بیست و سومین کنفرانس اپتیک و فوتونیک و نهمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
دانشگاه تربیت مدرس
۱۴-۱۲ 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 یک میکروسکوپ فلورسانس بازتاب داخلی کلی برپایه منشور

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

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

[۲]گروه فیزیک دانشگاه ادینبورگ، اسکاتلند

[۳]گروه فیزیک دانشگاه صنعتی مالک اشتر، لویزان، تهران

چکیده - میکروسکوپ فلورسانس بازتاب داخلی کلی به دلیل کاربرد در تصویربرداری از سطح با ضخامت حدود ۲۰۰-۱۰۰ نانومتر روشی مناسب برای بررسی فرایندهای سلولی، به‌ویژه در نزدیکی غشای سلول زنده، است. در این پژوهش، یک میکروسکوپ فلورسانس بازتاب داخلی کلی بر پایه منشور طراحی شده است. به منظور بهینه‌سازی چیدمان آزمایشگاهی، از یک باریکه‌گستر برای موازی سازی و گسترده نمودن سطح نوردهی به نمونه، و از روغن شناوری نیز به‌عنوان لایه میانی استفاده شده تا اتلاف ناشی از پراکندگی و جذب نور ضمن عبور از محیط‌های با ضریب شکست متفاوت کاهش یابد. هم‌چنین یک قطبشگر و تحلیلگر جهت کنترل شدت و قطبیدگی نور تابشی و بررسی میزان پایداری توان لیزر در بازه‌های مختلف زمانی و مکانی به کار برده شده است. چیدمان آزمایشگاهی برپا شده برای تصویر برداری فلورسانس بازتاب داخلی کلی از محلول رنگدانه‌های رودامین (*Rd6G*) *مورد استفاده قرار گرفته است*.

کلید واژه- فلورسانس، بازتاب داخلی کلی، میکروسکوپی فلورسانس بازتاب داخلی کلی.

Design and Operation a Prism-based Total Internal Reflection Fluorescence Microscope

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

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

[2]Physics Department, University of Edinburgh, Scotland

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

Abstract- Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy because of usage at imaging from surface with 100-200 nm in thickness is a good method for investigation of biological processes in/out of cells, specially in cell membrane proximity. In this paper a prism-based TIRF microscope is designed and operated. For optimizing the experimental setup, a beam expander for collimating light and expanding the illumination surface of sample, and the immersion oil for decreasing the loss due to scattering and absorption are employed. Also, the polarizer and analyzer are used to control the intensity and polarization of light and investigation of the laser power stability in different time and distance intervals. The experimental set up is used for total internal reflection fluorescence imaging of rhodamine (Rd6G) dyes.

Keywords: Fluorescence, Total Internal Reflection, Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy.

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

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-02]

۱- مقدمه

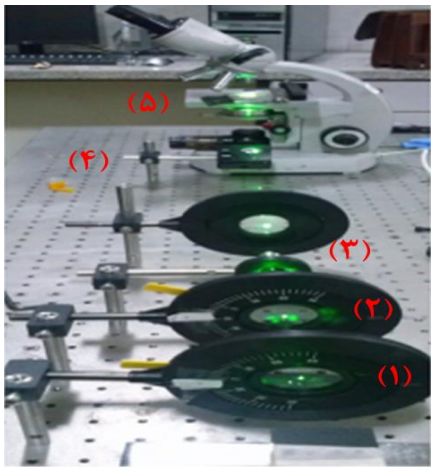
میکروسکوپی فلورسانس بازتاب داخلی کلی نخستین بار توسط دانیل آکسلرد در سال ۱۹۸۰ مطرح گردید [۱]. در این روش، از موج میرای ناشی از بازتاب داخلی کلی منبع نور برای برانگیزش مولکول‌های فام‌ساز در فاصله‌ی حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر از سطح استفاده می‌شود [۲]. به منظور بهینه‌سازی تصویربرداری، چیدمان‌های مختلفی برای این روش ارائه شده است [۳]. امروزه از میکروسکوپ‌های مستقیم و وارون برای میکروسکوپ فلورسانس بازتاب داخلی کلی استفاده می‌شود. با انتخاب نوع میکروسکوپ به منظور هدایت پرتو به سمت نمونه و فراهم نمودن شرایط مناسب بازتاب داخلی کلی، از منشور یا موجبر و یا عدسی با روزنه‌ی عددی بالا می‌توان استفاده نمود.

برای استفاده از این نوع میکروسکوپ سه نکته مهم باید در نظر گرفته شود: ۱- نور تابشی بیشتر سطح نمونه را در برگیرد، ۲- شدت نور تابشی و قطبش آن که از مولفه‌های با اهمیت برای برانگیزش مولکول‌های فام‌ساز به شمار می‌آید، تحت کنترل باشد [۴] و ۳- پراکندگی و جذب ناخواسته نور در اثر تغییر ناگهانی ضریب شکست محیط‌هایی که نور از آن عبور می‌کند به حداقل برسد [۵]. قرار دادن باریکه گسترده نور در چیدمان برای رساندن نور به سطح بیشتری از نمونه، استفاده از مجموعه‌ای از قطبشگرها جهت کنترل شدت و قطبش نور، قرار دادن لایه‌ای میانی بین منشور (عامل بازتاب داخلی) و سطح زیرین نمونه جهت کاهش میزان پراکندگی و جذب نور از جمله راه‌کارهایی است که می‌تواند میکروسکوپ فلورسانس بازتاب داخلی کلی را بهینه نماید تا به‌عنوان گزینه مناسبی برای مشاهده سطح نمونه‌ها از جمله سلول‌های زنده در زمینه بیوفیزیک در نظر گرفته شود.

در این مقاله، یک میکروسکوپ مستقیم بر پایه منشور طراحی و راه‌اندازی شده و از نمونه‌های رودامین (Rd6G) تصویربرداری شده است.

۲- چیدمان تجربی

مطابق شکل ۱، چیدمان آزمایشگاهی از یک منبع نوری، منشور، میکروسکوپ نوری و آشکارساز سی سی دی



شکل ۱: چیدمان میکروسکوپ فلورسانس بازتاب داخلی کلی بر پایه منشور شامل (۱و۲) قطبشگر، (۳) مجموعه پهن کننده باریکه، (۴) آینه و (۵) مجموعه میکروسکوپ و منشور.

تشکیل یافته و برای بهینه‌سازی آن ابزارهای اپتیکی مختلفی به کار گرفته شده است.

لیزر رایج‌ترین منبع نوری مورد استفاده در این‌گونه چیدمان‌ها است که با توجه به مواد فام‌ساز موجود در نمونه انتخاب می‌شود، در این چیدمان دو لیزر سبز پیوسته نئودیمیوم یاگ (۵۳۲ nm) با توان اسمی ۱۰۰ mw و لیزر دیودی قرمز (۶۳۵ nm) با توان اسمی ۲۰ mw مدل dpss کشور چین به کار گرفته شده‌اند. برای کنترل شدت نور لیزر و قطبیدگی آن مجموعه دو قطبشگر به کار گرفته شده است که یکی به‌عنوان قطبشگر و دیگری به‌عنوان تحلیلگر به کار می‌رود. با تغییر زاویه محور قطبش قطبشگر میزان عبور نور تغییر نموده و با تغییر زاویه محور قطبش تحلیلگر این میزان کم و زیاد می‌شود و بدین ترتیب میزان شدت قابل کنترل خواهد بود. از آن‌جاکه هدف در این روش، تصویربرداری از سطح نمونه سلولی است، نیاز به پرتوی پهن و موازی برای روشن ساختن کل سطح مورد مطالعه احساس می‌شود. بدین‌جهت از پهن‌کننده باریکه شامل دو عدسی با فاصله کانونی‌های متناسب استفاده شده است.

پرتو نور با کمک یک آینه تحت زاویه‌ای مناسب، که باید بزرگتر از زاویه حد باشد تا بازتاب داخلی رخ دهد، به سمت منشور تعبیه شده در میکروسکوپ هدایت شده است. منشور عنصر اساسی این چیدمان بوده و با ایجاد بازتاب داخلی کلی و تولید موج میرا کار روشن سازی نمونه را انجام می‌دهد. نور با عبور از منشوری از جنس BK7 (محیطی با ضریب شکست ۱/۵۱۸) وارد هوای موجود بین منشور و تیغه شیشه‌ای نازک زیر نمونه (محیط با ضریب شکست کمتر)

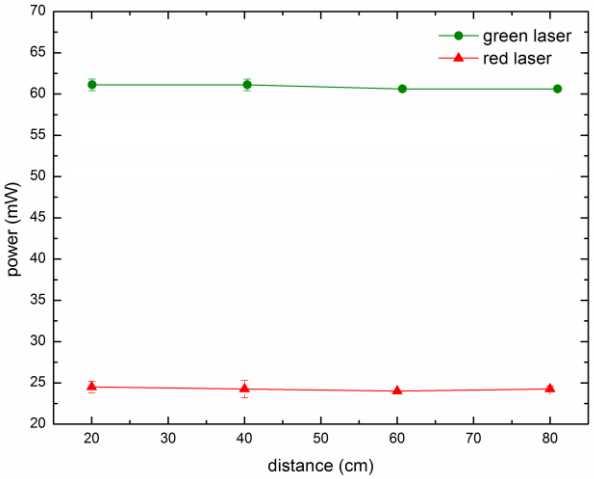
این مقاله به شرط در دسترس بودن در وبگاه www.opsi.ir معتبر است.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-02]

می‌شود. این عبور باعث رخ دادن پدیده‌های نامطلوب پراکندگی و جذب نور، به دلیل تغییر ناگهانی ضریب شکست محیط، می‌شود. بدین‌جهت احتیاج به لایه‌ای میانی است که ضریب شکست آن برابر ضریب شکست منشور باشد تا با ورود نور به آن لایه، اتلافی رخ ندهد. در این چیدمان از روغن شناوری مخصوص میکروسکوپ با ضریب شکست ۱/۵۱۸ استفاده شده است [۶]. داده‌های حاصل از این چیدمان، به منظور تهیه‌ی تصویر مناسب برای تحلیل پدیده‌های نزدیک به غشای سلولی، گزارش و رفتار توان لیزر در هر مرحله عبور از اجزای چیدمان شامل قطبشگر، تحلیلگر، منشور، روغن شناوری و تیغه شیشه‌ای نازک به کمک توان‌سنج مورد بررسی دقیق قرار گرفته است.

۳- نتایج و بحث

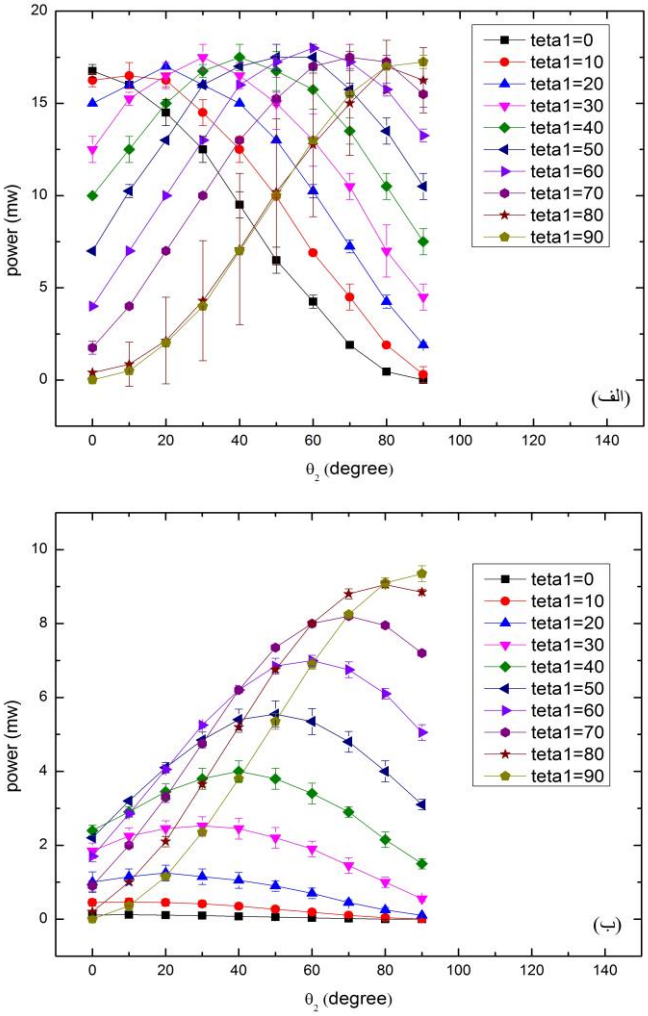
با توجه به اهمیت پایداری توان لیزر تابشی در آزمایش، در اولین مرحله به بررسی پایداری توان لیزر در زمان‌ها و فاصله‌های مختلف پرداخته شده است بدین‌جهت تغییر توان لیزرهای با طول موج ۵۳۲ نانومتر (سبز رنگ) و ۶۳۵ نانومتر (قرمز رنگ) در فاصله‌های زمانی min ۵ و در فاصله‌های مکانی cm ۲۰ مورد بررسی قرار گرفته و در شکل ۲ نمودار میانگین زمانی آن‌ها رسم شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود توان لیزرها تغییر چندانی با گذشت زمان و در فاصله‌های مختلف نکرده است و این نشان از پایداری لیزر در یک بازه زمانی و مکانی مشخص دارد.



شکل ۲: میانگین زمانی تغییر لیزرهای سبز و قرمز در فاصله‌های مختلف.

در شکل ۳- الف و ب به بررسی تغییر توان لیزرها با عبور از قطبشگر و تحلیلگر پرداخته شده است. بدین‌منظور توان نور لیزر پس از عبور از قطبشگر و تحلیلگر بازای زاویه‌های مختلف محور قطبش اندازه‌گیری شده است. با توجه به شکل رفتار منظمی در عبور نور مشاهده می‌شود. در زاویه‌های متعامد عبور صفر و در زاویه‌های یکسان عبور بیشینه به خوبی مشهود است. با کمک این دو نمودار به خوبی می‌توان محور قطبیدگی قطبشگر و تحلیلگر را برای دستیابی به شدت نور مطلوب تنظیم نمود. نمونه‌های زیستی بسیار آسیب‌پذیر و حساسند در نتیجه میزان شدت نور تابشی به آن‌ها باید کنترل شده و مناسب باشد که با استفاده از این نمودار می‌توان به آن دست یافت.

حضور لایه‌های متفاوت در مسیر رسیدن نور به مرز مشترک تیغه شیشه‌ای نازک و نمونه موجب تغییر در



شکل ۳: توان لیزر (الف) سبز و (ب) قرمز برحسب زاویه محور قطبش قطبشگر و تحلیلگر.

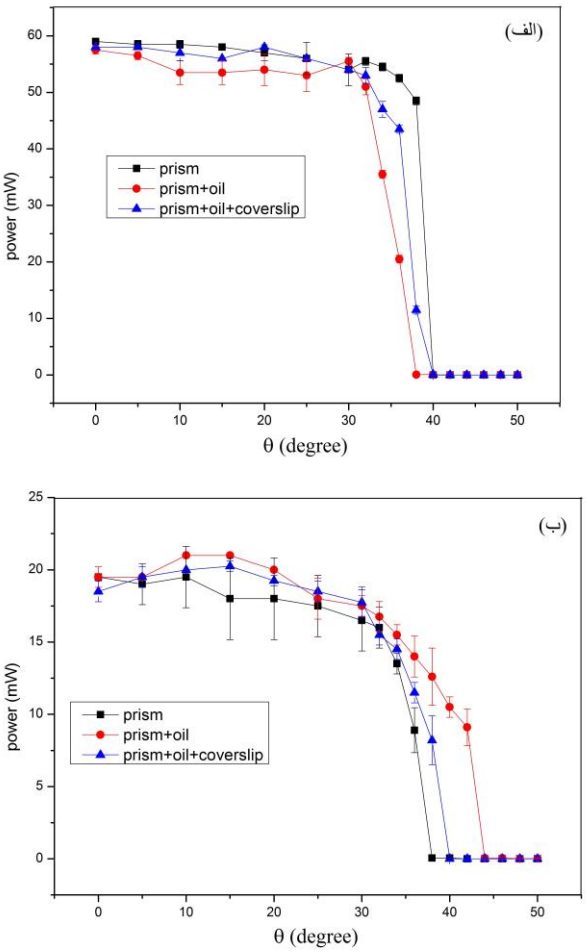
زاویه حد می‌شود. محدوده تمام این زاویه‌ها حدود ۳۵ تا ۴۰ درجه بدست آمده است. توان عبوری از محیط‌های متفاوت منشور، منشور/روغن شناوری، منشور/روغن شناوری/ تیغه

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

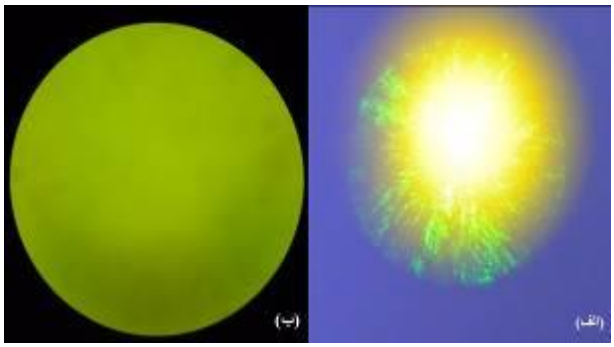
[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-02]

شیشه‌ای نازک بازای زاویه‌های کمتر و بیشتر از زاویه حد در شکل ۴ نشان داده شده است. کاهش شدت عبوری با افزایش زاویه تابشی نور پس از زاویه حد به خوبی مشهود است.

با چیده شدن تمام مولفه‌های اپتیکی و انتخاب شدت مناسب نور لیزر سبز از محلول رنگدانه‌های رودامین (RG6) در اتانول (محصول شرکت مرک آلمان با خلوص ۹۹٪) تصویربرداری شده است. رنگ زرد فلورسانسی این ماده با تابش نور لیزر تحت زاویه و شدت مناسب که پس از آزمایش‌های متوالی بهینه‌سازی شده، توسط دوربین سی سی دی متصل به میکروسکوپ ثبت شده است. تصاویر در حالت‌های بهینه و قبل آن در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۴: تغییر توان لیزر (الف) سبز و (ب) قرمز در عبور از منشور، روغن و تیغه شیشه‌ای نازک.



شکل ۵: تصویر فلورسانس بازتاب داخلی کلی بر پایه منشور از محلول رودامین (Rd6G) (الف) قبل و (ب) پس از بهینه‌سازی.

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق، چیدمان میکروسکوپ فلورسانس بازتاب داخلی کلی بر پایه منشور با در نظر گرفتن ابزارهای نوری مناسب بهینه‌سازی شده است. پهن‌کننده باریکه برای موازی سازی و گسترده نمودن سطح نوردهی به نمونه و همچنین روغن شناوری به‌عنوان لایه میانی برای کاهش اتلاف ناشی از پراکندگی و جذب نور ضمن عبور از محیط‌های با ضریب شکست متفاوت استفاده شده‌اند. میزان پایداری توان لیزر در بازه‌های زمانی و مکانی متفاوت بررسی شده و قطبشگر و تحلیلگر جهت کنترل شدت و قطبیدگی نور به کار گرفته شده است. آرایه برپا شده برای تصویربرداری نمونه رودامین (Rd6G) مورد استفاده قرار گرفته است.

مراجع

[1] D. Axelrod, N. L. Thompson, and T. P. Burghardt, “Total internal reflection fluorescence microscopy”, journal of microscopy 129, No. 1, pp. 19-28, 1983.

[2] N. C. Hoai Le, D. V. Dao, R.i Yokokawa, T. D. Nguyen, J. C. Wells and S. Sugiyama, “Highly-sensitive fluorescence detection and with microfabricated total internal reflection (TIR)-based devices”, J. Micro-Nano Mech. 7, pp. 45-59, 2012.

[3] D. Axelrod, “Total Internal Refection Fluorescence Microscopy in Cell Biology”, *Traffic.* 2, pp. 764-77, 2001.

[4] D. Axelrod, T. P. Burghardt and N. L. Thompson, “TOTAL INTERNAL REFLECTION FLUORESCENCE”, Ann. Rev. Biophys. Bioeng 13, pp 247-68, 1984.

[5] D. Axelrod, “Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives”, Journal of Biomedical Optics 6, No. 1, pp. 6-13, 2001.

[6] H.t Schneckenburger, “Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications”, Current Opinion in Biotechnology 16, pp. 13–18, 2005.

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

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-02]