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

طراحی و ساخت میکروسکوپ ورق نوری روبش دیجیتال لیزر جهت تصویربرداری فلوئورسانس از نمونه‌های زیستی

سعید عزیزی[۱]، محمد قندی منفرد[۲]، ندا امین الرعایا[۱]، حسن سرابی[۲]، علیرضا آرندیان[۱]، حمید لطیفی[۱،۲]

[۱]پژوهشکده لیزر و پلاسما – [۲]دانشکده فیزیک، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده- در سالهای اخیر بهره‌گیری و توسعه میکرو سکوپ ورق نوری به عنوان رده جدیدی از فناوری تصویربرداری فلوئور سانس، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران زیست‌شناسی و اپتیک قرار گرفته است. از مزیت‌های ویژه این میکروسکوپ می‌توان به سرعت بالای تصویربرداری، پایین بودن نرخ رنگبری و سمیت نوری و نیز قابلیت تصویربرداری از عمق نمونه‌هایی چون رویان موجودات کوچک اشاره نمود. در این گزارش به طراحی و ساخت یک میکروسکوپ ورق نوری می‌پردازیم که با استفاده از روبش پرتو لیزر، ورق نوری یکنواخت‌تر همراه با قابلیت کنترل بیشتر بر مشخصه‌های آن ایجاد می‌نماید. در این مورد قدرت تفکیک محوری و عرضی ۳۰ و ۱ میکرون در طول موج تحریک ۵۳۲ نانومتر قابل دسترس بود و ارتفاع ورق با استفاده از سیستم روبش لیزر کنترل گردید. در ادامه با تصویربرداری فلوئورسانس از یک نمونه زنده از رویان ماهی زبرا کیفیت عملکرد میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

کلید واژه- تصویربرداری زیستی فلوئورسانس، روبش لیزری، مقطع بندی اپتیکی، میکروسکوپ ورق نوری

Design and Implementation of a Digital Scanning Laser Light-Sheet Microscope for Fluorescence Imaging of Biological Samples

Saeed Azizi[1], Mohammad Ghandi-Monfared[2], Neda Aminoroaya[1], Hassan Sarabi[2], Alireza Arandian[1], Hamid Latifi[1, 2]

[1]Laser & Plasma Research Institute – [2]Faculty of physics, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, latifi@sbu.ac.ir

Abstract- Recently, utilizing and development of light-sheet microscopy, as a new type of fluorescence imaging technique, have been noticed by vast number of researchers in biology and optics. Special advantages of this technique include ability of fast imaging, low rates of photo-bleaching and photo-toxicity and, capability of in-depth imaging of live samples like small embryos. In this work, we designed and implemented a light-sheet microscope. The light sheet was generated using a fast scanning beam of laser from one side of a sample. This mechanism facilitates exact control of the sheet quality and its uniformity. Axial and lateral resolutions of 30µm and 1µm using a laser pump of 532nm were achieved, respectively. The light-sheet height could be controlled using a laser scanner. Then, we used the microscope to test the quality of the imaging system in case of living zebra-fish embryos.

Keywords: Fluorescence bio-imaging, Laser scanning, Light-sheet microscopy, Optical sectioning

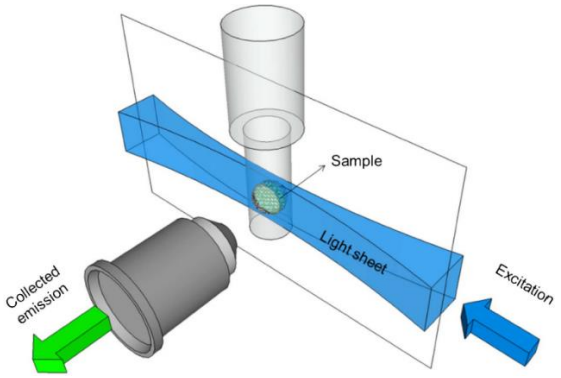
این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-10-12]

۱. مقدمه

اخیرا استفاده از روش میکروسکوپی فلوئورسانس ورق نوری[۱] بدلیل قابلیت تصویربرداری سه بعدی سریع، طولانی مدت و سازگاری بیشتر با نمونه‌های زیستی بشدت مورد توجه قرار گرفته است[۲]. این روش ساختار منحصر به فردی برای تابش و آشکارسازی میکروسکوپ ایجاد می‌کند که می‌توان از آن برای مطالعه انواع نمونه‌های زیستی مانند توده‌های سلولی، بافت‌های شفاف‌سازی شده و رویان انواع موجودات ریز استفاده نمود[۳]. مطابق شکل ۱ برای تحریک فلوئورسانس، نمونه توسط یک باریکه لیزر است که به صورت ورقی نازک در آمده است تابانده شده و تابش فلوئورسانس ساطع شده در مسیری جداگانه و عمود بر ورق نوری جمع آوری می‌شود.

تابش صفحه‌ای یک مقطع بندی نوری ذاتی بوجود می‌آورد که مانع رسیدن تابش اضافه به سایر قسمتهای نمونه شده و از اینرو کنتراست بهتر و نرخ سمیت و رنگ‌بری نوری کمتری را نتیجه داده و این روش را به گزینه مناسبی برای تصویربرداری طولانی مدت تبدیل می‌کند. همچنین، این روش در بزرگنمایی‌های کم به قدرت تفکیک محوری بهتر از سایر روشها (مانند میکروسکوپ هم‌کانون) منجر می‌شود. البته، قدرت تفکیک عرضی همچنان مانند میکروسکوپ فلوئورسانس میدان گسترده باقی می‌ماند.



شکل ۱: ساختار کلی میکروسکوپ ورق نوری[۱]

روشهای گوناگونی برای تولید ورق نازکی از نور وجود دارد. اولین روش از عدسی استوانه‌ای برای تولید آن بهره می‌برد که به ورق نوری تولید شده به این روش، ورق نوری ایستا گفته می‌شود[۴]. البته، این روش علیرغم چیدمان اپتیکی ساده دارای نقاط ضعفی از جمله عدم یکنواختی کامل و قابلیت تنظیم پذیری کم می‌باشد. روش دیگر، استفاده از باریکه کانونی شده‌ای که در یک صفحه حرکت روبشی سریع رفت و برگشتی انجام می‌دهد است. اگر سرعت حرکت روبشی بیشتر از سرعت آشکارسازی سیستم باشد یک ورق نوری پویا خواهیم داشت. ورق نوری تولید شده به صورت پویا دارای یکنواختی بیشتری بوده، ارتفاع آنرا می‌توان بدون تغییر سایر مشخصات ورق نوری به سادگی تنظیم نمود و به راحتی انواع مدولاسیون باریکه را (جهت استفاده‌های گوناگون) بر آن اعمال نمود. این سیستم معمولا میکروسکوپ فلوئورسانس ورق نوری روبش دیجیتال لیزر[۲] (DSLM) نامیده می‌شود[۵].

در این مقاله قصد داریم طراحی خودمان از یک میکروسکوپ ورق نوری روبش دیجیتال لیزر و ساخت آن برای تصویربرداری از نمونه‌های زیستی را گزارش کنیم. در بخش ۲، در مورد طراحی میکروسکوپ بحث خواهد شد که خود به سه زیر بخش در باره تابش، آشکارسازی و جایگذاری نمونه تقسیم شده است. در بخش ۳، نگاهی به جزئیات میکروسکوپ ساخته شده داشته و ادوات و نرم‌افزارهای بکار رفته معرفی خواهند شد. نهایتا، در بخش۴ نتایج تجربی بدست آمده را مشاهده خواهیم کرد.

۲. طراحی میکروسکوپ

برای یک تصویربرداری سه بعدی خوب باید تمامی اجزاء میکروسکوپ ورق نوری در هماهنگی کامل با یکدیگر کار کنند. واحد تابش یک ورق نوری پویا برای تحریک فلوئورسانس نمونه تولید می‌کند. واحد آشکارسازی تصاویر فلوئورسانس را ثبت می‌کند. حرکت دادن نمونه به سمت واحد آشکارسازی و یا در جهت مخالف آن باعث روبش ورق

[۱] Light-Sheet Microscopy

[۲] Digitally Scanned Laser light-sheet Microscope

[Downloaded from opsi.ir on 2024-10-12]

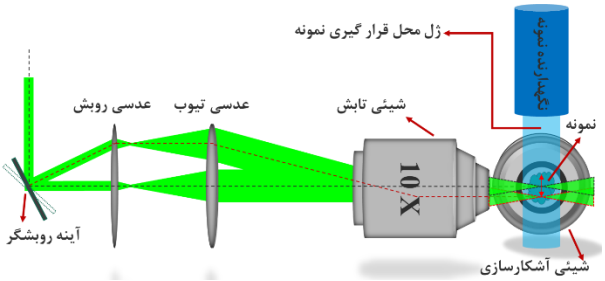
این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

نوری در عمق نمونه می‌شود. در هر گام از جابجایی نمونه به صورت همزمان یک تصویر فلوئورسانس ثبت می‌شود. در انتها این تصاویر توسط رایانه کنار یکدیگر قرار می‌گیرند تا تصویر سه بعدی نمونه حاصل شود.

برای سادگی اجزاء میکروسکوپ مذکور را می‌توان به سه بخش کلی تقسیم نمود:

۱,۲ واحد تابش میکروسکوپ

یک لیزر با طول موج متناسب با طیف تحریک فلوئورسانس و دارای پایداری کافی برای مدت زمان انجام آزمایش مورد نیاز است. معمولا یک فیلتر فضایی برای حذف نویز از باریکه لیزر بکار می‌رود. سپس باریکه توسط یک تلسکوپ کپلری تا جایی که ابعاد آینه روبشگر اجازه دهد منبسط می‌شود. مطابق شکل۲ آینه روبشگر باریکه دریافتی را با سرعت بالا با زاویه‌های گوناگون منحرف می‌کند. سپس یک عدسی روبش تغییر زاویه باریکه لیزر را به جابجایی خطی در راستای عمودی تبدیل می‌کند. نهایتا، ترکیب یک عدسی تیوب و یک شیئی میکروسکوپ باریکه لیزر را بر روی نمونه که در مقابل شیئی آشکارسازی قرار گرفته کانونی می‌کند. ترکیب دو عدسی مذکور را می‌توان به صورت اپتیک نامتناهی میکروسکوپ انتخاب نمود تا نور بین عدسی تیوب و شیئی به صورت دسته پرتوهای موازی منتقل گردد.



شکل ۲: قسمت تابش میکروسکوپ ورق نوری روبش دیجیتال لیزر که ورق نوری را به نمونه قرار گرفته در ژل می‌تاباند

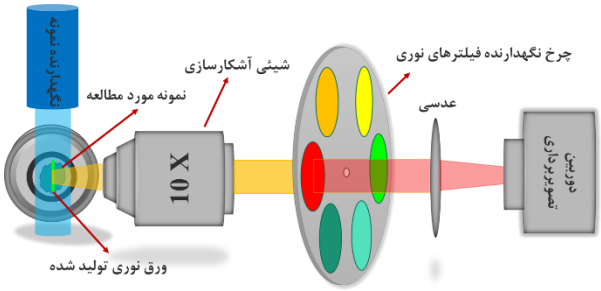
قطر باریکه ورودی به روزنه پشتی شیئی تابش و روزنه عددی آن ضخامت ورق نوری ایجاد شده را تعیین خواهند کرد. طبیعت موجی نور، همواره یک توازن میان طول مؤثر ورق نوری($2Z_R$) و ضخامت آن ($2W_0$) که توسط معادله باریکه گاوسی به صورت زیر بیان می‌شود ایجاد می‌کند[۶]:

$$2Z_R = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda} \qquad (۱)$$

که در آن λ طول موج باریکه لیزر می‌باشد.

۲,۲ واحد آشکارسازی میکروسکوپ

در واحد آشکارسازی مطابق شکل۳ یک شیئی با تصحیح اپتیکی نامتناهی تمامی سیگنالهای واقع در کانون‌اش را جمع می‌کند. یک فیلتر طول موج فلوئورسانس مورد نظر را جدا کرده و یک عدسی تیوب این دسته پرتوهای موازی را بر روی حسّگر تصویر کانونی می‌کند.



شکل ۳: قسمت آشکارسازی میکروسکوپ ورق نوری و قسمت نگهداری نمونه همراه با شیئی آشکارسازی

۳,۲ واحد جایگذاری نمونه

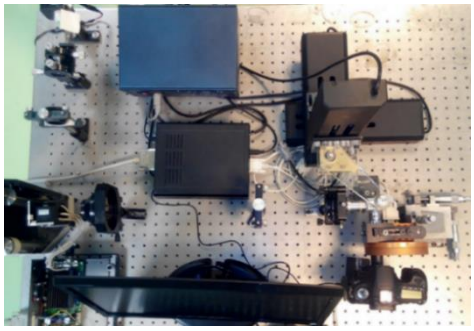
در میکروسکوپ ورق نوری، نمونه معمولا درون یک ژل قرار می‌گیرد که اجازه رشد آزادانه به آنرا داده و همچنین مشابهت بیشتری به شرایط طبیعی رشد برای نمونه‌های زیستی دارد. برای تصویربرداری از عمق‌های مختلف نمونه، باید ورق نوری درون آن حرکت داده شود. اینکار معمولا به صورت عکس با جابجایی اندک لوله نگهدارنده ژل حاوی نمونه توسط یک جابجاگر میکرونی انجام می‌شود.

۳. ساخت میکروسکوپ

میکروسکوپ طراحی شده مطابق شکل۴ ساخته شده است. زاویه و سرعت روبش، جابجاگر میکرونی و دوربین توسط کد نوشته شده در نرم‌افزار LabView کنترل می‌شود. تصاویر بدست آمده پس از پردازش برای ساخت تصویر سه بعدی به نرم‌افزار ImageJ منتقل می‌شوند. شکل۵ کیفیت ورق نوری ایجاد شده درون یک محلول را نشان می‌دهد.

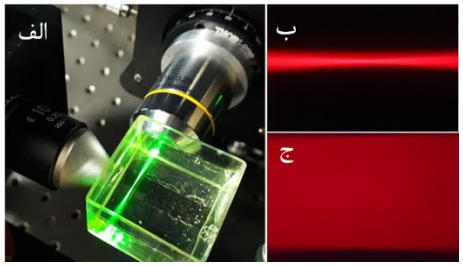
[Downloaded from opsi.ir on 2024-10-12]

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



شکل ۴: چیدمان اپتیکی میکروسکوپ DSLM ساخته شده

ضخامت و ارتفاع ورق نوری به ترتیب ۳۰µm و ۱mm بدست آمده است. قدرت تفکیک محوری مطابق معادله۱ توسط اثر ابعاد کلی نمونه بر ضخامت ورق نوری محدود شده است. قدرت تفکیک عرضی با تصویربرداری از یک نمونه استاندارد مشخص شد کمتر از ۱µm می‌باشد. مقیاس روی تصاویر نیز به کمک این نمونه استاندارد مشخص شده است.



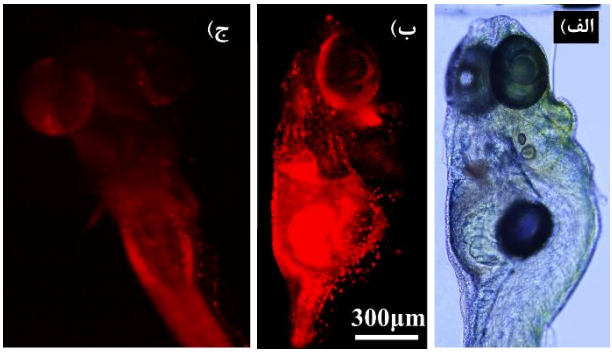
شکل ۵: کیفیت ورق نوری تولید شده. الف) شکل باریکه درون محلول صابون. ب) شکل باریکه درون محلول ردآمین قبل از شروع روبش. ج) شکل ورق نوری تشکیل شده در اثر روبش سریع باریکه

۴. تصویربرداری از نمونه زیستی

نهایتا، کیفیت میکروسکوپ ساخته شده با تصویربرداری از رویان یک ماهی زبرا آزموده شد. رگهای خونی حاوی رنگدانه فلوئورسانس از نوع DsRed می‌باشد. طول موج تحریک ۵۳۲nm بوده و تابش فلوئورسانس در طیف قرمز قرار دارد. شکل۶ نتایج بدست آمده را نشان می‌دهد.

۵. نتیجه گیری

میکروسکوپ ورق نوری به عنوان سیستمی قدرتمند در تصویربرداری زیستی شناخته می‌شود. در این کار یک نمونه از این میکروسکوپ (مبتنی بر روبش دیجیتال لیزر) با موفقیت طراحی و ساخته شده است. قدرت تفکیک محوری و عرض به ترتیب مقادیر ۳۰µm و ۱µm بدست آمده است.



شکل ۶: تصاویر فلوئورسانس بدست آمده از رویان ماهی زبرا. الف) تصویر رویان ماهی زبرا توسط میکروسکوپ عبوری. توجه شود که با اینکه یک چشم ماهی در عقب قرار دارد هنوز مشاهده می‌شود ب) تصویر فلوئورسانس یک صفحه از این رویان. ج) تصویر سه بعدی بدست آمده از یک رویان دیگر با میکروسکوپ ساخته شده.

۶. سپاسگزاری

گروه کاری سپاس فراوان خود را از خانم دکتر پهلوان و آقای دکتر رضایی از پژوهشگاه رویان بابت فراهم نمودن نمونه‌های ماهی زبرا ابراز می‌دارد.

۷. مرجع‌ها

1. Olarte, O.E., et al., *Light-sheet microscopy: a tutorial*. Advances in Optics and Photonics, 2018. **10**(1): p. 111-179.
2. Arandian, A., et al., *Optical Imaging Approaches to Monitor Static and Dynamic Cell-on-Chip Platforms: A Tutorial Review*. Small, 2019: p. 1900737.
3. Chatterjee, K., et al., *Recent progress in light sheet microscopy for biological applications*. Applied spectroscopy, 2018. **72**(8): p. 1137-1169.
4. Huisken, J., et al., *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*. Science, 2004. **305**(5686): p. 1007-1009.
5. Keller, P.J. and E.H. Stelzer, *Quantitative in vivo imaging of entire embryos with digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy*. Current opinion in neurobiology, 2008. **18**(6): p. 624-632.
6. Saleh, B.E. and M.C. Teich, *Fundamentals of photonics*. 2019: John Wiley & Sons.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-10-12]

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