínek, které lze předpokládat s dostatečně velkou pravděpodobností, včetně použití optických přístrojů pro pozorování uvnitř svazku. [21]

Třída 2M. Lasery vyzařující viditelné záření v rozsahu vlnových délek od 400 nm do 700 nm, u kterých je ochrana zraku za normálních okolností zajištěna fyziologickými reakcemi zahrnujícími i mrkací reflex. Ale sledování výstupu laseru může být daleko nebezpečnější, jestliže uživatel použije pro sledování uvnitř svazku optické přístroje. [21]

Třída 3R (do roku 2001 označována 3A). Lasery vyzařující v rozsahu vlnových délek od 302,5 nm do 106 nm, u kterých je přímé sledování uvnitř svazku potenciálně nebezpečné, ale riziko je menší než u laserů třídy 3B. Rovněž je pro ně požadováno menší množství výrobních požadavků a kontrolních hodnot pro uživatele než u laserů třídy 3B. Přípustná mez záření (AEL) je pětinásobkem přípustné meze záření AEL pro třídu 2 v rozsahu vlnových délek od 400 nm do 700 nm a pětinásobkem přípustné meze záření AEL pro třídu 1 pro ostatní vlnové délky. [21]

Třída 3B. Lasery, u kterých je za normálních okolností nebezpečné, jestliže dojde k přímému ozáření svazkem (ve jmenovité vzdálenosti s nebezpečím poškození zraku NOHD). Sledování difúzních odrazů je za běžných podmínek bezpečné. [21]

Třída 4. Lasery, které jsou schopny produkovat nebezpečné difúzní odrazy. Mohou způsobit poškození pokožky a vznik požáru. Jejich používání vyžaduje mimořádnou pozornost. [21]

Příloha B – Naměřené hodnoty před a po ořezání laserového svazku

Name	Value	Units	Mean	Std Dev	Max	Min	Sample Size
Power/Energy *							
Total ISO	786,835,966.50	cnts	782,551,150.58	2,349,126.74	787,612,258.50	777,836,909.50	36
Peak ISO	3,221.61	cnts	3,194.32	50.10	3,314.61	3,091.61	36
Min	-35.70	cnts	-105.38	96.01	-33.34	-287.00	36
Spatial *							
Centroid X ISO	3.777907e+03	um	3.777765e+03	5.806859e-01	3.778603e+03	3.776287e+03	36
Centroid Y ISO	2.648548e+03	um	2.648907e+03	5.856097e-01	2.650377e+03	2.647737e+03	36
D4σX ISO	4.273e+03	um	4.273e+03	5.705e-01	4.275e+03	4.272e+03	36
D4σY ISO	4.011e+03	um	4.010e+03	4.771e-01	4.012e+03	4.010e+03	36
Divergence *							
Gaussian *							
Gauss Height Zg	2,268.40	cnts	2,256.72	6.40	2,270.67	2,243.87	36
Dg X	4.165e+03	um	4.164e+03	4.781e-01	4.165e+03	4.163e+03	36
Dg Y	4.069e+03	um	4.069e+03	5.139e-01	4.070e+03	4.068e+03	36
Gauss Centroid X	3.810086e+03	um	3.810082e+03	5.963736e-01	3.810991e+03	3.808492e+03	36
Gauss Centroid Y	2.618137e+03	um	2.618376e+03	5.965554e-01	2.619713e+03	2.617160e+03	36
Goodness of Fit	0.947		0.947	0.000	0.947	0.946	36
Roughness of Fit	0.559		0.563	0.008	0.578	0.549	36
Δ Centroid X	3.218e+01	um	3.232e+01	7.055e-02	3.245e+01	3.218e+01	36
Δ Centroid Y	-3.041e+01	um	-3.053e+01	1.475e-01	-3.026e+01	-3.095e+01	36
Δ Centroid	4.428e+01	um	4.446e+01	1.001e-01	4.468e+01	4.428e+01	36
TopHat *							
Frame Info *							

Obrázek 23: Naměřené hodnoty před ořezání laserového svazku [20]

Name	Value	Units	Mean	Std Dev	Max	Min	Sample Size
Power/Energy *							
Total ISO	643,092.31	cnts	644,297.05	1,861.04	649,409.86	641,398.11	36
Peak ISO	3,248.50	cnts	3,232.51	31.51	3,299.50	3,165.45	36
Min	-4.22	cnts	-7.34	2.12	-4.13	-14.38	36
Spatial *							
Centroid X ISO	1.936381e+03	um	1.936550e+03	3.728956e-01	1.937523e+03	1.935763e+03	36
Centroid Y ISO	1.968851e+03	um	1.969141e+03	4.018633e-01	1.970042e+03	1.968359e+03	36
D4σX ISO	1.121e+02	um	1.124e+02	3.586e-01	1.131e+02	1.115e+02	36
D4σY ISO	1.099e+02	um	1.100e+02	2.576e-01	1.106e+02	1.094e+02	36
Divergence *							
Gaussian *							
Gauss Height Zg	3,097.99	cnts	3,088.35	14.81	3,119.05	3,063.25	36
Dg X	9.849e+01	um	9.889e+01	3.290e-01	9.946e+01	9.822e+01	36
Dg Y	9.770e+01	um	9.782e+01	2.521e-01	9.842e+01	9.727e+01	36
Gauss Centroid X	1.935977e+03	um	1.936134e+03	3.745e-01	1.937115e+03	1.935329e+03	36
Gauss Centroid Y	1.967334e+03	um	1.967630e+03	3.996e-01	1.968526e+03	1.966867e+03	36
Goodness of Fit	0.967		0.968	0.003	0.974	0.963	36
Roughness of Fit	0.119		0.119	0.009	0.135	0.103	36
Δ Centroid X	-4.042e-01	um	-4.158e-01	2.757e-02	-3.444e-01	-4.706e-01	36
Δ Centroid Y	-1.518e+00	um	-1.512e+00	4.290e-02	-1.394e+00	-1.607e+00	36
Δ Centroid	1.571e+00	um	1.568e+00	4.121e-02	1.665e+00	1.455e+00	36
TopHat *							

Obrázek 24: Naměřené hodnoty po ořezání laserového svazku [20]

Příloha C - Norma ISO 14644-1

Norma ISO 14644-1 Klasifikace čistoty vzduchu

Zabývá se klasifikací čistoty vzduchu, kde čistota je stanovena počtem prachových částic v 1 m³. Pro účely klasifikace jsou brány v úvahu jen statistické soubory částic, které mají kumulativní rozdělení rozmezí ležících v intervalu velikosti $(0,5 \leq X < 5)$ μm obsažených v kubickém metru vzduchu. v stejné jako norma FS 209 E, D. [22]

Základní definice:

Čistý prostor

Je prostor, ve kterém je koncentrace částic obsažených ve vzduchu řízena. Tento prostor je konstruován a používán tak, aby se minimalizoval vstup, vytváření a usazování částic uvnitř tohoto prostoru. Rovněž zde musí být podle potřeby řízeny parametry jako teplota, vlhkost a tlak.

Čistá zóna

Je vyhrazený prostor, ve kterém je koncentrace prachových částic řízena. Tento prostor je zkonstruován a používán tak, aby se minimalizoval vstup, vytváření a víření částic uvnitř této zóny. Rovněž zde musí být podle potřeby řízeny i jiné důležité parametry, např. teplota, vlhkost a tlak. Nemusí se jednat o čistý prostor. Instalace čistých prostor nebo jedna či více čistých zón spolu se všemi přidruženými stavebními konstrukcemi, vzduchotechnikou, službami a přívody médií.

Klasifikace

Je úroveň znečištění vzduchu částicemi, která je použitelná na čistý prostor nebo zónu. Vyjadřuje se jako ISO třída N, která reprezentuje maximální dovolené koncentrace částic uvažovaných velikostí.

Částice

Je pevný nebo kapalný objekt, který je zařazen do kumulativního statistického rozdělení s prahem v intervalu od 0,1 μm do 5 μm.

Velikost částice

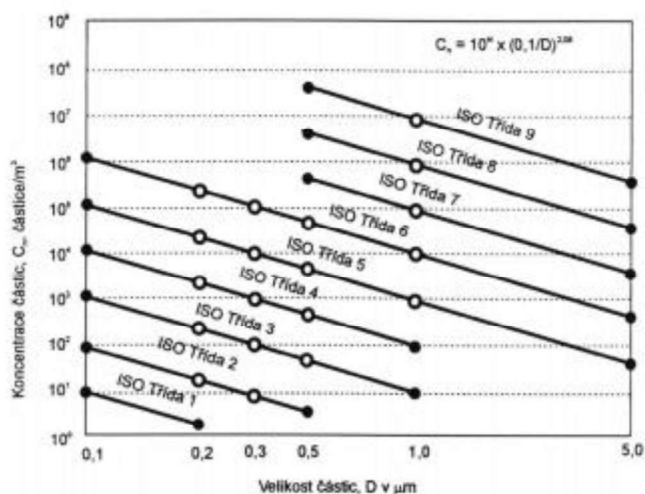
Je průměr částice ve tvaru koule, která v příslušném přístroji na měření částic vyvolá stejnou odezvu, jako částice měřená.

Koncentrace částic

Je počet jednotlivých částic v jednotce objemu vzduchu.

Tabulka 1: Tabulka maximálních koncentrací prachových částic pro jednotlivé klasifikace ISO [22]

Číslo klasifikace ISO (N)	Maximální meze koncentrace prachových částic (počet částic/m ³ vzduchu), jejichž velikost je větší nebo rovná velikosti částice uvedené níže					
	≥ 0.1 μm	≥ 0.2 μm	≥ 0.3 μm	≥ 0.5 μm	≥ 1.0 μm	≥ 5.0 μm
ISO 1	10	2				
ISO 2	100	24	10	4		
ISO 3	1000	237	102	35	8	
ISO 4	10000	2370	1020	352	83	
ISO 5	100000	23700	10200	3520	832	29
ISO 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
ISO 7				352000	83200	2930
ISO 8				3520000	832000	29300
ISO 9				35200000	8320000	293000



Graf 2: Grafické znázornění koncentrace částic pro jednotlivé klasifikace ISO [22]