rchive of SID

مقالات

میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون

نویسنده

پروین هادیان[۱]

*parvinhadian@gmail.com

واژه‌های کلیدی

کانفوکال، میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون، فلورسانس، فلوروفور.

چکیده

میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون[۲] یک روش میکروسکوپی نوری است که برای تصویربرداری از نمونه‌های دارای نشانگرهای فلورسنت با ساختار سه بعدی قابل توجه است. میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون به ابزاری ارزشمند برای طیف گسترده‌ای از تحقیقات در علوم زیستی و پزشکی برای تصویربرداری از مقاطع نوری نازک در نمونه‌های زنده و ثابت با ضخامت تا ۱۰۰ میکرومتر تبدیل شده‌است. ابزارهای مدرن، مجهز به ۳ تا ۵ سیستم لیزری هستند که با استفاده از فیلترهای قابل تنظیم با سرعت بالا کنترل می‌شوند و امکان تنظیم بسیار دقیق طول موج و شدت تحریک بالا را فراهم می‌کنند. این میکروسکوپ‌ها قادر به بررسی گسیل فلورسانس در محدوده ۴۰۰ تا ۷۵۰ نانومتر هستند. ابزار مجهز به سیستم‌های آشکارسازی، طیف‌های فلورسانس فلوروفورها را از طیف‌های همپوشانی جدا کرده و همچنین توانایی اصلاح فلورسانس خودبخودی را نیز دارند. پیشرفت‌های اخیر در طراحی فلوروفورها، از جمله پروتئین‌های فلورسنت و نقاط کوانتومی،که سطح بالایی از پایداری نور و اختصاصی بودن را نشان می‌دهند، منجر به بهبود عملکرد پروب‌های مولکولی مصنوعی و طبیعی و در نتیجه افزایش کارایی میکروسکوپ شده‌است.

مقدمه

میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون (یا به اختصار میکروسکوپ هم‌کانون) به دلیل ویژگی‌های منبع نور، آینه‌ها و عدسی‌ها، حالت‌های کنتراستی را ایجاد می‌کند که با میکروسکوپ نوری سنتی به آسانی در دسترس نیستند، لذا به ابزاری ضروری در زیست‌شناسی، زیست پزشکی و همچنین در علم مواد تبدیل شده‌است. توانایی استفاده از فلوروفورهای طبیعی و سنتزی باعث شناسایی سلول‌ها و اجزای داخل سلولی به‌طور اختصاصی می‌شود. در حقیقت میکروسکوپ هم‌کانون قادر به تشخیص حضور تک مولکول‌ها است. این میکروسکوپ با استفاده از نمونه‌های نشان‌دارشده با چندین فلوروفور، می‌تواند به‌طور هم‌زمان چندین مولکول هدف را هم در نمونه‌های ثابت و هم در سلول‌ها و بافت‌های زنده شناسایی کند [۱].

مفهوم اصلی میکروسکوپ هم‌کانون در ابتدا توسط ماروین مینسکی[۳] در اواسط دهه ۱۹۵۰ (ثبت اختراع در

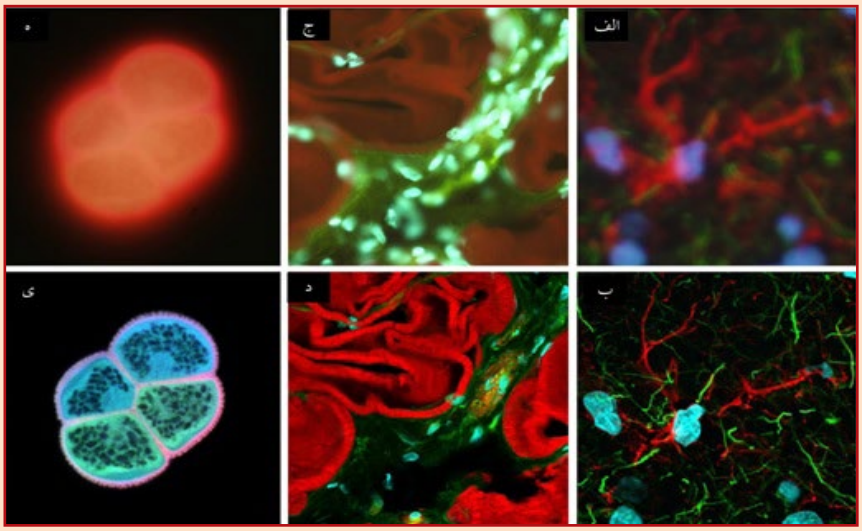
www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سال ۱۹۶۱) مطرح شد، زمانی که او دانشجوی فوق دکترا در دانشگاه هاروارد بود. او در تلاش بود تصویری از شبکه عصبی بافت مغز بدون رنگ‌آمیزی آن تهیه کند تا رویدادهای زیستی سیستم‌های زنده را مشاهده کند [۲]. تا مدت زمان زیادی، به دلیل عدم وجود یک منبع نور با شدت بالا و یک رایانه قدرتمند برای جمع‌آوری اطلاعات، به اختراع مینسکی توجهی نشد. به دنبال کار مینسکی، دیوید ایگر[۴] و مجمیر پتران[۵]، در اواخر دهه ۱۹۶۰ میکروسکوپ هم‌کانون چندپرتویی را که شامل یک دیسک چرخان برای بررسی بخش‌های بدون رنگ مغز و سلول‌های غدد عصبی بود، ساختند [۳]. طی فراز و نشیب‌های بسیار، اولین میکروسکوپ هم‌کانون تجاری در سال ۱۹۸۷ ساخته شد. در طول دهه ۱۹۹۰ پیشرفت‌ها در اپتیک و الکترونیک، لیزرهای پایدارتر و قدرتمندتر، فیبر نوری با توان عملیاتی بالا، پوشش‌های دی الکتریک لایه نازک بهتر و آشکارسازهایی با ویژگی‌های نویز کاهش‌یافته فراهم شد. علاوه‌بر این، فلوروفورهایی که با دقت بیشتری با خطوط تحریک لیزری مطابقت داشتند، سنتز شدند.

میکروسکوپ هم‌کانون مزیت‌های فراوانی نسبت به میکروسکوپ نوری میدان گسترده معمولی دارد که از جمله آن می‌توان به توانایی کنترل عمق میدان، حذف یا کاهش اطلاعات پس‌زمینه دور از سطح کانونی (که منجر به تخریب تصویر می‌شود) و توانایی جمع‌آوری اطلاعات از لایه‌های مختلف نمونه‌های ضخیم اشاره کرد. کلید اصلی موفقیت میکروسکوپ هم‌کانون، استفاده از روش‌های فیلتر فضایی برای حذف نور یا تابش نور خارج از تمرکز[۶] در نمونه‌هایی است که ضخامت آنها از سطح تمرکز بیشتر است. شکل (۱)، مجموعه‌ای از تصاویر میکروسکوپ فلورسانس میدان گسترده و میکروسکوپ هم‌کانون به‌منظور مقایسه میدان دید دو روش است.



شکل (۱): مقایسه تصاویر میکروسکوپ میدان گسترده (ردیف بالا) و میکروسکوپ هم‌کانون (ردیف پایین). مقدار سیگنال در تصاویر میدان گسترده از ساختارهای فلورسنت واقع در خارج از صفحه کانونی قابل توجه است. (الف) و (ب): بخش ضخیم هیپوکامپ مغز موش با آنتی‌بادی‌های اولیه. (ج) و (د): بافت ضخیم عضله موش.(ه) و (ی): فلورسانس خودبخودی چهارتایی دانه گرده آفتابگردان [۱].

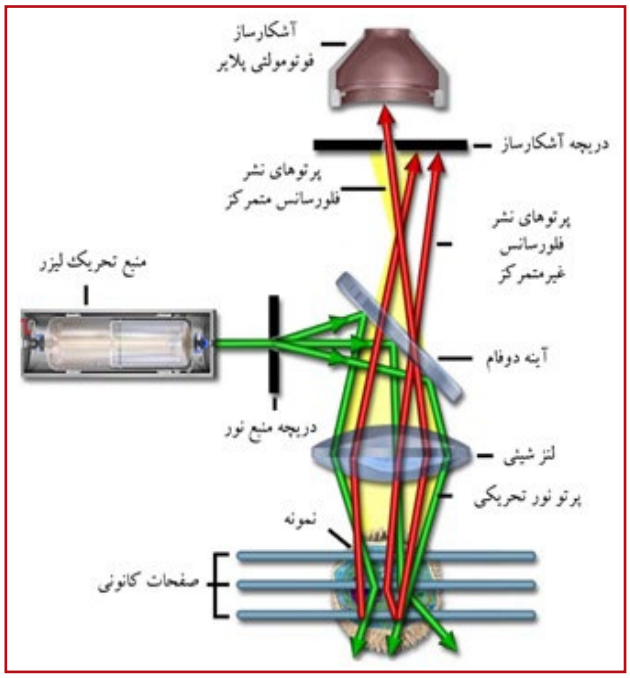
در یک میکروسکوپ فلورسانس میدان گسترده، فلورسانس ثانویه‌ای که از نمونه ساطع می‌شود، بیشتر از طریق یک حجم برانگیخته اتفاق می‌افتد و وضوح ساختارهایی را که در صفحه کانونی هدف قرار دارند، پنهان می‌کند. این مشکل با نمونه‌های ضخیم‌تر (بیشتر از ۲ میکرومتر) تشدید نیز می‌شود، به طوری که چنان درجه بالایی از انتشار فلورسانس را نشان می‌دهند که بیشتر جزئیات دقیق از بین می‌رود. میکروسکوپ هم‌کانون، وضوح نوری محور (Z) (محور موازی با محور نوری میکروسکوپ) را همراه با وضوح جانبی محورهای (x) و (y) ارائه می‌دهد و می‌تواند فلورسانس ثانویه را حذف کند. با این حال گرچه وضوح میکروسکوپ هم‌کانون نسبت به میکروسکوپ‌های میدان گسترده مرسوم افزایش یافته است اما قطعا وضوح کمتری نسبت به میکروسکوپ الکترونی عبوری دارد. لذا میکروسکوپ هم‌کانون را می‌توان پلی بین این دو روش کلاسیک در نظر گرفت. شایان ذکر است در این مقایسه باید نوع کاربرد روش مورد نظر نیز مورد توجه قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

اصول کاری میکروسکوپ هم‌کانون

اصول کارکرد میکروسکوپ هم‌کانون در شکل (۲) ارائه شده‌است. نور منسجم ساطع شده توسط سیستم لیزر (منبع تحریک) از یک روزنه عبور کرده و پس از روبش نمونه، از روزنه دوم که در مقابل آشکارساز قرار دارد خارج شده و آشکارسازی می‌شود.

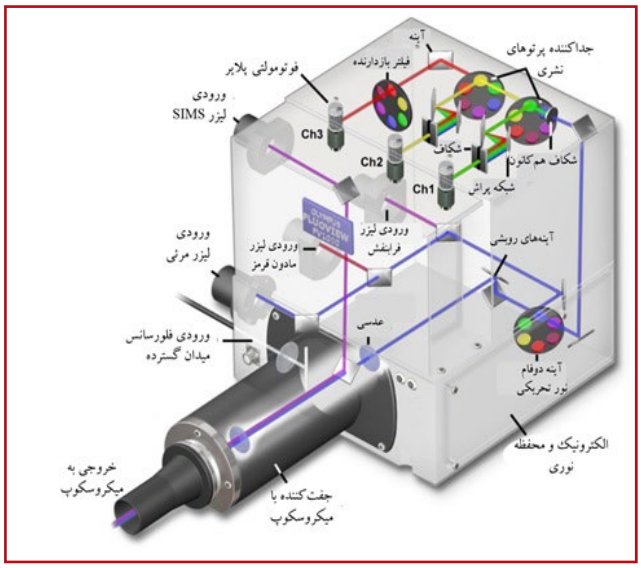


شکل (۲): نمای مسیر نوری و اجزای اصلی در میکروسکوپ هم‌کانون [۱].

همان‌طور که نور لیزر با استفاده از یک آینه دوفام[۷] منعکس می‌شود، سراسر نمونه در یک صفحه کانونی مشخص با نور لیزر اسکن می‌شود، فلورسانس ثانویه ساطع شده از نقاط روی نمونه (در همان صفحه کانونی) از آینه دوفامی دیگر عبور کرده و روی روزنه آشکارساز متمرکز می‌شود. مقدار قابل توجهی از انتشار فلورسانس که در نقاط بالا و پایین صفحه کانونی هدف رخ می‌دهد (که در شکل (۲) اشعه نور غیر متمرکز نامیده می‌شود)، با روزنه آشکارساز در یک راستا نیستند و سبب ایجاد دیسک‌های ایری[۸] در صفحه روزنه می‌شوند [۴]. لذا بیشتر این نورهای اضافی با استفاده از فوتومولتی‌پلایر[۹] (آشکارساز) تشخیص داده نمی‌شوند و در تصویر حاصل مزاحمتی ایجاد نمی‌کنند. آینه دوفام، فیلتر مانع و فیلتر تحریک عملکردهای مشابهی با اجزای یکسان در میکروسکوپ فلورسانس میدان گسترده دارند.

در میکروسکوپ اپی فلورسانس میدان گسترده، کل نمونه در معرض نور شدید از یک لامپ بخار جیوه یا زنون قرار می‌گیرد و تصویر حاصل از نشر فلورسانس ثانویه را می‌توان به‌صورت مستقیم در عدسی‌های چشمی یا روی یک دستگاه الکترونیکی مشاهده کرد. در مقابل این مفهوم ساده، سازوکار تشکیل تصویر در یک میکروسکوپ هم‌کانون در اصل متفاوت است [۵]. همان‌طور که در بالا توضیح داده شد، میکروسکوپ هم‌کانون شامل چندین منبع تحریک لیزری، یک سر اسکن با اجزای نوری و الکترونیکی، آشکارسازهای الکترونیکی (به‌طور معمول مولتی‌پلایر) و یک رایانه برای جمع‌آوری، پردازش، تجزیه و تحلیل و نمایش تصاویر است.

سر اسکنر، قلب میکروسکوپ هم‌کانون است و وظیفه تحریک نمونه اولیه با طول موج مناسب و همچنین جمع‌آوری فوتون‌های نشر شده از نمونه برای تهیه تصویر نهایی را بر عهده دارد. یک سر اسکن معمولی شامل ورودی‌هایی از منابع لیزر خارجی، مجموعه فیلترهای فلورسانس، آینه‌های دوفام، سیستم آینه‌ای مبتنی بر گالوانومتر، روزنه‌های متغیر برای تولید تصویر هم‌کانون و آشکارسازهای فوتومولتی‌پلایر برای آشکارسازی طول موج‌های فلورسانس مختلف است. بسیاری از ابزارهای مدرن دارای توری‌های پراش یا منشور هستند که با استفاده از روزنه‌هایی که در نزدیکی آشکارساز قرار گرفته‌اند تصویربرداری طیفی (که به‌عنوان اثرانگشت گسیل نیز نامیده می‌شود) از طریق عدم همپوشانی نشر نمونه‌های نشان‌دار شده با ترکیبی از پروتئین‌های فلورسنت یا فلوروفورها را میسر می‌سازند. آرایش کلی اجزای سر اسکنر در شکل (۳) برای یک دستگاه تجاری معمولی ارائه شده‌است.



شکل (۳): سر اسکنر میکروسکوپ هم‌کانون سه کاناله با درگاه‌های لیزر مرئی، فرابنفش، و مادون قرمز و همچنین یک درگاه لامپ تخلیه جیوه برای مشاهده میدان وسیع نشان داده شده‌است. لیزرها از طریق فیبر نوری به اسکنر متصل می‌شوند، باریکه پرتو لیزر پس از ورود به اسکنر با استفاده از عدسی واگرا گسترده می‌شود تا پشت روزنه دریچه عدسی شیئی را به‌طور کامل بپوشاند، پرتو گسترده شده پس از عبور از عدسی شیئی به شکل نقطه‌ای متمرکز می‌شود و با آینه‌های روبشی گالوانومتری، انجام عمل روبش صورت می‌گیرد. روزنه دریچه یکی از مهمترین مولفه‌های تصویربرداری است که توسط اپراتور در اندازه‌های مختلف قابل تنظیم است. در حین اسکن نمونه، پرتوهای فلورسانس توسط عدسی و آینه‌های مشابه جمع‌آوری و پس از عبور از فیلترها وارد روزنه دریچه آشکارساز می‌شوند. تنظیم این شکاف موجب جلوگیری از ورود پرتوهای غیرمتمرکز به آشکارساز شده و همچنین مانع ورود نورهای هرز محیطی می‌شود [۱].

یکی از مفیدترین مباحث در مقایسه شباهت‌ها و تفاوت‌های بین میکروسکوپ‌های میدان گسترده و هم‌کانون،

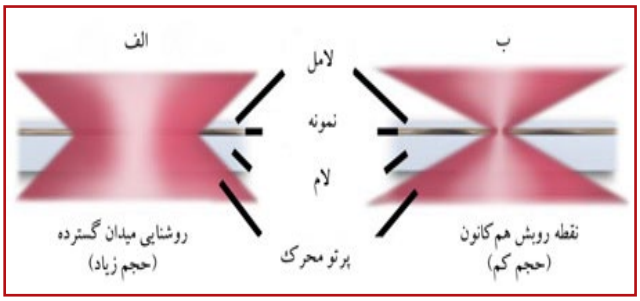
www.SID.ir

Archive of SID

بررسی هندسه نمونه و برهم‌کنش آن با نور فرودی است. در میکروسکوپ فلورسانس میدان گسترده، نور منبع به‌صورت یک مخروط وسیع روی حجم زیادی از نمونه متمرکز می‌شود که به‌طور یکنواخت و هم‌زمان نمونه را روشن می‌کند (همان‌طور که در شکل (۴-الف) نشان داده شده‌است). سپس فلورسانس نشر شده از نمونه با استفاده از عدسی شیئی جمع‌آوری شده و به عدسی چشمی و یا آشکارساز هدایت می‌شود. در نتیجه مقدار قابل توجهی سیگنال به دلیل نور پس زمینه و فلورسانس خودکار مربوط به نواحی بالا و پایین صفحه کانونی نشر می‌شود که وضوح و کنتراست تصویر را به‌طور جدی کاهش می‌دهد [۶].

در میکروسکوپ هم‌کانون، منبع نور لیزر ابتدا برای پر کردن دریچه پشتی عدسی شیئی منبسط می‌شود و سپس با استفاده از سیستم عدسی به نقطه بسیار کوچکی در صفحه کانونی متمرکز می‌شود (شکل (۴-ب)).

اندازه نقطه روشنایی از قطر به‌صورت تقریبی ۰/۲۵ تا ۰/۸ میکرومتر (وابسته به عدد عدسی شیئی) و عمق نفوذ بین ۰/۵ تا ۱/۵ میکرومتر، بیشترین شدت را دارد. اندازه نقطه روشنایی در میکروسکوپ هم‌کانون به طراحی میکروسکوپ، طول موج نور لیزر فرودی، مشخصات لنز شیئی، تنظیمات روبشگر و نمونه وابسته است [۶]. در شکل (۴) مقایسه‌ای بین مخروط‌های روشنایی یک میکروسکوپ میدان گسترده (شکل (۴-الف)) و میکروسکوپ هم‌کانون (شکل (۴-ب)) با عدسی شیئی یکسان ارائه شده‌است.



شکل (۴): حجم روشنایی میکروسکوپ میدان گسترده در مقابل هم‌کانون، نشان دهنده تفاوت در اندازه بین پرتوهای نوری میدان گسترده و اسکن نقطه‌ای است [۶].

در میکروسکوپ میدان گسترده، تمام عمق نمونه در یک منطقه وسیع با استفاده از منبع نور روشن می‌شود، در حالی که در میکروسکوپ هم‌کانون، نمونه با یک نقطه نورانی متمرکز روبش می‌شود.

در میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون، تصویر نمونه با روبش پرتو متمرکز در یک ناحیه مشخص و در یک الگوی شطرنجی که با استفاده از دو آینه نوسانی با سرعت بالا که با موتورهای گالوانومتر هدایت می‌شوند، تولید می‌شود. یکی از آینه‌ها پرتو را از چپ به راست در امتداد محور جانبی (x) حرکت می‌دهد، در حالی که دیگری پرتو را در جهت (y) منحرف می‌کند. پس از هر اسکن منفرد در امتداد محور (x)، پرتو به سرعت به نقطه شروع برمی‌گردد و در امتداد محور (y) جابجا می‌شود تا یک اسکن جدید در فرآیندی به نام فلایبک آغاز شود [۷]. در طول عملیات فلایبک، اطلاعات تصویر جمع‌آوری نمی‌شود. به این ترتیب، ناحیه مورد نظر روی نمونه در یک صفحه کانونی مشخص، با نور لیزر تحریک می‌شود. همان‌طور که هر خط روبش در امتداد نمونه از صفحه کانونی حرکت می‌کند، انتشار فلورسانس با عدسی شیئی جمع‌آوری شده و از طریق سیستم نوری هم‌کانونی ارسال می‌شود. سرعت حرکت آینه‌های روبشی نسبت به سرعت نور بسیار آهسته است؛ بنابراین، انتشار ثانویه یک مسیر نوری را در امتداد محور نور دنبال می‌کند که با پرتو تحریک اولیه یکسان است. بازگشت انتشار فلورسانس از طریق سیستم آینه‌ای گالوانومتر به‌عنوان روبش‌زدایی[10] نامیده می‌شود [۷]. پس از خروج از آینه‌های روبش‌گر، انتشار فلورسانس به‌طور مستقیم از آینه دوفام عبور کرده و بر روزنه تعبیه شده روی دریچه آشکارساز متمرکز می‌شود. نشر فلورسانس با استفاده از تقویت کننده نوری، به یک سیگنال الکتریکی آنالوگ با ولتاژ متغیر پیوسته (مرتبط با شدت) تبدیل می‌شود. سیگنال آنالوگ به‌صورت دوره‌ای نمونه‌برداری می‌شود و با یک مبدل آنالوگ به دیجیتال (A/D) که در واحد اسکن یا کابینت الکترونیکی همراه آن قرار دارد، به پیکسل تبدیل می‌شود. اطلاعات تصویر به‌طور موقت در یک رایانه ذخیره شده و روی صفحه نمایش نشان داده می‌شود. توجه به این نکته مهم است که تصویر هم‌کانون یک نمونه، نقطه به نقطه، از سیگنال فوتون‌های گسیل شده، توسط تقویت کننده نوری و سامانه الکترونیکی آن بازسازی می‌شود و هرگز به‌عنوان یک تصویر واقعی که بتوان از طریق چشمی میکروسکوپ مشاهده کرد، وجود ندارد.

همه میکروسکوپ‌های نوری، از جمله ابزارهای معمولی میدان گسترده، هم‌کانون و دو فوتونی دارای وضوح محدودی هستند که با یک سری قوانین فیزیکی توجیه می‌شوند. در یک سیستم نوری کامل، وضوح[11] با استفاده از دریچه عددی اجزای نوری و با طول موج نور، نور فرودی (تحریک) و نور آشکارسازی شده (نشر) محدود می‌شود.

میکروسکوپ هم‌کانون به شدت به فلورسانس به‌عنوان عامل اصلی تصویربرداری متکی است، به دلیل حساسیت بالای این روش همراه با توانایی هدف قرار دادن اجزای ساختاری و فرآیندهای دینامیکی در سلول‌های تثبیت شده و بافت‌های زنده، کاربردهای فراوانی در زیست‌شناسی پیدا کرده است. بسیاری از نشانگرهای فلورسنت، مواد شیمیایی آلی آروماتیک مصنوعی هستند که برای اتصال با یک ماکرومولکول زیستی (به‌عنوان مثال، یک پروتئین یا اسید نوکلئیک) یا برای قرار گرفتن در یک مکان خاص مانند اسکلت سلولی، میتوکندری، دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی و هسته طراحی شده‌اند [۸]. نشانگرهای دیگر برای نظارت بر فرآیندهای دینامیکی

www.SID.ir

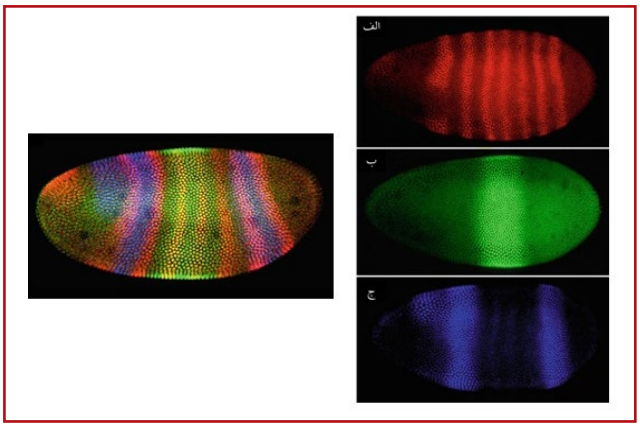
Archive of SID

و متغیرهای محیطی موضعی، از جمله غلظت یون‌های فلزی معدنی، pH، گونه‌های فعال اکسیژن و پتانسیل غشایی استفاده می‌شوند. رنگ‌های فلورسنت همچنین در تشخیص یکپارچگی سلولی (زنده در مقابل مرده و آپوپتوز)، اندوسیتوز، اگزوسیتوز، سیالیت غشاء، مسیرهای رفت و آمد پروتئین، انتقال سیگنال و فعالیت آنزیمی مفید هستند.

کاربردهای میکروسکوپ هم‌کانون

میکروسکوپ هم‌کانون قادر به جمع‌آوری تصاویر واضح از یک بخش نازک از یک نمونه ضخیم با پس زمینه کم و حداقل تداخلات خارج از تمرکز است. تصاویر دارای اطلاعات نوری، کاربردهای رایجی در علوم زیست پزشکی و علم مواد دارند. در عمل، نمونه موردنظر در محل قرارگیری آن در میکروسکوپ قرار داده می‌شود و تصویر در صفحه کانونی بالایی جمع‌آوری شده و سپس محل قرارگیری نمونه و یا عدسی شیئی میکروسکوپ (وابسته به نوع طراحی دستگاه) به صفحه کانونی بعدی جابجا می‌شود و این فرآیند با روبش صفحات کانونی متعدد ادامه می‌یابد. یک تصویر حجمی، نتیجه چنین آزمایشی است و اطلاعات فضایی سه بعدی (که می‌تواند کمی نیز باشد) را در مورد نمونه ارائه می‌دهد. استفاده از میکروسکوپ هم‌کانون برای تصویربرداری زنده و همچنین با نمونه‌های ثابت به‌طور فزاینده‌ای رایج است [۹].

داده‌ها از نمونه‌های ثابت و رنگ‌آمیزی شده یا نمونه‌های زنده در حالت‌های تک، دو، سه یا چند طول موج جمع‌آوری می‌شوند. به همین ترتیب نمونه‌های تهیه شده با روش‌های نشان‌گزاری منفرد، دوگانه و سه‌گانه اکنون برای بیشتر سیستم‌های تصویربرداری هم‌کانون مدرن به نسبت معمول هستند [۱۰]. همچنین تعداد پروب‌های فلورسنت مختلف که می‌توانند در آماده‌سازی نمونه مورد استفاده قرار گیرند در حال افزایش است (شکل (۵)). هر کانال اضافی به‌طور معمول به روش‌های تخصصی‌تر آماده‌سازی نمونه، تصویربرداری تخصصی‌تر و روش‌های تخصصی‌تر ارائه و تجزیه و تحلیل تصویر نیاز دارد [۱۱].



شکل (۵): سمت راست: مقاطع نوری منفرد از جنین مگس سرکه با نشان‌گذاری سه‌تایی در سلول‌های بلاستودرم. سه بخش نوری به‌طور هم‌زمان با استفاده از یک لیزر آرگون کریپتون در سه طول موج تحریک (۴۸۸، ۵۶۸ و ۶۴۷ نانومتر) جمع‌آوری شدند. سه ژن از جنین که در تشکیل بال دخیل هستند، نشان‌گذاری شده‌اند. (الف): Hairy (لیسامین رودامین، تحریک: ۵۷۲ نانومتر، نشر: ۵۹۰ نانومتر). (ب): Kruppel (فلورسئین، تحریک: ۴۹۶ نانومتر، نشر ۵۱۸ نانومتر) و (ج): Giant (سیانین، تحریک: ۵۶۴۹ نانومتر، نشر ۶۷۲ نانومتر). سمت چپ: تصویر چند طول موجی که از ترکیب سه عکس سمت راست به‌دست آمده است [۱۱].

در بیشتر مواقع تعدادی از روش‌های مبتنی بر فلورسانس با میکروسکوپ هم‌کانون ترکیب می‌شوند، از جمله انتقال انرژی تشدید فلورسانس[۱۲]، بازیابی فلورسانس پس از سفید شدن نوری[۱۳]، تصویربرداری طول عمر فلورسانس[۱۴]، تصویربرداری طیفی، اپتوژنتیک و تصویربرداری چند فوتونی [۹]. انتخاب نوع میکروسکوپ هم‌کانون که برای یک کاربرد خاص مناسب‌تر است، تا حد زیادی به اولویت‌بندی سرعت تصویربرداری، وضوح و میدان دید بستگی دارد. میکروسکوپ هم‌کانون می‌تواند روشی استثنایی باشد. با این حال، از آنجایی که این ابزارها به‌طور گسترده در دسترس هستند و استفاده از آنها به نسبت آسان است، بیشتر برای جمع‌آوری داده‌های کمی به‌طور بهینه استفاده نمی‌شوند. در آزمایش میکروسکوپ هم‌کانون، انتخاب روش صحیح، عدسی و فلوروفورهای مناسب، محیط نمونه‌گزاری و اجزای نوری برای دستیابی به بهترین تصاویر بسیار مهم است.

نتیجه‌گیری

میکروسکوپ هم‌کانون یک روش میکروسکوپی نوری است که برای تصویربرداری از نمونه‌های نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسنت به‌منظور تهیه تصاویر سه بعدی بدون برش از نمونه‌های ضخیم شفاف مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاربردهای میکروسکوپ هم‌کانون در علوم زیستی و پزشکی شامل تصویربرداری از توزیع فضایی ماکرومولکول‌ها در سلول‌های ثابت یا زنده، جمع‌آوری خودکار داده‌های سه‌بعدی، تصویربرداری از نمونه‌های نشان‌دار شده متعدد و اندازه‌گیری فرآیندهای فیزیولوژیکی در سلول‌های زنده است.

تحقیقات چند دهه اخیر بهبود قابل توجهی در تمام زمینه‌های هم‌کانونی، نه تنها در خود ابزار، بلکه در فرآیندهای آماده‌سازی نمونه، تجزیه و تحلیل داده‌ها، نمایش و مدیریت تصاویر هم‌کانونی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک انجام شده‌است.

www.SID.ir

Archive of SID

پی‌نوشت

۱. کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ پروبی روبشی

2. Laser scanning confocal microscopy

3. Marvin Minsky

4. M. David Egger

5. Mojmir Petran

6. Focus

7. Dichromatic mirror

۸. آینه دوفام سطحی شیشه‌ای با پوشش نازکی از فلز مخصوص است که رنگ‌های معینی از نور را بازتاب و بقیه را از خود عبور می‌دهد.

9. Airy disks

10. Photomultiplier

11. Descanning

12. Resolution

13. FRET

14. FRAP

15. FLIM

مراجع

[1] Claxton, N.S.; Fellers, T.J.; Davidson, M.W. Laser scanning confocal microscopy. In Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, 2nd ed.; Webster, J.G., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; pp. 1–37.

[2] M. Minsky, Microscopy Apparatus, US Pat. 3,013,467, 1961.

[3] M. D. Egger and M. Petran, New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells, Science, 157: 305-307,1967.

[4] E. H. K. Stelzer, Practical Limits to Resolution in Fluorescence Light Microscopy, in R. Yuste, F. Lanni, A. Konnerth (eds.), Imaging Neurons: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 12.1-12.9, 2000.

[5] J. Murray, Confocal Microscopy, Deconvolution, and Structured Illumination Methods, in R. D. Goldman and D. L. Spector (eds.), Live Cell Imaging: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 239-280, 2005.

[6] S. J. Wright and D. J. Wright, Introduction to Confocal Microscopy, in B. Matsumoto (ed.), Cell Biological Applications of Confocal Microscopy, in Methods in Cell Biology, Volume 70, New York: Academic Press, 1-85, 2002.

[7] R. H. Webb, Confocal Optical Microscopy, Rep. Prog. Phys., 59: 427-471, 1996.

[8] R. P. Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Chicago: Invitrogen Molecular Probes, 2005.

[9] Amicia D. Elliott, Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices, Curr Protoc Cytom. 2020 March; 92(1).

[10] Stephen W. Paddock (ed.), Confocal Microscopy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1075, Springer Science+Business Media New York 2014.

[11] Brelje TC, Wessendorf MW, Sorenson RL (1993) Multicolor laser scanning confocal immunofl uorescence microscopy: practical applications and limitations. Methods Cell Biol 38:98–177.

www.SID.ir