بیست و پنجمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و یازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه شیراز،
شیراز، ایران.
۹-۱۱ بهمن ۱۳۹۷

تعیین اندازه نمونه‌های زیستی سفادکس با استفاده از روش میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتال

حوریسا نجفیان[۱]؛ محمدرضا رشیدیان وزیری[۲]؛ بتول سجاد[۱]؛ امیرمحمد بیگ‌زاده[۳]؛ امیر عباسی[۲*]

[۱] گروه فیزیک ، دانشکده فیزیک شیمی، دانشگاه الزهرا، تهران

[۲] پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ی، پژوهشکده فوتونیک و فن‌آوری‌های کوانتومی، تهران

[۳] پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کاربرد پرتوها، تهران

a.abbasi-ph@hotmail.com[*]

چکیده- در این مطالعه اندازه ذرات زیستی پرکاربرد در پزشکی به نام سفادکس، با استفاده از روش تداخل سنجی میکروسکوپی دیجیتال اندازه گرفته شده است. در ابتدا بزرگنمایی دستگاه تداخل سنج طراحی شده با استفاده از توری‌های پراش استاندارد به دست آمده و سپس اندازه ثبت شده از توری پراش توسط سیستم میکروسکوپی به عنوان مقیاسی برای اندازه‌گیری اندازه‌ی نمونه‌های سفادکس به کار برده شد. از توری‌های پراش استاندارد ۱۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ خط در میلی‌متر برای کالیبره کردن چیدمان تمام-نگاری میکروسکوپی استفاده شد. قطر ذره سفادکس G۲۰۰ با استفاده از این روش حدود ۱۲۳/۸ میکرومتر تعیین شده و نشان داده شد که با اندازه‌گیری به روش لام نئوبار نیز همخوانی دارد.

کلیدواژه- نورشناخت فوریه، تمام نگاری دیجیتال، کاربردهای پزشکی

Electric Field Determining the Size of Sephadex Biological Samples Using Digital holographic Microscopy Technique

Hourisa Najafian[1]; Mohammad Reza Rashidian Vaziri[2]; Batool Sajad[1]; Amir Mohammad Beigzadeh[3]; Amir Abbasi[2*]

[1] Department of Physics, Alzahra University, Tehran, Iran

[2] Photonics and Quantum Technologies Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran

[3] Radiation Application Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran

[*]a.abbasi-ph@hotmail.com

Abstract- In this study, size of a highly used biological substance in medicine called sephadex is measured using the digital microscopic interferometry technique. Initially, magnification of the designed interferometer was determined using standard diffraction gratings and then the recorded size of the diffraction gratings was used as a scale for measuring the size of the sephadex specimens. Standard diffraction gratings with 100, 300 and 600 lines per millimeter were used for calibrating the digital holographic microscopy setup. Diameter of a G200 sephadex particle is estimated about 123.8 micrometers and it is shown that the measurement is consistent with a separate measurement with neobar lam technique.

Keywords: Fourier Optics, Digital Holography, Medical applications

[Downloaded from opsi.ir on 2026-02-01]

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

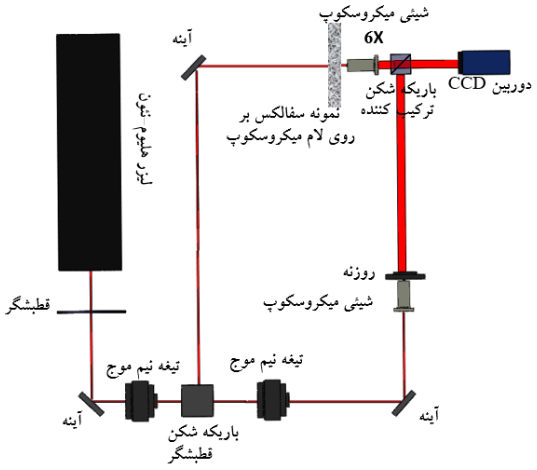
مقدمه

سفادکس نام تجاری برای ژل پلیمری دکستران کراس لینک شده است که برای پالایش ژل‌های پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ژل‌های پلیمری کراس لینک شده، متورم و آب دوست، از نظر ساختاری به عنوان سیستم دو فازی متقابل مایع و جامد مورد توجه هستند [۱]. نمونه‌های سفادکس، در کاربردهای جداسازی کروماتوگرافی استفاده فراوان دارند [۲]. سفادکس برای خالص‌سازی پروتئین، تجزیه و پاکسازی بیوپلیمرها، مبادله بافر و پاک‌سازی نمونه‌های زیستی، به عنوان مثال پپتیدها، پروتئین‌های کوچک و الیگوساکاریدها، حذف مؤثر آلاینده‌ها مانند نمک‌ها، رنگ‌ها و برچسب‌های رادیواکتیو و تجزیه و تحلیل آنتی‌بادی‌های گروه خون نیز کاربرد گسترده دارد [۳]. توزیع اندازه ژل‌های آب دوست به طور معمول به روش کروماتوگرافی اندازه طردی[1] تعیین می‌شود که در آن حجم نفوذی از یک ژل تابعی از اندازه مولکول‌های مورد بررسی است.

تمام‌نگاری دیجیتال روشی برای تصویربرداری از اجزای میکروسکوپی است [۴و۵]. در این کار، اندازه ذرات سفادکس با استفاده از روش تداخل‌سنجی میکروسکوپی اندازه گرفته شده است. در ابتدا بزرگنمایی چیدمان طراحی شده با استفاده از توری‌های پراش استاندارد به دست آمده و در ادامه اندازه ثبت شده از توری پراش توسط چیدمان میکروسکوپی، به عنوان مقیاسی برای اندازه‌گیری اندازه نمونه‌های سفادکس بکار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از چیدمان تداخل‌سنجی میکروسکوپی برای اندازه گیری اندازه نمونه‌های سفادکس استفاده شد. طرح این چیدمان در شکل ۱ نشان داده شده است. در این چیدمان منبع نوری به کار گرفته شده برای ایجاد طرح نوارهای تداخلی، لیزر موج پیوسته هلیوم–نئون با خروجی قطبیده خطی است. طول موج لیزر ۶۳۲/۸ نانومتر و توان آن ۱۰ میلی‌وات بوده است. چیدمان تداخل‌سنج از نوع ماخ- زندر است که نوعی تداخل‌سنج تقسیم دامنه‌ای محسوب می‌شود.



شکل ۱: طرحی از چیدمان تداخل‌سنجی میکروسکوپی مورد استفاده.

از ویژگی‌های چیدمان تداخل‌سنج ماخ- زندر می‌توان به قابلیت آن در جایگزیدگی طرح نوارهای تداخلی در مکان دلخواه با تنظیم مناسب آینه‌ها اشاره کرد. اندازه ذرات نمونه‌های سفادکس G10 و G200 نشانده شده بر روی لام میکروسکوپ با استفاده از چیدمان اندازه‌گیری شدند [۶]. قطر نمونه‌های دایره‌ای شکل سفادکس اغلب در بازه ۵۰ تا ۱۵۰ میکرومتر است. این مسئله به میزان آب‌دوستی و جذب آب توسط دانه‌های سفادکس بستگی دارد. برای نمونه‌ای مانند G10 جذب آب کم‌تر بوده و برای نمونه G200 جذب آب بیش‌تر است. دلیل تفاوت در نام‌گذاری سفادکس‌ها هم به همین علت است. به این معنی که به عنوان مثال نمونه G10 سطح آب‌دوستی کم‌تری نسبت به نمونه G200 دارد. به طور معمول برای اندازه‌گیری اندازه انواع مولکول‌ها و سلول‌ها از میکروسکوپ نوری استفاده می‌شود. از روش‌های فلوسایتومتری و لام نئو بار نیز برای شمارش و برآورد تقریبی ابعاد مورد استفاده قرار می‌گیرد. قبل از تعیین اندازه نمونه‌های سفادکس، ابتدا سیستم میکروسکوپی با استفاده از نمونه‌های استاندارد توری پراش کالیبره

[1] size exclusion chromatography

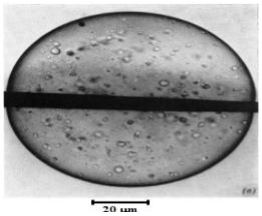
این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2026-02-01]

شد. برای این هدف از توری‌های پراش ۱۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ خط بر میلی‌متر استفاده شد، که به ترتیب فاصله بین خطوط در آنها برابر با ۱۰ و ۳/۳۳ و ۱/۶۶ میکرومتر است. روش مورد استفاده در این مطالعه مشابه با روش لام نئو بار است [۷]. در این روش، لام نئو بار خط‌کشی شده را به عنوان معیار اندازه‌گیری در زیر میکروسکوپ قرار داده و سپس نمونه مورد نظر روی آن قرار می‌گیرد. با شمارش تعداد خطوطی که بر روی نمونه واقع شده است، برآوردی از ابعاد سلول یا سایر اجزای میکروسکوپی به دست خواهد آمد.

نتایج

در شکل ۲ اندازه‌گیری قطر نمونه سفادکس G200 به روش لام نئوبار با مقیاس ۲۰ میکرومتر نشان داده شده است. با توجه به این مقیاس می‌توان برآوردی تقریبی از قطر ذره در حدود ۱۰۰ میکرومتر داشت.



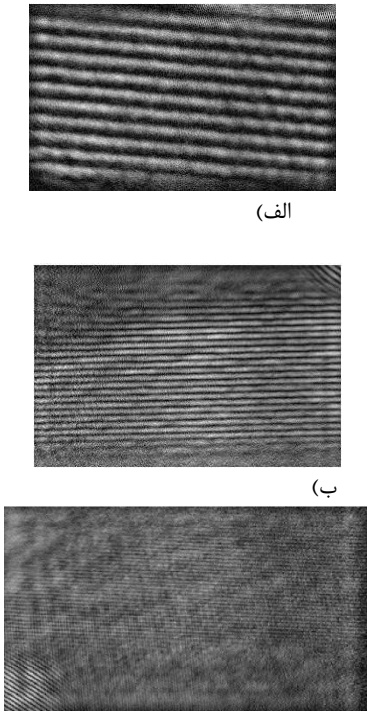
شکل ۲: اندازه‌گیری قطر نمونه سفادکس G200 به روش لام نئوبار.

پس از روشن کردن لیزر، ایجاد باریکه‌های شیئی و مرجع و تشکیل طرح تداخلی، تمام‌نگار ناشی از توری‌ها ثبت شدند. عملیات بازسازی تصویر به صورت دیجیتالی توسط رایانه انجام شد. شکل ۳ تصاویر بازسازی شده سه توری را در کنار هم نشان می‌دهد. همانگونه که می‌توان مشاهده کرد تفاوت بین تعداد خطوط توری‌ها مشخص و واضح است.

پس از تعیین دقیق فاصله بین خطوط توری به روش میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتال، این توری‌ها به عنوان خط‌کش برای اندازه‌گیری قطر ذرات کروی سفادکس استفاده شدند. از رابطه ۱ برای به دست آوردن فاصله بین خطوط توری استفاده شد:

$$d = w / N \qquad (۱)$$

که در آن d فاصله بین دو خط توری، w پهنای توزیع خطوط و N نشان دهنده تعداد خطوط توزیع شده در آن پهنا است. پس از بازسازی تصاویر توری‌های مختلف، با بررسی آن‌ها فاصله بین خطوط بدست آمد. به این منظور، بعد از نمایش تصویر توری در نرم افزار متلب، در امتداد خطی عمود بر خطوط توری نمودار تغییرات شدت رسم شد. در ادامه با اعمال صافی میانه نوفه‌های موجود در نمودار تغییرات شدت حذف شد. نمودار شدت به دست آمده برای توری ۳۰۰ خط در شکل ۴ نشان داده شده است که در این نمودار فاصله بین دو قله و یا دو دره متوالی نشاندهنده فاصله بین دو خط مجاور توری است.



الف)

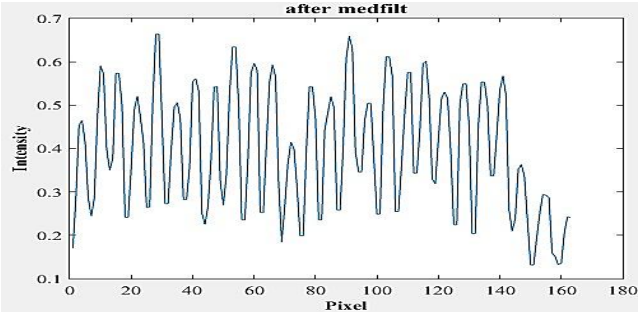
ب)

ج)

شکل ۳: نمایش تصویر سه توری مورد بررسی به دست آمده به روش میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتال. الف) توری ۱۰۰، ب) توری ۳۰۰ و ج) توری ۶۰۰ خط در میلی‌متر.

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

[Downloaded from opsi.ir on 2026-02-01]



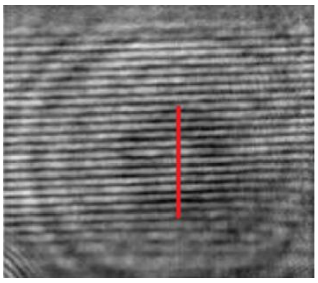
شکل ۴: نمودار رسم شده برای تعیین فاصله بین خطوط توری ۳۰۰ خط در میلی‌متر پس از اعمال صافی میانه.

مقادیر اندازه‌گیری شده خطوط توری در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به این جدول، روش تصویربرداری تمام‌نگاری دیجیتال برآورد خوبی از فاصله بین خطوط توری برجای می‌گذارد.

جدول ۱ : فاصله بین خطوط توری‌های مختلف، اندازه‌گیری شده به روش میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتال. فاصله بین خطوط برای توری ۶۰۰ خط بدلیل کیفیت پائین تصویر ثبت شده (شکل ۳-ج) ارائه نشده است.

نوع توری (خط بر میلی‌متر)	فاصله بین خطوط (میکرومتر)	فاصله محاسبه شده بین خطوط (میکرومتر)
۱۰۰	۱۰	۱۰/۳۲±۰/۱۳
۳۰۰	۳/۳۳	۳/۵۳±۰/۳۲
۶۰۰	۱/۶۶	-

برای اندازه‌گیری قطر همین ذره با استفاده از چیدمان میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتال، نمونه سفادکس بر روی توری پراش قرار گرفته و سپس مجموعه دو نمونه با هم در محل مخصوص نمونه در چیدمان قرار گرفته است. شکل ۵ تصویر ذره دایره‌ای سفادکس G200 را به همراه توری که پشت آن قرار گرفته است، به دقت نشان می‌دهد.



شکل ۵: تصویر بازسازی شده سفادکس G200 که در پشت آن از توری پراش ۱۰۰ خط در میلیمتر به عنوان معیار اندازه‌گیری استفاده شده است.

تعداد خطوط توری واقع شده روی ذره سفادکس، در امتداد خط عمودی نشان داده شده در تصویر شمارش شده است. تعداد خطوط برابر با ۱۳ خط است. با استفاده از جدول ۱ که در آن فاصله بین خطوط توری ۱۰۰ خط اندازه‌گیری شده است، می‌توان قطر ذره را مطابق با رابطه زیر محاسبه کرد:

(۲) قطر ذره = (۱۳-۱) × ۱۰/۳۲ =۱۲۳/۸۴ میکرومتر

نتیجه اندازه‌گیری تطابق خوبی با برآورد اندازه‌ای که می‌توان از روش لام نئوبار در شکل ۲ داشت دارد.

نتیجه‌گیری

در این مقاله قطر نمونه‌های ماده زیستی سفادکس با استفاده از روش میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتال اندازه-گیری شد. توری پراش به عنوان معیار اندازه‌گیری برای تعیین قطر مولکولی نمونه‌های زیستی سفادکس به کار برده شده است. نتایج به دست آمده از روش میکروسکوپی تمام نگاری دیجیتال با نتایج حاصل از روش لام نئوبار مطابقت خوبی نشان داد. نتایج به دست آمده نشاندهنده این مسئله است که پیکربندی میکروسکوپی تمام‌نگاری-دیجیتال پیاده‌سازی شده در آزمایشگاه به‌درستی طراحی و تنظیم شده است و قطر نمونه‌های زیستی را می‌توان با استفاده از این روش اندازه‌گیری کرد.

مرجع‌ها

[1] M. Sernetz; *Macromolecules 1992: Invited Lectures of the 34th IUPAC International Symposium on Macromolecules. VSP*, 1993
[2] B. MURPHY and E. PEARSON; *Nature New Biology* 232.27, (1971) 21.
[3] Ogston, A. G., and J. D. Wells; *Biochemical Journal* 119.1, (1970) 67-73.
[4]Smith, F. H; *Modern Methods of Microscopy*. Butterworth Scientific Publications London, 1955. 76.
[5] Kim, Myung K. "Digital holographic microscopy." *Digital Holographic Microscopy*. Springer, New York, NY, 2011. 149-190.
[6] L. Ståhle; S. Segersvärd, and U. Ungerstedt; *Journal of pharmacological methods* 25.1, (1991) 41-52.
[7] P. Wilde; J. David; C. Clark, and Didier Marion; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, (1993) 1570-1576.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.
[Downloaded from opsi.ir on 2026-02-01]