



سی و یکمین
کنفرانس اپتیک و فوتونیک
و شانزدهمین کنفرانس مهندسی و
فناوری فوتونیک ایران
دانشگاه علم و صنعت ایران
۱۷ و ۱۸ بهمن ۱۴۰۳



طراحی ترکیبی از ریزبین میدان روشن با ریزبین فلورسانس بازتاب داخلی کلی

بی‌تا مهرجویی^۱، بتول سجادی^۱، شراره تودد^۲

۱. گروه فیزیک اتمی مولکولی، دانشکده فیزیک، دانشگاه الزهرا

۲. دانشکده فیزیک، دانشگاه ادینبرو، انگلستان

چکیده- ریزبین بازتاب داخلی کلی در سال‌های اخیر توسط گروه‌های پژوهشی در سرتاسر جهان جهت بررسی سلول‌های زیستی به کار گرفته شده است. مهم‌ترین ویژگی روشن‌سازی نمونه از طریق بازتاب داخلی کلی این است که موج ناپایا تنها فاصله محدودی را در نمونه روشن می‌کند که تابش از مولکول‌های فام‌ساز لایه‌های بالاتر از عمق نفوذ را بشدت کاهش می‌دهد و از بین می‌برد. بنابراین نرخ نوفه‌ی ناشی از نور پیش زمینه نیز به شدت کاهش می‌یابد. در این روش ریزبینی، در عین حال که نمونه با میدان ناپایا روشن می‌شود، برای مشاهده‌ی کامل نمونه، به صورت هم‌زمان به موج‌های پیش‌رونده نیز نیاز است. ترکیب این دو ایده نیاز به طراحی دارد و برای این کار، باید یک ریزبین میدان روشن با ریزبین بازتاب داخلی کلی ترکیب شود. در این پژوهش، آرایه مورد نیاز برای ترکیب این دو، طراحی و سپس چیدمان آن در آزمایشگاه برپا شد. به این ترتیب امکان تصویربرداری هم‌زمان میدان روشن و فلورسانس بازتاب داخلی کلی هم‌زمان فراهم شد.

کلید واژه- ریزبین میدان روشن، ریزبین بازتاب داخلی کلی، امواج ناپایا، امواج پیش‌رونده.

Designing a compatible prism-based total-internal-reflection fluorescence microscope with a bright field microscope

Bitā Mehrjouei¹, Batool Sajad¹, and Sharareh Tavaddod²

1. *Department of Atomic and Molecular Physics, Faculty of Physics, Alzahra University, Tehran, Iran.*

2. *School of Physics and Astronomy, University of Edinburgh, UK.*

Abstract- In recent years, the total internal reflection microscope has been used by research groups around the world to study biological cells. The most important feature of illuminating the sample through total internal reflection is that the evanescent wave illuminates only a limited distance within specimen, which greatly reduces the radiation from the fluorescence molecules of the layers above the penetration depth and eliminates it. Therefore, the noise rate caused by the background light is also greatly reduced. In this microscopy method, while the specimen is illuminated with an evanescent field, progressive waves are also needed to observe the specimen fully. Combining these two ideas requires design, for this, a bright field microscope needs to be combined with a total internal reflection microscope. In this research, the array needed to combine these was designed and then arranged in the laboratory. In this way, the possibility of simultaneous imaging of a bright field and a total internal reflection fluorescence was provided.

Keywords: bright field microscope, total internal reflection microscope, evanescent waves, progressive waves

مقدمه

بیشتر ریزبین‌هایی که تاکنون ابداع شده، ریزبین‌های نوری هستند که برای بررسی یک جسم، از پرتوهای نور استفاده می‌کنند. ریزبین‌های میدانِ روشن، بازتاب داخلی کلی و همچنین ریزبین‌های فام‌ساز، از جمله انواع مختلف ریزبین‌های نوری هستند. در یک ریزبین میدانِ روشن استاندارد، نور از منبع روشنایی از طریق چگالگر به نمونه و سپس از طریق عدسی‌ها به چشم کاربر می‌رسد و در پس زمینه‌ای روشن ظاهر می‌شود. در واقع در ریزبین میدانِ روشن، نمونه در نور منعکس شده دیده می‌شود و میدان دید وقتی که زاویه تابش از حد بحرانی، بیشتر شود به صورت یکنواخت روشن دیده می‌شود و قسمت‌های در تماس با سطح، بصورت تیره‌تر با پس زمینه روشن بنظر می‌رسند. این نوع ریزبین‌ها اغلب برای مطالعه بافت‌ها و نیز برای نمونه‌های رنگ آمیزی شده یا رنگ دانه‌های طبیعی مانند موجودات زنده‌ی فتوسنتزی مناسب است. یکی از محدودیت‌های این روش تباین کم برای نمونه‌هایی با جذب ضعیف است.

در ریزبینی بازتاب داخلی کلی که در دهه ۱۹۸۰ میلادی توسط دنیل آکسلرود مطرح شد [۱]، روشن سازی بر مبنای پدیده‌ی فیزیکی بازتاب داخلی کلی است. درواقع، هنگامی که بازتابش داخلی کلی رخ می‌دهد، بخشی از موج الکترومغناطیسی تابشی، که امواج ناپایا یا محوشونده نام دارد، به صورت جزئی در محیط رقیق‌تر انتشار می‌یابد این موج ناپایا که توسط بازتاب داخلی کلی ایجاد می‌شود مزایای منحصر بفردی برای روشن سازی تک مولکول‌ها دارد چرا که عمق نفوذ میدان محوشونده در محدوده ۷۰ تا ۲۰۰ نانومتر است و این امکان را در ریزبین بازتاب داخلی کلی بوجود می‌آورد که مولکول‌های فام‌ساز نمونه در فاصله بیش از این عمق برانگیخته نشوند و فقط مولکول‌های فام‌ساز نمونه که در تماس با سطح زیرلایه قرار دارد، برانگیخته شود

و فام‌ساز گسیلی از این دسته از مولکول‌ها جمع آوری شود. بنابراین این محدودیت عمق برانگیختگی نه تنها نقص روشن سازی به شمار نمی‌آید بلکه مزیت مهم روش ریزبین بازتاب داخلی کلی به شمار می‌آید. که مشاهده سطح ناحیه‌هایی مثل غشای سلولی در سلول‌های زنده را ممکن می‌سازد و همچنین تصویرهای ثبت شده از نمونه در این روش تصویرهایی با بالاترین نسبت داده به نوفه و با قدرت تفکیک محوری بالا هستند [۲].

برای ایجاد تصاویر بهتر می‌توان ریزبین میدانِ روشن و بازتاب داخلی کلی را با هم ترکیب کرد. ریزبین بازتاب داخلی کلی از قسمت‌های نزدیک به سطح، با دقت بالا تصویر برداری می‌کند و ریزبین میدانِ روشن می‌تواند از قسمت‌هایی که دورتر از سطح هستند نیز تصویربرداری کند.

در پژوهش‌های پیشین این گروه، ریزبین بازتاب داخلی کلی (بر پایه موجبر و منشور) طراحی و ساخته شده است [۳،۴]. ضعف تصاویر بدست آمده از این ریزبین‌ها، عدم تمایز کافی بین نمونه و پس زمینه بوده است. در مقاله حاضر، طراحی ترکیبی از ریزبین میدانِ روشن با ریزبین بازتاب داخلی کلی انجام شده است. سپس تصاویر حاصل از آن بررسی شده است. هدف نهایی از نتایج بدست آمده در این پژوهش این است که ریزبین میدانِ روشن هم‌زمان با ریزبین بازتاب داخلی کلی تصاویر با تباین بالا از نمونه‌های زیستی ثبت کند تا میزان اختلاف میان روشن‌ترین و تیره‌ترین بخش یک تصویر به طور واضح دیده شود [۵].

چیدمان تجربی

چیدمان آزمایشگاهی از یک منبع نوری، چگالگر، صفحه ریزبینی به همراه خط‌کش مدرج، عدسی، دوربین سیموس، استوانه مدرج، آینه و لیزر تشکیل یافته است. نخست طرحی از ریزبین مستقیم با کمک نرم افزار کورل دراو رسم شده است (شکل ۱). برای آماده سازی بخش‌های مختلف

لیزر، رایج ترین منبع نوری مورد استفاده برای ایجاد بازتاب داخلی کلی است که با توجه به مواد فام ساز موجود در نمونه انتخاب می شود، در این چیدمان، نمونه از ترکیب دو ماده آگارز و نقطه کوانتومی کربن در حالت مایع تشکیل شده و همچنین هارمونیک دوم لیزر نئودیم یاگ پیوسته در طول موج ۵۳۲ نانومتر استفاده شده است.



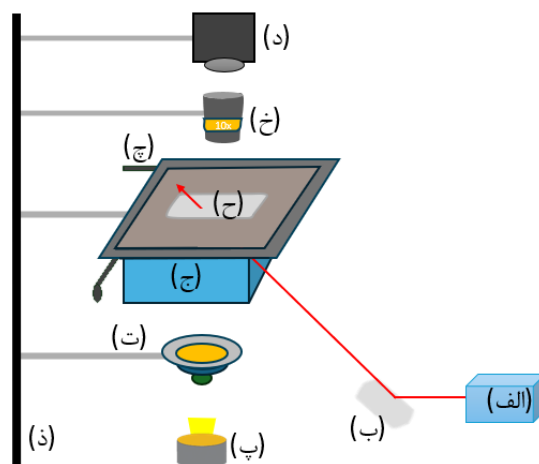
شکل ۲: صفحه ریزبین ساخته شده.



شکل ۳: قطعه های باز شده خط کش متحرک.

پرتو نور توسط آینه و با کمک استوانه مدرج تحت زاویه ای مناسب، به سمت قطعه شیشه ای تعبیه شده در صفحه ریزبینی هدایت می شود. این زاویه باید بزرگتر از زاویه حد باشد تا بازتاب داخلی کلی رخ دهد، نمایی از چیدمان نهایی برپا شده در آزمایشگاه در شکل ۴ نشان داده شده است.

چیدمان از قطعه و ابزارهای موجود استفاده شده است. به این منظور، از بخش های نوری یک ریزبین قدیمی برای بهینه سازی، ابزارهای اپتیکی و مکانیکی آن مطابق شکل ۲ و ۳ استفاده شد. یک لامپ ال ای دی کوچک سفید رنگ تهیه و در داخل محفظه مناسب ریزبینی قرار داده شد.



شکل ۱: تصویر طرح مورد نظر آرایه ریزبین ترکیبی: (الف) لیزر، (ب) آینه، (پ) منبع روشنایی، (ت) چگالگر، (ج) منشور، (چ) صفحه ی خط کش دار، (ح) نمونه، (خ) عدسی، (د) دوربین، (ذ) پایه.

سپس یک چگالگر آبه شامل مجموعه عدسی میدان و روزنه تهیه شده است و از یک قاب نگهدارنده مخصوص چگالگر طی انجام تغییرهایی، استفاده شد. در این چیدمان چگالگر با ارتفاع ۷/۵ سانتی متر بالاتر از لامپ در راستای قائم قرار داده شده است. در مرحله بعد هم محوری لامپ و چگالگر با عدسی انجام شد. در این پژوهش عدسی یک ۱۰X به یک میکرومتر دقیق یک بعدی وصل شده است تا به صورت میکرومتری در جهت قائم حرکت کند و به طور دقیق بتواند در کانون عدسی قرار گیرد.

برای ساخت صفحه ریزبین یک قطعه فلزی و یک خط کش مدرج باز شده و یک گیره کمانی شکل روی هم سوار شد و با کمک تراشکار حفره مناسب برای قرارگیری تیغه شیشه ای نازک نمونه ایجاد شد. صفحه نمونه آماده شده در ارتفاع ۲۸ سانتی متری از میز نوری قرار گرفت.



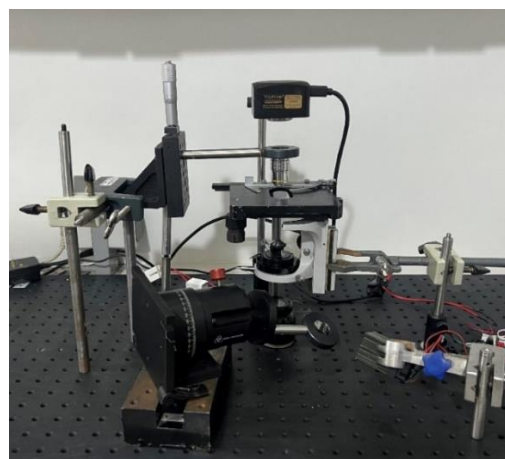
شکل ۶: تصویر نمونه با ریزبین (الف) بازتاب داخلی کلی، (ب) میدان روشن

نتیجه گیری

در این پژوهش، با هدف طراحی یک ریزبین ترکیبی، الگوها و چیدمان‌های ریزبین‌های نوری به ویژه، بخش چگالگرهای نوری به طور جامع بررسی شده است. بر این اساس، طراحی یک ریزبین مستقیم ارائه شده است که به طور هم‌زمان هم میدان روشن و هم بازتاب داخلی کلی را شامل می‌شود. سپس قطعه‌های لازم تهیه، نصب و بهینه‌سازی شده است. تصویربرداری از نمونه‌ها که با موفقیت انجام شده، دست‌یابی به هدف ریزبین ساخته شده را تایید کرده است.

مرجع‌ها

- [1] D. Axelrod, Cell-substrate contacts illuminated by TIRF, *The Journal of cell biology*, 1981. 89(1).
- [2] Y. Fang, Total internal reflection fluorescence quantification of receptor pharmacology, *Biosensors*, 2015. 5(2).
- [3] E. Sheykhi, et al, Quantifying F-actin patches in single melanoma cells using TIR fluorescence microscopy, *Scientific Reports* 12 (1), 2022.
- [4] N. Roostaie, et al., A thin layer imaging with the total internal reflection fluorescence microscopy, *Journal of Optoelectronic Nanostructures* 2 (3), 2017.
- [5] G.S. Kino, T.R. Corle, *Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems*, Academic Press 1996.



شکل ۴: چیدمان ترکیبی ریزبین میدان روشن با بازتاب داخلی کلی.

نتایج و بحث

در تصویر سلولی گرفته شده با چیدمان ریزبین بازتاب داخلی کلی پژوهش پیشین (شکل ۵)، تمایز کافی بین نمونه و پس زمینه مشاهده نمی‌شود. در چیدمان مربوط به پژوهش حاضر، سعی به ایجاد تمایز کافی بین نمونه و پس زمینه با کمک چگالگر و نور لامپ بود که منجر به ثبت تصاویر با وضوح بالا توسط ترکیب ریزبین میدان روشن و ریزبین فلورسانس بازتاب داخلی کلی شد.



شکل ۵: تصاویر حاصل از پژوهش پیشین دانشگاه الزهراء (الف) چیدمان ریزبین فلورسانس بازتاب داخلی کلی بر پایه منشور، (ب) تصویر سلولی حاصل از چیدمان

با چیده شدن تمام مولفه‌های اپتیکی و انتخاب لیزر مناسب، تصویربرداری از نمونه با دوربین سی‌موس با تفکیک‌پذیری ۱۰ مگاپیکسل با موفقیت انجام شده است. (شکل ۶).