

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky



Petra ČECHOVÁ

Časově rozlišené měření fluorescence na nanosekundové škále

Molekulární biofyzika

Vedoucí práce:

Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

Olomouc 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Olomouci, 14.5.2011

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu Doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D. za vedení bakalářské práce a čas strávený při konzultacích.

Souhrn

Bakalářská práce představuje základní charakteristiky metod používaných pro časově rozlišené měření fluorescence na nanosekundové škále, popisuje jednotlivé součásti experimentálního uspořádání a matematické modely používané pro vyhodnocení naměřených dat. Ukazuje použití těchto metod na modelových příkladech. Její součástí je software pro zpracování dat získaných při měření v módu TTTR.

Abstract

The bachelor work introduces the basic characteristics of the methods used for nanosecond-timescale time resolved fluorescence measurements, describes the parts of experimental setup and mathematical models used for the data analysis. It demonstrates the usage of this methods by showing model examples. It contains processing software for data obtained in TTTR measurement mode.

Seznam zkratek

ADC	Analog-to-Digital Converter; analogově-digitální převodník
ASE	Asymptotic standard error; asymptotická standardní chyba
IRF	Instrument response function; funkce přístrojové odezvy
SNR	Singal to noise ratio, poměr signál/šum
TAC	Time-to-Amplitude Converter; převodník času na amplitudu
TCSPC	Time correlated single photon counting; časově korelované čítání fotonů
TRES	Time resolved emission spectra; časově rozlišená emisní spektra
TTS	Transit time spread; rozptyl časů letu
TTTR	Time-Tagged Time-Resolved; časově značené, časově rozlišené

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Dynamika fluorescenčních procesů.....	8
2.1. Jabloňského diagram.....	8
2.2. Doba života excitovaného stavu.....	9
2.3. Modely kinetiky dohasínání.....	10
2.3.1. Jednoexponenciální model.....	10
2.3.2. Víceexponenciální model.....	10
2.3.3. Další modely.....	11
2.3.3.1. Gausovské rozložení.....	11
2.3.3.2. Protažené exponenciály.....	11
2.3.4. IRF a konvoluce.....	11
3. Měření kinetiky dohasínání fluorescence metodou korelovaného čítání jednotlivých fotonů.....	12
3.1. Princip metody.....	12
3.2. Významné charakteristiky.....	13
3.2.1. Rozlišení.....	13
3.2.2. Šum.....	13
3.2.3. Frekvence signálu, pile-up efekt.....	14
3.3. Součásti přístroje.....	14
3.3.1. Elektronika.....	14
3.3.1.1. Proces měření.....	14
3.3.1.2. Constant Fraction Discriminator (CFD).....	14
3.3.1.3. Time-to-Amplitude Converter (TAC).....	15
3.3.1.4. Analog-to-Digital Converter (ADC).....	15
3.3.2. Experimentální uspořádání.....	16
3.3.2.1. Obecné vlastnosti.....	16
3.3.2.2. Zdroje excitačního světla.....	16
3.3.2.2.1. Laserové diody, LED.....	16
3.3.2.2.2. Titan-safírový laser.....	16
3.3.2.2.3. Barvivové lasery.....	17
3.3.2.2.4. Pulzní výbojky.....	17
3.3.2.2.5. Synchrotronové záření.....	18
3.3.2.3. Detektory pro TCSPC.....	18
3.3.2.3.1. Fotonásobiče.....	18
3.3.2.3.2. Mikrokanálové destičky.....	18
3.3.2.3.3. Lavinové fotodiody.....	18
3.4. Metody vyhodnocování dat.....	19
3.4.1. Metoda nejmenších čtverců.....	19
3.4.2. Autokorelační funkce.....	19
3.4.3. ASE.....	20
3.4.4. Support plane.....	20
3.4.5. Bootstrap.....	21
3.5. Pokročilejší metody akvizice dat.....	21
3.5.1. TRES.....	21
3.5.2. Měření v TTTR módu.....	21
4. Materiál a metody.....	22
4.1. Software pro vyhodnocení dat z měření v TTTR módu.....	22
5. Výsledky a diskuze.....	25
5.1. Dohasínání kinetiky fluorescence.....	25
5.2. TRES.....	29
5.3. TTTR.....	30

6. Závěr.....	37
7. Reference.....	38
Přílohy.....	39

1. Úvod

Fluorescence je jev, jehož sledování se dnes využívá v mnoha biologických, biochemických či medicínských aplikacích, ať už se jedná o vlastní fluorescenci zkoumané látky, nebo o vzorek označený fluorescenčním barvivem. Časově rozlišené měření, na rozdíl od kontinuálního měření, přináší kromě informace o intenzitě a vlnové délce emitovaného světla i znalost toho, jak rychle po vybuzení krátkým pulzem dochází k dohasínání fluorescence.

Díky tomuto „novému“ parametru, nazývanému doba života, jsme schopni například rozlišit komponenty, které emitují na podobné vlnové délce, ale s jinou rychlostí dohasínání (například dvě aminokyseliny umístěné v různých částech molekuly), rozlišit statické a dynamické zhášení fluorescence nebo sledovat relaxace molekuly. Doba života také obvykle není závislá na koncentraci fluoroforu, tudíž poskytuje spolehlivější informaci o jeho okolí, než pouhé měření intenzity.

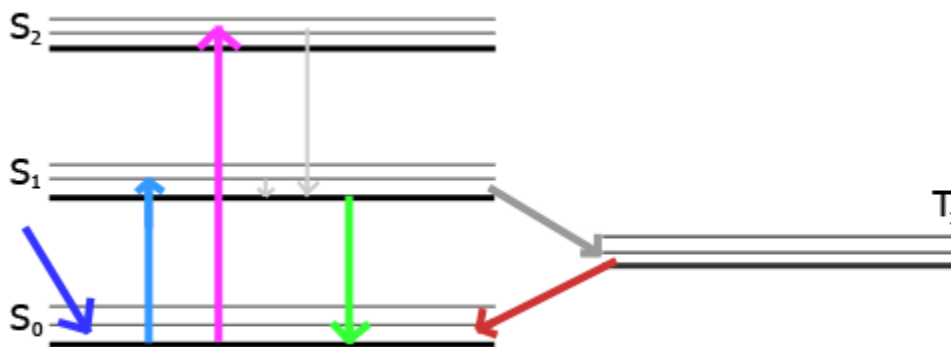
Cílem této práce je představit základní metody používané při časově rozlišeném měření, jejich experimentální uspořádání a způsoby vyhodnocení získaných dat a prakticky ukázat použití těchto metod na modelových příkladech.

2. Dynamika fluorescenčních procesů

2.1. Jabloňského diagram

Základním schématem používaným k popisu fluorescence je tzv. Jabloňského diagram, který zobrazuje možné přechody molekuly mezi jednotlivými energetickými hladinami při interakci se světlem.

Po absorpci světla dochází k excitaci fluoroforu na některou z vyšších elektronových a obvykle i vibračních hladin, následně však dochází k relaxaci molekuly na nejnižší vibrační hladinu elektronového stavu S_1 (vnitřní konverze). Tento proces je velmi rychlý (10^{-12} s), takže k němu dochází před samotnou fluorescencí. Z této hladiny potom molekula přechází zpět do základního stavu za uvolnění energie buď nezářivými procesy, nebo zářivě fluorescencí.



Obr. 1: Jabloňského diagram – tmavě modrá šipka znázorňuje excitační impuls, světle modrá a fialová přechod elektronů na vyšší energetické hladiny, světle šedé relaxace na nejnižší vibrační hladinu elektronového stavu S₁, zelená fluorescenci. Tmavě šedá intersystémovou konverzi a červená fosforescenci.

V některých molekulách může dojít k intersystémové konverzi ze singletní hladiny (S₁) na energeticky nižší tripletní hladinu (T₁). Tento proces je o několik řádů pomalejší než fluorescence, protože při něm dochází k překlopení spinu a přechod z tripletní hladiny (T₁) na základní singletní (S₀) je spinově zakázaný. Vyzáření světla z tripletní hladiny se nazývá fosforescence a je v porovnání s fluorescencí posunuta k červené oblasti spektra.

(Lakowicz 2006, s. 5)

2.2. Doba života excitovaného stavu

Průměrný čas, který fluorofor stráví v excitovaném stavu se nazývá doba života excitovaného stavu a označuje τ . Je to statistická veličina a emise fotonu je náhodná událost, tudíž všechny fluorofory neemitují foton v době rovné době života. Závislost počtu emitovaných fotonů na času od excitace je zaznamenána experimentálně jako křivka dohasínání intenzity a jejím prokládáním matematickými modely dohasínání lze poté získat hodnotu doby života, případně poměry jednotlivých složek dohasínání.

(Lakowicz 2006, s. 99)

2.3. Modely kinetiky dohasínání

2.3.1. Jednoexponenciální model

Při vyhodnocování dat získaných TCSPC měřeními dochází k prokládání histogramu teoreticky předpokládaným tvarem křivky dohasínání. V případě excitace fluoroforu ideálním δ -pulssem dochází k depopulaci excitovaného stavu podle vztahu

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(k_{zár} + k_{nezár})n(t)$$

kde $k_{zár}$ je rychlostní konstanta zářivých, $k_{nezár}$ nezářivých přechodů a $n(t)$ počet excitovaných molekul v čase t . Emise fotonu probíhají náhodně a v daném časovém intervalu má každý excitovaný fluorofor stejnou pravděpodobnost emise fotonu, takže řešení této diferenciální rovnice bude ve tvaru

$$n(t) = n_0 e^{-t(k_{zár} + k_{nezár})}$$

V případě, že vezmeme intenzitu fluorescence úměrnou počtu excitovaných molekul, můžeme tento vztah přepsat do tvaru

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

kde $\tau = \frac{1}{k_{zár} + k_{nezár}}$ je doba života excitovaného stavu a I_0 intenzita pro $t=0$.

(Lakowicz 2006, s. 99)

2.3.2. Víceexponenciální model

V systémech, kde se nachází více fluorescenčních komponent (například protein s několika tryptofany), je výsledná intenzita dána součtem příspěvků od jednotlivých komponent.

V matematickém vyjádření je pak

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

kde τ_i je doba života i -té složky a A_i je preexponenciální faktor určující její poměrné zastoupení.

(Lakowicz 2006, s. 101-103)

2.3.3. Další modely

2.3.3.1. Gausovské rozložení

Tento model, využívaný např. pro heterogenní vzorky, předpokládá, že střední doba života excitovaného stavu molekul má gaussovské rozložení okolo určité hodnoty τ .

$$I(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \rho(\tau) e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} d\tau$$

Pro

$$\rho(\tau) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{A_i}{(\sigma_i(2\pi)) \left(\frac{1}{2}\right)} \right) e^{\left(\frac{-1}{2} \left(\tau - \frac{\tau_i}{\sigma_i}\right)^2\right)} \quad \text{a} \quad \sigma_i = \frac{\Delta_{(FWHM)_i}}{(8\ln 2) \left(\frac{1}{2}\right)},$$

kde A_i je poměrné zastoupení i -té složky, τ_i její doba života a Δ_{FWHM_i} pološířka jejího rozptylu. (FluoFit : User's manual and technical data.)

2.3.3.2. Protážené exponenciály

Tento model fituje naměřená data pomocí souborem protažených („stretched“) exponenciálních funkcí podle vztahu

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)^{\beta_i}},$$

kde A_i je faktor určující poměr jednotlivých složek, τ_i jejich dobu života a β_i je parametr popisující jejich rozložení, kdy při $\beta = 1$ je fit ekvivalentní víceexponenciálnímu a pro $\beta \sim 0$ popisuje nekonečně široké rozložení.

(FluoFit : User's manual and technical data.)

2.3.4. IRF a konvoluce

Výše zmíněné modely dohasínání platí za předpokladu excitace vzorku δ -pulsem (excitačním pulsem se zanedbatelnou šířkou v porovnání s dobou dohasínání) a ideální odezvou detektoru. V reálných případech je nutno vzít v potaz také funkci přístrojové odezvy (instrument response function, IRF), což je nejuzší časový profil, který může být daným přístrojem změřen. K jeho

zjištění se používá například vzorek, který pouze rozptyluje světlo. Vzhledem k tomu, že rozptyl probíhá o několik řádů rychleji, než fluorescence, můžeme s dobrým přiblížením považovat jeho $\tau \rightarrow 0$.

Reálný excitační puls si ovšem můžeme představit jako vzniklý složením postupných δ -pulsů s různými amplitudami. Každý z těchto pulsů pak vybudí fluorescenci vzorku s intenzitou závislou na jeho amplitudě. Pro čas t je pak intenzita vybuzená k -tým δ -pulem (v čase t_k) rovna

$$I_k(t) = L(t_k) I(t - t_k) \Delta t \quad (t > t_k),$$

kde $L(t_k)$ je intenzita excitačního pulsu a výraz $(t - t_k)$ znázorňuje, že před časem excitace t_k nedochází žádné emisi. Naměřená křivka intenzity dohasínání pak odpovídá součtu jednotlivých dohasínání vybuzenými různými δ -pulsy v různý čas, takže pro čas t_k platí:

$$N(t_k) = \sum_{t=0}^{t=t_k} I(t_k) = \sum_{t=0}^{t=t_k} L(t_k) I(t - t_k) \Delta t$$

a pro malé hodnoty Δt se tento vztah dá převést na takzvaný konvoluční integrál

$$N(t) = \int_0^t L(t') I(t - t') dt'.$$

Účelem rekonvoluce je tedy ze znalosti IRF proložit naměřená data některým z modelů dohasínání, tak, aby pro vypočtené parametry (τ , A_i , ...) byl rozdíl naměřených a vypočtených hodnot co nejmenší.

(Lakowicz 2006, s. 103 -107)

3. Měření kinetiky dohasínání fluorescence metodou korelovaného čítání jednotlivých fotonů

3.1. Princip metody

Metoda časově rozlišeného čítání fotonů (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) je založena na detekci jednotlivých fluorescenčních fotonů, měření jejich doby letu a následné rekonstrukci tvaru původní křivky dohasínání.

Základním předpokladem je nízká pravděpodobnost detekce více než jednoho fotonu na jeden excitační puls. Detekovaný signál je pak série jednofotonových impulsů s periodou několikrát menší (1-10%) než perioda excitací.

Při dopadu fotonu na detektor dochází ke změření času od excitačního pulsu po detekci a jeho zaznamenání do histogramu (počet fotonů pro jednotlivé kanály časů příletu od excitace). Pro velkém množství cyklů a dostatečné množství kanálů pak histogram odpovídá původnímu tvaru dohasínání fluorescence.

(Becker 2008., s. 29-30)

3.2. Významné charakteristiky

3.2.1. Rozlišení

Na rozdíl od analogových měření není u TCSPC rozlišení omezeno šířkou odezvy detektoru na jeden foton, ale na schopnosti detektoru určit přesný čas příletu jednotlivých fotonů. Tato schopnost je závislá na tom, jak moc se od sebe liší doby reakce detektoru na různé fotony. Tato charakteristika, nazývaná rozptyl dob letu (transit time spread, TTS), bývá typicky o řád menší, než odezva detektoru na jeden foton, tudíž se při použití daného detektoru použitého při měření v módu čítání fotonů dá dosáhnout desetkrát větší přesnosti než při analogovém měření.

Protože vyhodnocování výsledků měření probíhá pomocí prokládání získaných dat matematickým modelem, lze tak, při dostatečném množství naměřených fotonů identifikovat i komponenty s kratší dobou života, než šířka samotné IRF.

(Becker 2008., s. 31)

3.2.2. Šum

Přestože je zesilování signálu na detektoru fotonů založeno na náhodných procesech emise elektronů, a tudíž vzniká rozdíl mezi amplitudami signálů pro různé fotony, při měření pomocí TCSPC je každý foton počítán se stejnou vahou, a tudíž šum detektoru celkový poměr signál/šum neovlivňuje. I dalšími parametry (šířka IRF, nevýraznost signálu pozadí, šířka jednotlivých časových kanálů) se TCSPC blíží k ideálnímu případu, pro který platí, že poměr signál/šum (signal-to-noise ratio, SNR) je dán poissonovským rozdělením, tedy

$$SNR = \sqrt{N},$$

kde N je počet detekovaných fotonů.

(Becker 2008., s. 32)

3.2.3. Frekvence signálu, pile-up efekt

Pile-up efekt je jev, který nastává v případě, kdy je v jednom emisním pulzu emitován více než jeden foton. Druhý foton (a případně další) pak dorazí na detektor v takzvané mrtvé době („dead time“), kdy je zpracováván signál z prvního fotonu, a není zaznamenán. Naměřené dohasínání je pak zdánlivě rychlejší, než ve skutečnosti. Pro minimalizaci tohoto efektu by měla být frekvence dopadu emisních fotonů zhruba 1-10% frekvence pulzů zdroje.

(Lakowicz 2006, s. 116)

3.3. Součásti přístroje

3.3.1. Elektronika

3.3.1.1. Proces měření

Samotné měření začíná excitačním pulsem (start signál), který zaznamená Constant Fraction Discriminator (CFD). Tato součástka slouží k omezení vlivu fluktuací signálu způsobených šumem zdroje nebo různým zesílením fotonů na detektoru. Druhý CFD je napojen na detektor emitovaných fotonů (fotodiodu nebo fotonásobič) a poskytuje stop signál.

Tyto dva signály zpracovává time-to-amplitude converter, TAC, ve kterém po dobu mezi start a stop impulzem dochází k nárůstu napětí na kondenzátoru, které pak odpovídá době letu emitovaného fotonu vůči excitačnímu pulsu.

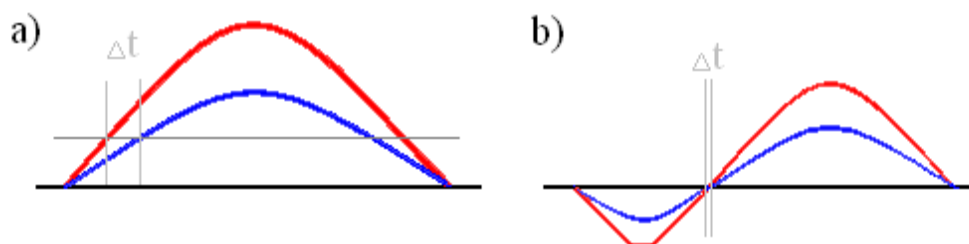
Signál z TAC je pak zesílen a poslán do Analog-to Digital Converter, kde dochází k jeho rozdělení do jednotlivých časových kanálů a přiřazení místa v paměti signálů jednotlivých fotonů, které jsou pak použity pro vytvoření histogramu pro jednotlivé časy letu.

(Becker 2008., s. 34-35)

3.3.1.2. Constant Fraction Discriminator (CFD)

Po dopadu fotonu na detektor dochází k několikanásobné emisi elektronů, které poté dopadnou na detektorovou anodu. Protože je však proces sekundární emise elektronů náhodný, dochází k uvolnění různého množství elektronů pro různé fotony. Pro TSCPC je však nutné počítat jednotlivé fotony se stejnou váhou a zároveň s co největší možnou přesností doby doletu. V případě použití takzvaných „leading-edge“ diskriminátorů (náběhové hrany), které zaznamenávají překročení určité hodnoty proudu, by u pulsů s různou amplitudou docházelo k odchylkám

na základě různé „příkrosti“ pulsů s různou amplitudou. Constant Fraction Diskriminátor („rozlišovač konstantního poměru“) oproti tomu pracuje tak, že rozdělí puls z detektoru na dva (v určitém poměru, který je pro všechny pulsy stejný) a posléze jeden zpozdí a druhý převrátí. Po jejich opětovném složení dojde k vytvoření nulového bodu, jehož pozice je nezávislá na amplitudě a proto určení jeho pozice v čase je zatíženo menší odchylkou (zhruba dvacetkrát), než v případě použití „leading-edge“ diskriminátorů.



Obr 2: Porovnání „leading-edge“ (a) a Constant Fraction (b) diskriminátoru. (Lakovicz 2006, s. 114)

3.3.1.3. Time-to-Amplitude Converter (TAC)

Po obdržení start signálu (od zdroje excitačního pulzu) dochází v Time-to-Amplitude Converter („převodník času na amplitudu“) k lineárnímu nárůstu napětí, až po okamžik obdržení stop signálu, po kterém napětí zůstává konstantní. Protože při mnoha excitačních pulsech není emitován foton (a tudíž nedojde k zaznamenání stop signálu), musí být k TAC připojen další okruh, který v případě překročení určitého napětí TAC vypne a resetuje. Při vysokých frekvencích zdroje excitačního světla (50-100 MHz) by však mohlo docházet k tomu, že doba resetu bude stejná, nebo delší než perioda excitačních pulsů, tudíž by došlo k zahlcení TAC resety a nemohlo by dojít k zaznamenání signálu emitovaných fotonů. Proto se někdy využívá opačné uspořádání „reversed start-stop“, kdy je jako start signál použitý signál z detektoru a stop signál je následující excitační pulz. K převrácení časové osy pak dochází buď při čtení signálu z ADC, nebo až softwarově při tvorbě histogramu.

(Becker 2008., s. 34-35)

3.3.1.4. Analog-to-Digital Converter (ADC)

Analogově-digitální převodník (Analog-to-Digital Converter, ADC) je součástí převádějící zesílený signál z TAC na záznam v paměti počítače. K tomu se používá pomocného („dithering“)

signálu, který se v analogové podobě přičte k signálu z TAC. Tento spojený signál potom projde konverzí na digitální, poté se od něj odečte pomocný signál v digitální podobě a je mu přidělena pozice v jednom z časových kanálů a paměti.

V některých sestavách je ADC už přímo spojen s TAC a spolu vytváří Time-to-digital Converter, TDC.

(Becker 2008., s. 52, 64)

3.3.2. Experimentální uspořádání

3.3.2.1. Obecné vlastnosti

Stejně jako u jiných měření fluorescence, i pro časově rozlišené měření se využívá takzvané „L- uspořádání“, při kterém dochází k měření fluorescence v pravém úhlu k excitačnímu paprsku. Excitační světlo může procházet filtrem nebo monochromátorem pro zúžení jeho spektrálního profilu, být fokusováno čočkou nebo tlumeno závěrkou. Emitované světlo může být také fokusováno nebo filtrováno monochromátorem, případně polarizačním filtrem. Pro zmírnění efektů vznikajících různě rychlou rotací různě velkých molekul ve vzorku se používají dva polarizační filtry (jeden před vzorkem, jeden za ním) v takzvaném „magickém úhlu“ 54,7°.

3.3.2.2. Zdroje excitačního světla

3.3.2.2.1. Laserové diody, LED

Pulzní laserové diody a LED patří k nejnověji aplikovaným součástkám, které jsou výhodné díky své relativně nízké ceně a snadné obsluze. Díky tomu, že jsou to polovodičové součástky s emisí světla ovládanou napájecím proudem, lze na rozdíl od laserů lehce měnit jejich repetiční frekvenci, až po maximální hodnotu 40 MHz. Laserové diody emitují obvykle na jedné vlnové délce a poskytují pulsy o šířce desítek pikosekund, zatímco LED mají širší spektrální profil a pološířku pulsu v řádu jednotek nanosekund. Oba druhy diod jsou dostupné pro několik vlnových délek, přičemž LED lépe pokrývají ultrafialovou, zatímco laserové diody červenou oblast spektra.

(Lakowicz 2006, s. 108)

3.3.2.2.2. Titan-safírový laser

Titan-safírový laser poskytuje femtosekundové pulsy s primární frekvencí 80 MHz. K jeho provozu je potřeba ještě sytící argonový laser o výkonu jednotek wattů a vlnové délce 514 nm. Výhodou

tohoto laseru je to, že díky vlastnosti titano-safírového krystalu (takzvaný self-mode locking), může být aktivován kontinuálním světlem a sám pak poskytuje světlo pulzní, navíc o vysoké intenzitě. Nevýhodami Ti:Sapph laseru je vysoká primární frekvence pulsů, která musí být snižována pomocí „vybírače“ (pulse picker) za snížení intenzity, a poskytované světlo o dlouhých vlnových délkách (720-1000 nm), takže pro dosažení nižších vlnových délek je potřeba používat frekvenční zdvojovač (na 360-500 nm) či ztrojovač (210-330 nm), což jsou pro takto krátké impulsy poměrně komplikované součástky.

(Lakowicz 2006,s. 109-110)

3.3.2.2.3. Barvivové lasery

Před nástupem LED a laserových diod byly barvivové lasery nejpoužívanějším zdrojem excitací pro TCSPC s pikosekundovými pulsy o frekvencích od kilohertzů až po 80 MHz. Barvivové lasery jsou syceny buď nebo Nd:YAG nebo častěji argonovým laserem, který musí být „mode-locked“, což znamená, že jeho paprsek prochází akusto-optickým modulátorem, který způsobuje interferenci paprsků o několika vlnových délkách na pulzní světlo. Výstup z argonového (Nd:YAG) laseru o vlnové délce 514 nm (532 nm) a frekvenci pulsů 80 MHz poté sytí barvivový laser, který má rezonanční dutinu o stejné délce jako sytící laser. V jeho dutině je umístěný takzvaný „cavity dumper“, akusto-optické zařízení, který je ovládán rádiovým signálem o požadované frekvenci a v požadovaných intervalech odklání paprsek v rezonanční dutině barvivového laseru na hranol, který jej odráží ven. Při tomto procesu nedochází ke ztrátě intenzity, což je výhodné zvláště proto, že světlo z většiny barvivových laserů musí pro dosažení vlnových délek použitelných pro excitaci fluorescence projít frekvenčním zdvojovačem, který má naopak vysoké ztráty.

(Lakowicz 2006, s. 110-112)

3.3.2.2.4. Pulzní výbojky

V dnešní době patří výbojky mezi méně používané zdroje pro časově rozlišená měření kvůli poměrně velké šířce pulsu (2 ns), jeho nižší intenzitě a zvláště frekvenci. Spektrální složení světla z výbojek záleží na plynu, kterým jsou vyplněny (dusík, vodík, deuterium) a jeho tlaku. Hlavní nevýhodou výbojek je nízká maximální repetiční frekvence v řádech kHz, která velmi prodlužuje dobu nutnou pro získání dostatečného množství dat.

(Lakowicz 2006, s. 112)

3.3.2.2.5. Synchrontronové záření

Synchrotron je druh urychlovače částic, ve kterém kolují elektrony o vysokých rychlostech (blízkých rychlosti světla) a při tom vyzařují energii ve formě pulsů světla o různých vlnových délkách. Zřejmou nevýhodou synchrotronu je jeho vysoká cena a náročný provoz, výhodou naopak množství dostupných vlnových délek se stejnou frekvencí a šířkou pulsů.

(Lakowicz 2006, s. 112-114)

3.3.2.3. Detektory pro TCSPC

3.3.2.3.1. Fotonásobiče

Fotonásobiče využívají k detekci fotonů vnějšího fotoelektrického jevu, kdy foton po dopadu na fotokatodu způsobí emisi elektronu. Ten je pak urychlován napětím mezi fotokatodou a dynodou, na níž dojde k sekundární emisi elektronů. Při dopadu na další dynodu dochází k zesílení elektronového svazku, celkem (po dopadu svazku na anodu) v řádech 10^6 - 10^8 . Fotonásobiče jsou dostupné v různých uspořádáních, které zvyšují přesnost měření, nebo umožňují prostorové rozlišení.

(Becker 2008., s. 67)

3.3.2.3.2. Mikrokanálové destičky

Mikrokanálové destičky fungují na podobném principu jako fotonásobiče, jenom místo série dynod obsahují kanálky o velikosti několika mikrometrů, z jejichž stěn dochází pod vlivem vnějšího gradientu napětí k sekundárním emisím elektronů. Díky jejich malé velikosti dochází ke zmenšení rozdílů v době průletu různých elektronů, tudíž i k zvětšení rozlišení (až 25 ps). Pokud je anoda nahrazena anodovou mřížkou, jde dosáhnout i prostorového rozlišení dopadu fotonu.

(Becker 2008., s. 67-68)

3.3.2.3.3. Lavinové fotodiody

Lavinové fotodiody jsou polovodičové součástky využívající vnitřního fotoelektrického jevu, kdy po dopadu fotonu dochází k vytvoření páru elektron-díra. Diody je zapojena v závěrném směru na takové napětí, že elektron uvolněný po dopadu fotonu uvolní lavinovitě další. Aby nedošlo ke spálení diody, je k ní připojený zhasací okruh, který po spuštění lavinového efektu zvyšuje napětí nad kritickou hodnotu. Aktivní plocha lavinových diod je však v porovnání s fotonásobiči a mikrokanálovými destičkami menší (20-150 μm)

(Becker 2008., s. 69-70)

3.4. Metody vyhodnocování dat

3.4.1. Metoda nejmenších čtverců

Slouží k vyhodnocování rozdílu mezi vypočtenou hodnotou $N(t_k)$ a změřenou $N_{\text{exp}}(t_k)$. Pro všechny časy pak získáme parametr kvality fitu vztahem

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{(N_{\text{exp}}(t_k) - N(t_k))^2}{\sigma_k^2}$$

kde σ_k^2 je standardní odchylka pro každý bod (časový kanál). Pro TCSPC na základě poissonovské statistiky platí, že $\sigma_k^2 = N_{\text{exp}}(t_k)$,

takže můžeme psát

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{(N_{\text{exp}}(t_k) - N(t_k))^2}{N_{\text{exp}}(t_k)}$$

Protože samotný χ^2 závisí na množství dat, používá se k vyhodnocování správnosti fitu redukovaný χ^2 :

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu},$$

kde n je počet datových bodů, p počet parametrů a $\nu = n - p$ je počet stupňů volnosti daného systému. U TCSPC je obvykle počet datových bodů daleko větší než počet fitovaných parametrů, takže $n - p$ je přibližně rovno n . Tudíž pokud k χ_R^2 přispívají pouze náhodné chyby, je jeho hodnota blízká jedné.

(Lakowicz 2006, s. 131)

3.4.2. Autokorelační funkce

Pro správný model bez systematických chyb jsou rezidua (rozdíly mezi modelem a naměřenými hodnotami) rozložena náhodně kolem nuly. Tuto náhodnost zkoumá autokorelační funkce, která vyhodnocuje vztah reziduí v jednotlivých kanálech a ověřuje, jestli odchylka v daném kanále předpovídá znaménko odchylky v j -tém kanále za ním.

Vztah pro autokorelační funkci je:

$$C(t_j) = \frac{\frac{1}{m} \sum_{k=1}^m D_k D_{(k+j)}}{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n D_k^2}$$

kde D_k je odchylka v k -tém kanále a D_{k+j} v $k+j$ -tém kanále. Výpočet se obvykle provádí pouze pro polovinu kanálů, takže graf autokorelační funkce má poloviční počet hodnot, než je kanálů v původním histogramu. (Lakowicz 2006, s. 132)

3.4.3. ASE

Základním nástrojem pro odhad intervalu, v němž se s danou pravděpodobností bude nacházet parametr nejlépe odpovídající naměřeným datům (v okolí hodnoty určené fitem) je určení takzvané „asymptotické standardní chyby“ (asymptotic standard error), například pomocí sledování derivací prostoru χ^2 kolem hodnot nejlépe fitujících parametrů. Omezením této metody je to, že platí pouze v případě, kdy jsou všechny parametry na sobě nezávislé.

(Lakowicz 2006, s. 134)

3.4.4. Support plane

Metoda support plane („pomocná rovina“) se používá k přesnějšímu určení možné odchylky fitovaných parametrů, než podle odhadu pomocí asymptotické standardní chyby (ASE). Při této metodě dochází ke zkoumání roviny χ^2_R pomocí drobné změny jednoho z parametrů a zopakování fitu, kterým se mohou pozměnit ostatní parametry. Pokud následná hodnota χ^2_R nepřesahuje určitou hodnotu, daný parametr se opět mírně pozmění a fit se opakuje. Hodnota, pro kterou je nově získané χ^2_R ještě „dostatečně malé“ se určuje takzvané pomocí F_χ statistiky. Ta je znázorněna vztahem

$$F_\chi = \frac{\chi_R^2(par)}{\chi_R^2(min)} = 1 + \frac{p}{v} F(p, v, P)$$

pro nově vypočtenou, $\chi^2_R(par)$, a minimální, $\chi^2_R(min)$, hodnotu χ^2_R , počet parametrů p , počet stupňů volnosti v a $F(p, v, P)$, což je funkce parametrů, stupňů volnosti a pravděpodobnosti. Její hodnoty lze najít v matematických tabulkách. Pro standardní odchylku platí, že pravděpodobnost, že nafilované parametry odpovídají naměřeným datům je 68%, což odpovídá hodnotě $P=0,32$.

(Lakowicz 2006, s. 135)

3.4.5. Bootstrap

Metoda Bootstrap vychází z analýzy chyb pomocí metody Monte Carlo. Vychází z naměřeného souboru dat, přidá náhodně šum (v praxi vezme některé naměřené hodnoty vícekrát) a pak provede fit tohoto nově vytvořeného souboru. Po množství opakování lze určit interval hodnot ve kterém se s danou pravděpodobností nachází nejlepší výsledek fitu.

(FluoFit : User's manual and technical data.)

3.5. Pokročilejší metody akvizice dat

3.5.1. TRES

Metoda TRES (Time-Resolved Emission Spectra, časově rozlišená emisní spektra) využívá měření dohasínání fluorescence na různých emisních vlnových délkách a následného společného vyhodnocování získaného souboru dat. Tato metoda je vhodná například pro sledování relaxačních procesů látek, u kterých probíhají pomaleji, než v obvyklých řádech 10^{-12} s. Pokud je rychlost relaxací ve stejném řádu jako střední doba života fluorescence, dochází ke změně rychlosti dohasínání pro různé vlnové délky. V krátkovlnné část spektra dochází k dohasínání rychleji, protože je daná vibrační hladina depopulována jak fluorescencí, tak relaxací, zatímco v dlouhovlnné oblasti je dohasínání pomalejší, protože před emisí fotonu musí nejprve dojít k jeho relaxaci.

(Lakowicz 2006, s. 236-240)

3.5.2. Měření v TTTR módu

Při měření v módu TTTR (Time-Tagged Time-Resolved) dochází kromě zaznamenání informace o době letu fluorescenčního fotonu (využívané při tvorbě histogramu) také z určení času příletu fotonu od počátku experimentu („time tag“). Na rozdíl od standardního TCSPC měření nedochází k zaznamenání pouze rozložení fotonů do jednotlivých časových kanálů, ale k uložení doby letu pro každý foton zvlášť. Kvůli většímu objemu dat získaných při detekci jednoho fotonu je k měřicí sestavě připojena ještě vyrovnávací paměť, která je pak v režimu FIFO (First In First Out) přepisována do paměti počítače. Tento způsob záznamu dat je sice technicky náročnější, ale otevírá nové možnosti pro následnou analýzu dat.

(Becker 2008., s. 45-46)

4. Materiál a metody

Všechna měření byla provedena na spektrometru FluoTime200 se softwarem pro akvizici dat PicoHarp 300 (PicoQuant, Německo).

Pro měření kinetiky dohasínání fluorescence a TRES byla zdrojem excitačního světla laserová dioda o emisní vlnové délce 298 nm (repetiční frekvence 10MHz) a polarizační filtry byly v magickém úhlu 54,7°. Funkce přístrojové odezvy (IRF) byla naměřena na roztoku LUDOXu při 298 nm. Vyhodnocení probíhalo pomocí softwaru FluoFit 4.1 (PicoQuant, Německo). Měřeným vzorkem byl 25 μ M roztok HSA v 10mM TRIS a 100mM NaCl s pH =7,5.

Při měření kinetiky dohasínání byl emisní monochromátor nastaven na vlnovou délku 350 nm, měření bylo zastaveno při dosažení 10 000 fotonů v jednom časovém kanále a rozlišení histogramu bylo 32 ps/kanál.

Při měření v módu TRES byly proměřeny emisní vlnové délky 320-420 nm s krokem 10 nm a dobou měření 180 s na jednu vlnovou délku. Rozlišení histogramu bylo 32 ps/kanál.

Pro měření v módu TTTR byl jako vzorek použit list tabáku, který byl v nádobě s vodou ponechán po dvacet minut ve tmě a poté z něj byly postupně nastříhány kousky o velikosti asi 1x2 cm, které byly na držáku vloženy do kyvety. Měření probíhalo 5s, se zapnutím laseru až po začátku měření. Jako zdroj sloužila laserová dioda o vlnové délce 445 nm (repetiční frekvence 20 MHz), emisní monochromátor byl nastaven na 685 nm. Osvětlená část listu byla asi 1mm², při výkonu zdroje 1,8mW. Vyhodnocení probíhalo pomocí vlastního programu, který je schématicky popsán v následující sekci a jehož celý text je přiložen v příloze. Polarizační filtry byly v magickém úhlu.

4.1. Software pro vyhodnocení dat z měření v TTTR módu

Software se spouští v programu Matlab a tvoří jej dva programy. K vyhodnocení dat získaných v měření slouží ten s názvem ttr.m. V prvním kroku uživatel pomocí dialogového okna zvolí soubor .pt3 získaný měřením v módu „T3“ pomocí software PicoHarp 300. Z tohoto souboru jsou pak přečteny údaje o času letu a času od počátku experimentu, které jsou zapsány do matice A1. V „Command Window“ jsou vypsány základní informace o měření – název souboru, době měření, rozlišení, celkový počet fotonů, atp.

Následně dojde (pomocí matice A1) k vytvoření „histogramové“ matice B, jejíž počet řádků je dán vztahem $\text{syncperiod}/\text{Resolution}$, tj perioda impulsů zdroje/rozlišení. Jednotlivé fotony jsou pak rozděleny do jednotlivých časových kanálů – řádků matice odpovídajících celočíselnému základu podílu jejich doby letu a rozlišení. Ve druhém sloupci matice B je počet fotonů v daném řádku.

I-tý foton z matice A1 je tak do j-tého řádku matice B umístěn způsobem:

$$j = \text{floor}(A1(i, 1) / \text{Resolution}) \quad (\text{určení čísla řádku})$$

$$B(j, 1) = j * \text{Resolution} \quad (\text{výpočet času letu pro daný řádek})$$

$$B(j, 2) = B(j, 2) + 1 \quad (\text{přičtení fotonu})$$

Poté je nalezeno maximum „histogramu“ a jemu odpovídající čas (F).

V dalším dialogovém okně je uživatel požádán o vložení velikosti časového intervalu ns. Pro každý z těchto intervalů je poté spočítána střední doba života, intenzita a konstanta zářivých přechodů. Je nutno mít na paměti, že nejmenší možné rozlišení závisí na celkovém počtu fotonů.

Samotný výpočet probíhá v matici C, který je nejprve naplněna z matice A1 způsobem

$$A1(i, 2) < k * \text{intcas} \quad (\text{určení do kterého intervalu daný foton patří})$$

$$C(k, 1) = k * \text{intcas} \quad (\text{výpočet času od počátku pro daný interval})$$

$$C(k, 2) = C(k, 2) + 1 \quad (\text{přičtení fotonu})$$

$$C(k, 3) = C(k, 3) + A1(i, 1) \quad (\text{přičtení času letu})$$

Ve třetím sloupci matice C je teď součet časů letu, od kterého je v dalším kroku odečten nejčastěji se vyskytující čas letu („maximum histogramu“ z matice B) a poté je spočítána doba života na základě vztahu:

$$\tau = \frac{\left(\sum_{i=1}^N n_i t_i \right)}{\sum_{i=1}^N n_i},$$

kde n_i je intenzita (počet fotonů) a t_i čas letu. Čtvrtý sloupec matice C tvoří konstanta zářivých přechodů získaná vztahem

$$K = \frac{\tau}{\sum_{i=1}^n n_i}$$

a pátý sloupec je tvořen hodnotami τ *intenzita, které jsou poté použity pro získání průměrných hodnot pro více souborů dat.

Poté je pomocí průměrné intenzity za první 0,2s (doba před zapnutím laseru v průběhu experimentu) matice C „ořezána“ o šum na počátku experimentu za vytvoření matice D, která je pak zapsána do textového souboru ve stejné složce a se stejným názvem, jako soubor .pt3 získaný měřením a jednotlivé sloupce jsou vykresleny v grafu.

Pro vytváření průměrů jednotlivých veličin z více měření se používá druhý program (scitac.m), který spočítá vážený průměr středních dob života a aritmetický průměr intenzit, konstant zářivých přechodů a hodnot τ *intenzita pro případné další průměrování výsledků. Na závěr vypíše výsledky do souboru vysledky.txt v aktivní složce Matlabu. (Tudíž je v případě několikanásobného vyhodnocování tento nejprve soubor přemístit nebo přejmenovat). Tento program je konstruován na zprůměrování deseti souborů, v případě jejich menšího počtu dojde při zavření dialogového okna vyzývajícího k vložení souboru k vložení nulových hodnot.

Celý proces je poměrně výpočetně náročný počítače a v případě většího rozlišení i časově náročný.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Dohasínání kinetiky fluorescence

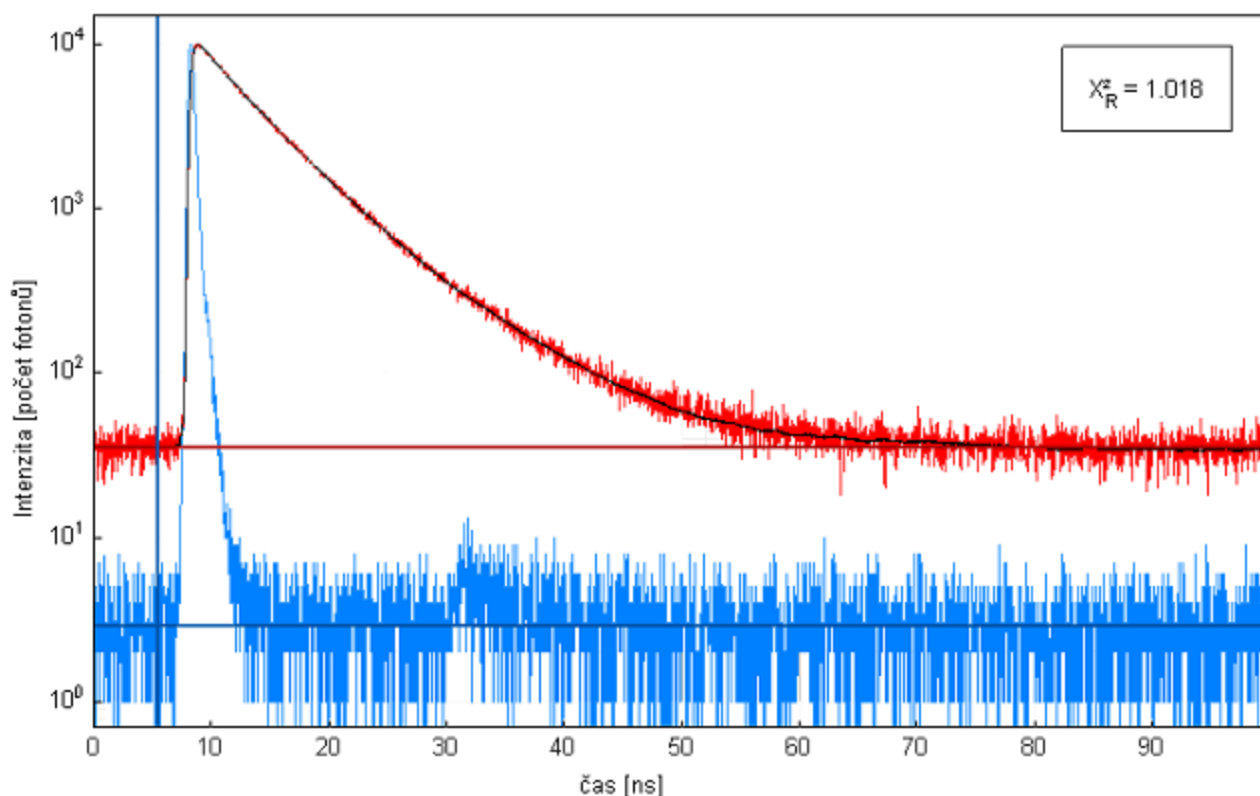
HSA (human serum albumin) je protein získaný z lidské krevní plazmy, obsahující jeden tryptofan.

Dohasínání kinetiky HSA bylo naitováno funkcí

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{\frac{-(t-t')}{\tau_i}} dt',$$

se třemi složkami o středních dobách života $\tau_1 = 0,856$ ns, $\tau_2 = 4,334$ ns, $\tau_3 = 7,694$ ns a preexponenciálních faktorech (odpovídající počtu fotonů, kterými daná složka přispěla do celkové intenzity fluorescence) $A_1 = 1452$, $A_2 = 6705,9$, $A_3 = 4837,4$. χ^2_R pro ten to fit je 1,018.

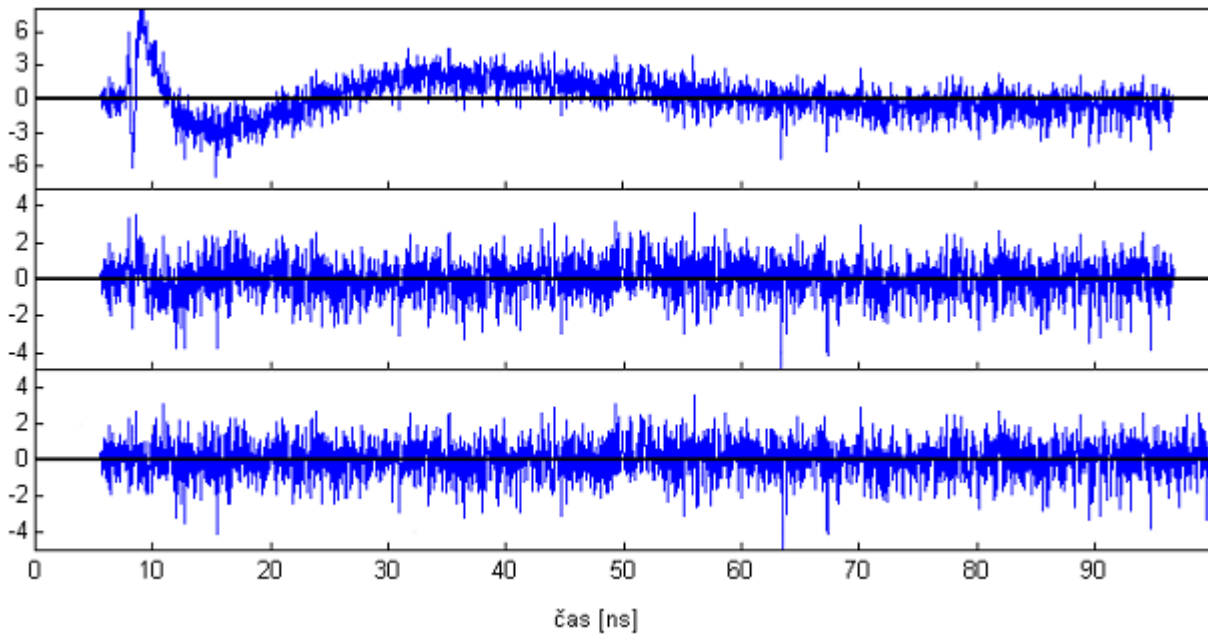
Obrázek 3 ukazuje průběh dohasínání a IRF pro tento fit.



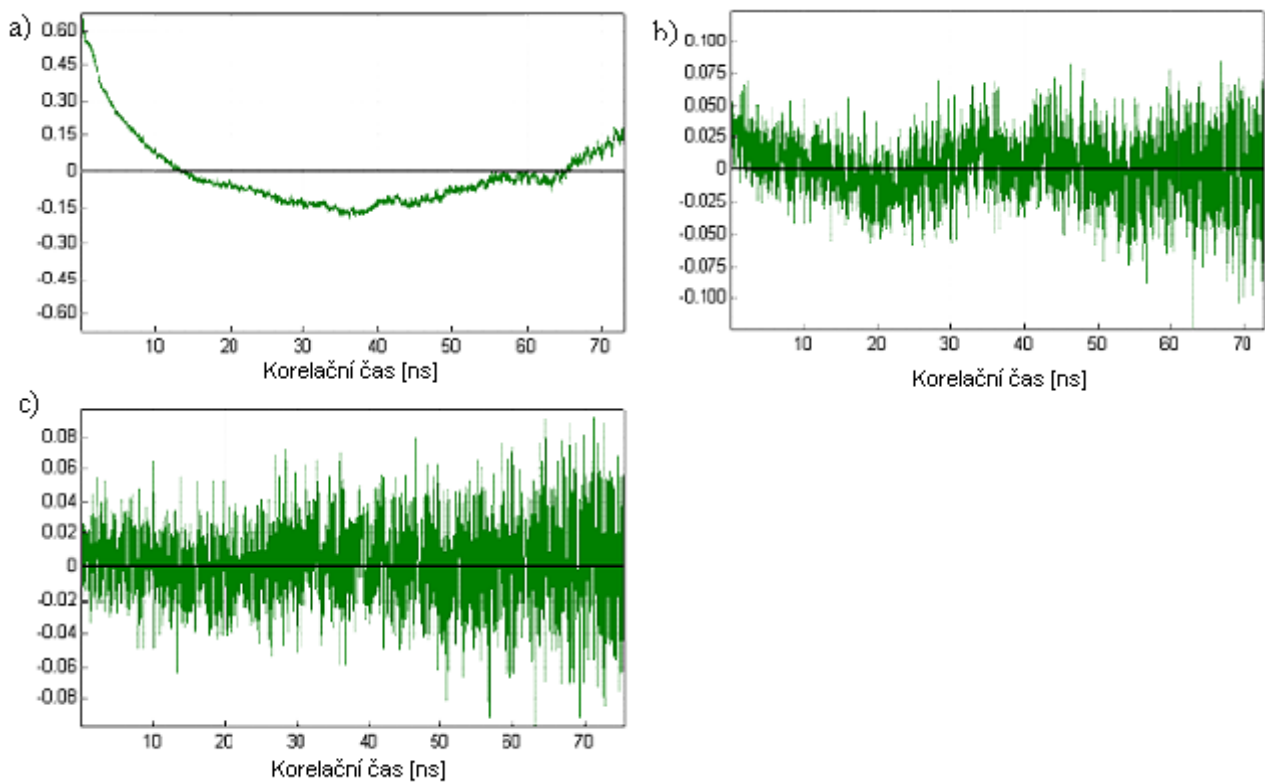
Obr. 3: Dohasínání HSA (červená) s IRF (světle modrá) pro tříexponenciální model.

Tříexponální model byl zvolen, protože jedno- a dvouexponenciální dostatečně nevyhovovaly experimentálním datům. Na obr. 4 jsou porovnána rezidua pro tyto tři modely, se zřetelnými odchylkami od požadovaného rovnoměrného rozložení kolem nuly pro jedno- a dvojexponenciální fit. Také z porovnání autokorelačních funkcí (obr. 5) je zřejmé, že jedno- a dvojexponenciální model

mají daleko větší rozptyl odchylek než tříexponenciální. χ^2_R pro jednoexponenciální model byl 3,005 a pro dvouexponenciální 1,054.



Obr 4: Rezidua pro jednoexponenciální (nahore), dvouexponenciální (uprostřed) a tříexponenciální model dohasínání HSA



Obr 5: Porovnání autokorelačních funkcí pro jednoexponenciální (a), dvouexponenciální (b) a tříexponenciální (c) dohasínání HSA

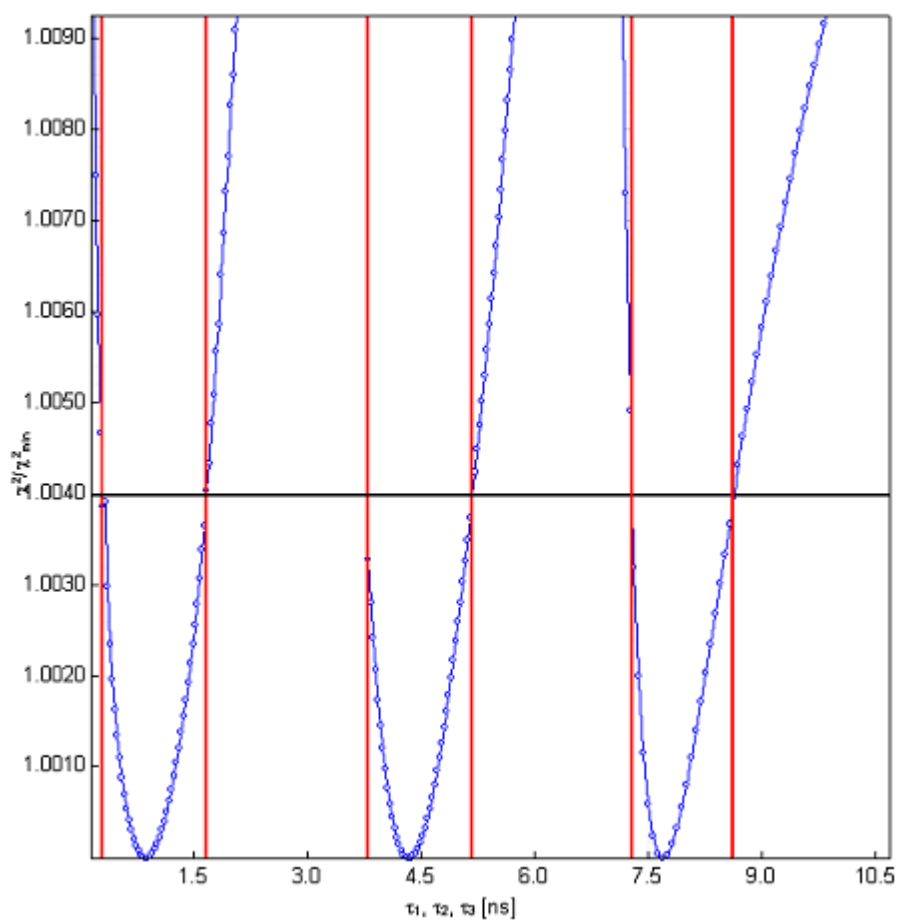
K zjištění odchylek v tříexponenciálním modelu byly použity tři metody - ASE, Support plane a Bootstrap, jejich porovnání je v tabulce 1.

Tabulka 1: Porovnání odchylek pro různé metody jejich získání

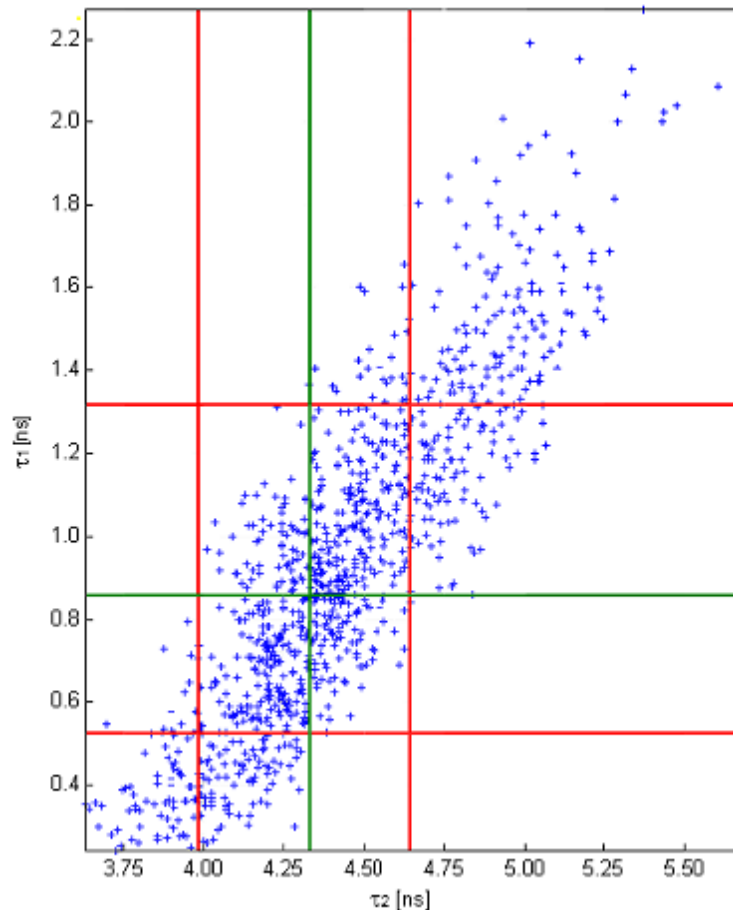
parametr	Hodnota [ns]	odchylky ASE [ns]		odchylky Support Plane [ns]		odchylky Bootstrap [ns]	
τ_1	0,856	-0,202	0,202	-0,567	0,808	-0,333	0,458
τ_2	4,334	-0,053	0,053	-0,531	0,844	-0,348	0,315
τ_3	7,694	-0,056	0,056	-0,403	0,937	-0,213	0,299

Můžeme vidět, že odchylky získané pomocí ASE jsou několikrát menší, než ty získané pomocí jiných metod, tudíž jsou to hodnoty spíše pouze orientační. Pro přesnější určení odchylek je výhodnější použít metody Support Plane nebo Bootstrap, které mohou také odhalit, pokud se parametry nalézají pouze v lokálním minimu χ^2_R . U parametru τ_1 je také vidět, že odhadované odchylky jsou vzhledem jeho hodnotě poměrně velké, což je dáno relativně malým počtem fotonů přispívajících k této komponentě.

Obr. 6 a 7 ukazují výsledky analýzy odchylek parametrů pomocí metody Support Plane, respektive Bootstrap graficky. Obr 7 pak jasně ukazuje, že parametry fitu nejsou zcela nezávislé.



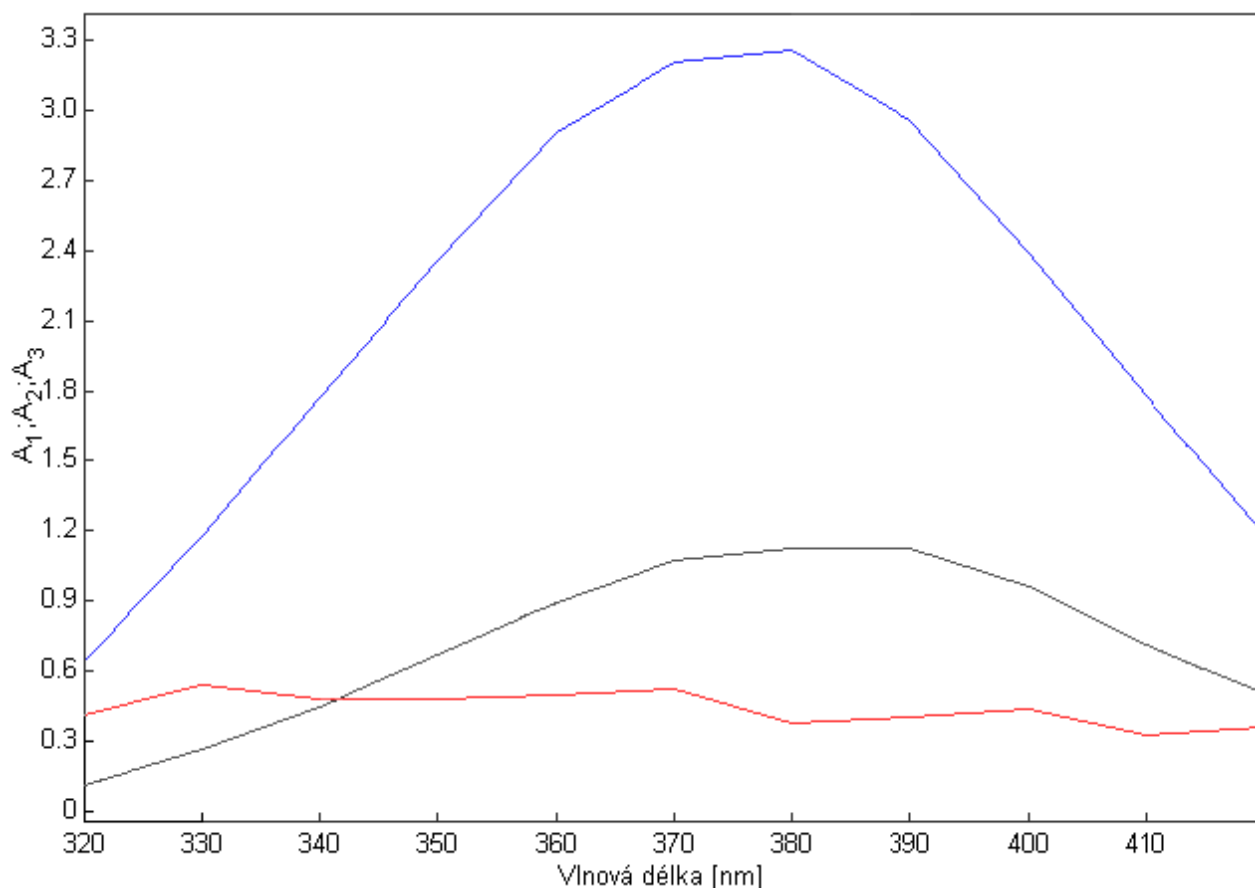
Obr 6: Výsledky analýzy chyb pomocí metody Support plane pro parametry τ_1 , τ_2 a τ_3 . Šedá čára znázorňuje zvolenou hodnotu poměru pozměněné a minimální hodnoty χ^2_R a červené čáry pak odchylky pro jednotlivé střední doby života.



Obr 7: Výsledky analýzy provázanosti parametrů pomocí metody Bootstrap pro parametry τ_1 a τ_2 . Zeleně jsou vyznačeny hodnoty nejlepšího fitu, červeně jejich odchylky.

5.2. TRES

Při vyhodnocování dat získaných v módu TRES bylo využito funkce globálního fitu – tj některé parametry (v tomto případě střední doby života $\tau_1 = 0,856$ ns, $\tau_2 = 4,334$ ns, $\tau_3 = 7,694$ ns) jsou považovány za konstantní pro všechny měřené vlnové délky. Maximum emisního spektra první komponenty je při vlnové délce 380 nm, druhé komponenty při 390 nm a třetí komponenty při 330 nm. Těžiště jednotlivých emisních spekter jsou 373 nm, 378 nm a 362 nm. Nekorigovaná emisní spektra jsou zobrazena na obr 8.



Obr 8: Emisní spektra jednotlivých komponent (A_1 modrá, A_2 černá, A_3 červená)

5.3. TTTR

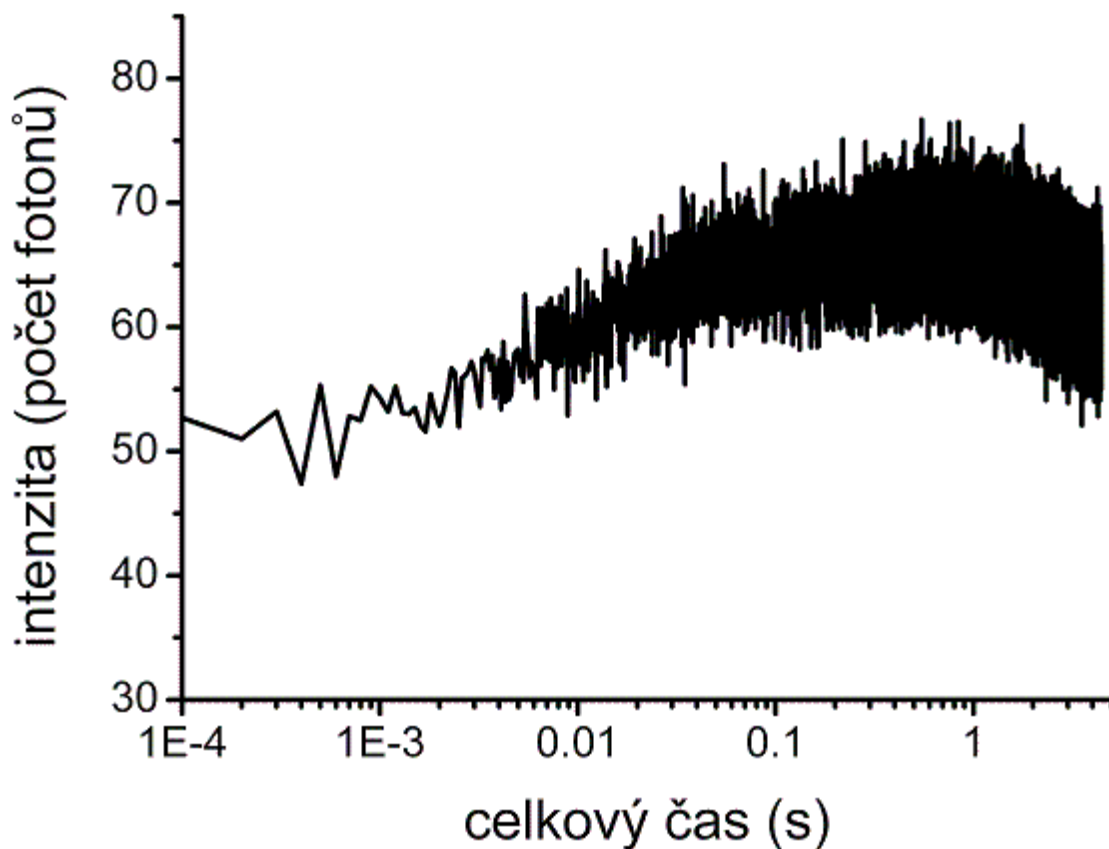
Po osvětlení rostliny předtím ponechané ve tmě dochází k fluorescenčnímu indukčnímu jevu, pro který je charakteristická takzvaná O-J-I-P křivka. Tato křivka znázorňuje postupný nárůst fluorescence od počáteční hodnoty intenzity (O) po její maximum (P, 1s), přičemž body J (1ms) a I (10ms) označují lokální zastavení nárůstu intenzity odpovídající přesunům náboje ve fotosyntetických centrech.

Nárůst z počáteční hodnoty O na hodnotu J odpovídá akumulaci redukováného chinonu (označovaný Q_A , primární stabilní akceptor elektronů ve fotosystému II). Z něj pak elektrony přechází na plastochinon, (Q_B), který se uvolňuje do do prostoru tylakoidní membrány. Akumulaci jeho redukované formy (zároveň s redukováným Q_A) odpovídá nárůst mezi hodnotami J a I, zatímco nárůstu mezi hodnotami I a P odpovídá další redukci plastochinonu na Q_B^{2-} .

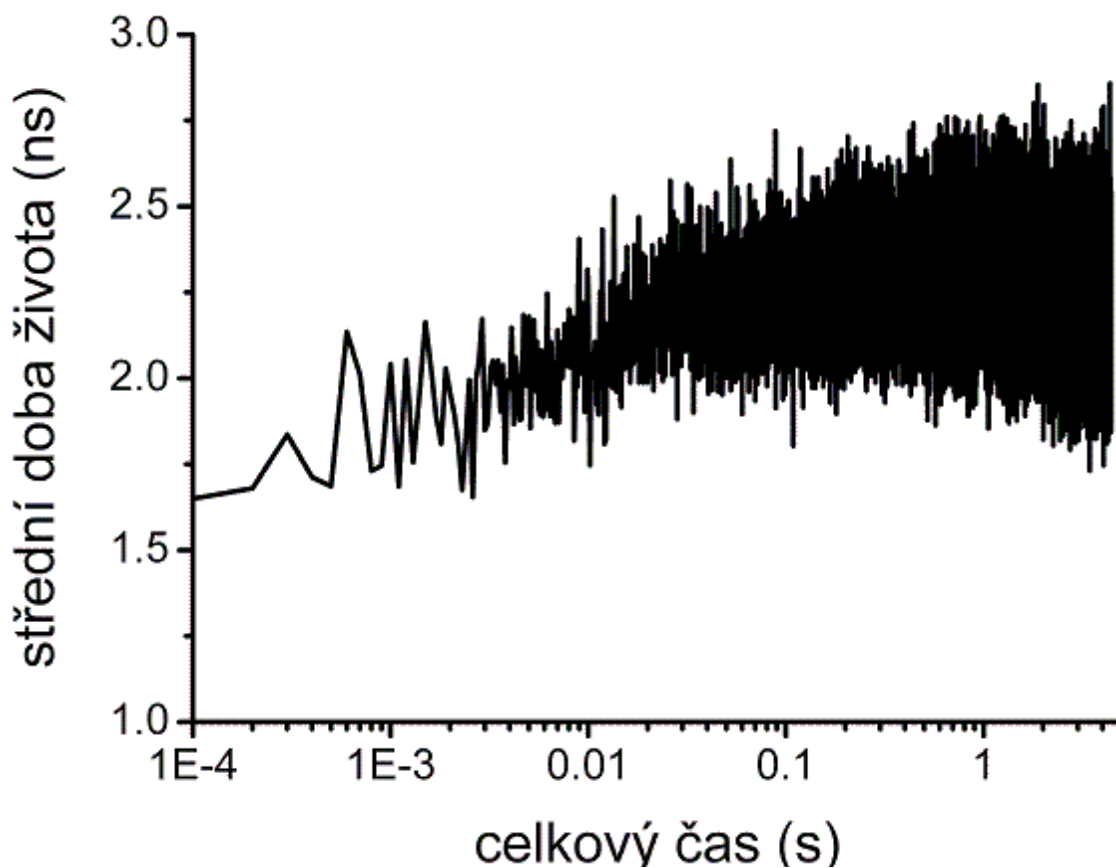
(Lazár 2006, 33, s. 9–30.)

O-J-I-P křivka tak znázorňuje postupné přesuny náboje ve fotosyntetickém řetězci, který se po vystavení světlo postupně uvádí do chodu. Jedním z předpokladů správnosti výsledků při sledování nezářivých přenosů energie pomocí zářivých procesů, je nezávislost konstanty zářivých přechodů ($k_{zář}$) na čase.

Na obr. 9 je zobrazen průběh intenzity fluorescence měřený v módu TTTR s časovým intervalem výpočtu 10^{-4} s a zprůměrovaný pro deset měření. V čase kolem 1s je zřetelně vidět maximum intenzity odpovídající bodu P, mírné pozastavení nárůstu intenzity se nachází i v okolí 10 ms odpovídající bodu I.

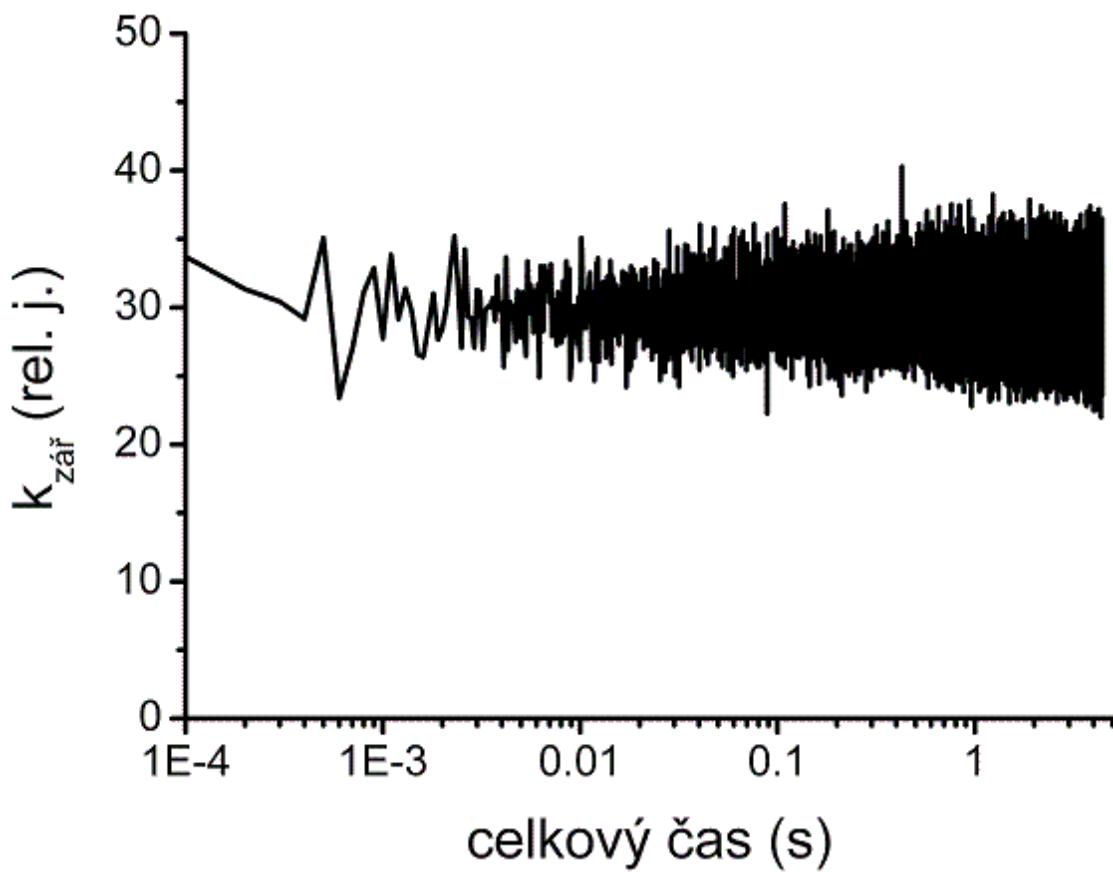


Obr 9: Průběh intenzity - průměr pro deset měření (rozlišení 10^{-4} s/interval)



Obr 10: Průběh střední doby života – vážený průměr deseti měření (rozlišení 10^{-4} s/interval)

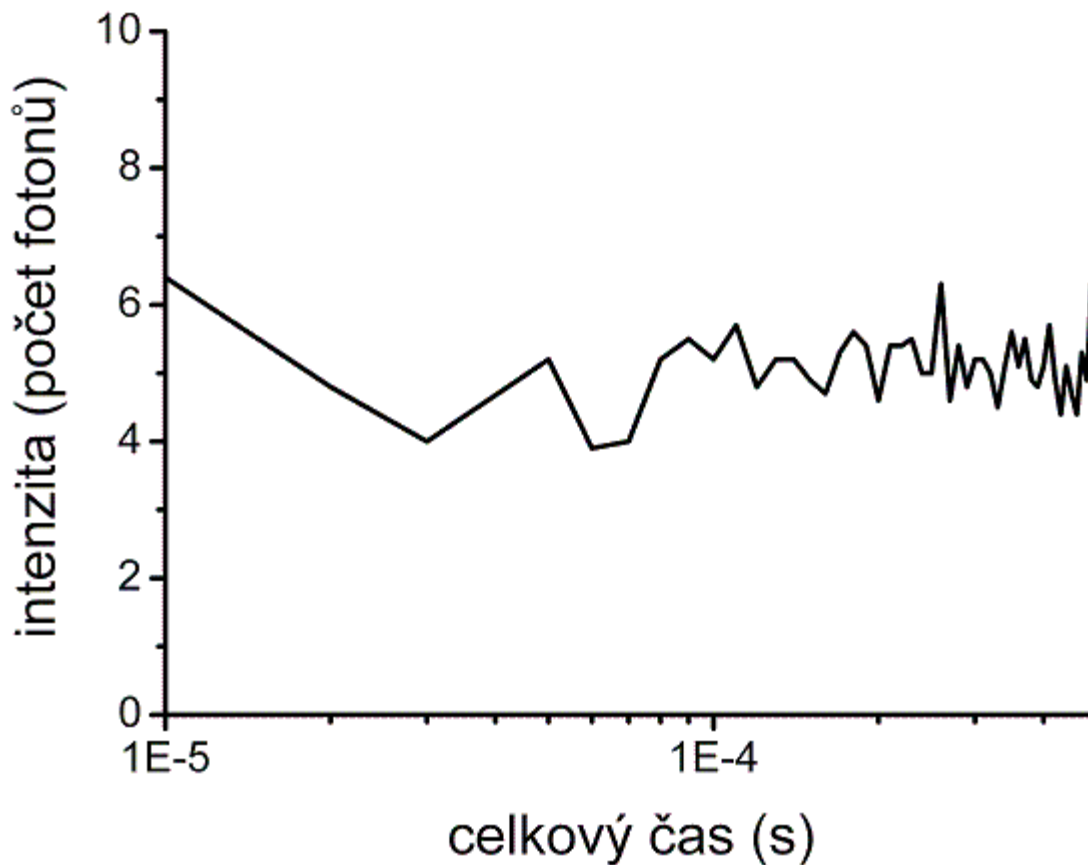
Obr 10 zachycuje průběh střední doby života opět pro deset měření s délkou výpočetního intervalu 10^{-4} s. Doba života se pohybuje v rozmezí 1,5 – 2,5 ns, což odpovídá luminiscenci chlorofylu ve fotosyntetickém aparátu.



Obr 11: Průběh rychlostní konstanty pro zářivé přechody - průměr deseti měření (rozlišení 10^{-4} s/interval)

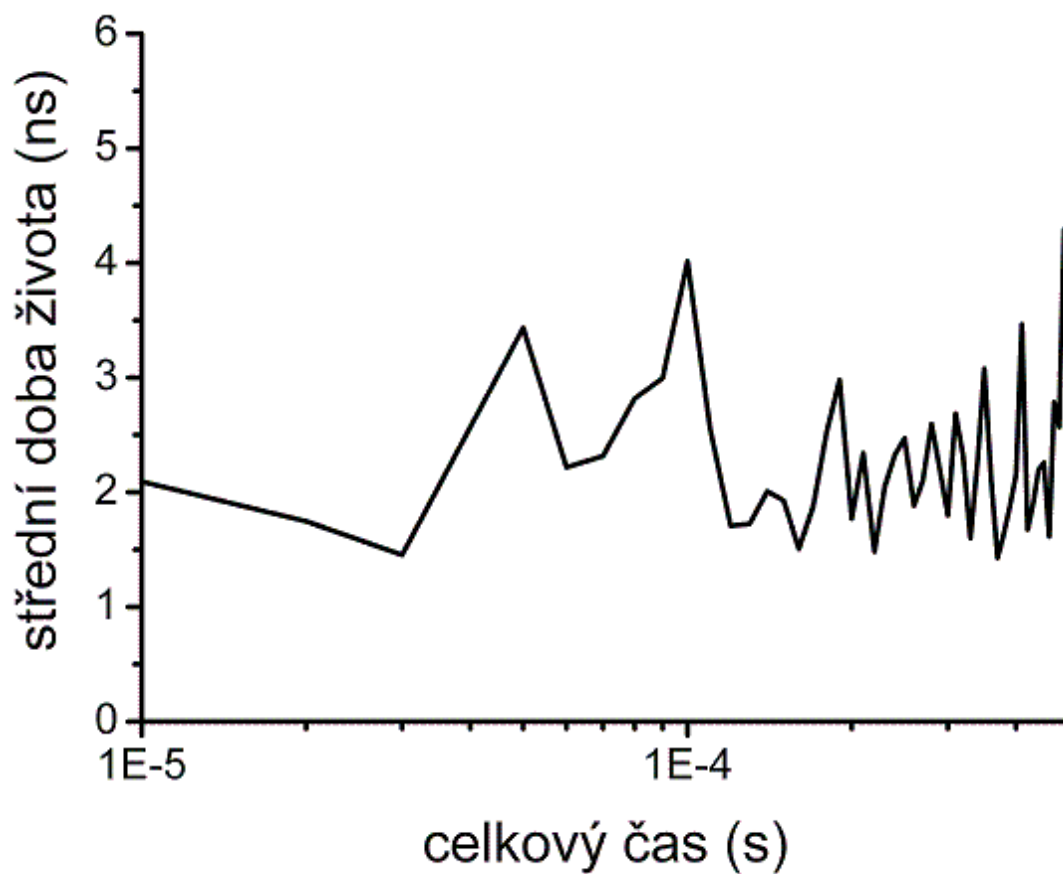
Na obr 11 vidíme, že hodnoty rychlostí konstanty zářivých přechodů jsou v intervalu pěti sekund od počátku měření poměrně rovnoměrně rozloženy kolem hodnoty 30 rel. j. po celou dobu měření.

Obr 12, 13 a 14 ukazují průběh jednotlivých veličin (intenzita, střední doba života a konstanta zářivých přechodů), pro rozlišení 10^{-5} s na výpočetní interval a časové rozmezí 10^{-5} až $5 \cdot 10^{-4}$ s.



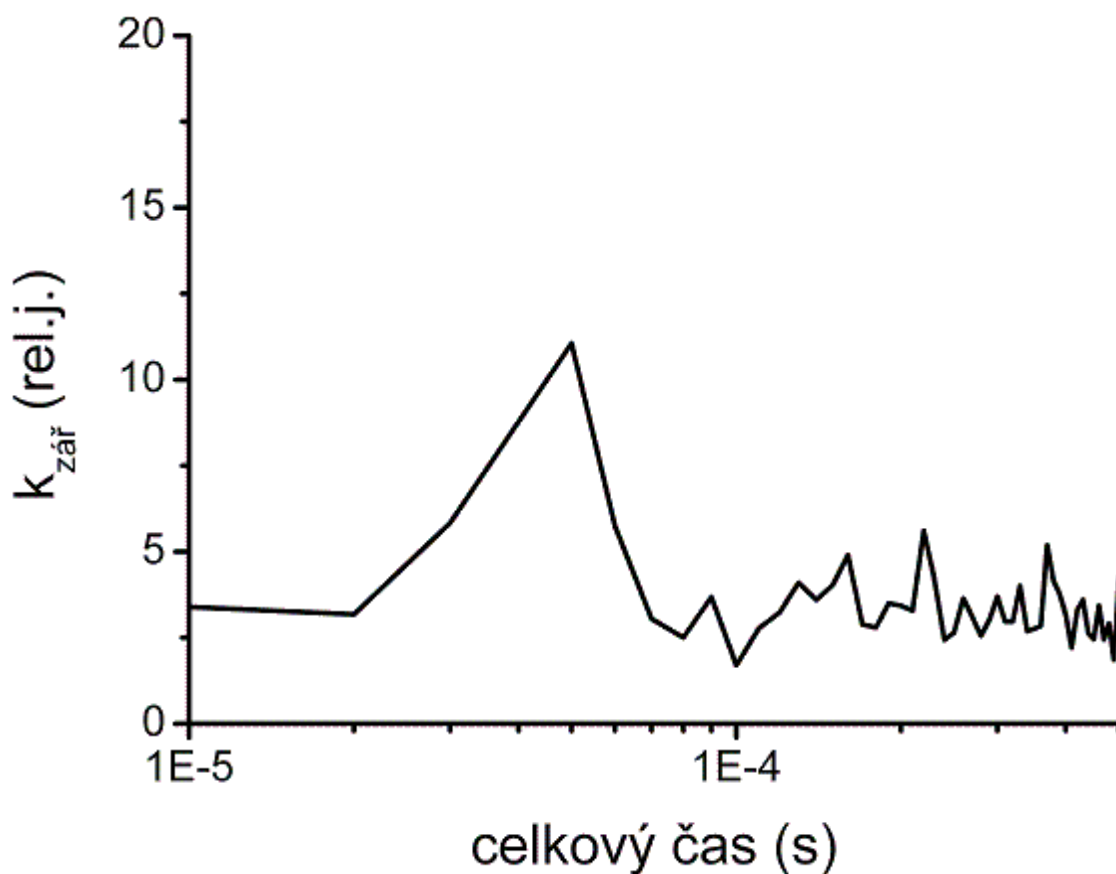
Obr 12: Průběh intenzity - průměr pro deset měření (rozlišení 10^{-5} s/interval)

Z obr 12 můžeme vidět, že intenzita (počet fotonů) v jednotlivých intervalech se pohybuje pouze v řádu jednotek, což způsobuje velkou zašuměnost výsledků.



Obr 13: Průběh střední doby života - průměr pro deset měření (rozlišení 10^{-5} s/interval)

Z obr. 13 vidíme, že je střední doba života rozložena kolem hodnoty 2ns. V čase 40 μ s a 400 μ s se nacházejí zřetelné vrcholy průběhu doby života, přičemž první z nich odpovídá svou polohou nárůstu hodnoty rychlostní konstanty pro zářivé přechody (viz obr. 14).



Obr 14: Průběh rychlostní konstanty pro zářivé přechody- průměr deseti měření (rozlišení 10^{-5} s/interval)

Na obr 14 vidíme průběh rychlostí konstanty zářivých přechodů s výrazným maximem při čase 40 μ s od počátku měření. I přes nízký počet fotonů v jednotlivých intervalech je tento vrchol natolik výrazný, že může znamenat narušení předpokladu vyhodnocování O-J-I-P křivky o nezávislosti konstanty zářivých přechodů na čase.

6. Závěr

Metoda TCSPC se používá pro měření kinetiky dohasínání fluorescence v řádu nanosekund po vybuzení vzorku krátkým excitačním pulsem. Umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení a velké rychlosti měření.

Při vyhodnocování dat je možné využít různé modely dohasínání a několik způsobů hodnocení přesnosti fitu a odchylek jednotlivých parametrů.

Metoda TRES využívá měření dohasínání na několika vlnových délkách, proto je možné ji využít pro sledování relaxačních procesů, které jsou charakteristické změny průběhu dohasínání v závislosti na vlnové délce. Při měření v módu TTTR je k informaci o době života zaznamenána i informace o času příletu daného fotonu, čehož je možno využít ke sledování dynamiky fluorescenčních procesů.

Tato práce shrnuje základní informace o metodě TCSPC, jejích charakteristikách, experimentálním uspořádání pro její použití a následném zpracování z dat jí získaných. Na modelových pokusech ukazuje vyhodnocení dohasínání, analýzu chyb a měření TRES. Byl vytvořen software pro vyhodnocení dat z naměřených v módu TTTR, který byl použit na měření fluorescenčního indukčního jevu, kde odhaluje možnou změnu rychlostní konstanty zářivých přechodů v čase 40 μs .

7. Reference

BECKER, Wolfgang. *TCSPC Handbook*. Berlin : Becker and Hickl GmbH, 2008

FluoFit : User's manual and technical data. Berlin : PicoQuant GmbH

LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd Edition. [s.l.] : Springer Science, 2006.

LAZÁR, Dušan. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology*,. 2006, 33, s. ,9–30.

Přílohy

Software:

- ttr.m
- scitac.m

Data:

- 1.pt3
- 2.pt3
- 3.pt3
- 4.pt3
- 5.pt3
- 6.pt3
- 7.pt3
- 8.pt3
- 9.pt3
- 10.pt3