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

ارتقاء توان تفکیک میکروسکوپی فلورسانی لایه نوری با استفاده از میکروکره

حسین کافیان[۱]، وحید عباسیان[۱و۲]، شیوا اکبری بیرگانی[۳]، علی‌رضا مرادی[۱و۲]و داریوش عبداله‌پور[۱و*]

[۱]دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان
[۲] مدرسه علوم نانو، پژوهشگاه دانشهای بنیادی، تهران
[۳]دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان
*email: dabdollahpour@iasbs.ac.ir

چکیده - میکروسکوپ فلورسانی لایه نوری روشی کارآمد برای تصویربرداری سه‌بعدی از نمونه‌های زیستی، با کمترین آسیب‌نوری به نمونه و سرعت تصویربرداری بالاست. با این وجود، دستیابی به توان تفکیک عرضی بالا در مطالعات تک سلولی به کمک این شیوه موضوعی چالش برانگیز است. در این مقاله، نشان داده می‌شود که با بکارگیری یک میکروکره شفاف با قطر ۲۵۰ µm در مسیر آشکارساز، ضریب بزرگ‌نمایی به میزان ۳٫۲ برابر زیاد شده و توان تفکیک عرضی بهبود می‌یابد. کارایی این چیدمان با تصویربرداری از سلول‌های سرطان پستان (MCF7) نشان داده شده و تصاویر با حالت بدون میکروکره مقایسه شده‌اند. رهیافت ارائه شده روش جایگزینی کم هزینه و ساده به جای استفاده از شیئی‌های با گشودگی عددی بالا در میکروسکوپی فلورسانی لایه نوری است.

کلید واژه- ابرتفکیک، سه‌بعدی، میکروسکوپ لایه نوری فلورسانی، میکروسکوپی تقویت شده با میکرو کره

Resolution enhancement of light-sheet fluorescence **microscopy using a microsphere**

Hosein Kafian[1], Vahid Abbasian[1,2], Shiva Akbari Birgani[3], Ali-Reza Moradi[1,2], and Daryoush Abdollahpour[1,*]

[1]Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan
[2]School of Nano Science, Institute for Research in Fundamental Sciences (IPM), Tehran
[3]Department of Biology, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan
*Email: dabdollahpour@iasbs.ac.ir

Abstract- Light-sheet fluorescence microscopy (LSFM) is a powerful method 3D imaging of biological samples with the minimal photodamage, and high imaging speeds. However, achieving high lateral resolution for single cell imaging applications is a challenging issue for the method. Here, we demonstrate that using a transparent microsphere (250 µm diameter) in the imaging system, leads to 3.2x increase of the magnification, and an enhanced resolution. The capability of the approach is verified single-cell imaging of breast cancer cell line MCF7, and the results are compared with conventional LSFM images without the microsphere. Our proposed arrangement can be considered as an inexpensive and simple alternative for using high-NA objectives in LSFM.

Keywords: 3D, Light-Sheet Fluorescence Microscopy, microsphere-assisted microscopy, Super-Resolutio

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

[Downloaded from opsi.ir on 2026-02-05]

مقدمه

تصویربرداری سه‌بعدی از نمونه‌های زیستی درشت-مقیاس با توان تفکیک بالا همواره از دغدغه‌های اصلی زیست پژوهان است. شیوه‌های رایج و نوین به منظور تصویربرداری سه‌بعدی شامل میکروسکوپ هم‌کانون و میکروسکوپی فلورسانی چند فوتونی است. با این وجود این شیوه‌ها، به دلیل سرعت تصویربرداری کم (روبش نقطه به نقطه نمونه) و نوردهی اضافی نمونه که موجب آسیب نوری و یا سفیدشدگی خواهد شد، امکان تصویربرداری در لحظه یا طولانی مدت از نمونه را ندارند. از سوی دیگر، میکروسکوپ-های لایه‌ی نوری توانایی منحصر به‌فردی در تصویربرداری سه‌بعدی غیرمخرب و طولانی مدت از نمونه‌های درشت مقیاس دارند. در این شیوه تنها لایه‌ایی مشخص از نمونه نوردهی و به وسیله بازوی آشکارساز که عمود بر مسیر نوردهی است، تصویربرداری می‌شود [۱]. علاوه بر این، مجزا بودن سیستم‌های نوردهی و تصویربرداری در این روش، امکان تصویربرداری نمونه‌های درشت را نیز فراهم می‌کند. تصاویر سه‌بعدی از جابه‌جا کردن نمونه در راستای آشکارساز و کنار هم قرار دادن تصاویر لایه‌های ثبت شده در هر مرحله از روبش نمونه حاصل می‌شود.

با این حال، تصویربرداری تک سلولی از نمونه‌های زیستی مستلزم استفاده از شیئی‌هایی با گشودگی عددی بالا است که کار با آنها دشوار بوده و نوعاً چیدمان را پیچیده‌تر می‌کند. برای بهبود توان تفکیک میکروسکوپ لایه نوری فلورسانی روش‌هایی نیز ارائه شده‌اند که از این جمله می‌توان به ترکیب این شیوه با سایر روش‌های ابرتفکیک هم‌چون تخلیه تابشی القایی و نوردهی ساختار یافته اشاره کرد [۲ و ۳]. این روش‌ها علاوه بر بکارگیری شیئی‌های با گشودگی عددی بالا چیدمانی پیچیده داشته و پر هزینه هستند. از سوی دیگر در چند سال اخیر استفاده از میکروکره شفاف به منظور تصویربرداری ابرتفکیک به دلیل سهولت روش و ارتقاء توان تفکیک سیستم‌های میکروسکوپی نوری، بسیار مورد توجه است. در این روش، با قرار دادن میکروکره در فاصله کاری یک شیئی میکروسکوپ، گشودگی عددی موثر سیستم (حتی در شیئی‌های با گشودگی عددی پایین) افزایش یافته و به تصویرگیری ابرتفکیک می‌انجامد [۴]. در سال‌های اخیر نتایجی رضایت‌بخش از استفاده از این روش برای افزایش توان تفکیک در سیستم‌های میروسکوپ نوری گزارش شده است که از این جمله می‌توان به ترکیب این ایده با میکروسکوپ‌های نوری هم‌کانون، میدان تاریک، تمام‌نگاری دیجیتالی، و طیف‌سنجی رامان اشاره کرد.

در این مقاله نشان می‌دهیم که استفاده از میکروکره روشی کم‌هزینه و ساده برای افزایش توان تفکیک چیدمان میکروسکوپ صفحه نوری فلورسانی است.

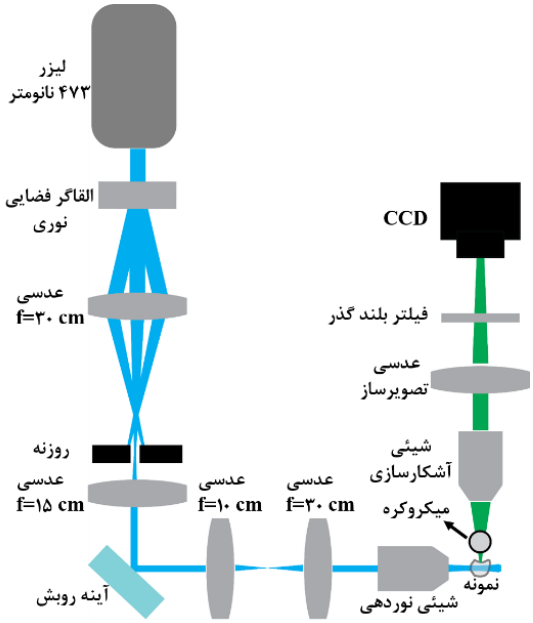
چیدمان آزمایشگاهی

شکل۱ چیدمان آزمایش را نمایش می‌دهد. در این چیدمان از باریکه ایری برای نوردهی استفاده می‌شود. جزئیات چیدمان در مرجع [۵] گزارش شده است. باریکه لیزر با طول موج ۴۷۳ نانومتر پس از عبور القاگر فضایی نوری از سیستم $4f$ متشکل از عدسی‌های با فاصله کانونی ۳۰ و ۱۵سانتی‌متر بر روی آینه روبش هدایت و صفحه نوری با نوسانات آینه تشکیل می‌شود. لکه لیزر بر روی آینه روبش به وسیله سیستم $4f$ متشکل از عدسی‌های با فاصله کانونی ۱۰ و ۳۰

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

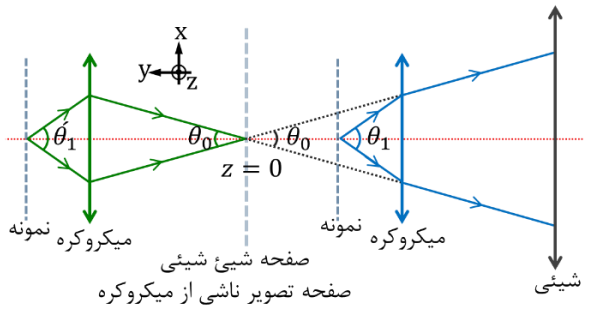
[Downloaded from opsi.ir on 2026-02-05]

سانتی‌متر بر روی صفحه کانونی پشتی شیئی نوردهی (10×, NA=0.3) تصویر می‌شود.



شکل ۱: طرح کلی چیدمان آزمایش.

تصویر صفحه نوردهی شده به وسیله میکروسکوپ فلورسانی افقی چیده شده ثبت می‌شود. این میکروسکوپ متشکل از شیئی آشکارساز (20×, LWD, NA=0.42)، عدسی تصویرساز (TTL200, Thorlabs)، فیلتر بلندگذر (FEL0500, Thorlabs) و دوربین CCD است. میکروکره (از جنس سیلیکا) با قطر ۲۵۰μm در فاصله بین نمونه و شیئی آشکارساز قرار داده می‌شود. به‌منظور امکان نوردهی صفحات از عمق‌های مختلف، نمونه بر روی جابه‌جاگر موتوری نانومتری قرار می‌گیرد. در شکل ۲، نمایش هندسی چگونگی ثبت تصویر و نیز تشکیل تصویر در دو حالت مجازی (پرتو آبی رنگ) و حقیقی (پرتو سبز رنگ) آورده شده است. ابتدا نمونه در محل z=0 (صفحه شی شیئی آشکارساز) قرار داده می‌شود. قبل از افزودن میکروکره، تفکیک پذیری سیستم را گشودگی عددی شیئی آشکارساز که با θ_0 متناسب است تعیین می‌کند. با قراردادن میکروکره اندکی قبل یا بعد از فاصله کانونی آن، به ترتیب دو تصویر مجازی و حقیقی در محل صفحه شی شیئی تشکیل می‌شود. همان‌طور که در شکل۲ نمایش داده شده است، درحضور میکروکره، زاویه مخروط نوری به θ_1 افزایش می‌یابد [۴].



شکل ۲: نمایش هندسی تشکیل تصویر در اثر میکروکره برای دو حالت مجازی (پرتو آبی رنگ) و حقیقی (پرتو سبز رنگ) با میکروکره.

نتایج تجربی

به منظور بررسی کارایی چیدمان از آن برای تصویربرداری از سلول‌های سرطان پستان (MCF7) استفاده شد.

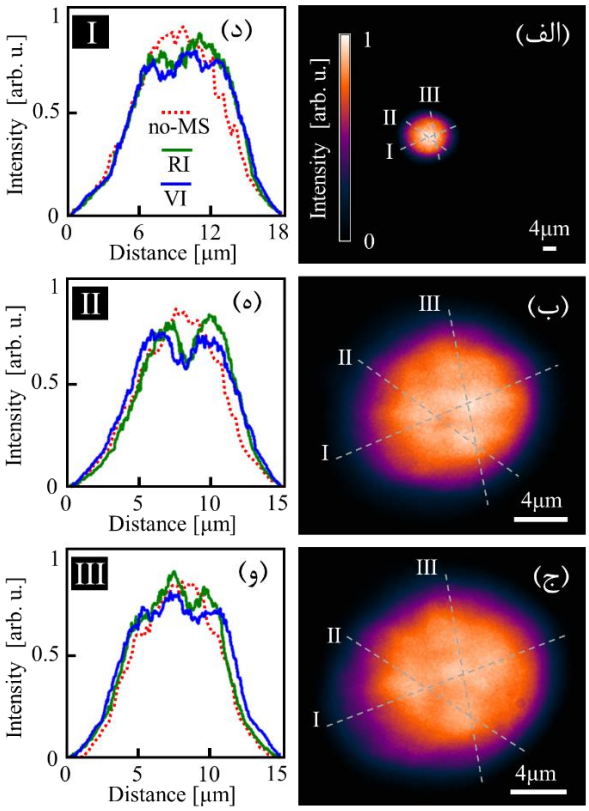
تصاویر این سلول‌ها در حضور و در غیاب میکروکره در شکل۳ نمایش داده شده اند. شکل۳(الف) تصویر سلول را پیش از قراردادن میکروکره نمایش می‌دهد. در شکل‌های ۳(ب و ج) تصویر حقیقی و مجازی در حضور میکروکره نشان داده شده است. تصاویر حقیقی و مجازی ناشی از میکروکره به‌ترتیب دارای بزرگ‌نمایی ۲٫۸ و ۳٫۲ برابر بیش‌تر نسبت به حالت بدون میکروکره هستند. هم‌چنین تصاویر تشکیل شده به وسیله میکروکره به وضوح دارای توان تفکیک بالاتری هستند. شکل۳ (د-و) توزیع شدت بر روی سه برش خطی دلخواه را نشان می‌دهد. تصاویر نشان می‌دهد، ساختارهایی که در حالت بدون میکروکره پنهان هستند در هر دو تصویر حقیقی و مجازی آشکار می‌شوند.

به منظور ثبت تصاویر از عمق‌های مختلف، نمونه بر روی جابه‌جاگر موتوری قرار گرفت و در راستای محور آشکارساز

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

[Downloaded from opsi.ir on 2026-02-05]

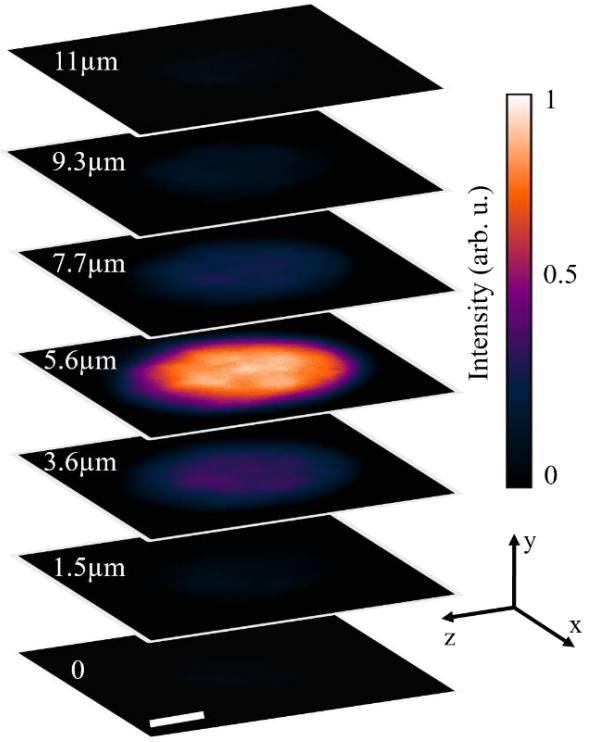
جابه‌جا شد. شکل۴ قابلیت لایه‌بندی (ثبت تصاویر از عمق-های مختلف) چیدمان میکروسکوپ صفحه‌نوری با استفاده از میکروکره را نمایش می‌دهد.



شکل ۳: تصاویر دوبعدی ثبت شده از تک سلول MCF7؛ الف) قبل از افزودن میکروکره، ب) با میکروکره در حالت حقیقی، ج) با میکروکره در حالت مجازی، د-و) نمایه‌های تک بعدی در طول خط برش‌های دلخواه I، II و III

نتیجه‌گیری

دراین مقاله افزایش بزرگ‌نمایی و توان تفکیک میکروسکوپ صفحه نوری فلورسانی با قراردادن میکروکره بین نمونه و شیئی آشکارساز گزارش شد. از این چیدمان برای ثبت تصاویر از سلول‌های سرطان پستان استفاده شد و قابلیت لایه‌بندی سه‌بعدی چیدمان با ثبت تصاویر دوبعدی از عمق-های مختلف نشان داده شد. نتایج نشان دهنده افزایش توان توان تفکیک و بزرگ‌نمایی(تا ۳٫۲ برابر) با استفاده از این شیوه است. این رهیافت، جایگزینی کم هزینه برای استفاده از شیئی‌های آشکارساز با گشودگی عددی بالا است.



شکل۴: نمایش تصویر سه‌بعدی ثبت شده از تک سلول MCF7 به‌صورت برشی در چند عمق مختلف. خط مقیاس:۴ μm.

مرجع‌ها

[1] Jan Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst HK Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. Science, 305(5686):1007-1009, 2004.

[2] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. Journal of Microscopy, 198(2):82-87, 2000.

[3] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission depletion fluorescence microscopy. Optics Letters, 19(11):780-782, June 1994.

[4] V. Abbasian, S. Rasouli and A. R. Moradi. Microsphere-assisted self-referencing digital holography in transmission mode. Journal of Optics, Vol. 21, No. 4, pp. 045301, 2019.

[5] Hosein Kafian, Milad Laleh Nezhad, Sahar Moradi Mehr, Shiva Akbari-Birgani, and Daryoush Abdollahpour, Light-Sheet Fluorescence Microscopy with Scanning Non-diffracting Beams, bioRxiv, 10.1101/837328, 2019.

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

[Downloaded from opsi.ir on 2026-02-05]