

Konstruktion av ett konfokalmikroskop för enmolekylspektroskopi

En sammanfattning av examensarbetet:

Construction of a Scanning Laser Confocal
Fluorescence Microscope System for
Single Molecule Detection and Spectroscopy

Av:
Erik Hedlund

E-mail: egh@df.lth.se

Handledare

Docent Ivan Scheblykin,
Lunds Universitet, Avdelningen för kemisk fysik

Institutionen för elektrisk mätteknik, handledare

Johan Nilsson
Lunds Universitet, Lunds tekniska högskola, Institutionen för elektrisk
mätteknik

Examinator

Tomas Jansson
Lunds Universitet, Lunds tekniska högskola, Institutionen för elektrisk
mätteknik



Mikroskop och enmolekylspektroskopi

Inledning

Detta projekt initierades av Ivan Sheblykin på avdelningen för kemisk fysik vid Lunds Universitet. Det gick ut på att skapa en apparat som optiskt skulle kunna detektera och utföra spektroskopiska mätningar på enstaka molekyler av till exempel organiska färgämnen och polymerer.

Optiska mikroskop

Ett mikroskop i dess traditionella bemärkelse är en optisk konstruktion för att ge kraftig vinkelförstoring för en bild av ett objekt. På detta vis har människan sedan mikroskopet uppfanns runt början på 1600-talet haft möjlighet att se föremål långt mindre än hon kan se med blotta ögat. Bland det första man beskådade var jästceller och diverse bakterier och andra mikroorganismer. Därefter började man betrakta allt mindre strukturer och långt senare uppfanns även andra mikroskopkonstruktioner som använde alternativa belysningsmetoder (även elektronstrålar som i elektronmikroskop) eller rent mekaniska metoder som i t.ex. atomkraftsmikroskop.

Ett optiskt mikroskop är en ganska enkel grundkonstruktion, även om de ingående elementen var för sig kan vara väldigt komplicerade optiska system. I figuren nedan visas principen för ett oändlighetskorrigerat mikroskop, detta är den typ av mikroskop som använts i detta projekt.

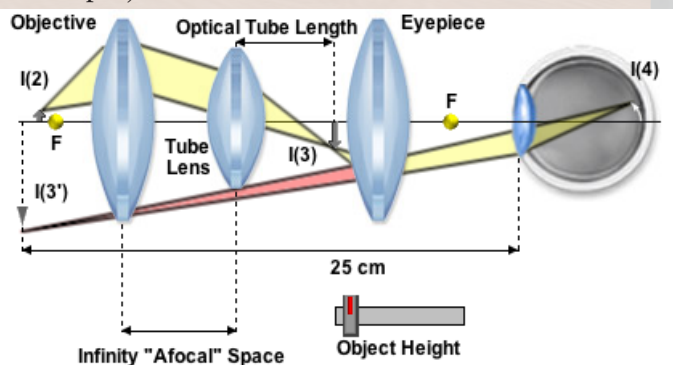


Figure courtesy Olympus Microscope, Kenneth R. Spring, John C. Long and Michael W. Davidson
<http://www.olympusmicro.com/primer/java/components/infinitymicroscope/index.html>

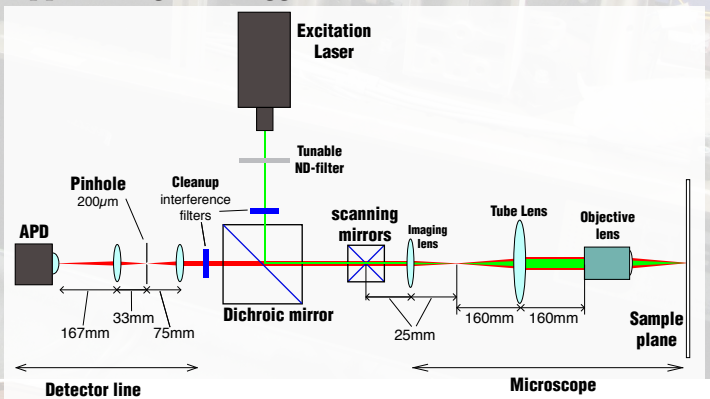
I utrymmet som ovan kallas "Afocal Space" är ljusstrålarna parallella och kan därmed anses vara fokuserade i oändligheten, därav namnet på principen.

Utveckling av det optiska mikroskopet

Fluorescensmikroskopi går ut på att man observerar ljus med en annan våglängd (oftast längre) än den som man belyst objektet med. Det ljus man belyser med exciterar atomer eller molekyler i provet och man betraktar fluorescensen istället för reflekterat ljus eller skuggor efter absorption som i klassiska mikroskop. Man utnyttjar ett

särskilt filter, en så kallad dikroisk spegel, som reflekterar våglängder kortare än ett visst värde, men släpper igenom ljus med längre våglängder. På detta vis kan man även belysa ett prov från samma sida som man betraktar provet.

Ytterligare en utveckling är konfokalmikroskopet, denna utveckling är principen som använts i detta projekt. Det innebär att man efter avbildningsoptiken (även kallad okular) fokuserar ljuset från ett enstaka fokalplan genom en mycket liten bländare (en. pinhole). Då kan man avbilda en enstaka punkt i rummet på en detektor. Genom att skanna av ett område punkt för punkt kan man på detta vis bygga upp en bild av ett två- eller tredimensionellt område, beroende på om man väljer flytta fokus genom provet eller inte. Man kan få mycket högre känslighet med detta system än om man skulle avbildat hela området på en gång, t.ex. med en CCD-kamera. På bilden nedan visas schematiskt den uppställning som byggdes.



Att avbilda enstaka molekyler

Allteftersom vår skicklighet i att skapa optiska komponenter såsom linser och speglar blivit allt större genom åren närmade man sig och kom förbi gränsen för när det inte längre är instrumentets toleranser som begränsar den maximala förstoring man kan få med ett mikroskop utan de rent fysikaliska fenomen som ljus uppvisar. Detta betyder rent praktiskt att den minsta punkt man kan avbilda, eller omvänt, koncentrera en ljusstråle till avgörs av formeln:

$$d_{min} = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA}$$

Där λ betyder *numerisk apparatur*, som är ett värde på de vinklar som en lens (objektivet) kan ta emot ljus inom. Det är beroende på brytningsindex, n , i det medium ljuset passerar genom på väg från linsen till des fokalplan.

$$NA = n \cdot \sin(\text{vinkeln})$$

Detta betyder t.ex. att om man skall fokusera ljus med en våglängd om ca en halv mikrometer genom ett objektiv med $NA=0.6$ kommer den minimala storleken på ljusfläcken vara runt en mikrometer i diameter. Detta

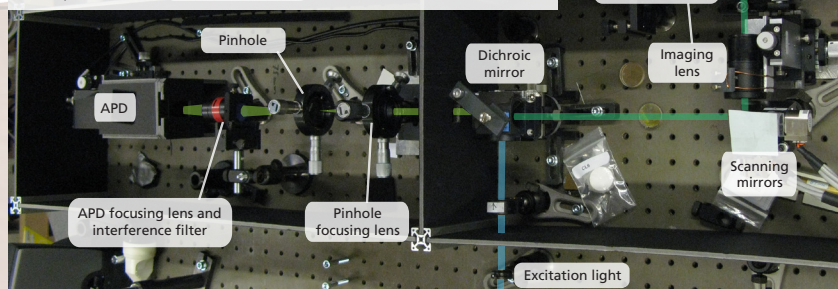
gäller såklart på andra hållet också och man förstår enkelt att det i allt väsentligt betyder att den absolut minsta *struktur* man kan se med ett optiskt mikroskop vid den våglängden motsvarar denna storlek.

Det är dock möjligt i vissa specialfall att delvis bortse ifrån denna begränsning om man väljer förutsättningarna på rätt sätt. Det är vad som gjorts i detta projekt. Då det är så att även om ett ljusutsändande objekt är mindre än d_{min} ovan kommer det att se ut att vara så stort vid avbildning. En molekyl av en polymer som heter MEH-PPV som användes som demonstrationsprov har molekyler som är några enstaka nanometer i diameter, det vill säga en tusendel av ljusfläcken. Men genom att sprida ut de molekyler man är vill undersöka så glesat man är säker på att de befinner sig (åtminstone i allmänhet) en och en kan man observera ljus utsänt av enstaka molekyler.

Genom att använda en laser som ljuskälla i mikroskopet så kan man välja en mycket precis våglängd på excitationsljuset och man kan också skapa en mycket smal stråle som behåller sin diameter över långa sträckor (låg divergens). Dessa egenskaper ger fördelar när ljuset skall fokuseras genom mikroskopet.

Datorstyrningen av systemet

Genom att placera två ställbara speglar i avbildningslinsens (okularets) brännpunkt kommer de två speglarna enkelt kunna styra, bara genom att ändra laserstrålens vinkel in mot avbildningslinsen var på provet ljuset skall fokuseras. Det är här den

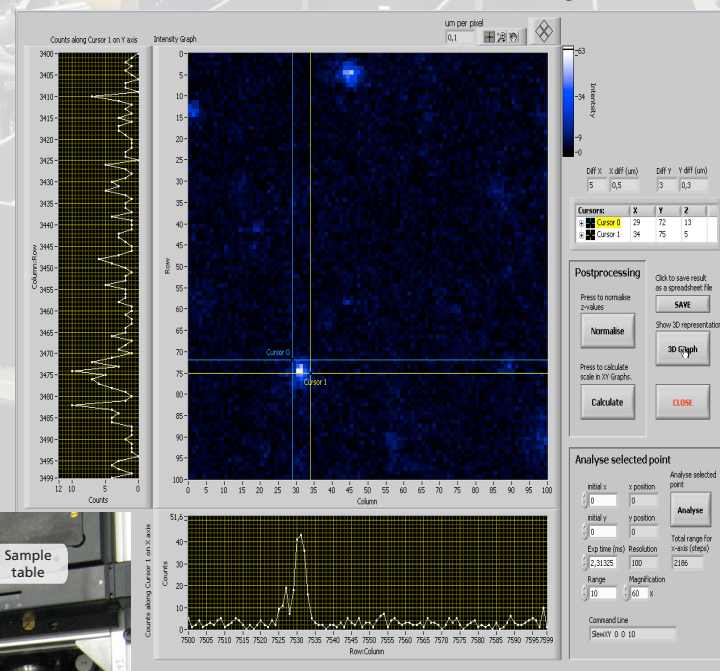


stora fördelen med att systemet är byggt som ett konfokalmikroskop då den andel rödsdiffrat ljus från fluorescensen som faller tillbaka genom mikroskopet exakt samma väg som det insända ljuset kommer passera den dikroiska spegeln och fokuseras genom bländaren på en känslig fotodetektor, en *lavinfotodiod* eller APD (en. Avalanche Photo Diode).

De båda speglarna som skannar ljuset och detektorn över provet längs varsin axel styr ifrån en dator över ett seriegränssnitt (en USB-port används). Datorn är en vanlig arbetsstation med ett särskilt digitaliseringskort (ett s.k. DAQ-kort) som kan räkna högfrekventa pulståg, som signalen från APD:n.

Hela systemet styrs från ett och samma program, ett specialiserat avbildningsprogram skrivet i

LabVIEW, ett grafiskt programmeringsspråk. Programmet ger ett flertal möjligheter att ta upp och spara bilder av provet och att rikta in laserstrålen mot specifika punkter av intresse. Vid val av enstaka punkter kan även tidsserier (som kan sparas) tas upp för att visa på en punkts beteende vid en längre tids belysning. I bilden nedan visas användargränssnittet så som det ser ut när en enstaka MEH-PPV-molekyl lyser upp när den blir belyst av lasern (observera att bilden egentligen är monokrom, endast intensitet detekteras, inte färg).



Resultat

Detta projekt visade att det är möjligt att bygga ett konfokalmikroskop användbart för att detektera enstaka molekyler av färgämnen avsatta tillräckligt tunt på ett vanligt provglas. Standardkomponenter från Olympus användes för mikroskopdelen, tillsammans med några hembyggda fästen och smärre modifieringar av delarnas infästningar.

Även den dikroiska filterkuben som användes var en lätt modifierad standardkomponent för fluorescensmikroskopi från Olympus. Övriga optiska komponenter var standardlinser, speglar, bländare och fästen för montering på optikbord.

Mjukvaran är 100% specialanpassad för ändamålet och körs i LabVIEW-miljö. Utöver ett digitaliseringskort från National Instrument på en PCI-plats användes i övrigt standardhårdvara i styrdatorn. Spegelarna styrs av extern specialhårdvara från GSI Lumonics styrt över ett vanligt RS232-gränssnitt.

Hela rapporten kan laddas ner från:
http://www.df.lth.se/~egh/Diploma_project

