

Determinación de características ópticas del SPIM para la medición de anisotropía de muestras biológicas



Estudiante: Sebastián Schiavinato
Director: Dr. Hernán E. Grecco
Codirectora: Dr. Andrea V. Bragas

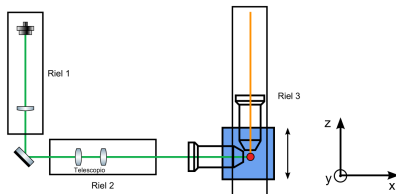
Laboratorio 6 y 7, DF, FCEyN, UBA

Julio 5, 2016

Motivación del proyecto

En el Laboratorio de Electrónica Cuántica (LEC) se dispone de un microscopio SPIM

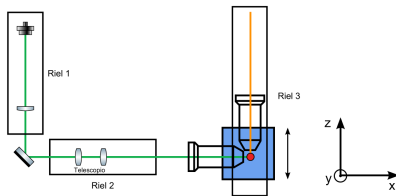
- Utiliza muestras con fluoróforos
- Con una hoja de luz (lightsheet) ilumina un plano de la muestra por vez
- Disminuye el photobleaching (blanqueo de los fluoróforos)
- Permite reconstruir una imagen en 3D de la muestra



Motivación del proyecto

La construcción de este microscopio requiere determinar

- Perfil del haz, que cambia el tamaño de la hoja del haz
- Espectro del haz, determina los flouoroforos a utilizar
- Polarización del haz, que si es lineal permite hacer mediciones de anisotropía de los fluoroforos



Para calibrar el SPIM, se construyó el siguiente instrumental portátil

- Perfilador
- Polarímetro

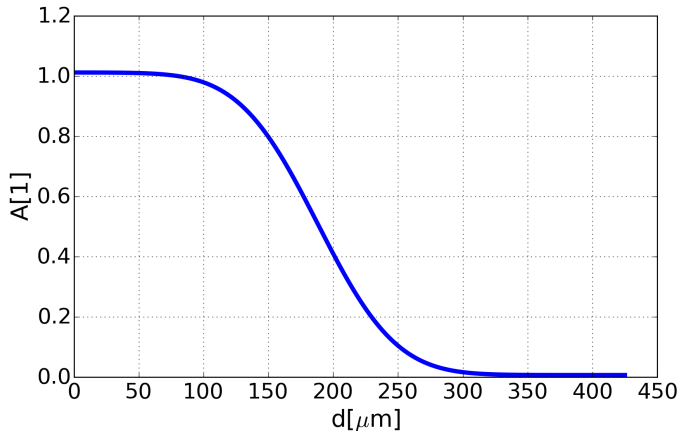
Concepto del perfilador

- Determinar el perfil especial del haz en un plano
- Al desplazarse permite determina la divergencia del haz.
- Perfiladores con cámaras CCD. Sensores muy caros
- Perfiladores integradores. Complejidad mecánica

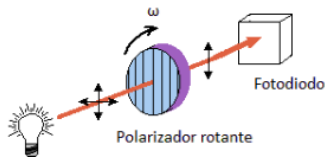


Concepto del perfilador

Para haces gaussianos (la mayoría), el perfil de intensidades, es decir la integral del perfil, es la función error



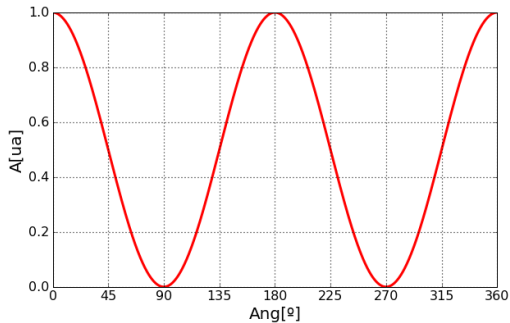
Concepto del polarizador



- Permite determinar eje mayor y eje menor de polarización elíptica.
- Permite identificar polarización circular.
- Depende de la precisión de rotación del motor, pero puede mejorarse con mecánica adecuada.

Concepto del polarizador

Ley de Malus

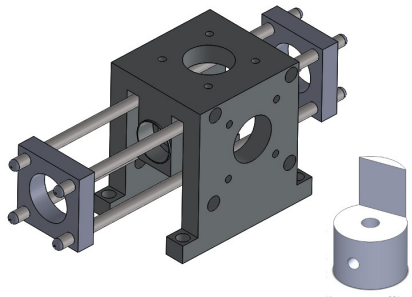


$$\alpha = \frac{\text{máx} - \text{mín}}{\text{máx} + \text{mín}} = \begin{cases} 1 & \text{si lineal} \\ 0 & \text{si circular} \\ (0, 1) & \text{si elíptica} \end{cases}$$

Perfilador en Laboratorio 6

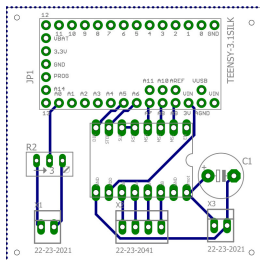
Piezas mecánicas del perfilador

- Diseño autoportante.
- Tambor de perfilación permite medir en sistema Cage de Thorlabs. Permite medir divergencias importantes
- Tambor impreso en 3D.
- Motor paso a paso NEMA 17. 200 pasos por vuelta. Máximo 15rps.



Perfilador en Laboratorio 6

Electrónica de adquisición

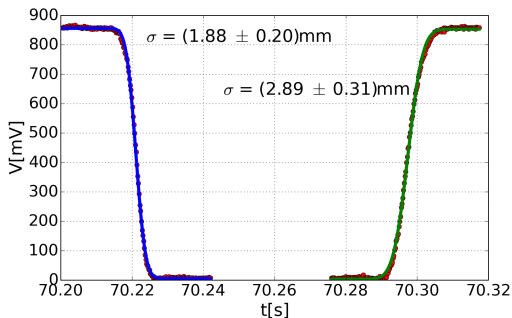


- uC Teensy v3.2. CPU 96MHz, y 64KiB RAM. ADC 1Msps max.
- Pololu A4988. Motores hasta 1.5A por fase
- Buffer de puerto serie de 1200 datos
- Software de ajuste en continuo cambio. Hecho en Python
- Máxima adquisición de 12 perfiles por segundo, limitación del uC/Software.

Mediciones de calibración

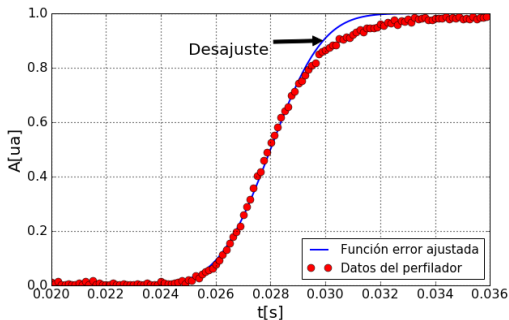
Mediciones de calibración

- Medición a salida de colimador F220FC.
- Diferencia apreciable de tamaño de haz entre transiciones.
- Es de origen mecánico, soporte no ajusta correctamente el motor



Mediciones de calibración

Mediciones de calibración

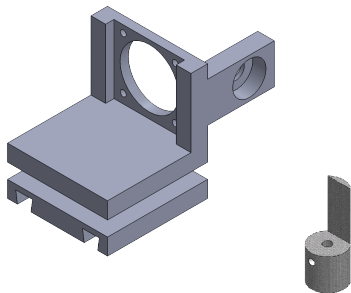


- Desajuste entre función error y datos al desobturar haz.
- Fotodiodo con resistencia de carga enorme genera respuesta en frecuencia pobre.
- Es necesario amplificar señal del fotodiodo

Perfilador en Laboratorio 7

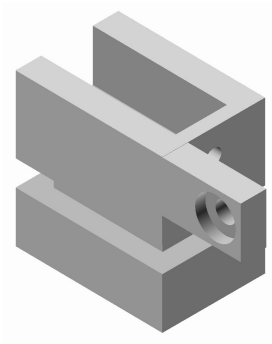
Primera iteración mecánica

- Soporte adosable a la mesa óptica por pernos. Fácil colocación
- Motor encastrado en soporte. No hay artefactos mecánicos
- Tambor de metal con superficie no reflectante
- No permite medir fácilmente en el otro eje. Habrá otra iteración



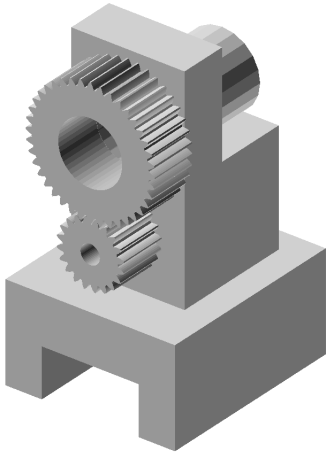
Perfilador en Laboratorio 7

Segunda iteración mecánica.



- Motor NEMA 8, reduce un 500 % el tamaño.
- Soporte fácil de colocar sobre la mesa óptica y sobre un soporte en altura
- Tambor reimpreso en plástico

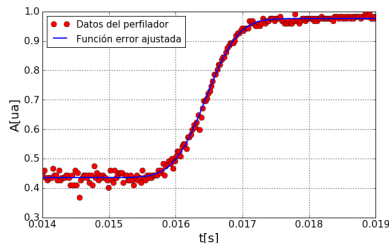
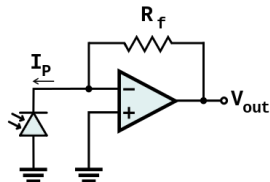
Mecánica del polarimetro



- Motor NEMA 8 mueve el engranaje inferior paso a paso
- Utiliza electrónica creada para el perfilador. Mide en cada paso del motor
- Hecho con impresión 3D en plástico

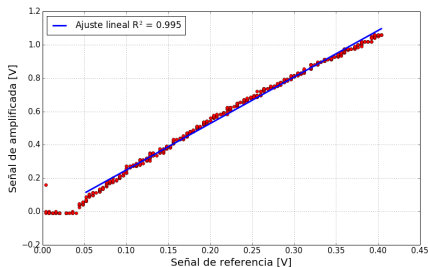
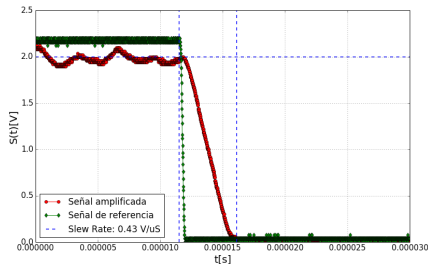
Electrónica de adquisición

- Se mide con amplificador de corriente Stanford SR750 y se observa mejoras substanciales
- Implementado amplificador de transimpedancia con fotodiodo no polarizado.
- Mejor respuesta en frecuencia y ajusta correctamente una función error.



Calibración de amplificador

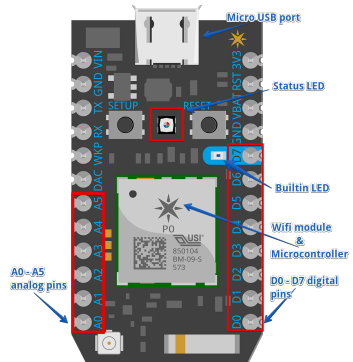
- Amplificador con LM358.
Con fuente simple
- Respuesta al escalón de $0,4\text{V } \mu\text{s}^{-1}$. 4 veces más grande de la necesaria
- Rango lineal bastante amplio, pero no acusa corriente nula. Se puede buscar otro amplificador. Suficiente para la aplicación



Generación de sensores portátiles

Spark Photon

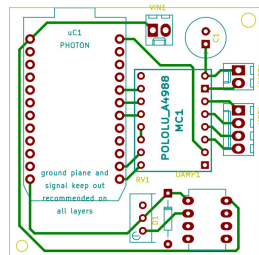
- ARM Cortex M3 120MHz con stack WiFi.
- 128KiB RAM y 1MiB FLASH
- Programación en la nube, permite actualizaciones OTA.
- API de programación más poderosa. C++ por defecto
- Software implementado con licencia libre, puede ser adaptado



Generación de sensores portátiles

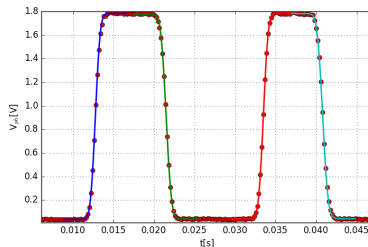
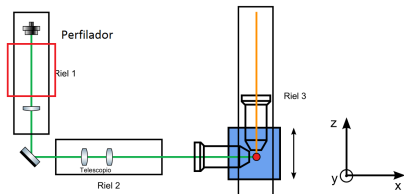
Resultados con este uC/Software

- Se pudo mover el motor hasta 30RPS. PWM mejor implementado
- Adquisición de datos (del uC) cada $10\mu\text{s}$ o 100ksps. Más de lo necesario
- Conexión TCP ya resuelta, cada 0,1s se obtiene 4000 datos.
- Software de adquisición hecho enteramente en Python, libre, con interfaz de usuario gráfica



Mediciones con el perfilador

Calibración del instrumento, medición del colimador F280FC del SPIM

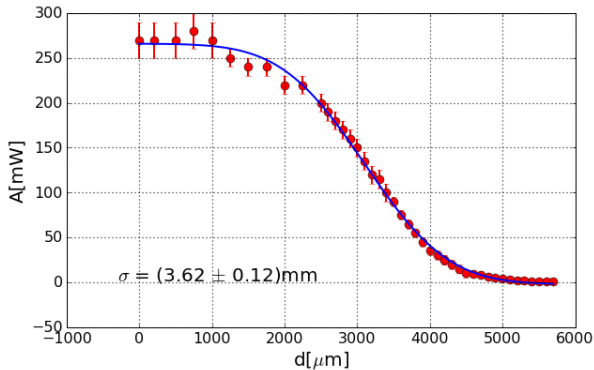


- Inicio del riel:
 $\sigma = (3,03 \pm 0,15) \text{ mm}$

- Fin del riel:
 $\sigma = (3,02 \pm 0,18) \text{ mm}$

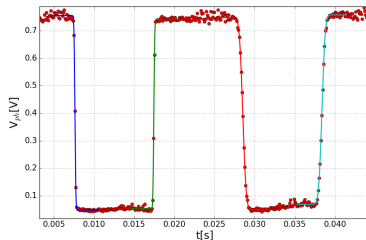
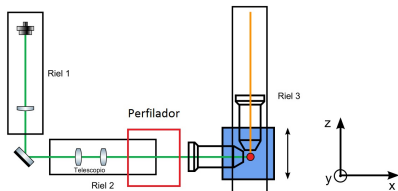
Mediciones con el perfilador

Medición manual del colimador F280FC del SPIM



Mediciones con el perfilador

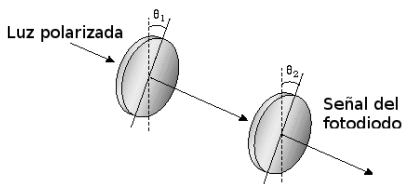
Haz en el telescopio del SPIM



Medición a
 $d \approx 80$ mm del fin del telescopio
 $\sigma_1 = (0,55 \pm 0,02)$ mm
 $\sigma_2 = (2,11 \pm 0,05)$ mm

Mediciones con el polarimetro

Calibración de láminas polarizadoras

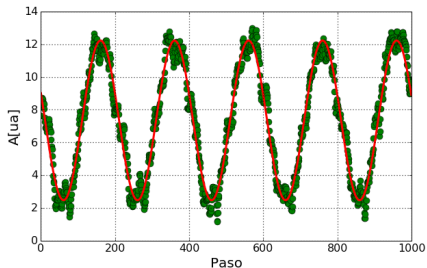


- Con dos polarizadores móviles se puede determinar los parámetros del material polarizador
- El plástico usado tiene la siguiente matriz de transmisión
$$\begin{pmatrix} 0,5 & 0 \\ 0 & 2 \times 10^{-6} \end{pmatrix}$$
- Permite polarizar, pero elimina un 50% de la señal en el máximo.

Mediciones con el polarimetro

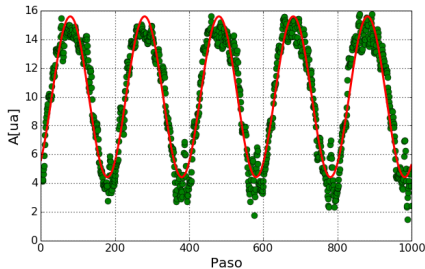
Medición de polarización par láser azul DHOM-M-473

Antes de la fibra óptica



$$\frac{\text{máx} - \text{mín}}{\text{máx} + \text{mín}} = (0,83 \pm 0,39)$$

Después de la fibra óptica



$$\frac{\text{máx} - \text{mín}}{\text{máx} + \text{mín}} = (0,83 \pm 0,31)$$

Conclusiones

Del polarizador

- El perfilador mide exitosamente el haz, con un error del %5, comparable con la medición manual
- Se pudo caracterizar el haz a salir de la fibra y en el telescopio correctamente
- El perfilador fue capaz de medir la divergencia con solo un set de mediciones.
- Para medir la salida del telescopio habrá que diseñar un perfilador más compacto.

Conclusiones

Del polarimetro

- La lámina polarizadora utilizada está lejos de ser un polarizador perfecto, pero es funcional a la aplicación
- Se midió la polarización antes de acoplar en fibra y después de acoplar en fibra y no se observó cambio de polarización
- Esta medición es de importancia fundamental para medir anisotropía de flouoroforos en el SPIM

Proyecto SOMA (Sistema de OptoMecánica Abierta)



- Plataforma abierta de instrumental opto-mecánico
- Diseño con énfasis en la reproducibilidad, con tecnología de impresora 3D o mecanizado automático.
- Electrónica libre, controlada por software creado con tecnologías libres.

Página del proyecto: <http://lec.df.uba.ar/soma>

Gracias