

**Oponentský posudek na magisterskou práci Tomáše Essla:  
„Sestavení a zprovoznění aparatury pro měření Fluorescenčních spekter  
jednotlivých molekul“.**

Předložena magisterská práce Tomáše Essla je věnována mimořádně aktuálnímu a zajímavému tématu – experimentálnímu studiu jednotlivých molekul metodami emisní spektroskopie. Pozdívá se čtyř hlavních částí a závěru.

V poměrně rozsáhlém úvodu je popisována problematika spektroskopie jednotlivých molekul a to se zvláštním zřetelem na experimentální podmínky spektroskopických měření. Posledně jsou rozehrány obecné faktory, které limitují podobná měření, zejména šum a rušivý signál pozadí.

Značná pozornost je věnována nejrozšířeným technickým spektroskopickým měření na jednotlivých molekulách. Je vysvětlen princip činnosti laserových fotodiod, moderních dvojdimenzionálních hadkových CCD detektorů světla s kanálovými zesilovacími fotoelektrony, jakož i Křemíkových CCD kamer se zvláštním vyřezáním typu. Dále jsou postupně rozehrány různé mikroskopické techniky, jež byly v oblasti spektroskopie jednotlivých molekul již úspěšně použity. Jedná se především o skanovací metody využívající výhled konfokální mikroskopie včetně buzení fluorescence miniaturám optickým vláknem v režimu mikroskopie blízkého pole. Dalším experimentálním přístupem je mikroskopie širokého pole, jež pro zobrazování jednotlivých molekul využívá povrchové buzení evanescentní vlnou v epifluorescenční nebo techniky spektroskopie úplněho vnitřního odrazu (TIR).

Velmi podrobné informace o prostorové orientaci molekul lze získat pomocí měření polarizované luminescence. Buzení luminescence polarizovaným světlem v režimu spektroskopie úplného odrazu je vhodné ke studiu geometrie molekul. Neoprávně sledování změn ve spektrálním složení emise jednotlivých molekul poskytuje informaci o nejbližším okolí dané molekuly. Účinnou metodou pro stanovení konformačních změn molekulárních vzájemností donoru a akceptoru jakož i pro sledování konformačních změn v biomakromolekulách je Försterův fluorescenční resonanční přenos energie (FRET). Závěr této úvodní části je věnován výhledům dvoufotonového buzení luminescence a časové závislým dynamickým studiím, založeným na měření dob dolhastání fluorescence.

Celá tato úvodní část poskytuje řadu cenných informací o složitě moderní spektroskopické technice ke sledování jednotlivých molekul, a to včetně časového rozboru některých inherentních experimentálních obtíží. Ze zpracování je jasné patrné, že se diplomanti velmi dobře orientují do této experimentálně obtížné problematiky.

Experimentální část práce popisuje jednak použité materiály i měřicí techniky. Pro měření byla sestavena aparatura s He-Cd laserem, invertovaným optickým mikroskopem se zvláštním pro spektroskopii totálního vnitřního odrazu, zobrazovacím spektrografem a moderními detektory světla. Spektrograf byl nejprve kalibrován pomocí neonové a argonové kalibrační spektrální lampy.

Vlastní měření byla provázena na vzorcích di-methyl-oxa-karboxyliinu (DMOC), dále na chlorofylu *a* a rovněž na složitějším biologickém preparátu – komplexu fotosystému I z thylakoidní membrány izolované z *Prochlorococcus hollandica*.

Významným výsledkem této práce je skutečnost, že se na dané aparatuře podařilo zachytit velmi dobře rozlišena emisní spektra jednotlivých molekul DMOC, což je nezvyklé dokumentováno na obrázcích 16 – 23 na straně 38 – 40. Tato skutečnost svědčí o tom, že se diplomanti velmi dobře orientují v této problematice.

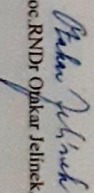
V případě chlorofylu *a* se bohužel zatím nepodařilo zachytit jednotlivé molekuly jako v komplexu fotosystému I, jak je ukázáno na obrázku 30 na str. 43.

K práci mám následující připomínky:

Dominován se, že tak mimořádně zajímavé tematické by mělo odpovídat i akcivně pečlivě zpracovávat. Formální stránce práce měla být dle mého soudu věnována větší pozornost. Také stylizace jsou místy dosti neohrabané. Za největší nedostatek považuji tu skutečnost, že v práci nejsou číselovány matematické vztahy a rovnice, to, že v textu často chybí popis používaných symbolů. Pokládám za zbytečné oddělovat pomělkou složeniny jako dvou-fotonový, dvou-blaďový a pod., jak se to vyskytuje v celé práci. I když se to v odborné literatuře často vyskytuje, není správný tvar detektorů ale detegovat, jak jsem sám před časem ověřil dotazem v Ústavu pro jazyk český. Na str. 8 je bar město správného hv. V práci je též dle mého soudu zbytečně množstvi anglickými jako na str. 5 „a/nebo“, str. 16 „designovaného“. Na str. 9 chybí pageinace a na str. 10 by mělo být fosforescenční stimulo město fosforové. Dominován se, že v přejatých slovech by se mělo přibližet spíše k jejich původnímu pravopisu – tedy skanovat město skenovat. Také úvodní seznam použitých zkratk obsahuje řadu nepřesností: CCD je nábojově vázaný převk, FWHM je plná šířka v polovině maxima – proč genitiv?, OD není neutralita (sedý) filtr, ale jeho charakteristika optická hustota, PMT je dle mé zkušenosti zkratka pro běžný fotonasobit, pro mikrokanálový fotonasobit bych volil MCPMT. TIR je zkratka pro totální vnitřní odraz.

Přes uvedené nedostatky se domnívám, že tato práce plně dokumentuje, že Tomáš Fessl zvládl obtížnou experimentální techniku v jedné z nejnáročnějších oblastí optické spektroskopie. Aktivně se podílel na konstrukci unikátní aparatury a také se mu podařilo získat dobře rozlišitelné optické signály od jednotlivých molekul. Proto doporučuji tuto práci přijmout k obhajobě. Nedominován se však, že by mohla být vzhledem k řadě uvedených formálních nedostatků klasifikována nejvyšším stupněm.

V Praze dne 10. května 2006

  
Doc. RNDP. Opařka Jelinek, CSc.