



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Závislost časové odezvy lavinových fotodiod
na četnosti detekovaných fotonů**

**Count rate dependence of avalanche
photodiode timing response**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor práce: Tomáš Malina

Vedoucí práce: Ing. Dalibor Pánek, Ph.D.

Kladno 2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Závislost časové odezvy lavinových fotodiod na četnosti detekovaných fotonů“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 19. 5. 2017

.....

Tomáš Malina

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat panu Ing. Daliboru Pánkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, návrhy, připomínky a dobré rady při konzultacích k vypracování bakalářské práce, za jeho vstřícnost a za poskytnutí laboratorních prostor pro realizaci řešení tématu.

Dále děkuji panu Dr. Kapustovi za poskytnutou pomoc s analýzou datových souborů a za cenné rady při vyhodnocování výsledků.

Mé velké díky patří přítelkyni, rodině a všem ostatním, co mne podporovali během psaní bakalářské práce.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Fakultě biomedicínského inženýrství ČVUT za poskytnutí programového prostředí Matlab R2015b a R2017a.

ABSTRAKT

Single Photon Avalanche Diode (SPAD) jsou hojně používané detektory jednotlivých fotonů zejména ve fluorescenční spektroskopii či mikroskopii. Závislost funkce přístrojové odezvy (angl. Instrument Response Function, IRF) na intenzitě dopadajících fotonů je nepříjemným jevem při experimentálních měřeních. V této práci byly závislosti IRF na count-rate naměřeny u pěti komerčně dostupných SPAD modulů od čtyř různých výrobců. Následně byly zkoumány vlivy těchto změn IRF na naměřený průběh dohasínání fluorescence a korelace při měření difúze pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS).

V této práci je zjištěno, že závislost časové odezvy detektoru na count-rate je rozdílná pro detektor od každého výrobce, avšak je též určena vlastnostmi použité elektroniky pro registraci výstupu SPAD. Při analýze průběhů dohasínání fluorescence pomocí rekonvoluce je potvrzeno, že pro měřicí sestavu vykazující změnu tvaru IRF lze najít vhodnou intenzitu světelného svazku pro měření IRF pro každou intenzitu, při které bylo měřeno dohasínání fluorescence. Nakonec je zjištěno, že výběr nevhodné IRF pro měření může kompletně znehodnotit dosažené výsledky měření.

Klíčová slova

IRF, Instrument Response Function, SPAD, Single Photon Avalanche Diode, FCS, Fluorescenční korelační spektroskopie, FLCS, Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie

ABSTRACT

Single Photon Avalanche Diode (SPAD) is a widely used type of single photon counting detector, especially in the field of fluorescence spectroscopy and microscopy. The temporal dependence of Instrument Response Function (IRF) on the intensity of incident photons is an unwanted phenomenon. In this thesis, the IRF dependence is assessed for five commercially available modules from four different manufacturers. Afterwards, there is discussed the influence of IRF on fluorescence decay and the resulting correlations in a conducted fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurement.

In this thesis it has been discovered that the occurring IRF dependences have no general parameters by which they are governed and they also depend on the electronics used to register the SPAD output. Analysis of fluorescence decays using reconvolution showed that if a change in shape of IRF occurs, it is possible to find laser beam intensity suitable for the IRF measurement that fits the best any steady-state fluorescence intensity. In the end it has been found that an improper choice of IRF can lead to the measurement results being completely invalidated.

Keywords

IRF, Instrument Response Function, SPAD, Single Photon Avalanche Diode, FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy, FLCS, Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	ix
1 Úvod	1
1.1 Lavinové fotodiody	1
1.2 Přehled současného stavu	2
1.3 Cíle práce	3
2 Metody	5
2.1 Princip časově korelovaného čítání fotonů	5
2.1.1 Funkce přístrojové odezvy (IRF)	6
2.2 Měření IRF	6
2.2.1 Použité soustavy	6
2.2.2 IRF drift	9
2.2.3 Popis experimentu	10
2.2.4 Software pro vyčtení a vyhodnocení IRF	11
2.3 Měření za stacionárních podmínek	15
2.3.1 Popis experimentu	15
2.3.2 Anizotropie fluorescence	16
2.3.3 Vyhodnocení posunů	17
2.4 Měření za FCS podmínek	18
2.5 Analýza dat fluorescenčních měření	19
2.6 Vyhodnocení korelace	22
3 Výsledky a diskuze	25
3.1 Vyhodnocení závislostí IRF	25
3.1.1 Charakteristiky detektorů	29
3.2 Vyhodnocení měření za stacionárních podmínek	32
3.2.1 Nastavení polarizátoru	33
3.2.2 Analýza křivek dohasínání	35
3.2.3 Vliv posunu IRF na pozici křivek dohasínání	41
3.3 Vyhodnocení měření fluktuujícího signálu fluorescence	45
3.3.1 Analýza křivek dohasínání bez rozlišení count-rate	45
3.3.2 Analýza křivek dohasínání rozlišených podle count-rate	50

3.4	Vliv IRF na korelační křivky	55
3.4.1	ACF – měření za stacionárních podmínek	55
3.4.2	ACF a CCF – měření fluktuujícího signálu.....	59
4	Závěr	63
	Seznam použité literatury	66
	Příloha A: Názvy použitých skriptů se stručnými popisy.....	69
	Příloha B: Grafy naměřených IRF	71
	Detektor 1 (EG&G) + TimeHarp 200.....	71
	Detektor 1 (EG&G) + HydraHarp 400	75
	Detektor 2 (Perkin Elmer) + TimeHarp 200.....	77
	Detektor 2 (Perkin Elmer) + HydraHarp 400	83
	Detektor 3 (PicoQuant) + HydraHarp 400.....	85
	Detektor 4 (PicoQuant) + HydraHarp 400.....	87
	Detektor 5 (Excelitas) + TimeHarp 200	89

Seznam symbolů a zkratek

ACF – autokorelační funkce

AVCR – average count-rate – průměrný count-rate (typicky ve vztahu pro celý měřený záznam)

CCF – kroskorelační funkce

cps – counts per second (příp. kcps – tisíc counts per second) – počet (detekčních událostí) za sekundu, jednotka pro veličinu count-rate

CW – continuous wave – kontinuální vlna (CW laser – laser s kontinuálním vyzařováním paprsku)

FCS – Fluorescence Correlation Spectroscopy – fluorescenční korelační spektroskopie

FLCS – Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy – časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie

FWHM – Full-Width at Half-Maximum – šířka (pulzu) v polovičním maximu, pološířka

IPD – Inter-photon delay – interval zpoždění foton-foton

IRF – Instrument Response Function – funkce odezvy přístroje

NIR – Near-Infrared – blízké infračervené spektrum

PMT – Photomultiplier Tube – druh fotonásobiče

SPAD – Single Photon Avalanche Diode

TAC – time to amplitude converter – převodník čas-amplituda

TCSPC – Time Correlated Single Photon Counting – časově rozlišené čítání fotonů

TTTR – Time-Tagged Time-Resolved – mód TCSPC měření, při kterém se zaznamenává jak absolutní čas od začátku měření (s nanosekundovým rozlišením), tak relativní čas od posledního excitačního pulzu laseru (s pikosekundovým rozlišením)

1 Úvod

Single photon avalanche diode (SPAD) je typ fotodiody používané pro čítání jednotlivých fotonů. Hlavními výhodami tohoto detektoru jsou vysoká citlivost, vysoké časové rozlišení a linearita. Díky těmto vlastnostem je užitečný pro použití v mikroskopových laboratořích, především pro detekci slabých světelných signálů, např. fluorescence. Jednou ze známých vlastností SPAD je časová závislost jejich funkce přístrojové odezvy (Instrument Response Function, IRF) na četnosti dopadajících fotonů (count-rate) – intenzitě luminiscence. Tato vlastnost je silně omezující v některých pokročilých spektroskopických aplikacích, jako je například časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (FLCS), relativně moderní varianta fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). V této práci jsou nejprve stanoveny parametry, podle kterých je vhodné tyto závislosti hodnotit, a následně je provedeno měření na pěti modulech od čtyř výrobců (EG&G, Perkin Elmer, PicoQuant a Excelitas).

Fluorescenční spektroskopie zahrnuje velké množství oborů a metod, které lze využít k mikroskopickému sledování konkrétních molekul a struktur. V této práci je využito časově rozlišeného čítání fotonů (TCSPC) pro získávání informací o zkoumaných systémech. Pomocí TCSPC záznamů jsou získána data o měřené fluorescenci, jež jsou poté vyhodnocována analýzou naměřených křivek dohasínání a FCS analýzou.

Práce se zabývá SPAD detektory používanými v oblasti fluorescenční spektroskopie a instrumentálními artefakty ve změřených datech. V práci je měřeno dohasínání fluorescence za podmínek, kdy je intenzita zaznamenávané fluorescence jednak stacionární, jednak silně fluktuující. Poté byl vyhodnocen vliv časově závislé odezvy detektorů na fit (křivky, která matematicky reprezentuje průběh dohasínání) křivek těchto dohasínání. Tento fit je získán konvolucí matematického modelu dohasínání a změřené IRF. Pomocí nich je stanovována ideální intenzita pro měření IRF, aby bylo vhodné tuto IRF použít pro fitování pomocí rekonvoluce. Pojmem fitování je zde označován proces, jež je popsán podrobně v kapitole 2.5.

Závěrem práce je diskutován i vliv závislosti tvaru a pozice IRF na detekovaném count-rate na výpočet korelačních křivek z měření.

1.1 Lavinové fotodiody

Čítání fotonů bylo vyvíjeno mnoho let postupným zlepšováním výkonu PMT (photomultiplier tube) detektorů. Koncem minulého tisíciletí však byl představen úplně nový polovodičový detektor schopný detekovat jednotlivé fotony. Tento detektor byl nazýván např. lavinovou diodou pracující v Geigerově módu, triggered avalanche diode

(spouštěnou lavinovou diodou), ale nejvíce se pro něj začal užívat název Single Photon Avalanche Diode (jednotlivé fotony čítající lavinová dioda), SPAD. Tento detektor je nejlépe schopný detekovat fotony v blízké infračervené (NIR) a ve viditelné oblasti spektra s vysokou detekční citlivostí [1].

Křemíkové SPAD lze rozdělit na dvě kategorie podle šířky P-N přechodu. Tato vrstva může být buď tenká ($\sim 1 \mu\text{m}$), nebo široká (přibližně $20\text{--}150 \mu\text{m}$). Hlavním rozdílem mezi nimi je časové odezva a účinnost detekce [1].

Lavinové diody s tenkým P-N přechodem mají průrazové napětí v hodnotách desítek voltů, aktivní oblast fotodiody je malá (s poloměrem přibližně $5\text{--}150 \mu\text{m}$) a detekční účinnost většinou nepřesahuje 50 % na žádné vlnové délce, přičemž klesá na přibližně 0,1 % pro 1064 nm. Hlavní výhodou těchto SPAD je jejich časová odezva, která je mnohdy pouhých 20 ps [1].

Na druhou stranu lavinové diody s širokým P-N přechodem mají průrazové napětí v hodnotách stovek voltů, aktivní oblast je větší (poloměr přibližně $100\text{--}500 \mu\text{m}$) a detekční citlivost je mnohem větší – na některých vlnových délkách okolo 70 %, zatímco pro 1064 nm zůstává stále v jednotkách procent. Nicméně, časové rozlišení těchto fotodiod je mnohem nižší, hodnoty se pohybují v nízkých stovkách ps [1].

Tyto parametry mohou být nastaveny změnou tloušťky vrstvy P-N přechodu, stejně tak lze dosáhnout jiných výsledků při použití jiného polovodivého materiálu. Pro detekci v NIR spektru se mnohem více hodí SPAD z germania [1].

Každá součástka elektrického obvodu má vlastní přenosovou funkci, která popisuje způsob, jakým je součástka schopna přenášet elektrické signály. SPAD zde není výjimkou. Při popisu soustavy pro fluorescenční spektroskopii se však nehovoří o přenosových funkcích jednotlivých prvků, nýbrž o přenosové funkci celé soustavy, jež v sobě zahrnuje tvar pulzu, vliv použitých optických prvků na časový průběh pulzu, přenosovou funkci detektoru a (jak bylo zjištěno v této práci) přenosovou charakteristiku elektroniky registrující výstup ze SPAD. Konvoluce všech těchto vlivů je poté výslednou funkční přístrojové odezvy, IRF (Instrument Response Function). Výstupní zaznamenaný signál z detektoru je potom konvolucí přenášeného signálu (měřená fluorescence) a IRF.

1.2 Přehled současného stavu

Téma bakalářské práce „Závislost časové odezvy lavinových fotodiod na četnosti detekovaných fotonů“ vzniklo v návaznosti na bakalářskou práci „Fluorescenční korelační spektroskopie při studiu permeability lipidových membrán“ Michala Šindeláře [4]. V jeho práci byla zkoumána permeabilita fosfolipidových membrán v přítomnosti antimikrobiálního peptidu Halictinu. Provedená měření byla uskutečněna pomocí FLCS. Naměřená data, zejména parametry korelačních funkcí

měřené intenzity fluorescence, však nevedla k dosažení výsledku odpovídajícímu předpokladům, neboť výsledky nebyly konzistentní [4]. Jedním z diskutovaných důvodů byly artefakty způsobené právě změnou odezvy použitých SPAD v závislosti na intenzitě detekovaného signálu.

Detektory SPAD jeví závislost rychlosti odezvy (a tvaru výstupního signálu) právě na frekvenci dopadání fotonů na detektor (count-rate) [5]. Tato závislost byla v minulosti přisuzována zhášecím obvodům SPAD [3], které jsou jejich nezbytnou součástí [1]. Japonský tým (T. Otsu et al.) již zkoumal na SPAD detektorech závislost časové polohy IRF na count-rate a dospěl k závěrům, že posun IRF je závislý pouze na intervalu od předchozího detekovaného fotonu, IPD (inter-photon delay) [6]. Jejich návrhem byla jednoduchá metoda kalibrace SPAD detektorů pro kompenzaci pozorovaného časového posunu.

Původním úkolem, který byl realizován, bylo pouze zjistit, zda je tato kalibrační metoda navržená v [6] použitelná pro detektory v laboratořích na FBMI ČVUT v Praze, aby mohla být prováděna FCS měření. Výsledkem by byl odpovídající software pro zpracování dat, který by bylo možné použít na data naměřená v [4], aby se do výsledků nepromítal vliv odlišné reakce detektoru SPAD na fotony přilétající s různým count-rate. Během pilotních experimentů však bylo zjištěno, že detektory na FBMI ČVUT v Praze vykazují jiné chování, než bylo popsáno v [6]. Proto bylo rozhodnuto rozšířit tuto studii na zjištění závislosti časové odezvy IRF na více detektorech od různých výrobců a provést ověření nalezených poznatků pomocí analýzy měření stacionárního a fluktuujícího fluorescenčního signálu.

Je nutno zmínit, že charakter časové závislosti odezvy detektoru SPAD na dopadající fotony není mimo [6] nikde charakterizován a výrobci žádnou míru změny odezvy detektoru neuvádějí. Lze tedy pouze porovnávat tyto vlastnosti detektorů mezi sebou, avšak žádný limit posunu není výrobcem garantovaný.

1.3 Cíle práce

Prvním cílem této práce je navrhnout postup měření, kterým bude možné porovnat a vyhodnotit časový posun IRF detektorů SPAD v závislosti na intenzitě detekovaných fotonů. Pro experiment je potřeba jak navrhnout parametry měření a provést experimenty, tak vyvinout skript, který bude umět zpracovat výsledné datové formáty z měřicí soustavy a vyčíst z nich potřebné údaje. Zde je nutné stanovit jednak rozsah měřených intenzit, average count-rate (AVCR), ve kterém bude časový posun IRF zkoumán, jednak prvky potřebné pro umožnění měření ve stanovených mezích a připravit takovou aparaturu k měření. Po naměření požadovaných dat je potřeba tato data zpracovat – byly vybrány tři odlišné aparatury pro uskutečnění měření (konfokální mikroskop PicoQuant MicroTime 200, konfokální mikroskop Zeiss Confocor II a vlastním způsobem postavená dráha paprsku na speciálním stole s pneumatickými tlumiči proti otřesům), přičemž používány jsou dva datové formáty záznamu souborů, a

proto je nezbytné naprogramovat dva skripty, které budou analogickým způsobem vyhodnocovat různě kódované datové soubory. Součástí tohoto cíle je stanovit velikosti a případné trendy posunů IRF detektorů.

Druhým cílem této práce je stanovení vlivu vybrané IRF na přesnost rekonvolučních fitů křivek dohasínání a určení, zda posuny IRF odpovídají posunům křivek dohasínání při stacionární intenzitě fluorescence. Pro tuto část jsou vybrány dva detektory, jež v první části vykazovaly velmi odlišné chování. Na těchto dvou detektorech je vliv IRF na křivky dohasínání demonstrován. Je-li to u vybraného detektoru možné, je nalezena intenzita, při které je vhodné naměřit IRF pro měření dohasínání určité stacionární intenzity fluorescence.

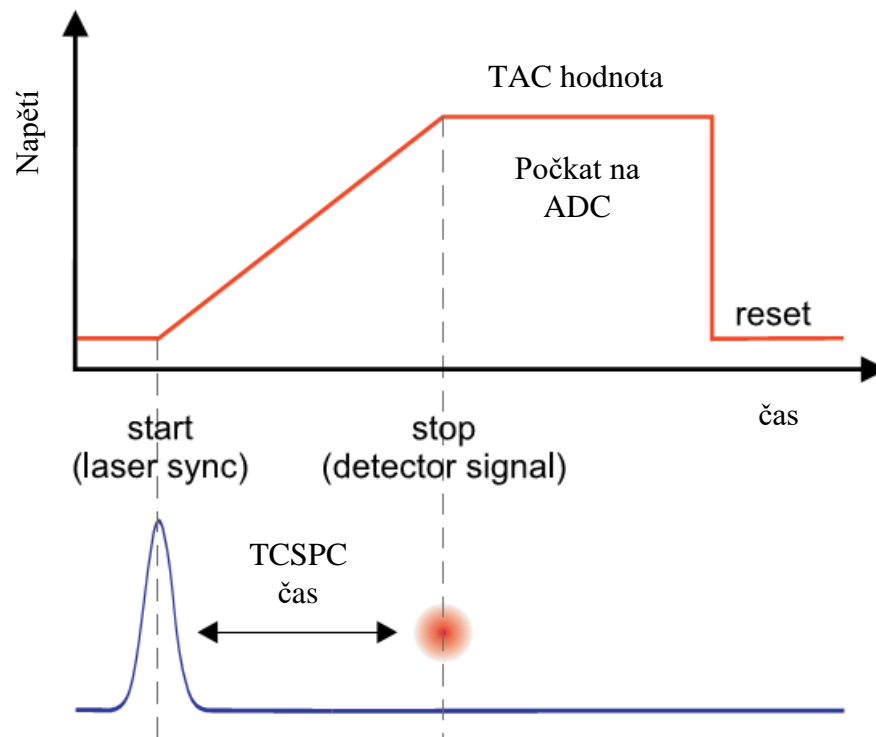
U fluktuujícího signálu je cílem určit, zda lze stanovit vhodnou intenzitu měření IRF pro měření fluktuujícího signálu. Jsou porovnávány fity vytvořené podle IRF měřených při různých AVCR. Je provedena analýza celkových křivek dohasínání, křivek dohasínání z jednotlivých úseků záznamu a křivek dohasínání rozdělených podle count-rate v každém milisekundovém intervalu záznamu. Jsou též porovnány výsledky pro vhodné intenzity IRF získané podle analýzy křivek rozdělených dle count-rate s výsledky pro vhodné intenzity IRF dosaženými při analýze křivek dohasínání při stacionární intenzitě fluorescence.

V poslední části je zkoumán vliv zvolené IRF na tvar korelačních funkcí a zda zvolená IRF ovlivní výsledek FCS analýzy. Korelační funkce jsou získány za použití statistického filtru vypočteného podle rekonvolučních fitů křivek dohasínání. U záznamu stacionární intenzity jsou vytvářeny autokorelační funkce pouze s nejlepšími fity daného měření, u záznamu fluktuujícího měření jsou pro vytváření korelačních funkcí použity fity získané pomocí všech změřených IRF a jsou porovnávány rozdíly mezi nimi.

2 Metody

2.1 Princip časově korelovaného čítání fotonů

K zaznamenání dat pro TCSPC je zapotřebí dvou signálových kanálů. Oba kanály jsou vyhodnocovány v časově amplitudovém převodníku (TAC); jedná se o kanál synchronizačního signálu z časovače laseru a kanál signálu z detektoru. Pokud pracuje v přímém módu, tzv. forward mode (na Obr. 2.1), po každém pulzu laseru je do TAC vyslán signál prvním kanálem, narůstá na něm napětí a v okamžiku, kdy přijde v druhém kanálu signál (impulz z detektoru, který zaznamenal foton), nárůst napětí se zastaví. Poté je vyčtena hodnota napětí, která odpovídá časovému intervalu mezi excitačním pulzem a detekovaným fotonem. Před následujícím pulzem laseru se napětí na TAC resetuje, aby byl připraven opět k záznamu. Pokud na detektor žádný foton po excitačním pulzu nedorazí, TAC se pouze resetuje na původní hladinu. Při vysokých opakovacích frekvencích laseru (desítky MHz) bývalo dříve nutné zapojení TAC ve zpětném módu, tzv. reverse mode. Při něm je většinu času převodník v klidu a napětí na něm začne narůstat až po detekci fotonu a hodnota je opět vyčtena při resetu. Excitační pulz je zde nutné vhodným způsobem zpozdít, aby mohl být použit jako stop signál, který zastaví nárůst napětí. Poté je na tento způsob záznamů potřeba uzpůsobit software. [2]



Obrázek 2.1 Princip fungování TAC v přímém módu, převzato z [2] a upraveno

2.1.1 Funkce přístrojové odezvy (IRF)

Každá součástka elektrického obvodu má vlastní přenosovou funkci, která popisuje způsob, jakým je součástka schopna přenášet elektrické signály. Výstupní signál je potom konvolucí přenášeného signálu (měřená fluorescence) a přenosové funkce měřicí soustavy (IRF). SPAD zde není výjimkou. Pro získání maximálního detekovatelného count-rate je však potřeba k lavinové diodě připojit aktivní zhášecí obvod, který urychlí přípravu detektoru na další zaznamenání fotonu. Zhášecí obvody pomáhají získat krátký tzv. „dead-time“ – mrtvý čas detektoru, po který není schopen zaznamenávat signál (fotony), následující zpravidla ihned po detekci fotonu (viz Obrázek 2.1). Zkrácením tohoto intervalu lze zkrátit čas celkového měření, neboť požadovaný objem dat bude nasbírán mnohem dříve. Bohužel jsou tyto zhášecí obvody podle některých zdrojů pravděpodobně zdrojem posunu IRF s měnícím se count-rate [3].

Protože je změřený signál konvolucí skutečného signálu a IRF, není možné naměřená data popsat matematickým modelem přímo odpovídajícím zkoumané fluorescenci. Vliv IRF musí být započítán, aby bylo možné dosáhnout shody naměřených dat s teoretickým předpokladem.

Právě proto je posun IRF v čase při různých zaznamenávaných intenzitách (count-rate) velmi nechtěným jevem.

2.2 Měření IRF

2.2.1 Použité soustavy

Posun IRF byl zkoumán na několika detektorech za pomoci několika laserů. Byly použity 2 různé TCSPC moduly pro měření, PicoQuant TimeHarp 200 a PicoQuant HydraHarp 400. Celkem bylo měřeno 5 různých detektorů od 4 různých výrobců – EG&G, Perkin Elmer, PicoQuant a Excelitas. Modely od prvních dvou jmenovaných byly měřeny s oběma TCSPC moduly, PicoQuant detektory byly měřeny pouze s TCSPC modulem HydraHarp 400 a detektor Excelitas byl měřen pouze s modulem TimeHarp 200. Detektory EG&G a Perkin Elmer byly vybrány pro měření na obou časovacích modulech proto, že díky navedení optickým vláknem je bylo možné relativně snadno zapojit do různých sestav.

Detektory SPAD mají omezeně velkou aktivní oblast, u které záleží, kam přesně v této oblasti dopadne detekovaný foton [1]. Podle místa dopadu fotonu se liší odezva i citlivost daného detektoru, tedy je mnohem obtížnější porovnávat časové odezvy detektorů s fokusační čočkou, neboť jejich odezva závisí na fokusačním místě P-N přechodu. K tomuto účelu porovnání časovacích TCSPC modulů byly proto využity jen vláknově navedené detektory, kde je pozice vlákna vždy stejná (neboť detektor má

pouze jednu pozici, ve které jde vlákno zasunout), a tedy je i stejné místo, kam fotony dopadají. Nastavení takových detektorů pro měření je též snazší.

U detektorů s fokusační čočkou (PicoQuant, Excelitas) bylo vždy pro porovnání vybráno místo dopadu na P-N přechod takové, kdy odezva detektoru byla nejkratší.

Parametry měření byly následující:

- Opakovací frekvence laseru 10 MHz/20MHz
- Intenzita laseru těsně nad prahem stimulované emise
- Odraz fotonů od podložního sklíčka nebo křemíkové destičky
- Nastavování count-rate změnou ostření (pohyb ohniska), velikosti a pozice kruhové apertury nebo optickým atenuátorem či polarizátorem.
- Lasery i detektory byly vždy zapnuty určitou dobu před začátkem experimentu.

Každý nastavený parametr má konkrétní důvod:

Opakovací frekvence 10 MHz byla zvolena pro TCSPC modul TimeHarp 200. U detektorů Perkin Elmer a EG&G byl navíc pozorován dodatečný peak za hlavním peakem, a to se značným zpožděním – jednalo se o totožný peak, jaký byl pozorován v práci Michala Šindeláře (lze vidět např. na Obr. 3.10 na IRF zobrazené zeleně). Na tomto TCSPC modulu nebylo možné softwarově nastavit pozici peaku v měřené periodě (elektronické zpoždění mezi časovacím signálem a signálem z detektoru), změna mohla proběhnout pouze změnou délky kabelů od a do detektoru. Z dostupných délek kabelů byly vybrány takové délky, pro které byl peak přibližně uprostřed 100 ns periody. Při zvýšení frekvence na dvojnásobek nebyla dostupná délka kabelů, která by poskytovala dostatečný interval před i za peakem, tedy musela být zvolena nižší opakovací frekvence. Rychlejší opakovací frekvence by mohla způsobit, že by data patřící tomuto peaku byla zahrnuta do následujícího detekčního cyklu a znehodnotit tak měření. U měření s TCSPC modulem HydraHarp 400 bylo možné zvolit elektronické zpoždění v softwaru, a mohla tedy být bez obtíží použita vyšší opakovací frekvence (20 MHz) pro snazší získávání dat. Samotná opakovací frekvence měření neovlivňuje výsledky, pokud je dodržena podmínka, aby žádné fotony excitované jedním laserovým pulzem nebyly zaznamenány až po příchodu následujícího laserového pulzu, tj. aby měřený průběh nebyl delší, než odpovídá periodě excitačního cyklu.

Intenzita těsně nad prahem laseru byla zvolena kvůli specifikacím v návodech k laserům. Tam je uvedeno, že při takovéto intenzitě má pulz nejmenší pološířku (FWHM – full width at half maximum) [9], tedy naměřená odezva bude nejméně ovlivněna tvarem samotného laserového pulzu.

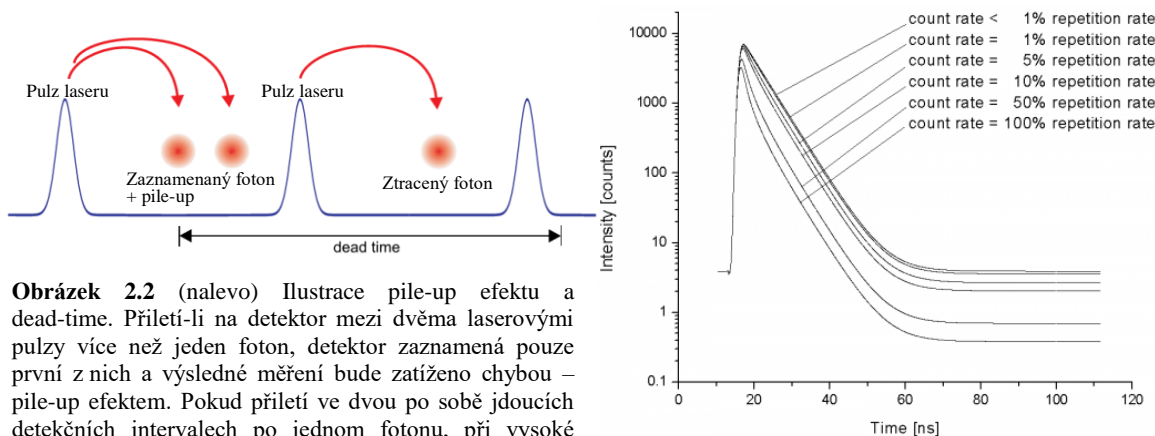
Odraz od podložního sklíčka byl zvolen jako jedna z možností redukce intenzity záření bez změny tvaru pulzu na jedné soustavě, kde bylo obtížné dosáhnout rozumně nízkého count-rate. Rozhraní vzduch-sklo odrazí zhruba 4 % původní intenzity, takže

není překročen maximální dovolený count-rate na detektoru. Odraz od křemíkové destičky byl použit pro jinou soustavu, kde byl k dispozici pro tlumení intenzity optický attenuátor.

Změna count-rate pouze pomocí pozice ohniska, pozice kruhové apertury (pouze v případě vláknově navedených detektorů na TimeHarp 200), velikosti kruhové apertury a optickým attenuátorem je z důvodu, aby nedošlo ke změně tvaru laserového pulzu. Změna intenzity pomocí ovládání budící intenzity laseru by vedla ke změně tvaru pulzu generovaného laserem a tedy data naměřená při různých count-rate by neměla stejnou výpovědní hodnotu.

Důvod, proč byly nejprve lasery i detektory zapnuty určitou dobu před měřením, je, že během měření může docházet k posunu IRF. Tento efekt byl nejsilněji pozorován především po zapnutí měřicí soustavy. Bylo nutné, aby nejdříve došlo k ustálení IRF na jedné pozici, aby nebylo ovlivněno měření (více v podkapitole 2.2.2).

V potaz musel být brán i již zmíněný pile-up efekt. Je-li frekvence dopadajících fotonů vysoká, je pravděpodobné, že určitý počet detekčních intervalů (doba mezi dvěma následujícími laserovými pulzy) bude obsahovat dva nebo více fotonů, z nichž pouze ten první bude moci být zaznamenán, neboť princip fungování TAC neumožňuje registrovat dva fotony v jednom excitačním cyklu. Pile-up bude mít za následek posun těžiště křivky dohasínání (nebo zde IRF) směrem ke kratším časům, avšak změní se i tvar křivky. Kvůli tomuto efektu je požadavkem měření TCSPC limit poměru detekovaného count-rate ku frekvenci excitujících laserových pulzů. Pro přesná měření se limit uvádí jako 1–2 %, někdy i 5 % (což je ovšem už na hranici patrného zkreslení dohasínání, viz Obr. 2.2) [2]. Zde byla pro úplnost prováděna měření i za hranicí 5 %, tato data (křivky přes 500 kcps u detektorů měřených na TCSPC modulu TimeHarp 200) již však mohou být zkreslené (viz Obr. 2.2). Minimální zaznamenávaná intenzita byla cca 3 kcps. Všechny měřené detektory jsou uvedeny v Tabulce 2.1.



Obrázek 2.2 (nalevo) Ilustrace pile-up efektu a dead-time. Přiletí-li na detektor mezi dvěma laserovými pulzy více než jeden foton, detektor zaznamená pouze první z nich a výsledné měření bude zatíženo chybou – pile-up efektem. Pokud přiletí ve dvou po sobě jdoucích detekčních intervalech po jednom fotonu, při vysoké frekvenci pulzů může být foton nezaznamenán z důvodu dead-time detektoru [2].

Obrázek 2.3 (napravo) Porovnání tvaru křivky dohasínání (či IRF) při různých poměrech detekované frekvence ku excitační frekvenci [10]

Tabulka 2.1 Použité detektory

	Výrobce	Model	S/N
1	EG&G	SPCM-AQR-13-FC	4857 REV F
2	Perkin Elmer	SPCM-AQRH-13-FC	20930
3	PicoQuant	tau-SPAD-100	1024738
4	PicoQuant	tau-SPAD-100	1024739
5	Excellitas	SPCM-AQRH-14	26862

Detektory 1 (EG&G) a 2 (Perkin Elmer) byly s časovací technikou TimeHarp 200 měřeny pomocí dvou různých laserů (Modrý laser a Červený laser, viz Tabulka 2.2), chování detektoru Perkin Elmer bylo na této soustavě navíc ověřeno pomocí Zeleného laseru. Tyto detektory měřené s časovací technikou HydraHarp 400 byly měřeny se Zeleným laserem.

Detektory 3 a 4 (oba PicoQuant) byly měřeny s TCSPC modulem HydraHarp 400 pomocí Zeleného laseru. Pro rozdělení paprsku byl použit beam-splitter (zt 405–473/532 rpc).

Detektor 5 byl měřen s TCSPC modulem TimeHarp 200 a pouze pomocí Modrého laseru bez beam-splitteru. Byl použit odraz od podložního sklíčka přímo navedeného na detektor, bez optické soustavy mikroskopu. Pro omezení count-rate byla použita i clona, skrz kterou byl laser poslán po kolimaci. Kvůli nedostatku místa pro nastavení odrazu laseru přímo od sklíčka do detektoru byl odraz od sklíčka poslán kolmo na zrcátko, od kterého byl paprsek poslán zpět skrz podložní sklíčko, již do detektoru (schéma popsáno v kapitole 2.2.3 na Obr. 2.6). Toto nastavení bylo zvoleno z důvodu, že detektor byl již nastaven pro použití v jiné měřicí aparatuře a tento způsob byl nejjednodušší, aniž by byla celá nainstalovaná aparatura rozebrána. Intenzita laserového svazku byla nastavována pomocí polarizátoru – bylo použito vlákno udržující polarizaci, takže svazek vystupující z vlákna je polarizovaný a změnou úhlu polarizátoru tudíž dochází ke změně intenzity prošlého svazku.

Tabulka 2.2 Použité lasery [11, 12]

Označení v textu	Výrobce	Model	Vlnová délka (nm)	FWHM pulzu (ps)
Modrý laser	PicoQuant	LDH-D-C-470	470	< 70
Červený laser	PicoQuant	LDH-P-C-640B	640	< 90
Zelený laser	PicoQuant	LDH-P-FA-530B	532	< 100

2.2.2 IRF drift

Před měřeními bylo testováno, jako dlouho trvá, než se pozice IRF ustálí. Z prvních měření s TimeHarp 200 bylo pozorováno, že po cca 30 minutách od zapnutí laseru a detektoru pozice zůstává stejná a nemění se. Stejně pozorování bylo provedeno

i s TCSPC modulem HydraHarp 400, avšak zde bylo pozorováno ustálení až několik hodin po zapnutí (viz Obr. 2.4).

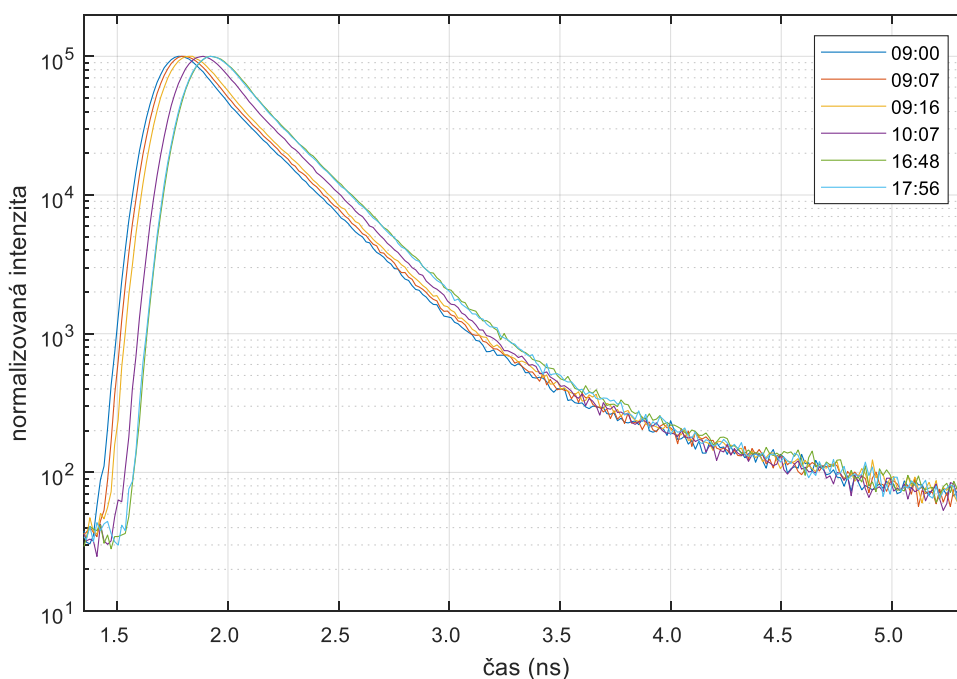
Postupně bylo zjištěno, že pozorovaný drift v čase se objevuje především kvůli laseru, nikoliv detektoru. Pokud byl laser zapnutý déle dopředu, avšak detektory zůstaly vypnuté, drift IRF po dodatečném zapnutí detektorů trval méně než 10 minut. Proto byla tato technika ponechána před měřením běžet přes noc (více než 12 h), aby se pozice IRF ustálila.

Při změně detektoru u téže soustavy se tedy nemuselo čekat dlouho, než tento efekt odezněl, byla-li soustava laseru zapnutá dostatečnou dobu předem.

Velikost driftu není zdaleka zanedbatelná, z Obrázku 2.4 je patrné, že dochází k posunům v řádu stovek ps. Protože při TCSPC měření je měřeno s přesností na nízké desítky ps, je takovéto ovlivnění nepřijatelné a musí být před začátkem měření zkontrolováno, že k driftu nedochází.

Důvod tohoto driftu je neznámý, domníváme se, že jde o drift způsobený změnou teploty, jelikož většina elektronických součástek má charakteristiky závislé na teplotě.

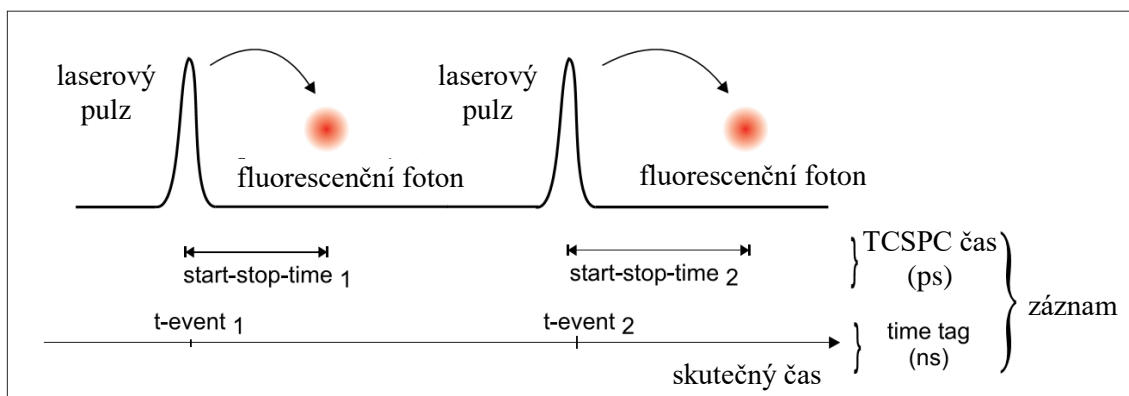
K vyhodnocení IRF driftu byl použit skript `plotPTU.m` popsáný v Příloze A.



Obrázek 2.4 Pozorovaný drift IRF v čase při konstantním AVCR 100 kcps po zapnutí laseru v cca 9:00 na detektoru 3 (PicoQuant) – logaritmické měřítko pro lepší názornost

2.2.3 Popis experimentu

Záznam dat probíhal měřením metodou TCSPC v tzv. TTTR (Time-Tagged Time-Resolved) módu. V tomto módu jsou pro každý detekovaný foton zaznamenávány dva časové údaje – čas od začátku měření s nanosekundovým rozlišením a čas od posledního laserového pulzu s pikosekundovým rozlišením (Obr. 2.5).



Obrázek 2.5 Měření start-stop časů v módu TTTR – zjednodušený náčrt [14]

Pro TCSPC modul TimeHarp 200 bylo měřené rozlišení 38,8 ps na detekční kanál (kanál zde označuje název pro kvantovanou hladinu výstupu z TAC převodníku odpovídající detekčnímu času, nijak nesouvisí s kanály signálu popisovanými jako vstupy do tohoto převodníku), 4096 kanálů. Byla použita opakovací frekvence 10 MHz. Po získání přibližně 10^6 zachycených fotonů bylo měření ručně ukončeno. Count-rate byl sledován pomocí TimeHarp software (ve kterém probíhal i záznam dat).

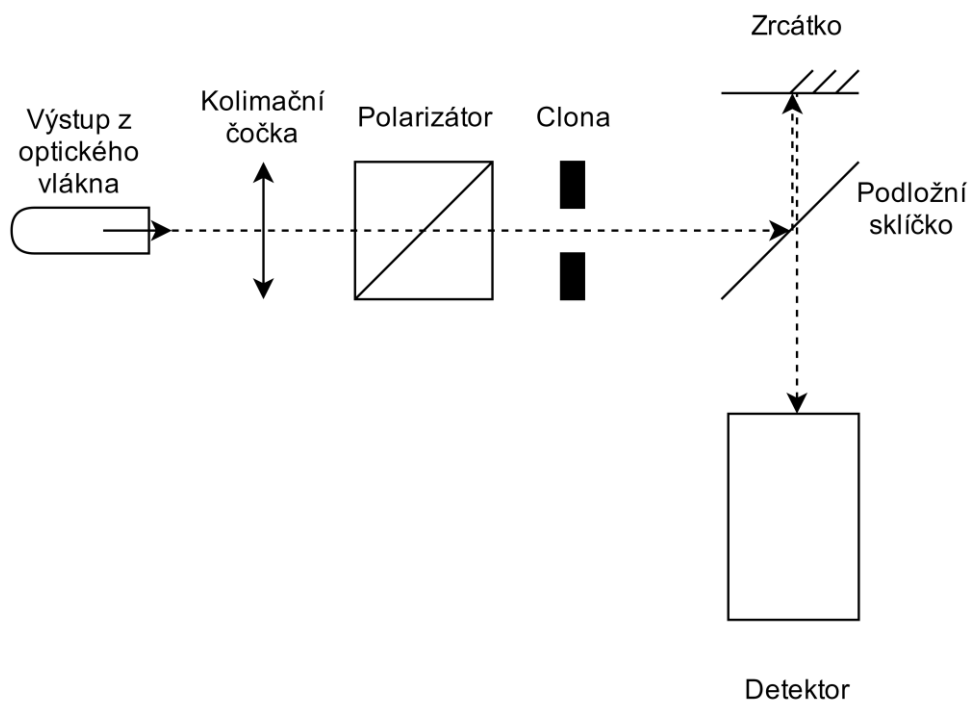
Změřené IRF se vyskytovaly v různých detekčních kanálech pro různé lasery, neboť zpoždění elektronikou rozdílných laseru není stejné. Navíc, odezva SPAD je závislá na vlnové délce [13]. Byla použita pouze data z kanálů obsahující hlavní pulz, vedlejší pulz detektoru ani šum v okolních kanálech nebyl zahrnut do zpracování. Pokud by byly započítány všechny kanály, započítaný vedlejší pulz i šum v okolních kanálech by zkreslil skutečně pozorovaný posun IRF. Pro každou kombinaci laser - detektor musely být detekční kanály vždy zvoleny.

U TCSPC modulu HydraHarp 400 bylo rozlišení 16 ps na kanál, 32 768 kanálů. Použita byla opakovací frekvence 20 MHz, takže ve skutečnosti bylo využito pouze 3125 kanálů. Měření bylo zastaveno po zaznamenání přibližně 10^6 fotonů. Pro odhad count-rate byl použit program SymPhoTime 64. IRF byla vypočtena opět pouze z kanálů obsahujících hlavní pulz, aby byl omezen vliv šumu a afterpulsingu akumulovaného ve všech kanálech rovnoměrně (k afterpulsingu více v kapitole 3.1.1).

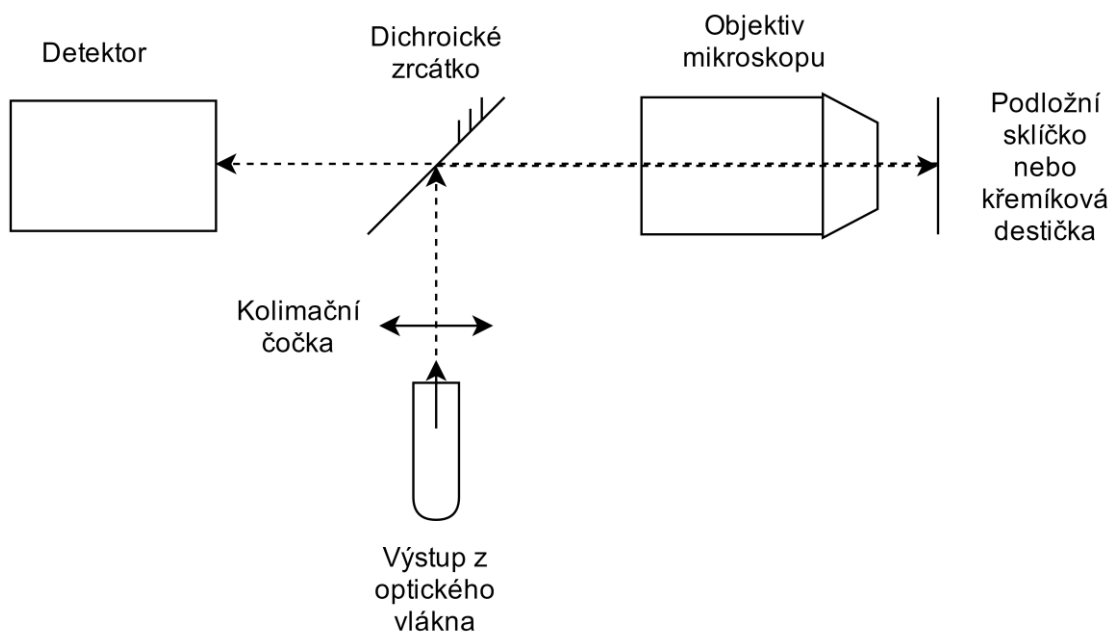
Schémata použitých aparatur jsou na Obrázcích 2.6 a 2.7.

2.2.4 Software pro vyčtení a vyhodnocení IRF

Získaná data byla naměřena do binárních souborů (T3R a PTU). Aby bylo možné sestavit IRF, musela být uložená data rozkódována a zpracována. Oba datové formáty mají standardní strukturu (hlavičku a tělo). Hlavička byla přečtena pomocí demo skriptů, z nichž byly získány i informace o struktuře ukládaných dat v tělu souboru. Zpracování a výpočty mnou poté byly naprogramovány na tento základ skriptu v programovém prostředí MATLAB.



Obrázek 2.6 Schéma vytvořené aparatury na speciálním tlumeném stole s popsánymi prvky. Na stole se nacházela jiná používaná aparatura, tedy zvolené uspořádání nejprve odráží svazek z podložního sklíčka na zrcátko, a až poté do detektoru. Pomocí této soustavy bylo provedeno měření SPAD detektoru od firmy Excelitas.



Obrázek 2.7 Schéma aparatury mikroskopů (Microtime 200 a Zeiss Confocor II), na kterých bylo prováděno měření všech detektorů kromě Excelitas. Dichroickým zrcátkem je propuštěn k detektoru pouze malý zlomek původní intenzity laseru. Ve schématu jsou pro zjednodušení vynechány některé optické prvky jako zrcátka pro zalomení dráhy paprsku či dělení svazku pomocí beam-splitteru.

Oba typy souborů používají 32-bitové integer pro uložení 4 proměnných zaznamenávajících událost v čase. Data z TimeHarp 200 byla ukládána do T3R souborů, kde pouze 3 proměnné byly relevantní k měření:

- Valid (1 bit) – značí, jestli je záznam fotonem nebo zvláštní událostí
- TimeTag (16 bitů) – počítadlo pulzů laseru od začátku měření. Pokaždé, když bylo počítadlo vynulováno, byla v proměnné Valid zaznamenána zvláštní událost (overflow).
- Channel (12 bitů) – Detekční čas fotonu od posledního pulzu laseru (start-stop-time na Obrázku 2.5).

Proměnné byly ukládány do 32-bitových integer tímto způsobem („T“ znamená TimeTag, „V“ znamená Valid, „C“ znamená Channel a „-“ znamená nezakódovaný nebo pro měření nepotřebný bit):

```
-V--CCCC CCCCCCCC TTTTTTTT TTTTTTTT
```

Data z HydraHarp 400 byla ukládána do PTU souboru, kde všechny 4 proměnné byly relevantní k měření:

- Nsync (10 bitů) – ekvivalent TimeTag v souboru T3R
- Dtime (15 bitů) – ekvivalent Channel v souboru T3R
- Channel (6 bitů) – rozlišuje SPAD detektor, na který přiletěl zaznamenaný foton
- Special (1 bit) – ekvivalent Valid v souboru T3R

Proměnné byly ukládány do 32-bitových integer tímto způsobem („N” znamená Nsync, „D” znamená Dtime, „C” znamená Channel a „S” znamená Special):

```
SCCCCCCD DDDDDDDD DDDDDN NNNNNNNN
```

Velká část vyhodnocení se odvíjí od tzv. Inter-photon delay, IPD, tedy časový odstup mezi dvěma po sobě detekovanými fotony. Ten je zde určován pouze na základě dat time tag (označen na Obr. 2.5). Jedná se tak pouze o interval mezi laserovými pulzy, po nichž byl zaznamenan foton (to je vzhledem k poměru frekvence count-rate fotonů a frekvence excitačního laseru zanedbatelný rozdíl – časy totiž budou vycházet v řádech stovek až tisíců nanosekund, nikoliv desítek pikosekund). Po každém laserovém pulzu je určitá pravděpodobnost, že bude zaznamenan foton. Rozdělení, které odpovídá tomu, v jakých intervalech (IPD) tyto fotony budou detekovány, odpovídá Poissonovské statistice [15].

Toto rozdělení prvotně platí pro kontinuální záření (CW). Máme-li CW laser, který vysílá fotony v náhodných časových okamžicích s určitou průměrnou intenzitou, je rozdělení jejich IPD Poissonovské. Pulzní laser toto pro krátké časové intervaly splňovat nemusí. V našem případě je však u většiny měření splněna TCSPC podmínka

detekovaných fotonů (tj. že foton je na detektoru po laserovém pulzu zaznamenán v max. 5 % případů).

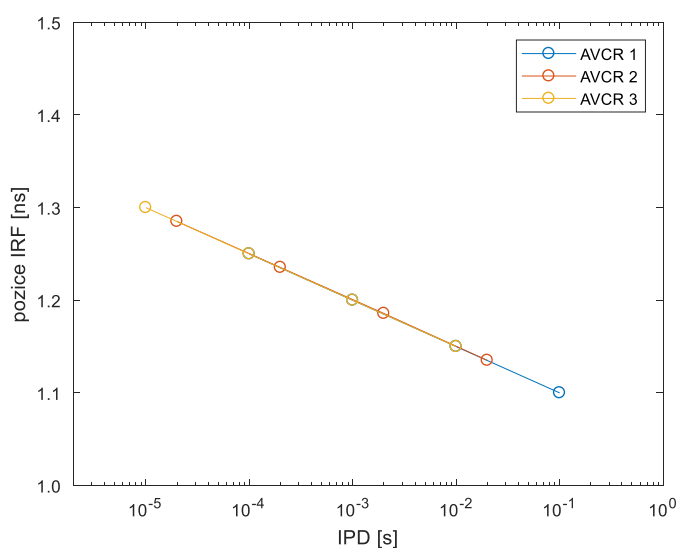
Při vyhodnocování byly načteny všechny záznamy v datovém souboru, byly nalezeny všechny okamžiky resetu počítačla TimeTag/Nsync a byl sestaven skutečný čas TimeTag/Nsync fotonů od začátku měření. Poté byly spočítány intervaly mezi po sobě následujícími fotony (IPD), ze kterých byl vytvořen histogram pro kontrolu, že byly měřeny rozdílné count-rate s Poissonovským rozdělením a pro pozdější určení, na kterém z parametrů AVCR (průměrný count-rate) a IPD závisí posun IRF.

Poté byl vynesena histogram Channel/Dtime časů, který odpovídá IRF detektoru.

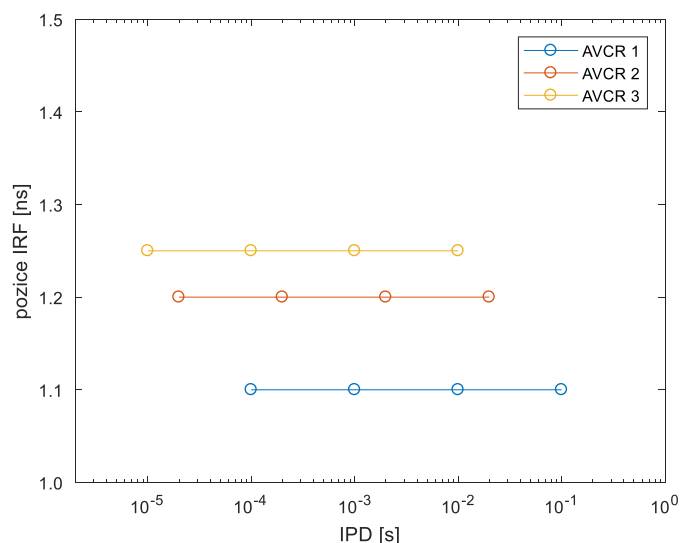
Následně bylo spočítáno těžiště plochy pod IRF.

Nakonec byl použit roztříděný histogram IPD, pro pět tříd histogramu s nejvíce fotony byly vytvořeny zvlášť IRF a pro tyto jednotlivé IRF (vytvořené vždy pouze z fotonů daného IPD) byly vypočteny jejich pozice – těžiště plochy. Tato těžiště ploch byla vynesena do posledního grafu pro každý AVCR. Pokud by se tyto pozice IRF poskládaly na jednu křivku napříč různými průměrnými count-rate, znamenalo by to závislost pozice IRF pouze na intervalu od posledního detekovaného fotonu, IPD (ilustrace na Obr. 2.8). Pokud by však pozice IRF pro každý zvolený IPD v jednom AVCR neměnila (avšak měnila se pozice IRF napříč AVCR), znamenalo by to závislost pozice IRF pouze na AVCR, bez vlivu intervalu od předchozího detekovaného fotonu (ilustrace na Obr. 2.9).

Skripty použité pro vyhodnocení (**READ_T3R.m** a **readPTU.m**) jsou popsány v sekci Příloha A.



Obrázek 2.8 Ukázka pozic těžišť IRF pro jednotlivé IPD se závislostí na zpoždění od posledního fotonu – všechny IRF pro stejné IPD jsou na stejné pozici, napříč AVCR



Obrázek 2.9 Ukázka pozic těžišť IRF pro jednotlivé IPD bez závislosti na zpoždění od posledního fotonu – všechny IRF pro jednotlivé AVCR jsou na stejné pozici

2.3 Měření za stacionárních podmínek

2.3.1 Popis experimentu

Pro stacionární podmínky měření bylo zvoleno barvivo Rhodamin 6G. Toto barvivo má ve vodě lifetime (střední doba života fluorescence, tedy doba, kdy intenzita fluorescence poklesne na $1/e$ násobek počáteční intenzity) přibližně 4 ns, tedy jeho dohasínání je mnohem delší než křivka IRF [16]. Jeho emisní maximum je na přibližně 555 nm a jeho absorpční maximum na 525 nm [16]. Tyto vlastnosti ho dělají velmi dobře použitelným pro excitaci Zeleným laserem (532 nm) používaným k měřením IRF. Pro měření byla použita koncentrace barviva 100 nmol/l připravená ředěním nasyceného roztoku. Tato koncentrace v lineární oblasti (mimo oblast saturace fluoroforu) poskytuje požadovanou intenzitu fluorescence [experimentální určení].

Pro měření byla použita časovací technika HydraHarp 400 a nastavení měření bylo velmi podobné tomu při měření IRF. Opakovací frekvence byla ponechána na 20 MHz, pro měření byly použity detektory Perkin Elmer a PicoQuant (v Tabulce 2.1 označen číslem 3) a rozdílných intenzit fluorescence bylo dosahováno pomocí optického atenuátoru laseru. Ohnisko objektivu bylo posunuto cca 250 μm nad horní povrch podložního sklíčka. V této oblasti je již minimální intenzita odrazu od rozhraní, přesto by však intenzita tohoto odrazu přehlušila snímanou fluorescenci. Nutností bylo tedy vložení filtru 550 nm longpass (od firmy AHF) do optické dráhy ze vzorku pro odstínění odraženého záření z excitačního laseru a ponechání pouze fotonů z fluorescence barviva. Před samotným detektorem žádný filtr použit nebyl. Pro měření

byl navíc používán polarizátor pro vyloučení vlivu fluorescenční anizotropie, která by mohla zkreslovat měření [17].

2.3.2 Anizotropie fluorescence

Fluorescence je obecně částečně polarizovaná, protože je vzorek ozařován laserovým paprskem, který je vysoce polarizovaný. Pravděpodobnost absorpce polarizovaného fotonu fluoroforem závisí na úhlu, jaký spolu svírají rovina dipólového momentu a rovina polarizace fotonů. Matematicky je tato pravděpodobnost úměrná $\cos^2 \theta$, kde θ je zmíněný úhel mezi rovinami. Je proto mnohem pravděpodobnější, že polarizovaný paprsek laseru excituje především fluorofory orientované jedním směrem. Proto bude též fluorescence polarizovaná v tomto směru (platí pouze pro statické fluorofory) [17].

Míra anizotropie fluorescence závisí na poměru její doby života a rychlosti rotace fluoroforu. I viskózní roztoky totiž vykazují Brownův pohyb, tedy též rotační difúzi. Pokud je poločas života fluoroforu tak krátký, že se molekula nestihne otočit (rotačně difundovat), je vyzářený foton s vysokou pravděpodobností opět polarizovaný rovnoběžně s elektrickým polem excitujícího fotonu. Toto nastává především ve viskózních prostředích, kde je míra rotační difúze malá. Do určité míry se však tento efekt projevuje i u méně viskózních rozpouštědel jako je voda. [17]

Kvůli tomu je potřeba anizotropii fluorescence korigovat i u roztoků měřených v této práci.

Anizotropie fluorescence je definována jako [17]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{TOT}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.2.1)$$

kde I_{\parallel} je intenzita fluorescence rovnoběžná s excitačním paprskem, I_{\perp} je intenzita fluorescence kolmá na excitační paprsek a I_{TOT} je celková intenzita fluorescence. Tento případ předpokládá symetrii fluorescence podél osy snímaného směru. [17]

Podle průmětů vektorů elektrických polí do os lze definovat, že [17]:

$$I_{\parallel} = k \cdot \cos^2 \theta \quad (2.2.2)$$

$$I_{\perp} = \frac{k}{2} \cdot \sin^2 \theta \quad (2.2.3)$$

kde k je konstanta (odpovídající celkové intenzitě fluorescence) a θ je úhel mezi dipólovým momentem fluoroforu a osou vektoru elektrického pole maxima fluorescence. Dosazením těchto vztahů do vztahu pro anizotropii (rovnice 2.2.1) lze dostat vztah pro anizotropii v závislosti na orientaci fluoroforu, nikoliv na měřených intenzitách [17]:

$$r = \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \quad (2.2.4)$$

Zde je patrné, že anizotropie dosáhne maxima, pokud úhel θ bude roven 0, naopak minima (nulové anizotropie) bude dosaženo, bude-li $\cos^2\theta = \frac{1}{3}$, tedy bude-li $\theta \approx 54,7^\circ$. Tento úhel se též nazývá magickým úhlem [17]. V měřených roztocích bude nutné tento úhel experimentálně nalézt.

Nastavení polarizačního filtru pod magickým úhlem k této nalezené orientaci bude mít za následek odstranění vlivu časového průběhu anizotropie (dle rovnice 2.2.4) na měření. Směr polarizace excitačního záření totiž ovlivňuje dobu života fluoroforu, neboť jsou-li excitovány fluorofory s dipólovým momentem pouze v jednom směru, intenzita fluorescence polarizované rovnoběžně se směrem excitace nejprve klesá rychleji (ubývá dvěma procesy – vyzářením fotonu a rotační difúzí), zatímco intenzita fluorescence polarizované kolmo ke směru excitace ubývá nejprve pomaleji (ubývá vyzářením fotonu, ale přibývá rotační difúzí fluoroforů původně rovnoběžných s excitačním zářením). Proto budou pozorovatelné dvě odlišné doby života – jedna odpovídající době života elektronu na excitované hladině a druhá odpovídající době rotační difúze. Použitím polarizátoru pod magickým úhlem se tyto vlivy navzájem vyruší. Bude tedy pozorována pouze doba života fluoroforu skutečně odpovídající době, jak dlouho se zdrží elektron na excitované hladině.

2.3.3 Vyhodnocení posunů

Při měření fluorescenčního dohasínání za stacionárního count-rate je očekáváno, že pozice křivek dohasínání bude určena pozicí IRF. Při neměnné intenzitě fluorescence by IRF měla být stále na stejném místě (neboť byly vybrány pro měření detektory, jež vykazují závislost časové odezvy na AVCR), a tedy by mělo být možné porovnat, jakou měrou dochází k posunům samotných křivek dohasínání.

Vyhodnocování posunů měřených dohasínání Rhodaminu 6G je kvůli délce lifetime o něco obtížnější než vyhodnocování posunů IRF.

U IRF bylo možné použít vyhodnocení posunu těžiště plochy pod křivkou, protože doba trvání křivky IRF je nanejvýš několik nanosekund. Nasbírat milion fotonů v takto krátkém intervalu znamená, že křivka bude dostatečně hladká a vliv šumu bude v místě sbíraného signálu naprosto minimální.

U měření decay Rhodaminu 6G, který má lifetime 4 ns [16, 18], znamená, že pološířka křivky je řádově větší. Pokud by byl sbírán pouze milion událostí, ty by byly rozprostřeny do řádově většího časového intervalu a křivka z jednoho milionů zaznamenaných fotonů by byla velmi zašuměná. Porovnání plochy pod křivkou by tedy ztrácelo význam, neboť tato plocha by byla z velké míry rozmístěna náhodně.

Protože při zaznamenávání signálu s rostoucí délkou záznamu roste poměr signál-šum pouze s odmocninou času, je-li pološířka dohasínání barviva 10krát delší než pološířka IRF, bude pro stejně hladkou křivku nutné zaznamenat 100krát více dat (a tedy zaznamenávat 100krát déle). Pokud by ale mělo být zaznamenáváno 100 milionů fotonů při intenzitě 3 kcps, jako byla nejnižší intenzita zaznamenávané IRF v kapitole 2.2.1, trvalo by měření téměř 10 hodin. V takto dlouhém intervalu již nelze s jistotou zaručit stacionární měření, ať už kvůli možnému driftu IRF či usazování barviva. Nejdelší provedené měření proto bylo dlouhé přibližně hodinu a nejnižší count-rate fluorescence byl posunut na 10 kcps. Bylo tedy nutné sledovat jiné parametry než plochu pod křivkou, neboť taková křivka zůstala stále mírně zašuměná.

Parametr, který byl nejvíce konzistentní napříč různými měřeními, byla pozice náběžné hrany dohasínání, přesněji bod na náběžné hraně v polovině amplitudy. Tento bod byl získán pomocí spline interpolace. V tomto místě má křivka velký sklon, a proto by zde měl šum mít velmi malý vliv na získaná data.

Protože bylo měření prováděné na TCSPC modulu HydraHarp 400, byly výsledné soubory měření ukládány do souborů PTU, které poté byly vyčteny a zpracovány podle upravené verze skriptu z předchozí části (skript `readPTU_rhodamin.m` je popsán v příloze A).

2.4 Měření za FCS podmínek

Z pohledu vyhodnocení i nastavení experimentu (použité aparatury a detektoru) probíhalo měření stejně, jako měření za stacionárních podmínek. Polarizátor v dráze paprsku byl ponechán pro případ, že by detektory SPAD vykazovaly závislost odezvy na polarizaci dopadajících fotonů (pro vyhodnocení byly použity stejné IRF jako pro vyhodnocení stacionárního měření, neboť měření fluktuujícího signálu bezprostředně následovalo měření stacionárního signálu).

Fluorescence byla tentokrát měřena na difundujících fluorescenčních částicích zvýrazňovače. Barvy ve zvýrazňovačích jsou fluorescenční, avšak ne všechny zvýrazňovače obsahují jejich nanočástice. Je nutné experimentálně vybrat zvýrazňovač, který takové částice bude obsahovat. Toto lze nejjednodušeji provést experimentálně, kdy je naměřen záznam fluorescence pomocí konfokálního mikroskopu a je sledována změna intenzity snímané fluorescence.

Pokud se v roztoku nebudou vyskytovat nanočástice, bude rozpuštěné barvivo difundovat jako samostatné molekuly a výsledný naměřený záznam bude totožný, jako záznam naměřený při stacionárním měření. V tomto případě se totiž do detekčního objemu konfokálního mikroskopu vejde velké množství molekul a tak se v něm poměrné množství molekul barviva nebude příliš měnit (bude-li v detekčním objemu průměrně 1000 molekul barviva, difunduje-li do objemu 10 dalších molekul, bude nově snímaná intenzita téměř totožná).

Pokud však v roztoku budou nanočástice přítomny, lze potom pozorovat veliké výkyvy při měření intenzity, neboť většina barviva (po naředění) bude právě na těchto nanočásticích, nikoliv volně rozpuštěna v roztoku. Poté, bude-li na jedné nanočástici přítomno 1000 molekul barviva, objeví se velký nárůst snímané intenzity, jakmile tato nanočástice připluje do detekčního objemu. Těmto prudkým změnám intenzity se říká tzv. burst [19]. Vzorek s takto fluorescenčními difundujícími částicemi je používán v měřeních FCS, kde lze pomocí autokorelačních (ACF) a kroskorelačních (CCF) křivek určit např. rychlost difúze částice, a tedy její velikost. Těchto měření se týká velké množství používaných metod, např. Burst analysis, FLCS či vícebarevná FLCS. Vícebarevná FLCS byla použita jako metoda v bakalářské práci [4], na kterou tato práce navazuje.

Barvy obsažené v použitém zvýrazňovači nejsou úplně známé, byl použit oranžový zvýrazňovač, jenž standardně obsahuje barviva Basic Yellow 40 [20] (emituje mezi 500 a 560 nm [21]) a Rhodamin F4GK [20] (emituje nad 600 nm [21]). Přesné vlnové délky nejsou známy, neboť se tato barviva běžně pro fluorescenční měření nepoužívají.

Nelze zaručit, že vybraný zvýrazňovač obsahuje přesně tyto barvy, výrobce přesné složení barev neuvádí, lze však předpokládat, že použitá směs barviv v tomto zvýrazňovači bude obsahovat směs xanthanových a kumarinových barviv [20]. Přesné složení barviv by muselo být spektrometricky určeno, což však není součástí této práce, neboť nám postačí libovolné barvivo excitovatelné laserem o 532 nm, které difunduje na nanočásticích obsahujících velký počet fluoroforů a vykazuje tak fluorescenci o výrazně fluktuující intenzitě.

2.5 Analýza dat fluorescenčních měření

Barvivo Rhodamin 6G dohasíná monoexponenciálně, což znamená, že intenzita v čase po excitaci klesá dle následující rovnice:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (2.4.1)$$

kde t je čas uplynulý od excitace (ns), τ je doba života fluorescence – lifetime (ns) a I_0 je intenzita fluorescence v čase $t = 0$ (-).

Monoexponenciální dohasínání odpovídá barvivo, u něž je vyzářen foton pouze při přechodu z jedné elektronové hladiny na druhou, ostatní přechody mezi hladinami, které se objevují, jsou nezářivé (např. konverze na tepelnou energii). Některá barviva mají zářivých přechodů mezi hladinami více. Typicky odpovídá každému přechodu mezi dvěma konkrétními hladinami vlastní lifetime, podle kterého lze případně barvivo identifikovat při FLCS. Má-li barvivo více zářivých přechodů, byla by výsledná intenzita součtem příspěvků jednotlivých intenzit od jednotlivých fluorescenčních přechodů. Poté by dohasínání bylo víceexponenciální [17].

Postup zpracování dat stacionárního měření je následující:

- Je provedena konvoluce matematického modelu (rovnice 2.4.1) a vybrané IRF.
- Konvoluce je prováděna tak dlouho, dokud nejsou určeny parametry τ , I_0 a vzájemný posun mezi IRF a naměřeným dohasínáním, které dosahují nejpřesnějšího výsledku fitu naměřených dat dle chí kvadrát testu (test dobré shody). Parametr τ by měl odpovídat teoretické hodnotě doby dohasínání daného barviva (Rhodamin 6G ~4 ns [16, 18]).
- Fit je proveden pro všechny kombinace IRF a dohasínání naměřené na tomtéž detektoru.
- Fitování je provedeno pouze ve vybraném intervalu zaznamenaného dohasínání, mimo oblast šumu a afterpulsingu (afterpulsing popsán v kapitole 3.1.1).

K tomuto postupu je v práci zkráceně odkazováno jako k fitování, příp. rekonvolučnímu fitování.

Nejprve jsou předpřipraveny TXT soubory s uloženými křivkami dohasínání, které jsou získány pomocí jednoduché úpravy předchozího skriptu pro zpracování IRF závislostí. Tento postup je zvolen z důvodu nižší náročnosti na paměť a výpočetní výkon, kdy při opětovné analýze není nutné analyzovat celý datový soubor měření, ale stačí načíst již jednou zpracované křivky. Po načtení křivek dohasínání jsou postupně načítány jednotlivé IRF detektoru (též předpřipravené do TXT souboru), s nimiž je provedena konvoluce teoretického modelu dohasínání popisovaného rovnicí 2.4.1. Pomocí funkce *fminsearch* v MATLABu je nalezena nejlepší shoda konvoluce IRF s exponenciálním modelem a naměřeného dohasínání podle parametrů chí kvadrát testu. Po nalezení nejlepší shody jsou pro fit zaznamenány parametry doby života fluoroforu, intenzity, vzájemného časového posunu IRF a naměřeného dohasínání a hodnoty chí kvadrát odpovídající daným dvěma porovnáním:

$$\chi^2 = \frac{1}{(n - \text{počet_stupňů_volnosti})} \cdot \sum_{i=0}^n \frac{(x_{i_{\text{fit}}} - x_{i_{\text{histogram}}})^2}{x_{i_{\text{histogram}}}} \quad (2.4.2)$$

Výsledné grafy jsou vyexportovány, aby mohly být vyhodnoceny (do obrázkového formátu pro vizuální vyhodnocení, navíc fity jsou exportovány do TXT formátu kvůli pozdějšímu použití pro vytváření korelačních křivek). Nakonec jsou získané grafy porovnávány a je vybrána nejlepší IRF vhodná pro danou intenzitu zaznamenané fluorescence.

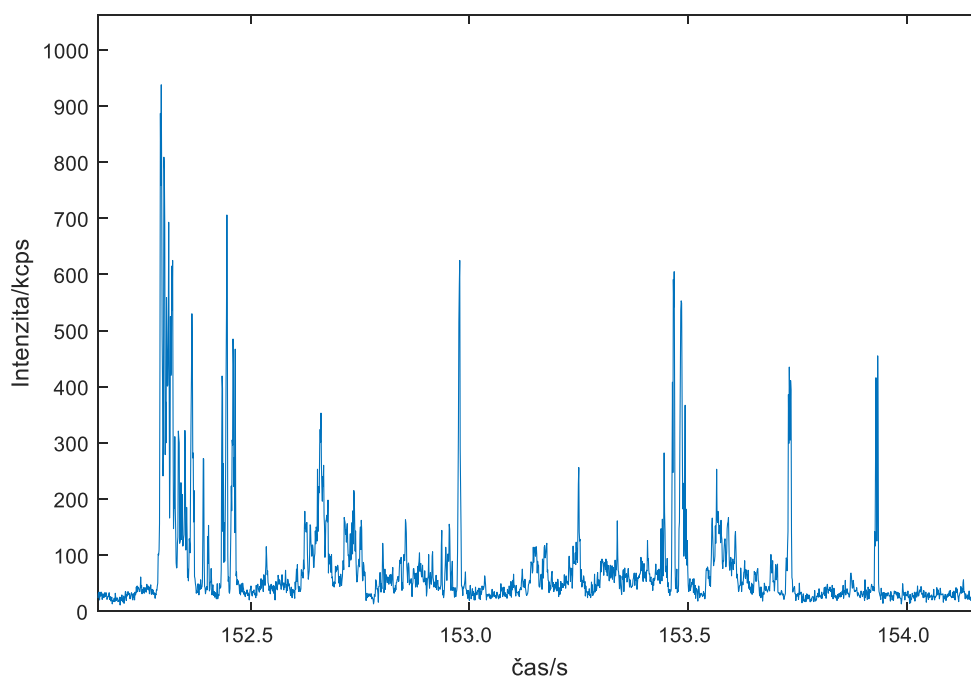
Protože je vzájemný časový posun křivek dohasínání a IRF ponechán při fitování jako volný parametr, ani zde není možné sledovat vliv posunu IRF na přesnost fitu. Tento postup je v obou měřeních zvolen z důvodu, že snímaná fluorescence je zaznamenána na jiné vlnové délce než IRF, a tedy by mohly vznikat nepřesnosti spíše kvůli závislosti odezvy SPAD na vlnovou délku než na detekovanou intenzitu [13]. Vliv změny tvaru IRF však nadále zůstává patrný.

U fluktuujícího signálu měřeného na nanočásticích zvyrazňovače bude porovnán tento způsob analýzy se způsobem analýzy zohledňujícím fluktuující signál.

Data z měření s fluktuující intenzitou jsou nejprve analyzována stejným způsobem jako stacionární měření. Protože se ale intenzita fluorescence v čase výrazně mění, nepředpokládá se vysoká přesnost této metody (ukázka fluktuujícího signálu na Obrázku 2.10). Byla provedena i analýza částí souboru, aby nevznikaly nepřesnosti kvůli příliš velkému množství dat. Množství zaznamenaných událostí v peaku celkové křivky dohasínání u měření fluktuujícího signálu totiž bylo cca 10 krát větší, než množství v peaku křivky IRF. Soubor byl proto rozdělen do deseti stejně dlouhých úseků, z nichž byl každý fitován zvlášť rekonvolučním fitem. Zde se předpokládá přesnost o něco větší.

Metoda zohledňující fluktuující signál je následující:

Z naměřených dat je vytvořen tzv. Time Trace signál (Obrázek 2.10), což je průběh intenzity fluorescence v čase. Je definována délka intervalu Time Trace, pro kterou je počítán count-rate. Dle spočteného count-rate z daného intervalu jsou rozřazovány příslušné fotony do skupin. Fotony s podobným count-rate v tomto intervalu jsou zařazeny do jedné skupiny a ze všech fotonů v jedné takové skupině je následně vytvořena křivka dohasínání na základě jejich časů dohasínání. Vznikne tak série křivek dohasínání vždy specifická pro fotony, jež byly detekovány za určitého count-rate.



Obrázek 2.10 Ukázka průběhu Time Trace signálu – viditelné peaky odpovídají nanočásticím difundujícím skrze detekční objem mikroskopu, které způsobí krátký a prudký nárůst detekované intenzity, nízká intenzita na pozadí odpovídá volnému barvivu, jehož množství je v detekovaném objemu vždy přibližně konstantní. Tento druh signálu se používá při metodě Burst Analysis.

Velikost tříd (intervalů, ve kterých je počítán count-rate) je volena experimentálně. Bylo nutné zvolit takovou velikost, která bude dostatečně selektivní, ale která bude stále projevovat charakteristiku závislosti IRF použitého detektoru (Perkin Elmer i PicoQuant s HydraHarp 400 mají závislost pozice/tvaru IRF na AVCR, jak je zjištěno v této práci, viz kapitola 3.1). Pokud by byl zvolený interval příliš krátký, dané intervaly by obsahovaly velmi malý počet fotonů, a tedy by se mohla spíše projevovat charakteristika závislosti na IPD, kterou detektor Perkin Elmer s HydraHarp 400 nevykazuje téměř žádnou. Vhodný interval byl experimentálně určen jako 1 ms.

Velikost skupin (intervaly podobných count-rate, pro něž je počítána jedna křivka dohasínání) je též volena experimentálně. Pokud budou skupiny příliš široké, budou fotony blízko krajních hodnot count-rate systematicky zneprůhledňovat výsledné fity. Budou-li však skupiny příliš specifické, v mnoha z nich pravděpodobně nebude dostatek dat, ze kterých by bylo možné porovnávat fity, a tak bude zásadní roli hrát šum. Je nutné zvolit střední cestu mezi těmito dvěma extrémy.

Následně je provedena konvoluce matematického modelu s IRF pro různé AVCR, aby byl pro každou křivku nalezen nejlepší fit (stejně jako u stacionárního měření). Opět jsou provedeny fity všech kombinací částečných křivek dohasínání a IRF. Díky tomu bude možné pozorovat, zda se potvrdí předpoklad, že křivky zaznamenané při různých AVCR (buť zde uměle vytvořené výběrem takových count-rate z celkového záznamu) vykazují lepší shodu s fitem vytvořeným pomocí různých IRF hodícím se pro daný AVCR.

Tento postup je proveden též pomocí mezikroků s TXT soubory, aby nebylo nutné vždy analyzovat celý datový soubor. Poté je též využito funkce *fminsearch* v MATLABu a jsou zaznamenány parametry doby života fluoroforu, intenzit jednotlivých složek, vzájemného časového posunu IRF a naměřeného dohasínání a hodnoty chí kvadrát odpovídající daným dvěma porovnáním. Výsledné grafy jsou vyexportovány, aby mohly být vyhodnoceny (do obrázkového formátu pro vizuální vyhodnocení, navíc fity jsou exportovány do TXT formátu kvůli pozdějšímu použití pro vytváření korelačních křivek).

Pro vytvoření timetrace signálu a následné zpracování fluktuujícího signálu je upraven skript pro zpracování IRF ze souborů PTU (`timetrace.m` popsán v Příloze A).

2.6 Vyhodnocení korelace

Z vytvořených TXT souborů fitů celkových křivek dohasínání jsou následně vytvořeny statistické filtry pro autokorelační a kroskorelační křivky (jak pro data ze stacionárního měření, tak pro data z měření fluktuujícího signálu), na kterých je demonstrován vliv zvolené IRF na výsledné korelace.

U stacionárního signálu by měla být korelace nulová, neboť se v záznamu nevyskytují žádné prudké výkyvy intenzity, které by naznačovaly přítomnost difundujících částic – koncentrace barviva je vysoká, že by se molekuly barviva měly jevit jako homogenní roztok. U fluktuujícího signálu by autokorelační křivky měly být kladné, klesající do poloviny amplitudy v difúzním čase dané sledované komponenty. Právě na základě těchto křivek lze z FCS dat určit rychlost difúze fluoroforem značené částice. Velikost částice je poté možné určit z její rychlosti difúze vlivem Brownova pohybu, neboť menší částice bude Brownovým pohybem difundovat rychleji než větší částice.

- Výsledné fity jsou použity pro výpočet statistických filtrů dle rovnice z [7]:

$$\mathbf{F} = \left[\mathbf{M}^T \cdot \text{diag} \langle \mathbf{I} \rangle^{-1} \cdot \mathbf{M} \right]^{-1} \cdot \mathbf{M}^T \cdot \text{diag} \langle \mathbf{I} \rangle^{-1}, \quad (2.4.3)$$

kde \mathbf{F} je hledaný filtr, $\langle \mathbf{I} \rangle$ vektor změřené křivky dohasínání ($\langle \rangle$ značí, že křivka odpovídá průměrné naměřené hodnotě v čase), \mathbf{M} vektor příslušného vzoru (zde fitovací křivka daného barviva) a horní index T značí operaci transpozice.

- Následně je vypočtena ACF a CCF a u fluktuujícího měření jsou porovnány výsledky dosažené pomocí rozdílných IRF.

Skript pro tento úkol mi byl poskytnut Ing. Daliborem Pánkem, Ph.D., mým vedoucím. Jedná se o skript použitý v bakalářské práci Michala Šindeláře. V tomto skriptu mnou byly provedeny úpravy. Skript využívá import externí DLL knihovny, v níž jsou prováděny výpočty. Tato knihovna mnou musela být přepracována na 64-bit verzi použitelnou v 64-bit verzi MATLABu a zároveň v ní mnou byly provedeny úpravy zpracování T3R souborů (v Příloze A **reconvolve.m** a **t3r_dll_64.dll**).

Protože dostupná knihovna podporuje T3R soubory, nikoliv PTU, který je výstupem použitého TCSPC modulu HydraHarp 400, byl mnou vytvořen skript pro konverzi PTU souborů do T3R formátu (v Příloze A **PTUtoT3R.m**).

Ve MATLABu je nejprve načten soubor s naměřenými daty (T3R) pomocí upraveného skriptu od Ing. Dalibora Pánka, Ph.D. (skript **flcs_hist.m** popsáný v Příloze A) a k němu křivka dohasínání (odpovídající danému AVCR) s příslušnými fity. Pro jednotlivé složky dohasínání je vypočítán statistický filtr dle rovnice 2.4.3., jenž je následně použit pro výpočet ACF obou barviv pomocí algoritmu, jenž odpovídá vzorci:

$$G(\tau) = \frac{\langle \partial F(t) \cdot \partial F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (2.4.4)$$

kde $F(t)$ je intenzita fluorescence v čase vynásobená hodnotou statistického filtru této složky, τ prodlevu, po které je intenzita fluorescence porovnávána, δ okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty a $\langle \rangle$ značí průměrnou hodnotu v čase [19].

Pro výpočet CCF byl použit analogický vzorec:

$$G(\tau) = \frac{\langle \partial F(t) \cdot \partial F'(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle \cdot \langle F'(t) \rangle}, \quad (2.4.5)$$

kde $F'(t)$ značí intenzitu fluorescence vynásobené statistickým filtrem jiné fluorescenční složky než $F(t)$.

U měřeného stacionárního signálu jsou porovnávány pouze ACF, neboť se v roztoku vyskytovala pouze jedna složka. Je vypočtena ACF s korekcí na pozadí (pomocí vypočteného filtru vzorcem 2.4.3) a ACF bez korekce na pozadí (filtr je definován v každém bodě křivky dohasínání na hodnotu 1). Lze proto určit vliv pozadí na získané ACF a určit důležitost použitého filtru pro každý použitý detektor (Perkin Elmer a PicoQuant, v Tabulce 2.1 označen číslem 3).

U naměřeného fluktuujícího signálu jsou porovnány vlivy fitů celkové křivky dohasínání dosažené pomocí různých IRF na tvary ACF a CCF odpovídající celému měření. Jsou počítány dvě ACF (neboť v kapitole 3.3.1 jsou určeny dvě složky v roztoku zvyrazňovače) a kroskorelace mezi nimi. Tímto lze určit, zda jsou v roztoku dva druhy nanočástic (každý značený jedním barvivem), nebo nanočástice značené smíšeně (nebo např. jen jedním víceexponenciálním barvivem).

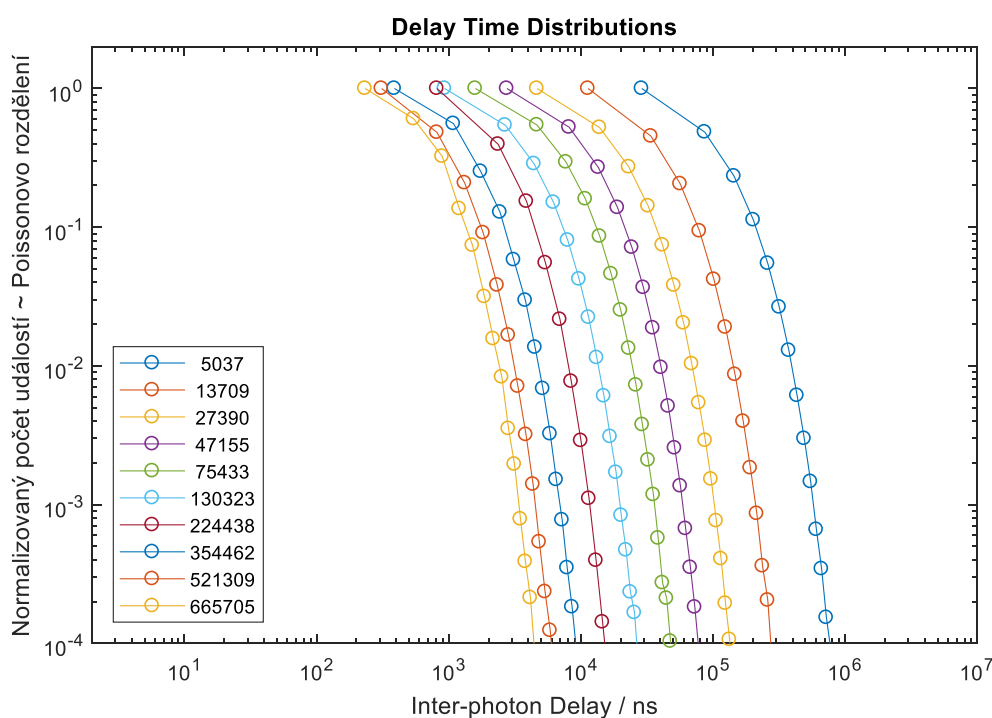
3 Výsledky a diskuze

3.1 Vyhodnocení závislostí IRF

Po vynesení závislostí do grafů je možné závislosti IRF porovnat pro různé detektory s různými časovacími technikami. Všechny vynesené grafy mají stejné velikosti měřítka, aby bylo porovnání co nejnázornější, a jsou uvedeny v Příloze B.

Nejprve je vynesena první závislost:

Byl vytvořen histogram intervalů foton-foton (IPD) pro každý měřený AVCR. Grafy jsou vyneseny na Obrázcích B.1, B.5, B.9 atd. v Příloze B – Delay Time Distributions. Měřítka grafů jsou sjednocena pro snadnější porovnávání. Ukázka tohoto grafu je na Obrázku 3.1 (odpovídá B.13).



Obrázek 3.1 Rozložení četností IPD pro různé AVCR (v legendě v cps) při měření IRF u detektoru č. 2 (Perkin Elmer) na TCSPC modulu TimeHarp 200 s modrým laserem

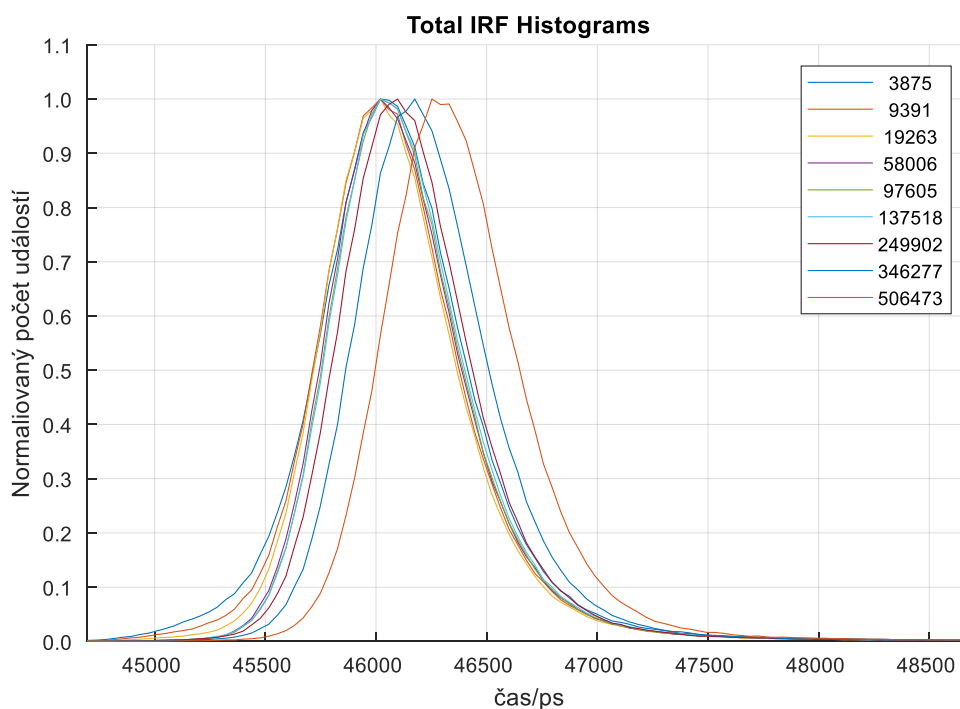
Nejprve, z prvních grafů bylo zjištěno, že u všech měřených detektorů jsou všechny četnosti IPD řízeny Poissonovskou statistikou. Tím je ověřen předpoklad z konce kapitoly 2.2.3. Pokud by rozdělení těchto fotonů nebylo podle Poissonovské statistiky, znamenalo by to, že se při měření zanesla do dat chyba, která by velice pravděpodobně ovlivňovala dosažené výsledky.

Byly měřeny i případy, kdy 5% podmínka TCSPC dodržována nebyla a jak bylo vysvětleno v kapitole 2.1.1 a na Obrázku 2.3, v těchto případech již není vhodné brát naměřené výsledky závazně. Dokonce je u nejrychlejších měřených AVCR znatelná deformace správného Poissonovského rozdělení, u kterých byly pozorovány nejkratší

IPD (a tedy se jedná o křivky nejvíce vlevo). Vždy se jedná o případy, kdy bylo měřeno na TCSPC modulu TimeHarp 200 (tedy s periodou laseru 100 ns) při AVCR větších než 500 kcps. Ukázka, že rozdělení je Poissonovské, je na Obrázku 3.1 (odpovídá obrázku B.13 v Příloze B), na kterém jsou u vysokých AVCR vidět artefakty pile-up efektu (křivky pro nejvyšší AVCR se u nejkratších IPD nepravidelně překrývají).

Druhý sledovaný graf je samotnou IRF:

Byl vynesena histogram detekčních časů fotonů (interval pulz-foton) pro každý měřený AVCR (start-stop-time na Obrázku 2.5), jež je měřenu křivkou IRF. Grafy jsou vyneseny na Obrázcích B.2, B.6, B.10 atd. v Příloze B – Total IRF Histograms. Měřítka grafů jsou sjednocena pro snadnější porovnávání, osa x znázorňuje vždy trvání 4 ns, amplituda IRF je normalizovaná. Ukázka je uvedena na Obrázku 3.2 (odpovídá Obrázku B.2).



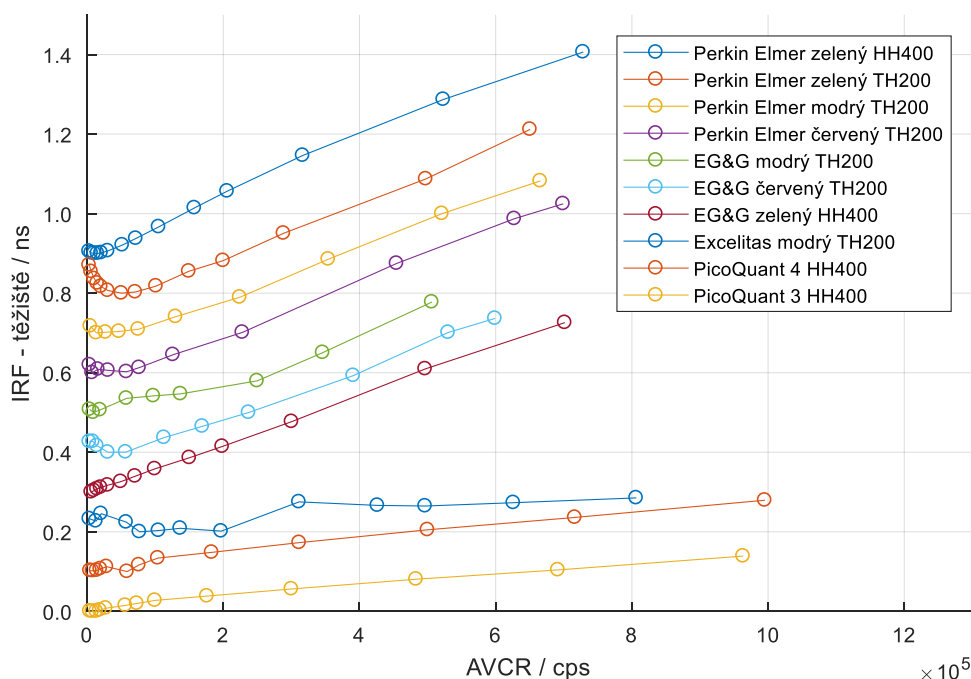
Obrázek 3.2 Grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps), detektor č. 1 (EG&G) s modrým laserem na TCSPC modulu TimeHarp 200

Zhodnotíme-li na průběh IRF, všechny detektory vykazovaly IRF s ostrým hlavním peakem (detektory EG&G a Perkin Elmer navíc s vedlejším peakem viditelným např. na Obrázku 3.10 zeleně). Šířka (FWHM) peaku IRF je důležitá pro časové rozlišení detektoru, neboť čím kratší IRF bude, tím snáze na detektoru půjde rozlišit např. dohasínání fluoroforů s mírně odlišnými lifetime. Nejmenší pološířku mají (dle Obrázků B.30 a B.34 v Příloze B) IRF detektorů PicoQuant, největší pološířku má detektor Excelitas (Obr. B.38 v Příloze B). U detektorů EG&G a Excelitas se navíc FWHM pulzu se změnou AVCR výrazně nemění a zůstává vždy přibližně konstantní, zatímco u detektorů Perkin Elmer a PicoQuant se s vyšším AVCR doba trvání odezvy

(FWHM) prodlužuje – u detektoru PicoQuant je to přibližně 100 ps při změně AVCR z cca 3 kcps na 950 kcps, u detektoru Perkin Elmer je tato změna násobně výraznější (více k chování detektoru Perkin Elmer dále).

Jako třetí jsou sledovány posuny těžiště plochy pod křivkou IRF:

Byla vynesena závislost pozice IRF (těžiště plochy pod křivkou IRF) na AVCR. Grafy jsou vyneseny na Obrázcích B.3, B.7, B.11 atd. v Příloze B – Count Rate Dependence. Měřítka grafů jsou sjednocena pro snadnější porovnávání, osa y znázorňuje vždy posun 1 ns. Výsledky pro všechny měřené detektory a soustavy jsou souhrnně uvedeny na Obrázku 3.3.



Obrázek 3.3 Závislosti těžiště IRF na AVCR pro rozdílné detektory. Absolutní hodnoty na ose y jsou zvoleny libovolně (pro přehlednost jsou křivky rozmístěny 0,1 ns od sebe), o posunech nevypovídají absolutní pozice křivek, ale jejich průběh, kterým je udávána změna pozice IRF oproti ostatním pozicím daného měření. V legendě uveden daný detektor s označením laseru podle Tabulky 2.2 a použitým TCSPC modulem (TH200 = TimeHarp 200, HH400 = HydraHarp 400).

Na Obrázku 3.3 jsou srovnány posuny těžišť IRF všech detektorů. Pozice křivek byla pro každou kombinaci detektoru a laseru odlišná, neboť závisí mimo jiné na délce kabelů a nastaveném elektronickém zpoždění – zde je však důležitá relativní pozice křivek vůči sobě v rámci jednoho měření. Proto mohly být pozice křivek zvoleny za účelem snadného porovnání (vzdálenost jednotlivých křivek na ose y je nastavena jako 0,1 ns), avšak velikosti posunů v rámci každé křivky odpovídají měřítku.

Z grafů závislostí těžišť IRF byl zjištěn celkový posun těžiště IRF při změně AVCR. Zde lze rozlišit dva typy závislostí. Prvním z nich je závislost, kdy se IRF s rostoucím AVCR vždy posouvá k pozdějším časům. Nejkratší odezva na foton je tedy u nejnižších AVCR. Takováto závislost je patrná u detektoru EG&G s modrým laserem

s TCSPC modulem TimeHarp 200 (na Obr. 3.3 světle zeleně) nebo se zeleným laserem s TCSPC modulem HydraHarp 400 (na Obr. 3.3 vínově), u detektoru Perkin Elmer se zeleným laserem s TCSPC modulem HydraHarp 400 (na Obr. 3.3 tmavě modře nahoře) nebo u detektorů PicoQuant (na obr. 3.3 žlutě a oranžově dole). Průběh těchto posunů je přibližně lineární mimo detektor EG&G s modrým laserem, kde je posun sice monotónně rostoucí, avšak nazvat ho lineárním průběhem nelze.

Druhým typem závislostí je posun IRF k pozdějším časům u vyšších AVCR, avšak pro nízké AVCR se objevuje posun IRF ke kratším časům. Takto závislé detektory tedy mají určitý AVCR, při němž je jejich odezva na foton nejkratší. Nejlépe je tato závislost vidět u detektoru Perkin Elmer měřeného se zeleným laserem na TCSPC modulu TimeHarp 200 (na Obr. 3.3 oranžově nahoře). Důvod těchto rozdílných závislostí není dobře znám a pravděpodobně souvisí s použitou elektronikou daných SPAD TCSPC modulů. Je zřejmé, že určitou roli musí hrát i mírně odlišná odezva na různé vlnové délky.

Poslední měřený detektor Excelitas nevykazuje ani jeden z těchto dvou typů závislostí, jeho posun IRF se vyskytuje skokově – nejprve ke kratší odezvě, poté skokově zpět na původní pozici k delší odezvě (na Obr. 3.3 tmavě modře dole). Tyto skoky pozice IRF jsou však v porovnání s celkovými posuny u ostatních detektorů menší.

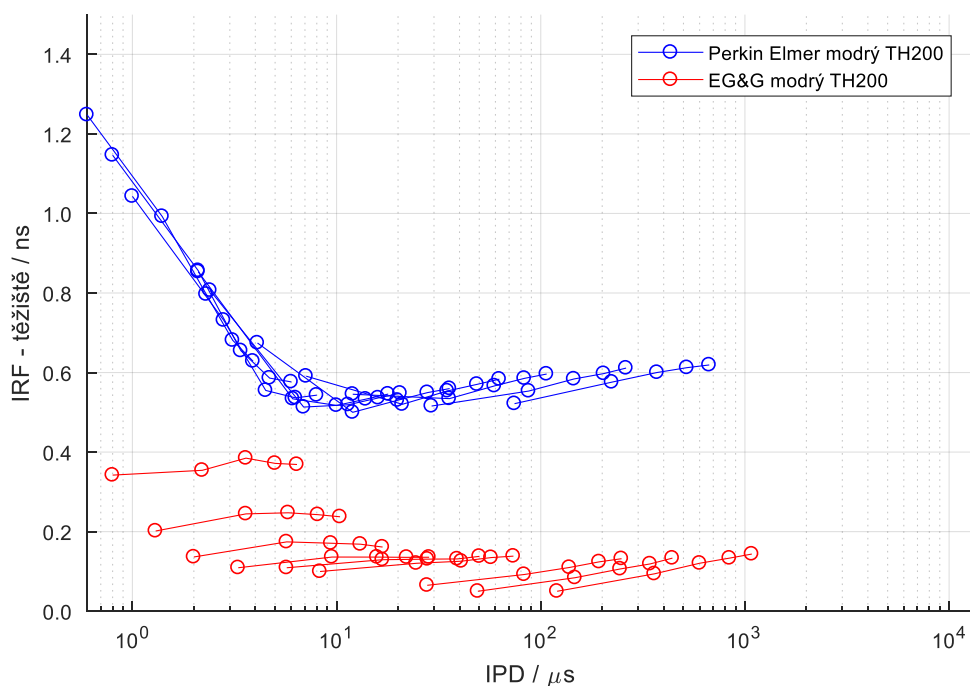
Poslední, čtvrtá sledovaná závislost se zaměřovala na jednotlivé IPD:

Je sledována pozice IRF pro různá zpoždění foton-foton (pro každý průměrný count-rate je vybráno 5 nejčtetnějších IPD). Grafy jsou vyneseny na Obrázcích B.4, B.8, B.12 atd. v Příloze B – Delay Time Dependence. Měřítka grafů jsou sjednocena pro snadnější porovnávání, osa y znázorňuje vždy posun 1 ns. Ukázky těchto závislostí pro detektory Perkin Elmer a EG&G s modrým laserem na TCSPC modulu TimeHarp 200 jsou na Obrázku 3.4.

Z těchto grafů je zjištěno, zda je posun IRF způsoben vlivem rozdílné odezvy na každý jednotlivý foton s rozdílným IPD (viz Obrázek 2.8), nebo je IRF posouvána jako celek s rozdílným AVCR (viz Obrázek 2.9). Postup je rozebrán v kapitole 2.2.4.

Detektor EG&G vykazuje na všech soustavách posuny IRF odpovídající Obrázku 2.9, tedy posun závisí na AVCR, nikoliv na IPD (na Obr. 3.4 červeně). Stejným způsobem se chovají i detektory PicoQuant.

Detektor Excelitas v tomto případě vykazuje kombinovanou závislost. S kratším IPD se v rámci jednoho AVCR odezva zrychluje a IRF se pro tyto fotony posouvá směrem ke kratším časům (tento sklon je mírně vidět i u detektoru EG&G na Obr. 3.4 pro delší IPD), zatímco závislost posunu IRF na AVCR je skoková, jak bylo popsáno výše.



Obrázek 3.4 Ukázka průběhu těžišť IRF vypočtených v pěti nejčtenějších IPD každého měřeného AVCR pro detektory Perkin Elmer a EG&G měřeny pomocí modrého laseru na TCSPC modulu TimeHarp 200

Detektor Perkin Elmer vykazuje chování ze všech zkoumaných detektorů nejrozmanitější. Na TCSPC modulu TimeHarp 200 vykazuje chování naprosto rozdílné od chování všech ostatních měřených detektorů a to pro všechny vlnové délky (ukázka na Obr. 3.4 modře). Závislost, kterou vykazuje, je totiž striktně na IPD a nikoliv na AVCR, jak bylo prezentováno na Obrázku 2.8 (jednotlivé charakteristiky jsou vidět na Obrázcích B.16, B.20 a B.24 v Příloze B). Stejně chování bylo popsáno v [6]. Z ostatních provedených měření vyplývá, že charakteristika zjištěná v [6] je však jen jednou z několika možných charakteristik IRF u SPAD detektorů. Ukázka pozic těžišť IRF jednotlivých IPD napříč AVCR pro detektory Perkin Elmer a EG&G je na Obrázku 3.4.

Úplně jiné chování však detektor Perkin Elmer vykazuje na TCSPC modulu HydraHarp 400. Závislost vykazovaná zde je velmi podobná závislostem ostatních detektorů, tedy pouze na AVCR a nikoliv na IPD (Obrázek B.28 v Příloze B). Z tohoto jasně vyplývá, že závislost časové odezvy není způsobena pouze samotným detektorem (či jejich zhášecími obvody, jak je naznačeno v [3]), ale významnou roli hraje i vybraný TCSPC modul.

3.1.1 Charakteristiky detektorů

Míra závislosti posunu odezvy detektorů při změně AVCR se výrazně liší. Nejmenší závislost posunu IRF je pozorovatelná u detektorů PicoQuant (mimo detektor Excelitas, jež nevykazuje ani vzdáleně lineární charakteristiku) – u obou testovaných modulů je posun cca 1,5 ps při změně count-rate o 10 kcps. Naopak nejvyšší posun je u

detektorů EG&G a Perkin Elmer, u nichž při všech konfiguracích (různé lasery a různé TCSPC moduly) vychází posun přibližně 6–7 ps při změně count-rate o 10 kcps. Ne všechny posuny jsou však monotónní, v některých případech se objevoval u nízkých AVCR posun opačným směrem, jak bylo zmíněno výše. Tyto opačné posuny do průměrných posunů nebyly započítány, zmíněné posuny platí pro rostoucí části křivek.

Z tohoto pozorování lze vyvodit, že se obecně charakter posun IRF v závislosti na detekované vlnové délce nemění, alespoň v rámci středních a vyšších AVCR. Je však specifický pro každý detektor. Přestože jsou tedy časové odezvy detektorů na různé vlnové délky velmi odlišné [13] (bylo pozorováno u stejných detektorů při použití jiného laseru, viz obrázky v Příloze B), velikosti posunů při změně AVCR zůstávají přibližně konstantní. Navíc, detektory vykazují stejnou závislost i za 5% hranicí TCSPC podmínky měření.

Obecně lze říci, že většina testovaných detektorů SPAD vykazuje posuny IRF směrem k pozdějším detekčním časům s rostoucím AVCR (pro count-rate vyšší než cca 50 kcps, pro nízké AVCR je směr posunu nekonzistentní). Toto platí nezávisle na detekované vlnové délce. U jediného detektoru (Excelitas) tuto závislost nelze jednoznačně určit. Jeho závislost časové odezvy není monotónní, byť je jednoznačně nejmenší.

Co se užití detektorů týče, každý má různé výhody a nevýhody. Detektor Excelitas vykazuje velmi malé posuny IRF se změnou count-rate, avšak na druhou stranu není tato mírná závislost směrem pouze ke kratším nebo delším časům, navíc FWHM odezvy tohoto detektoru je ze všech nejdelší (nepočítáme-li jeden případ vysokého AVCR na detektoru Perkin Elmer s TCSPC modulem HydraHarp 400).

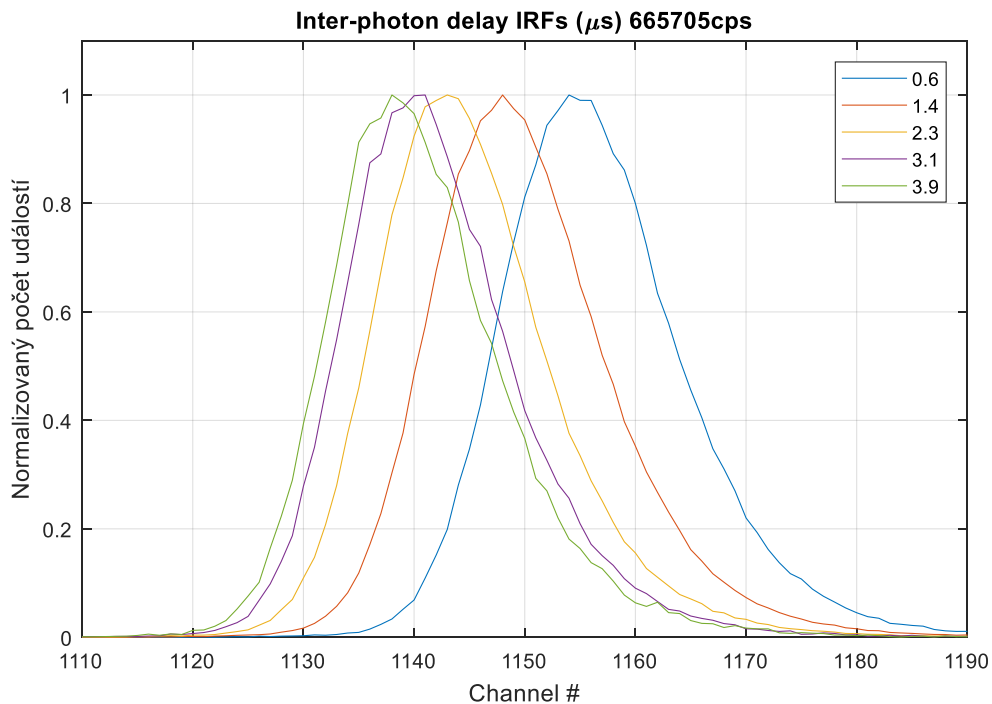
Detektor PicoQuant má též velmi malou (a monotónní, dá se říci lineární) závislost časové odezvy na měnícím se AVCR, navíc FWHM jeho IRF je velmi malá. Zároveň mají tyto detektory nízký temný šum (při testování pozorován cca 3x menší než u všech ostatních měřených detektorů), na druhou stranu se u nich ale projevuje velmi výrazný efekt afterpulsingu (viz dále).

Detektor EG&G má strmější (avšak stále monotónní) závislost časové odezvy na změnu AVCR a jeho FWHM měřených IRF je zhruba uprostřed mezi FWHM detektorů Excelitas a PicoQuant. Temný šum detektoru je mírně vyšší (srovnatelný s temným šumem detektorů Excelitas a Perkin Elmer), avšak afterpulsing je téměř zanedbatelný.

Detektor Perkin Elmer má téměř zanedbatelný afterpulsing, FWHM jeho IRF je srovnatelná s těmi detektoru EG&G (byť se FWHM u vyšších AVCR mění) a jeho temný šum je srovnatelný s ostatními detektory mimo PicoQuant. Na druhou stranu se jeho závislost časové odezvy odvíjí od použitého TCSPC modulu. To je velmi nevýhodné, neboť provede-li se na datech korekce posunů kvůli IPD např. na TimeHarp 200 (podle [6]), při přenesení detektoru na TCSPC modul HydraHarp 400 je takováto korekce nepoužitelná.

Používání detektoru Perkin Elmer na více TCSPC modulech bude tedy znamenat násobně více programování pro úpravu výsledků od systematických chyb, na rozdíl od detektoru EG&G, který vykazoval stejnou závislost časové odezvy na obou TCSPC modulech.

Dále, změna FWHM detektoru Perkin Elmer na TCSPC modulu TimeHarp 200 je snadno vysvětlitelná. Protože částečným IRF pro jednotlivé IPD v rámci jednoho AVCR náleží rozdílná doba odezvy (především u krátkých IPD pod $\sim 5 \mu\text{s}$), tyto jednotlivé IRF se nepřekrývají, a tedy jejich součet (celková IRF pro daný AVCR) je širší (Obrázek 3.5).



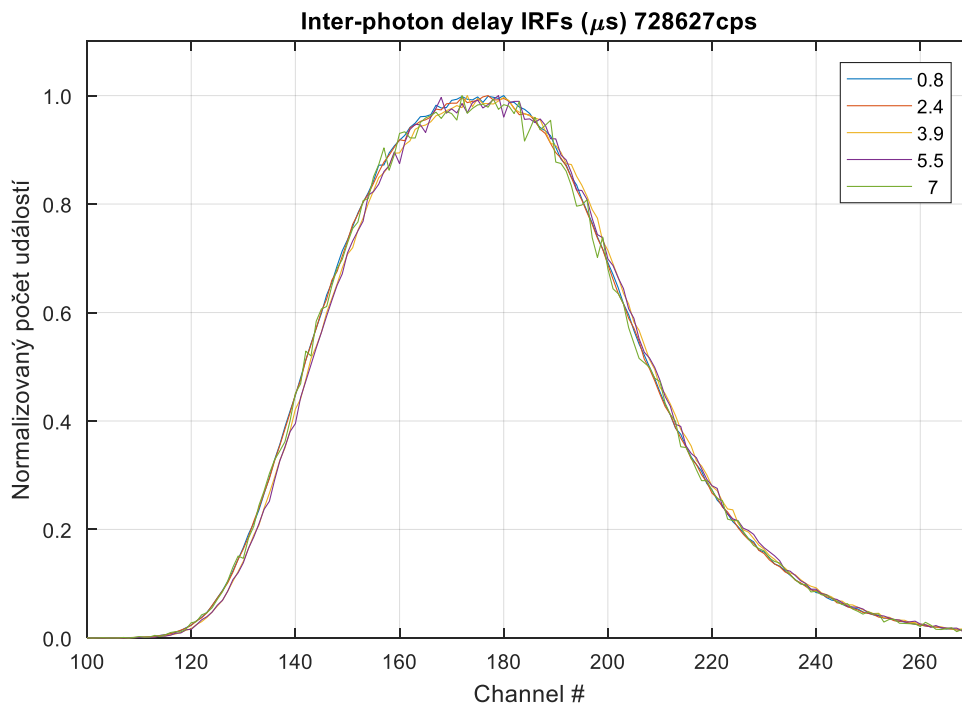
Obrázek 3.5 Jednotlivé IRF pro IPD (v legendě v μs) pro AVCR $\sim 666 \text{ kcps}$ na detektoru Perkin Elmer s modrým laserem a TCSPC modulem TimeHarp 200. Ukázka posunů částečných IRF viditelných na Obrázku B.16 (srovnatelné s posuny viditelnými na Obrázcích B.20 a B.24) v oblasti krátkých IPD (pod $5 \mu\text{s}$). Rozlišení 39 ps/channel.

Na TCSPC modulu HydraHarp 400 je však změna FWHM ještě výraznější, avšak nelze ji vysvětlit snadným způsobem jako v případě předchozím. Doba trvání IRF se prodlužuje při všech IPD, tedy zde není rozšíření výsledkem součtu různě posunutých částečných IRF (Obrázek 3.6).

Nakonec, efekt již zmíněného afterpulsingu může ovlivňovat měření, především u velmi nízkých count-rate. Při detekci fotonu SPAD detektorem dochází ke vzniku průrazového proudu a lavinovým efektem se generuje velké množství nosičů náboje. Po odeznění pulzu mohou některé nosiče náboje uváznout uvnitř hradlové vrstvy. Tento nosič náboje se postupně vlivem tepelného pohybu uvolní, čímž způsobí lavinovým efektem další pulz přes SPAD, který nebude odezvou na foton, ale na uvolnění tohoto nosiče náboje. Tento náboj se vlivem tepelné excitace může uvolnit kdykoliv (typicky

v časech o několik řádů delších než doba periody excitačního laseru), tedy výsledný efekt nebude ovlivňovat tvar dohasínání, pouze zvýší pozadí ve všech detekčních kanálech [22].

Kde se však tento jev bude promítat do výsledků, je ACF. U ACF bude totiž vždy toto uvolnění uvázané nosiče náboje korelováno s událostí, která ho vyvolala, a tedy na ACF bude patrná další ke korelaci přispívající složka s korelačním časem rovnému době, za kterou se průměrně uvolní tyto nosiče náboje náboje z hradlové vrstvy. Vizuálně tedy bude patrné zkreslení tvaru ACF (popisováno v kapitole 3.4.1) [22].



Obrázek 3.6 Jednotlivé IRF pro IPD (v legendě v μs) pro AVCR ~ 730 kcps na detektoru Perkin Elmer se zeleným laserem a TCSPC modulem HydraHarp 400. Ukázka posunů částečných IRF viditelných na Obrázku B.28 v Příloze B (na rozdíl od Obrázků B.16, B.20 a B.24 v Příloze B mění IRF tvar pro každý IPD stejným způsobem). Rozlišení 39 ps/channel.

3.2 Vyhodnocení měření za stacionárních podmínek

V této kapitole jsou vyhodnocena měření dohasínání fluorescence při konstantní intenzitě snímaného signálu, což znamená, že průměrná intenzita v makroskopickém časovém měřítku zůstává konstantní. Za těchto podmínek bylo očekáváno, že je pozice křivky dohasínání ovlivněna striktně pozicí IRF, neboť pro konstantní intenzitu fluorescence je daná IRF vždy stejná. Proto je předpokládán, že lze jednoduše nalézt pro libovolnou intenzitu dohasínání fluorescence vhodnou intenzitu pro měření IRF, která povede k dobrému fitu křivky dohasínání.

3.2.1 Nastavení polarizátoru

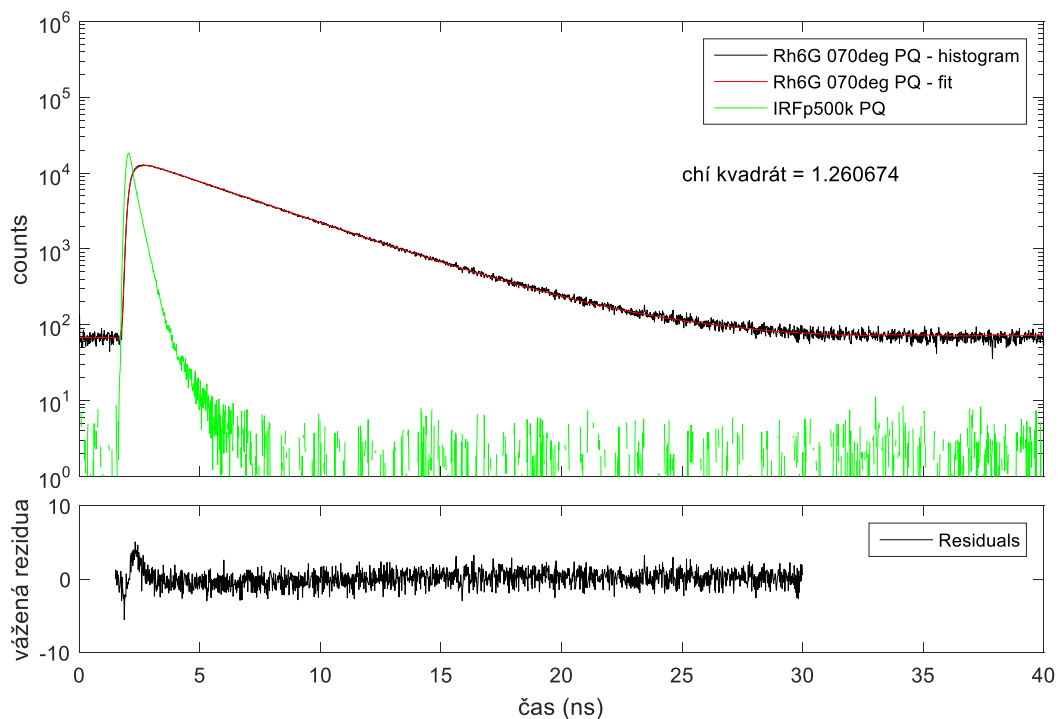
Stacionární fluorescence byla měřena na dohasínání rozpuštěného barviva Rhodamin 6G ve vodě na časovací technice HydraHarp 400. Do dráhy svazku byl nejprve vložen polarizátor, u něhož musela být určena správná orientace pro vyloučení zmíněné anizotropie. Správná pozice polarizátoru byla určena pomocí detektoru PicoQuant, který vykazoval při měření menší změnu pozice a tvaru IRF při změně AVCR. Pokud by byl použitý pro nastavení detektor Perkin Elmer, jehož tvar IRF závisí na AVCR (podle obrázku B.26 v Příloze B), bylo by možné, že nebude dosaženo dostatečně dobré shody nikoliv vlivem špatného nastavení polarizátoru, ale vlivem použití nevhodné IRF.

Z předchozích měření na Rhodaminu 6G prováděných bez polarizátoru bylo určeno, že se tvar IRF u detektoru PicoQuant se změnou AVCR nemění. Bylo dosaženo tohoto závěru, protože při různých intenzitách fluorescence Rhodaminu 6G po provedení konvoluce IRF (naměřených při různých intenzitách) s teoretickým modelem pro všechny intenzity fluorescence (při ponechaném volném parametru vzájemného posunu křivek, což kompenzuje změnu pozice IRF) vykazovala nejlepší shodu mezi fitem a IRF naměřenou při jedné intenzitě, a to přibližně 500 kcps (avšak vlivem anizotropie tyto fity vycházely s hodnotou chý kvadrát přibližně 2).

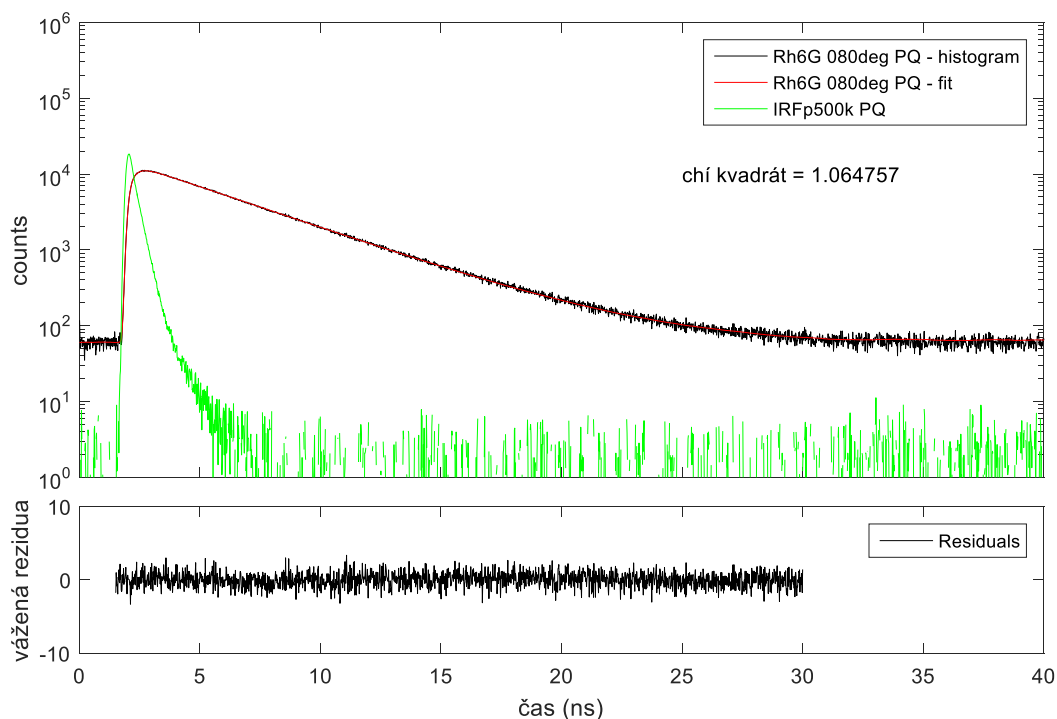
Proto byla konvoluce teoretického modelu provedena s IRF naměřenou při intenzitě právě 500 kcps, podle níž bylo provedeno nastavení úhlu polarizátoru. Byla též provedena kontrola provedením konvolucí s IRF při jiných intenzitách (blíže intenzitě fluorescence Rhodaminu 6G), kde byla též nalezena nejlepší shoda pro totožný úhel, avšak shoda fitu s naměřenou křivkou byla menší, než u IRF pro 500 kcps.

Na obrázcích 3.7 až 3.9 jsou vidět tři vybrané grafy, podle kterých byl určen úhel polarizátoru odpovídající magickému úhlu. Velikosti úhlů v legendě jsou úhly vztahované ke zvolené referenční poloze, nejedná se o úhly mezi excitačním a emitovaným svazkem. V grafu jsou uvedeny hodnoty chý kvadrát určující přesnost shody mezi naměřeným průběhem dohasínání a vypočteným fitem.

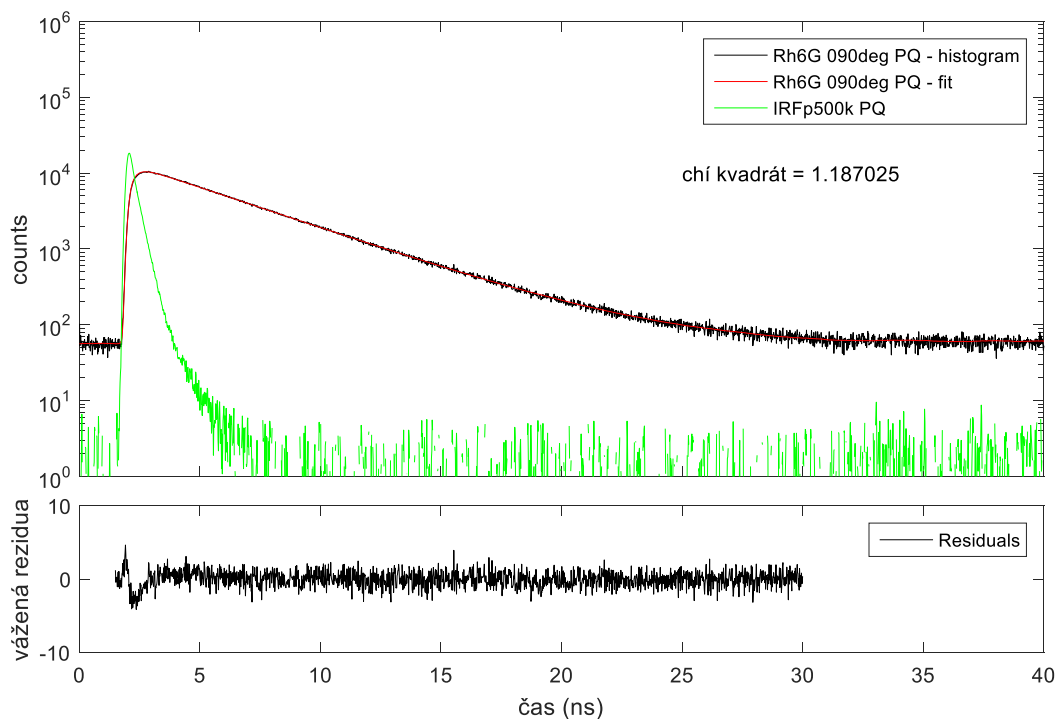
Pro ilustraci jsou uvedeny grafy rozdílů výsledku otočením polarizátoru o 10° . V okolí magického úhlu byl krok měření 1° . Postup výpočtu fitu je uveden v kapitole 2.5.



Obrázek 3.7 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G na detektoru PicoQuant při nastavení polarizátoru o 10° na jednu stranu od magického úhlu, v dolním grafu je vidět nepřesnost fitu v náběžné hraně vlivem nevyrušené anizotropie.



Obrázek 3.8 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G na detektoru PicoQuant při nastavení polarizátoru na magický úhel, v dolním grafu je vidět vyrušený vliv anizotropie na nepřesnost fitu.



Obrázek 3.9 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G na detektoru PicoQuant při nastavení polarizátoru o 10° na druhou stranu než Obr. 3.7 od magického úhlu, v dolním grafu je vidět nepřesnost fitu v náběžné hraně vlivem nevyrušené anizotropie.

3.2.2 Analýza křivek dohasínání

S tímto určeným nastavením polarizátoru poté bylo provedeno měření stacionární fluorescence Rhodaminu 6G pro rozdílné intenzity.

U detektoru Perkin Elmer bylo pozorováno, že volba IRF je velmi důležitá pro vytváření vhodného fitu. Z měření lze určit, při jaké intenzitě by měla být měřena IRF pro danou intenzitu fluorescence. Toto je způsobeno změnou tvaru IRF při změně AVCR, která je u detektoru Perkin Elmer na HydraHarp 400 výrazná, neboť vzájemný časový posun je při výpočtu ponechán jako volný parametr, aby byla nalezena nejlepší shoda a vyloučen vliv posunu IRF vlivem rozdílné vlnové délky měřené fluorescence a IRF.

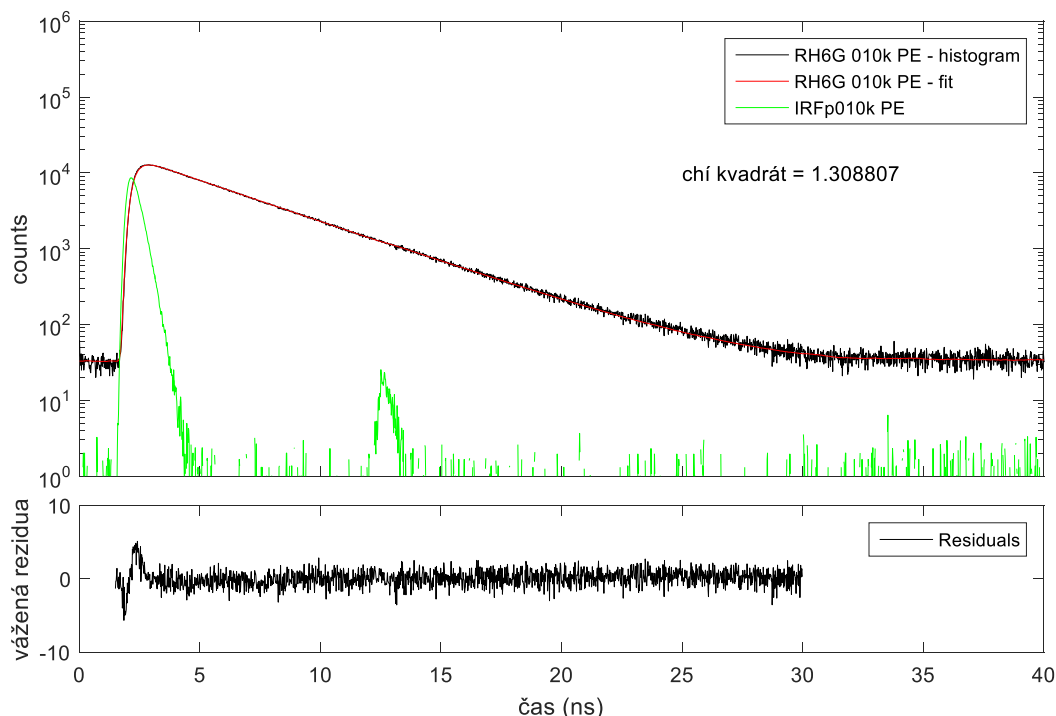
Pokud by měl být časový posun zafixován, musela by IRF být měřena při stejné vlnové délce, jako měřená fluorescence. To u stacionárního měření není problém, stačí do silně koncentrovaného vzorku měřeného barviva přidat zhášedlo – např. spektroskopicky čistý jodid draselný, který způsobuje dynamické zhášení fluoroforu.

Dynamické zhášení je způsobeno vlivem kolizí molekul fluoroforu a zhášedla. Pokud se molekuly srazí, dojde k deexcitaci fluoroforu. Tím je narušeno jeho přirozené dohasínání. Bode-li v roztoku vysoká koncentrace zhášedla (jodid draselný je velmi dobře rozpustný ve vodě, tedy není obtížné dosáhnout vysoké koncentrace), jen

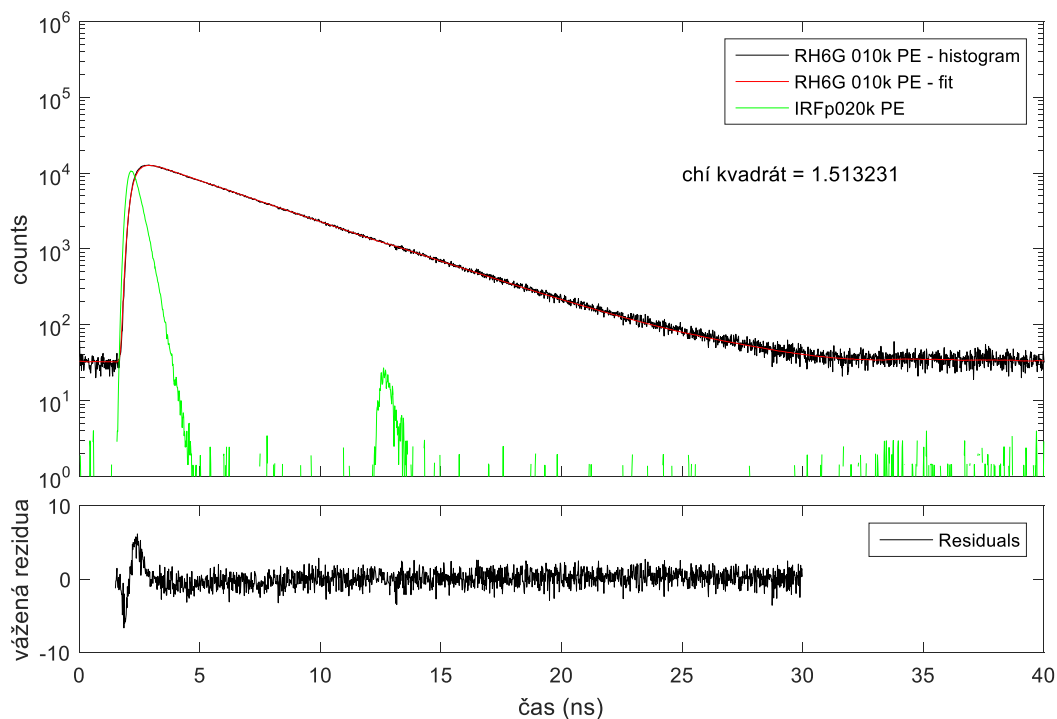
zanedbatelné množství molekul fluoroforu vydrží excitované delší dobu. Čím vyšší bude koncentrace zřáseďla, tím vyšší bude pravděpodobnost jeho srážky s fluoroforem, a tedy bude množství excitovaných molekul fluoroforu rychleji ubývat [17]. Rychlejší úbytek znamená krátký lifetime takového vzorku a ve skutečnosti bude šířka takové křivky dohasínání fluorescence srovnatelná s šířkou IRF.

Jak bylo zmíněno, tento postup je možné použít, měříme-li pouze jedno barvivo v roztoku. Pokud je v roztoku více fluoroforů nebo fluorofor s více zářivými přechody, je pravděpodobné, že zhášení obou těchto přechodů nebude probíhat stejnou měrou, a tak měření IRF bude mít odlišné zastoupení složek s danými vlnovými délkami, než při snímání fluorescence. To je případem u měření fluktuující fluorescence. Proto byl zvolen postup s volným posunem IRF a měřené fluorescence, aby byla data stacionárního a fluktuujícího měření zpracována stejným způsobem.

Na obrázcích 3.10 a 3.11 je zobrazeno porovnání fitů křivek dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě 10 kcps na detektoru Perkin Elmer při použití IRF naměřených při intenzitě 10 kcps a 20 kcps. IRF měřená při vyšší intenzitě dává horší shodu, než IRF naměřená při intenzitě 10 kcps. Použitím IRF při ještě vyšší intenzitě je shoda čím dál menší. Zde by byla vhodná IRF naměřená s intenzitou menší než 10 kcps, protože ale nebyla taková IRF měřena, intenzita vhodné IRF nemůže být určena.



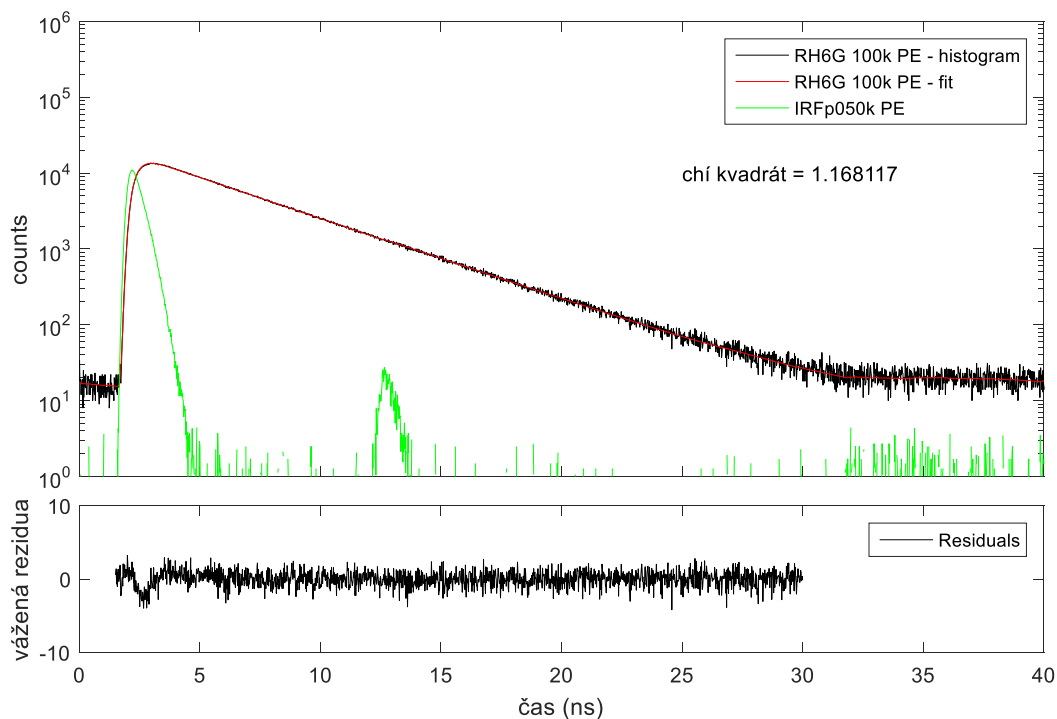
Obrázek 3.10 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě fluorescence 10 kcps na detektoru Perkin Elmer s IRF naměřenou při intenzitě 10 kcps, v dolním grafu je vidět nepřesnost fitu v náběžné hraně vlivem nevhodné volby IRF



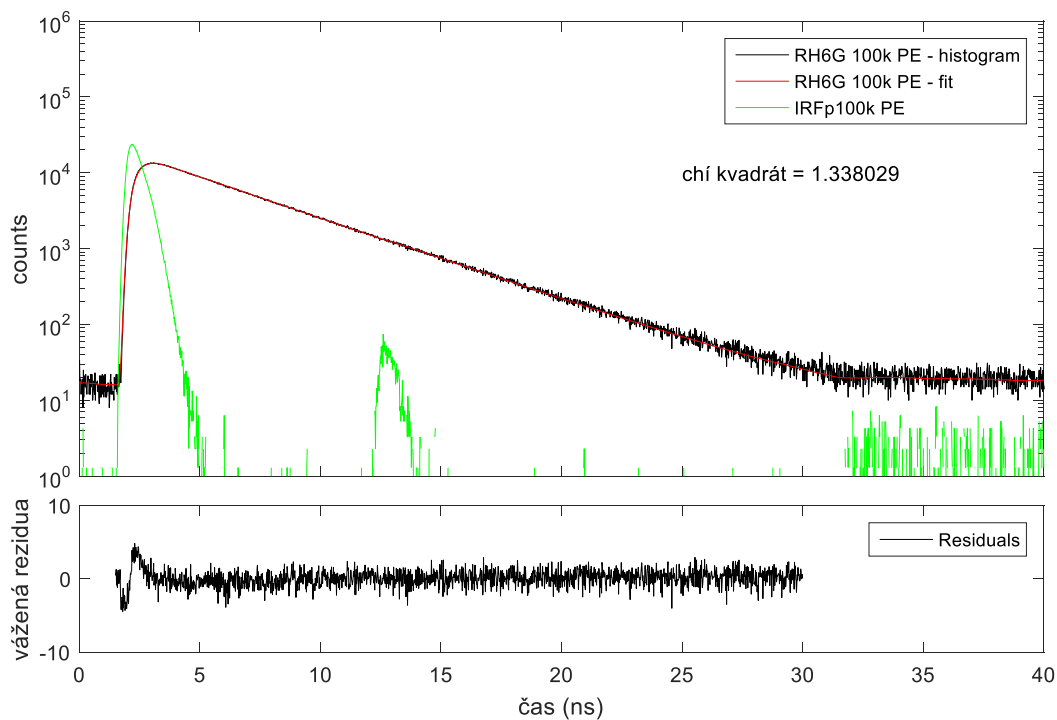
Obrázek 3.11 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě fluorescence 10 kcps na detektoru Perkin Elmer s IRF naměřenou při intenzitě 20 kcps, v dolním grafu je vidět nepřesnost fitu v náběžné hraně vlivem nevhodné volby IRF

Na Obrázcích 3.12 a 3.13 je uveden tentýž případ fluorescence Rhodaminu 6G pro intenzitu 100 kcps, tentokrát s použitím IRF naměřených při intenzitách 50 kcps a 100 kcps. Obě IRF způsobují odchylku fitu, avšak každá na opačnou stranu. Je tedy logické předpokládat, že vhodná IRF pro měření dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě 100 kcps by měla být naměřena mezi intenzitami 50 kcps a 100 kcps. Lze i určit, že vzhledem k velikostem chí kvadrátu je nejvhodnější AVCR pro IRF blíže 50 kcps než 100 kcps. Časové posuny IRF zde nemohou mít vliv, tedy rozdíly ve fitech mohou být způsobeny jen změnou tvaru IRF.

Vhodné IRF byly na detektoru Perkin Elmer určeny i pro další AVCR fluorescence Rhodaminu 6G. Určené hodnoty AVCR, který je vhodný pro měření IRF k danému AVCR dohasínání, jsou uvedeny v Tabulce 3.1, včetně zvýrazněné hodnoty, pro niž z dostupných IRF byla nalezena nejlepší shoda.



Obrázek 3.12 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě fluorescence 100 kcps na detektoru Perkin Elmer s IRF naměřenou při intenzitě 50 kcps, v dolním grafu je vidět nepřesnost fitu v náběžné hraně vlivem nevhodné volby IRF



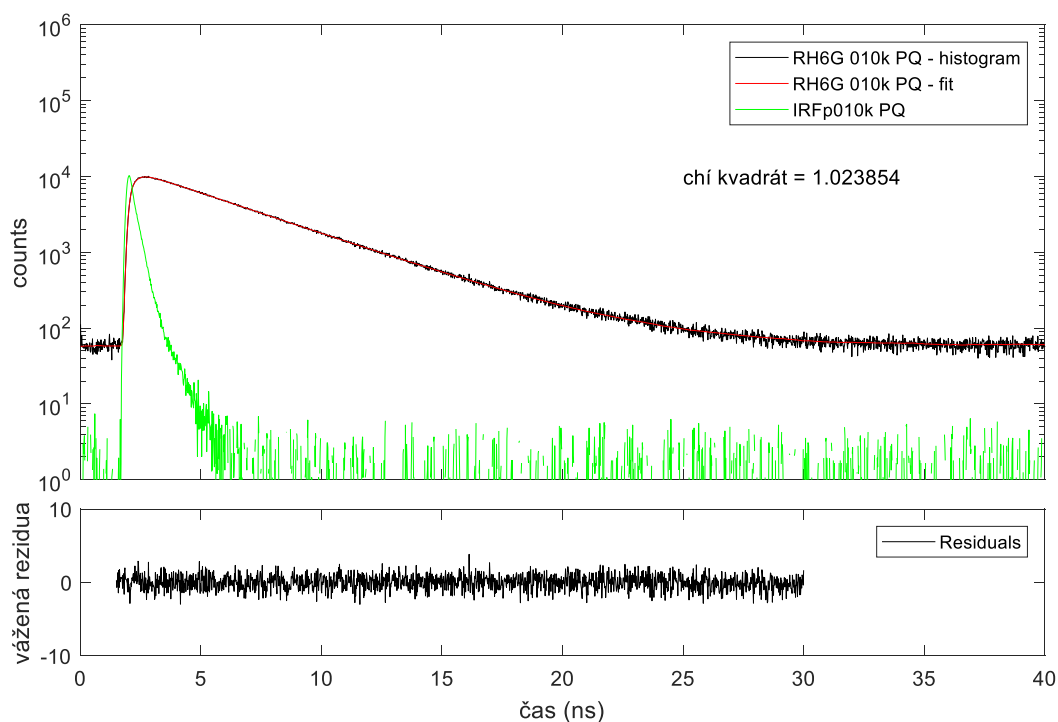
Obrázek 3.13 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě fluorescence 100 kcps na detektoru Perkin Elmer s IRF naměřenou při intenzitě 100 kcps, v dolním grafu je vidět nepřesnost fitu v náběžné hraně vlivem nevhodné volby IRF

Tabulka 3.1 Vhodné intenzity pro měření IRF k dané intenzitě fluorescence Rhodaminu 6G na detektoru Perkin Elmer se zvýrazněnými hodnotami pro intenzitu IRF dávající lepší shodu ze dvou uvedených

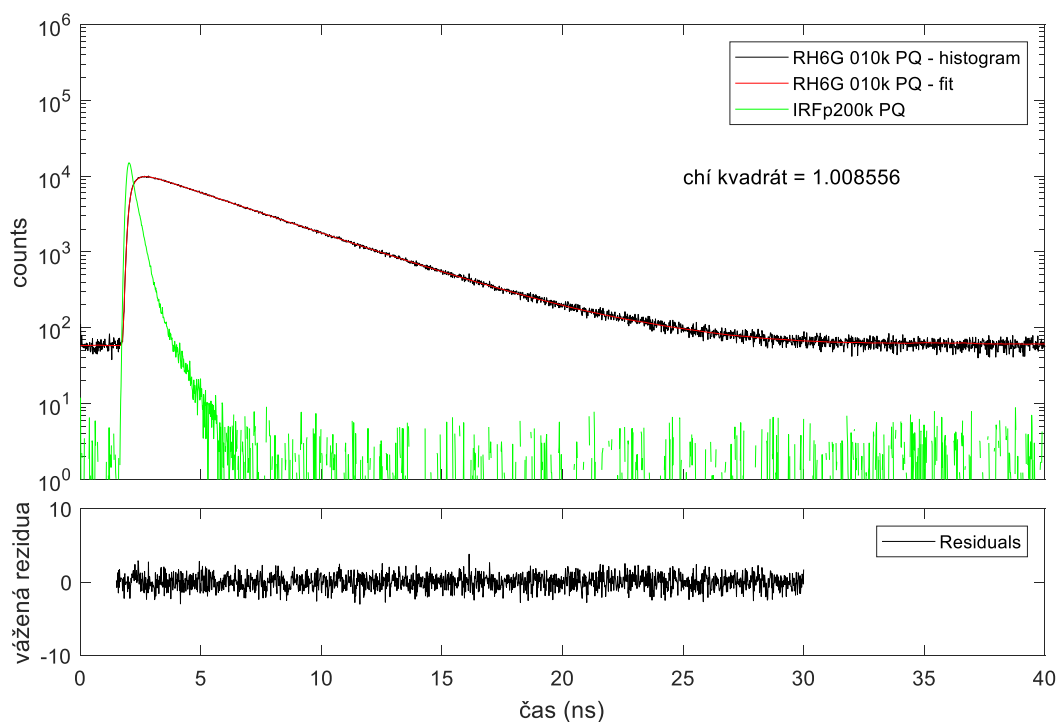
AVCR dohasínání (kcps)	Vhodný AVCR použité IRF (kcps)
10	< 10
20	< 10
30	< 10
50	10–20
100	50–100
150	100–150
200	150–200
300	200–300

U detektoru PicoQuant (v Tabulce 2.1 označen číslem 3) byla stejným postupem provedena konvoluce a též byly hledány vhodné IRF pro dané AVCR.

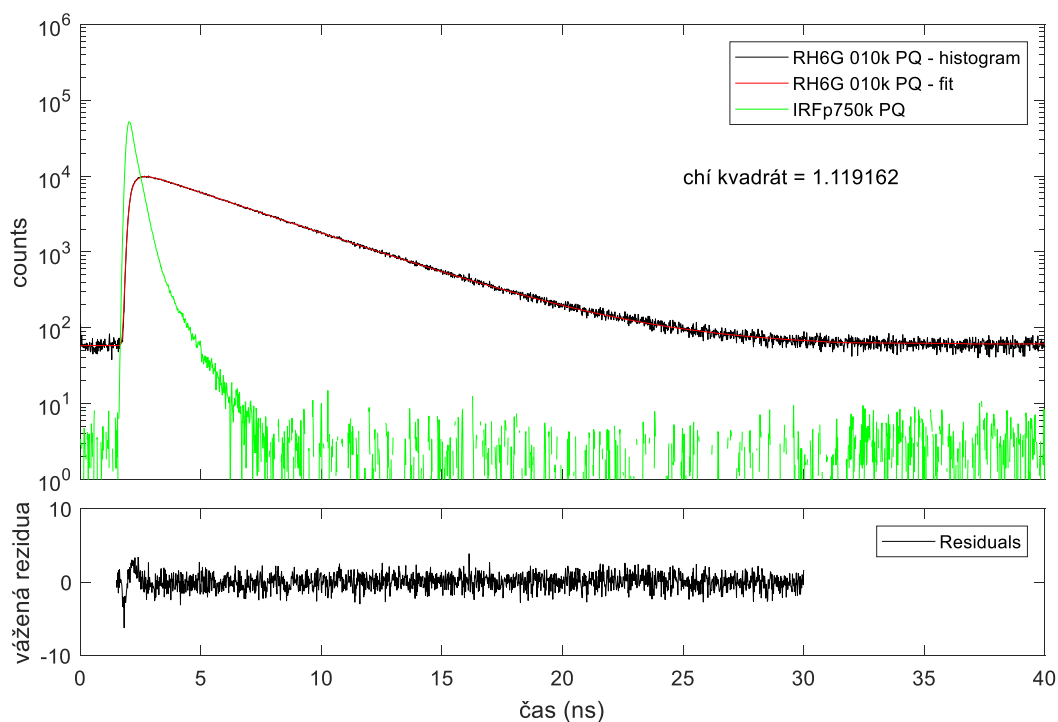
Protože detektor PicoQuant žádnou zaznamatelnou změnu tvaru IRF se změnou AVCR nevykazoval (vykazoval pouze změnu časové pozice IRF), je pochopitelné, že rozdíl ve fitování různými IRF je minimální (Obrázky 3.14 a 3.15). Mírná změna tvaru se objevuje až u IRF měřené při intenzitě 750 kcps (Obrázek 3.16).



Obrázek 3.14 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě fluorescence 10 kcps na detektoru PicoQuant s IRF naměřenou při intenzitě 10 kcps, v dolním grafu je vidět, že fit této IRF se se zaznamenanou křivkou dobře shoduje



Obrázek 3.15 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě fluorescence 10 kcps na detektoru PicoQuant s IRF naměřenou při intenzitě 200 kcps, v dolním grafu je vidět, že fit i této IRF se se zaznamenanou křivkou dobře shoduje



Obrázek 3.16 Křivka a fit dohasínání Rhodaminu 6G při intenzitě fluorescence 10 kcps na detektoru PicoQuant s IRF naměřenou při intenzitě 750 kcps, v dolním grafu je vidět mírná nepřesnost fitu vlivem nevhodné volby IRF

Po odstranění anizotropie polarizátorem nevykazuje u detektoru PicoQuant nejlepší fit všech křivek dohasínání IRF naměřená při intenzitě 500 kcps, jak tomu bylo u měření bez polarizátoru (zmíněno v Kapitole 3.2.1), ale nejpřesnější fity se objevují vždy pro IRF při intenzitě 200 kcps. Zároveň je shoda mezi fitem a křivkou dohasínání velice dobrá, hodnoty chý kvadrátu se pohybují velice blízko 1. V takto přesných případech fitu již hlavní nepřesnosti nejsou způsobeny vlivem špatného výběru IRF, ale spíše vlivem šumu. Proto nejsou všechny hodnoty chý kvadrát stejné.

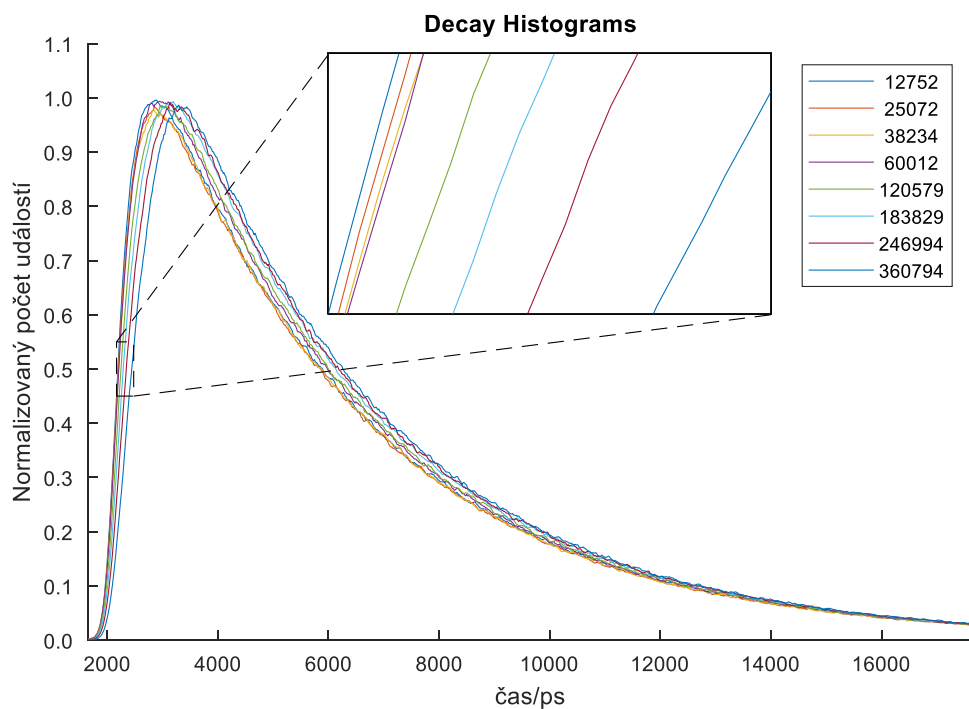
Hodnoty lifetime byly vždy velice blízko 4 ns (většinou 3,98–3,99 ns), což naznačuje, že měření nebylo zatíženo výraznějšími chybami.

Vhodné IRF byly na detektoru PicoQuant určovány i pro další AVCR fluorescence Rhodaminu 6G. Jak již bylo zmíněno, vhodná IRF pro všechna měření byla změřena při 200 kcps. Zde při takto podobných shodách již nejspíše měl vliv šum, a tedy je možné, že by při opakování měření byla nejvhodnější IRF naměřena při jiném AVCR. Proto nelze na tomto detektoru udělat doporučení pro vhodnou intenzitu měření IRF k dané intenzitě fluorescence.

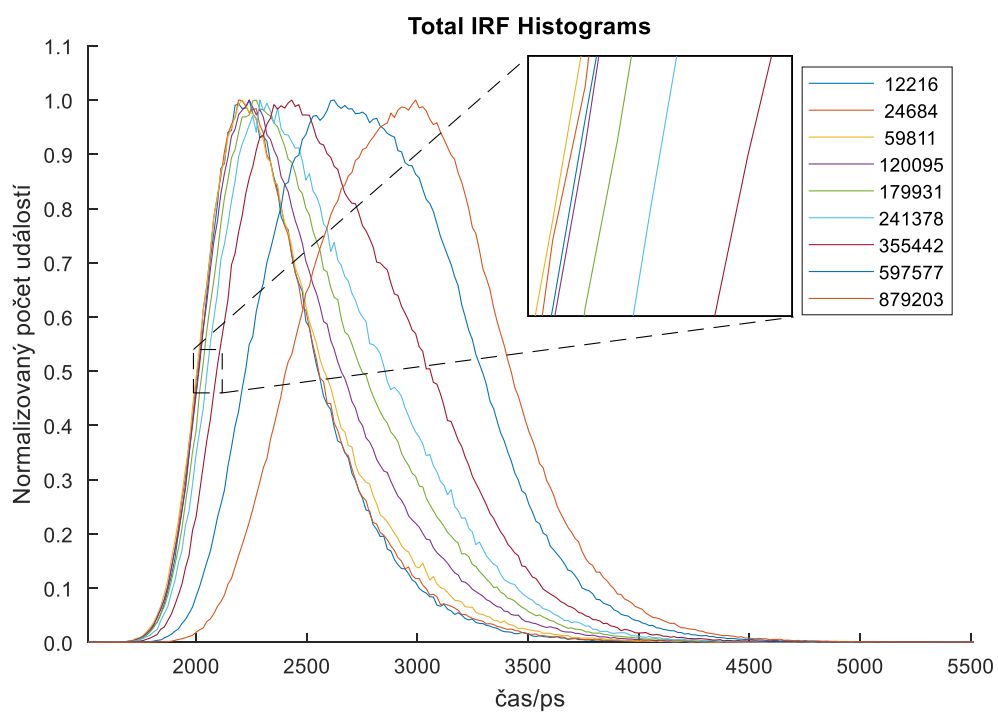
3.2.3 Vliv posunu IRF na pozici křivek dohasínání

Na dohasínání stacionární intenzity fluorescence byly též ověřovány předpoklady, že posun IRF při změně AVCR způsobí posun křivek dohasínání. Toto bylo sledováno podle posunu bodu v polovině amplitudy náběžné hrany (viz kapitola 2.3.3).

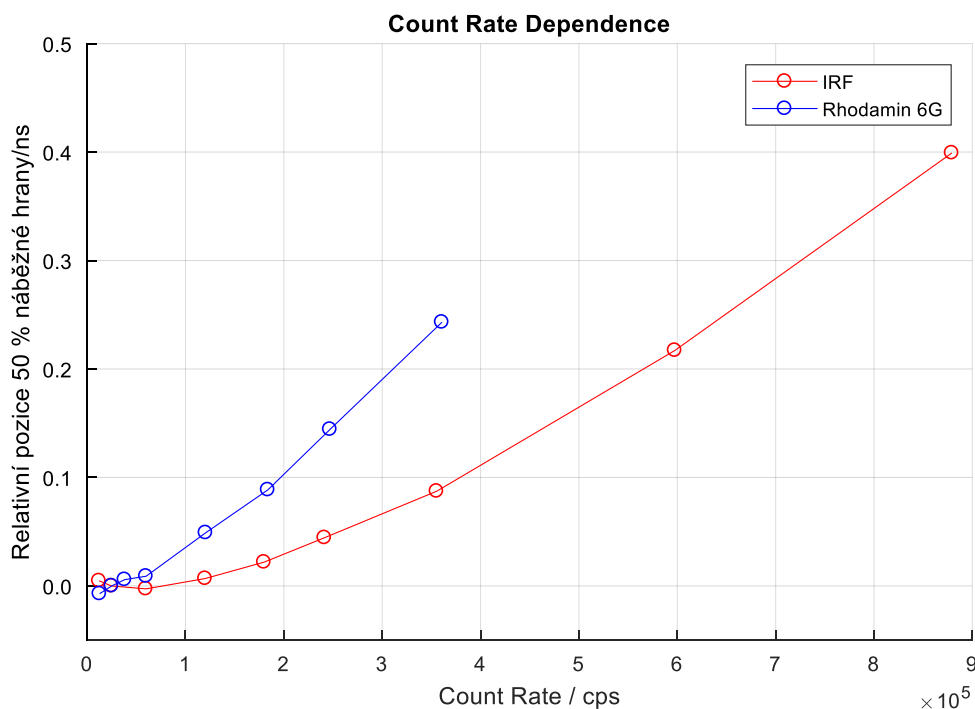
Nejprve jsou vyhodnocena data pro detektor Perkin Elmer. Na Obrázku 3.17 jsou zobrazeny naměřené křivky dohasínání Rhodaminu 6G při různých intenzitách. Dále jsou zobrazeny křivky IRF naměřené před stacionárním měřením (Obr. 3.18). U obou (jak dohasínání Rhodaminu 6G, tak IRF) jsou zde sledovány posuny podle náběžné hrany – jsou tedy vyneseny závislosti její pozice na AVCR. Protože jsou data pro IRF i Rhodamin 6G naměřena v jiných detekčních kanálech, a tedy jsou posuny pozorovány na jiných pozicích, jsou tyto závislosti přeneseny přes sebe do grafu na Obrázku 3.19, kde je sledována pouze změna pozice náběžné hrany (relativní pozice vůči pozici měření při intenzitě 20 kcps).



Obrázek 3.17 Křivky dohasínání barviva Rhodamin 6G při různých AVCR na detektoru Perkin Elmer



Obrázek 3.18 IRF detektoru Perkin Elmer při různých AVCR



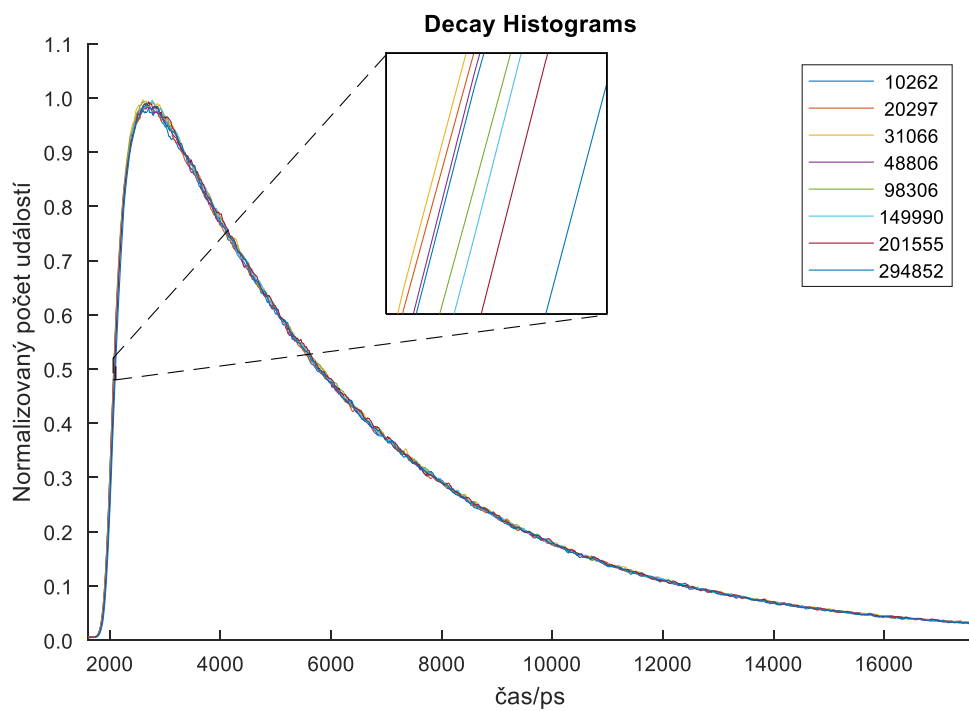
Obrázek 3.19 Posuny náběžné hrany IRF a křivek dohasínání fluorescence v závislosti na AVCR.

Posuny IRF a posuny křivek dohasínání nejsou stejné. Změna pozice náběžné hrany křivek se projevuje mnohem výrazněji, než změna pozice náběžné hrany IRF. Důvodem může být přílišná deformace tvaru IRF, kvůli které je zkreslován i tvar dohasínání.

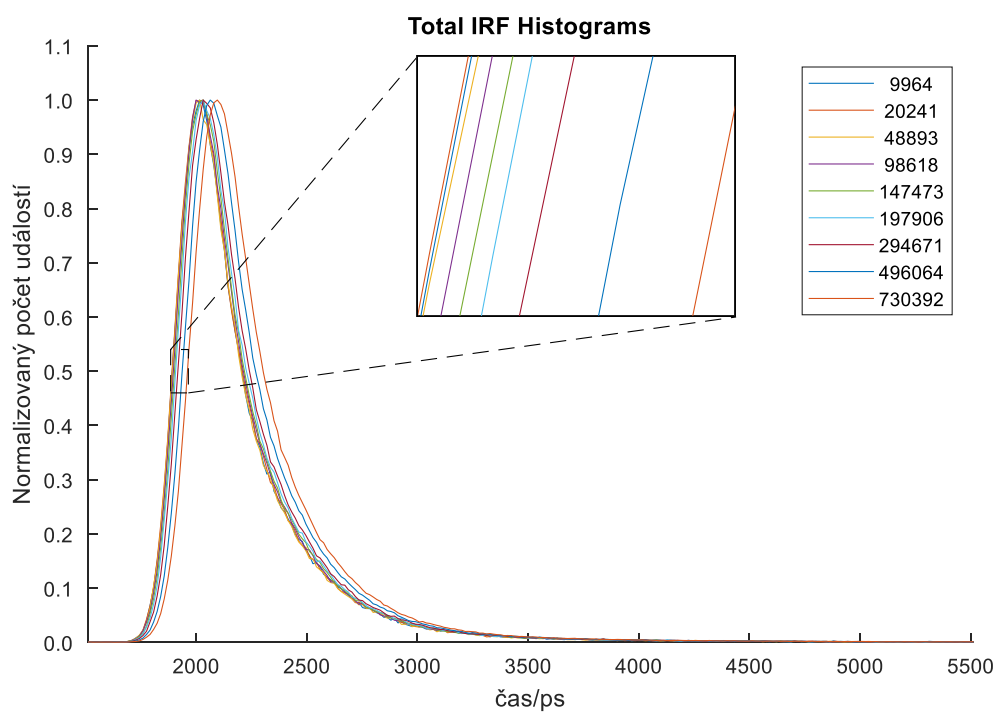
Tuto úvahu podporuje fakt, že u detektoru PicoQuant, kde je změna tvaru IRF v závislosti na AVCR minimální, je velikost posunů křivek dohasínání prakticky totožná s velikostí posunů IRF (Obrázek 3.22). U detektoru PicoQuant je vidět, že pokud bude při zpracování zvolena jednoduchá varianta pouhé kompenzace časového posunu IRF, bude tato metoda dávat dobré výsledky. To bylo pozorováno i v předchozí kapitole, kdy všechny IRF při rekonvoluci dávaly velmi dobrý výsledek, téměř nezávisle na count-rate (Obrázky 3.14 až 3.16).

Tento postup by na druhou stranu nemohl být použit u detektoru Perkin Elmer, neboť jak bylo ukázáno na Obrázcích 3.10 až 3.13, změna tvaru IRF hraje velkou roli a tedy je hlavním zdrojem rozdílů mezi naměřeným dohasínáním a jeho rekonvolučním fitem. To se promítá do rozdílné závislosti IRF a křivek dohasínání na Obrázku 3.19.

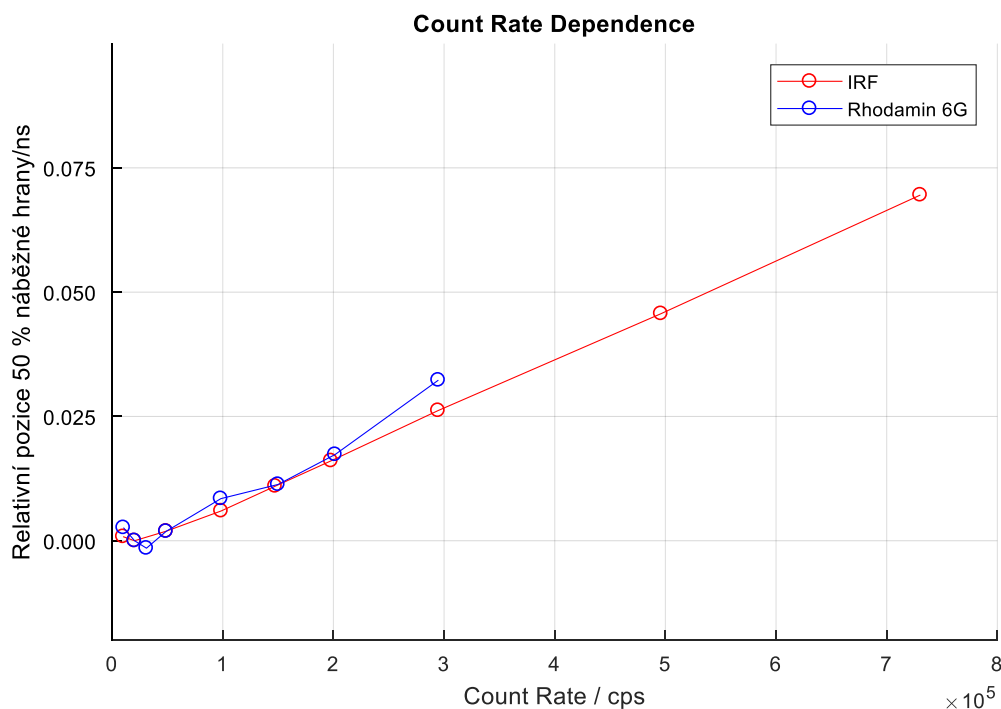
Na Obrázku 3.20 je zobrazena křivka dohasínání Rhodaminu 6G na detektoru PicoQuant. V porovnání s detektorem Perkin Elmer jsou změny pozice náběžné hrany křivky dohasínání minimální. IRF detektoru PicoQuant naměřené před měřením dohasínání fluorescence jsou zobrazeny na Obrázku 3.21, které stejně jako při měření samostatných IRF v kapitole 3.1 nemění tvar.



Obrázek 3.20 Křivky dohasínání barviva Rhodamin 6G při různých AVCR na detektoru PicoQuant



Obrázek 3.21 IRF detektoru PicoQuant při různých AVCR



Obrázek 3.22 Posuny náběžné hrany IRF a křivek dohasínání v závislosti na AVCR.

3.3 Vyhodnocení měření fluktuujícího signálu fluorescence

V této kapitole jsou vyhodnocovány vlivy rozdílných IRF na fluktuující měření. Nejprve je provedena analýza stejným způsobem jako u stacionární intenzity signálu. U této metody není očekávána vysoká přesnost, neboť IRF se mění v závislosti na intenzitě, a tedy není stejná v průběhu měření silně fluktuující intenzity. Poté je ověřován předpoklad, zda lze vybrat ze záznamu fluktuující intenzity pouze data zaznamenaná s určitými vybranými count-rate, pro která bude nalezení vhodné IRF možné.

3.3.1 Analýza křivek dohasínání bez rozlišení count-rate

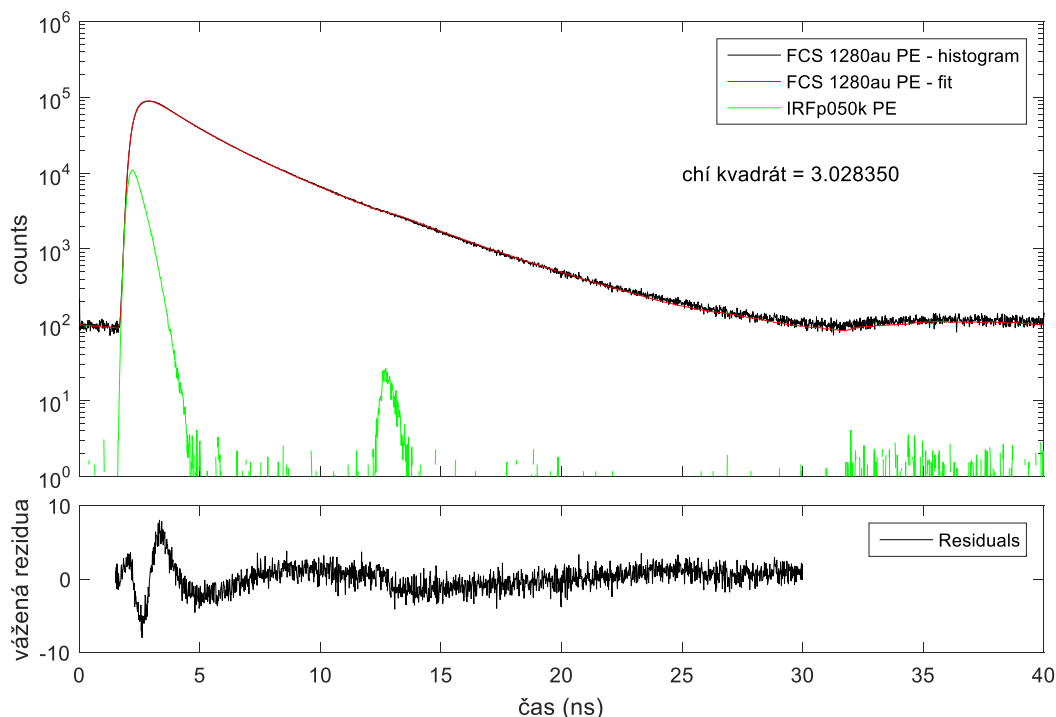
Signál z fluktuujícího měření stačilo zaznamenat jen jeden, neboť právě charakterem měřeného vzorku je poté v záznamu zastoupena celá škála různých count-rate. Při rekonvoluci bylo stanoveno, že zkoumaný vzorek obsahuje elementy se dvěma rozdílnými lifetime. To může být způsobeno vícero důvody – mezi nejpravděpodobnější patří:

- Přítomnost dvou rozdílných barviv, které vyzařují po excitaci laserem o vlnové délce 532 nm
- Přítomnost jednoho barviva se dvěma zářivými přechody
- Přítomnost jednoho barviva s jedním zářivým přechodem, který je ovlivněn odlišně v prostředí rozpouštědla a v prostředí difundující nanočástice

Nejprve byl proveden rekonvoluční fit celkové dohasínání zahrnující všechny zaznamenané fotony, tedy ty z difundujících částic i ty z pozadí (viz Obrázek 2.10). Jak bylo zmíněno v kapitole 2.5, od této metody nebyla očekávána velká přesnost.

Zde mohla vznikat i nepřesnost kvůli velkému množství zaznamenaných dat, proto byly provedeny i samostatné rekonvoluční fity částí souborů – soubor byl rozdělen do deseti stejně dlouhých intervalů, které byly fitovány konvolucí teoretického modelu s IRF.

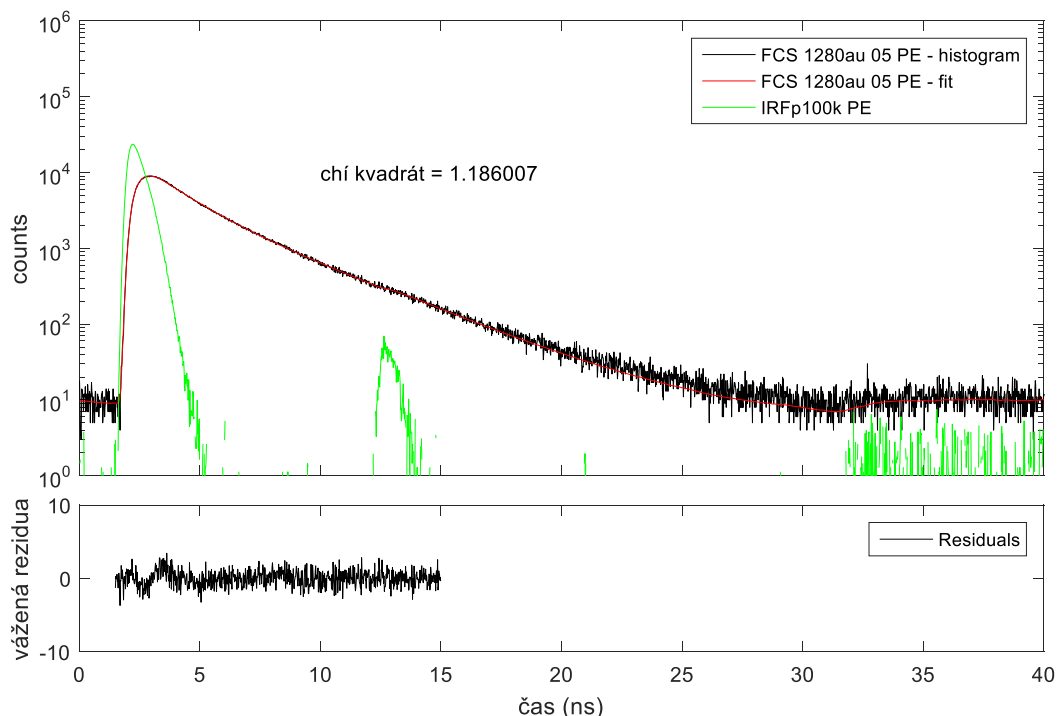
Na Obrázku 3.23 je uveden nejlepší dosažený fit celé křivky dohasínání pro detektor Perkin Elmer. Je patrné, že oproti fitům křivek dat stacionárního měření je fit o hodně nepřesnější, chí kvadrát pro něj vychází přibližně 3. Stejným postupem byly nafitovány křivky získané z deseti rozdělených intervalů. Na Obrázku 3.24 je ukázka fitu pro jednu z křivek z těchto intervalů, který vychází mnohem lépe. Všechny hodnoty chí kvadrátů nejlepších fitů se pohybovaly mezi hodnotami 1,03 a 1,21, průměrná hodnota chí kvadrátu nejlepších fitů je 1,13 a směrodatná odchylka 0,08.



Obrázek 3.23 Celková křivka dohasínání z měření fluktuujícího signálu (difundující nanočástice zvyrazňovače) s nejpřesnějším fitem – konvoluce matematického modelu s IRF naměřené při 50 kcps, Perkin Elmer

Zároveň, protože byl celý soubor rozdělen do několika úseků, aby se zamezil vliv příliš velkého souboru dat, křivky dohasínání přecházejí plynule v šum v kratších časech, než celková křivka dohasínání. Kvůli tomu byla i zkrácena fitovací oblast, neboť v místech, kde je velmi malé množství dat, odchylky dohasínání od jeho fitu jsou velmi malé, běžně menší než 1. Kvůli tomu jsou těmito místy zkreslovány celkové hodnoty chí kvadrátu směrem k lepším shodám, neboť šum je zde malý. Ten je dle definice úměrný odmocnině z množství dat v daném kanálu. Je-li množství dat v daném

časovém okamžiku malé, bude tímto hodnota chí kvadrát uměle snížena. Aby byl vliv malého množství dat omezen a nebyla uměle ovlivněna přesnost fitů, byly meze fitu omezeny do času 15 ns, oproti původním 30 ns používaným u křivek dohasínání s dostatečným počtem dat.



Obrázek 3.24 Částečná křivka dohasínání z měření fluktuujícího signálu (difundující nanočástice zvyrazňovače, pátý interval) s nejpřesnějším fitem – konvoluce matematického modelu s IRF naměřené při 100 kcps, Perkin Elmer

Nejlepší fity nebyly vždy dosaženy s jednou IRF, pro různé intervaly vykazovaly nejlepší shodu různé IRF. Hodnoty průměrných chí kvadrátů a směrodatné odchylky výše jsou uvedené pro fity s nejlepší shodou. V tabulce 3.2 jsou uvedeny hodnoty chí kvadrátů a jejich průměrů se směrodatnou odchylkou vždy pro jednu IRF. Do tabulky byly vybrány pouze IRF, které vykazovaly alespoň jednu nejlepší shodu, tedy IRF měřené při intenzitách 50 kcps a 100 kcps. Fity dosažené pomocí ostatních IRF v tabulce uvedeny nejsou, neboť byly velmi nepřesné.

Pokud by byl každý interval fitován stejnou IRF, jež vykazovala nejlepší shodu na celém měřeném souboru (Obr. 3.23), tj. IRF měřená při intenzitě 50 kcps, byla by průměrná hodnota chí kvadrátu 1,29, nikoliv 1,14, a směrodatná odchylka 0,13, nikoliv 0,04. Zajímavým jevem je, že na rozděleném záznamu vykazuje lepší shodu především IRF naměřená při 100 kcps, avšak při fitování celkové křivky dohasínání je vhodnější IRF měřená při 50 kcps. Pro IRF měřenou při 100 kcps vyšla průměrná hodnota chí kvadrátu jen 1,15 se směrodatnou odchylkou 0,09, což je velmi blízko hodnotám pro nejlepší fity.

Tabulka 3.2 Chí kvadráty shody křivek dohasínání z jednotlivých intervalů a rekonvolučních fitů IRF měřených při intenzitě 50 kcps a 100 kcps se zvýrazněním nejpřesnějších fitů

Číslo intervalu	χ^2 IRF 50 kcps	χ^2 IRF 100 kcps
1	1,45	1,18
2	1,41	1,04
3	1,37	1,03
4	1,70	1,11
5	1,04	1,19
6	1,19	1,04
7	1,21	1,22
8	1,26	1,28
9	1,04	1,12
10	1,20	1,26
Průměr	1,29	1,15
Sm. odchylka	0,19	0,09

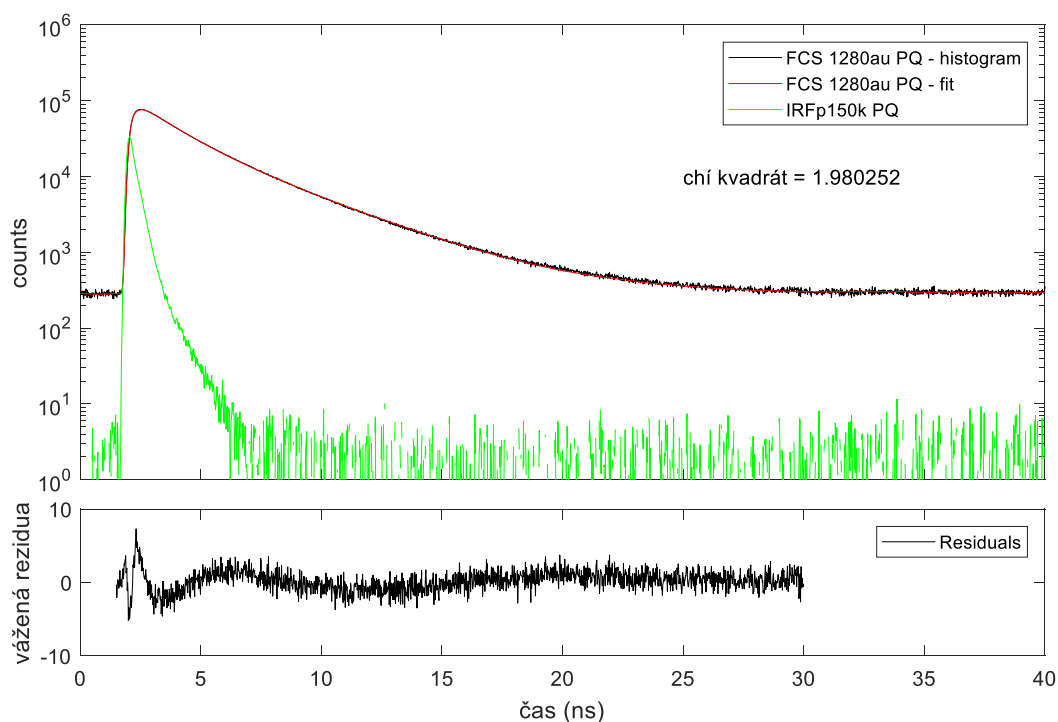
Tím, že se fity částí souboru shodují lépe, než fity celého měření, je ukázáno, že nepřesnosti fitu celého měření jsou částečně ovlivněny velkým množstvím dat. Porovnáním podobně vysokých křivek dohasínání a IRF (v peaku) je přesnost výrazně vyšší (Obr. 3.24).

Stejným způsobem bylo provedeno vyhodnocení dohasínání pro detektor PicoQuant. U něj nedocházelo k tak velkým odchylkám, neboť jeho závislost tvaru IRF na AVCR je minimální.

Na obrázku 3.25 je uvedena celková křivka dohasínání zaznamenaná na tomto detektoru s nejlépe shodným rekonvolučním fitem pomocí IRF měřené při 150 kcps.

Stejným způsobem, jako byly nafitovány intervaly celkového měření naměřené na detektoru Perkin Elmer, bylo nafitováno opět deset intervalů rozděleného záznamu na detektoru PicoQuant. V tomto případě vycházely všechny fity velmi podobně, což bylo očekávané vzhledem k neměničícímu se tvaru IRF. Čtyři různé IRF v tomto případě poskytly nejlepší shodu alespoň s jedním z deseti intervalů celého měření. Tyto IRF byly naměřeny při intenzitě 50, 100, 150 a 200 kcps. Průměrné chí kvadráty fitů jednotlivými IRF vychází pro nejlepší fity 1,07 se směrodatnou odchylkou 0,03. Hodnoty pro jednotlivé IRF se však příliš neliší. Je tedy vidět, že rozdíly mezi použitými IRF jsou pro detektor PicoQuant naprosto minimální a hodnoty pro různé IRF se nejspíše liší pouze vlivem kvantového šumu, případně afterpulsingu. Zaznamenané hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 3.3.

Na Obrázku 3.26 je poté uvedena ukázka fitu dohasínání ze čtvrtého intervalu pomocí IRF měřené při 150 kcps, jež vykazovala pro tento interval nejlepší shodu. U tohoto detektoru je tedy vliv zvolené IRF na přesnost minimální, větší roli hraje kvantový šum.

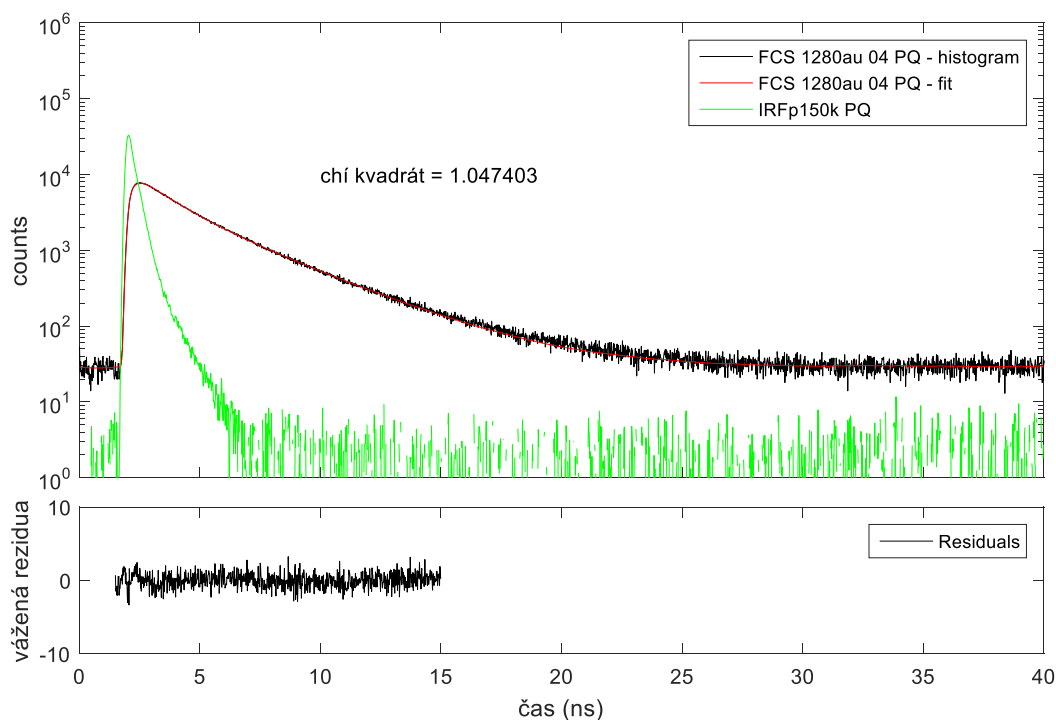


Obrázek 3.25 Celková křivka dohasínání z měření fluktuujícího signálu (difundující nanočástice zvyrazňovače) s nejpřesnějším fitem – konvoluce matematického modelu s IRF naměřené při 150 kcps, PicoQuant

U obou detektorů tak bylo ukázáno, že zvolené množství fitovaných dat hraje významnou roli a je výrazně lepší, pokud je množství dat v peaku křivky dohasínání a IRF podobné množství dat v peaku IRF používané pro rekonvoluční fit.

Tabulka 3.3 Chí kvadráty shody křivek dohasínání z jednotlivých intervalů a rekonvolučních fitů IRF měřených při intenzitě 50, 100, 150 a 200 kcps se zvýrazněním nejpřesnějších fitů

Číslo intervalu	χ^2 IRF 100 kcps	χ^2 IRF 200 kcps	χ^2 IRF 300 kcps	χ^2 IRF 500 kcps
1	1,11	1,11	1,11	1,13
2	1,08	1,07	1,07	1,08
3	1,15	1,13	1,12	1,11
4	1,05	1,04	1,05	1,07
5	1,16	1,14	1,13	1,14
6	1,05	1,04	1,04	1,07
7	1,11	1,10	1,10	1,11
8	1,05	1,05	1,05	1,08
9	1,06	1,06	1,07	1,12
10	1,04	1,04	1,05	1,09
Průměr	1,09	1,08	1,08	1,10
Sm. odchylka	0,04	0,04	0,03	0,02



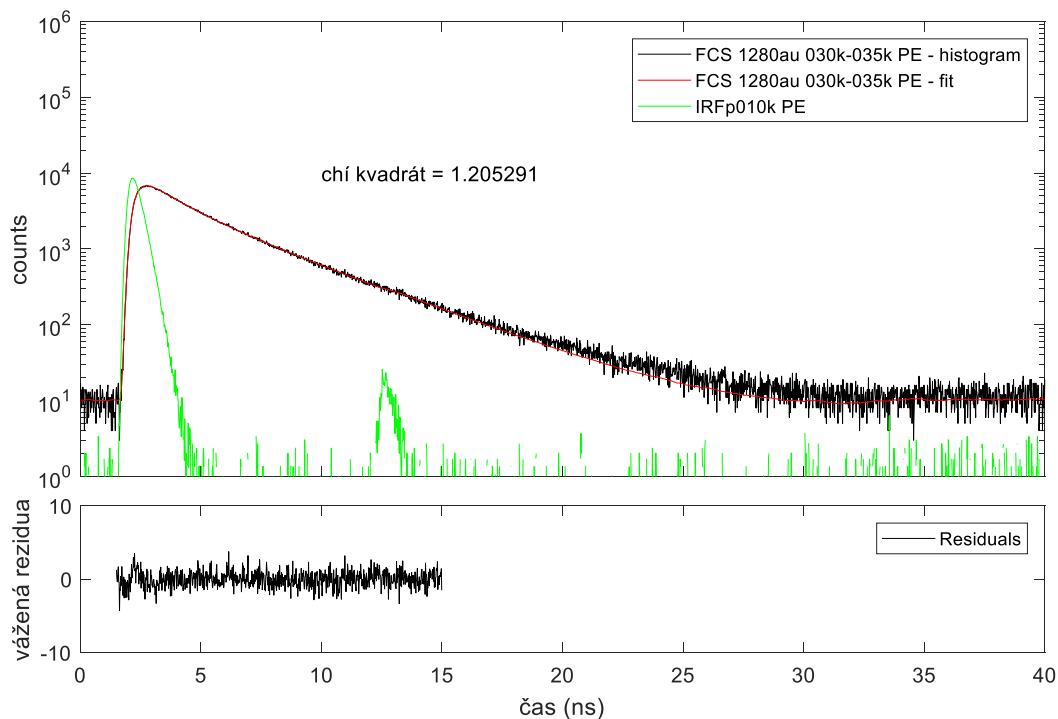
Obrázek 3.26 Částečná křivka dohasínání z měření fluktuujícího signálu (difundující nanočástice zvyrazňovače, čtvrtý interval) s nejpřesnějším fitem – konvoluce matematického modelu s IRF naměřené při 150 kcps, PicoQuant

3.3.2 Analýza křivek dohasínání rozlišených podle count-rate

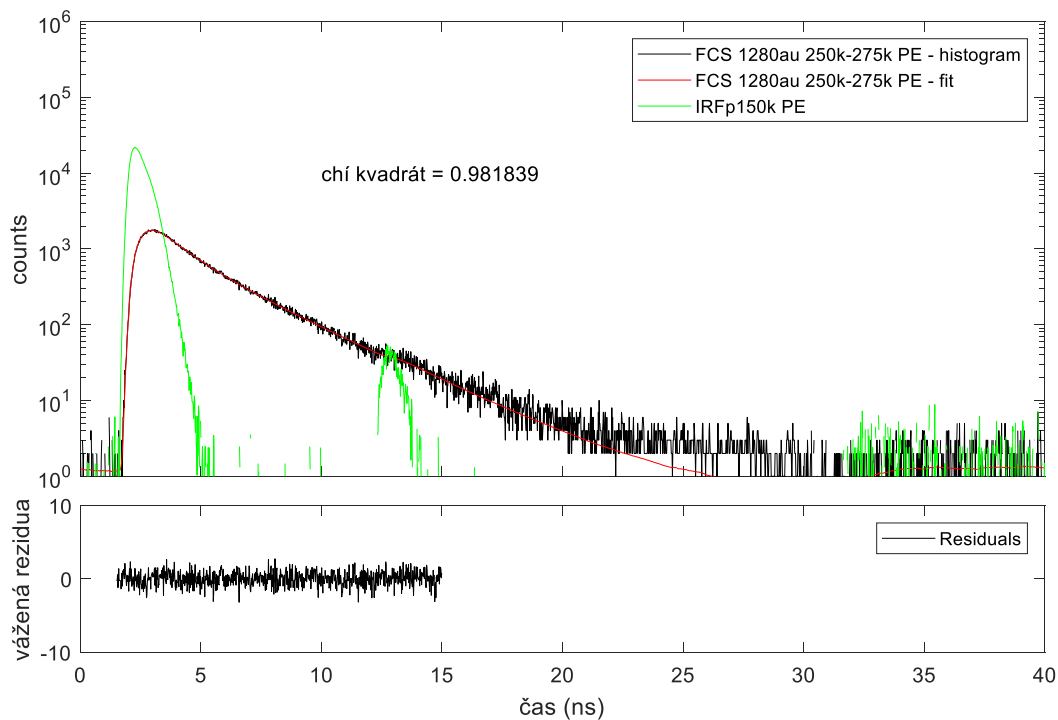
Pomocí skriptu v MATLABU byly z celkového souboru měření vytvořeny křivky dohasínání pro jednotlivé intervaly count-rate, které byly zvoleny experimentálně podle množství dat. Zvolené intervaly jsou uvedeny v Tabulce 3.4 spolu s očekávaným vhodným AVCR IRF pro dosažení nejpřesnějšího rekonvolučního fitu. Bylo předpokládáno, že fity křivek sestavených zvláště z fotonů dopadajících při daném count-rate budou poskytovat lepší shody. Tento předpoklad byl potvrzen u detektoru Perkin Elmer, u kterého je patrná závislost tvaru IRF na měřené intenzitě. Protože časový posun se změnou intenzity, který byl jediným zaznamenaným projevem u detektoru PicoQuant, byl ve skriptu kompenzován, tento předpoklad u tohoto detektoru nebyl potvrzen.

Kdyby byly zvoleny širší intervaly pro hodnoty count-rate, mohly by zde hrát větší roli nepřesnosti vlivem rozdílné odezvy na fotony zaznamenané při rozdílné intenzitě, které by byly zahrnuty do stejného intervalu.

Stejně jako u křivek dohasínání vytvořených pouze z úseků měřeného souboru byly fitované oblasti zkráceny, kvůli malému počtu dat byly zkráceny oblasti fitování i zde do 15 ns. Pro křivky dohasínání s velmi malými počty dat (pod cca 150 tisíc fotonů) byla mez ještě zmenšena, a to na 12 ns.



Obrázek 3.27 Křivka dohasínání pro vybrané count-rate 30–35 kcps z fluktuujícího signálu a její fit konvoluce matematického modelu s IRF měřenou při 10 kcps, Perkin Elmer



Obrázek 3.28 Křivka dohasínání pro vybrané count-rate 250–275 kcps z fluktuujícího signálu a její fit konvoluce matematického modelu s IRF měřenou při 150 kcps, Perkin Elmer

Vizuální analýzou signálu Time Trace vytvořeného způsobem popsaným v Kapitole 2.5 skriptem popsaným v sekci Přílohy byly v signálu rozpoznány dvě základní složky (Obr. 2.10). První z nich jsou bursty odpovídající difúzi fluorofory značených nanočástic do a z detekčního objemu. Druhou z nich je složka zhruba konstantní intenzity pozadí zaznamenávaná neustále, která je na Obrázku 2.10 vidět v momentech, kdy se nevyskytují velké peaky. Tuto složku způsobuje volně rozpuštěné barvivo – jeho jednotlivé volné molekuly v roztoku, jak je popsáno v Kapitole 2.5. Na Obrázcích 3.27 a 3.28 jsou zobrazeny křivky dohasínání pro vybrané count-rate s jejich nejpřesnějšími fity.

Nejprve byla vyhodnocena data z detektoru Perkin Elmer. Vhodná IRF se pro rekonvoluční fity mění v závislosti na vybraném intervalu count-rate. Tím se potvrzuje, že u detektoru Perkin Elmer lze dosáhnout lepších fitů křivek dohasínání správným výběrem IRF. V Tabulce 3.4 jsou uvedeny hodnoty předpokládaných vhodných IRF pro daný interval count-rate pro detektor Perkin Elmer, včetně zvýrazněné hodnoty, pro niž z dostupných IRF byla nalezena nejlepší shoda.

Porovnáním s Tabulkou 3.1, ve které jsou uvedené vhodné AVCR vhodných IRF pro daný snímání AVCR fluorescence při stacionární intenzitě, zjistíme, že se hodnoty mění podobně. Při měření fluktuujícího signálu sice vychází IRF měřená při přibližně 10 kcps vhodná pro count-rate do přibližně 70 kcps, zatímco při stacionárním měření na tomto detektoru již při AVCR fluorescence 50 kcps byla vhodnější IRF měřená při 20 kcps, než ta měřená při 10 kcps. U hodnot count-rate fluktuujícího signálu mezi 70 kcps a 350 kcps jsou však hodnoty vhodných AVCR pro IRF velmi podobné těm určeným při stacionárním měření. Vyšší intenzity nebyly se stacionárním signálem měřeny, tedy jejich shodu s daty z fluktuující intenzity nelze porovnat. Lze však odhadnout, že i pro vyšší count-rate je sledován trend, kdy vhodná IRF je měřena při přibližně o třetinu menším count-rate, než fluorescence.

U detektoru PicoQuant byly též určeny podle stejných intervalů nejvhodnější AVCR pro IRF. Zde však nelze říci, že by vhodné fity sledovaly nějaký trend. To je především proto, že na detektoru PicoQuant nedochází k deformaci IRF v závislosti na AVCR. Kvůli tomu i fity pro křivky dohasínání rozdělené podle count-rate sedí téměř pokaždé velmi dobře, hodnoty normalizovaného chí kvadrátu se vždy liší maximálně o několik setin. Jedna zajímavost však je přesto pozorovatelná. Dle Obrázků 3.29 a 3.30, AVCR pro IRF, která vykazuje nejlepší shodu fitu, obecně s rostoucím count-rate fluorescence klesá. Nejedná se o náhodné vybrané případy. V tuto chvíli pro tento jev není vysvětlení a bylo by potřeba měření na stejném detektoru zopakovat, aby bylo možné určit, zda se jedná o náhodný jev, nebo o reprodukovatelné pozorování. Samo o sobě jde však zatím toto pozorování proti smyslu předchozích výsledků.

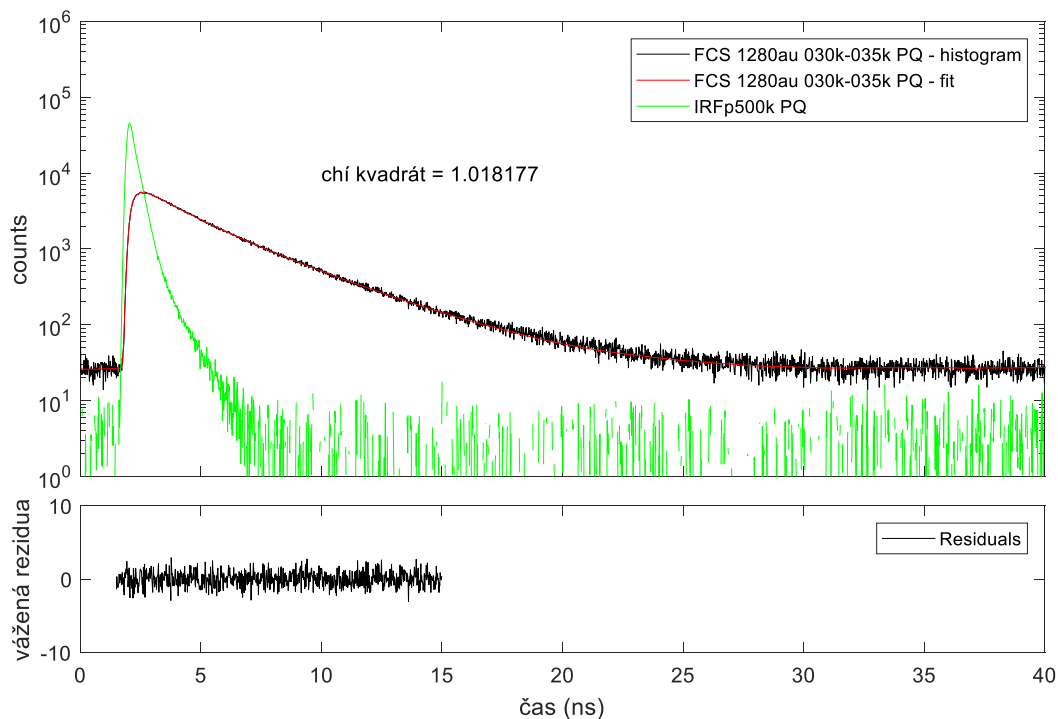
Hladina chí kvadrátu, kolem které se shoda fitu s křivkou dohasínání pohybuje (tj. jestli jsou pro daný interval count-rate všechny hodnoty chí kvadrátu blízko 1,0 nebo

1,1) je dána výskytem extrémních hodnot ve fitované oblasti. Vzhledem ke vzorci, kde je výsledná hodnota určena druhou mocninou odchylky fitu od křivky dohasínání, jediná hodnota, která vyjde s velkou nepřesností, může ovlivnit celý výsledek.

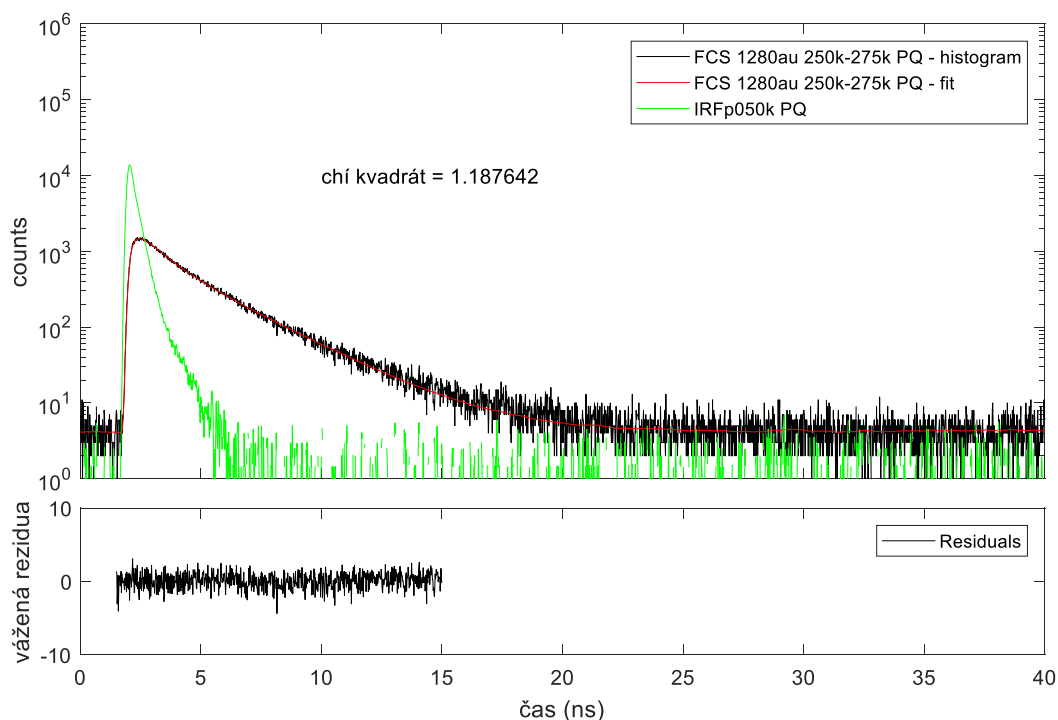
Tabulka 3.4 Vhodné intenzity pro měření IRF k dané intenzitě dohasínání vzorku s fluktuující intenzitou na detektoru Perkin Elmer se zvýrazněnými hodnotami pro intenzitu IRF dávající lepší shodu ze dvou uvedených

AVCR dohasínání (kcps)	Vhodný AVCR IRF (kcps)	AVCR dohasínání (kcps)	Vhodný AVCR IRF (kcps)
0–20	< 10	150–160	50–100
20–25	< 10	160–170	100–150
25–30	< 10	170–180	100–150
30–35	< 10	180–190	100–150
35–40	< 10	190–200	100–150
40–45	< 10	200–210	100–150
45–50	< 10	210–220	100–150
50–55	< 10	220–230	150–200
55–60	< 10	230–240	100–150
60–65	< 10	240–250	150–200
65–70	< 10	250–275	150–200
70–75	10–20	275–300	150–200
75–80	10–20	300–325	150–200
80–85	10–20	325–350	200–300
85–90	10–20	350–375	200–300
90–95	20–50	375–400	200–300
95–100	20–50	400–425	200–300
100–110	20–50	425–450	200–300
110–120	20–50	450–475	300–500
120–130	50–100	475–500	300–500
130–140	50–100	500+	500–750
140–150	50–100	–	–

Na Obrázcích 3.29 a 3.30 jsou zobrazeny křivky dohasínání pro vybrané count-rate s jejich nejpřesnějšími fity. V žádném z těchto fitů není žádná oblast (např. náběžná hrana, jak tomu bývalo u detektoru Perkin Elmer), která by způsobovala nepřesnost. Na Obrázku 3.30 přesto vychází hodnota χ^2 kvadrát o cca 0,16 větší, než u ostatních fitů. Tato odchylka je způsobena dvěma extrémními hodnotami, které se v grafu objevily. Je možné je identifikovat v grafu vážených reziduí na Obrázku 3.30, kde hned jedna z prvních hodnot fitované oblasti (kolem času 1,5 ns) je výrazně zápornější, než ostatní hodnoty reziduí. Stejná situace je opakována v čase přibližně 8 ns, kde je opět jedna hodnota vážených reziduí výrazně zápornější, než ostatní. Jedná se o extrémní hodnoty, které v grafu vznikají náhodně v důsledku menšího množství zpracovávaných dat a poté ovlivní výslednou hodnotu χ^2 kvadrátu.



Obrázek 3.29 Křivka dohasínání pro vybrané count-rate 30–35 kcps z fluktuujícího signálu a její fit konvoluce matematického modelu s IRF měřenou při 500 kcps, PicoQuant



Obrázek 3.30 Křivka dohasínání pro vybrané count-rate 250–275 kcps z fluktuujícího signálu a její fit konvoluce matematického modelu s IRF měřenou při 50 kcps, PicoQuant

Protože se v některých grafech vyskytují takovéto extrémy, které mohou ovlivnit výslednou míru shody, je nedoporučeno srovnávat fity různými IRF podle absolutních hodnot chí kvadrátů.

Aby bylo možné srovnávat hodnoty chí kvadrátů, bylo by nutné mít v peaku každé křivky dohasínání přibližně stejné množství dat, které by bylo srovnatelné s množstvím dat v peaku používaných IRF. Zároveň, tento peak by neměl být menší než přibližně 10^4 hodnot, aby byla poskytnuta dostatečná statistika a byl zanedbatelný vliv těchto extrémních hodnot, které zde ovlivňují výsledky. V neposlední řadě, všechny fitované intervaly by měly být stejně dlouhé, přičemž v každém místě fitované oblasti musí být dostatečné množství hodnot pro to, aby chí kvadrát test dobré shody byl přesný (z provedených fitů lze odhadnout minimální počet dat v bodech křivky dohasínání alespoň na 100 událostí – fotonů – pro detektor PicoQuant a desítky událostí pro detektor Perkin Elmer).

3.4 Vliv IRF na korelační křivky

Vliv zvolené IRF pro fit křivky dohasínání byl porovnáván při výpočtu ACF a CCF. ACF a CCF byly vypočteny pomocí statistického filtru vypočítaného dle fitů celkové křivky dohasínání měření fluktuující intenzity pomocí všech testovaných IRF. Nejprve však byly ověřeny předpoklady ohledně nulové korelace při stacionárním měření.

3.4.1 ACF – měření za stacionárních podmínek

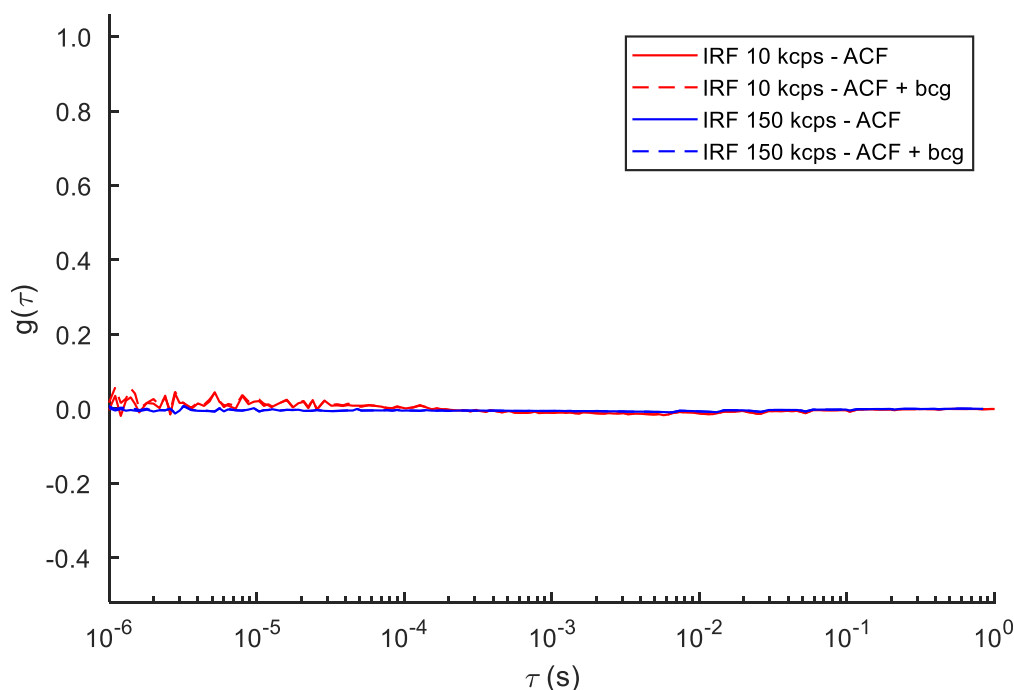
Ze stacionárního měření byly vypočteny pouze ACF (není mezi čím počítat kroskorelaci, neboť v roztoku je jen jeden difundující element – Rhodamin 6G). Pro každou měřenou intenzitu je vypočtena ACF bez korekce na pozadí a ACF s korekcí na pozadí podle statistického filtru popsaného v kapitole 2.6.

U detektoru Perkin Elmer je pozorováno, že ACF je pro všechny časy velice blízko nuly. Zároveň je vidět, že vliv filtru je zde zanedbatelný, dosaženy jsou téměř stejné výsledky pro ACF vypočtenou s filtrem i bez něj.

Opak je pravdou u detektoru PicoQuant. ACF získaná pomocí filtru je stále velmi blízko nuly, ACF získaná bez filtru je však velmi odlišná. Je zde zaznamenán velký vliv filtru na získané výsledky, který ukazuje velký vliv pozadí detektoru PicoQuant. Pozorovaný nárůst autokorelační funkce v krátkých časech lze přisoudit velkému afterpulsingu, který tento detektor vykazuje. Vliv tohoto jevu byl diskutován v Kapitole 3.1 a tvary výsledných autokorelací jenom potvrzují tento závěr učiněný o detektoru PicoQuant..

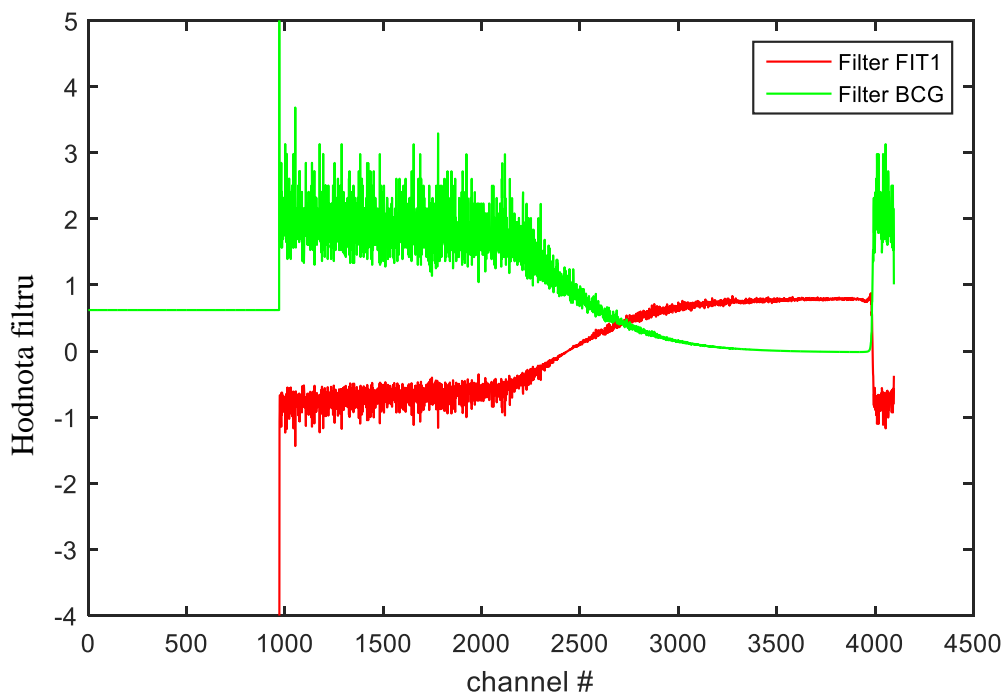
Na Obrázku 3.31 jsou zobrazeny autokorelační křivky pro stacionární měření barviva Rhodamin 6G při intenzitách 10 kcps a 150 kcps. Jediný patrný rozdíl mezi nimi je míra zašumění. Ta je rozdílná, neboť měření trvala různou dobu, aby bylo dosaženo stejné množství dat. Proto je u delšího měření, kde bylo naakumulováno více

kvantového šumu, vyšší míra zašumění, neboť poměr signálu ku šumu je nižší než u měření kratšího.



Obrázek 3.31 Autokorelační funkce pro stacionární měření Rhodaminu 6G při AVCR 10 kcps a 150 kcps bez filtru (přerušovaná čára) a s filtrem vypočítaným na základě nejlepšího provedeného rekonvolučního fitu (plná čára) pro detektor Perkin Elmer

Na Obrázku 3.32 je červeně zobrazen filtr použitý pro výpočet ACF bez vlivu pozadí. Filtry jsou zobrazeny v původní podobě, v jaké byly aplikovány na data naměřená v reverzním módu, tedy detekční kanály na ose x odpovídají času plynoucímu opačným směrem – kanál 4095 odpovídá časovému zpoždění 0 a s klesajícím číslem kanálu detekční čas roste. Zeleně je zobrazen filtr pro pozadí, který experimentálně smysl nemá, je však nutný pro vytvoření filtru prvního. Princip filtru je zde takový, že fotony zaznamenané v různých časových zpožděních od excitačního pulzu mají přiřazenou rozdílnou váhu (důležitost) do ACF Rhodaminu 6G. Dorazí-li foton v detekčním kanále 3500, bude mu přiřazena váha přibližně 1, že patří tento foton Rhodaminu 6G, a přibližně 0, že patří pozadí. Dorazí-li foton do detekčního kanálu 1500, bude mu přiřazena váha přibližně 2, že patří pozadí, a přibližně -1, že patří Rhodaminu 6G. Důvod je takový, že podle křivky dohasínání (např. Obrázek 3.10) je v určitých časech velmi pravděpodobné, že zaznamenaný foton bude patřit barviva a nikoliv pozadí (nejvíce v oblasti peaku křivky dohasínání barviva), zatímco v jiných určitých časech je pravděpodobnější, že bude patřit pozadí.



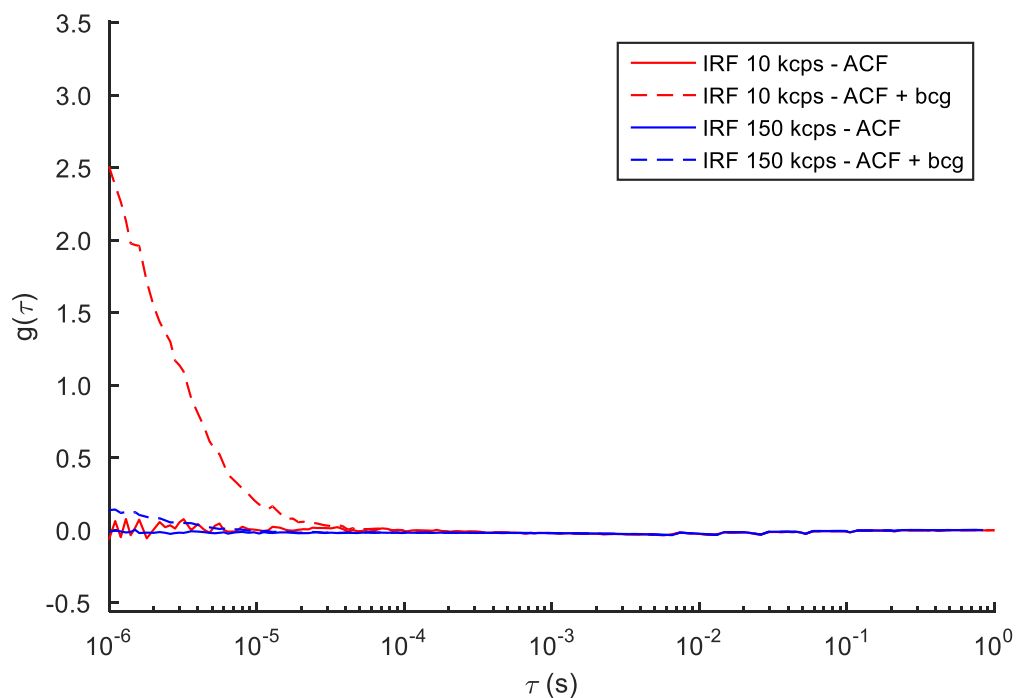
Obrázek 3.32 Filtr použitý pro výpočet plně červené ACF na Obrázku 3.31 (červený filtr) – filtr vybere barvivo Rhodamin 6G – a filtr pro pozadí nepoužitý pro výpočty (zelený), vzhledem k němuž byl počítán filtr první – filtr vybere signál pozadí, Perkin Elmer. Časová osa je zde otočená oproti ostatním obrázkům v této práci, čas plyne zprava doleva.

Zobrazené autokorelační křivky na Obrázku 3.33 jsou vytvořené ze záznamů při stejných AVCR, jako ACF na Obrázku 3.31. Je zde jednoznačně vidět důležitost použití váhovacího filtru pro výpočet ACF u detektoru PicoQuant.

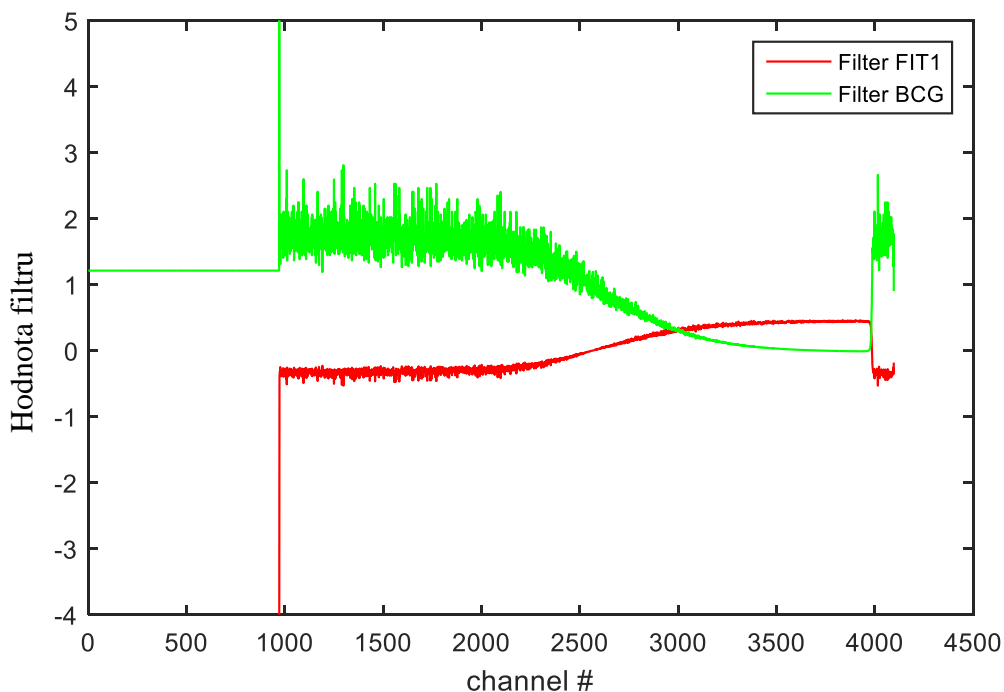
Vliv afterpulsingu na tvar ACF je výraznější u nižších AVCR. Nejedná se však o vliv AVCR, ale tento jev je způsoben rozdílnou dobou měření vzorků při rozdílných intenzitách. Afterpulsing je nezávislý na intenzitě dopadající na detektor a tedy je od něj naakumulován počet událostí úměrný k délce měření.

Filtr zobrazený na Obrázku 3.34 je velmi podobný tomu zobrazenému na Obrázku 3.32. To proto, že ač se jedná o rozdílné záznamy na rozdílných detektorech, zaznamenaný signál je stále tentýž, a to dohasínání Rhodaminu 6G. Rozdíl je patrný v místě, kde se filtry protínají. To není způsobeno rozdílným zjištěným lifetime (jeden z hledaných parametrů při vytváření rekonvolučního fitu), ale pouze rozdílným množstvím dat zaznamenaným na oba detektory. Na Obrázcích 3.10 a 3.14 kvůli logaritmickému měřítku není příliš patrný rozdíl ve velikosti obou dohasínání (pro Perkin Elmer je zaznamenáno přibližně 15000 hodnot v peaku, pro PicoQuant přibližně 10000 hodnot), avšak rozdílný počet hodnot je vidět v místech, kde křivka dohasínání končí. Zatímco pro detektor Perkin Elmer křivka klesá až přibližně do 30 ns, u detektoru PicoQuant dohasínání končí přibližně kolem 25 až 26 ns. Tímto je způsobeno, že u detektoru Perkin Elmer je stále vyšší pravděpodobnost, že foton patří dohasínajícímu barvivo v čase např. 28 ns, zatímco u detektoru PicoQuant již nikoliv.

Sklon křivky dohasínání je v obou případech stejný, rozdílná amplituda však způsobuje tento rozdíl u filtrů. Proto je potřeba pro každý záznam vypočítat filtr zvlášť a nespolehat se na stejné doby života jednoho barviva.



Obrázek 3.33 Autokorelační funkce pro stacionární měření Rhodaminu 6G při AVCR 10 kcps a 150 kcps bez filtru (zelená) a s filtrem vypočítaným na základě nejlepšího provedeného rekonvolučního fitu (červená) pro detektor PicoQuant



Obrázek 3.34 Filtr použitý pro výpočet plně červené ACF na Obrázku 3.33 (červený filtr) – filtr vybere barvivo Rhodamin 6G – a filtr pro pozadí nepoužitý pro výpočty (zelený), vzhledem k němuž byl počítán filtr první – filtr vybere signál pozadí, PicoQuant. Časová osa je zde otočená oproti ostatním obrázkům v této práci, čas plyne zprava doleva.

3.4.2 ACF a CCF – měření fluktuujícího signálu

U obou detektorů byly určeny vlivy použité IRF pro fit na výsledné ACF, a protože v roztoku s fluktuujícím signálem se vyskytují dva difundující elementy (určeno v kapitole 3.3.1), je možné vypočítat i CCF která udává, do jaké míry se pohybují oba vyzářující elementy pohromadě.

Pro detektor Perkin Elmer, u kterého je silná závislost tvaru IRF na AVCR, vychází fity pomocí různých IRF velmi odlišně. Jak již bylo zmíněno (viz Obrázek 3.23), nejlepšího fitu zde bylo docíleno s IRF měřenou při AVCR 50 kcps a chí kvadrát pro něj vychází přibližně 3.

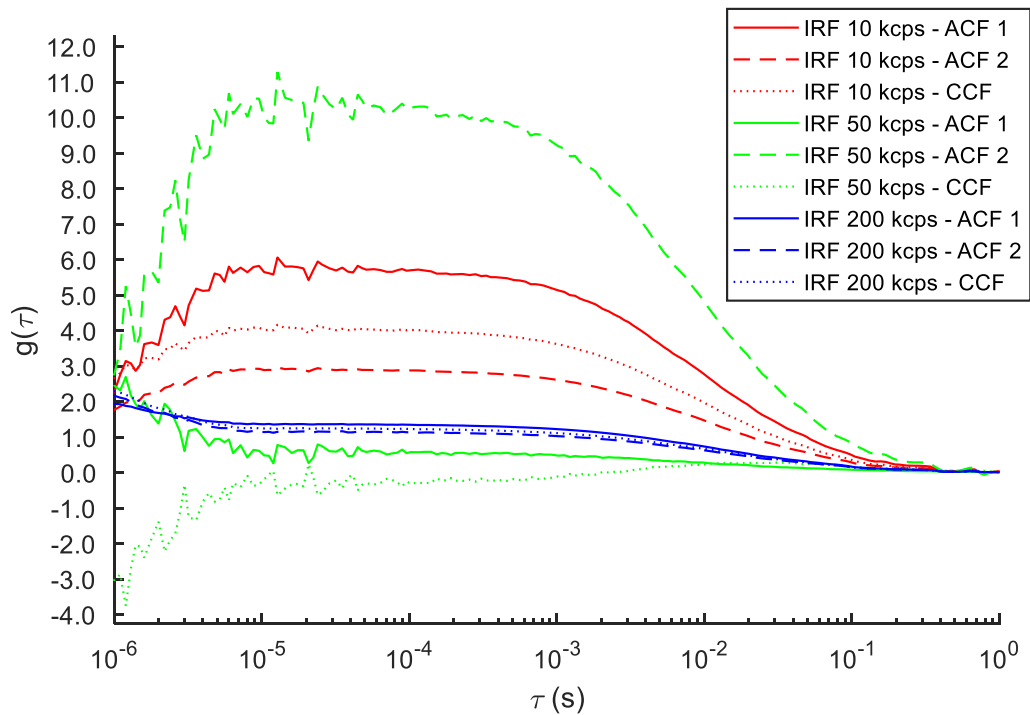
Použitím všech provedených fitů (pro IRF měřenou při 10 kcps vycházel chí kvadrát 7, pro IRF měřenou při 750 kcps dokonce 95) byly vypočteny filtry, za pomoci kterých byla vždy vypočtena ACF pro obě složky fluorescence a vzájemná CCF.

Na Obrázku 3.35 jsou zobrazeny ACF a CCF pro fit celkové křivky dohasínání fluorescence fluktuujícího signálu získaný pomocí IRF naměřených při různých intenzitách na detektoru Perkin Elmer. Tvar ACF a CCF pro IRF při 10 kcps je velice odlišný od očekávané sigmoidy, především pokles korelace v mikrosekundových časech je atypický. Není přesně zřejmé, co tento jev způsobuje, vliv by mohla hrát saturace fluorescence (fluorofor je ozařován příliš vysokou intenzitou, že není schopen emitovat fluorescenci úměrně excitační intenzitě) nebo antibunching (fluorofor je v každém časovém okamžiku schopen vyzářit pouze jeden foton, a tedy v krátkých časech není dostatek událostí, se kterými by bylo možné událost korelovat). Tyto teorie by se musely ověřit, není jim však možné přiřítat přílišnou váhu, neboť u mnoha dalších korelačních křivek se tyto poklesy neobjevují.

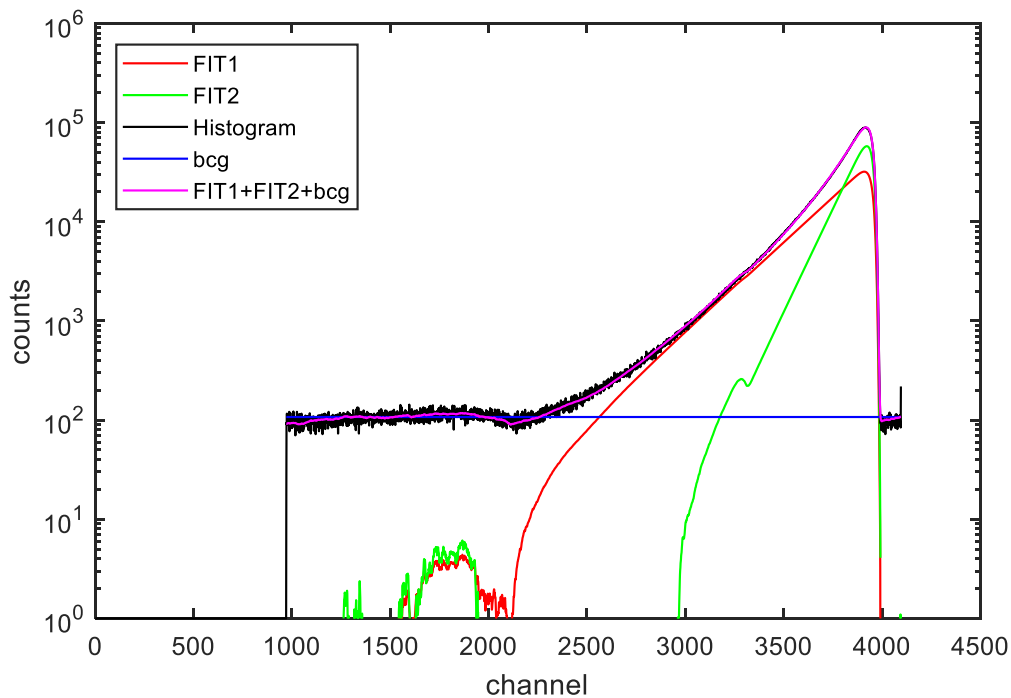
U ACF a CCF pro nejlepší získaný fit celkového dohasínání (tedy s IRF při intenzitě 50 kcps) zmíněný pokles v krátkých časech vykazuje pouze ACF jedné fluorescenční složky a CCF, která zde v krátkých korelačních časech vychází dokonce záporně.

U ACF a CCF pro fit celkové křivky dohasínání získaný pomocí IRF při 200 kcps je již místo poklesu v krátkých časech pozorován nárůst amplitudy ACF a CCF. Vše nasvědčuje tomu, že se nejedná o pozorování saturace nebo antibunchingu v případech nižších intenzit IRF, ani nejde o vliv nějaké další rychle difundující komponenty (na to, aby byl nárůst takto výrazný, by intenzita fluorescence pozadí na Obr. 2.10 musela být mnohem menší), ale že tyto výkyvy v amplitudě jsou důsledkem nedokonalostí fitů.

Pro lepší orientaci v jednotlivých ACF je přidán Obrázek 3.36 s křivkami dohasínání, kde jsou barevně znázorněny fitované složky s odebraným pozadím (zelená a červená), přičemž červená barva fitu odpovídá ACF značeným plnou čarou, zelený fit odpovídá ACF značeným přerušovaně.



Obrázek 3.35 ACF a CCF fluktuujícího záznamu získané pomocí rekonvolučních fitů křivek dohasínání pomocí IRF měřené při 10, 50 a 200 kcps, Perkin Elmer



Obrázek 3.36 Křivky dohasínání fluktuujícího záznamu včetně jejich fitů (IRF při 50 kcps) jednotlivých komponent, Perkin Elmer. Časová osa je zde otočená, čas tedy plyne zprava doleva.

Jak lze pozorovat z naprosto rozdílných tvarů ACF a CCF získaných pomocí jiných fitů na detektoru Perkin Elmer, vliv použité IRF je zásadní pro tvorbu fitů, podle kterých je získáván filtr pro ACF. Vzhledem k vysokým hodnotám chí kvadrátů všech fitů celkového dohasínání na detektoru Perkin Elmer, žádná z těchto ACF a CCF nemusí odrážet skutečný tvar funkcí. Zde by bylo nutné naměřit IRF pro rekonvuluci skutečně při správném AVCR, avšak ani to by nemuselo poskytnout uspokojivě přesné výsledky, neboť se nejedná o stacionární měření, ale intenzita fluorescence silně fluktuuje, a tedy i tvar IRF se v průběhu měření mění s intenzitou.

Jednalo-li by se o dvě rozdílná barviva, která dohasínají monoexponenciálně, bylo by nejjednodušším řešením místo rekonvolučních fitů s IRF použití křivek dohasínání každého barviva naměřeného zvlášť při obdobných podmínkách (na difundujících nanočásticích při fluktuujícím signálu). Tento postup však nelze zvolit, jedná-li se o jedno barvivo se dvěma přechody, neboť nelze snímat fluorescenci pouze z jednoho z nich.

V takovém případě by bylo nutné naměřit samotné IRF při fluktuujícím signálu, tedy na difundujících nanočásticích srovnatelné velikosti, jež by byly značeny velmi rychle dohasínajícím barvivem. Tento postup je však komplikovaný, proto se i pro FLCS spíše používají barviva s monoexponenciálním dohasínáním, aby bylo možné použít jejich naměřené křivky dohasínání.

Z dat naměřených na detektoru PicoQuant byly též vypočteny ACF a CCF pomocí filtrů získaných z fitů jednotlivými IRF. Zde nedocházelo téměř k žádným rozdílům, především proto, že všechny fity (pomocí různých IRF) na tomto detektoru dávaly velmi podobnou shodu. Protože tato shoda byla dobrá, lze dosažené výsledky korelací považovat za přesnější, než ty získané z detektoru Perkin Elmer.

Na Obrázku 3.37 jsou zobrazeny ACF a CCF získané pomocí fitu s IRF měřenou při různých AVCR na detektoru PicoQuant. ACF pro obě difundující složky se z velké části překrývají, CCF se vyskytuje pro všechny časové okamžiky mezi nimi. Toto platí pro IRF měřenou jak při 10 kcps, tak při 50 kcps i 200 kcps (tento fit vykazoval úplně nejlepší shodu s naměřenou křivkou dohasínání). Při porovnání se tyto tři sady funkcí prakticky totožné.

Z tohoto vyplývá, že ve vzorku zvyrazňovače měřeném při fluktuujícím záznamu jsou nanočástice značené pravděpodobně jen jedním barvivem s více zářivými přechody mezi elektronovými hladinami. To z důvodu, že byly-li by v roztoku dvě barviva, je nepravděpodobné, že by jich bylo stejné množství, aby vytvořily totožné korelace.

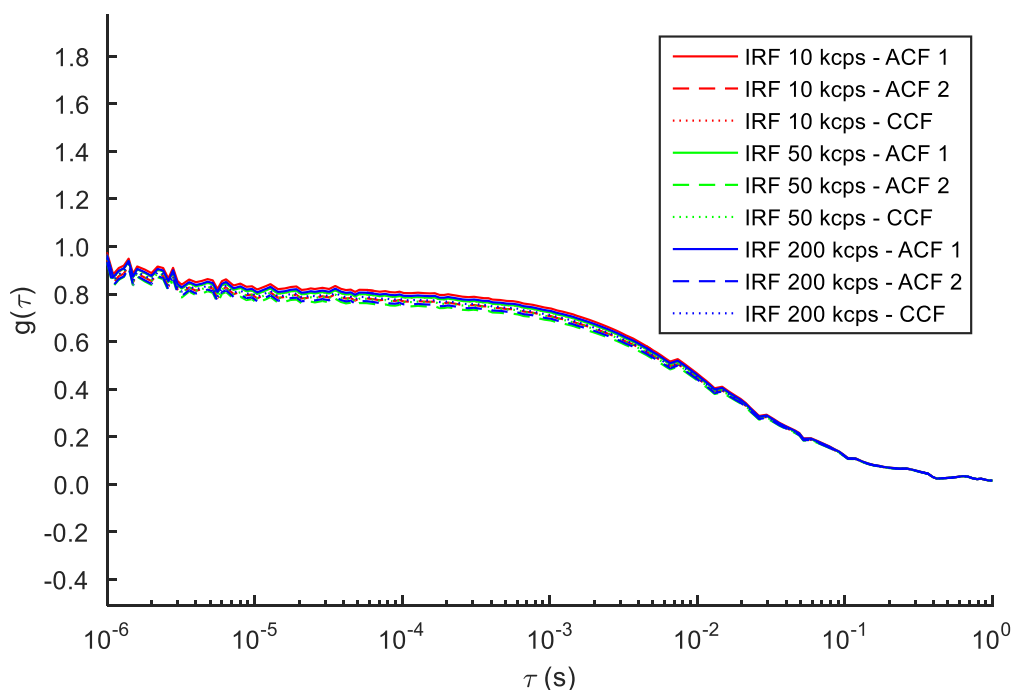
Zároveň je v krátkých časech vidět mírný příspěvek k autokorelaci od volně rozpuštěného barviva (mírný nárůst autokorelace v časech v řádech mikrosekund). Tento mírný nárůst je na rozdíl od výrazného nárůstu na Obr. 3.35 (pro modré ACF, osa y je výrazně delší, než osa y na Obrázku 3.37) uvěřitelný, neboť se předpokládá

nezanedbatelná koncentrace barviva v rozpouštědle, kvůli které je tento nárůst jenom mírný (intenzita volného barviva byla dle Obr. 2.10 nezanedbatelných 30 kcps).

Neznámý efekt se promítá do tvarů korelací na detektoru PicoQuant v difúzních časech v řádu desítek až stovek milisekund. Všechny korelační křivky zde vykazují mírné nerovnosti (Obrázek 3.37 a 3.33), které by na normální korelační křivce být přítomny neměly. Není pravděpodobné, že by se jednalo o projev špatného fitu, neboť chý kvadrát pro fit použitý k získání korelačních funkcí na Obrázku 3.36 sedí naprosto přesně. Čím jsou tyto výkyvy korelačních funkcí způsobeny, není známo a bylo by za potřebí dalšího zkoumání.

Přestože tedy byly pro získané fity použity IRF při velmi rozdílných AVCR, výsledky na detektoru PicoQuant jsou dobře interpretovatelné nezávisle na použité IRF. Tím se jen potvrzuje minimální závislost tvaru IRF u detektoru PicoQuant na snímané intenzitě – zde je dokázáno, že pozorované minimální rozdíly tvaru nehrají velkou roli u korelací.

Naopak krucíální roli hraje změna tvaru IRF s AVCR u detektoru Perkin Elmer, která je opravdu výrazná, a získané ACF a CCF jsou při použití každé z nich jiné. Lze očekávat, že podobně závažný dopad na tvary ACF by mělo použití různě posunutých IRF. Posun IRF v závislosti na AVCR byl totiž pozorován u téměř všech detektorů. V této práci však toto tvrzení prokázáno být nemohlo, neboť vlivem IRF naměřených při rozdílných vlnových délkách, než zaznamenaná fluorescence, by posun kvůli rozdílné vlnové délce byl výraznější, než posun kvůli AVCR. Proto musel tento jev být korigován.



Obrázek 3.37 ACF a CCF fluktuujícího záznamu získané pomocí rekonvolučních fitů křivek dohasínání pomocí IRF měřené při 10, 50 a 200 kcps, PicoQuant

4 Závěr

V první části práce byly určeny parametry pro měření závislosti časové odezvy lavinových fotodiod na snímané intenzitě. Byly vytvořeny výpočetní skripty v programovém prostředí MATLAB pro zpracování binárních souborů měření a pro vyhodnocení výsledků. Byly zkoumány především posuny IRF v čase, neboť hodnocení změny tvaru u většiny detektorů není potřeba a u zbylých by bylo kvantitativní hodnocení velmi obtížné, protože tvar se u nich měnil nerovnoměrně.

Změřením těchto závislostí na pěti detektorech od čtyř výrobců (EG&G, Perkin Elmer, PicoQuant a Excelitas) byly stanoveny závislosti odezvy jednotlivých detektorů na AVCR, avšak i na použité časovací TCSPC technice. Závislosti odezvy byly pro různé detektory rozdílné, detektory EG&G a PicoQuant vždy vykazovaly závislost odezvy především na AVCR, detektor Perkin Elmer na jednom TCSPC modulu vykazoval závislost především na AVCR, na druhém však byla zjištěna úplná závislost na zpoždění od posledního fotonu (IPD), zatímco detektor Excelitas vykazoval minimální (avšak nepravidelnou) závislost časové pozice IRF na AVCR. Zaznamenané mírné změny ukazují pro tento detektor závislost na obou faktorech, AVCR i IPD. Každý z těchto detektorů měl rozdílné ostatní výhody a nevýhody, které by je činily vhodnými či nevhodnými pro rozdílné metody FCS.

Bylo však ukázáno, že ačkoliv časová pozice IRF závisí na vlnové délce detekovaných fotonů, závislost, s jakou se IRF při změně AVCR posouvá, je přinejmenším u středních a vyšších AVCR stejná.

Novým zjištěním je, že výrazný vliv na pozorovanou závislost má použitý TCSPC modul pro registraci výstupního signálu ze SPAD. Doposud byla změna odezvy spojována pouze se samotnými detektory SPAD.

Ve druhé části této práce byly vybrány dva detektory (Perkin Elmer a PicoQuant), na kterých byl demonstrován vliv závislosti časové odezvy na snímané intenzitě při skutečných fluorescenčních měření (stacionární a fluktuující intenzita fluorescence).

Pro tento případ byly nejprve naměřeny křivky dohasínání z roztoku Rhodaminu 6G při různých stacionárních intenzitách fluorescence. Následně byly jejich IRF zaznamenané při různých intenzitách použity pro vytvoření rekonvolučního fitu a byla určována vhodná intenzita pro záznam IRF k dané intenzitě fluorescence podle chí kvadrát testu dobré shody mezi naměřeným dohasínáním a určeným fitem. Z důvodů pozdějších měření fluktuující intenzity, kdy nebylo možné zaznamenat IRF při stejné vlnové délce, jako fluorescence, byly posuny IRF s AVCR korigovány v MATLABu skriptem pro vytváření těchto fitů. Detektor Perkin Elmer vykazoval silnou závislost tvaru IRF na AVCR, tedy u něj byla vždy definována vhodná intenzita IRF pro danou

stacionární intenzitu fluorescence Rhodaminu 6G. Tato vhodná intenzita pro IRF byla pro většinu případů přibližně o třetinu nižší, než následná intenzita snímané fluorescence. U detektoru PicoQuant tato závislost tvaru patrná nebyla a tedy vhodná intenzita pro měření IRF k dané intenzitě snímané fluorescence určena být nemohla. Všechny naměřené IRF na tomto detektoru dávaly dobrou shodu mezi naměřenou křivkou dohasínání a vytvořeným rekonvolučním fitem.

Byly též porovnávány posuny křivek dohasínání při rozdílných AVCR, zda je jejich posun ve shodě s posunem IRF daného detektoru. U detektoru Perkin Elmer, u kterého je výrazná závislost tvaru IRF na AVCR, se posuny křivek dohasínání neshodují s posuny IRF. U detektoru PicoQuant však k žádné změně tvaru nedocházelo a posuny křivek dohasínání dobře odpovídaly zjištěným posunům IRF. Z toho bylo vyvozeno, že obecný posun křivky dohasínání stacionární intenzity fluorescence lze podle IRF dopředu určit jen u detektorů, u nichž nedochází ke změně tvaru IRF s AVCR. U takovýchto detektorů je tedy možné aplikovat korekci pouze na posun IRF, čímž dojde ke správné korekci naměřených dat dohasínání fluorescence při stacionární intenzitě signálu.

U měření fluktuující intenzity (záznam typu FCS) byl pořízený záznam nejprve vyhodnocován stejným postupem, tedy celková křivka dohasínání byla fitována pomocí rekonvolučního fitu s IRF, který především u detektoru Perkin Elmer nedával příliš dobré výsledky. V případech obou detektorů bylo dosaženo lepších výsledků (tj. lepší shody mezi naměřeným dohasínáním a fitem), pokud byl celkový záznam rozdělen na kratší intervaly a pro ně byly vytvořeny samostatné křivky dohasínání, jež v peaku dosahovaly přibližně stejných počtů fotonů jako IRF. Tento postup byl výrazně lepší, než bylo očekáváno.

Druhým postupem, který byl uplatňován, bylo rozdělení křivky dohasínání podle count-rate vypočteného v každém milisekundovém intervalu záznamu fluktuující intenzity. Tyto milisekundové intervaly byly zařazeny do skupin s ostatními intervaly obsahujícími podobné count-rate a z těchto skupin byly poté vytvořeny křivky dohasínání, které byly následně fitovány pomocí rekonvoluce exponenciálního dohasínání a změřené IRF. Tento postup měl simulovat dohasínání při stacionární intenzitě, avšak z fluktuujícího signálu. U detektoru Perkin Elmer bylo možné porovnat, zda nejlepší fity pomocí rozdílných IRF pro různé vybrané count-rate z celkového záznamu odpovídají tomu, jaké IRF odpovídaly daným AVCR při měření stacionární fluorescence. Toto porovnání ukázalo, že vhodné IRF jsou velmi podobné pro daný count-rate jak u stacionárního měření, tak u výběru z fluktuujícího měření. U detektoru PicoQuant toto porovnání provedeno být nemohlo, protože se fity ze všech IRF shodovaly se všemi křivkami dohasínání velmi dobře.

Je doporučeno provést tato měření s IRF snímanými na stejné vlnové délce jako fluorescence. V takovém případě bude možné zafixovat časový posun mezi IRF a

křivkou dohasínání a shody fitů budou reflektovat závislost IRF na AVCR. Tím bude možné určit nejvhodnější intenzitu pro měření IRF k danému snímání fluorescence i na detektorech, jež nevykazují přílišné změny tvaru IRF.

V poslední části je diskutován vliv použité IRF pro rekonvoluční fit na získané korelace. Toto bylo opět porovnáváno na stacionárním a fluktuujícím měření.

U stacionárního měření byly potvrzeny předpoklady nulové korelace u obou detektorů. U detektoru Perkin Elmer byly autokorelační křivky velmi blízké nule, a to i v případě, že vliv pozadí nebyl korigován. U detektoru PicoQuant byl identifikován velký vliv pozadí na tvar autokorelační křivky, která kvůli silnému afterpulsingu tohoto detektoru vykazovala kladné hodnoty v krátkých korelačních časech. Po odfiltrování vlivu pozadí však autokorelační křivka i pro tento detektor vycházela nulová.

U fluktuujícího měření, jelikož byly přítomny dvě zářivé složky v roztoku, byly vytvořeny dvě autokorelační funkce (pro každou složku) a byla určena kroskorelace mezi nimi. U detektoru Perkin Elmer byl zjištěn velký vliv použitých fitů (a tedy IRF) na výsledky korelace, které v případě špatných fitů nejsou konzistentní. Studované závislosti tvaru a posunu IRF na count-rate tedy mohou vést k velmi výrazným artefaktům u výsledných korelací.

To je potvrzeno na detektoru PicoQuant, na kterém je vliv změny tvaru IRF minimální a všechny ACF i CCF vychází téměř totožné, ač s neznámými nerovnostmi v delších časech. Stejně ACF pro obě složky jsou v souladu s orientačními předpoklady a potvrzují odhady složení roztoku s barvivem ze zvyrazňovače.

Seznam použité literatury

- [1] COVA, S., M. GHIONI, A. LACAITA, C. SAMORI a F. ZAPPA. Avalanche photodiodes and quenching circuits for single-photon detection. *Applied Optics*. 1996, 35(12), 1956-. DOI: 10.1364/AO.35.001956. ISSN 0003-6935. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ao-35-12-1956>
- [2] WAHL, Michael. *Time-Correlated Singel Photon Counting* [online]. PicoQuant, 2014 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf
- [3] ACCONCIA, Giulia, Ivan RECH, Angelo GULINATTI a Massimo GHIONI. High-voltage integrated active quenching circuit for single photon count rate up to 80 Mcounts/s. *Optics Express*. 2016, 24(16), 17819-. DOI: 10.1364/OE.24.017819. ISSN 1094-4087. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-24-16-17819>
- [4] ŠINDELÁŘ, Michal. *Fluorescenční korelační spektroskopie při studiu permeability lipidových membrán*. Kladno, 2012. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze. Fakulta biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Ing. Dalibor Pánek, Ph.D.
- [5] Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques. BECKER, Wolfgang. *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. Berlin: Springer, 2005, s. 297. ISBN 3540288821.
- [6] OTOSU, Takuhiro, Kunihiko ISHII a Tahei TAHARA. Note: Simple calibration of the counting-rate dependence of the timing shift of single photon avalanche diodes by photon interval analysis. *Review of Scientific Instruments*. 2013, 84(3), 036105-. DOI: 10.1063/1.4794769. ISSN 00346748. Dostupné také z: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/rsi/84/3/10.1063/1.4794769>
- [7] GREGOR, Ingo a Jörg ENDERLEIN. Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007, 6(1), 13-18. DOI: 10.1039/B610310C. ISSN 1474-905x. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B610310C>
- [8] KRÄMER, Benedikt a Felix KOBERLING. Time-Gated Fluorescence Correlation Spectroscopy for Improved Concentration Determinations [online]. PicoQuant, 2006, 1-4 [cit. 2017-01-10]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7271/appnote_time-gatedfcs.pdf
- [9] PICOQUANT. *PDL 828 Sepia II Computer Controlled Multi-Channel Picosecond Pulsed Diode Laser: User's Manual and Technical Data Version 0.93*. 63 s.

- [10] Pile-Up Effect. *Time Correlated Single Photon Counting Wiki* [online]. PicoQuant, 2015 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: http://www.tcspc.com/doku.php/glossary:pile-up_effect
- [11] Picosecond Pulzed Sources: LDH Series. *PicoQuant* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/picosecond-pulsed-sources/ldh-series-picosecond-pulsed-diode-laser-heads#custom1>
- [12] Picosecond Pulsed Sources: LDH-FA Series. *PicoQuant* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/picosecond-pulsed-sources/ldh-fa-series-amplified-picosecond-pulsed-laser-diode-heads#specification>
- [13] KAPUSTA, Peter, Michael WAHL a Rainer ERDMANN. *Advanced Photon Counting: Applications, Methods, Instrumentation*. 15. 1. Springer International Publishing, 2015, XII, 370. ISBN 978-3-319-15635-4.
- [14] WAHL, Michael a Sandra ORTHAUS-MÜLLER. *Time Tagged Time-resolved Fluorescence Data Collection in Life Sciences* [online]. PicoQuant, 2014 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/14528/technote_ttr.pdf
- [15] LAURENCE, Ted A., Achillefs N. KAPANIDIS, Xiangxu KONG, Daniel S. CHEMLA a Shimon WEISS. Photon Arrival-Time Interval Distribution (PAID): A Novel Tool for Analyzing Molecular Interactions. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, 108(9), 3051-3067. DOI: 10.1021/jp036499b. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp036499b>
- [16] Data Tables Index Lifetime Data of Selected Fluorophores. *ISS* [online]. 2017 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/LifetimeDataFluorophores.html
- [17] JOSEPH R. LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7463-124.
- [18] MAGDE, Douglas, Gail E. ROJAS a Paul G. SEYBOLD. *Solvent Dependence of the Fluorescence Lifetimes of Xanthene Dyes*. 1999. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb08277.x. ISBN 10.1111/j.1751-1097.1999.tb08277.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08277.x>
- [19] BERANOVÁ, L., J. HUMPOLÍČKOVÁ a M. HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy*. 2009, (103), 125-129. ISSN 1213-7103 0009-2770. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf

[20] MAMMEN, Thomas a Robert VALADEZ. AVERY DENNISON CORPORATION. *Smear-resistant ink compositions*. USA. US6946023. Uděleno 11. 12. 2003. Dostupné také z: <https://www.google.com/patents/US20030226474>

[21] BAKKER, M. a J. A. H. VAN LAARHOVEN. OCE-NEDERLAND B.V. *Magnetically attractable color toner powder*. USA. US4623602 A. Uděleno 18. 11. 1986. Dostupné také z: <https://www.google.com/patents/US4623602>

[22] ENDERLEIN, Jörg a Ingo GREGOR. Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*. 2005, **76**(3), 033102-. DOI: 10.1063/1.1863399. ISSN 0034-6748. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1863399>

Příloha A: Názvy použitých skriptů se stručnými popisy

1. **plotPTU.m** – skript pro vytváření a vyhodnocování driftu IRF z dat ve formátu PTU (popsáno v kapitole 2.2.2). Skript využívá funkci `readPTU_hist.m`, jež je postavena na základu skriptu `readPTU.m`. Dále je ve skriptu použita funkce `distinguishable_colors.m`, kterou je vytvářena paleta neopakujících se rozlišitelných barev. Autor – Ing. Dalibor Pánek, Ph.D., programováno na základu od Tomáše Maliny.

2. **Read_T3R.m** – skript pro vytváření a vyhodnocování IRF z dat ve formátu T3R (kapitola 3.1, popsáno v kapitole 2.2.4). Selekcce detekčních kanálů (řádek 19) byla použita pro každou kombinaci laser-detektor zvlášť. Nastavení grafů (limity os, měřítko atd.) byly použity univerzálně pro všechny detektory pro snazší porovnávání. Autor – Tomáš Malina na základě demo-skriptu od PicoQuant.

3. **readPTU.m** – skript pro vytváření a vyhodnocování IRF z dat ve formátu PTU (kapitola 3.1, popsáno v kapitole 2.2.4). Selekcce detekčních kanálů (řádek 19) byla použita pro každou kombinaci laser-detektor zvlášť. Nastavení grafů (limity os, měřítko atd.) byly nastaveny univerzálně pro všechny detektory pro snazší porovnání – stejným způsobem jako grafy ve skriptu výše. Autor – Tomáš Malina na základě demo-skriptu od PicoQuant.

4. **readPTU_rhodamin.m** – skript pro vyhodnocování posunů křivek dohasínání Rhodaminu a srovnání s posuny IRF (použito v kapitole 3.2.3, popsáno v kapitole 2.3.3). Skript vznikl úpravou skriptu `readPTU.m`. Ve skriptu je využita funkce `zoomPlot.m`, která je volně dostupná od jejího autora Wei Shanga z University of New Brunswick na adrese github.com/weishang. Autor skriptu – Tomáš Malina na základě demo-skriptu od PicoQuant.

5. **reconvolve.m** – skript pro fitování křivek dohasínání exponenciálními funkcemi pomocí konvoluce s IRF. Skript též používá funkce další funkce pro jednotlivé kroky: `Chi2.m` (vypočte fit konvoluce IRF + matematický model, ohodnotí fit pomocí goodness-of-fit), `Chi2_components.m` (získá fity jednotlivých komponent) a `tshift.m` (posune křivku v čase pomocí interpolace). Autor – Ing. Dalibor Pánek, Ph.D., upraveno a přepracováno Tomášem Malinou.

6. **PTUtoT3R.m** – skript pro konverzi z binárního formátu PTU do odlišného binárního formátu T3R včetně header specifikací. Autor – Tomáš Malina

7. **timetrace_PTU.m** – skript pro vytváření a ukládání částečných křivek dohasínání. Nejprve je celkový záznam rozdělen na 10 stejně dlouhých částí, ze kterých jsou uloženy křivky dohasínání. Poté je vypočten Time Trace signál fotony dopadající na detektor s rozdílnou intenzitou jsou zařazeny do rozdílných křivek podle specifikovaných count-rate intervalů (řádek 63). Tyto částečné křivky jsou uloženy do samostatných TXT souborů. Autor – Tomáš Malina

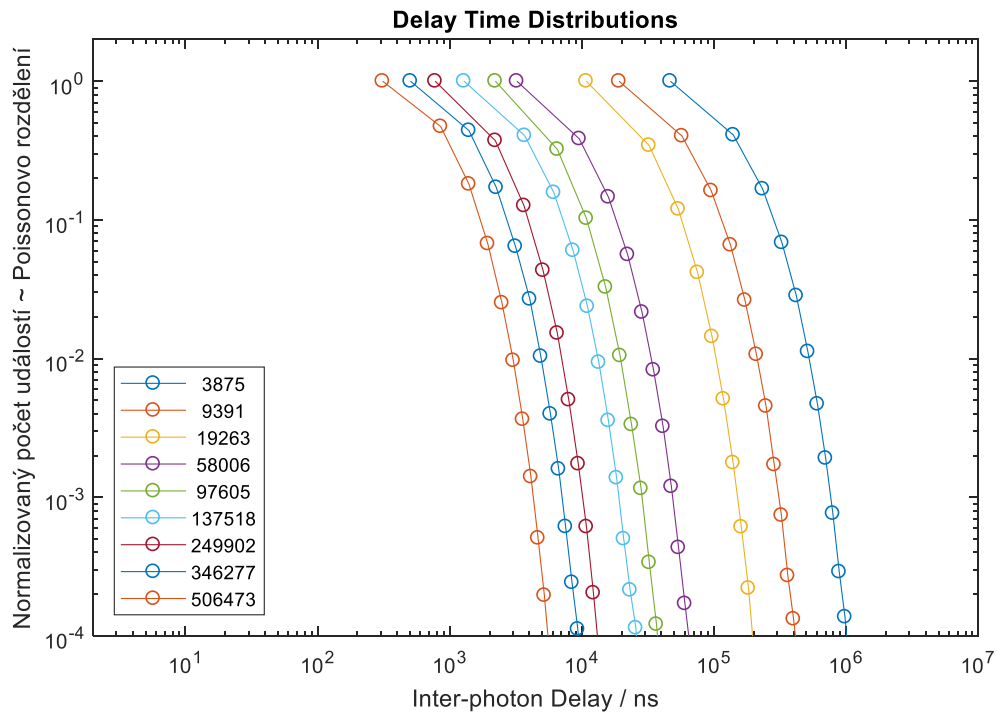
8. **flcs_hist.m** – skript pro výpočet ACF a CCF. Skript používá dynamickou knihovnu `t3r_dll_64.dll`, ve které jsou zakódované funkce pro počítání korelace, skript též používá další funkce pro jednotlivé kroky: `read_t3r_header.m` (přečte header T3R souboru) a `FLCSt3r.m` (spustí výpočet korelace pomocí knihovny `t3r_dll_64.dll`). Autor – Ing. Dalibor Pánek, Ph.D., upraveno a přepracováno Tomášem Malinou

9. **t3r_dll_64.dll** – dynamická knihovna postavená na základu dynamické knihovny `t3r_dll.dll` poskytnuté Dr. Peterem Kapustou. V této knihovně je zakódováno několik funkcí, z nichž je využívána ta pro výpočet korelace. Původní knihovna (`t3r_dll.dll`) byla naprogramována Dr. Peterem Kapustou, nová `t3r_dll_64.dll` knihovna je verze přepracovaná Tomášem Malinou na 64-bit platformu a upravena pro fungování na libovolných opakovacích frekvencích záznamů, neboť v práci je používána frekvence laseru 10 a 20 MHz. Pro build knihovny bylo použito prostředí Microsoft Visual Studio Community 2017 dostupné zdarma.

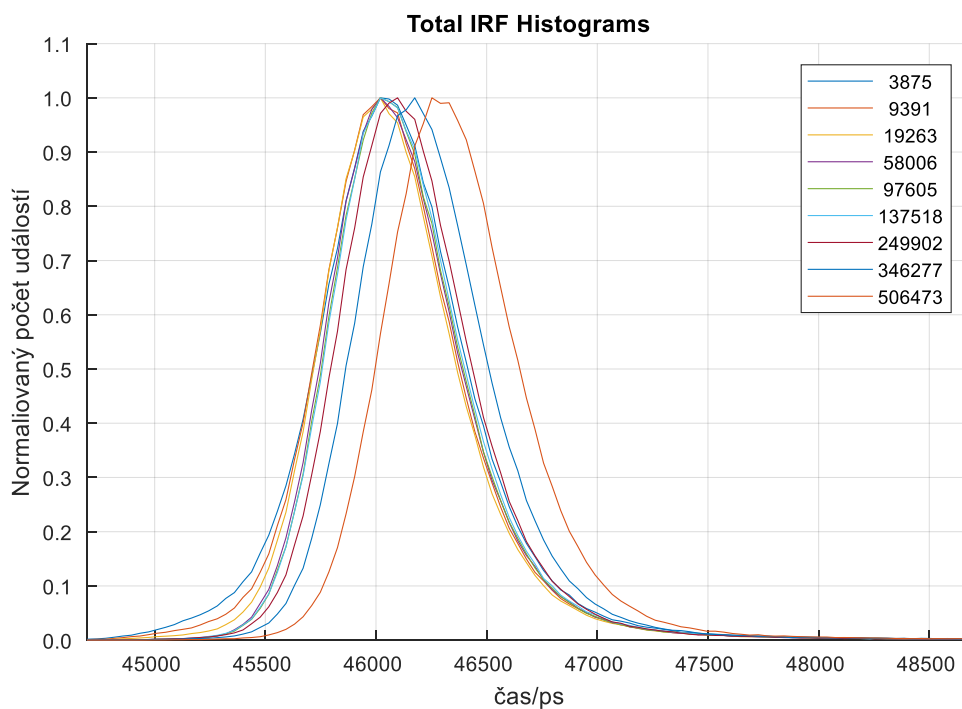
Příloha B: Grafy naměřených IRF

Detektor 1 (EG&G) + TimeHarp 200

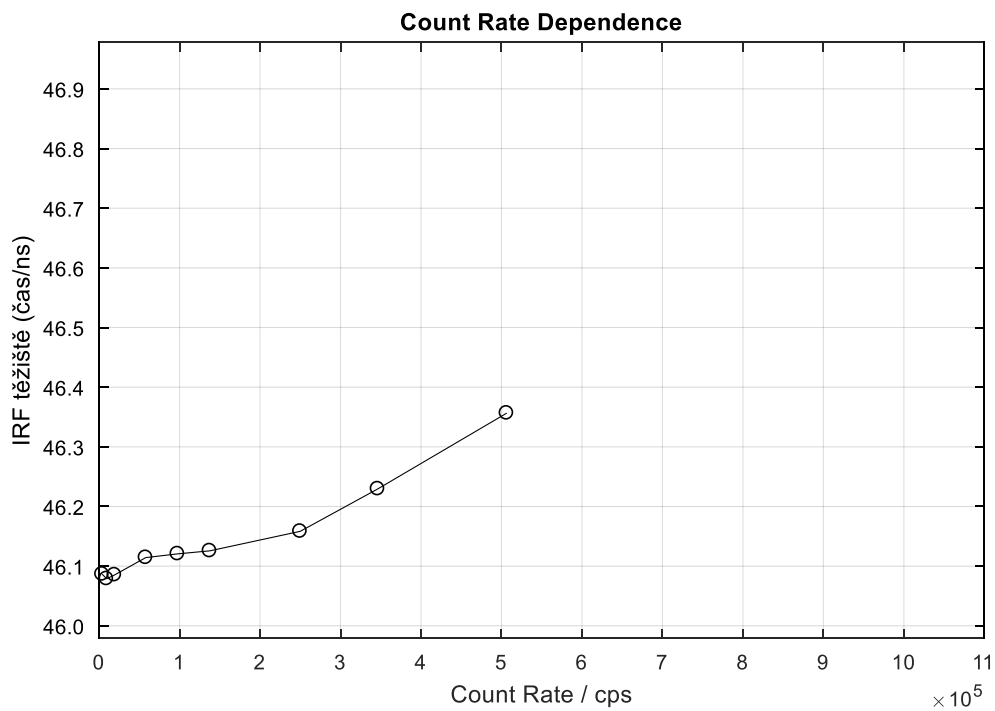
- Modrý laser:



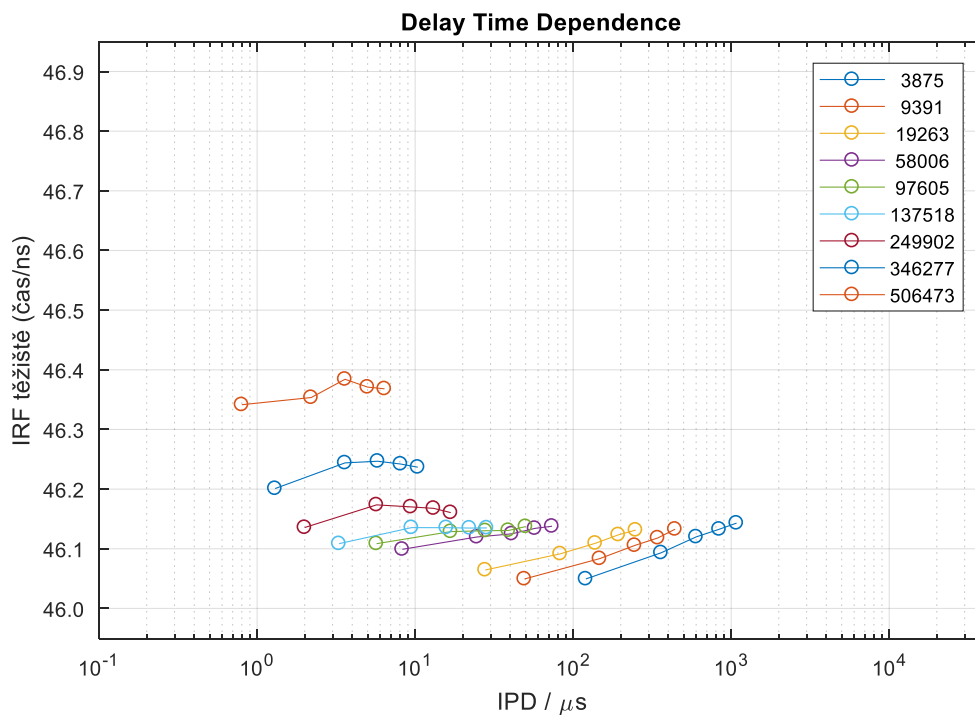
Obrázek B.1 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.2 Grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

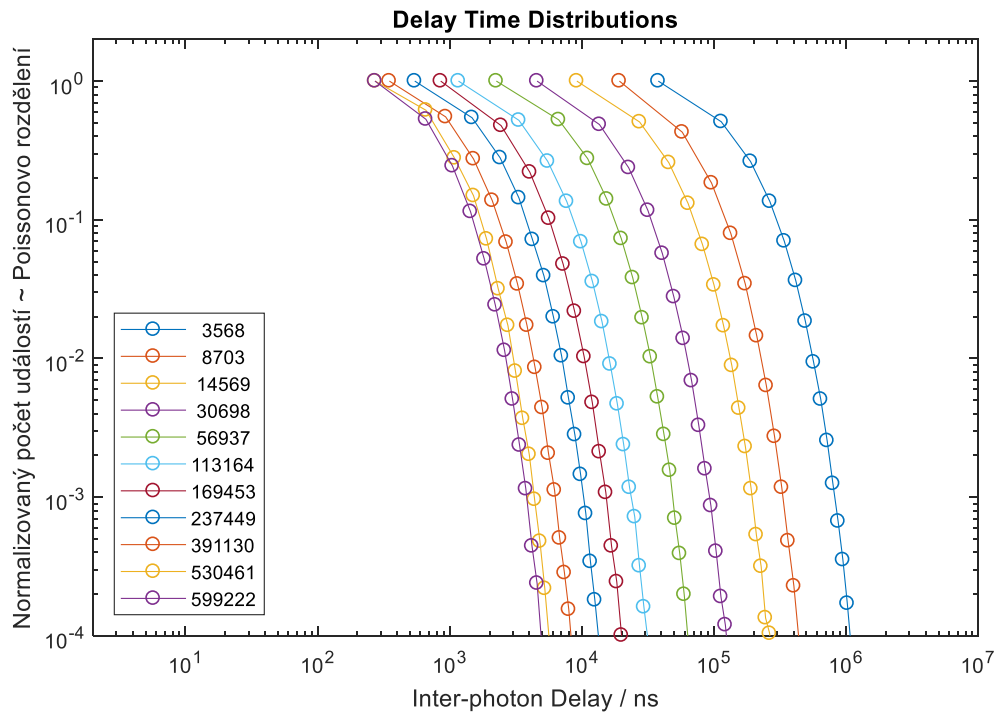


Obrázek B.3 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)

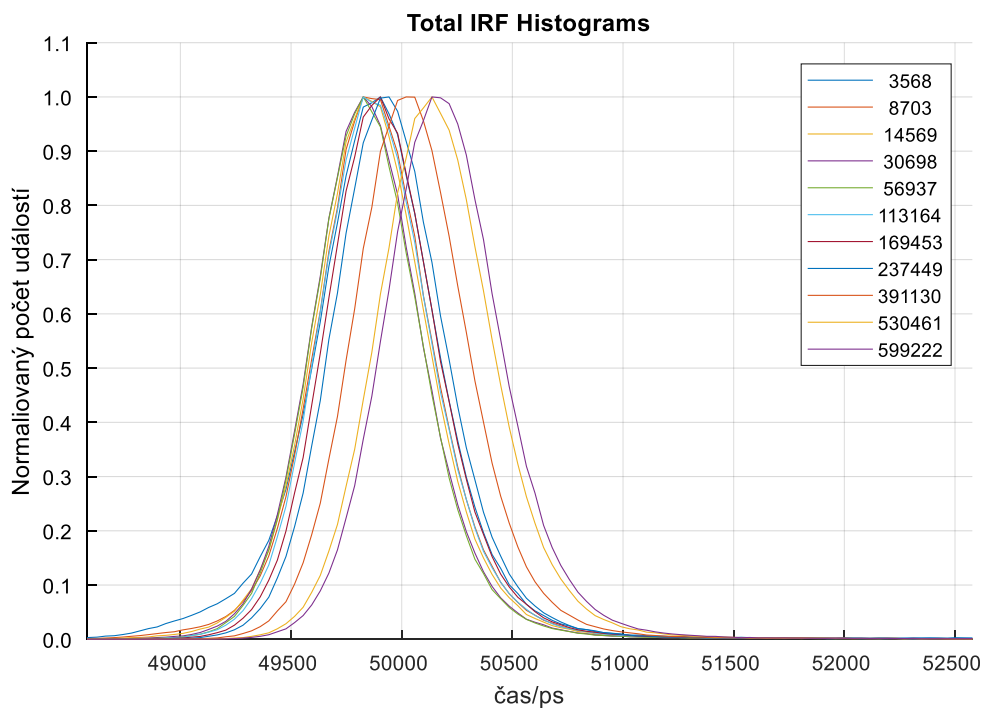


Obrázek B.4 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

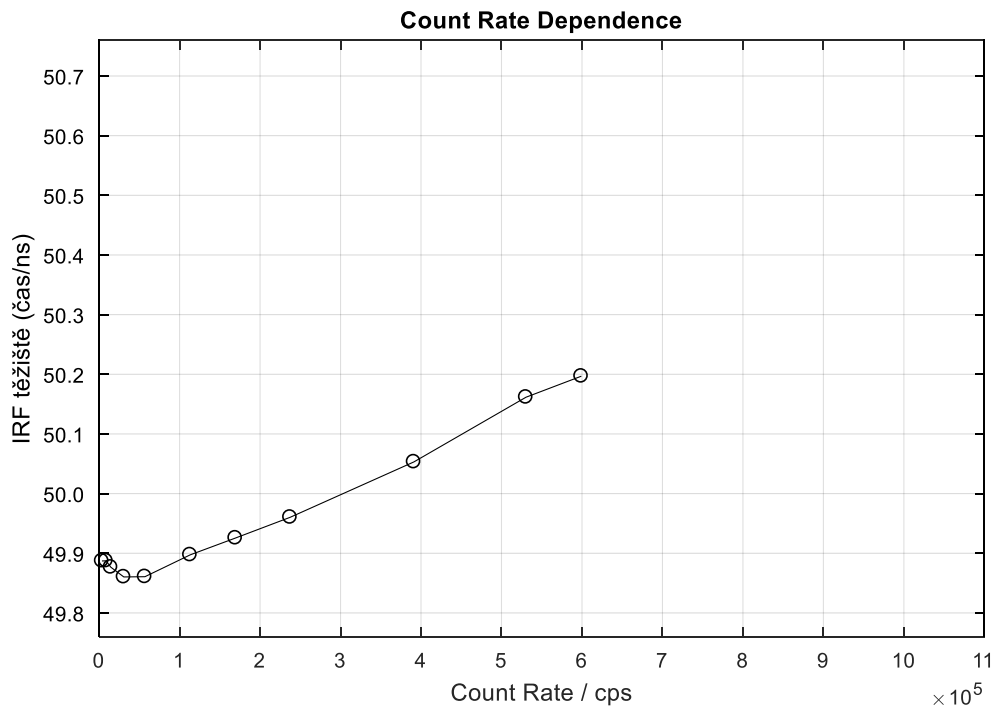
- Červený laser:



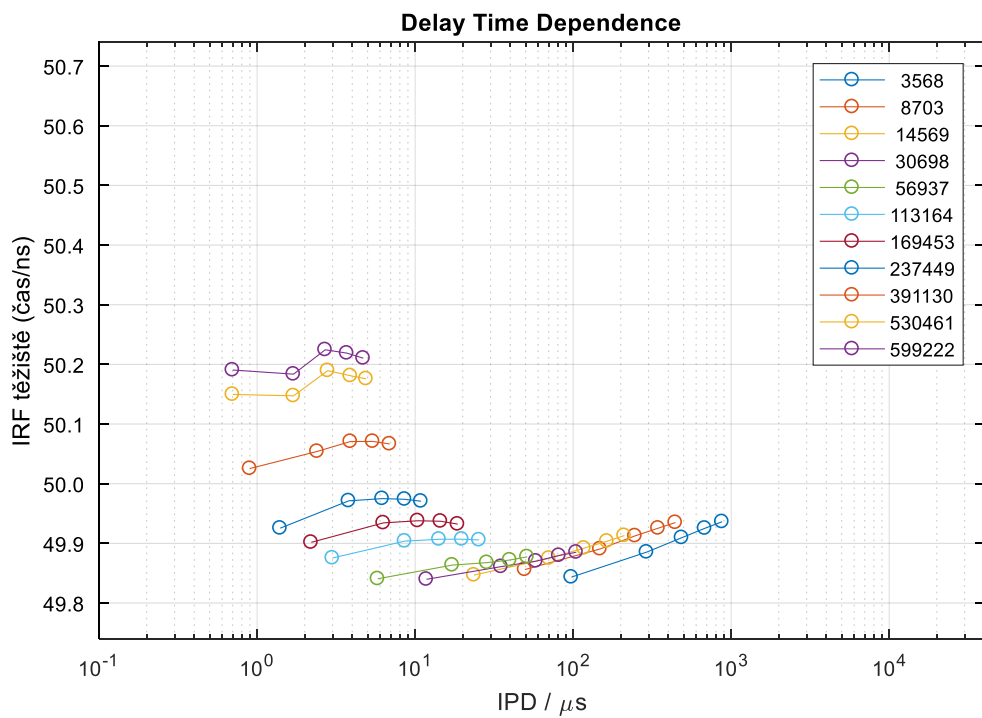
Obrázek B.5 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.6 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)



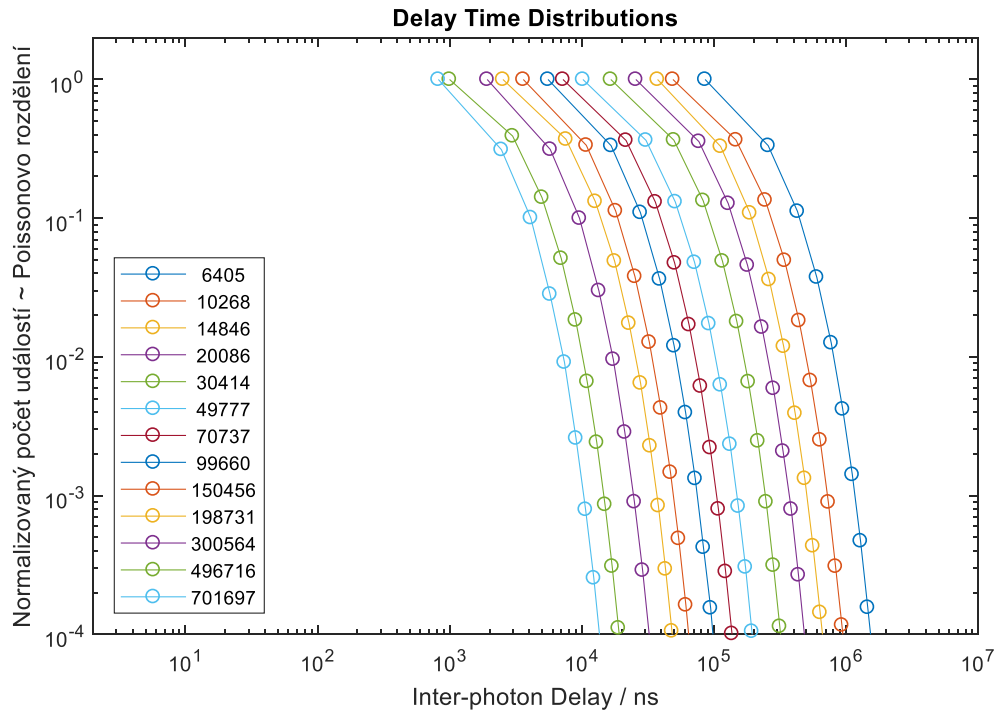
Obrázek B.7 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)



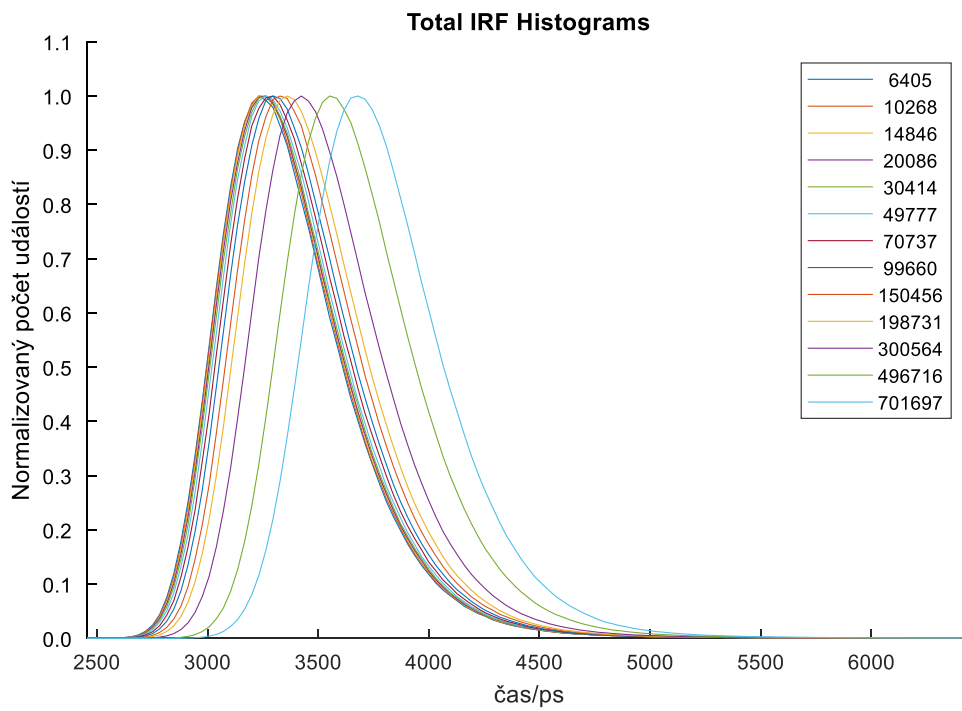
Obrázek B.8 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

Detektor 1 (EG&G) + HydraHarp 400

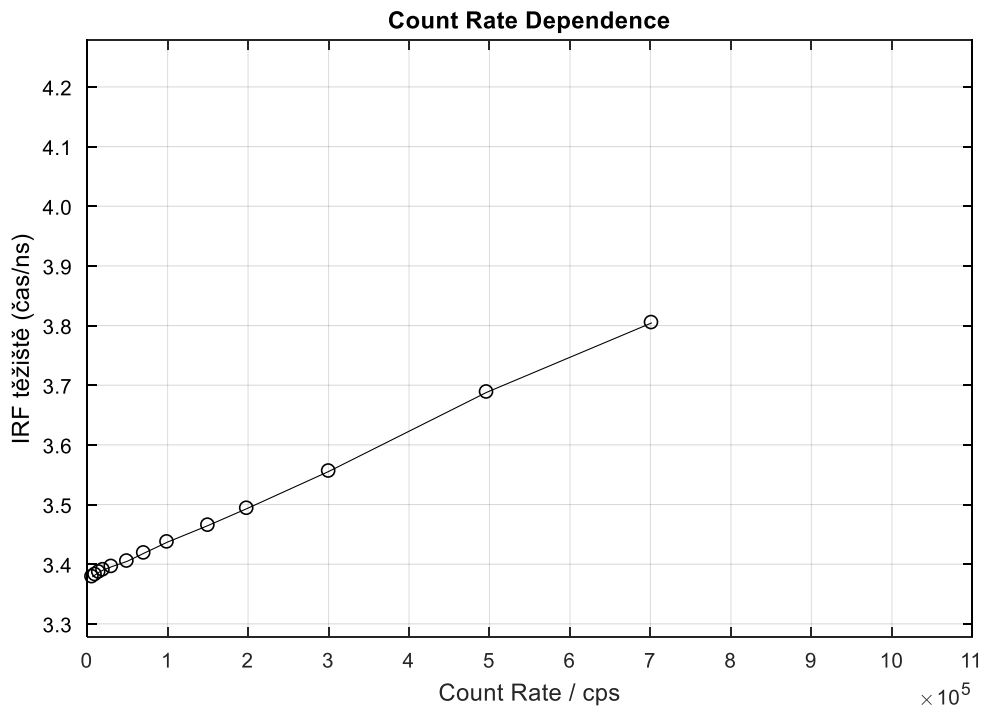
- Zelený laser



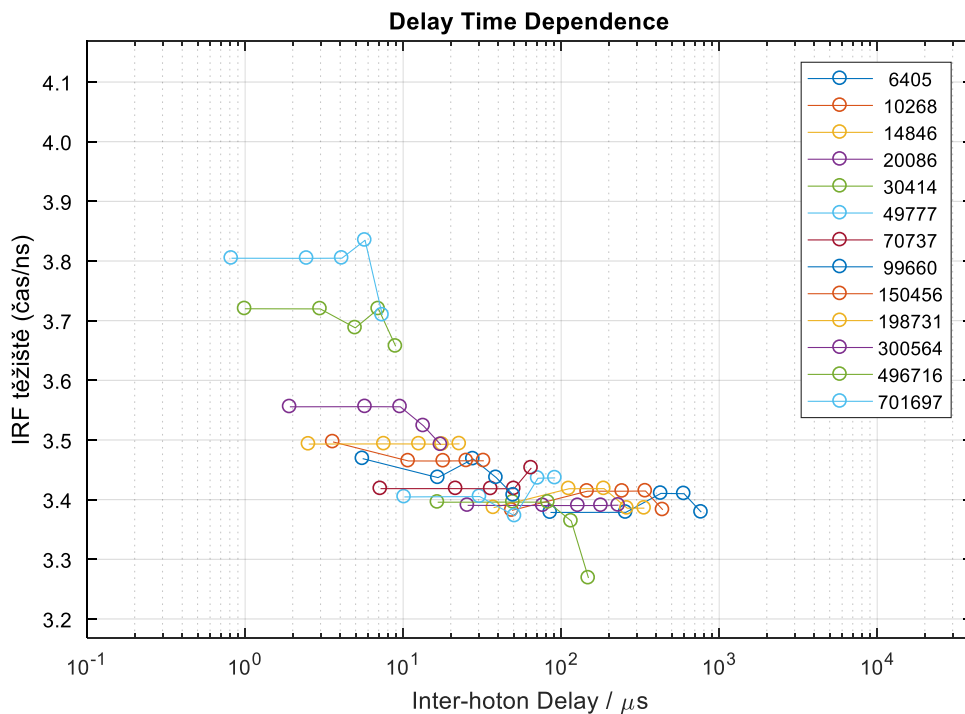
Obrázek B.9 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.10 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)



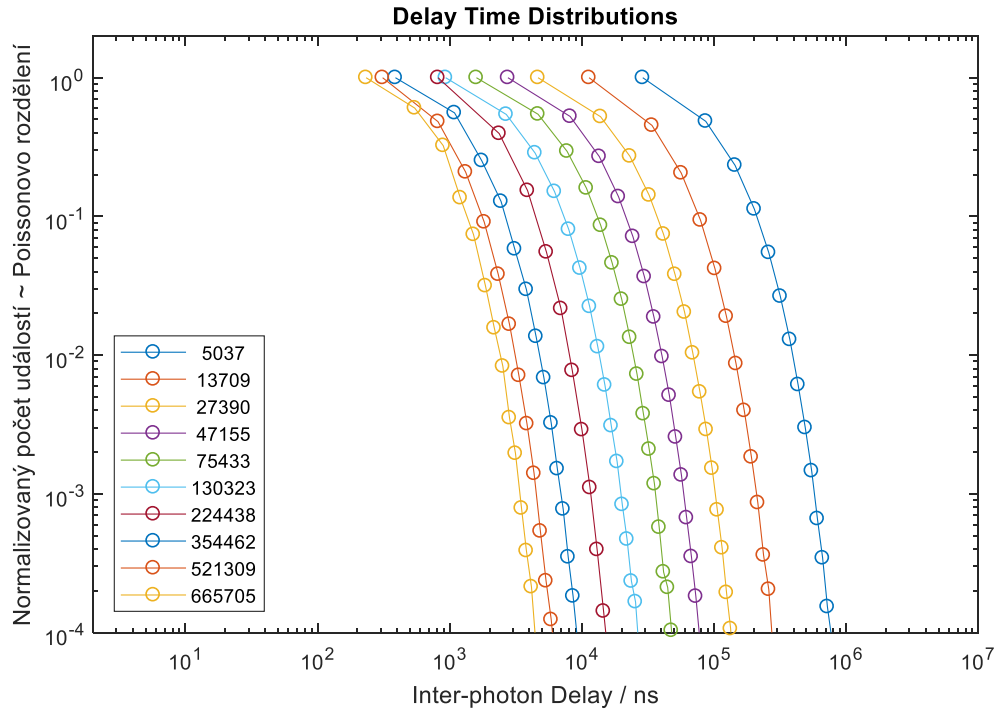
Obrázek B.11 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)



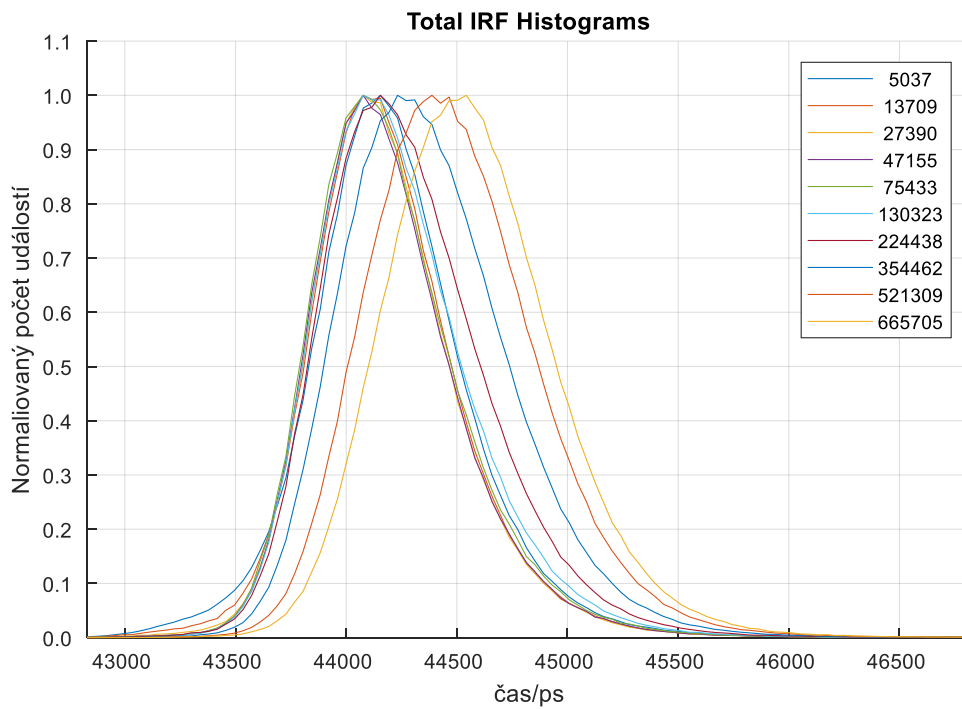
Obrázek B.12 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

Detektor 2 (Perkin Elmer) + TimeHarp 200

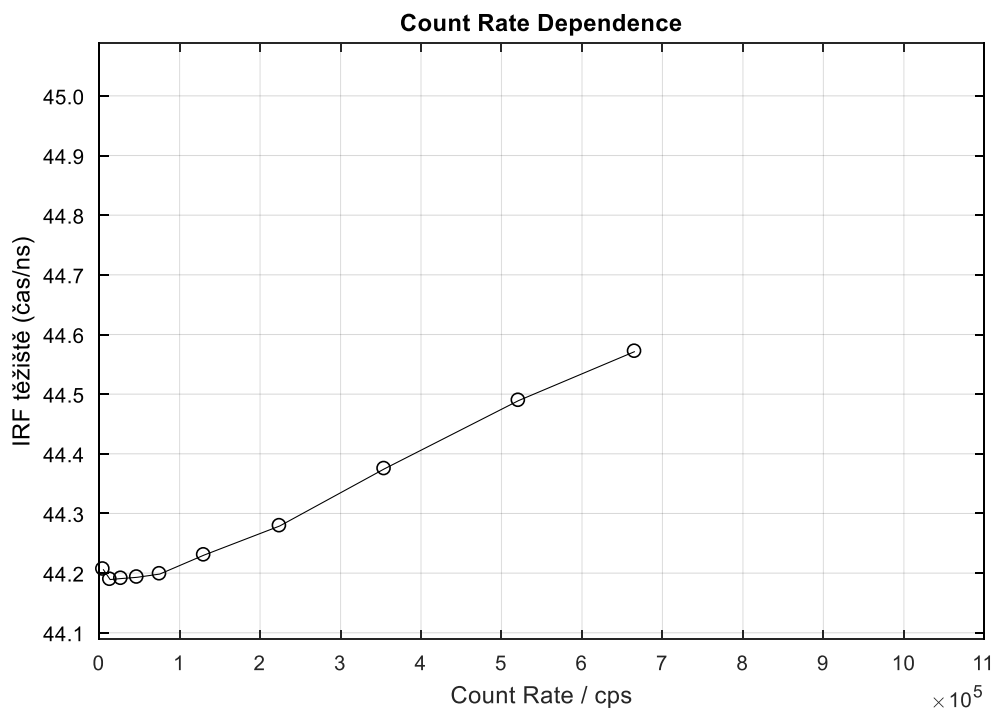
- Modrý laser



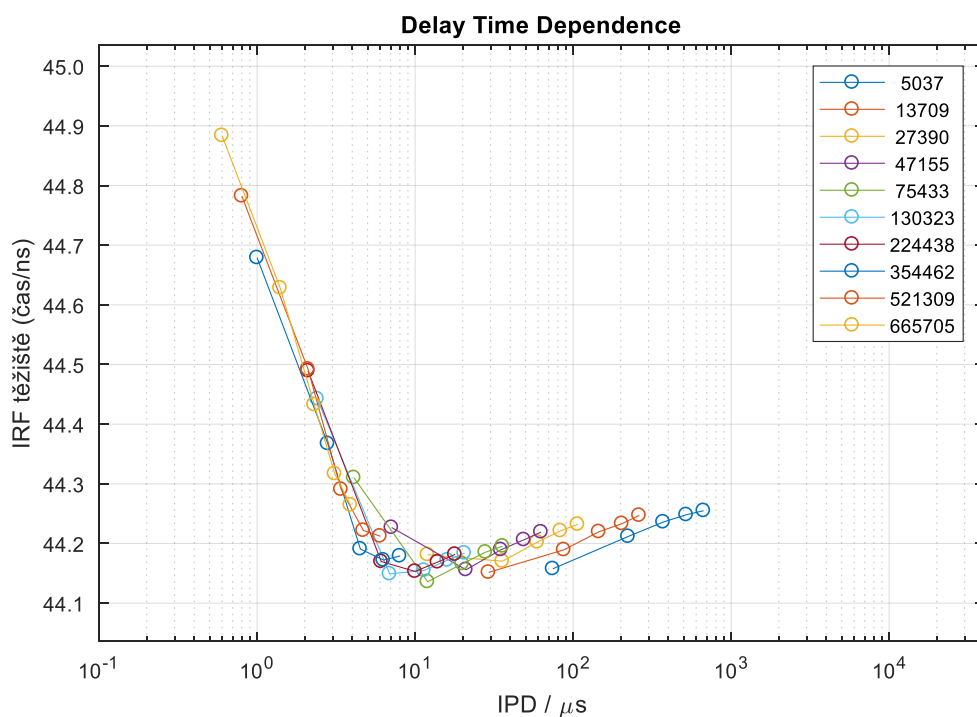
Obrázek B.13 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.14 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

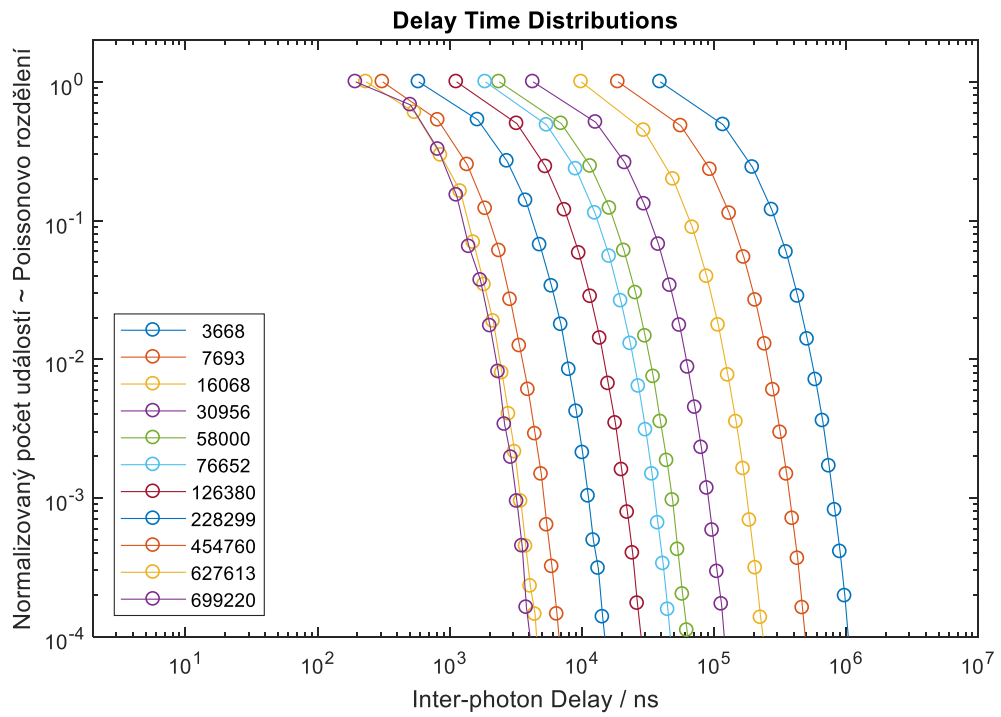


Obrázek B.15 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)

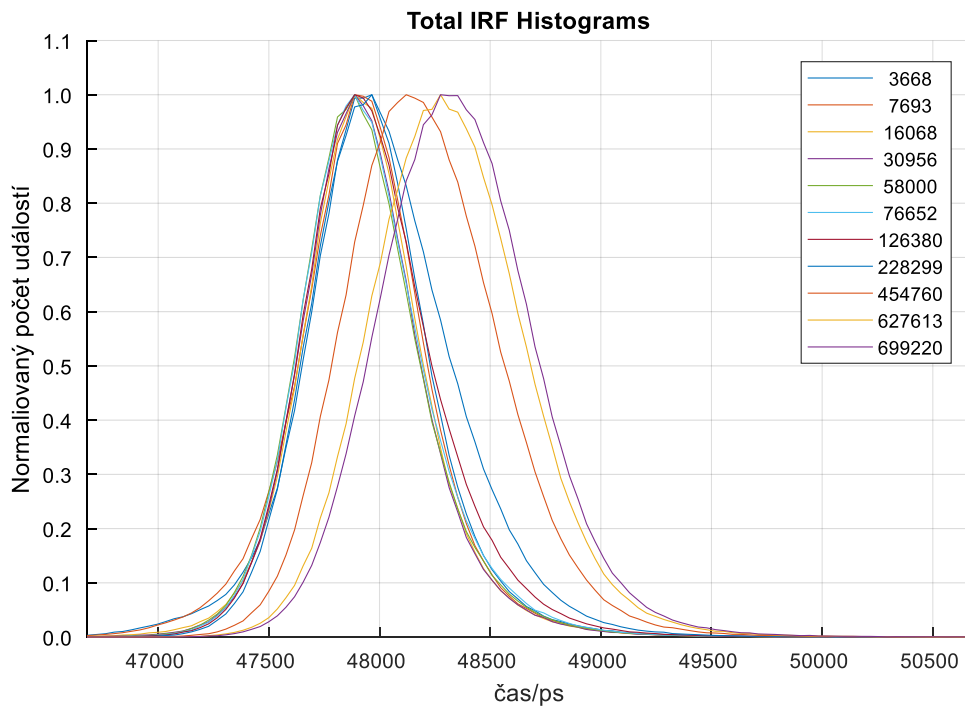


Obrázek B.16 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

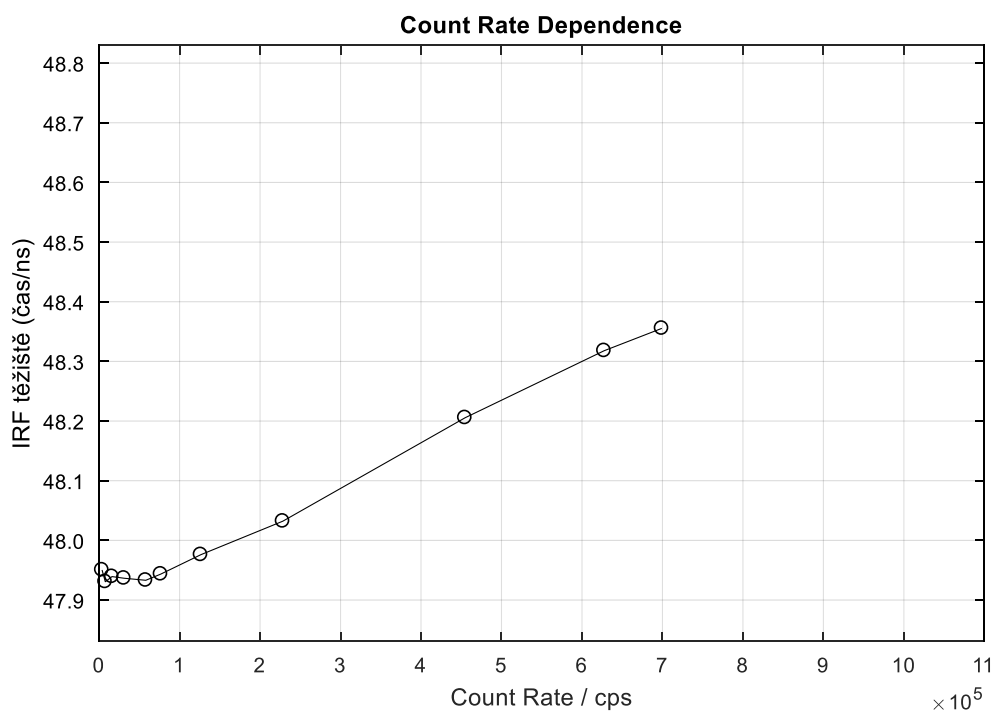
- Červený laser:



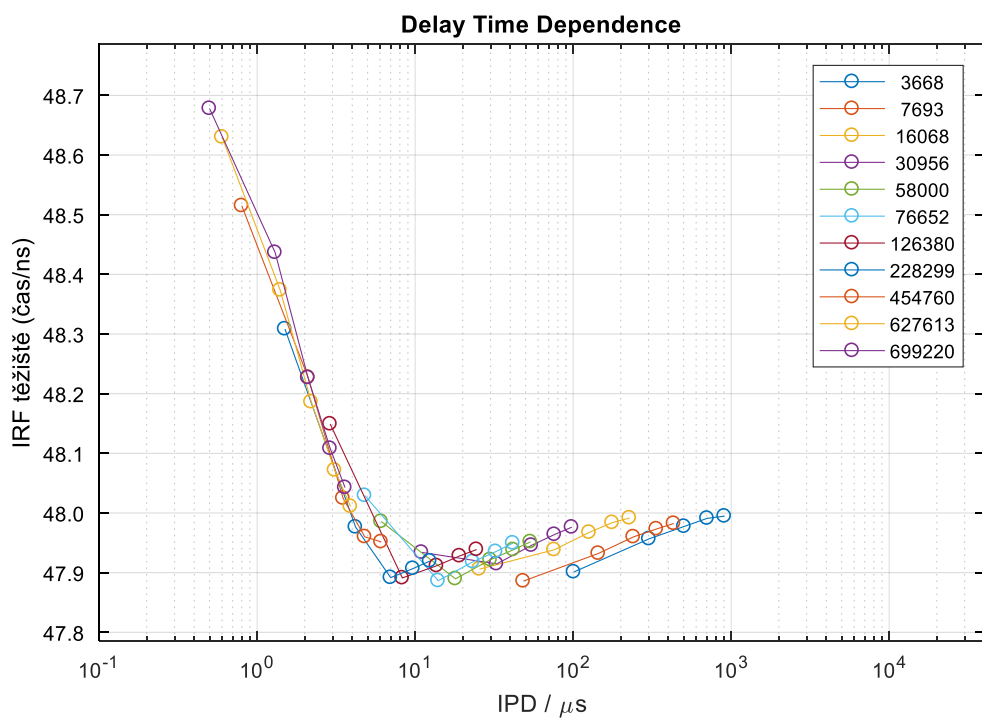
Obrázek B.17 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.18 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

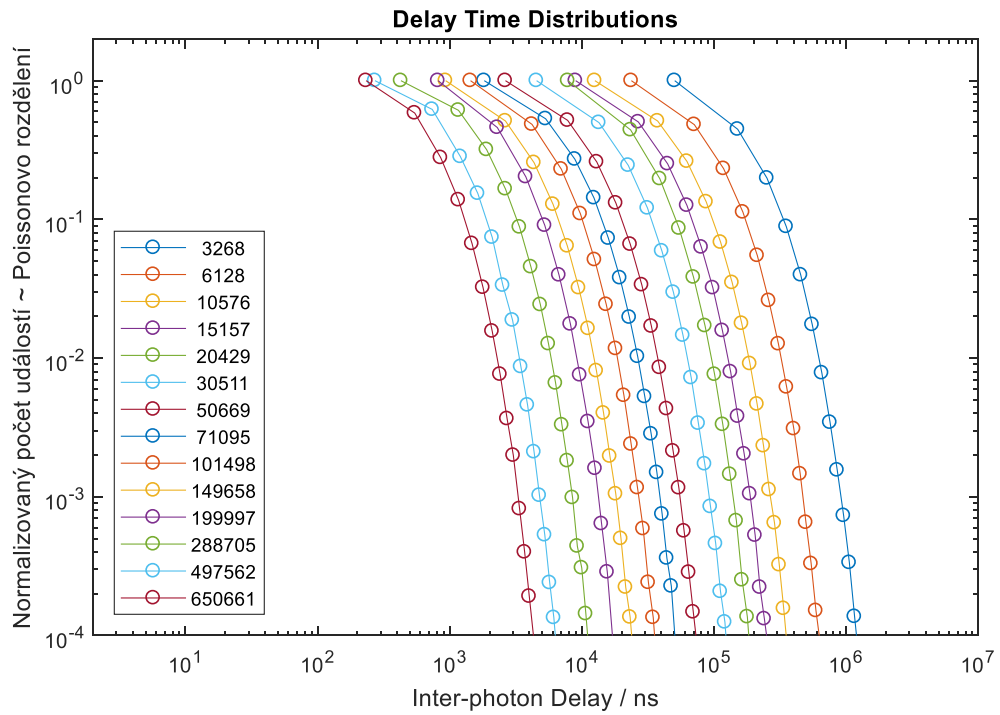


Obrázek B.19 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)

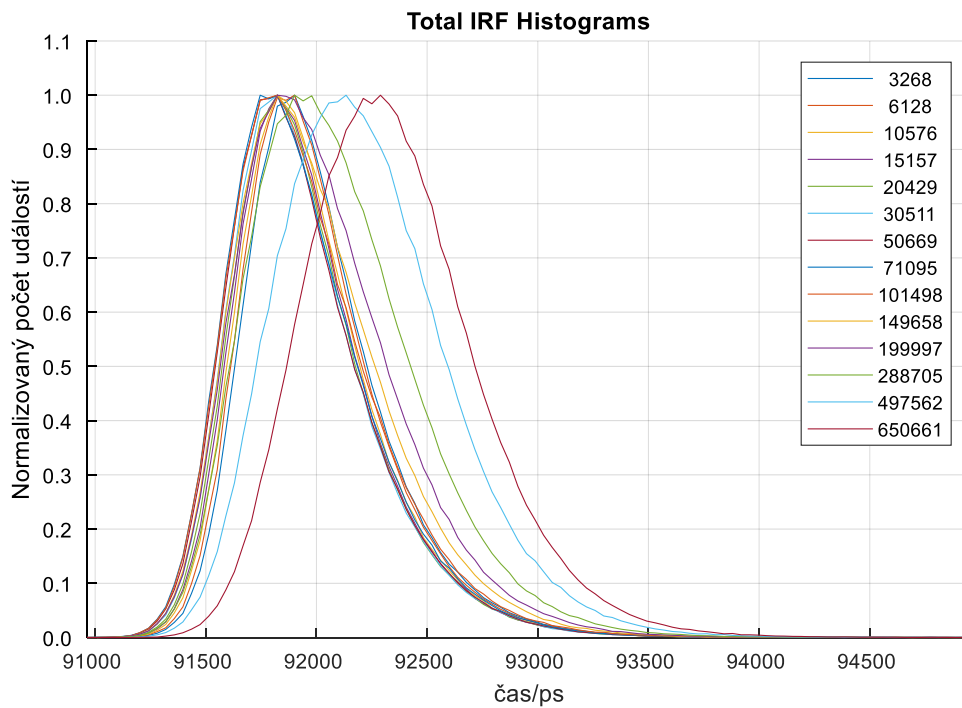


Obrázek B.20 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

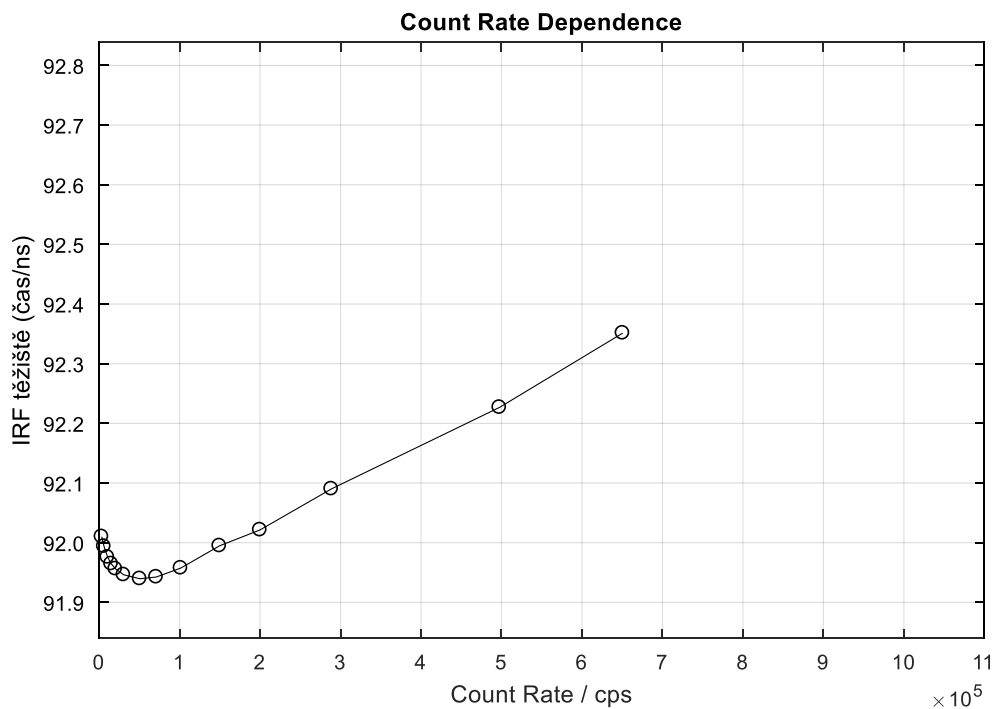
- Zelený laser:



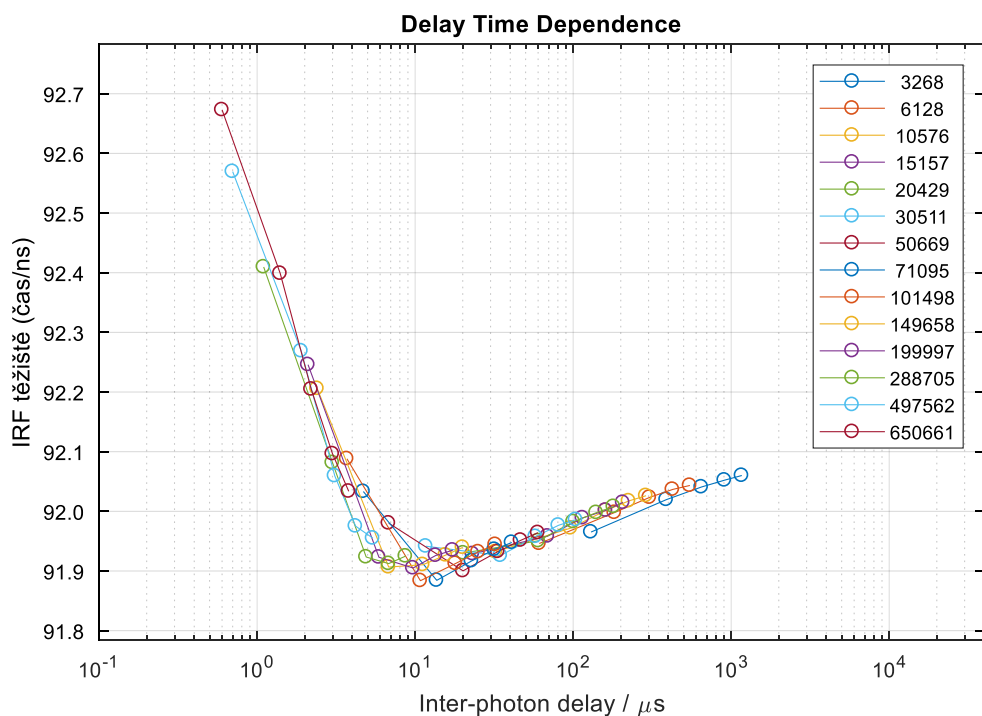
Obrázek B.21 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.22 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)



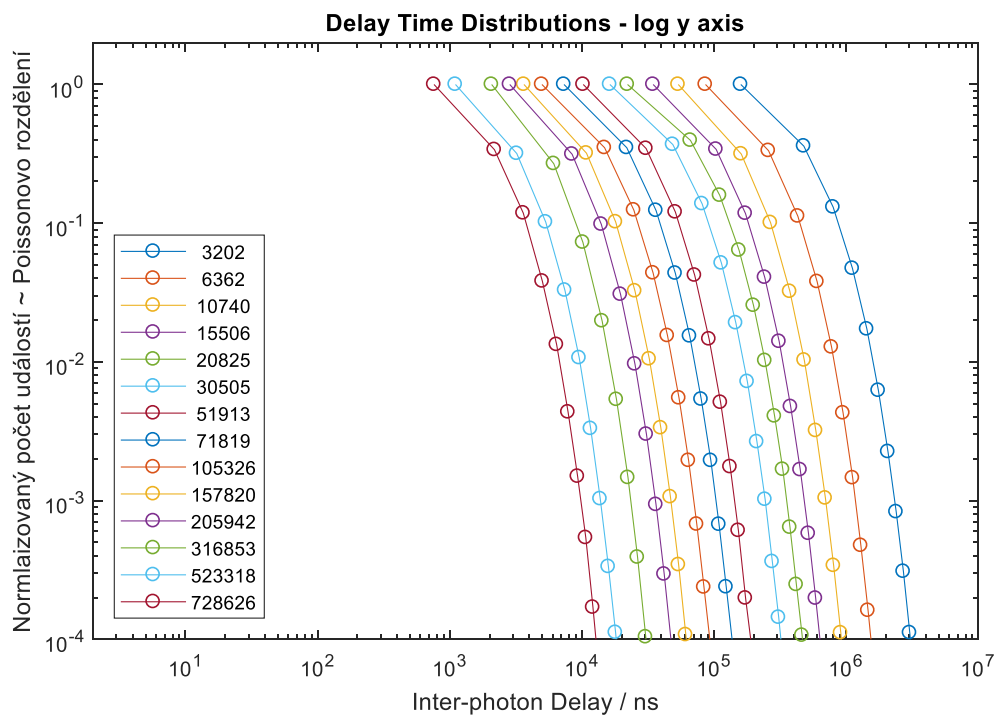
Obrázek B.23 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)



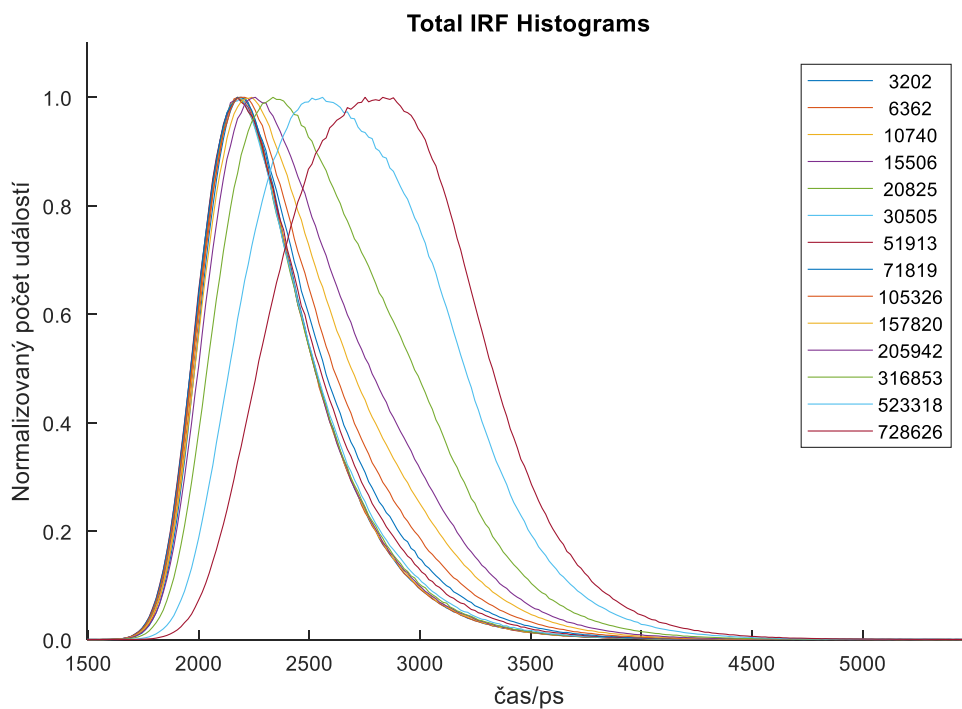
Obrázek B.24 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

Detektor 2 (Perkin Elmer) + HydraHarp 400

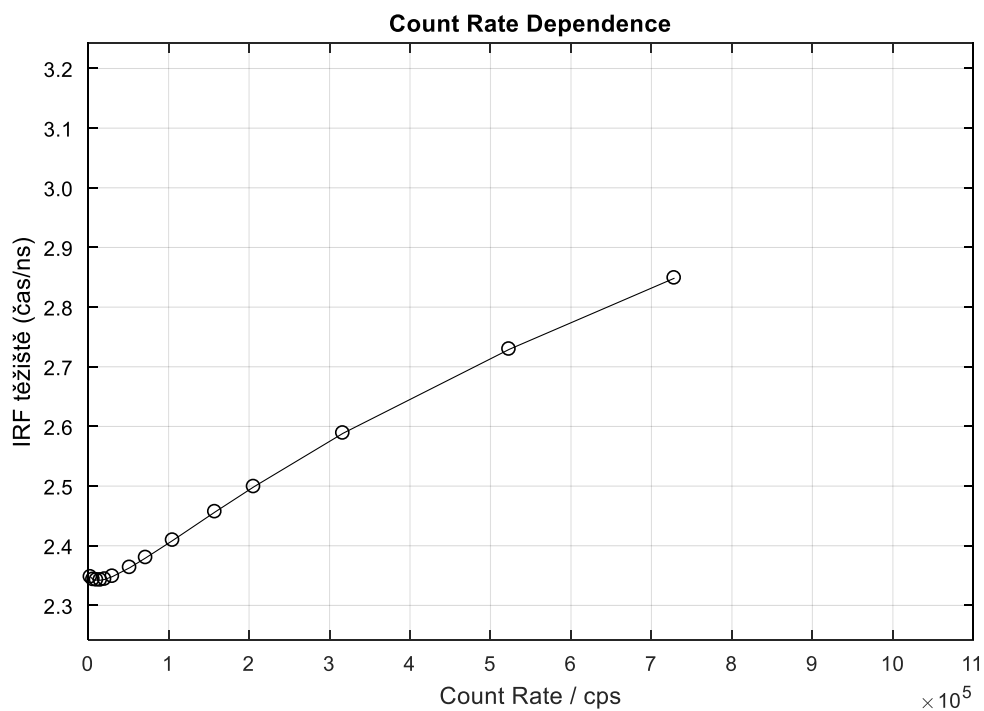
- Zelený laser



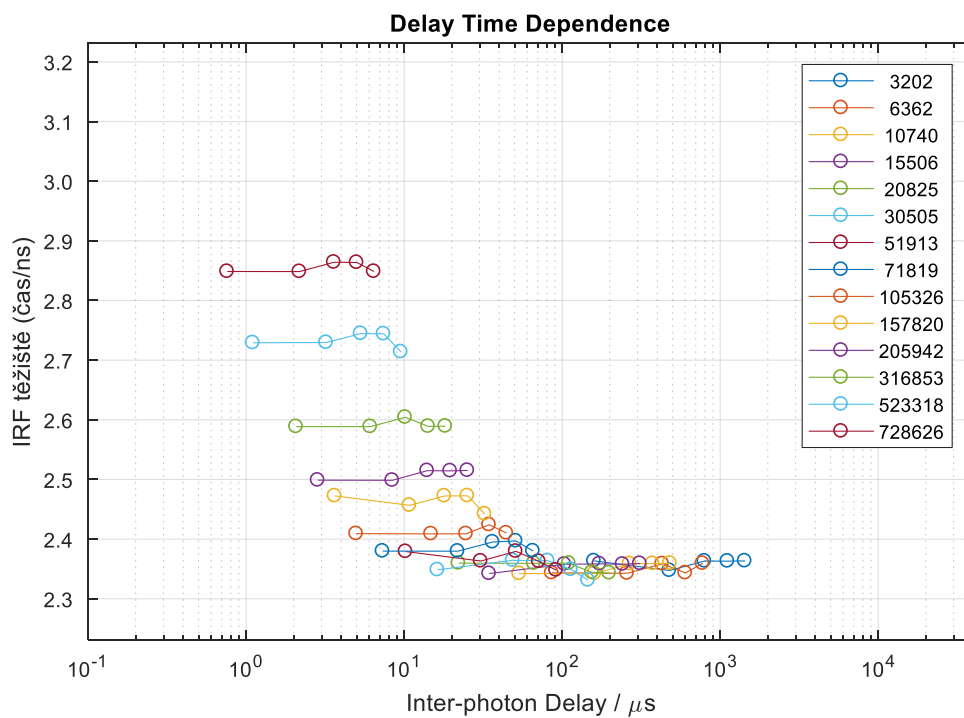
Obrázek B.25 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.26 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)



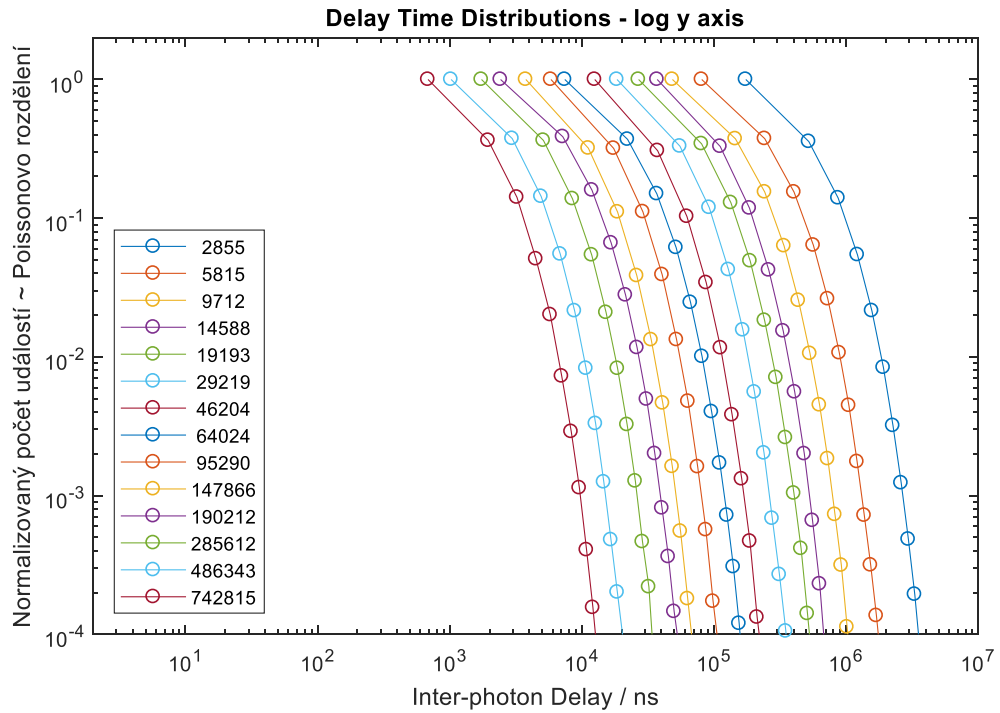
Obrázek B.27 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)



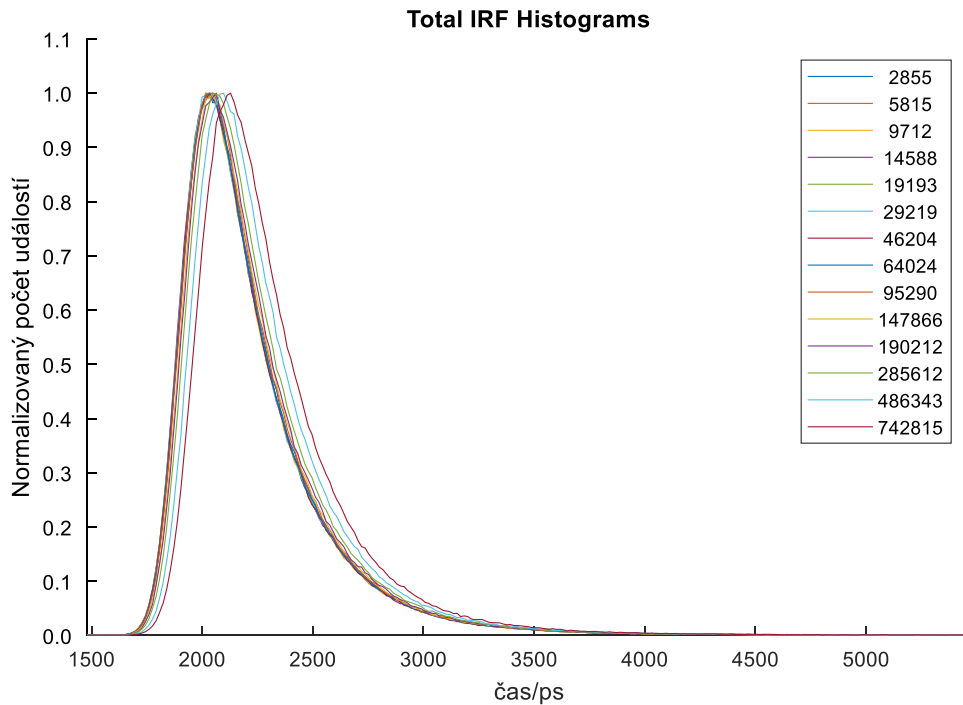
Obrázek B.28 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

Detektor 3 (PicoQuant) + HydraHarp 400

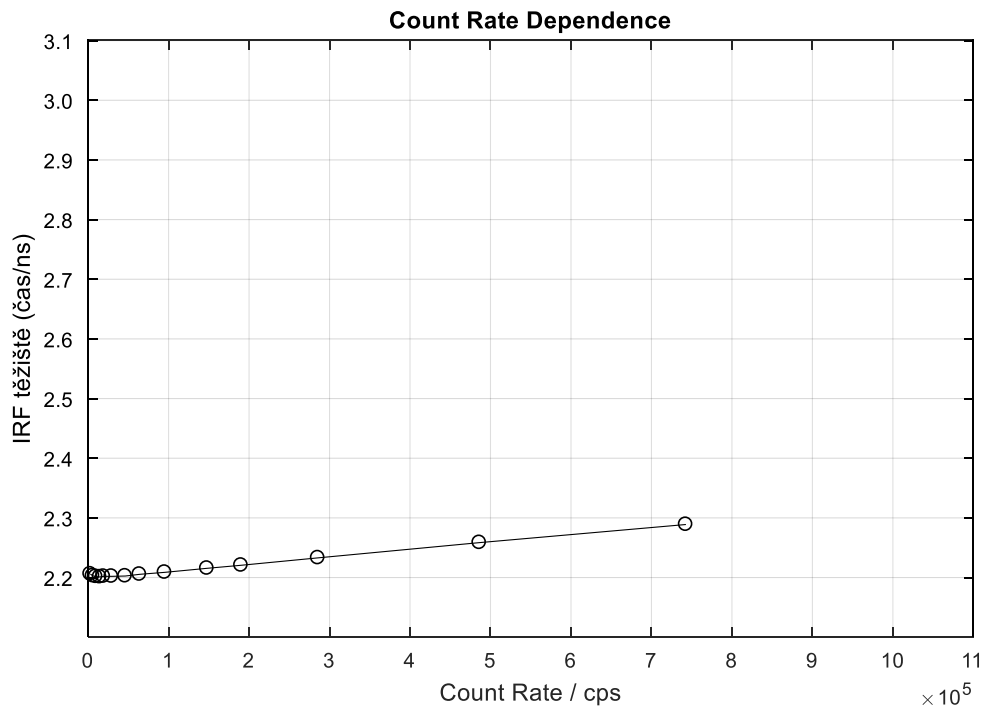
- Zelený laser



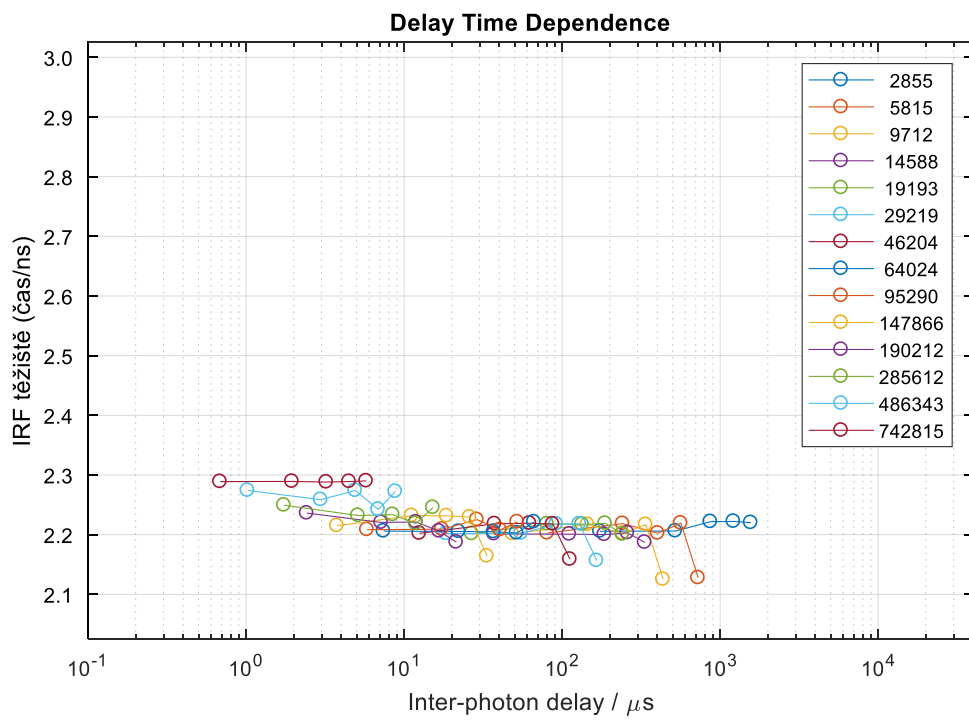
Obrázek B.29 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.30 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)



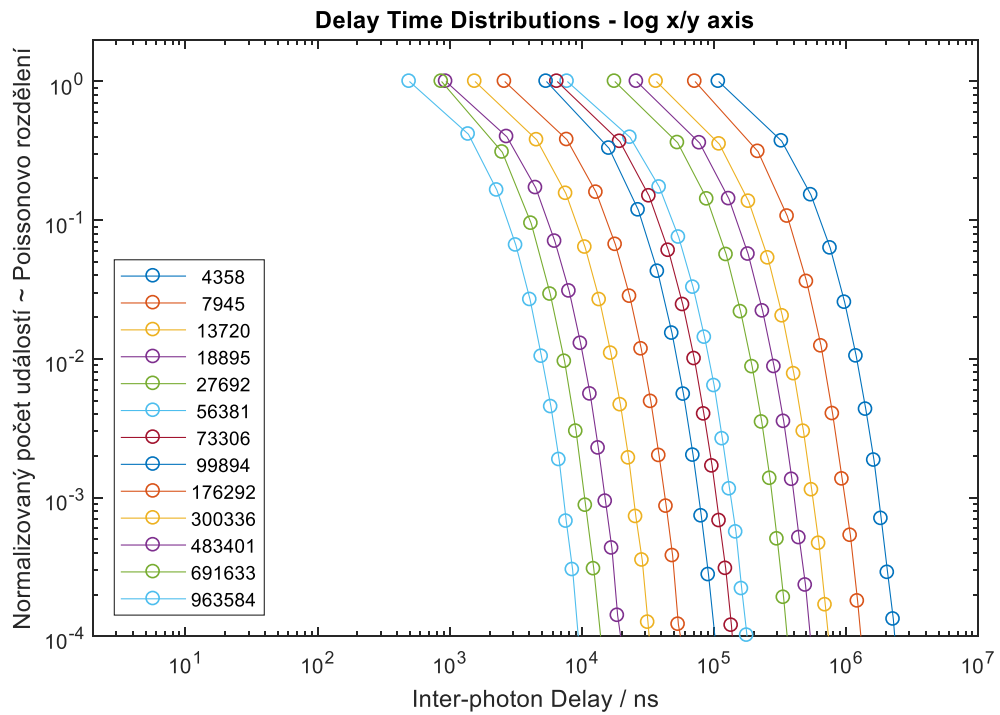
Obrázek B.31 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)



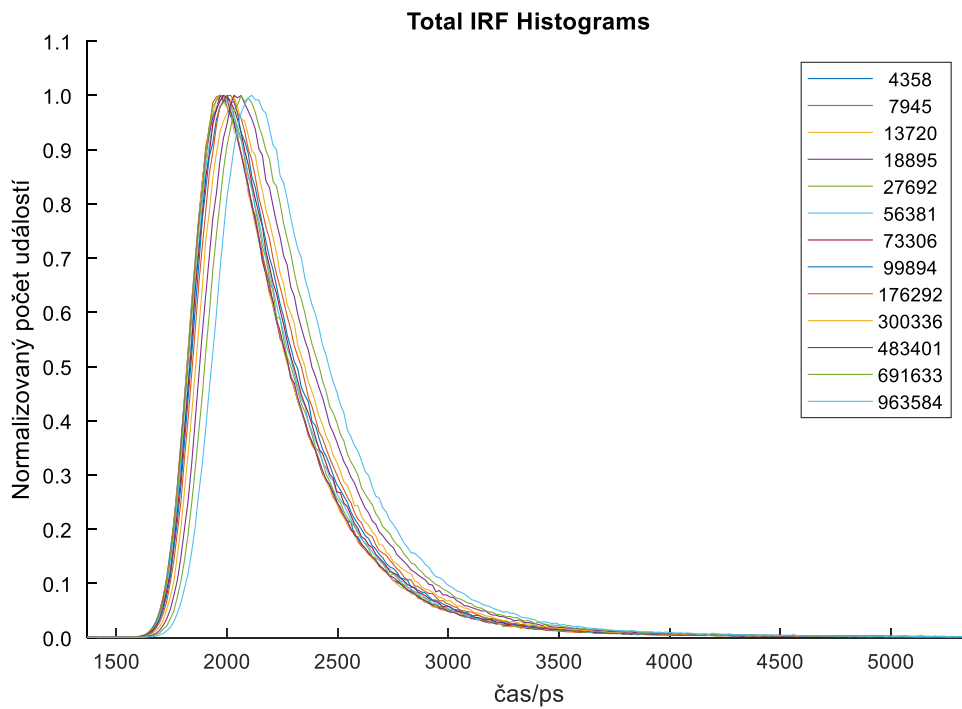
Obrázek B.32 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

Detektor 4 (PicoQuant) + HydraHarp 400

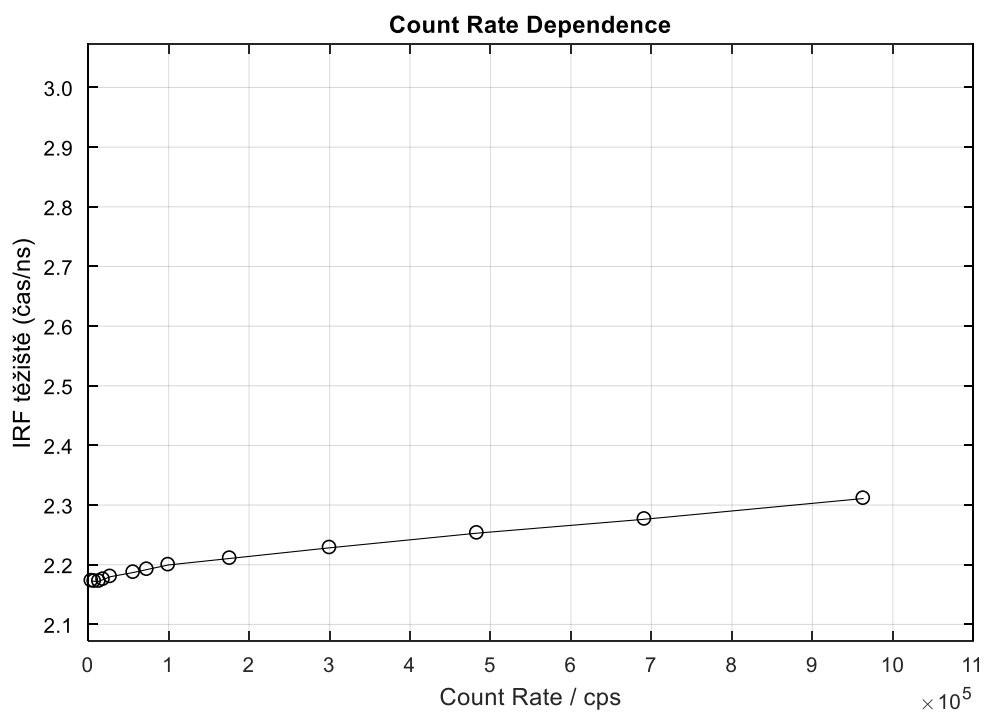
- Zelený laser



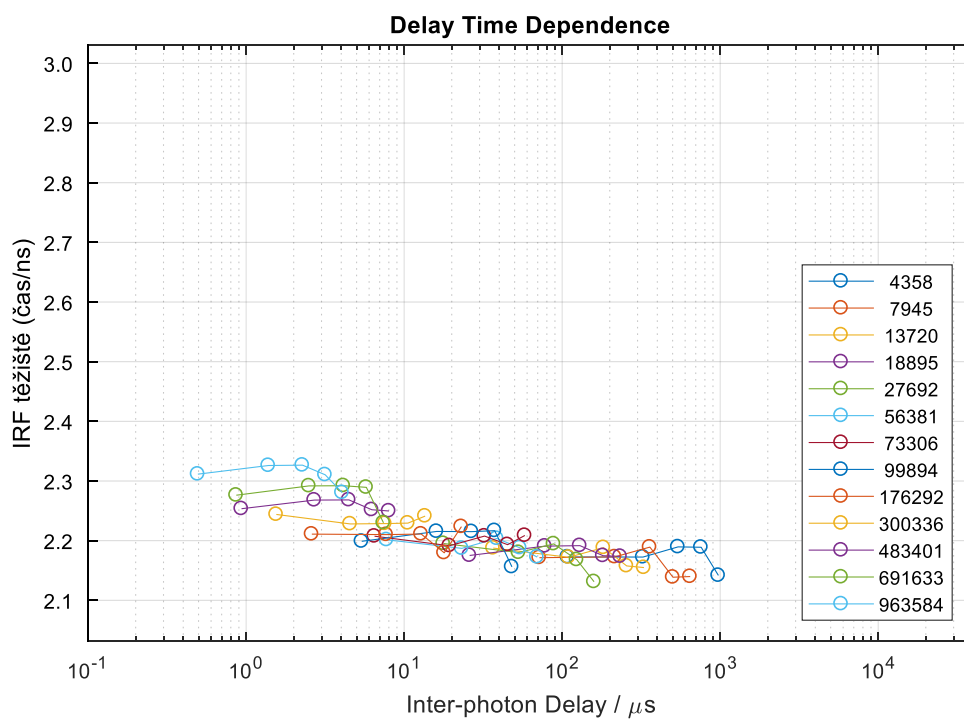
Obrázek B.33 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.34 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)



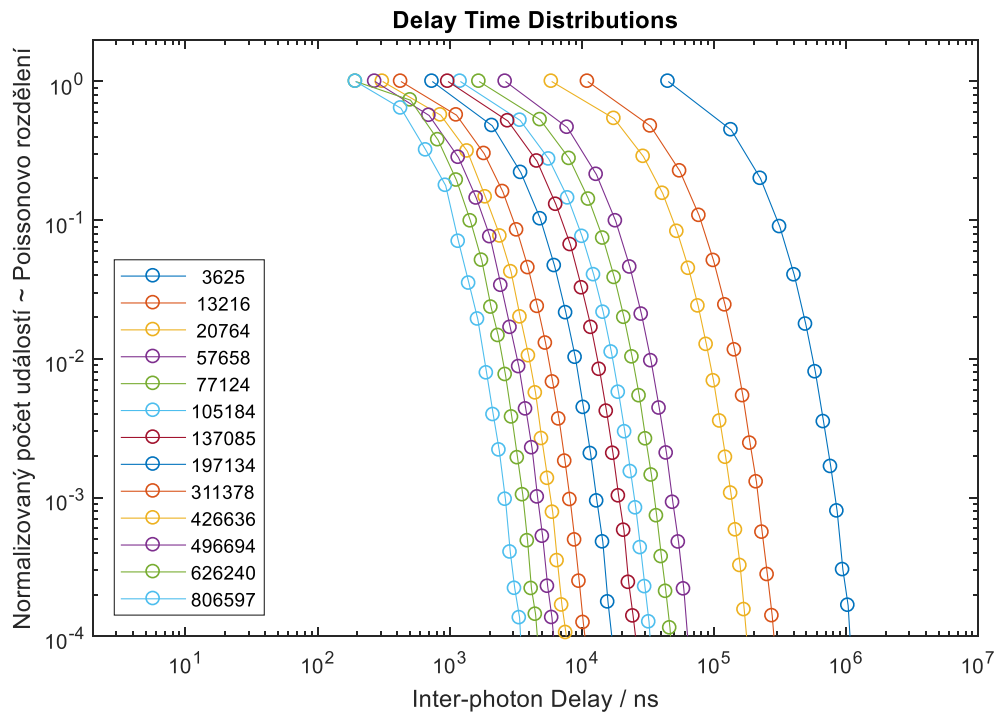
Obrázek B.35 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)



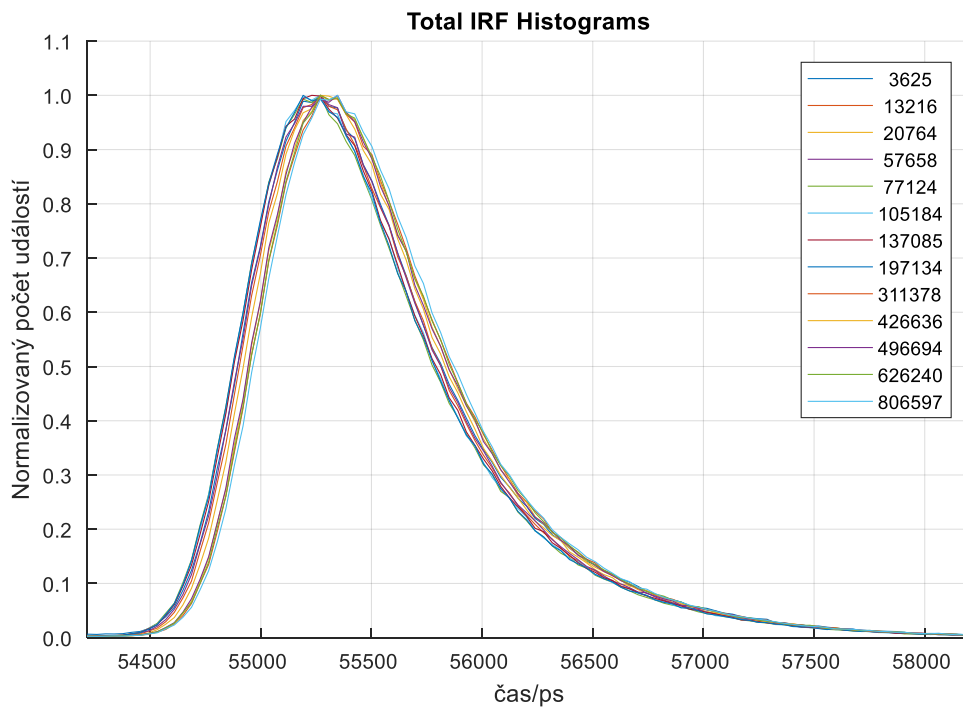
Obrázek B.36 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)

Detektor 5 (Excelitas) + TimeHarp 200

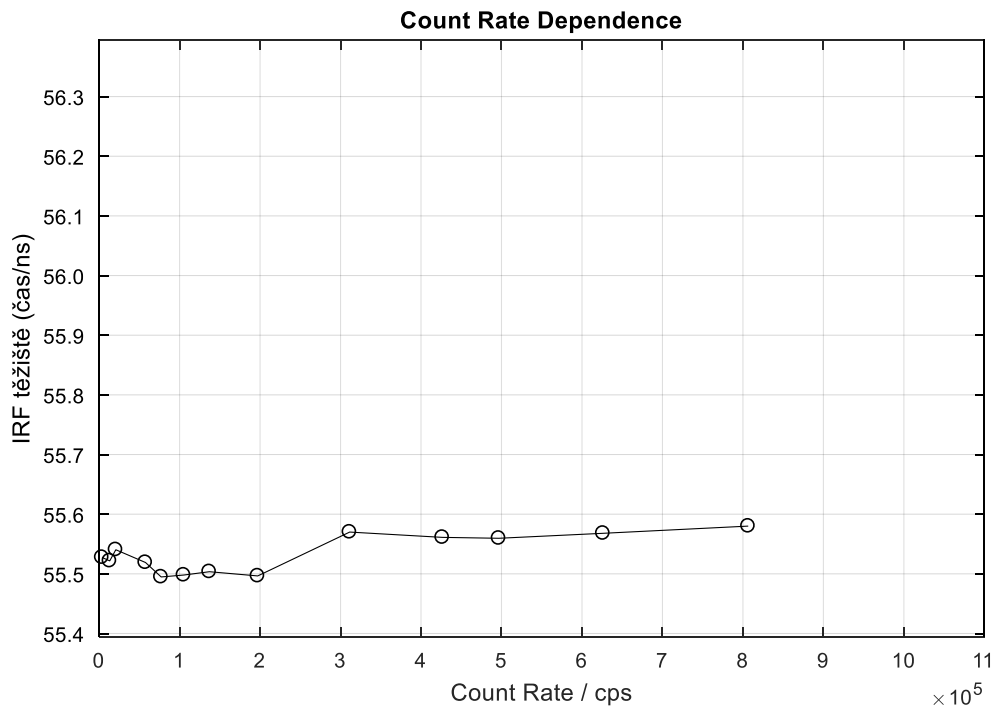
- Modrý laser



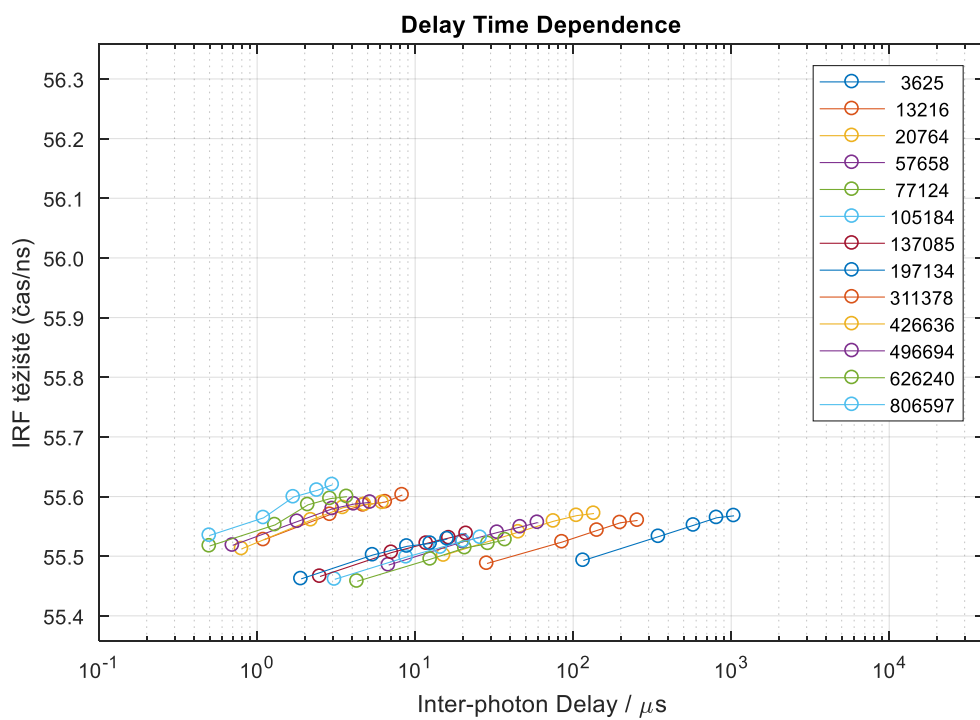
Obrázek B.37 Četnost výskytu jednotlivých zpoždění foton-foton pro různé AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.38 IRF grafy funkcí IRF pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.39 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na AVCR (v legendě v cps)



Obrázek B.40 Pozice (těžiště plochy) IRF v závislosti na zpoždění foton-foton (IPD) pro rozdílné AVCR (v legendě v cps)