



بیست و ششمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و دوازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه خوارزمی،
تهران، ایران.
۱۶-۱۵ بهمن ۱۳۹۸



ارتقاء توان تفکیک میکروسکوپی فلورسانسی لایه نوری با استفاده از میکروکره

حسین کافیان^۱، وحید عباسیان^{۱،۲}، شیوا اکبری بیرگانی^۳، علی رضا مرادی^{۱،۳} و داریوش عبدالله پور^{۱*}

^۱دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان

^۲مدرسه علوم نانو، پژوهشگاه دانشهای بنیادی، تهران

^۳دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان

*email: dabdollahpour@iasbs.ac.ir

چکیده - میکروسکوپ فلورسانسی لایه نوری روشی کارآمد برای تصویربرداری سه‌بعدی از نمونه‌های زیستی، با کمترین آسیب‌نوری به نمونه و سرعت تصویربرداری بالاست. با این وجود، دستیابی به توان تفکیک عرضی بالا در مطالعات تک سلولی به کمک این شیوه موضوعی چالش برانگیز است. در این مقاله، نشان داده می‌شود که با بکارگیری یک میکروکره شفاف با قطر $250\ \mu\text{m}$ در مسیر آشکارساز، ضریب بزرگ‌نمایی به میزان $3/2$ برابر زیاد شده و توان تفکیک عرضی بهبود می‌یابد. کارایی این چیدمان با تصویربرداری از سلول‌های سرطان پستان (MCF7) نشان داده شده و تصاویر با حالت بدون میکروکره مقایسه شده‌اند. رهیافت ارائه شده روش جایگزینی کم هزینه و ساده به جای استفاده از شیئی‌های با گشودگی عددی بالا در میکروسکوپی فلورسانسی لایه نوری است.

کلید واژه- ابر تفکیک، سه‌بعدی، میکروسکوپ لایه نوری فلورسانسی، میکروسکوپی تقویت شده با میکرو کره

Resolution enhancement of light-sheet fluorescence microscopy using a microsphere

Hosein Kafian¹, Vahid Abbasian^{1,2}, Shiva Akbari Birgani³, Ali-Reza Moradi^{1,2}, and Daryoush Abdollahpour^{1,*}

¹Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan

²School of Nano Science, Institute for Research in Fundamental Sciences (IPM), Tehran

³Department of Biology, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan

*Email: dabdollahpour@iasbs.ac.ir

Abstract- Light-sheet fluorescence microscopy (LSFM) is a powerful method 3D imaging of biological samples with the minimal photodamage, and high imaging speeds. However, achieving high lateral resolution for single cell imaging applications is a challenging issue for the method. Here, we demonstrate that using a transparent microsphere (250 μm diameter) in the imaging system, leads to 3.2x increase of the magnification, and an enhanced resolution. The capability of the approach is verified single-cell imaging of breast cancer cell line MCF7, and the results are compared with conventional LSFM images without the microsphere. Our proposed arrangement can be considered as an inexpensive and simple alternative for using high-NA objectives in LSFM.

Keywords: 3D, Light-Sheet Fluorescence Microscopy, microsphere-assisted microscopy, Super-Resolution

مقدمه

تصویربرداری سه بعدی از نمونه های زیستی درشت-مقیاس با توان تفکیک بالا همواره از دغدغه های اصلی زیست پژوهان است. شیوه های رایج و نوین به منظور تصویربرداری سه بعدی شامل میکروسکوپ هم کانون و میکروسکوپی فلورسانسی چند فوتونی است. با این وجود این شیوه ها، به دلیل سرعت تصویربرداری کم (رویش نقطه به نقطه نمونه) و نوردهی اضافی نمونه که موجب آسیب نوری و یا سفیدشدگی خواهد شد، امکان تصویربرداری در لحظه یا طولانی مدت از نمونه را ندارند. از سوی دیگر، میکروسکوپ های لایه ی نوری توانایی منحصر به فردی در تصویربرداری سه بعدی غیرمخرب و طولانی مدت از نمونه های درشت مقیاس دارند. در این شیوه تنها لایه ایی مشخص از نمونه نوردهی و به وسیله بازوی آشکارساز که عمود بر مسیر نوردهی است، تصویربرداری می شود [۱]. علاوه بر این، مجزا بودن سیستم های نوردهی و تصویربرداری در این روش، امکان تصویربرداری نمونه های درشت را نیز فراهم می کند. تصاویر سه بعدی از جابه جا کردن نمونه در راستای آشکارساز و کنار هم قرار دادن تصاویر لایه های ثبت شده در هر مرحله از رویش نمونه حاصل می شود.

با این حال، تصویربرداری تک سلولی از نمونه های زیستی مستلزم استفاده از شیئی هایی با گشودگی عددی بالا است که کار با آنها دشوار بوده و نوعاً چیدمان را پیچیده تر می کند. برای بهبود توان تفکیک میکروسکوپ لایه نوری فلورسانسی روش هایی نیز ارائه شده اند که از این جمله می توان به ترکیب این شیوه با سایر روش های ابرتفکیک هم چون تخلیه تابشی القایی و نوردهی ساختار یافته اشاره کرد [۲ و ۳]. این روش ها علاوه بر بکارگیری شیئی های با گشودگی عددی بالا چیدمانی پیچیده داشته و پرهزینه هستند. از سوی دیگر در چند سال اخیر استفاده از میکروکره شفاف به منظور تصویربرداری ابرتفکیک به دلیل سهولت روش و

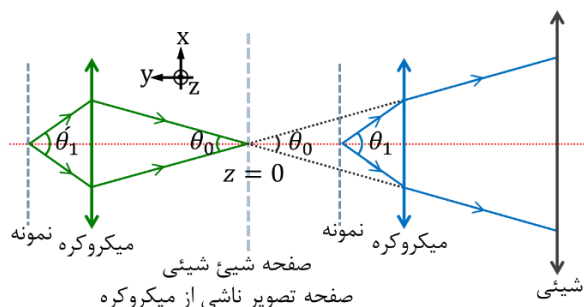
ارتقاء توان تفکیک سیستم های میکروسکوپی نوری، بسیار مورد توجه است. در این روش، با قرار دادن میکروکره در فاصله کاری یک شیئی میکروسکوپ، گشودگی عددی موثر سیستم (حتی در شیئی های با گشودگی عددی پایین) افزایش یافته و به تصویرگیری ابرتفکیک می انجامد [۴]. در سال های اخیر نتایجی رضایت بخش از استفاده از این روش برای افزایش توان تفکیک در سیستم های میکروسکوپ نوری گزارش شده است که از این جمله می توان به ترکیب این ایده با میکروسکوپ های نوری هم کانون، میدان تاریک، تمام نگاری دیجیتالی، و طیفسنجی رامان اشاره کرد.

در این مقاله نشان می دهیم که استفاده از میکروکره روشی کم هزینه و ساده برای افزایش توان تفکیک چیدمان میکروسکوپ صفحه نوری فلورسانسی است.

چیدمان آزمایشگاهی

شکل ۱ چیدمان آزمایش را نمایش می دهد. در این چیدمان از باریکه ایری برای نوردهی استفاده می شود. جزئیات چیدمان در مرجع [۵] گزارش شده است. باریکه لیزر با طول موج ۴۷۳ نانومتر پس از عبور القاگر فضایی نوری از سیستم ۴f متشکل از عدسی های با فاصله کانونی ۳۰ و ۱۵ سانتی متر بر روی آینه رویش هدایت و صفحه نوری با نوسانات آینه تشکیل می شود. لکه لیزر بر روی آینه رویش به وسیله سیستم ۴f متشکل از عدسی های با فاصله کانونی ۱۰ و ۳۰

مجازی و حقیقی در محل صفحه شیئی تشکیل می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲ نمایش داده شده است، در حضور میکروکره، زاویه مخروط نوری به θ_1 افزایش می‌یابد [۴].



شکل ۲: نمایش هندسی تشکیل تصویر در اثر میکروکره برای دو حالت مجازی (پرتو آبی رنگ) و حقیقی (پرتو سبز رنگ) با میکروکره.

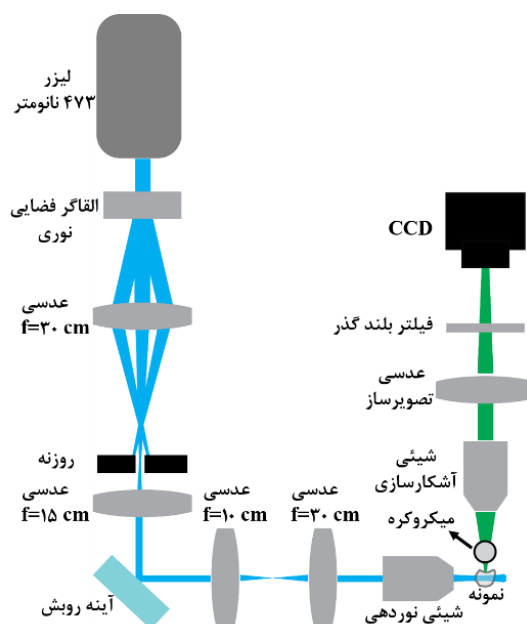
نتایج تجربی

به منظور بررسی کارایی چیدمان از آن برای تصویربرداری از سلول‌های سرطان پستان (MCF7) استفاده شد.

تصاویر این سلول‌ها در حضور و در غیاب میکروکره در شکل ۳ نمایش داده شده‌اند. شکل ۳(الف) تصویر سلول را پیش از قراردادن میکروکره نمایش می‌دهد. در شکل‌های ۳(ب و ج) تصویر حقیقی و مجازی در حضور میکروکره نشان داده شده است. تصاویر حقیقی و مجازی ناشی از میکروکره به ترتیب دارای بزرگ‌نمایی $2/8$ و $3/2$ برابر بیش‌تر نسبت به حالت بدون میکروکره هستند. هم‌چنین تصاویر تشکیل شده به وسیله میکروکره به وضوح دارای توان تفکیک بالاتری هستند. شکل ۳ (د-و) توزیع شدت بر روی سه برش خطی دلخواه را نشان می‌دهد. تصاویر نشان می‌دهد، ساختارهایی که در حالت بدون میکروکره پنهان هستند در هر دو تصویر حقیقی و مجازی آشکار می‌شوند.

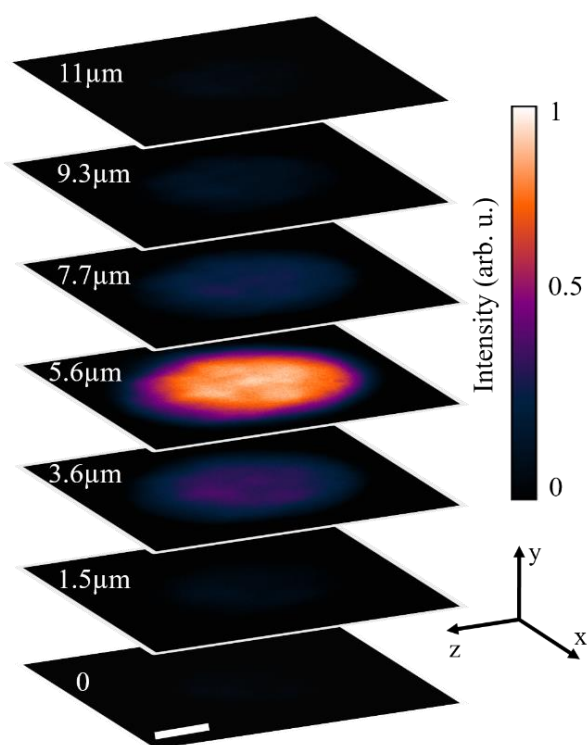
به منظور ثبت تصاویر از عمق‌های مختلف، نمونه بر روی جابه‌جاگر موتوری قرار گرفت و در راستای محور آشکارساز

سانتی‌متر بر روی صفحه کانونی پشتی شیئی نوردهی $(10\times, NA=0.3)$ تصویر می‌شود.



شکل ۱: طرح کلی چیدمان آزمایش.

تصویر صفحه نوردهی شده به وسیله میکروسکوپ فلورسانسی افقی چیده شده ثبت می‌شود. این میکروسکوپ متشکل از شیئی آشکارساز $(20\times, LWD, NA=0.42)$ ، عدسی تصویر ساز (TTL200, Thorlabs)، فیلتر بلندگذر (FEL0500, Thorlabs) و دوربین CCD است. میکروکره (از جنس سیلیکا) با قطر $250\mu m$ در فاصله بین نمونه و شیئی آشکارساز قرار داده می‌شود. به منظور امکان نوردهی صفحات از عمق‌های مختلف، نمونه بر روی جابه‌جاگر موتوری نانومتری قرار می‌گیرد. در شکل ۲، نمایش هندسی چگونگی ثبت تصویر و نیز تشکیل تصویر در دو حالت مجازی (پرتو آبی رنگ) و حقیقی (پرتو سبز رنگ) آورده شده است. ابتدا نمونه در محل $z=0$ (صفحه شیئی آشکارساز) قرار داده می‌شود. قبل از افزودن میکروکره، تفکیک پذیری سیستم را گشودگی عددی شیئی آشکارساز که با θ_0 متناسب است تعیین می‌کند. با قراردادن میکروکره اندکی قبل یا بعد از فاصله کانونی آن، به ترتیب دو تصویر

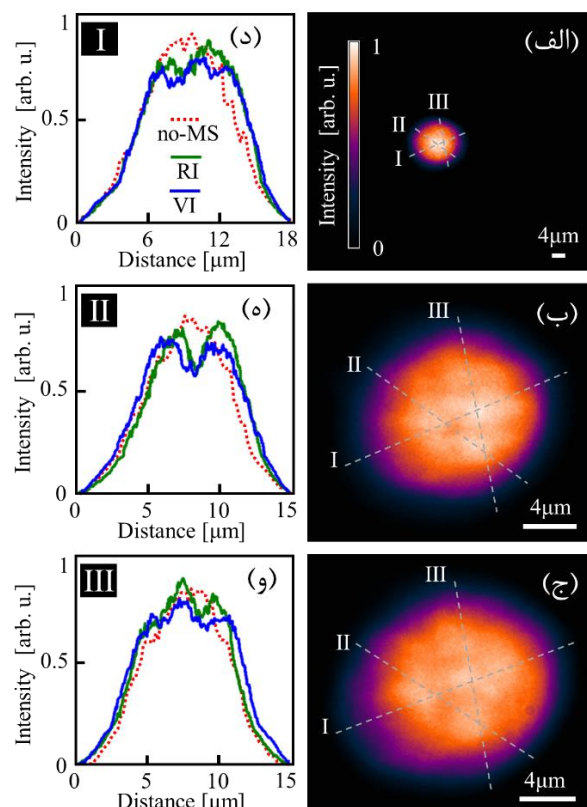


شکل ۴: نمایش تصویر سه بعدی ثبت شده از تک سلول MCF7 به صورت برشی در چند عمق مختلف. خط مقیاس: ۴ μm.

مرجع ها

- [1] Jan Huiskens, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst HK Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686):1007-1009, 2004.
- [2] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2):82-87, 2000.
- [3] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19(11):780-782, June 1994.
- [4] V. Abbasian, S. Rasouli and A. R. Moradi. Microsphere-assisted self-referencing digital holography in transmission mode. *Journal of Optics*, Vol. 21, No. 4, pp. 045301, 2019.
- [5] Hosein Kafian, Milad Laleh Nezhad, Sahar Moradi Mehr, Shiva Akbari-Birgani, and Daryoush Abdollahpour. Light-Sheet Fluorescence Microscopy with Scanning Non-diffracting Beams, *bioRxiv*, 10.1101/837328, 2019.

جابه جا شد. شکل ۴ قابلیت لایه بندی (ثبت تصاویر از عمق های مختلف) چیدمان میکروسکوپ صفحه نوری با استفاده از میکروکره را نمایش می دهد.



شکل ۳: تصاویر دوبعدی ثبت شده از تک سلول MCF7؛ الف) قبل از افزودن میکروکره، ب) با میکروکره در حالت حقیقی، ج) با میکروکره در حالت مجازی، د-و) نمایه های تک بعدی در طول خط برش های دلخواه I، II و III

نتیجه گیری

در این مقاله افزایش بزرگ نمایی و توان تفکیک میکروسکوپ صفحه نوری فلورسانسی با قراردادن میکروکره بین نمونه و شیئی آشکارساز گزارش شد. از این چیدمان برای ثبت تصاویر از سلول های سرطان پستان استفاده شد و قابلیت لایه بندی سه بعدی چیدمان با ثبت تصاویر دوبعدی از عمق های مختلف نشان داده شد. نتایج نشان دهنده افزایش توان تفکیک و بزرگ نمایی (تا ۳/۲ برابر) با استفاده از این شیوه است. این رهیافت، جایگزینی کم هزینه برای استفاده از شیئی های آشکارساز با گشودگی عددی بالا است.