

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه کردستان

دانشکده علوم پایه

گروه فیزیک

عنوان:

نظریه‌ی الکترومغناطیسی میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبری برای موجبرهای معمولی،

معکوس و متقارن در یک ساختار پنج لایه‌ای موجبر- سلول

پژوهشگر:

برزان محمدی

استاد راهنما:

دکتر عبدالله حسن زاده

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیک گرایش حالت جامد

مهر ماه ۱۳۹۰

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع

این پایان نامه (رساله) متعلق به دانشگاه کردستان است

*** تعهد نامه ***

اینجانب برزان محمدی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیک گرایش حالت جامد دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه گروه فیزیک تعهد می‌نمایم که محتوای این پایان‌نامه نتیجه تلاش و تحقیقات خود بوده و از جایی کپی برداری نشده و به پایان رسانیدن آن نتیجه تلاش و مطالعات مستمر اینجانب و راهنمایی و مشاوره اساتید بوده است.

با تقدیم احترام

برزان محمدی

۱۳۹۰ / ۷ / ۴



دانشگاه کردستان

دانشکده علوم پایه

گروه فیزیک

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیک گرایش حالت جامد

عنوان:

نظریه‌ی الکترومغناطیسی میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبری برای موجبرهای معمولی،

معکوس و متقارن در یک ساختار پنج لایه‌ای موجبر-سلول

پژوهشگر:

برزان محمدی

در تاریخ ۱۳۹۰ / ۷ / ۴ توسط کمیته تخصصی و هیات داوران زیر مورد بررسی قرار گرفت و بانمره و درجه به تصویب رسید.

<u>امضاء</u>	<u>مرتبۀ علمی</u>	<u>نام و نام خانوادگی</u>	<u>هیات داوران</u>
	استادیار	دکتر عبدالله حسن زاده	۱- استاد راهنما
	استاد	دکتر رستم مرادیان	۲- استاد داور خارجی
	استادیار	دکتر زهرا عالمی پور	۳- استاد داور داخلی

مهر و امضاء معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده

مهر و امضاء گروه

تقدیم به پدر و مادر عزیزم که در تمام مراحل تحصیل از
هر جهت حامی و امید بخش بنده بوده‌اند

سپاسگزاری

خداوند بلند مرتبه و بسیار بخشنده را شاکرم که این توفیق را به بنده عنایت نمود که گام در زیباترین، واقعی ترین و جذاب ترین رشته‌ی بشریت نهم و بدین وسیله و با درک اعجاز علمی آیات او، نوع نگرشم به عالم هستی دگرگون شود.

از خداوند متعال سپاسگزارم که به من فرصت و یاری داد تا در راه علم گام نهم و این تحقیق و پژوهش کوچک را به آخر برسانم. بی شک اگر الطاف بی‌نهایت الهی نبود قادر نبودم بر مشکلات موجود فائق آیم.

مسلمای این راه جز با کمک و یاری سروران و عزیزانی بزرگ میسر نبوده است. لذا بر خود لازم می‌دانم از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر عبدالله حسن زاده کمال تشکر را داشته باشم که در طول این مسیر همواره از راهنمایی، کمک و گذاشتن وقت بسیار دریغ ننموده‌اند. ایشان با صبر و حوصله‌ی بسیار و اخلاق زیبایشان الگوی مناسبی برای ادامه‌ی زندگی بنده خواهند بود

میکروسکوپ فلورسنس به عنوان یکی از بهترین ابزارهای بررسی و مطالعه، در زیست شناسی سلولی و زیست شناسی^۱ مولکولی نقش بسزایی داشته است. امروزه تصویربرداری فلورسنس به عنوان یک ابزار اصلی در زیست شناسی، مخصوصاً در مطالعه‌ی پدیده‌های مرتبط با غشاء سلولی، شکل سلول، حرکت سلول و چسبیدگی موضعی سلول در نظر گرفته می‌شود. مطالعه‌ی ناحیه‌ی تماس سلول با زیرلایه و بررسی پدیده‌های مربوط به زیست شناسی سلولی در سال‌های اخیر رشد سریعی داشته است و اهمیت تصویربرداری از این پدیده‌ها باعث رشد روش‌های متفاوتی در این زمینه شده است که از جمله‌ی آن می‌توان به میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبری^۲ (WEFFM) اشاره کرد.

تصویربرداری از نقاط تماس سلول با زیرلایه و فیلم‌های نازک، اندازه‌گیری فاصله سلول با موجبر و همچنین بررسی نحوه‌ی تاثیر داروها روی سلول‌ها از جمله کارهایی است که با میکروسکوپ میدان میرای موجبری انجام گرفته است. هنگامی که یک باریکه نور وارد موجبر می‌شود، بعد از انتشار در موجبر میدان میرایی روی سطح آن ایجاد می‌کند که عمق نفوذ آن (فاصله‌ایی که در آن بزرگی میدان به ۳۶٪ آن روی سطح موجبر می‌رسد) در حدود ۱۰۰nm است. این میدان میرا باعث تحریک مولکول‌های فلورسنس (که برای برچسب زدن محیط سلول یا غشاء سلول استفاده می‌شوند) می‌شود که در محدوده‌ی آن قرار می‌گیرند. فلورسنس در واقع انتشار نور با طول موج بالاتر توسط مولکول‌های فلورسنس است که در مدت 10^{-9} ثانیه بعد از جذب نور با طول موج پایین‌تر اتفاق می‌افتد و در این فرآیند الکترونی با جذب یک فوتون به حالت بالاتر تحریک می‌شود و سپس به حالت پایه‌ی خود باز می‌گردد و در این بازگشت فوتونی با طول موج بیشتر گسیل می‌کند که به کمک یک عدسی می‌توان این فوتون‌ها را جمع کرد و آن‌ها را با استفاده از یک فیلتر از فوتون‌های تحریک کننده جدا نمود و تصویری با زمینه‌ی کم را مشاهده کرد. این روش دارای مزیت‌هایی نسبت به روش‌های مشابه مانند میکروسکوپ فلورسنس بازتابش کلی است که از جمله می‌توان به سفید شدگی کمتر، عدم نیاز به لنز با قطر دهانه‌ی بالاتر، تعیین آسان‌تر فاصله‌ی جدایی سلول از سطح موجبر، ارزانی، ترکیب ساده‌تر آن با سایر روش‌های میکروسکوپی و استفاده از عدسی‌های گوناگون با بزرگنمایی‌های متفاوت اشاره کرد. تئوری الکترو مغناطیسی امواج هدایت شده در موجبر به طور کامل در منابع مختلف مورد بحث قرار گرفته است اما تا بحال تئوری مذکور برای موجبرهایی که روی سطح آنها لایه‌های متفاوت و غیر یکنواخت مانند سلول قرار گرفته، مورد بحث قرار نگرفته است. کاربردهای روز افزون روش میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبر در زمینه‌های مختلف مخصوصاً تصویربرداری از ناحیه‌ی تماس سلول با زیرلایه، زیست شناسی سلولی و زیست شناسی مولکولی، ما را بر آن داشت که در این پایان‌نامه تئوری مذکور را برای یک ساختار پنج لایه‌ایی سلول- موجبر ارائه کنیم و تمام مباحث مرتبط با میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبر و تئوری آن و همچنین عوامل تاثیر گذار روی این میکروسکوپ را مورد بررسی قرار دهیم.

کلید واژه: میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبری، عمق نفوذ، قطر دهانه، سفید شدگی

^۱ Cell Biology

^۲ Waveguide evanescent field fluorescence microscopy

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	مقدمه
۸	فصل اول (مقدمه ایی بر امواج الکترومغناطیسی)
۸	مقدمه
۹	۱-۱: معادلات ماکسول
۹	۱-۱-۱: قانون گاوس و شکل دیفرانسیلی آن
۱۰	۱-۱-۲: قانون فاراده و شکل دیفرانسیلی آن
۱۳	۱-۱-۳: تعمیم قانون آمپر و شکل دیفرانسیلی آن
۱۵	۲-۱: معادلات امواج الکترومغناطیسی
۱۷	۳-۱: بازتابش داخلی کلی و موج میرا
۲۰	۴-۱: ضرایب فرنل
۲۲	فصل دوم (ساختار موجبرها)
۲۲	مقدمه
۲۵	۱-۲: تعیین شکل میدان های الکتریکی در سه لایه
۲۵	۱-۲-۱: حل معادلات ماکسول برای لایه ی دوم
۲۹	۲-۱-۲: معرفی شکل میدان در سه لایه
۳۱	۳-۲: نحوه ی تعیین مدها و زاویه مدها
۳۶	فصل سوم جفتیدگی منشوری (prism coupling)
۳۶	مقدمه
۳۹	۱-۳: اسپکتروسکوپی m - خطی
۴۰	۲-۳: ساختار چهار لایه ایی زیرلایه، فیلم موجبر، شکاف هوا و منشور
۴۲	فصل چهارم (میکروسکوپ فلورسنس)
۴۲	مقدمه
۴۵	۱-۴: انواع میکروسکوپ ها

۴۶	۲-۴: میکروسکوپ فلورسنس
۵۲	۱-۲-۴: اصول فیزیکی فلورسنس
۵۳	۲-۲-۴: بازده کوانتومی، طول عمر حالت برانگیخته و انتقال انرژی
۶۱	۳-۲-۴: عوامل تاثیر گذار بر کیفیت تصاویر فلورسنس
۵۵	فصل پنجم (میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبر)
۵۵	مقدمه
۵۹	۱-۵: شکل میدان الکتریکی در ناحیه‌ی سوم یا محیط مایع
۶۶	۲-۵: نحوه‌ی تاثیر میدان میرا روی مولکول‌های فلورسانس چسبیده به سلول
۶۷	۳-۵: عمق نفوذ و فلورسنس نسبی F
۷۹	۴-۵: میدان الکتریکی در لایه‌های غشا و سیتوپلاسم
۶۹	۵-۵: شرایط ایجاد میدهان‌های میرا یا پیوسته در غشاء و سیتوپلاسم
۷۴	۶-۵: نتایج عددی
۷۵	۱-۶-۵: وابستگی میزان فلورسانس تحریک شده به زاویه‌ی فرودی و ضریب شکست موجبر
۸۶	۲-۶-۵: رابطه‌ی بین میزان فلورسنس و ضخامت مایع برای فرضیات متفاوت در باره‌ی ضریب شکست سیتوپلاسم
۸۷	۳-۶-۵: بستگی فلورسنس به ضخامت محیط مایع در شرایط خاص وقتی که سیتوپلاسم خیلی نازک باشد
۹۰	۷-۵: روشی دیگر برای اندازه‌گیری فاصله‌ی سلول از سطح موجبر
۹۶	۱-۷-۵: تقاطع نمودارهای S و p با هم
۱۰۷	۲-۷-۵: تفاضل شدت‌های S و p
۱۰۸	۸-۵: بررسی تصاویر گرفته شده از سلول‌ها
۱۱۲	نتیجه‌گیری
۱۱۵	منابع
۱۱۸	پیوست (تابش دو قطبی)
۱۱۸	مقدمه
۱۱۸	پ-۱: نورهای مجاز و ممنوعه
۱۲۱	پ-۲: اصول فیزیکی و ریاضی

پ-۲-۱: توزیع نور در فیلم موجبر

۱۲۱

پ-۲-۲: توزیع نور در محیط مایع

۱۲۵

فهرست اشکال

شکل	صفحه
شکل ۱-۱:	خطوط میدان مغناطیسی حاصل از جریان الکتریکی I در یک سیم راست بلند
شکل ۲-۱:	خطوط میدان مغناطیسی در سیمی به شکل حلقه‌ی دایره‌ای کوچک
شکل ۳-۱:	بردارهای موج و میدان‌های مربوط به آن‌ها برای مد TE
شکل ۴-۱:	بازتابش داخلی کلی
شکل ۱-۲:	ساختار کلی موجبر سه لایه‌ای تخت
شکل ۲-۲:	انتشار نور در یک موجبر تخت
شکل ۳-۲:	اختلاف فاز ناشی از اختلاف راه یک مسیر زیگزاگ
شکل ۴-۲:	راستای میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی در حالت (TE)
شکل ۵-۲:	سطح مقطع یک موجبر تخت به ضخامت d که مبدا مختصات در وسط موجبر قرار دارد
شکل ۶-۲:	مولفه‌های بردار (K_r) را در راستای (z, x) در یک موجبر را نشان می‌دهد
شکل ۷-۲:	یک باریکه‌ی نوری که در موجبر حرکت می‌کند
شکل ۸-۲:	مد مرتبه صفر برای یک موجبر با ضخامت ۱۰۰۰ نانومتر
شکل ۹-۲:	مد مرتبه یک برای یک موجبر با ضخامت ۱۰۰۰ نانومتر
شکل ۱۰-۲:	مد مرتبه دو برای یک موجبر با ضخامت ۱۰۰۰ نانومتر
شکل ۱۱-۲:	مد مرتبه سه برای یک موجبر با ضخامت ۱۰۰۰ نانومتر
شکل ۱۲-۲:	مد مرتبه چهار برای یک موجبر با ضخامت ۱۰۰۰ نانومتر
شکل ۱-۳:	باریکه‌ی نوری تحت زاویه (θ_m) به سطح موجبر می‌تابد
شکل ۲-۳:	باریکه‌ی نوری از طریق منشور و با عبور از شکاف هوا به داخل موجبر وارد می‌شود
شکل ۳-۳:	ایجاد یک میدان میرا در ناحیه‌ی شکاف هوا و نفوذ آن به داخل موجبر
شکل ۴-۳:	حالتی دیگر برای جفت‌دگی منشور با استفاده از منشور قائم الزاویه
شکل ۵-۳:	ساختار مربوط به اسپکتروسکوپی m-خطی

- شکل ۳-۶: ساختار ۴ طبقه ایی جفتیدگی منشور ۴۰
- شکل ۳-۷: نمودار شدت موج بازتابیده به شدت موج فرودی از ساختار ۴ لایه ایی ۴۱
- شکل ۴-۱: نمایش حد قدرت تشخیص ۴۴
- شکل ۴-۲: قطر دهانه برای لنزهای مختلف ۴۵
- شکل ۴-۳: دیاگرام جابلا نسکی ۴۹
- شکل ۴-۴: طیف نرمالیزه شده ی جذب و گسیل فلوروسین (Igc) ۵۰
- شکل ۵-۱: ساختار ۵ لایه ای مربوط به قرار گرفتن سلول روی سطح موجبر ۵۹
- شکل ۵-۲: ساختار ۵ لایه ای سلول و موجبر که مبدا مختصات در مرز بین لایه های ۲ و ۳ قرار دارد ۶۰
- شکل ۵-۳: یک سلول روی سطح موجبر تحت تاثیر میدان میرا قرار گرفته است ۶۶
- شکل ۵-۴: میدان الکتریکی در ساختار پنج لایه ایی موجبر - سلول. میدان در غشاء و سیتوپلاسم میراست ۶۹
- شکل ۵-۵: میدان الکتریکی در ساختار پنج لایه ایی موجبر - سلول. میدان در غشاء پیوسته و در سیتوپلاسم میراست ۷۰
- شکل ۵-۶: میدان الکتریکی در ساختار پنج لایه ایی موجبر - سلول. میدان در غشاء میرا و در سیتوپلاسم پیوسته است ۷۰
- شکل ۵-۷: میدان الکتریکی در ساختار پنج لایه ایی موجبر - سلول. میدان در غشاء و سیتوپلاسم پیوسته است ۷۰
- شکل ۵-۸: نمودار میزان تحریک فلوروفور (واحد اختیاری) توسط میدان میرا در گپ مایع زیر سلول سلول ۷۶
- شکل ۵-۹: نمودار عمق نفوذ بر حسب مد که با افزایش مد میزان عمق نفوذ افزایش می یابد ۷۷
- شکل ۵-۱۰: نمودار شدت میدان میرا برای قطبش S بر حسب افزایش فاصله ی عمودی از سطح موجبر معمولی ۷۷
- شکل ۵-۱۱: نمودار فلورسانس نسبی بر حسب تغییرات گپ مایع برای موجبر معمولی ۷۹
- شکل ۵-۱۲: نمودار عمق نفوذ بر حسب تغییرات ضریب شکست محیط مایع ۸۲
- شکل ۵-۱۳: مد شماره ی صفر برای سه موجبر ۸۳
- شکل ۵-۱۴: مد شماره ی یک برای سه موجبر ۸۳
- شکل ۵-۱۵: مد شماره ی دو برای سه موجبر ۸۴
- شکل ۵-۱۶: مد شماره ی سه برای سه موجبر ۸۴
- شکل ۵-۱۷: مد شماره ی چهار برای سه موجبر ۸۵
- شکل ۵-۱۸: مد شماره ی پنج برای سه موجبر ۸۵

- شکل ۵-۱۹: نمودار F_c بر حسب تغییرات گپ مایع برای مد شماره ۱ سه ۸۶
- شکل ۵-۲۰: ساختار ۵ لایه‌ای وقتی که غشا سلول را حذف کنیم ۸۷
- شکل ۵-۲۱: تحریک فلوروفورها آن طرف سیتوپلاسم برای موجبر معمولی ۸۸
- شکل ۵-۲۲: تحریک فلوروفورها آن طرف سیتوپلاسم برای موجبر معکوس ۸۸
- شکل ۵-۲۳: تحریک فلوروفورها آن طرف سیتوپلاسم برای موجبر متقارن ۸۹
- شکل ۵-۲۴: تحریک فلوروفورها آن طرف سیتوپلاسم برای هر سه نوع موجبر ۸۹
- شکل ۵-۲۵: شدت میدان میرا بر حسب فاصله از سطح برای مد شماره صفر موجبر معمولی ۹۱
- شکل ۵-۲۶: شدت میدان میرا بر حسب فاصله از سطح برای مد شماره یک موجبر معمولی ۹۱
- شکل ۵-۲۷: شدت میدان میرا بر حسب فاصله از سطح برای مد شماره دو موجبر معمولی ۹۲
- شکل ۵-۲۸: شدت میدان میرا بر حسب فاصله از سطح برای مد شماره سه موجبر معمولی ۹۲
- شکل ۵-۲۹: شدت میدان میرا بر حسب فاصله از سطح برای مد شماره چهار موجبر معمولی ۹۳
- شکل ۵-۳۰: شدت میدان میرا بر حسب فاصله از سطح برای مد شماره پنج موجبر معمولی ۹۳
- شکل ۵-۳۱: شدت میدان میرا بر حسب فاصله از سطح برای مد شماره شش برای موجبر معمولی ۹۴
- شکل ۵-۳۲: نمودار شدت میدان میرا برای قطبش S بر حسب افزایش فاصله ی عمودی از سطح موجبر معمولی ۹۴
- شکل ۵-۳۳: نمودار شدت میدان میرا برای قطبش P بر حسب افزایش فاصله ی عمودی از سطح موجبر معمولی ۹۵
- شکل ۵-۳۴: نمودار شدت میدان میرا برای قطبش S بر حسب شماره ی مد ۹۵
- شکل ۵-۳۵: نمودار شدت میدان میرا برای قطبش P بر حسب شماره ی مد ۹۶
- شکل ۵-۳۶: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $x_s=10, x_p=10 \text{ nm}$ ۹۷
- شکل ۵-۳۷: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $x_s=10, x_p=20 \text{ nm}$ ۹۷
- شکل ۵-۳۸: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $x_s=10, x_p=30 \text{ nm}$ ۹۸
- شکل ۵-۳۹: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $x_s=10, x_p=40 \text{ nm}$ ۹۸
- شکل ۵-۴۰: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $x_s=10, x_p=60 \text{ nm}$ ۹۹
- شکل ۵-۴۱: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $x_s=20, x_p=10 \text{ nm}$ ۹۹
- شکل ۵-۴۲: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $x_s=20, x_p=20 \text{ nm}$ ۱۰۰

- شکل ۴۳-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=20, X_p=30 \text{ nm}$ ۱۰۰
- شکل ۴۴-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=20, X_p=40 \text{ nm}$ ۱۰۱
- شکل ۴۵-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=20, X_p=50 \text{ nm}$ ۱۰۱
- شکل ۴۶-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=20, X_p=60 \text{ nm}$ ۱۰۲
- شکل ۴۷-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=100, X_p=100 \text{ nm}$ ۱۰۲
- شکل ۴۸-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=100, X_p=110 \text{ nm}$ ۱۰۳
- شکل ۴۹-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=100, X_p=120 \text{ nm}$ ۱۰۳
- شکل ۵۰-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=100, X_p=130 \text{ nm}$ ۱۰۴
- شکل ۵۱-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=100, X_p=140 \text{ nm}$ ۱۰۴
- شکل ۵۲-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=10, X_p=0-150 \text{ nm}$ ۱۰۵
- شکل ۵۳-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=20, X_p=0-150 \text{ nm}$ ۱۰۵
- شکل ۵۴-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=30, X_p=0-150 \text{ nm}$ ۱۰۶
- شکل ۵۵-۵: نمودار شدت بر حسب مد برای موجبر معمولی و برای $X_s=40, X_p=0-150 \text{ nm}$ ۱۰۶
- شکل ۵۶-۵: ستاپ تکنیک میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبر ۱۰۸
- شکل ۵۷-۵: تصاویر گرفته شده از یکنقاط تماس سلول توسط میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبر ۱۱۰
- شکل پ-۱: طرح موضوع دوقطبی ۱۱۸
- شکل پ-۲: توضیح نورهای مجاز و ممنوعه ($n_1 > n_2, n_2$) ۱۲۰
- شکل پ-۳: یک دوقطبی در فاصله‌ی کمتر از یک طول موج از سطح مشترک ۱۲۲
- شکل پ-۴: یک مولکول فلورسنس در سطح مشترک ۱۲۴

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۷۵	جدول ۱-۵: پارامترهای موجبر معمولی و سلول روی آن با ضریب شکست ۱.۷۷ در فیلم موجبر
۷۵	جدول ۲-۵: مقادیر مور نیاز برای رسم نمودار شکل ۸-۵
۷۸	جدول ۳-۵: مقادیر F_B برای مدهای مختلف برای موجبر معمولی با پارامترهای موجود در جدول (۱-۵)
۷۸	جدول ۴-۵: تعداد مد وزاویه مدها برای موجبر معمولی با ضریب شکست ۲/۲
۷۸	جدول ۵-۵: تعداد مد وزاویه مدها برای موجبر معمولی با طول موج ۵۴۳ نانومتر
۷۹	جدول ۶-۵: پارامترهای مربوط به موجبر معکوس
۸۰	جدول ۷-۵: زاویه مدها و تعداد آن‌ها برای موجبر معکوس
۸۰	جدول ۸-۵: مقادیر F_B برای مدهای مختلف برای موجبر معکوس با پارامترهای موجود در جدول (۶-۵)
۸۱	جدول ۹-۵: پارامترهای مربوط به موجبر متقارن
۸۱	جدول ۱۰-۵: زاویه مدها و تعداد آن‌ها برای موجبر متقارن
۸۱	جدول ۱۱-۵: مقادیر F_B برای مدهای مختلف برای موجبر متقارن با پارامترهای موجود در جدول (۹-۵)
۱۰۷	جدول ۱۲-۵: جدول تفاضل شدت های s و p را برای مدهای انتخابی در فواصل مختلف
۱۰۷	جدول ۱۳-۵: رابطه‌ی بین تفاضل شدت های مربوط به جدول بالا، با فاصله از سطح موجبر

مقدمه

میکروسکوپ فلورسنس (م ف) به عنوان یکی از بهترین ابزارهای بررسی و مطالعه، در زیست شناسی سلولی^۱ و زیست شناسی مولکولی نقش بسزایی داشته است. امروزه تصویربرداری فلورسنس به عنوان یک ابزار اصلی در زیست شناسی، مخصوصاً در مطالعه‌ی پدیده‌های مرتبط با غشاء سلولی، شکل سلول، حرکت سلول و چسبیدگی موضعی سلول در نظر گرفته می‌شود. میکروسکوپ فلورسنس با استفاده از روش‌ها، تجهیزات و برچسب‌های جدید در حال پیشرفت سریع است. دانستن اصول و قوانین مربوط به میکروسکوپ فلورسنس در هنگام بررسی و حل مسائل مربوط به تصاویر گرفته شده بسیار مفید و با اهمیت خواهد بود. در سال‌های اخیر خیلی از بهسازی‌ها و پیشرفت‌ها در میکروسکوپی در جهت افزایش سیگنال به نویز (کانتراست) بوده است [۱] که میکروسکوپ‌های فلورسنس بخاطر مواردی که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد، به تحقق این موضوع کمک شایانی کرده‌اند.

مواردی از جمله قدرت تشخیص و کانتراست تصویر دو پارامتر مهم در میکروسکوپی هستند. قدرت تشخیص یک میکروسکوپ به عنوان کمترین فاصله‌ی بین دو نقطه روی نمونه، که میکروسکوپ توانایی تشخیص یا تفکیک آنها را به عنوان دو نقطه‌ی جداگانه از هم دارد تعریف می‌شود. هر مقدار توانایی تفکیک یا تشخیص دو نقطه‌ی مجزا در نمونه توسط میکروسکوپ بیشتر باشد، قدرت تشخیص آن میکروسکوپ بالاتر خواهد بود. قدرت تشخیص میکروسکوپ‌های نوری معمولی که بعلت پدیده‌ی پراش محدود می‌شود، در راستای افقی 250 nm و در راستای قائم بیشتر از 400 nm است.

از دیگر انواع میکروسکوپ‌ها می‌توان به میکروسکوپ‌های SI ^۲، $STED$ ^۳ و $STOR$ ^۴ اشاره کرد که به ترتیب دارای قدرت تشخیص 100 ، 20 و 15 nm در راستای افقی و 100 ، 400 و 100 nm در راستای قائم هستند [۲]. اما با

^۱Cell Biology

^۲Stimulated illumination

^۳Stimulated emission depletion

^۴Approach stochastic optical reconstruction

پیشرفت‌های لازم در این زمینه و ساخت نسل‌های جدید میکروسکوپ‌ها از جمله میکروسکوپ‌های فلورسنس میدان میرا این مقدار قدرت تشخیص کمتر شده و به حدود ۱۰nm رسیده است [۳].

آشنایی با فلورسنس برای گرفتن نتایج بهتر توسط میکروسکوپ فلورسنس یک پیش نیاز است و بدون شناخت آن، مطالعه در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی کار سختی خواهد بود. فلورسنس در واقع انتشار نور با طول موج بالاتر توسط مولکول‌های فلورسنس است که در مدت 10^{-9} ثانیه بعد از جذب نور با طول موج پایین‌تر اتفاق می‌افتد و در این فرآیند الکترونی با جذب یک فوتون به حالت بالاتر تحریک می‌شود و سپس به حالت پایه‌ی خود باز می‌گردد و در این بازگشت فوتونی با طول موج بیشتر گسیل می‌کند. همین اختلاف بین طول موج‌های منتشر شده و پراکنجیده شده (شیفت استوکس) است که هم مولکول‌های فلورسنس و هم میکروسکوپ فلورسنس را توانمند و پر کاربرد کرده است. مولکول‌هایی را که دارای خاصیت فلورسنسی هستند فلوروفور^۱ می‌نامند [۱]. از جمله‌ی کاربرد مولکول‌های فلورسنس می‌توان به حسگرهای شیمیایی و بیوشیمیایی، برچسب‌ها، رنگ‌ها، اسپکتروسکوپی فلورسنس، آشکارسازهای زیستی و لامپ‌های فلورسنس اشاره کرد [۴].

مطالعه‌ی ناحیه‌ی تماس سلول با زیرلایه و بررسی پدیده‌های مربوط به زیست‌شناسی سلولی در سال‌های اخیر رشد سریعی داشته است [۵] و اهمیت تصویربرداری از این پدیده‌ها باعث رشد تکنیک‌های متفاوتی در این زمینه شده است. که از جمله‌ی آن می‌توان به میکروسکوپ میدان میرا اشاره کرد. در این میکروسکوپ، میدان میرا برای تحریک فلوروفورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این فلوروفورها فقط در یک ناحیه‌ی محدود (حدود ۱۰۰nm) در نزدیک سطح مشترک زیرلایه و نمونه تحریک می‌شوند. این ویژگی موجب شده است که میکروسکوپ میدان میرا به یک ابزار توانمند برای مطالعه‌ی پدیده‌های زیست‌شناسی سلولی تبدیل شود و در خیلی از کاربردها از جمله مطالعه‌ی نواحی تماس سلول با زیرلایه، اسپکتروسکوپی تک مولکولی نزدیک سطح و بررسی دینامیک سلول‌های زنده با قدرت تشخیص عمودی بالا نقش مهمی را ایفا می‌کند.

حدود چهار دهه پیش روش (IRM)^۲ باعث پیشرفت خوبی در مطالعه‌ی ناحیه تماس سلول با زیرلایه شد [۷]. در این روش یک باریکه‌ی نور از میان یک قطعه شیشه‌ی اپتیکی شفاف و بعد از بازتابش‌های متوالی از لایه‌ها و سطح مشترک‌های متفاوت، به نمونه برخورد می‌کند و آن را روشن می‌کند [۸]. اما این روش مشکلات و کاستی‌هایی دارد، از جمله: ارائه ندادن اطلاعات کافی در مورد ابعاد و خصوصیات ذاتی سلول و همچنین امکان اشتباه در تفسیر عکس‌ها و تصاویر گرفته شده [۷]. در این روش اندازه‌گیری فواصل سلول و زیرلایه فقط در حالتی ممکن است که ضخامت سیتوپلاسم از ۱۰۰۰nm کمتر نباشد [۸].

^۱Fluorophore

^۲Interference reflection microscopy

یک روش جایگزین و مناسب برای IRM میکروسکوپ فلورسنس بازتابش داخلی کلی (TIRFM)^۱ است. این ابزار و روش توانمند ابتدا در زیست‌شناسی سلولی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین این روش در ادامه برای مطالعه‌ی ناحیه‌ی تماس سلول با زیرلایه و ارائه‌ی کیفی نقشه و توپوگرافی آن مورد استفاده قرار گرفت [۳، ۷، ۹، ۱۰]. این روش دارای کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف می‌باشد که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تصویربرداری از ناحیه‌ی تماس سلول‌های زنده با زیرلایه [۵، ۱۱، ۱۲، ۱۳]، بررسی دینامیک سلولی در ناحیه‌ی تماس [۱۴]، میکروسکوپی تک مولکولی [۱۵]، مطالعه‌ی کوانتوم دات‌ها [۱۲]، زیست حسگرها، بیوشیمی [۱۱] و اسپکتروسکوپی [۱۶ و ۱۷].

در میکروسکوپ TIRFM اساس کار بر این است که یک باریکه‌ی نور از داخل یک زیرلایه‌ی شفاف (معمولاً یک قطعه شیشه‌ی اپتیکی) تحت زاویه‌ی بزرگتر از زاویه‌ی حد به سطح مشترک^۲ زیرلایه- محیط مایع که در آن ضریب شکست زیرلایه بیشتر از محیط مایع است، برخورد کرده و در نتیجه این باریکه دچار بازتابش داخلی کلی می‌شود. در اثر این بازتابش داخلی کلی یک میدان میرای کوتاه برد در ناحیه‌ی دوم و در نزدیک سطح مشترک تولید می‌شود [۷]. این میدان میرا می‌تواند مولکول‌های فلورسنس را که برای برچسب زدن غشاء سلول استفاده می‌شوند برانگیخته کند و باعث گسیل نور از آنها شود [۷].

تحریک مولکول‌های فلورسنس توسط میدان میرا می‌تواند بوسیله‌ی موجبرهای تخت نیز انجام گیرد [۱۸] که در آن محیط مایع، لایه‌ی رویی موجبر را تشکیل می‌دهد. همانطور که در فصل دوم نیز اشاره خواهد شد، موجبرها ساختارهای اپتیکی هستند که برای محدود کردن و هدایت امواج الکترومغناطیسی مورد استفاده قرار می‌گیرند. موجبرهای تخت از سه لایه‌ی زیرلایه با ضریب شکست n_1 ، فیلم موجبر با ضریب شکست n_2 و لایه‌ی رویی با ضریب شکست n_3 تشکیل شده‌اند. برای اینکه در فیلم موجبر یک موج قابل انتشار داشته باشیم لازم است یک باریکه‌ی نور تحت زاویه‌ی بزرگتر از زاویه‌ی حد به سطح‌های مشترک با لایه‌ی رویی و زیرلایه در فیلم موجبر برخورد کرده و تحت بازتابش داخلی کلی قرار گیرد و این مستلزم آن است که ضریب شکست فیلم موجبر از ضرایب شکست دو لایه‌ی دیگر بزرگتر باشد ($n_2 > n_1, n_3$). با نصب و استفاده از گریتینگ^۴ در سطح موجبر و با تابانیدن یک باریکه‌ی نور به آن، این باریکه می‌تواند تحت زوایای خاصی وارد موجبر شود [۱۹] و یکی از مدهای موجبر را تحریک کند (هر مد موجبر جوابی است برای معادلات ماکسول در فیلم موجبر). اگر معادلات ماکسول در موجبر فقط یک جواب (به طور مشابه یک زاویه برای ورود به موجبر) داشته باشند، آن موجبر را تک مده و اگر بیش از یک جواب برای معادلات ماکسول وجود داشته باشد آن موجبر را چند مده گویند. زوایایی که تحت آنها موج

^۱Total Internal Reflection Fluorescence microscopy

^۲Quantum Dots

^۳Interface

^۴Grating

الکترومغناطیسی وارد موجبر می‌شود به ضخامت فیلم موجبر، پریود گریٹینگ، طول موج نور فرودی و ضریب شکست فیلم موجبر و ضریب شکست گریٹینگ بستگی دارد [۲۰].

از این رو یک جایگزین مناسب برای روش TIRFM می‌تواند میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبر (WEFFM) باشد که میکروسکوپی است که مانند TIRFM از میدان میرا برای تحریک فلوروفورها استفاده می‌کند. از WEFFM برای تصویربرداری از فیلم‌های بسیار نازک و سلول‌های زنده که روی سطح موجبر قرار دارند [۱۹]، مطالعه‌ی ناحیه‌ی تماس سلول‌های زنده [۲۱، ۲۲]، دینامیک مربوط به سلول‌ها، تعیین فاصله‌ی سلول از سطح موجبر [۱۹، ۲۲]، بررسی توزیع و غلظت فلوروفورها نزدیک سطح استفاده شده است. در این روش موجبرها که اصلی‌ترین نقش را ایفا می‌کنند به عنوان زیرلایه‌های میکروسکوپی^۱ مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۹]. میکروسکوپ فلورسنس میدان میرای موجبر دارای قابلیت تشخیص نانومتری در راستای قائم است [۲۱]. این بدین معناست که قدرت تشخیص در این میکروسکوپ در مقایسه با سایر انواع میکروسکوپ‌ها که در ابتدا به تعدادی از آنها اشاره کردیم بسیار بالاست.

در اثر هدایت امواج و بازتابش داخلی کلی آن‌ها داخل فیلم موجبر، اگرچه هیچ شارش خالصی از انرژی به محیط سوم وجود ندارد اما باعث تولید یک میدان میرای کوتاه برد در محیط مایع و در نزدیک سطح موجبر می‌شود که فرکانس آن با فرکانس نور فرودی برابر است [۲۳]. شدت این میدان میرا بعد از طی یک طول موج در راستای عمود بر سطح موجبر، تقریباً به صفر می‌رسد.

عمق نفوذ^۲ میدان میرا در لایه‌ی سوم جایی است که در آن بزرگی میدان به ۳۷٪ مقدار آن در سطح می‌رسد. شدت میدان میرا در سطح موجبر به قطبش نور فرودی، زاویه‌ی فرودی، طول موج و ضرایب شکست محیط مایع و فیلم موجبر بستگی دارد. عمق نفوذ میدان میرا که مستقل از قطبش نور فرودی است در حدود ۱۰۰nm است [۲۴].

همانطور که اشاره شد (در تشابه با میکروسکوپ TIRF) از این میدان میرا به عنوان یک منبع روشنایی برای تحریک مولکول‌های فلورسنس موجود در محیط مایع نزدیک سطح مشترک و همچنین مولکول‌های فلورسنس روی سطح سلول استفاده می‌شود [۲۱]. طبیعتاً مولکول‌های فلورسنسی که در فاصله‌ی دورتری از سطح موجبر قرار دارند بعلاوه کاهش شدت میدان، کمتر توسط میدان تحریک می‌شوند. همچنین سیگنال تولید شده توسط یک منبع فلورسنس نیز به طور نمایی و با افزایش فاصله از منبع کاهش می‌یابد [۲۵]. با این عمق نفوذ محدود فقط مولکول‌های نزدیک سطح موجبر تحریک می‌شوند [۱] (کل فلوروفورهای اطراف سلول تحریک نمی‌شوند). همین دلیل، پایه و

^۱Microscopic Substrates

^۲Penetration depth