بیست و سومین کنفرانس اپتیک و فوتونیک و نهمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
دانشگاه تربیت مدرس
۱۲-۱۴ بهمن ۱۳۹۵
23rd Iranian Conference on Optics and Photonics and 9th Conference on Photonics Engineering and Technology
Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
January 31- February 2, 2017

طراحی و راه‌اندازی میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه موجبر نوری برای تصویربرداری نقطه‌های کوانتومی کادمیم سلنید

ندا روستایی[۱]، فریبا جاپلاقی[۱]، الهام شیخی[۱]، نورا افشار[۱]، نرگس قلمبر[۱]، محمدامین بصام[۲]، شراره تودد[۳] و بتول سجاد[۱]

[۱]گروه فیزیک دانشگاه الزهرا، خیابان ده ونک، تهران

[۲]گروه فیزیک دانشگاه صنعتی مالک اشتر، لویزان، بزرگراه شهید بابایی، تهران

[۳]گروه فیزیک دانشگاه ادینبورگ، اسکاتلند

چکیده - در این پژوهش، به منظور آشکارسازی تابش فلورسانسِ مولکول‌های فام‌ساز برچسب‌گذاری‌شده در نمونه، یک میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه موجبر نوری طراحی و راه‌اندازی شده است. در میکروسکوپی فلورسانسِ بازتابِ داخلیِ کلی از پدیده بازتابش داخلی کلی بهره گرفته می‌شود. درواقع، هنگامی‌که بازتابش داخلی کلی رخ می‌دهد، یک موج میرا در محیط رقیق‌تر انتشار می‌یابد و این موج میرا برای نوردهی نمونه استفاده می‌شود. درنهایت امکان مشاهده بخش سطحی نمونه (به جای عمق) که با مولکول‌های فام‌ساز نشاندار شده است، فراهم می‌شود. بدین منظور، ابتدا با استفاده از ابزارهای اپتیکی و اپتومکانیکی موجود در آزمایشگاه، یک میکروسکوپ وارون طراحی و ساخته شده است. سپس با استفاده از این میکروسکوپ وارون، چیدمان میکروسکوپ فلورسانسِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه موجبر نوری جهت تصویربرداری برپا شده است و از چند نمونه نقطه کوانتومی کادمیم سلنید، تصویربرداری صورت گرفته است.

کلید واژه- بازتاب داخلی کلی، فلورسانس، موج میرا، مولکول فام‌ساز.

Design and Operation a Lightguide-based Total Internal Reflection Fluorescence Microscope for Imaging of CdSe Quantum dots

Neda Roustaie[1], Fariba Japelaghi[1], Elham Sheykhi[1], Noura Afshar[1], Narges Ghalambor[1], Mohammad Amin Bassam[2], Sharareh Tavaddod[3] and Batool Sajad[1]

[1]Physics Department, Alzahra University, Dehvanak, Tehran

[2]Physics Department, Malek-Ashtar University of Technology, Lavizan, Tehran

[3]Physics Department, University of Edinburgh, Scotland

Abstract- In this works a lightguide-based total internal reflection fluorescence microscope is designed and demonstrated to detect the fluorescence of fluorophore molecules labeled in the sample. Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) is a technique that utilizes the total internal reflection phenomenon. Indeed, when total internal reflection occurs, an evanescent wave is generated in the less dense medium which is used for illuminating the sample and consequently the possibility of observing a superficial (instead of bulk) part of fluorophore-labeled sample is opened up. For this purpose, an inverted microscope first has been designed using the available optic and optomechanical devices. Subsequently, the arrangement of lightguide-based total internal reflection fluorescence microscope has been done by means of the inverted microscope to carry out the imaging operation for some CdSe quantum dot samples.

Keywords: total internal reflection, fluorescence, evanescent wave, fluorophore.

این مقاله به شرط در دسترس بودن در وبگاه www.opsi.ir معتبر است.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-11-12]

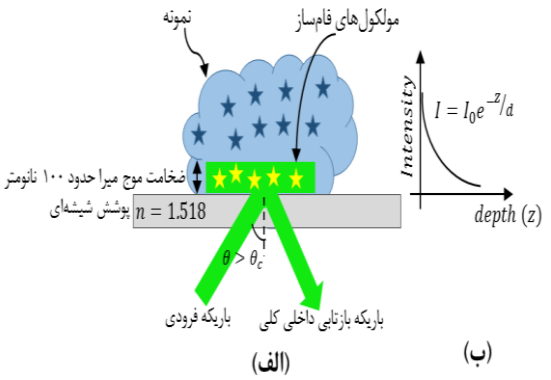
۱- مقدمه

میکروسکوپی فلورسانسِ بازتابِ داخلیِ کلی، روشی اپتیکی است که امکان تصویربرداری لایه نازکی از نمونه را فراهم می‌کند و در زیست‌شناسی سلولی برای مشاهده و بررسی غشای سلولی به کار می‌رود.

این روش از بازتابش داخلی کلی میان سطح زیرین نمونه و زیرلایه جهت مشاهده نمونه مورد مطالعه بهره می‌گیرد. از دیدگاه اپتیک هندسی، هنگامی‌که پرتوی نور از محیطی با ضریب شکست بیشتر به محیطی با ضریب شکست کمتر وارد می‌شود، در یک زاویه تابش خاص، به نام زاویه بحرانی، پرتوی نور شکسته‌شده، در امتداد فصل مشترک دو محیط انتشار می‌یابد و به ازای زاویه‌های تابش بزرگ‌تر از زاویه بحرانی، بازتابش داخلی کلی رخ می‌دهد.

از دیدگاه اپتیک موجی، هنگامی‌که بازتابش داخلی کلی روی می‌دهد، بخشی از موج الکترومغناطیسی تابشی، که موج میرا نامیده می‌شود، به‌صورت جزئی به محیط با ضریب شکست کمتر نفوذ پیدا می‌کند؛ از این موج میرا می‌توان برای نوردهی قسمت‌های خاصی از نمونه که در تماس با سطح زیرلایه قرار دارند، استفاده کرد. مطابق شکل ۱-(الف)، در میکروسکوپی فلورسانسِ بازتابِ داخلیِ کلی، ابتدا نمونه مورد مطالعه را با مولکول‌های فام‌ساز برچسب‌گذاری می‌کنند و سپس نمونه تحت زاویه‌ای بزرگ‌تر از زاویه بحرانی پرتودهی می‌شود. امواج میرای تولید شده، به‌طور گزینشی موجب برانگیخته شدن مولکول‌های فام‌ساز نزدیک سطح تماس پوشش شیشه‌ای-سلول می‌شوند. درنهایت، تابش گسیل‌شده از مولکول‌های فام‌ساز را جمع‌آوری کرده و امکان مشاهده بخش‌های مورد نظر فراهم می‌شود.

شدت موج میرا به‌طور نمایی با افزایش فاصله از فصل مشترک دو محیط، کاهش پیدا می‌کند. ازاین‌رو، تنها لایه نازکی از نمونه به ضخامت حدود ۲۰۰-۱۰۰ نانومتر روشن می‌شود که امکان بررسی برخی از ویژگی‌های سطح نمونه مانند چسبندگی را فراهم می‌کند.



شکل ۱: (الف) نمودار طرحواره پدیده فلورسانسِ بازتابِ داخلیِ کلی، (ب) نمودار شدت موج میرا بر حسب فاصله از فصل مشترک.

چیدمان‌های نوری مختلفی برای میکروسکوپی فلورسانسِ بازتابِ داخلیِ کلی می‌توانند به کار روند. در اوایل دهه ۱۹۸۰ میلادی، اکسلرد چیدمان‌های آزمایشگاهی میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی را برای میکروسکوپ‌های وارون و مستقیم توصیف کرد [۱ و ۲].

به‌طورکلی برای میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی تاکنون سه نوع چیدمان مورد بررسی قرار گرفته است: چیدمان بر پایه منشور، بر پایه عدسی شیئی و بر پایه موجبر نوری. هر سه چیدمان ویژگی‌های متفاوتی دارند که بسته به کار مورد نظر از آن‌ها استفاده می‌شود.

درواقع این چیدمان‌ها در روش‌های پرتودهی تفاوت دارند؛ در میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه منشور، پرتوی لیزر از طریق یک منشور تحت زاویه فوق بحرانی به فصل مشترک پوشش شیشه‌ای-نمونه هدایت می‌شود تا امکان پدیده بازتاب داخلی کلی فراهم شود. درحالی‌که در میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه عدسی شیئی، پرتوی لیزر قبل از روشن کردن نمونه از یک عدسی شیئی عبور می‌کند. این عدسی هم برای پرتودهی به فصل مشترک و هم برای مشاهده فلورسانس گسیلی استفاده می‌شود. در میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه موجبر نوری، پرتوهای نور توسط تار نوری از منبع نور به داخل موجبر نوری هدایت می‌شود. موجبر نوری در این چیدمان می‌تواند یک پوشش شیشه‌ای مستطیلی شکل یا مدور باشد. بعدازاینکه نور وارد موجبر نوری می‌شود، در سطوح بالا و پایین موجبر بازتاب چندگانه رخ می‌دهد و ناحیه وسیعی از موج میرا ایجاد می‌شود.

این مقاله به شرط در دسترس بودن در وبگاه www.opsi.ir معتبر است.

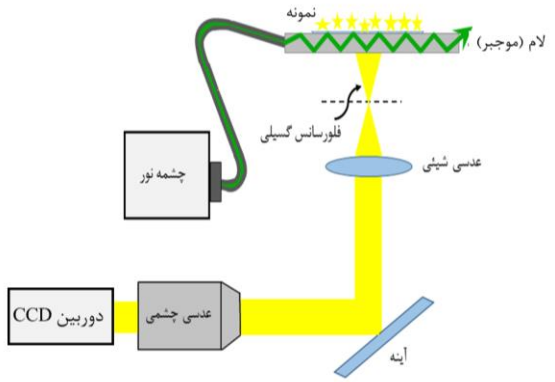
[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-11-12]

۲- روش تجربی

از بین سه چیدمانی که در بخش پیش به آن اشاره شد، چیدمان بر پایه منشور بهترین نسبت داده به نوفه را فراهم می‌کند؛ اما برای مشاهده نمونه‌های با محفظه باز در میکروسکوپ وارون مناسب نیست. چیدمان بر پایه عدسی شیئی برای مشاهده نمونه‌های با محفظه باز قابل اجرا است و امکان دسترسی به نمونه وجود دارد ولی برپایی این چیدمان تنها با عدسی‌های شیئی با عدد گشودگی بالا (گران) امکان‌پذیر است [۳].

چیدمان میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه موجبر نوری، انعطاف‌پذیر است و می‌تواند با عدسی‌های شیئی با عدد گشودگی کم و با ماده واسط هوا، آب و یا روغن انجام شود درحالی‌که نسبت داده به نوفه خوبی را نیز فراهم می‌کند و علاوه بر این، برپایی چیدمان آن خیلی هزینه‌بر نیست.

در شکل ۲، آرایه آزمایشگاهی میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه موجبر نوری در میکروسکوپ وارون نشان داده شده است. در این چیدمان، از یک لام ذوزنقه‌ای‌شکل به‌عنوان موجبر نوری استفاده شده است و نمونه مورد مطالعه روی این لام قرار داده می‌شود.



شکل ۲: آرایه آزمایشگاهی میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی بر پایه موجبر نوری.

نور لیزر از طریق تار نوری وارد موجبر نوری می‌شود. درواقع، برای اینکه در داخل موجبر نوری بازتاب داخلی کلی رخ دهد، لازم است که نور تحت زاویه فوق‌بحرانی به فصل مشترک لام-نمونه تابیده شود؛ تنظیم زاویه به‌وسیله یک قطعه گوه‌مانند انجام گرفته است. بعدازاینکه نور لیزر تحت زاویه فوق‌بحرانی به فصل مشترک لام-نمونه تابیده می‌شود، بازتاب داخلی چندگانه در داخل موجبر رخ می‌دهد. سپس ناحیه وسیعی از موج میرا ایجاد شده و موجب برانگیختگی مولکول‌های فام‌ساز موجود در نمونه می‌شود. درنهایت، تابش گسیل‌شده از نمونه پس از عبور از عدسی شیئی، توسط آینه بازتاب شده و به چشمی میکروسکوپ می‌رسد. تصویر نمونه از چشمی میکروسکوپ قابل مشاهده است؛ در این چیدمان یک دوربین بار جفت‌شده جهت تصویربرداری به چشمی میکروسکوپ وصل شده است.

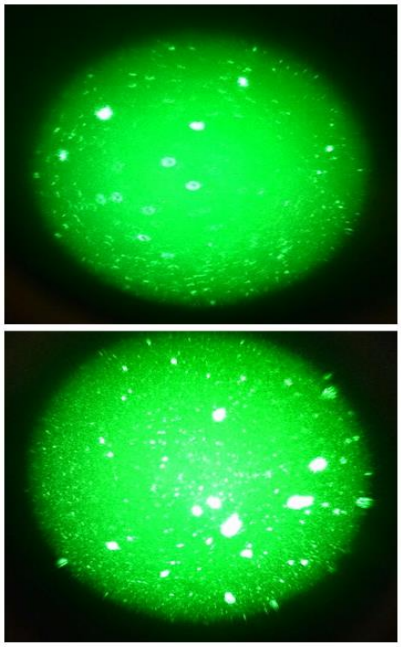
۲-۱- راه‌اندازی و تصویربرداری

در میکروسکوپی فلورسانسِ بازتابِ داخلیِ کلی تنها از پایین‌ترین سطح نمونه که در تماس با زیرلایه است، تصویربرداری می‌شود؛ بنابراین ابتدا کانونی کردن عدسی شیئی روی سطح لام انجام گرفته است. بعد از کانونی کردن عدسی شیئی روی سطح لام، لازم است نمونه جهت تصویربرداری آماده شود.

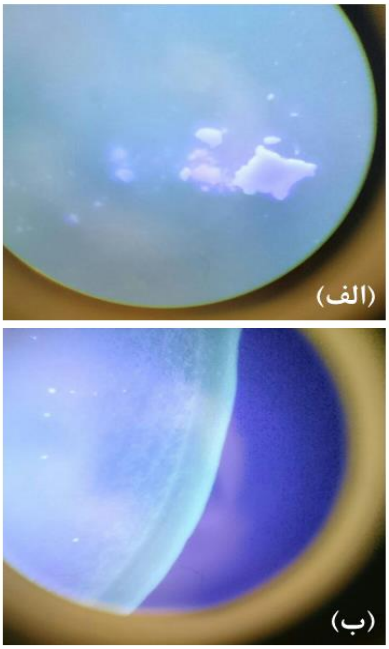
از این چیدمان برای تصویربرداری از دو نمونه نقطه‌های کوانتومی کادمیم سلنید استفاده شده است. نمونه اول شامل محلول نقطه‌های کوانتومی کادمیم سلنید بر انگیخته با طول‌موج سبز در محلول رودامین است؛ جهت آماده‌سازی نمونه، مقداری از محلول حاوی نقطه‌های کوانتومی کادمیم سلنید که با طول‌موج سبز برانگیخته می‌شوند، در محلول رودامین و اتانول ریخته شده است. سپس چند قطره از نمونه شامل این نقطه‌های کوانتومی و محلول رودامین، روی لام ذوزنقه‌ای قرار داده‌شده و با هدایت نور تکفام لیزر به داخل موجبر نوری، تصویربرداری از نقطه‌های کوانتومی موجود در محلول رودامین صورت گرفته است. در این مرحله از لیزر نئودمیوم-یاگ با طول‌موج ۵۳۲ نانومتر و توان اسمی ۱۰۰ میلی وات استفاده شده است. هم‌چنین برای نقطه‌های کوانتومی کادمیم سلنید که با طول‌موج فرابنفش برانگیخته می‌شوند، آزمایش تکرار شده است و از نقطه‌های کوانتومی برانگیخته با نور فرابنفش و محلول رودامین تصویربرداری انجام شده است. در این مرحله، لیزر دیود فرابنفش با طول‌موج ۴۰۵ نانومتر و توان ۲۰ میلی‌وات به کار رفته است. تصویرهای ثبت‌شده در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است.

این مقاله به شرط در دسترس بودن در وبگاه www.opsi.ir معتبر است.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-11-12]



شکل ۳: تصویرهای ثبت‌شده از نقطه‌های کوانتومی کادمیم سلنید برانگیخته با طول‌موج ۵۳۲ نانومتر در محلول رودامین.



شکل ۴: تصویرهای ثبت‌شده از نقطه‌های کوانتومی کادمیم سلنید برانگیخته با طول‌موج ۴۰۵ نانومتر در محلول رودامین؛ در شکل (الف) تجمع نقطه‌های کوانتومی چسبیده به سطح زیرلایه و (ب) مرز زیرلایه-نمونه قابل مشاهده است.

همان‌طور که در شکل‌های ۳ و ۴ دیده می‌شود، نقطه‌های کوانتومی کادمیم سلنید به‌هم‌چسبیده‌شده که ابعاد آن‌ها حدود چند ده میکرون است، در محلول رودامین به‌خوبی قابل مشاهده هستند؛ هم‌چنین با توجه به اینکه ابتدا عدسی شیئی میکروسکوپ روی سطح لام کانونی شده است، از روی سطح بودن نقطه‌های کوانتومی اطمینان حاصل شده است. لازم به ذکر است به دلیل در دسترس نداشتن پالایه مناسب، پالایه کردن نور تحریکی انجام نشده است.

۳- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، یک میکروسکوپ وارون طراحی و راه‌اندازی شده است. مزیت‌های چیدمان میکروسکوپ فلورسانسیِ بازتابِ داخلیِ کلی طراحی‌شده بر پایه موجبر نوری عبارت‌اند از: (۱) با توجه به اینکه در روش‌های میکروسکوپی روبشگر پویشی، به دلیل تماس روبشگر با نمونه، امکان تخریب نمونه‌های زیستی وجود دارد و برای بررسی و مطالعه قسمت‌های درون غشای سلولی خیلی مناسب نیستند؛ درحالی‌که روش میکروسکوپی فلورسانسِ بازتابِ داخلیِ کلی به‌طور گسترده برای بررسی غشای سلولی و نمونه‌های زیستی قابل استفاده است، (۲) به دلیل اینکه با عدسی‌های شیئی با عدد گشودگی پایین قابل اجرا است، روشی کم‌هزینه و کاربردی جهت مشاهده لایه نازکی از نمونه مورد مطالعه است و با عدسی‌های شیئی با ماده واسط هوا، روغن و یا آب امکان‌پذیر است، (۳) امکان دسترسی به نمونه وجود دارد، (۴) نسبت داده به نوفه خوبی را فراهم می‌کند، (۵) فوق‌العاده تنظیم‌پذیر است و (۶) ازآنجاکه در این روش تنها لایه نازکی به ضخامت حدود ۱۰۰ نانومتر از نمونه روشن می‌گردد، در ساختارهای زیستی امکان مطالعه غشای سلول و میزان چسبندگی سلول به سطح زیرلایه فراهم می‌گردد.

مراجع

[1] D. Axelrod, N.L. Thompson, and T.P. Burghardt., "Total internal reflection fluorescent microscopy", Journal of microscopy 129, No. 1, pp.19-28, 1983.
[2] D. Axelrod, T.P. Burghardt, and N.L. Thompson, "Total internal reflection fluorescence", Annual review of biophysics and bioengineering 13, No. 1, pp.247-268, 1984.
[3] D. Axelrod, "8 Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy", Optical Imaging and Microscopy: Techniques and Advanced Systems 87, p.195, 2007.

این مقاله به شرط در دسترس بودن در وبگاه www.opsi.ir معتبر است.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-11-12]