میکروسکوپ تابش طرحدار بر پایه یک مدولاتور فضایی نوری جهت افزایش توان‌تفکیک میکروسکوپی

محمد قندی منفرد، امیر حسین برادران قاسمی، حمید لطیفی

دانشکده فیزیک، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده – در این مقاله به برپایی یک میکروسکوپ بر پایه تابش طرحدار *(SIM)* پرداخته می‌شود. برپایی یک سامانه میکروسکوپ تابش طرحدار شامل طراحی چیدمان اپتیکی و الگوریتم بازیابی تصویر می‌باشد. در چیدمان اپتیکی مورد نظر از یک مدولاتور فضایی نوری *(SLM)* بازتابی جهت تولید تابش طرحدار استفاده شد. تابش استفاده شده جهت میکروسکوپی تعداد ۹ طرح توری پراش در سه زاویه و سه فاز مختلف هستند که توسط مدولاتور فضایی نوری تولید می شوند. همچنین کد رایانه ای برپایه اپتیک فوریه برای بازیابی تصاویر حاصل از تابش طرحدار روی نمونه نوشته شد. با توجه به نتایج بدست آمده، تصویر برداری از جزئیات نمونه مورد نظر بدلیل افزایش توان تفکیک میکروسکوپ امکان‌پذیر شد.

کلید واژه- میکروسکوپی تابش طرحدار، میکروسکوپی ابرتفکیک، مدولاتور فضایی نور

Structured Illumination Microscope based on a Spatial Light Modulator for High-resolution Microscopy

Mohammad Ghandi Monfared, Amir H. Baradaran Ghasemi, Hamid Latifi

Department of Physics, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract- In this paper we proceed with the implementation of a structured illumination microscope (SIM). SIM systems consist of two main parts i) Optical setup design and ii) image reconstruction algorithm. In the optical setup, we make use of a reflective spatial light modulator (SLM) in order to generate structured illumination. Nine different diffraction grating patterns were produced for microscopy through the SLM with three different related angles and phases. Moreover, we implemented a computer code in MATLAB based on Fourier optics to reconstruct the final image. According to our results, the fine details of a given biological sample were resolved by the SIM-SLM system due to an appreciable increase in resolution.

Keywords: Structured illumination microscopy, Super-resolution microscopy, Spatial Light Modulator

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-04]

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

۱- مقدمه

چالش بزرگ در میکروسکوپی نوری وجود حد پراش اپتیکی درافزایش توان تفکیک پذیری فضایی است. درحالی که با اختراع میکروسکوپی فلوئورسانس امکان افزایش تباین تصویر میسر شد ولی همچنان حد پراش اپتیکی محدودیتی عمده در گذر از میکروسکوپی به نانوسکوپی می‌باشد. به موجب این محدودیت که اولین بار توسط ارنست آبه در سال ۱۸۷۳ مطرح شد، امکان تمایز میان دو منبع نوری نقطه‌ای که فاصله آنها کمتر از مقدار $\lambda/2\ NA$ باشد، وجود ندارد. بطوریکه λ طول موج نور گسیل شده از منبع نقطه-ای و NA گشودگی عددی شیئی سیستم تصویربرداری می‌باشد. با این حال در سال‌های اخیر روش‌های گوناگونی برای عبور از این محدودیت اپتیکی پایه‌ریزی شده است.

اهمیت میکروسکوپی فراتر از حد پراش در مشاهده سامانه‌های زیستی دو چندان می‌شود. بطوریکه بعنوان یک شیوه غیر مخرب قابلیت استفاده جهت مطالعه نحوه عملکرد سلول های موجود زنده به کار می‌رود. یکی از روش‌هایی که در این راستا برای کاربردهای زیستی توسعه یافته‌اند، تکنیک تابش طرحدار (SIM)است [1]. این روش، چیدمان اپتیکی نسبتا ساده وارزان قیمت دارد که توانایی تصویربرداری تا دو برابر حد پراش را میسر می‌سازد. همچنین در صورت تحریک خواص غیر خطی نشان داده شده است که امکان تصویر برداری تا چند برابر حد پراش با استفاده از این تکنیک میسر می باشد. در این تکنیک، طرح‌های ماره حاصل از تابش فرودی با پروفایل طرحدار و تابش گسیل شده از نمونه، در رایانه ثبت می‌شوند. سپس در فضای فوریه اطلاعات موجود در مراتب بالاتر پراش در مکان‌های اصلی خود بازیابی می‌شوند. با بازگشت به فضای واقعی، تفکیک‌پذیری تصویر فراتر از حد پراش امکان پذیر می‌گردد[۲]. یکی از روش‌های ایجاد تابش طرحدار، ایجاد توری پراش در مسیر محور اپتیکی میکروسکوپ با استفاده از مدولاتور فضایی نوری (SLM) می‌باشد. یک مدولاتور فضایی نوری معمولا از فن‌آوری بلورهای مایع روی سیلیکون استفاده می‌کند. با اعمال اختلاف پتانسیل الکتریکی روی پیکسل‌های فضایی موجود در صفحه SLM، اختلاف راه نوری ایجاد می‌شود و فاز نقاط مختلف از جبهه موج نور فرودی روی آن تغییر می‌کند. لذا امکان تولید تابش طرحدار با هندسه اختیاری برای طراحی اپتیک تطبیقی میسر می‌گردد. در این مقاله به چیدمان اپتیکی یک میکروسکوپ بر پایه تابش طرحدار توسط یک مدولاتور فضایی نوری پرداخته می‌شود و نشان داده می‌دهیم که بازیابی جزئیات ریز موجود در یک نمونه واقعی توسط این روش میکروسکوپی امکان پذیر است.

۲- تئوری آزمایش

تصویر هر شیئ همگشت بین تابع پخش‌شدگی نقطه (PSF)، $P(r)$ و توزیع شدت گسیلی $E(r)$ از آن شیئ است.

(۱)

$$C(r) = (E \otimes P)(r)$$

که در آن، $C(r)$ توزیع شدتی فوتون‌ها روی شناساگر (CCD)، و $\otimes$ عملگر همگشت می باشند. در میکروسکوپی فلوئورسانس، توزیع شدتی گسیلی برابر با ضرب داخلی توزیع شدت تابش فرودی $S(r)$، در توزیع شدت فلوئورسانس نمونه $O(r)$ است،

(۲)

$$E(r) = S(r)\cdot O(r)$$

حال اگر منبع تابشی به جای تابش یکنواخت، الگوی تابشی سینوسی داشته باشد آنگاه

$$S_{\theta,\varphi}(\vec{r}) = S_0\left[1-\frac{m}{2}\cos(2\pi \vec{F}_\theta \cdot \vec{r} + \varphi)\right] \qquad (۳)$$

بطوریکه $\vec{r} \equiv (x, y)$ بردار موقعیت، S_0 شدت بیشینه تابش، $\vec{F}_\theta = (F\cos\theta, F\sin\theta)$ بردار فرکانس تابش سینوسی در فضای معکوس، φ فاز الگوی تابش و m ضریب تلفیق (مدولاسیون) می‌باشند.



شکل ۱: مثالی از نقش الگوی ماره در SIM. شیئ با فرکانس فضایی بالا پس از برهم‌نهی با تابش طرحدار و عبور از PSF سیستم اپتیکی تصویر ماره حاصل را بوجود می‌آورد. فرکانس فضایی تصویر کوچک‌تر شده و درون محدوده حد پراش قرار می‌گیرد[۳].

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

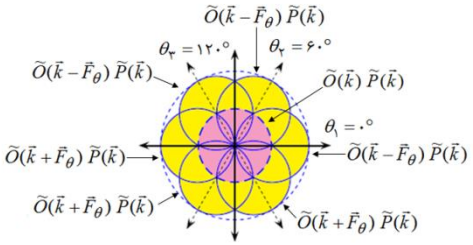
[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-04]

بر اساس معادلات بالا و از طریق طرح ماره می‌توان اطلاعات اشیاء ریز را با استفاده از تابش طرحدار از درون تصویر برهم‌نهی شده استخراج کرد. بنابراین توزیع شدت گسیلی مشاهده شده در سیستم اپتیکی (تصویر) در فضای وارون بصورت

$$\tilde{C}_{\theta,\varphi}(\vec{k}) = \left[\tilde{S}_{\theta,\varphi}(\vec{k}) \otimes O(\vec{k})\right] \cdot \tilde{P}(\vec{k}) + \tilde{N}(\vec{k}) \qquad (۴)$$

خواهد بود که در آن $N(\vec{r})$ نویز گاوسین سفید می‌باشد. بعد از انجام محاسبات، رابطه نهایی برای تصویر حاصل از تابش طرحدار از معادله (۵) بدست می‌آید[۴]،

$$\tilde{C}_{\theta,\varphi}(\vec{k}) = \frac{S_0}{2}\left(\tilde{O}(\vec{k}) - \frac{m}{2}\tilde{O}(\vec{k}-\vec{F}_\theta)\,e^{-i\varphi} - \frac{m}{2}\tilde{O}(\vec{k}+\vec{F}_\theta)\,e^{i\varphi}\right)\cdot \tilde{p}(\vec{k}) + \tilde{N}(\vec{k}) \qquad (۵)$$

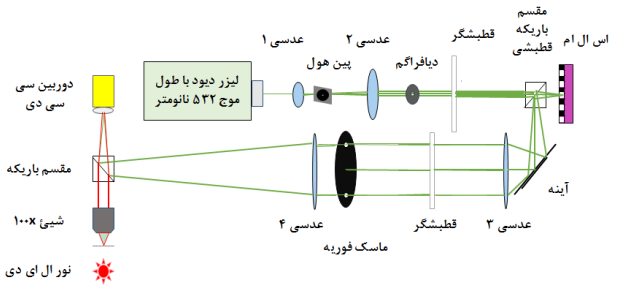


شکل 2: مفهوم SIM. دایره مرکزی فضای فرکانسی قابل مشاهده در محدوده حد پراش می باشد. دوایر زرد رنگ فضای فرکانسی بازیابی شده، طبق رابطه (۵) فراتر از حد پراش می‌باشند[۵].

معادله (۵) نشان می‌دهد که $\tilde{C}_{\theta,\varphi}(\vec{k})$ ترکیبی خطی از مجموعه فرکانسی درون سه ناحیه دایروی از نمونه $\tilde{O}(\vec{k})$ می‌باشد که مرکز آنها در فضای وارون در مبدا، $-\vec{F}_\theta$ و $\vec{F}_\theta$ می‌باشند. مطابق شکل (۲)، اگر فرکانس فضایی $\vec{F}_\theta$ برابر فرکانس قطع حد پراش باشد (دایره صورتی)، مجموع شعاع دایره حد پراش و شعاع دایره انتقال یافته از مبدا، دو برابر شعاع فرکانس قطع پراش می‌شود. از طرفی تفکیک پذیری با فرکانس فضایی رابطه مستقیم دارد. پس با در نظر گرفتن نقاط خالی بین دوایر زردرنگ و دایره نقطه‌چین، حد تفکیک‌پذیری تقریبا دوبرابر شده است.

۳- چیدمان آزمایش

شکل (۲) چیدمان مورد استفاده در این مقاله را نشان می‌دهد. نور لیزر دیود ۵۳۲nm پس از عبور از عدسی محدب f=5cm، روزنه ۲۵μm، عدسی محدب f=12.5cm و یک دیافراگم، بطور موازی و با شدت یکنواخت پس از عبور از قطبشگر وارد مقسم باریکه قطبشی شده تا فقط قطبش افقی وارد SLM (LETO, Holoeye) شود. نور منعکس شده از سطح SLM به صفحه فوریه عدسی محدب f=50cm می‌رسد. با انتخاب مرتبه ۱+ و ۱- پراش و حذف مرتبه صفرم، پرتو به عدسی محدب f=50cm رسیده تا توسط یک مقسم باریکه در شاخه میکروسکوپ سیستم، تصویر طرح‌های سینوسی به وضوح مشاهده شوند. شاخه عمودی در سمت چپ شکل(۲) میکروسکوپ سیستم را نمایش می‌دهد که شامل یک شیئی (NA=1، ۱۰۰x)، یک CCD تک رنگ با رزولوشن 480×720 و با اندازه پیکسل ۸μm به همراه عدسی دوربین با میدان دید کم و همچنین یک LED با توان ۱۲mW به عنوان نور پس زمینه میکروسکوپ، می‌باشد. به دلیل اینکه که پراش مرتبه صفر با نقاط مرده میان پیکسل های SLM تداخل می‌کند و همچنین مرتبه صفرم پراش و تداخل حاصل از مراتب بالاتر پراش در یک مکان تشکیل می شوند، بازده SLM کاهش می‌یابد[۶]. در این مقاله برای حذف پراش مرتبه صفر از فیلتر بالا گذر بصورت ماسکی که فقط مراتب اول پراش را در سه زاویه ۰، ۶۰ و ۱۲۰ درجه عبور می دهد و بقیه مراتب را مسدود می کند، استفاده می‌شود.



شکل ۳: چیدمان تجربی میکروسکوپی تابش طرحدار بر پایه SLM.

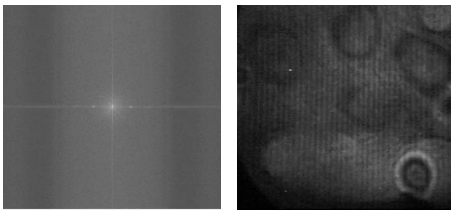
۴- نتایج

نمونه مورد مطالعه، برشی از جسم سلولی نورون‌های مغز یک موش صحرایی هستند که روی لام میکروسکوپ مهیا شدند. جهت بازیابی تصویر حاصل از سیستم میکروسکوپی ذکر شده در بخش قبل، کد رایانه ای در نرم افزار متلب با توجه به رابطه (۵) نوشته شد. لذا با انتخاب ۳ زاویه ۰، ۶۰ و ۱۲۰ درجه برای طرحهای سینوسی و انتخاب ۳ فاز ۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ درجه برای هر یک از این زوایا، در مجموع ۹ تصویر ثبت و الگوریتم بازیابی تصویر روی آنها اعمال شد.

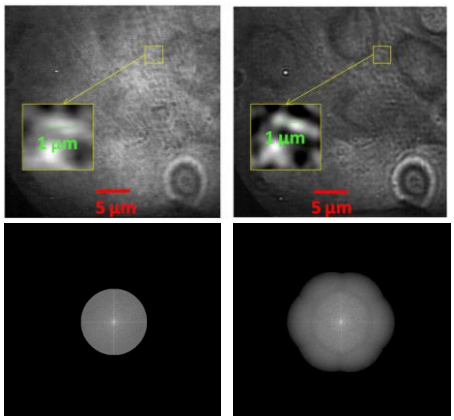
این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-04]

شکل (۴) یکی از این تصاویر و تبدیل فوریه آن در فضای فرکانس را نمایش می‌دهد.

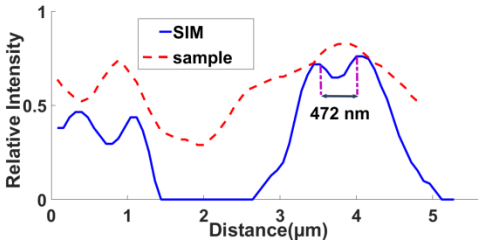


شکل ۴: (راست) تصویر برهم نهی نمونه با نور طرح دار سینوسی با زاویه و فاز ۰ درجه. (چپ) تصویر تبدیل فوریه تصویر سمت راست. نقاط پر رنگ سمت چپ و راست ناحیه مرکزی، مراکز ناحیه های دایروی، در فضای فرکانسی هستند.



شکل ۵:(بالا و چپ) تصویر نمونه حاصل از شاخه میکروسکوپ شکل (۳) بدون اعمال تابش طرحدار. (بالا و راست) تصویر SIM نمونه حاصل از اعمال تابش طرحدار توسط چیدمان شکل (۳). تصاویر نمونه در فضای فوریه در هر حالت، زیر خود تصویر نمایش داده شده‌اند.

شکل (۵) مقایسه‌ای بین تصویر نمونه و تصویر بازیابی‌شده نهایی به روش SIM را نشان می‌دهد. تفکیک‌پذیری به وضوح افزایش یافته است. فرکانس قطع OTF سیستم اپتیکی ۷۱ پیکسل و فرکانس $\vec{F}_\theta$ برابر ۴۴ پیکسل محاسبه شد. پس نسبت مجموع شعاع OTF و شعاع فرکانس $\vec{F}_\theta$ تقسیم بر فرکانس قطع سیستم اپتیکی (OTF)، میزان افزایش تفکیک را نشان می‌دهد که برابر ۱,۶۲ می‌باشد. پروفایل شدتی در امتداد خط سبز رنگ شکل (۵)، در شکل (۶) نمایش داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود افزایش توان تفکیک در استخراج جزئیات نمونه در روش SIM از میکروسکوپی استاندارد بیشتر است.



شکل ۶: پروفایل شدتی در راستای خط سبز در محدوده مستطیل بزرگ شده از شکل (۵). نقطه‌چین قرمز و خط آبی بترتیب مربوط به تصویر حاصل از میکروسکوپ معمولی و میکروسکوپ SIM می‌باشند.

۵- نتیجه گیری

در این مقاله به بررسی میکروسکوپی SIM پرداختیم. با نور طرحدار و تکنیک ماره، آن دسته از اطلاعات فاز نمونه که خارج از ناحیه طیف فرکانسی قطع سیستم اپتیکی است، می‌توانند بازیابی شوند. نتایج نشان می‌دهند به تفکیک پذیری بهتری از حد پراش رسیده‌ایم.

۶- سپاسگزاری

نویسندگان از ستاد علوم شناختی و معاونت علمی ریاست جمهوری، بخاطر حمایت از این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از دکتر لیلا درگاهی به خاطر آماده سازی نمونه برش سلول‌های عصبی و دکتر محمد اسماعیل زیبایی قدردانی می‌گردد.

۷- مراجع

[1] R. Heintzmann, C. Cremer, “Laterally Modulated Excitation Microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating,” vol.3568,pp.۱۸۵-۱۹۶ ,1998.
[2] M. G. L. Gustafsson, “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy,” Journal of Microscopy, 98(2), 82-87. 2000.
[3] H. Zhang, “Super resolution nonlinear structured illumination microscopy by stimulated emission depletion,” Arizona University, 2014.
[4] A. Lal, et.al., “Structured Illumination Microscopy Image Reconstruction Algorithm,” IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 22,(4), 6803414, 2016.
[5] A. Lal, C. Shan, and P. Xi, “Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm,” vol. X, no. X, pp. 1–15, 2016.
[6] F. L. Pedrotti, L. M. Pedrotti, and L. S Pedrotti, *Introduction to Optics*, Third edition, Ch. 12, 2005.
[7] Nikolenko, V., Peterka, D. S., Araya, R., Woodruff, A., & Yuste, R., " Spatial light modulator microscopy," *Cold Spring Harbor Protocols*, *2013*.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-04]