

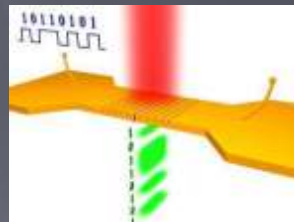
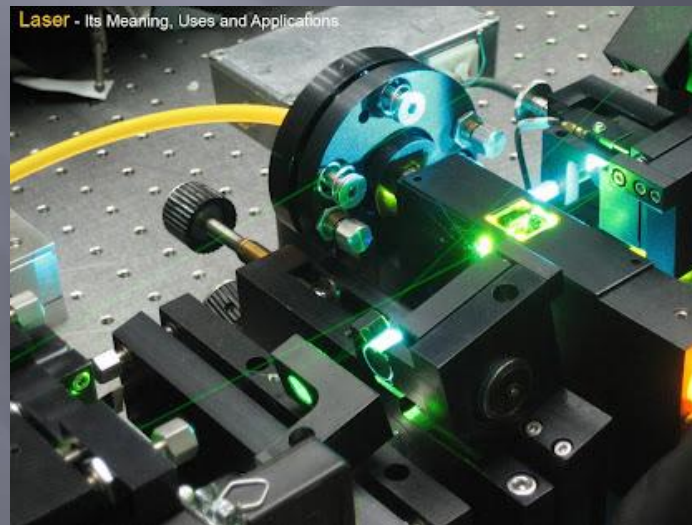
ΟΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

ΠΡΟΣΥΝΕΔΡΙΑΚΗ ΗΜΕΡΙΔΑ
17 ΜΑΪΟΥ 2012

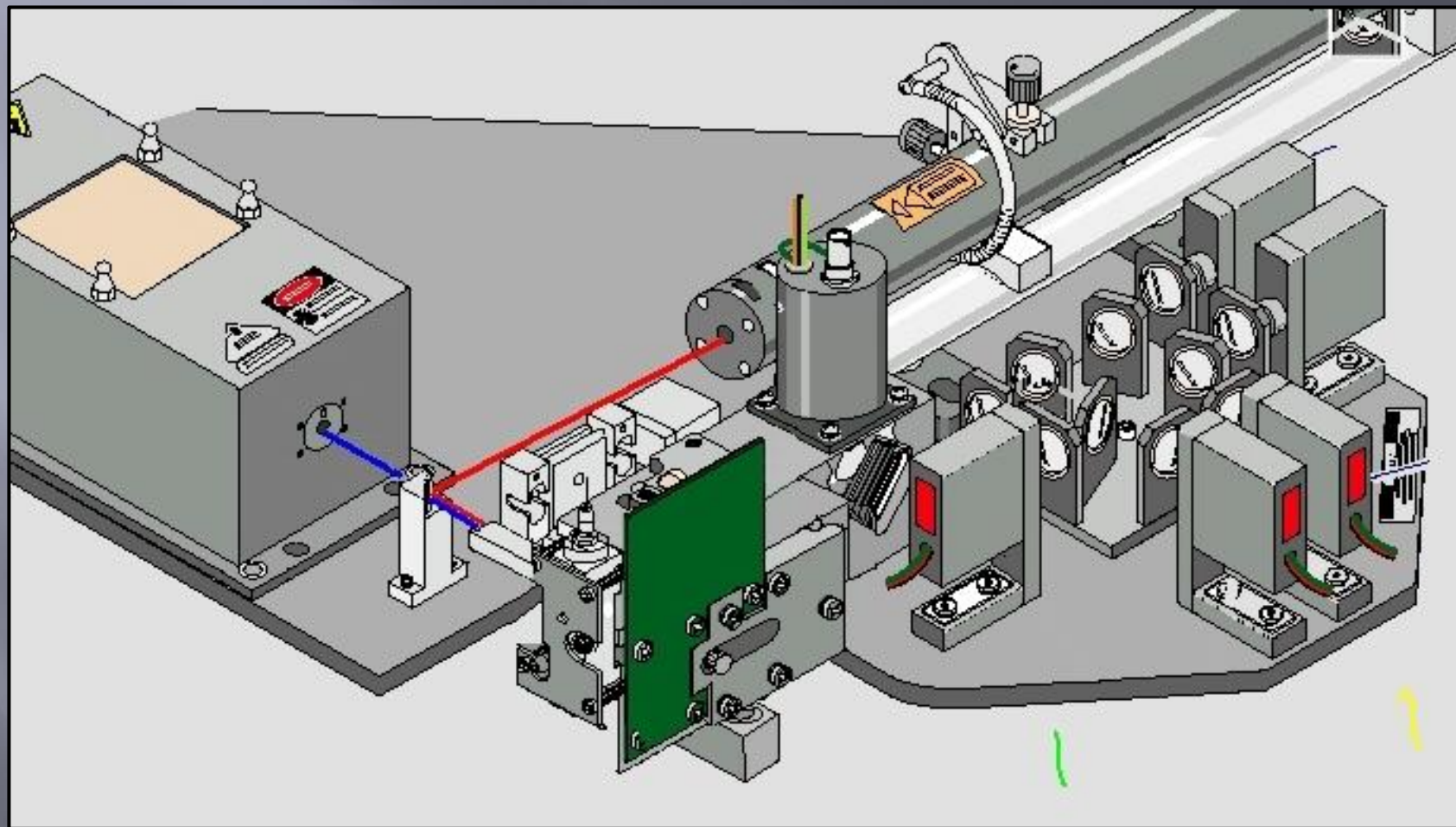
ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ Χημικός, PhD

ΣΠΥΡΟΣ ΣΠΥΡΙΔΑΚΗΣ Χημικός, MSc

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗΣ ΡΟΗΣ



ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΠΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ



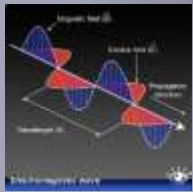
Η ΦΥΣΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ



$$E=h\nu$$

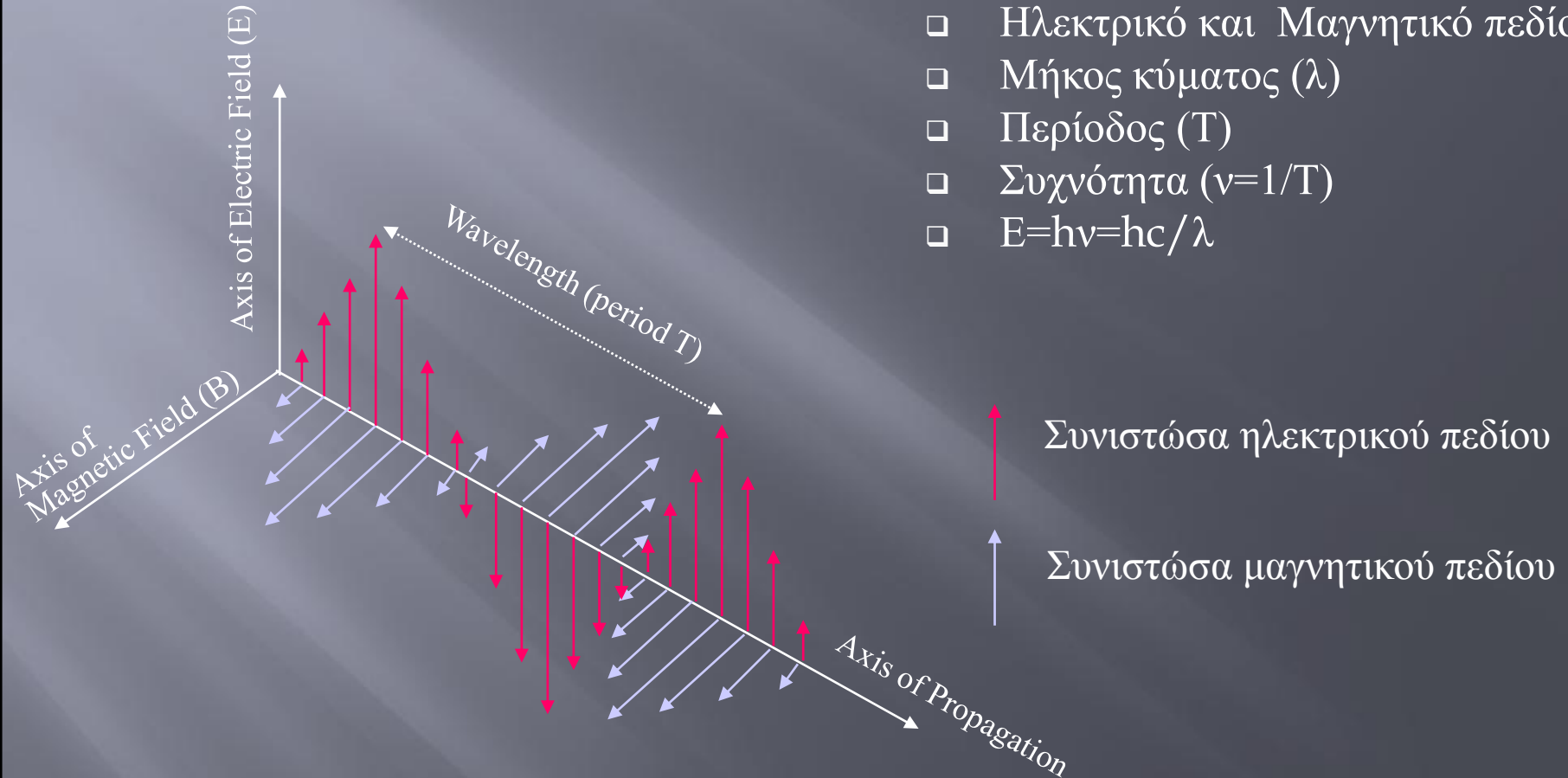
h :σταθερά του Planck

ν : συχνότητα κύματος



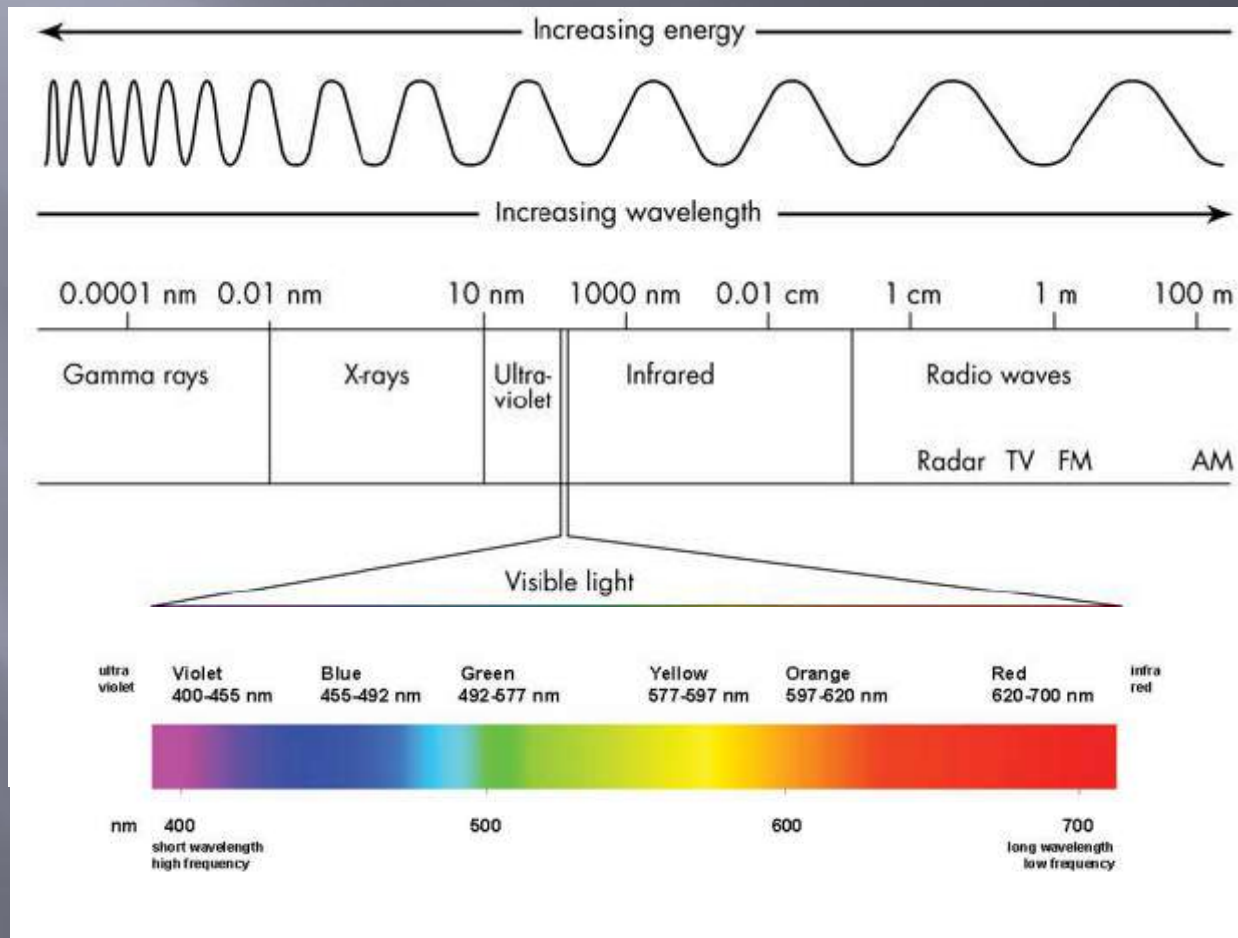
ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΚΥΜΑ

- Ηλεκτρικό και Μαγνητικό πεδίο
- Μήκος κύματος (λ)
- Περίοδος (T)
- Συχνότητα ($\nu=1/T$)
- $E=h\nu=hc/\lambda$

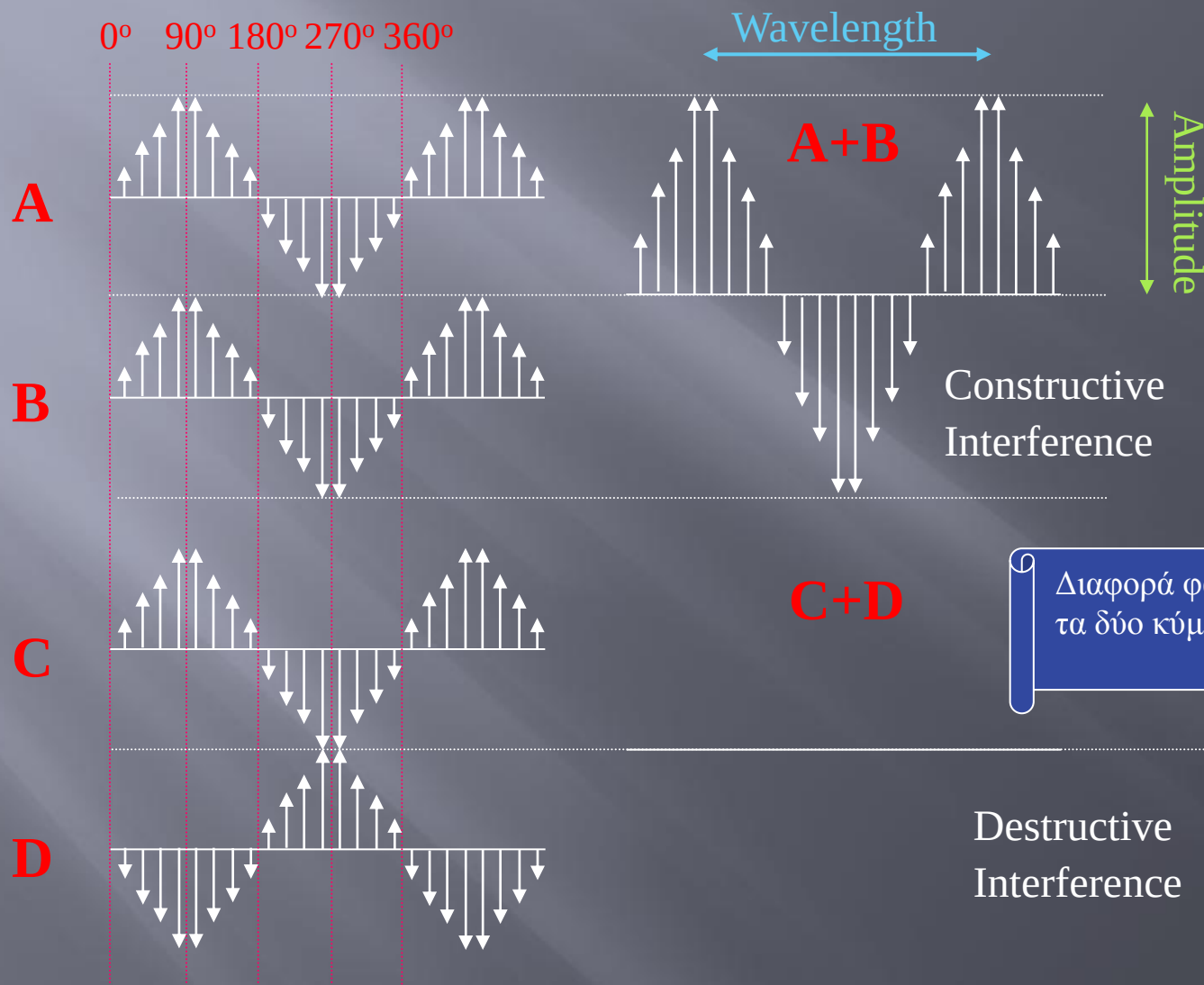


3rd Ed. Shapiro p 78
4th Ed. Shapiro p 104

ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ



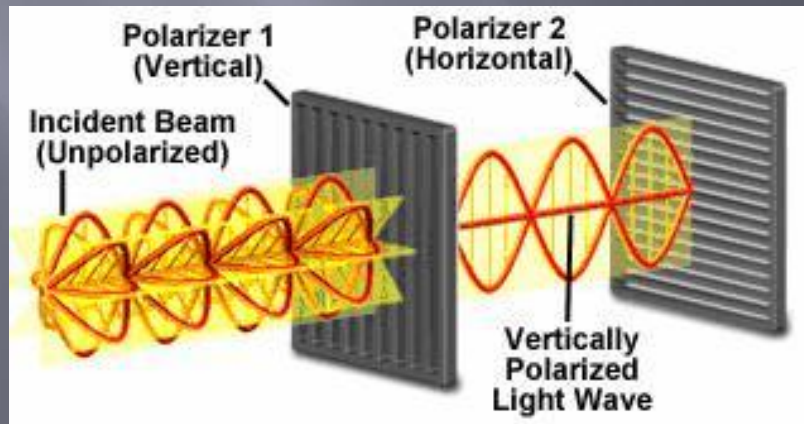
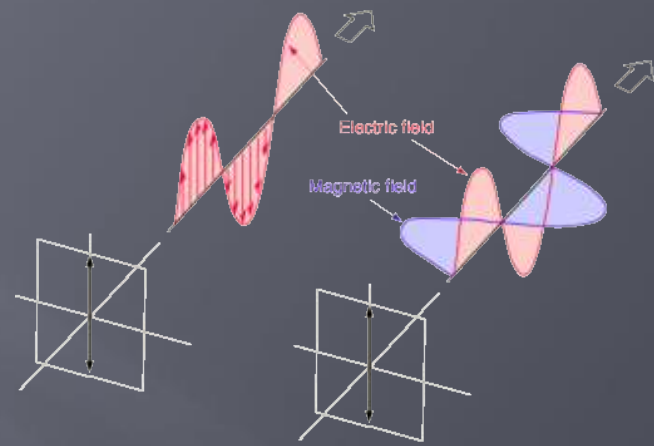
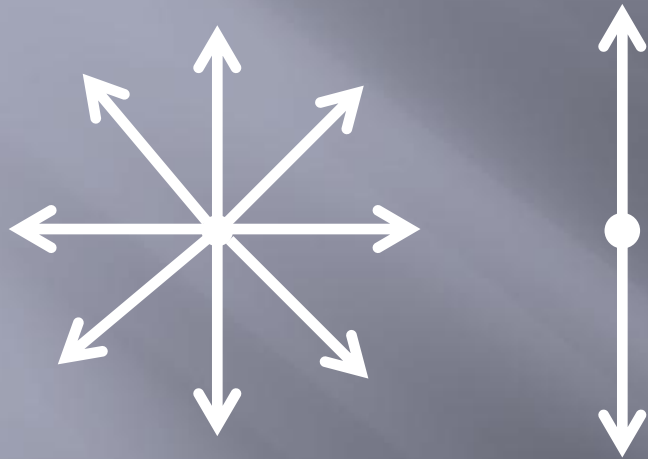
ΣΥΜΒΟΛΗ ΚΥΜΑΤΩΝ



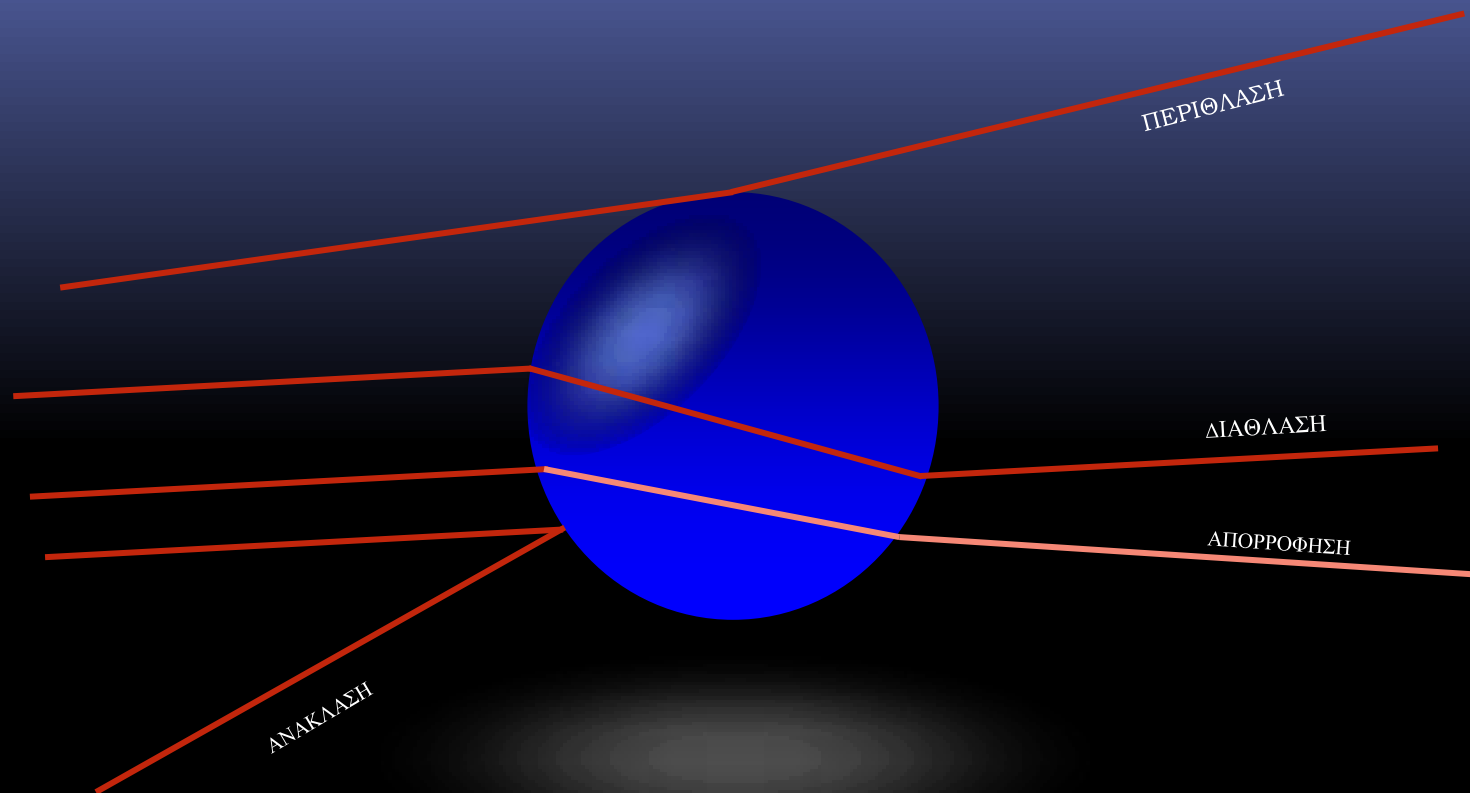
Η συχνότητα του κύματος είναι η ίδια. Το πλάτος ταλάντωσης διπλασιάζεται

Διαφορά φάσης 180° (2π radians)
τα δύο κύματα αλληλοαναιρούνται

ΠΟΛΩΣΗ ΦΩΤΟΣ

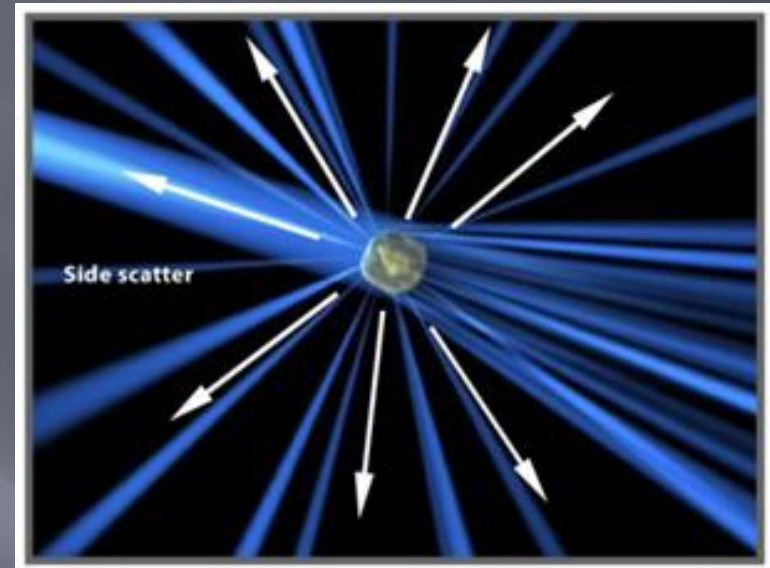
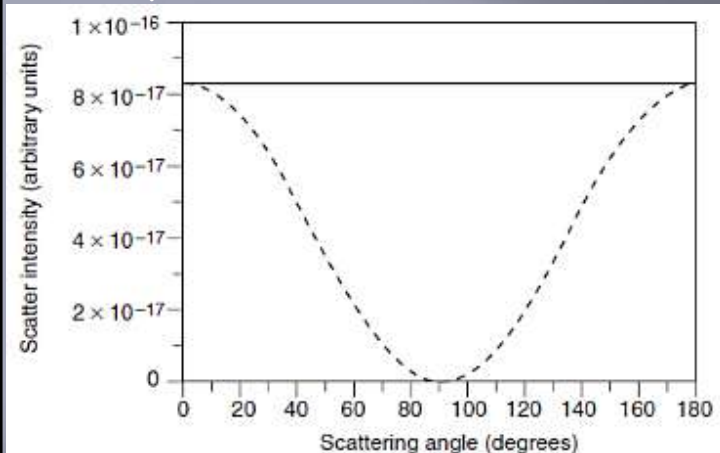


ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ



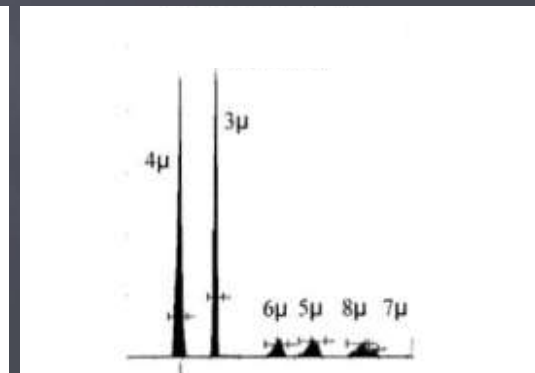
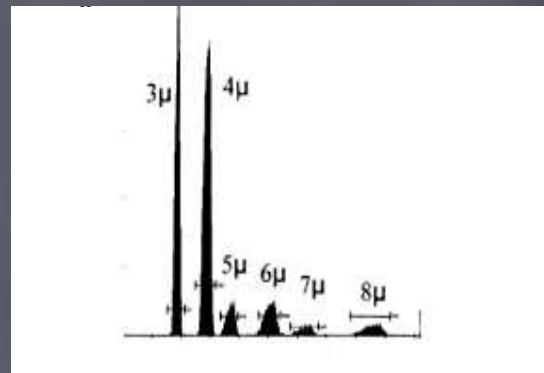
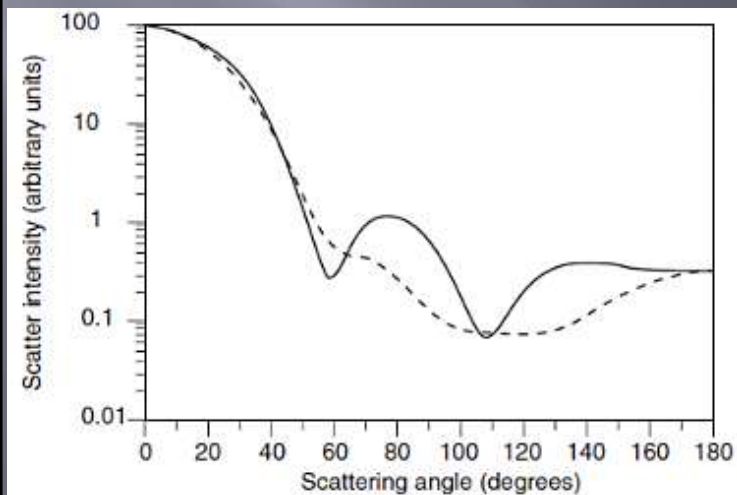
ΣΚΕΔΑΣΜΟΣ

Θεωρία Rayleigh
Σωματίδια $< \lambda$ nm

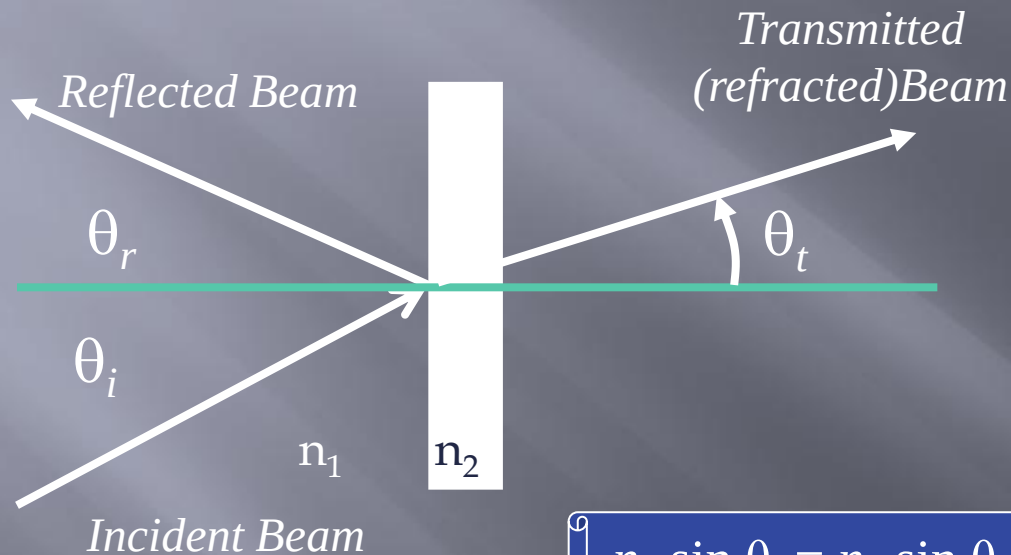


Θεωρία Mie
Σωματίδια $> \lambda$ nm

$$i_{par} = \frac{16\pi^4 a^6}{\lambda^4 r^2} \left| \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right|^2 \cos^2 \theta$$



ΑΝΑΚΛΑΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΘΛΑΣΗ

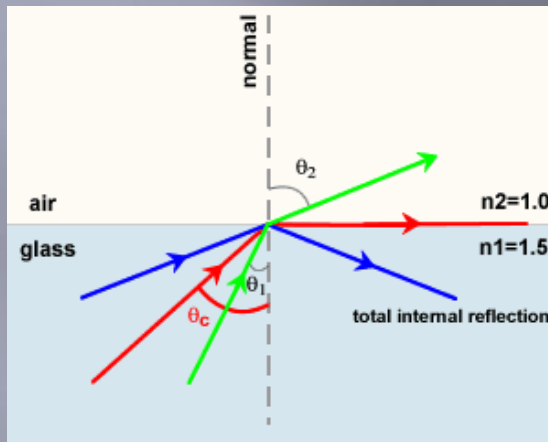


- ▣ **Snell's Law:** Η γωνία ανάκλασης (θ_r) είναι ίση με την γωνία πρόσπτωσης (θ_i) ανεξάρτητα από το υλικό της επιφάνειας
- ▣ Η γωνία διάθλασης (θ_t) εξαρτάται από το είδος του υλικού

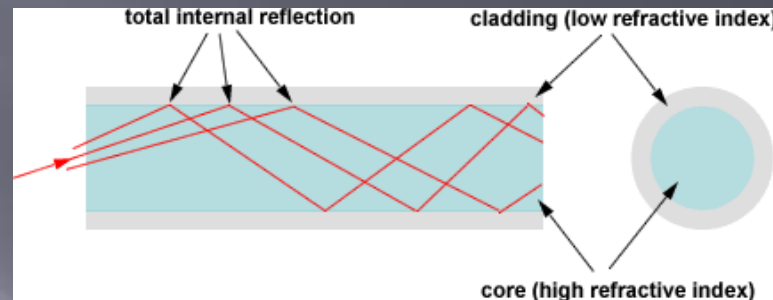
$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_t$$

Η ταχύτητα του φωτός σε υλικό με συντελεστή διάθλασης n είναι c/n

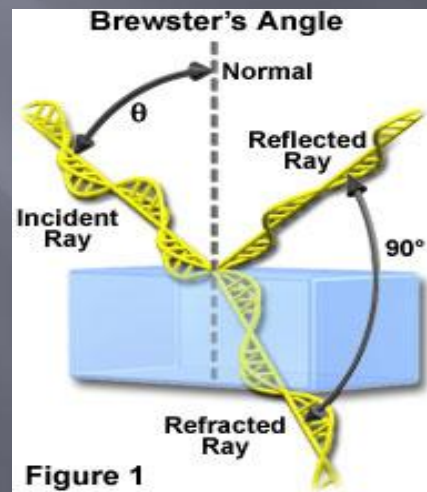
ΟΛΙΚΗ ΑΝΑΚΛΑΣΗ – ΟΠΤΙΚΕΣ ΙΝΕΣ



$$\theta_c = \theta_1 = \arcsin(n_2/n_1)$$



ΠΟΛΩΣΗ ΑΠΟ ΑΝΑΚΛΑΣΗ



$$\Theta = \arctan(n_2/n_1)$$

ΔΙΑΣΠΟΡΑ

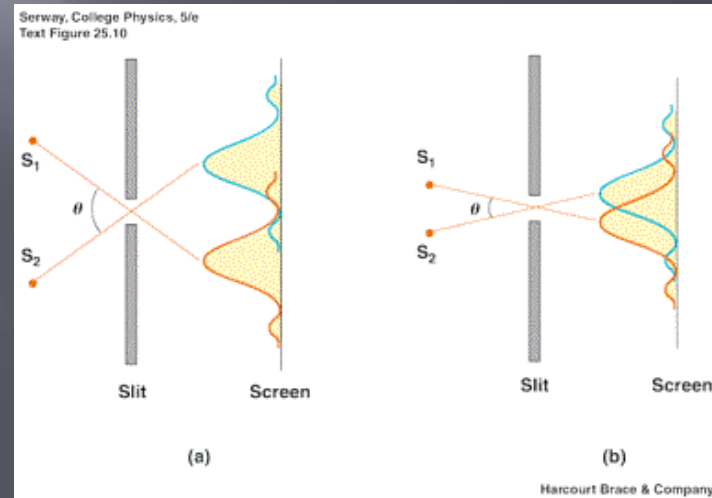
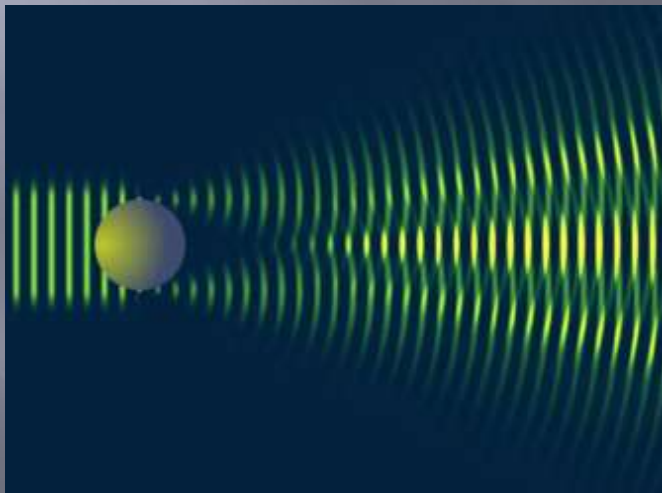
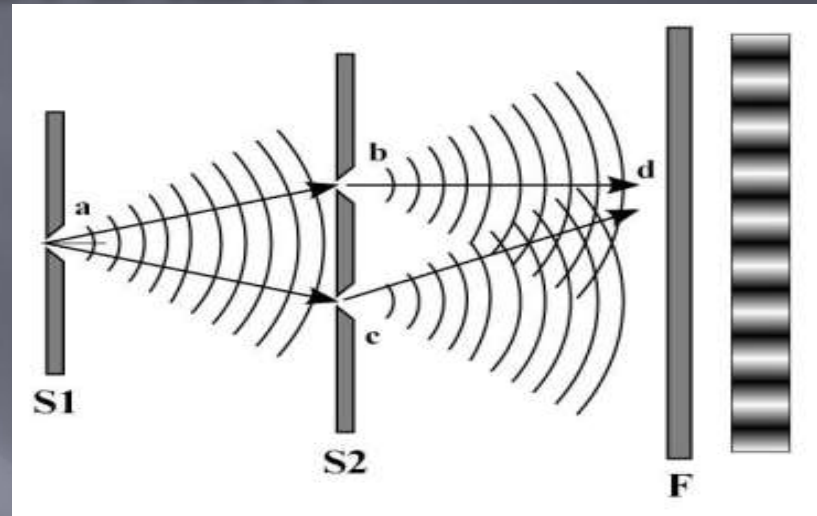
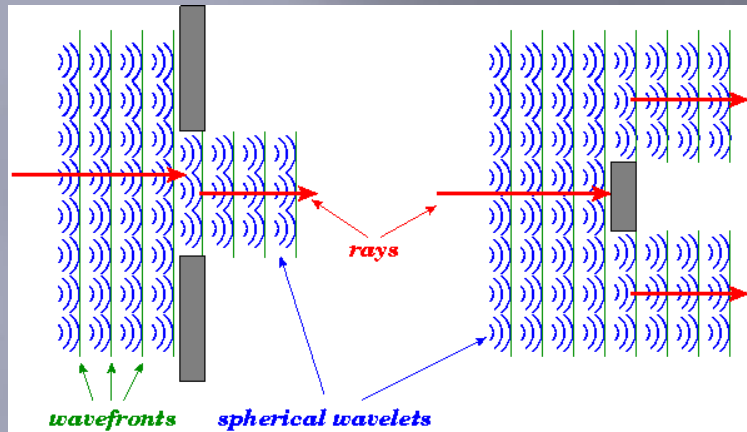
Διάθλαση



Το φως «καμπυλώνεται» και τα χρώματα διαχωρίζονται.

Οι ακτίνες με μικρότερο μήκος κύματος «καμπυλώνονται» περισσότερο.

ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ



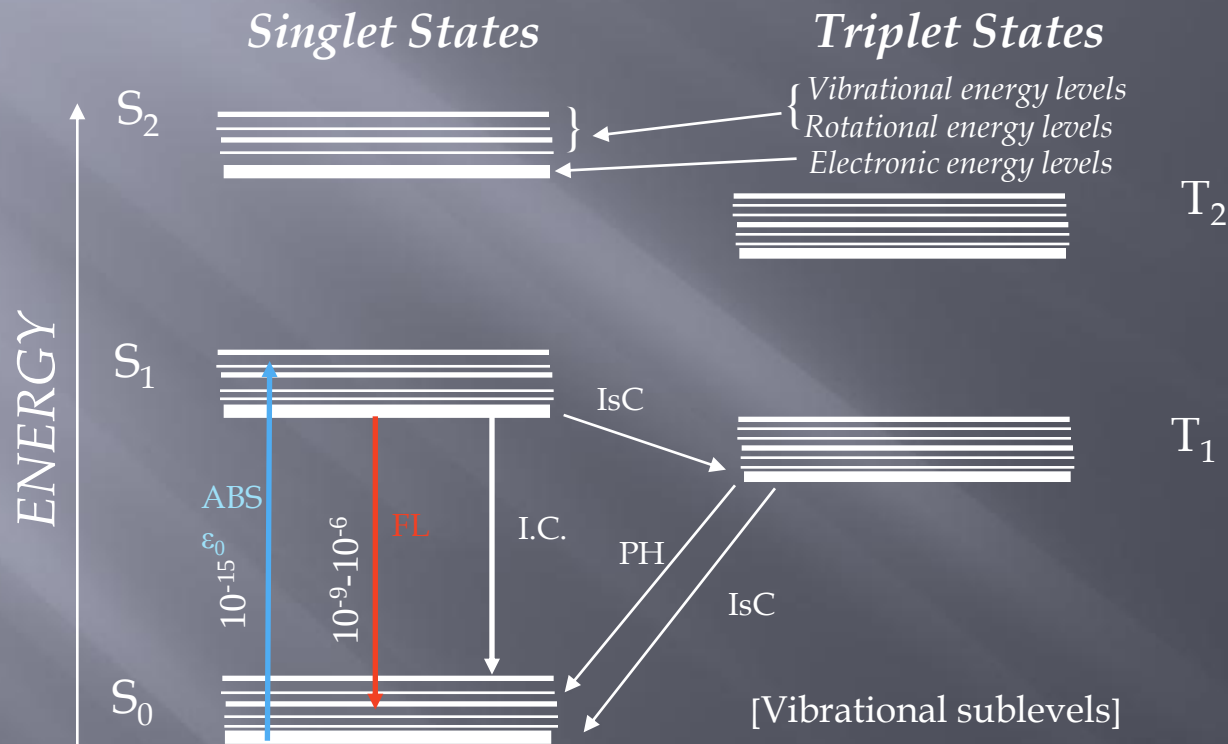
Διακριτική Ικανότητα Φακού

$$\Theta = 1,22\lambda / D$$

D= διάμετρος οπής

ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Jablonski Diagram



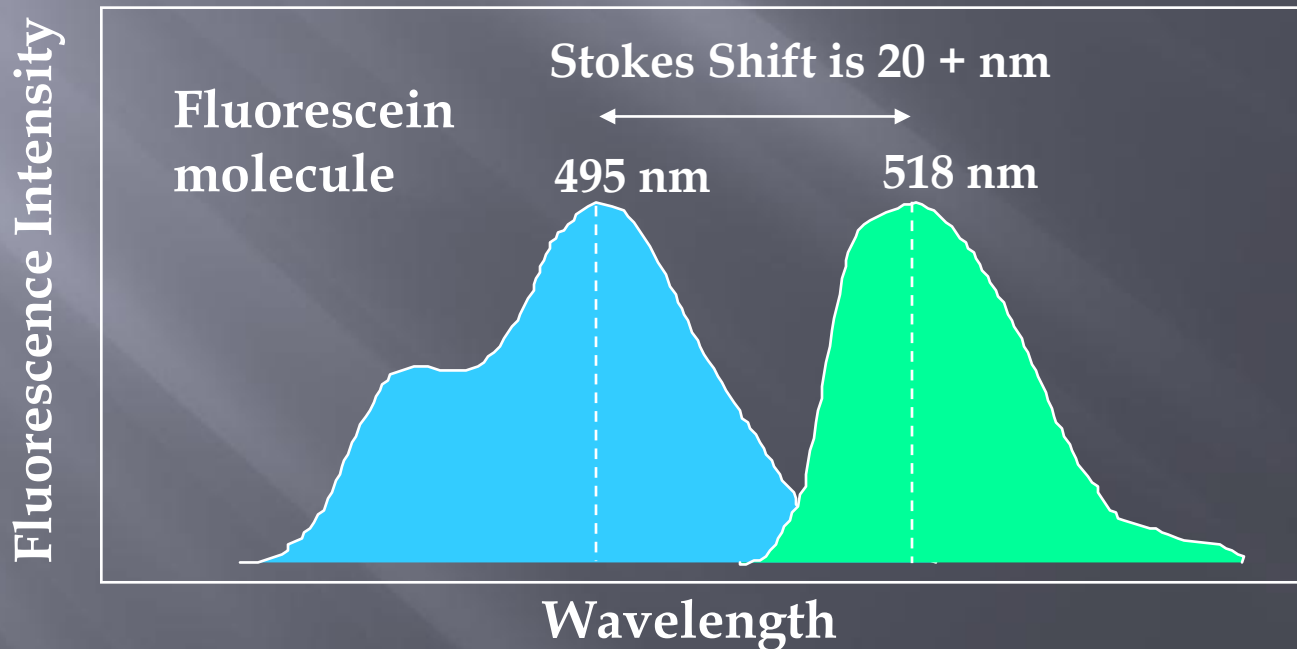
3rd Ed. Shapiro p 87

4th Ed. Shapiro p 112

ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

▣ Stokes Shift

- Η διαφορά μεταξύ του μέγιστου του φάσματος απορρόφησης και του μέγιστου του φάσματος εκπομπής



ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Απόδοση Φθορισμού
(quantum efficiency / yield)

$$\Phi = \frac{\text{Εκπεμπόμενα Φωτόνια}}{\text{Απορροφούμενα Φωτόνια}}$$

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

STOKES SHIFT

ΑΠΟΔΟΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ

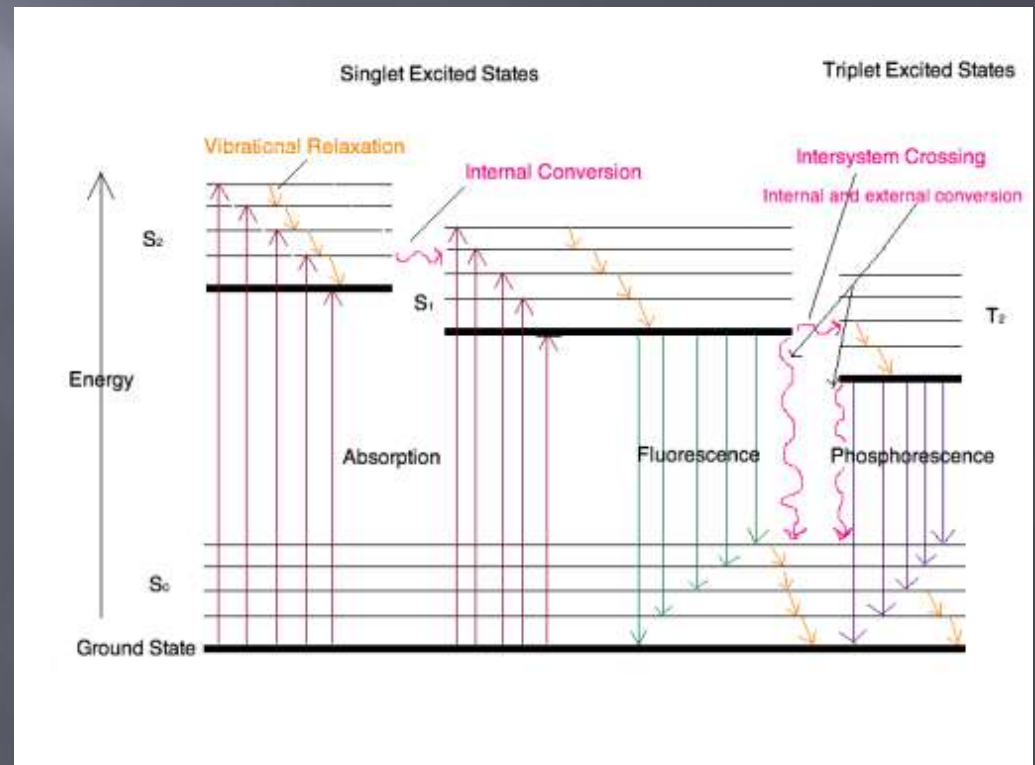
- Απόσβεση Φθορισμού (quenching)/ Environmental effects

Διαμοριακές συγκρούσεις

pH

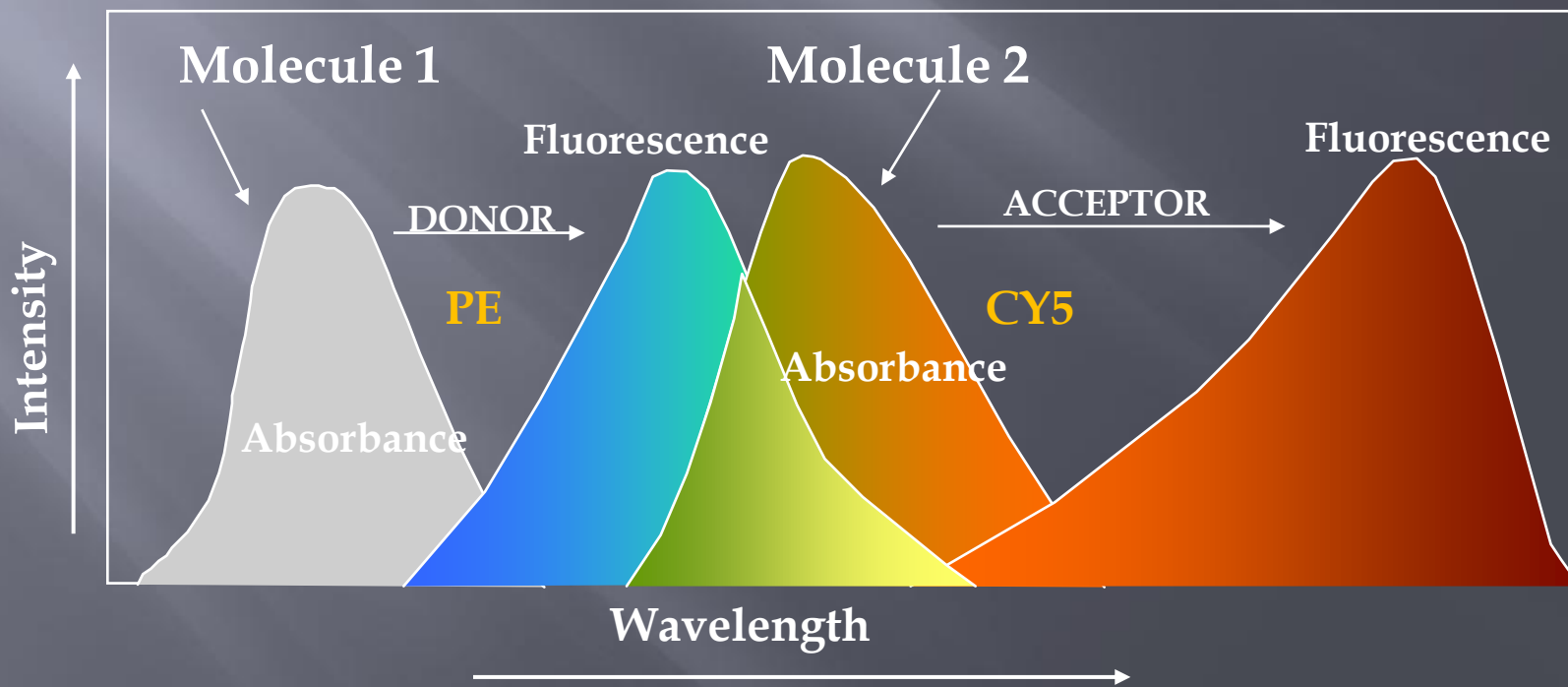
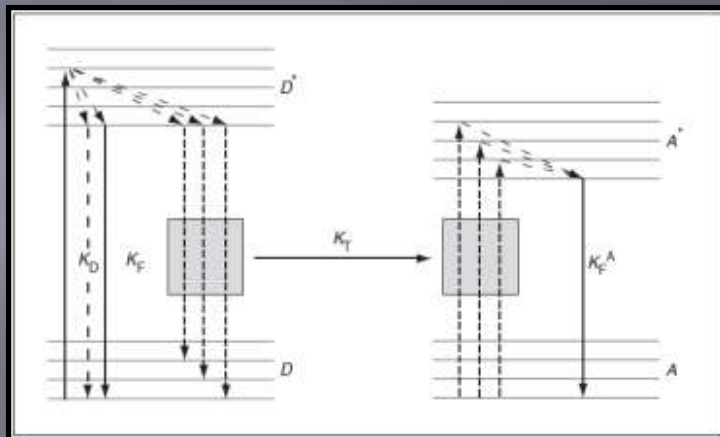
Βαρέα ιόντα

- Bleaching
- Φωσφορισμός (10^{-4} - 10 sec)
- Σκεδασμός Raman

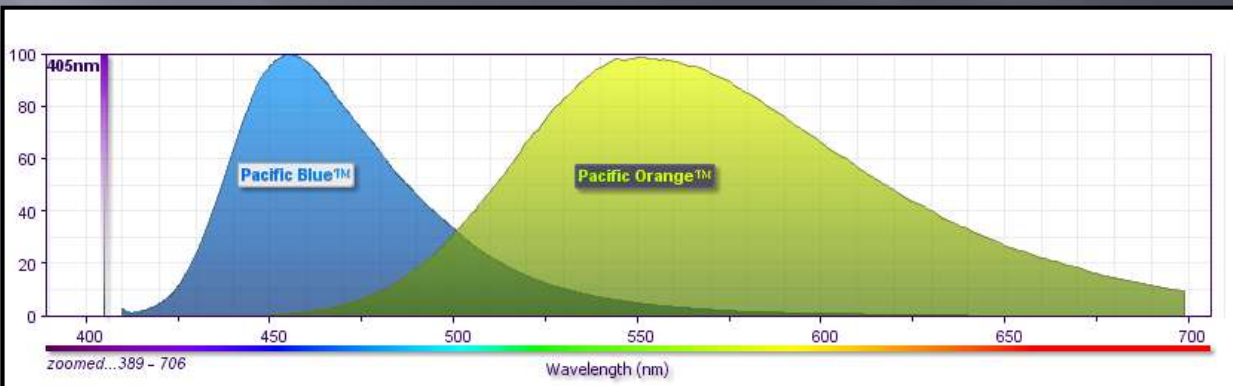
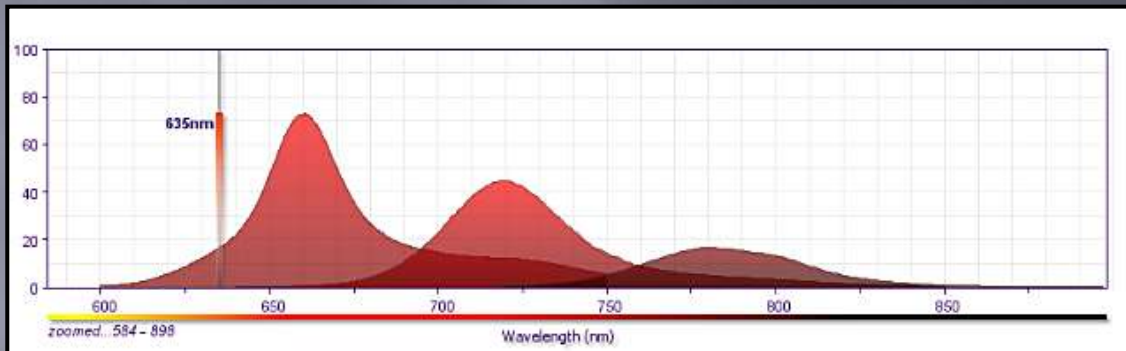
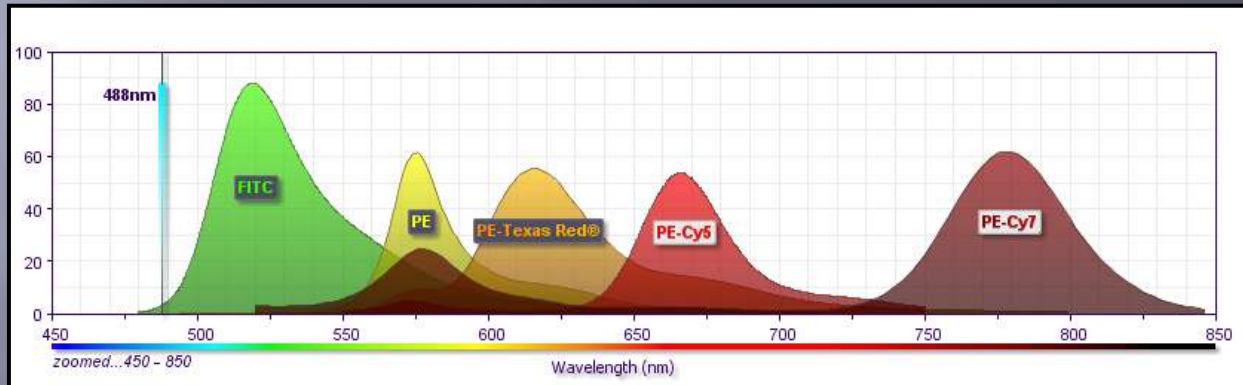


ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER



ΦΑΣΜΑΤΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ



ΠΗΓΕΣ ΦΩΤΟΣ

▣ Lamps

- ▣ Xenon-Mercury
- ▣ Mercury

▣ Lasers

- ▣ Argon Ion (Ar)
- ▣ Krypton (Kr)
- ▣ Helium Neon (He-Ne)
- ▣ Helium Cadmium (He-Cd)
- ▣ YAG (solid State), Diode

▣ LED (Light Emitting Diode)

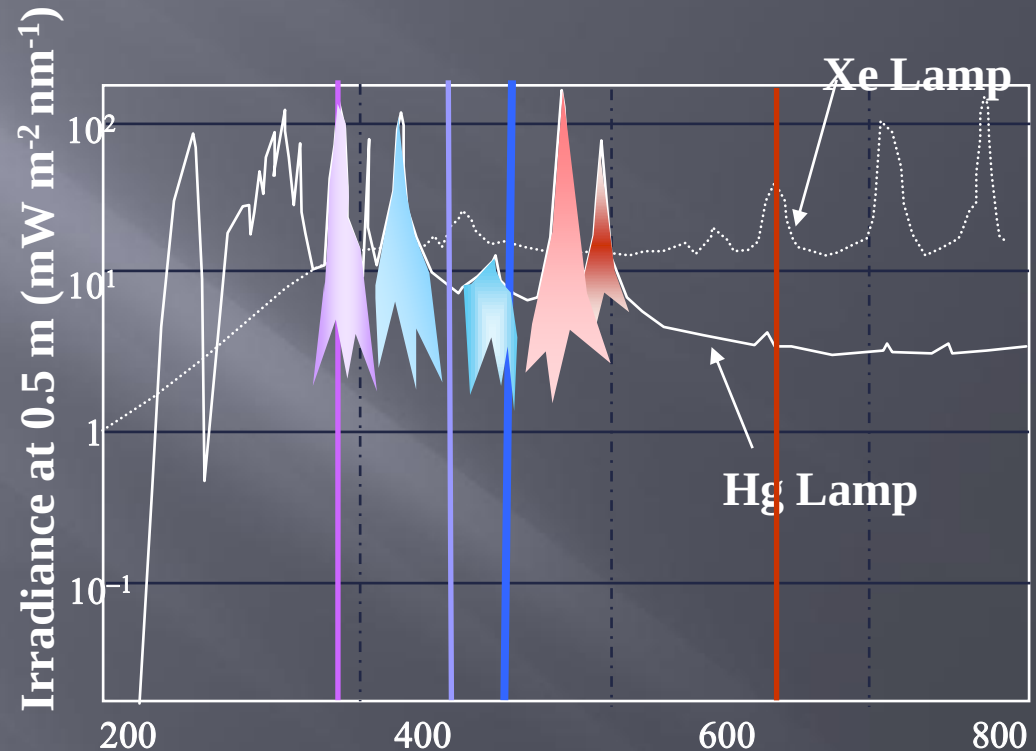
- ▣ Variety of wavelengths, cheap

ΦΑΣΜΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΛΑΜΠΤΗΡΩΝ



© J.Paul
Robinson

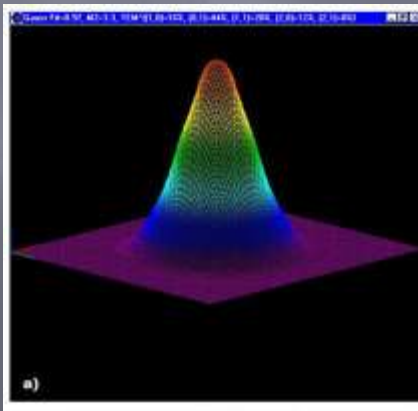
“...You can't put any more light through a given area of the specimen than comes from the same area of an extended light...” Shapiro p125 4th



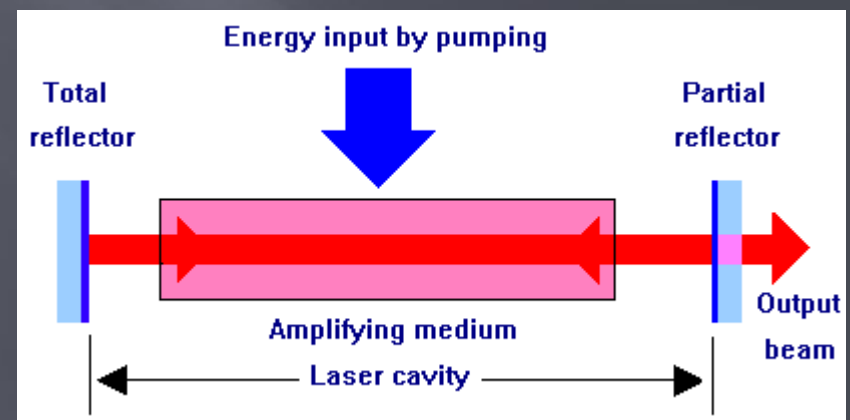
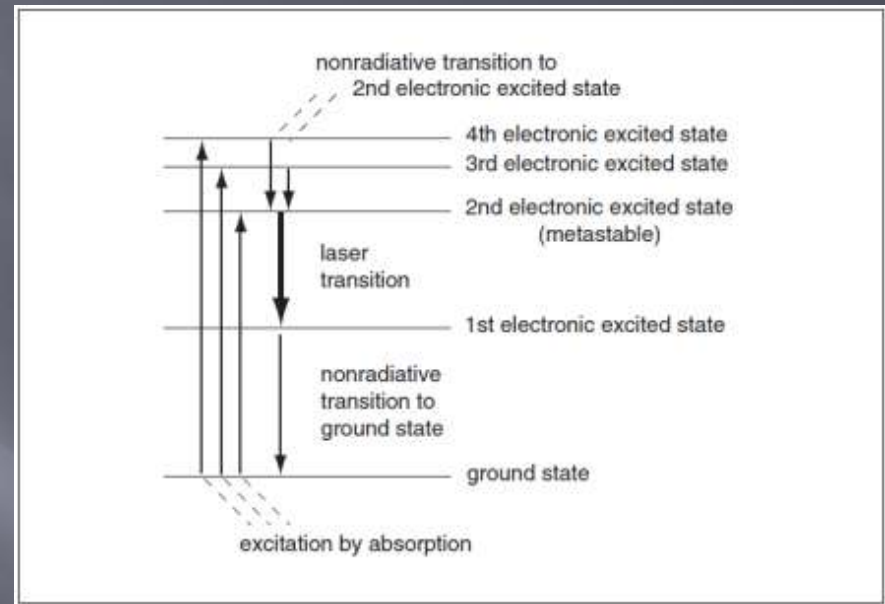
3rd Shapiro p 99
4th Shapiro p 125

ΕΞΑΝΑΓΚΑΣΜΕΝΗ ΕΚΠΟΜΠΗ

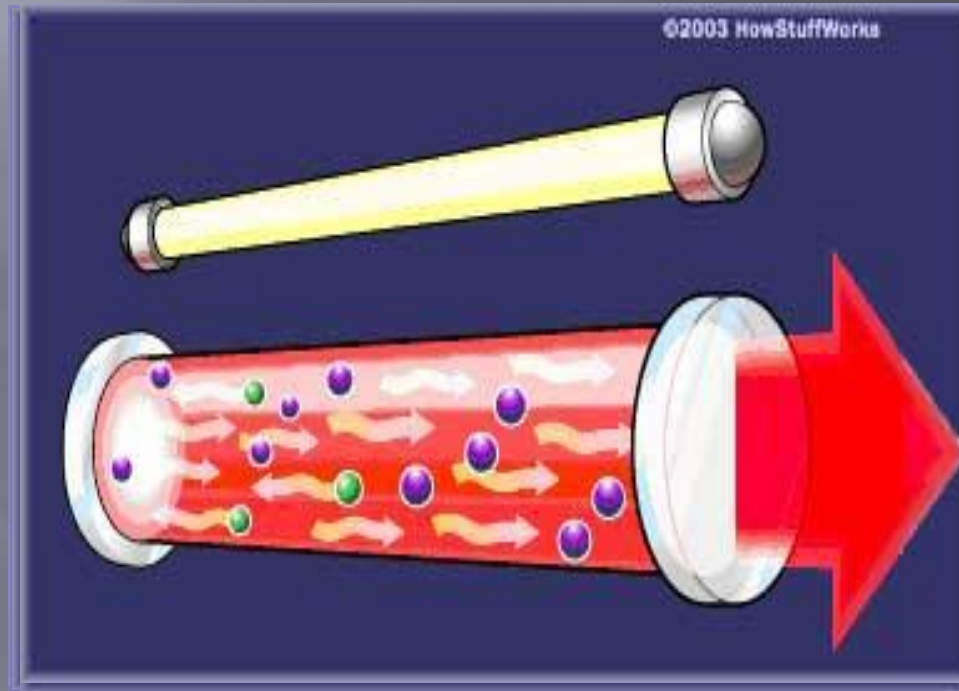
Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation



TEM_{00}



ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ



ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ LASER

Laser Ιοντών Αερίου

Argon Ion (Ar) Ar^+ 488, 514 Ar^{2+} 275, 363

Krypton (Kr) 568, 647

Helium Neon (He-Ne) 633, 543

Helium Cadmium (He-Cd) 325, 354, 441

Dye Lasers

Rodamine 6G

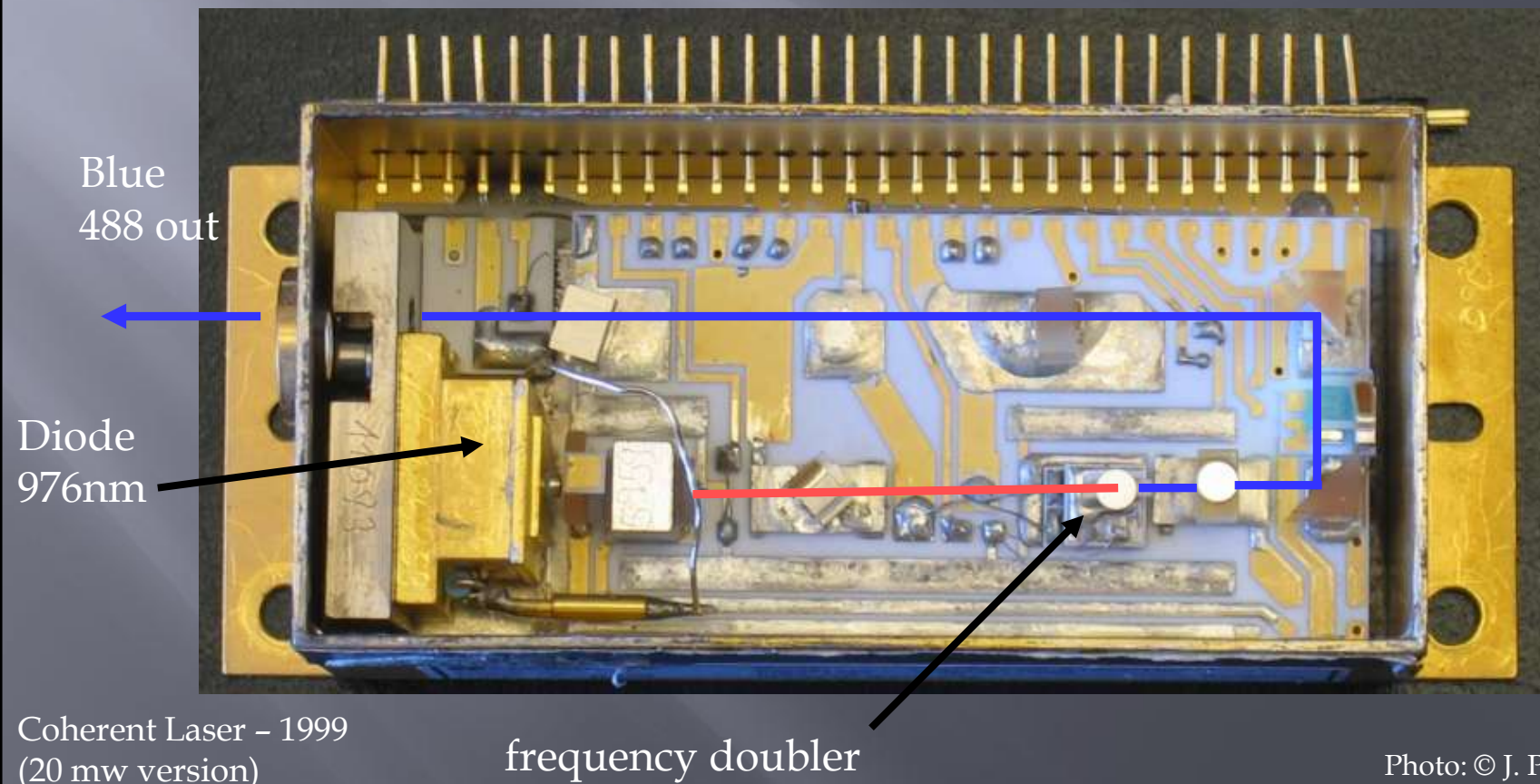
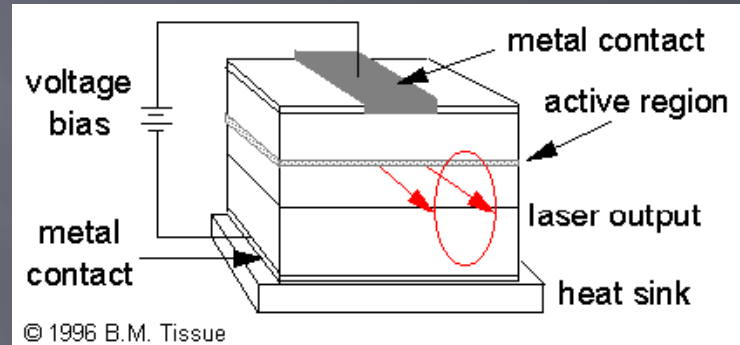
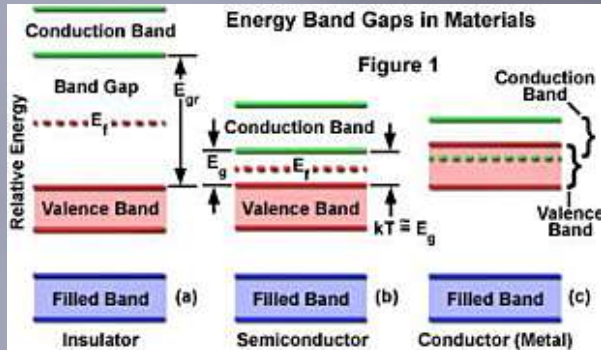
- ☐ Υλικό
- ☐ λ ακτινοβολίας
- ☐ Ισχύς Εξόδου
- ☐ Προφίλ ακτίνας
- ☐ Απόδοση

Solid State Lasers

Diode Lasers (GaAlAs) (600nm-1000nm)

Nd:YAG 1064nm, 532nm, 355nm (frequency doubling / tripling)

KATHGOPIES LASER



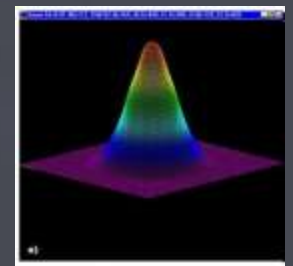
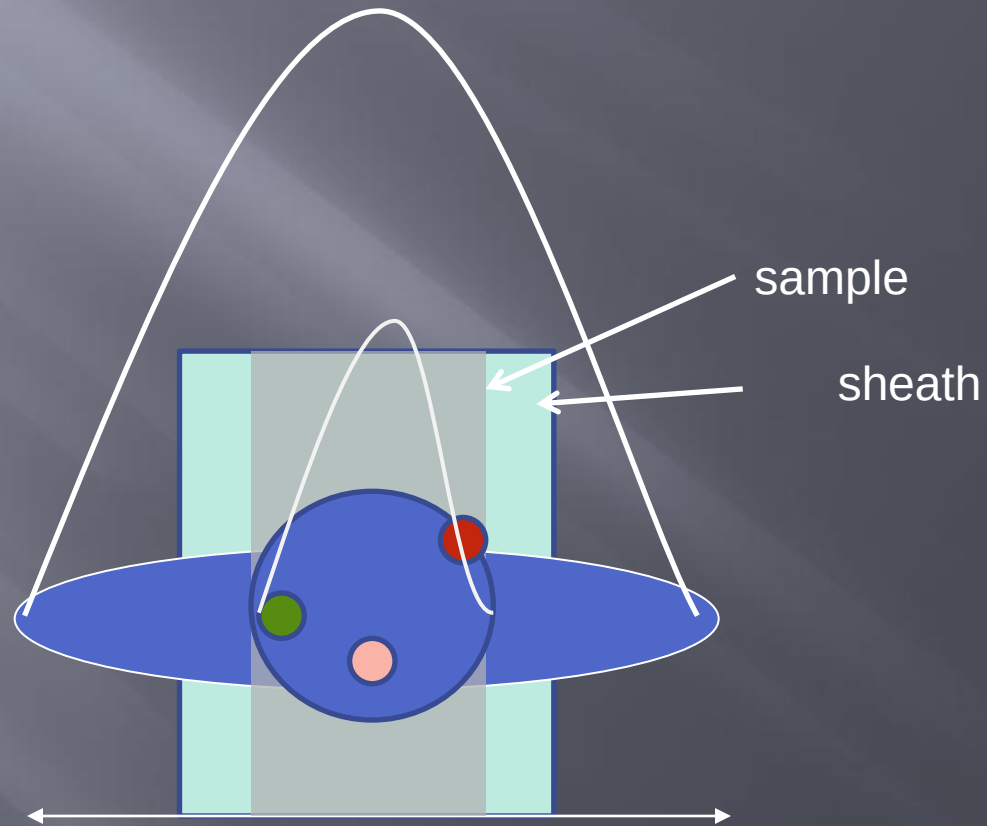
LASER ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ



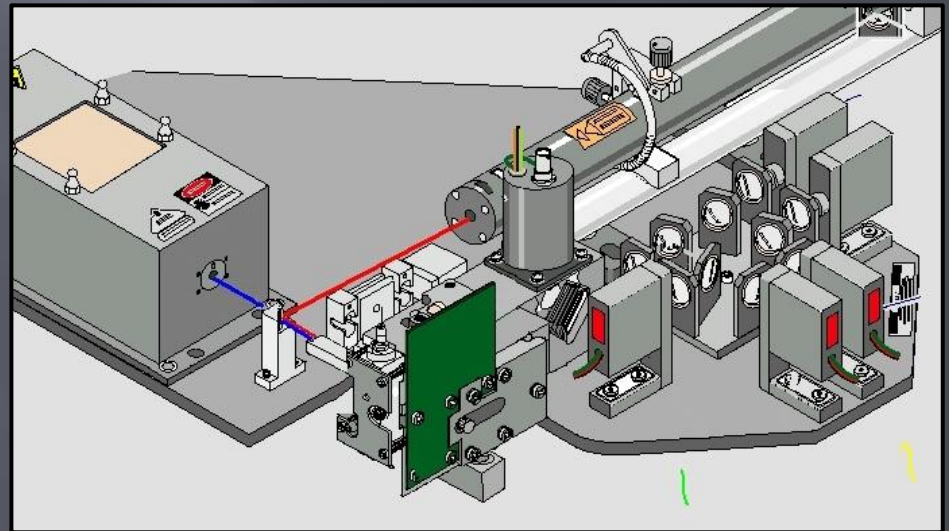
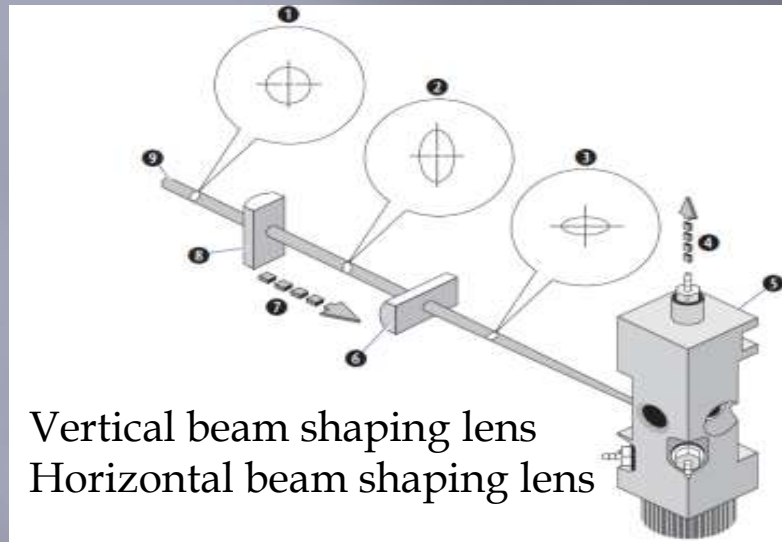
Κλάση	Περιγραφή
I	Η ακτίνα δεν βλάπτει τα μάτια ή το δέρμα.
IM	Η ακτίνα δεν βλάπτει τα μάτια ή το δέρμα, όταν δεν παρεμβάλλεται συγκεντρωτικός φακός ή άλλα οπτικά είδη.
II	Η ακτίνα δεν βλάπτει τα μάτια ή το δέρμα, όταν η έκθεση δεν ξεπερνάει τα 0,25 sec. Η ακτίνα είναι ορατή στο γυμνό μάτι από τα 400 nm μέχρι τα 700 nm.
IIM	Όπως η Σειρά 2, όταν δεν παρεμβάλλεται συγκεντρωτικός φακός ή άλλα οπτικά είδη.
IIIR	Η ακτίνα βλάπτει τα μάτια.
IIIB	Η ακτίνα βλάπτει τα μάτια και μπορεί να βλάψει και το δέρμα.
IV	Η ακτίνα είναι πολύ επικίνδυνη για τα μάτια και για το δέρμα, ακόμη και έπειτα από διάχυση σε επιφάνειες.



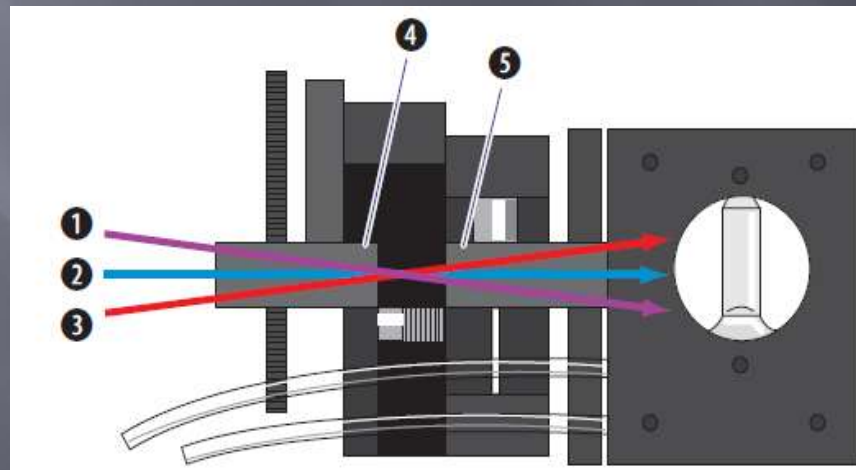
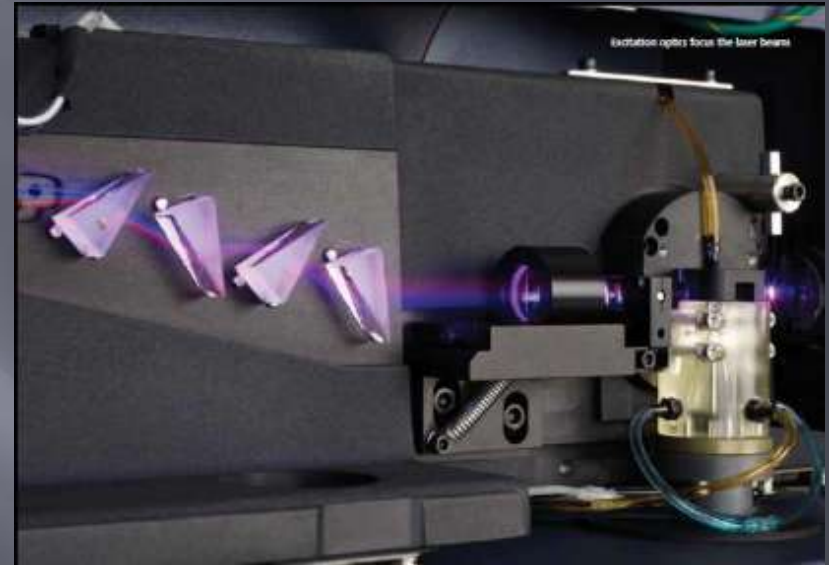
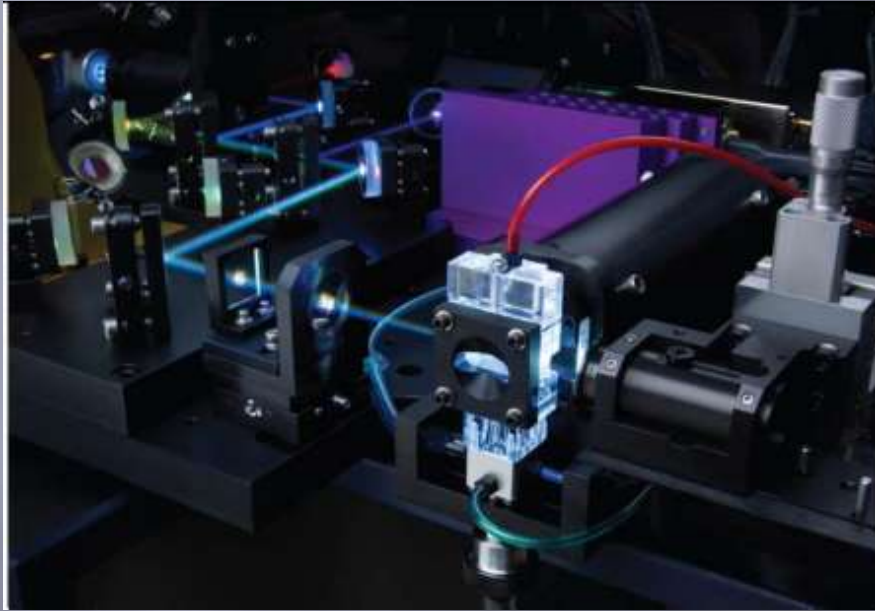
ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΑΚΤΙΝΑΣ LASER



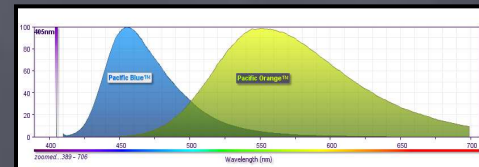
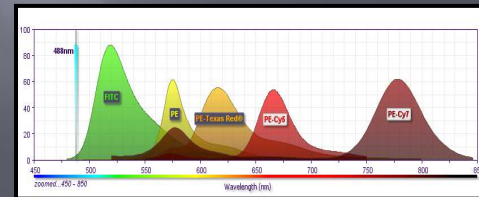
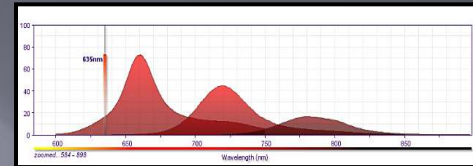
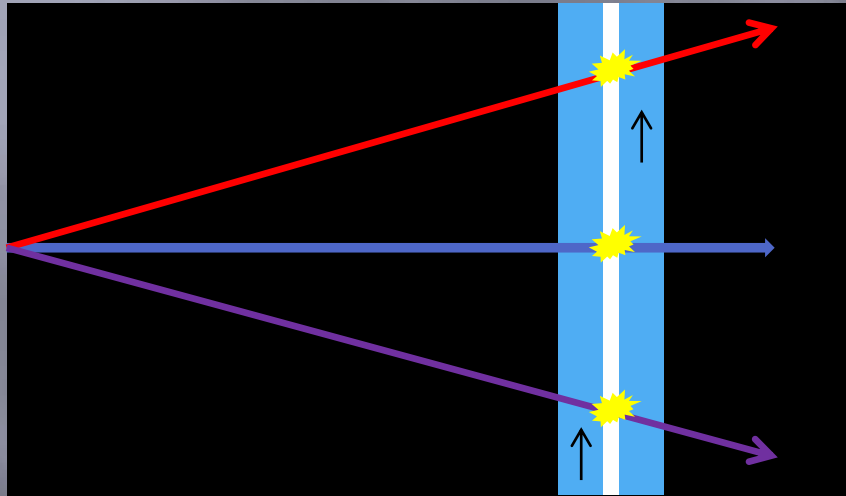
ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΑΚΤΙΝΑΣ LASER



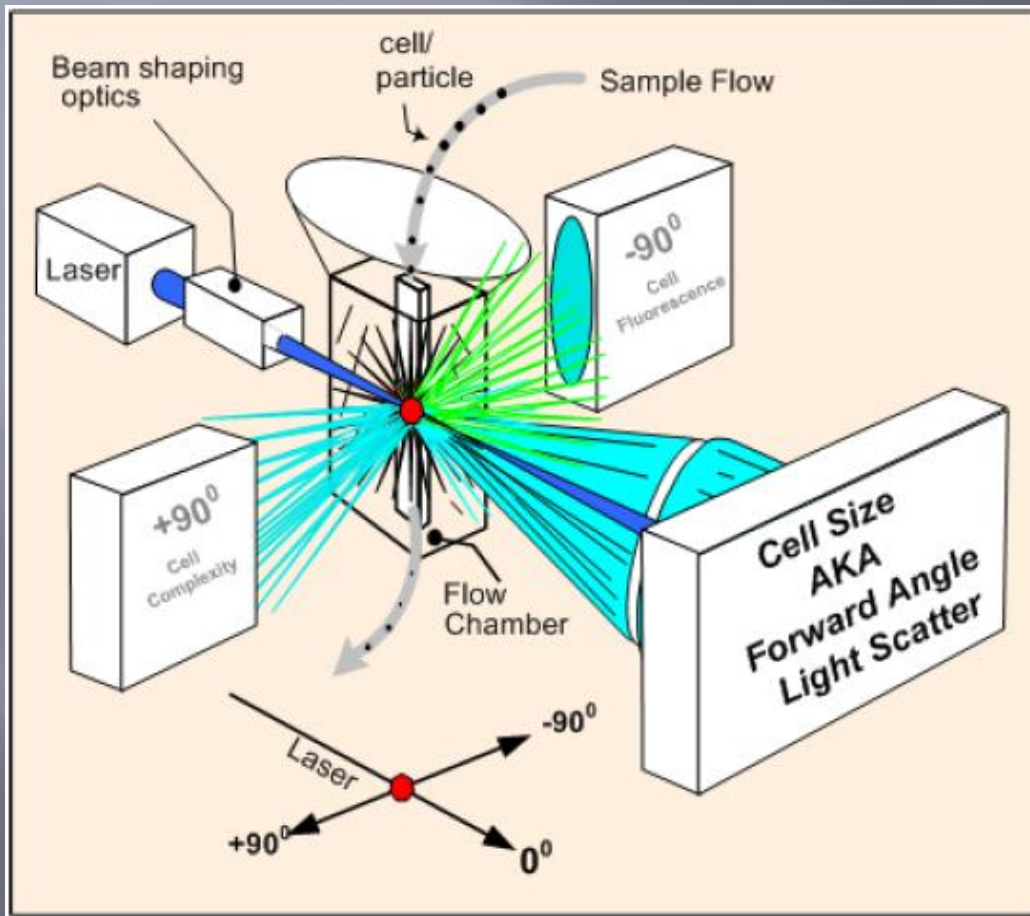
ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ LASER



ΠΟΛΥΧΡΩΜΑΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ



...ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΚΥΨΕΛΙΔΑ ΡΟΗΣ

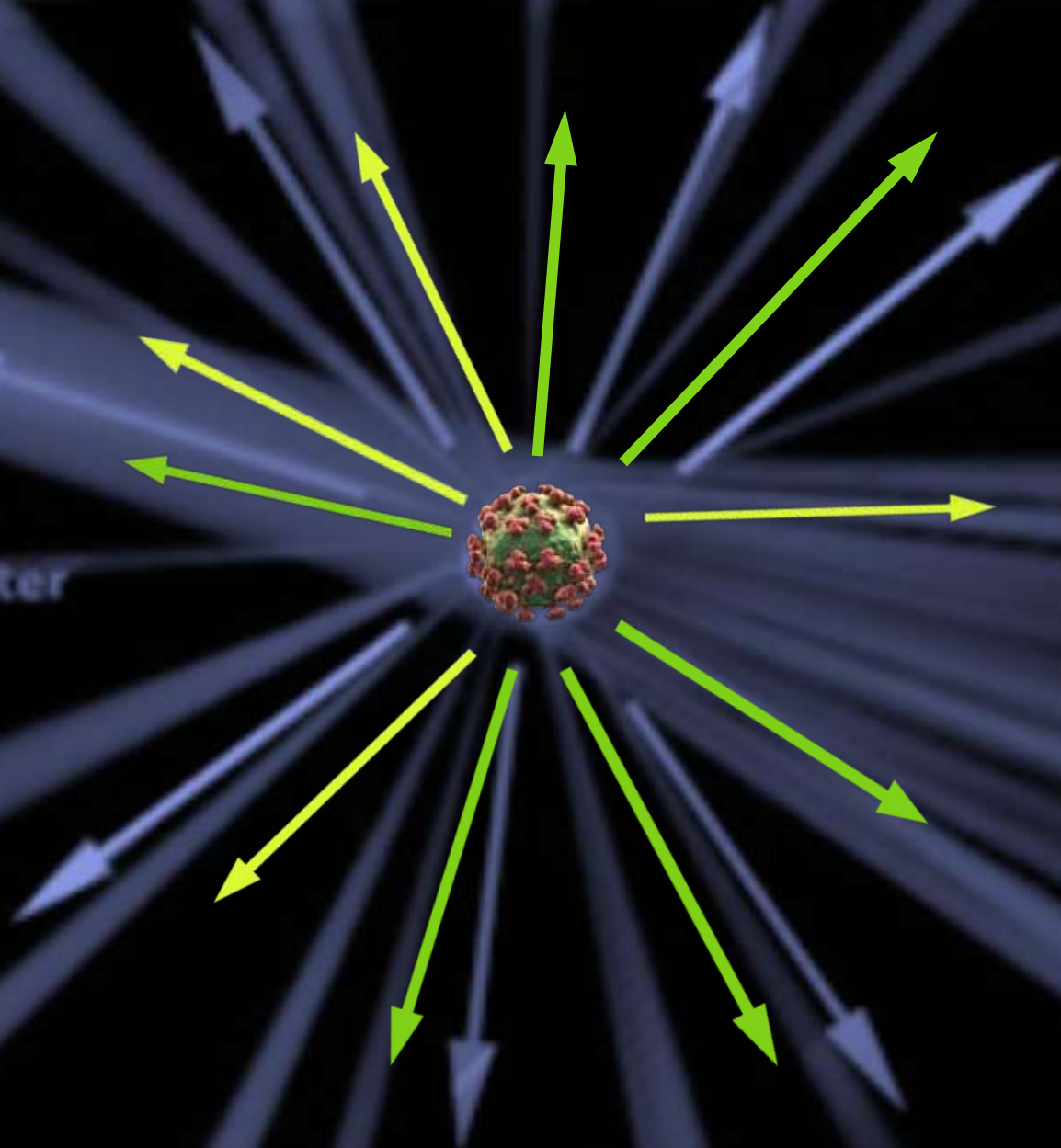


FS 2°-19°

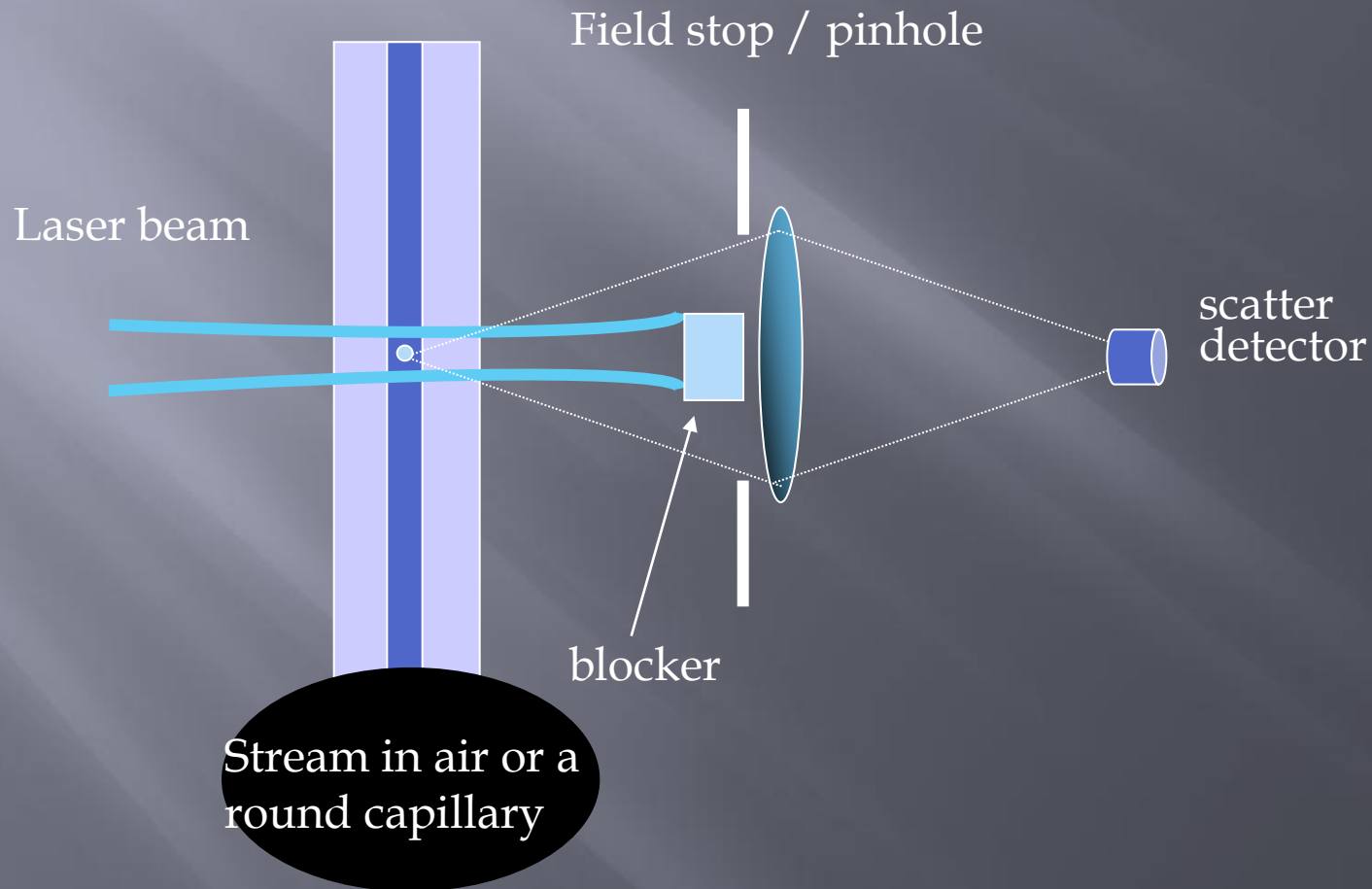
SS 90°

FLUORESCENCE

Side scatter

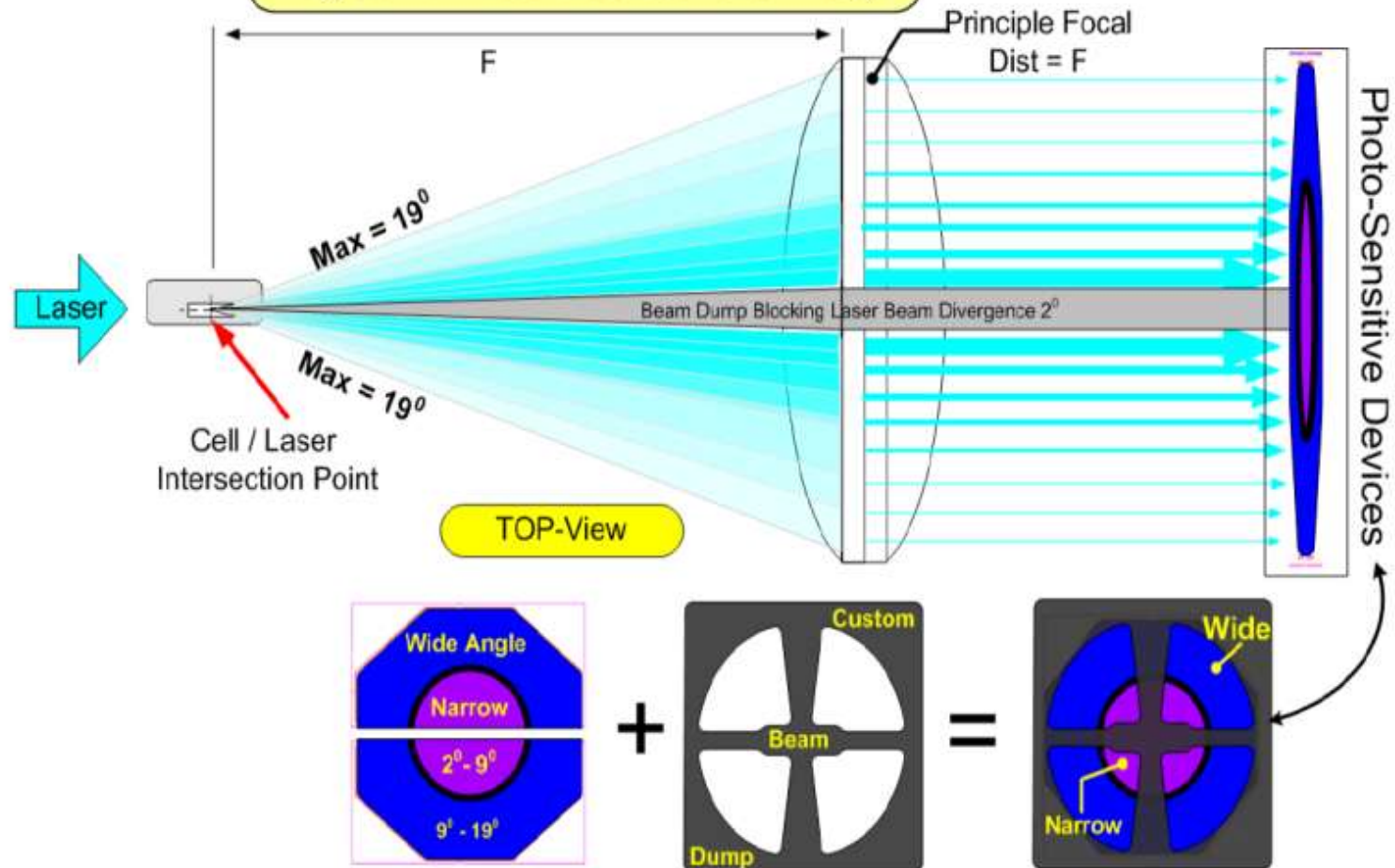


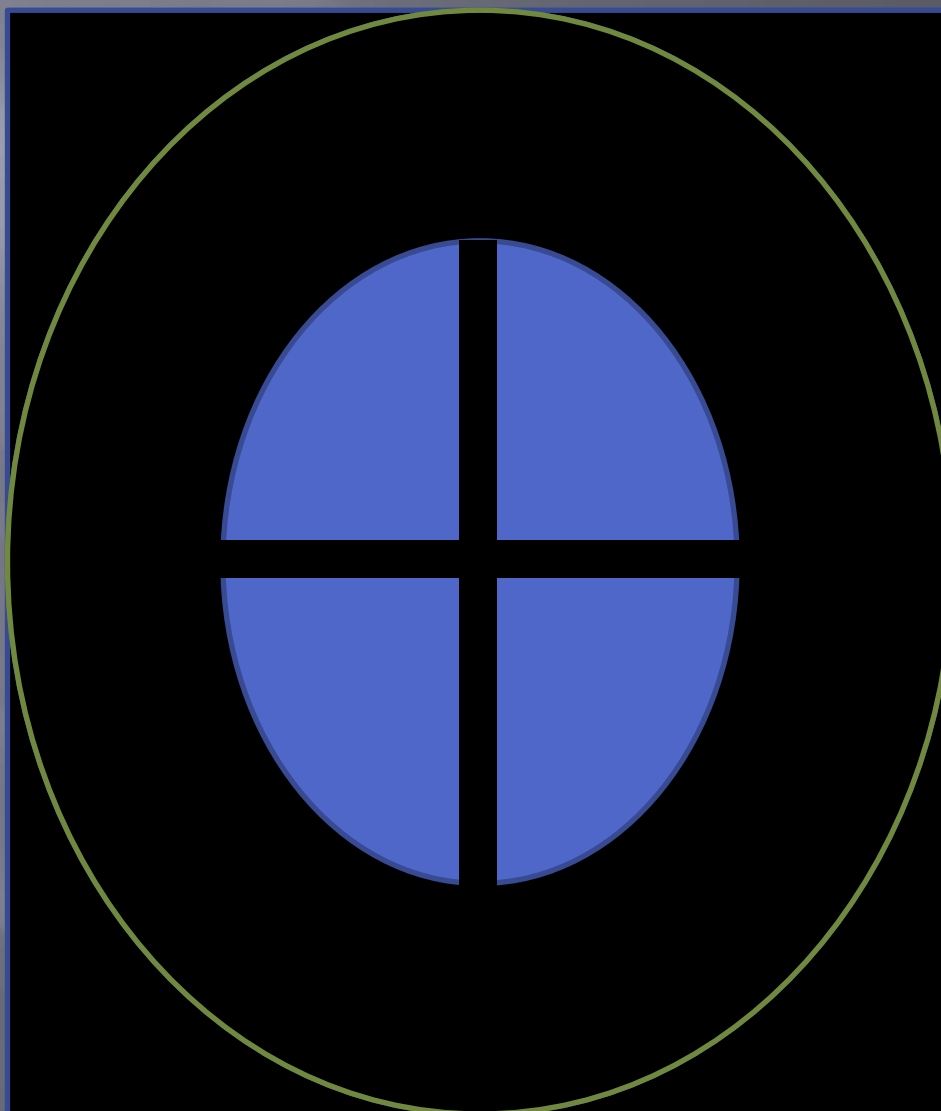
ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΣΚΕΔΑΣΜΟΥ



ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΣΚΕΔΑΣΜΟΥ

Figure-4 Photo-Detector Geometry





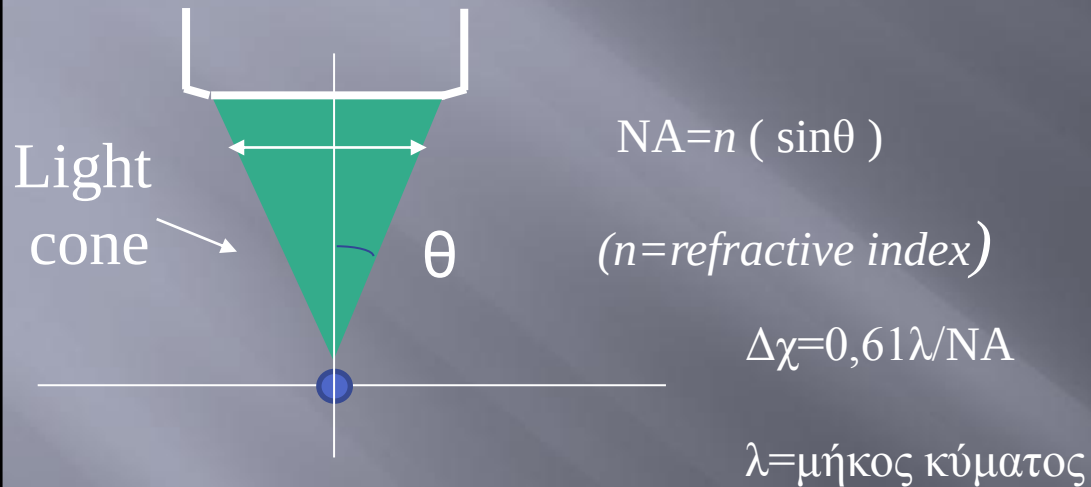
CAUTION - VISIBLE AND INVISIBLE
LASER RADIATION WHEN OPEN
AVOID EYE OR SKIN EXPOSURE TO
DIRECT OR SCATTERED RADIATION



ΠΡΟΣΘΙΟΣ ΣΚΕΔΑΣΜΟΣ



ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΟ ΑΝΟΙΓΜΑ ΦΑΚΟΥ (NUMERICAL APERTURE, NA)



- Το αριθμητικό άνοιγμα εκφράζει την ικανότητα του φακού να συλέξει ακτινοβολία
- Η διακριτική ικανότητα του φακού συνδέεται άμεσα με το αριθμητικό άνοιγμα του φακού

Oil Immersion and Numerical Aperture

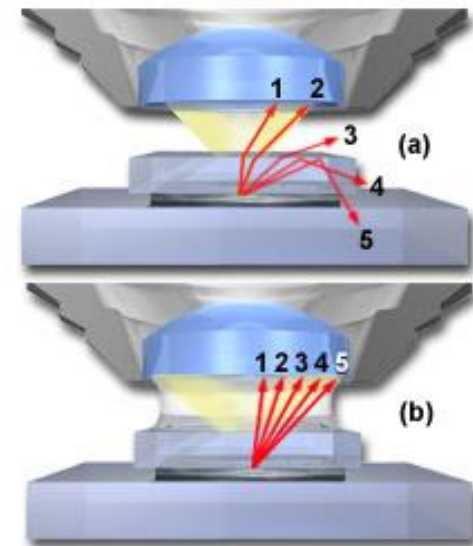
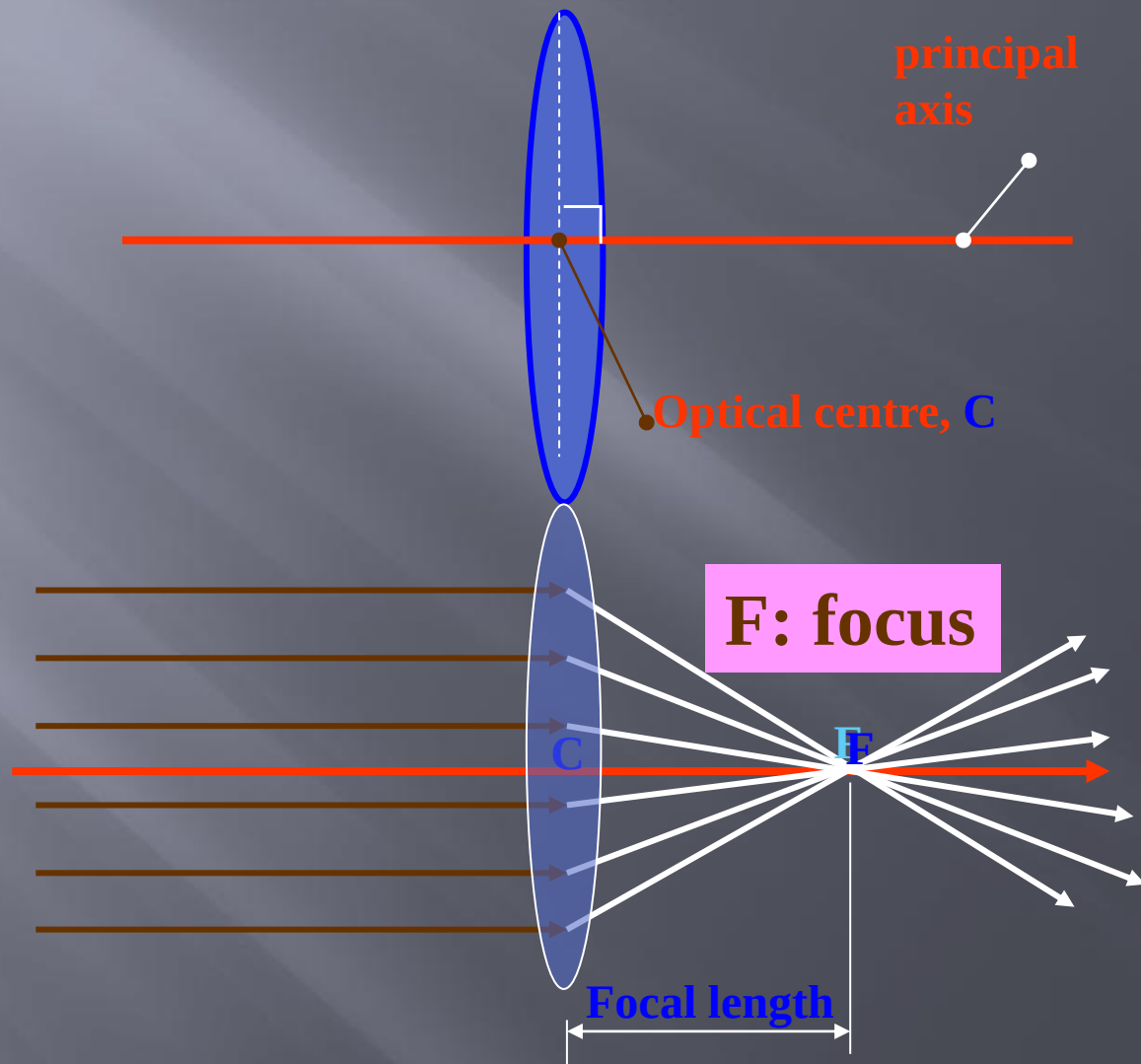
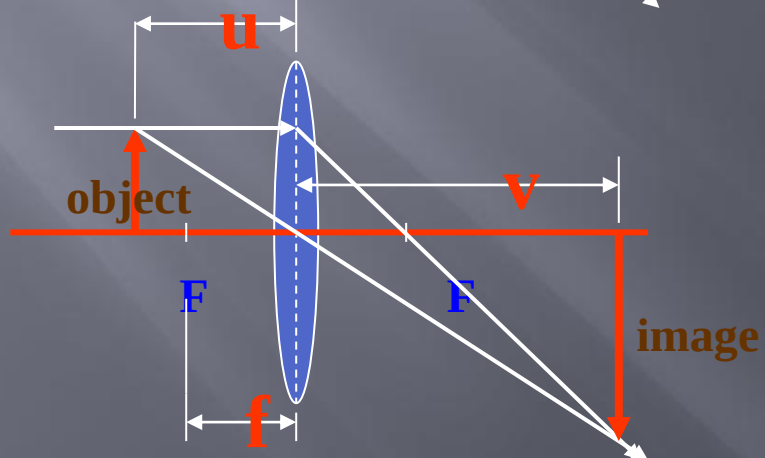
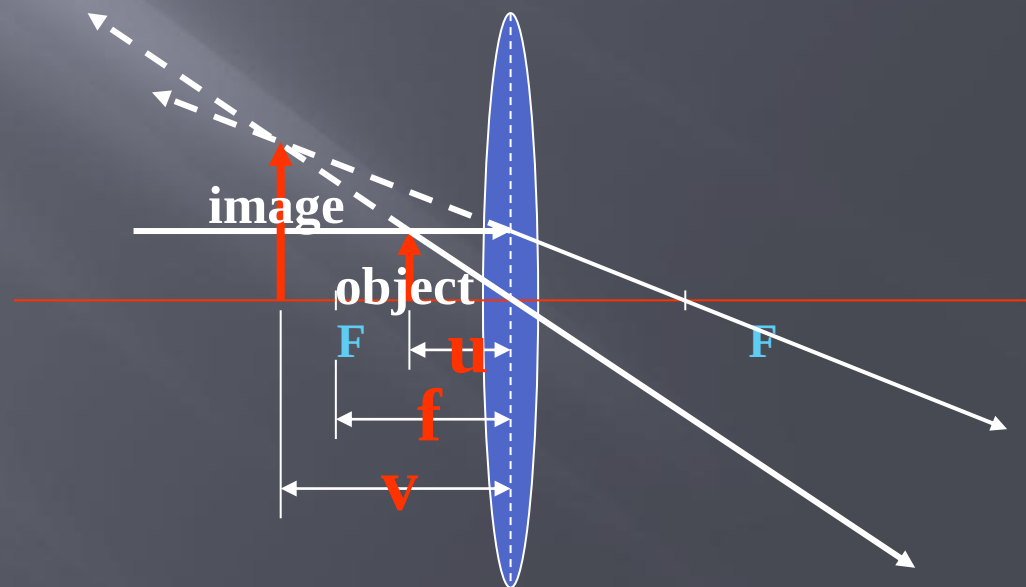
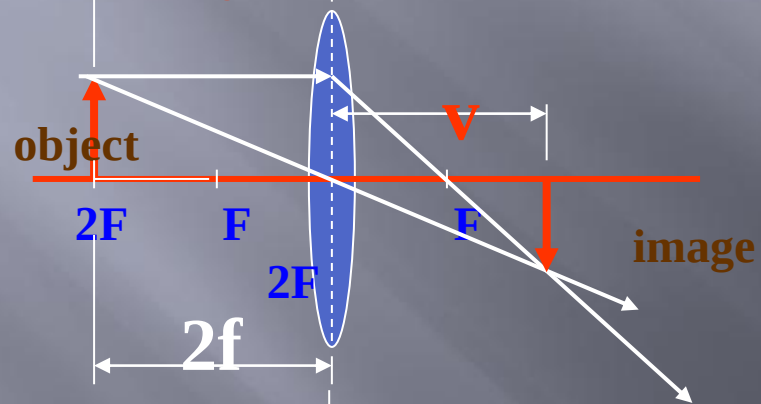
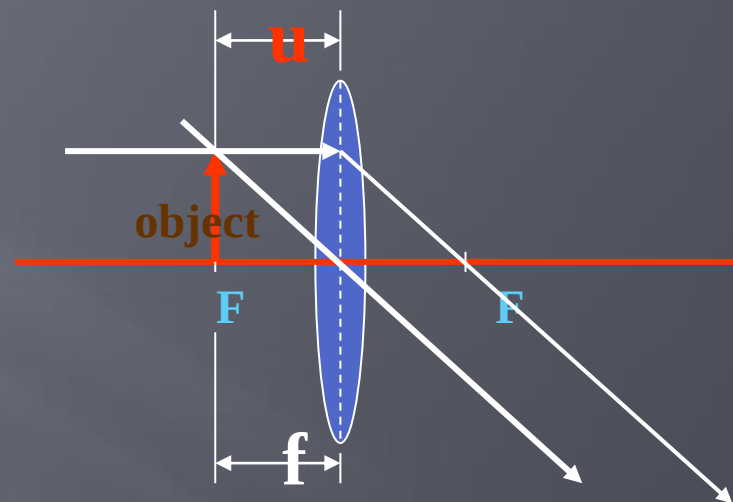
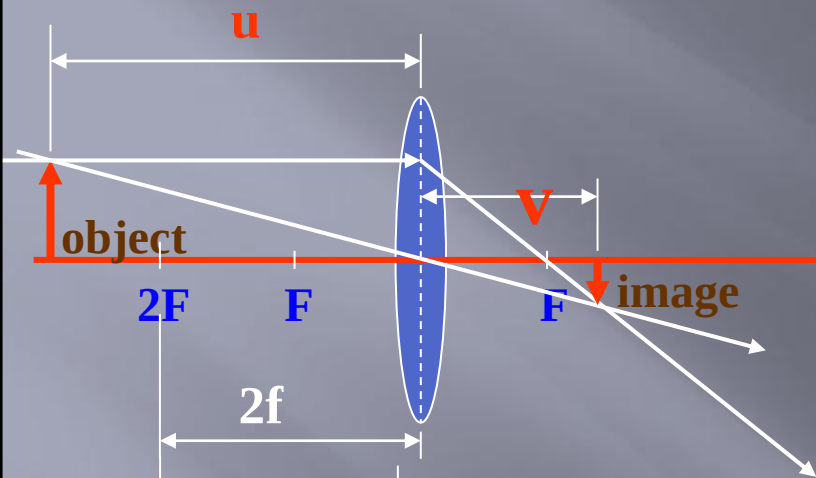


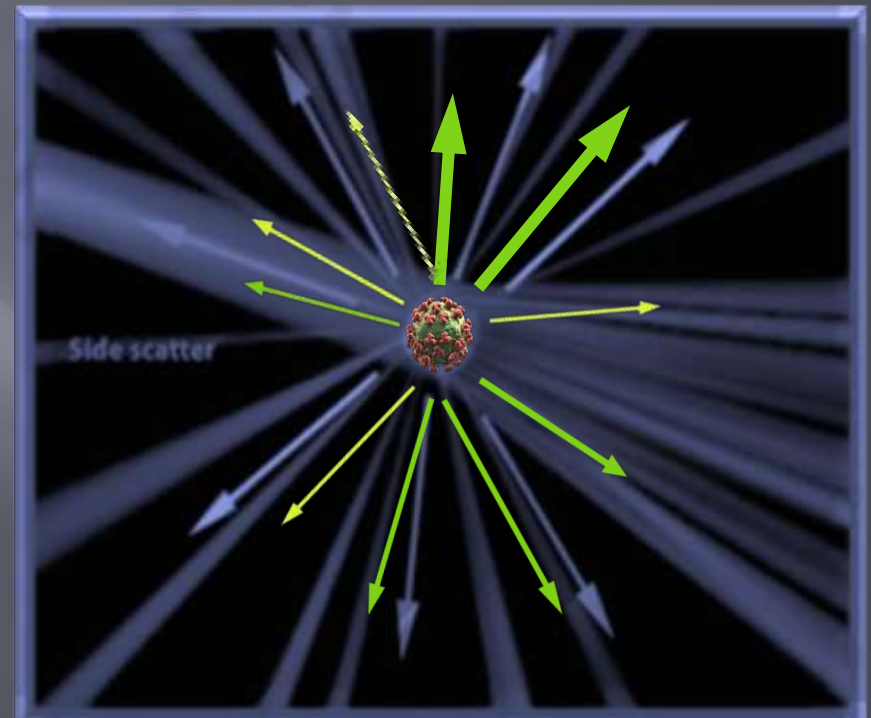
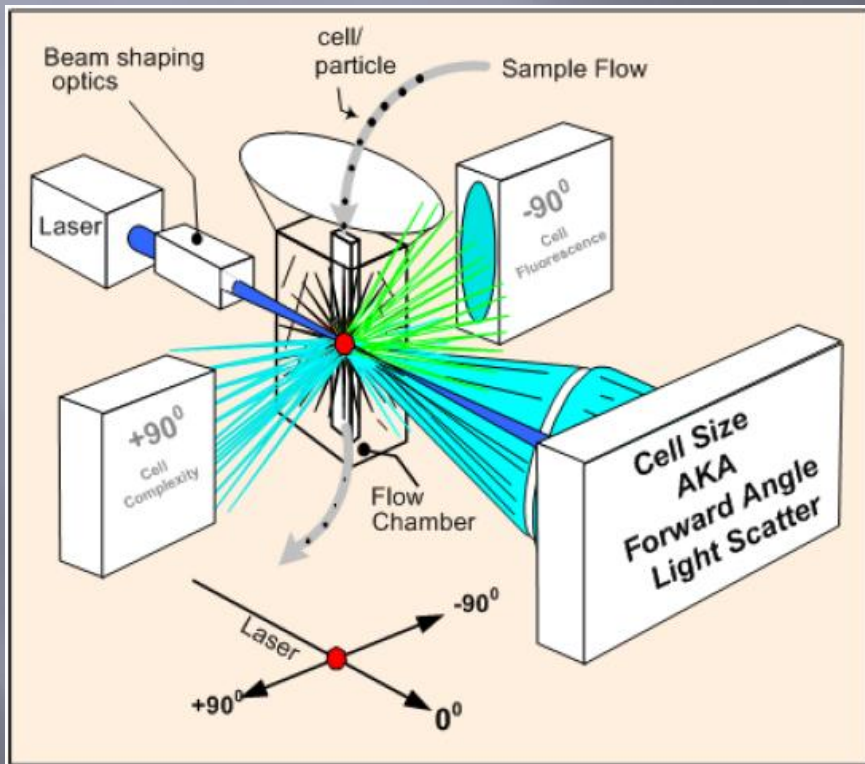
Figure 1

ΦΑΚΟΙ

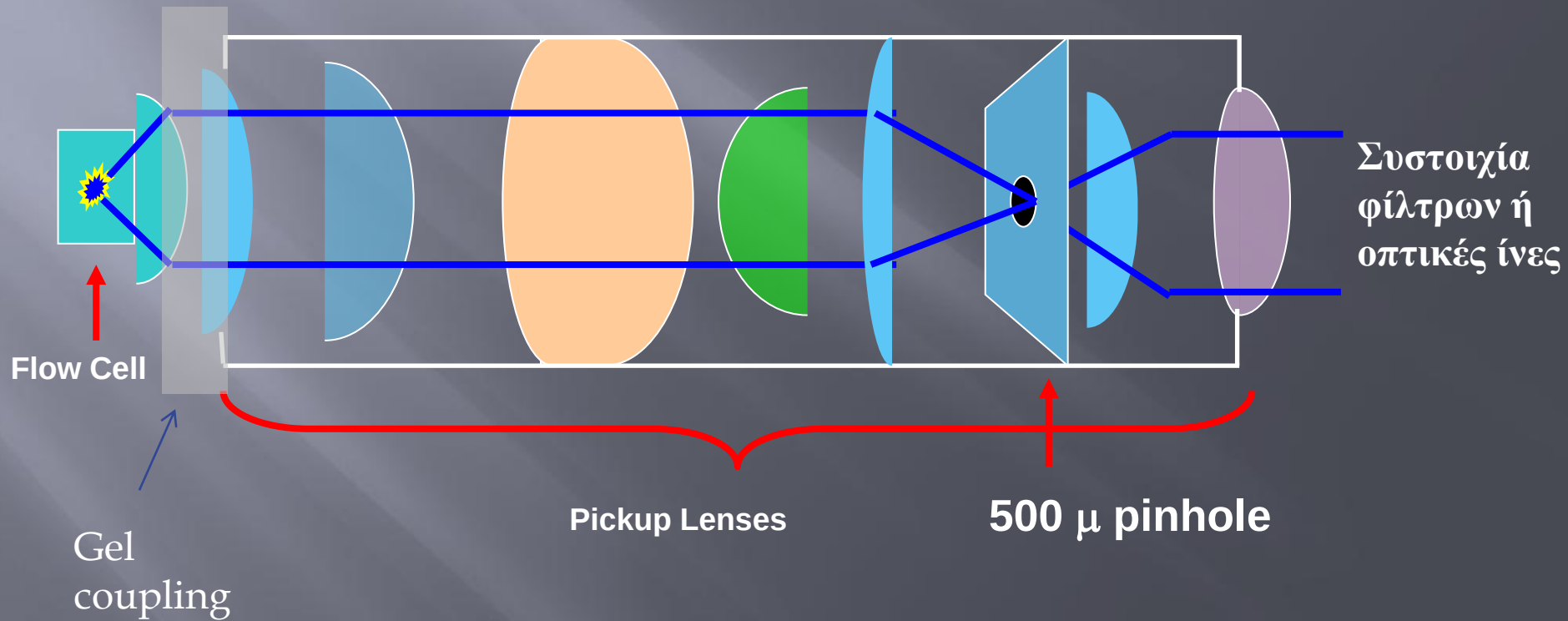




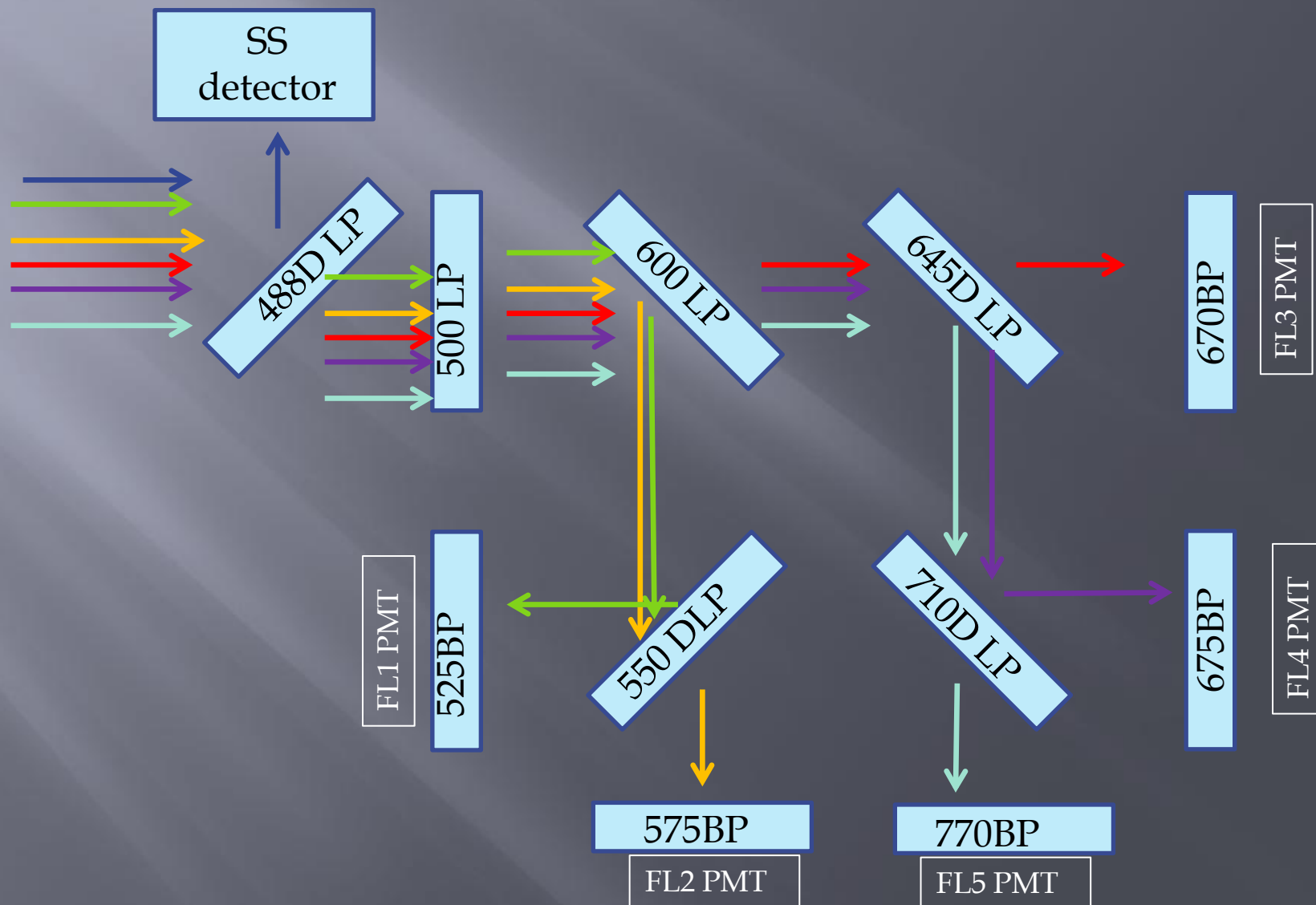
ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΠΛΑΓΙΟΥ ΣΚΕΔΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



ΠΛΑΓΙΟΣ ΣΚΕΔΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ



ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



ΦΙΛΤΡΑ

Κατηγορίες φίλτρων

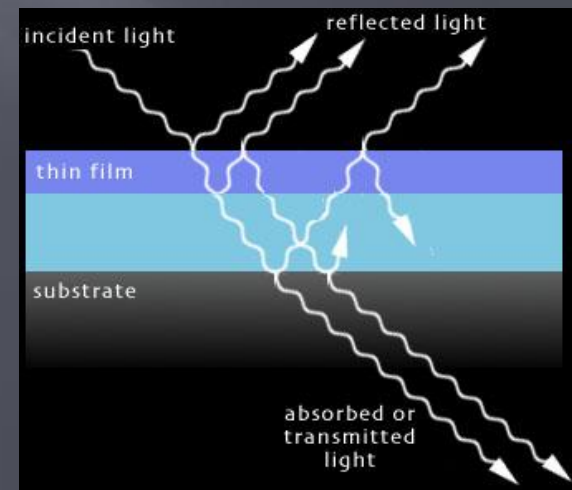
Φίλτρα απορρόφησης

Μεσώ απορρόφησης απορρίπτονται τα ανεπιθύμητα μήκη κύματος ενώ τα υπόλοιπα μεταδίδονται μέσα από το υλικό

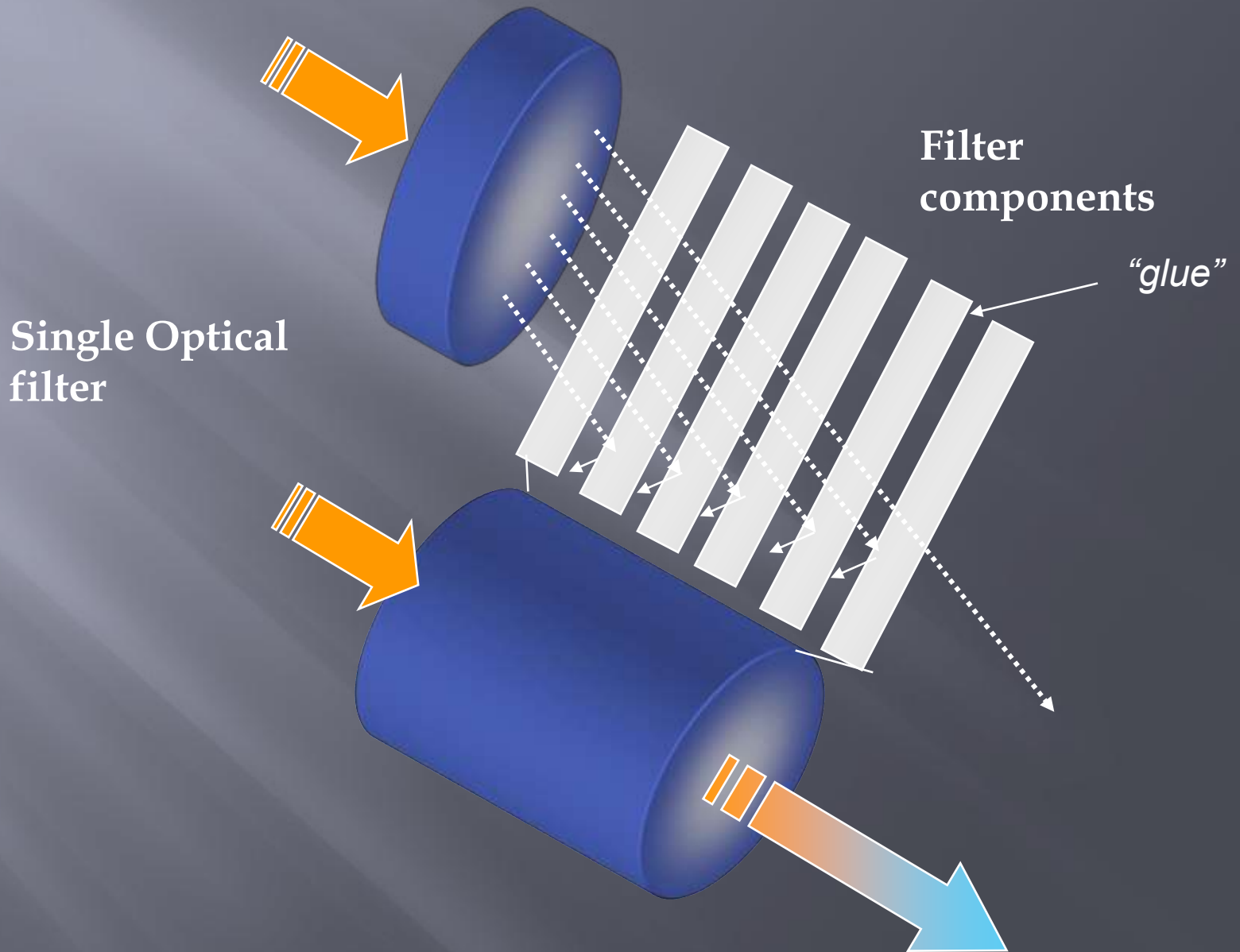
Φίλτρα παρεμβολής

(Interference filters)

Λειτουργούν με βάση το φαινόμενο της συμβολής των κυμάτων



ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΙΛΤΡΩΝ



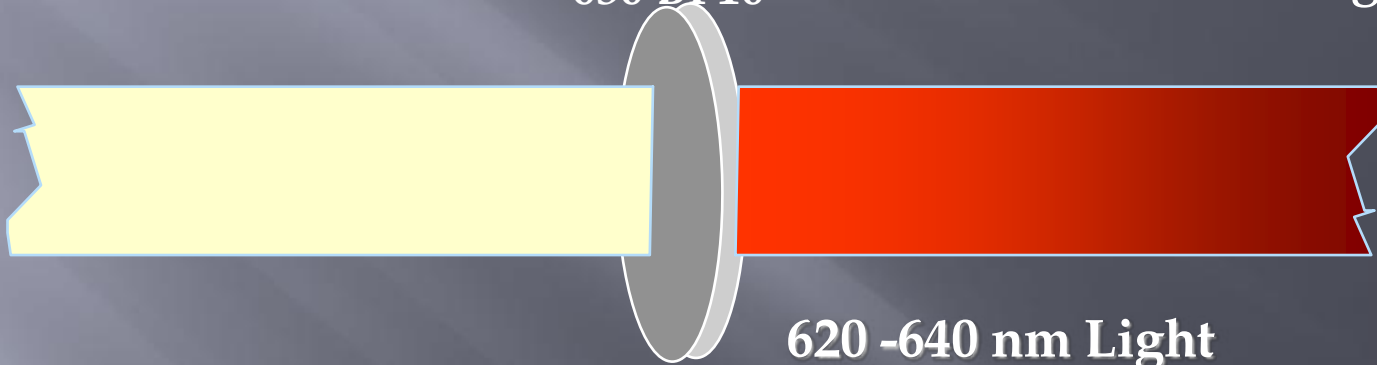
ΦΙΛΤΡΑ

Standard Band Pass Filters

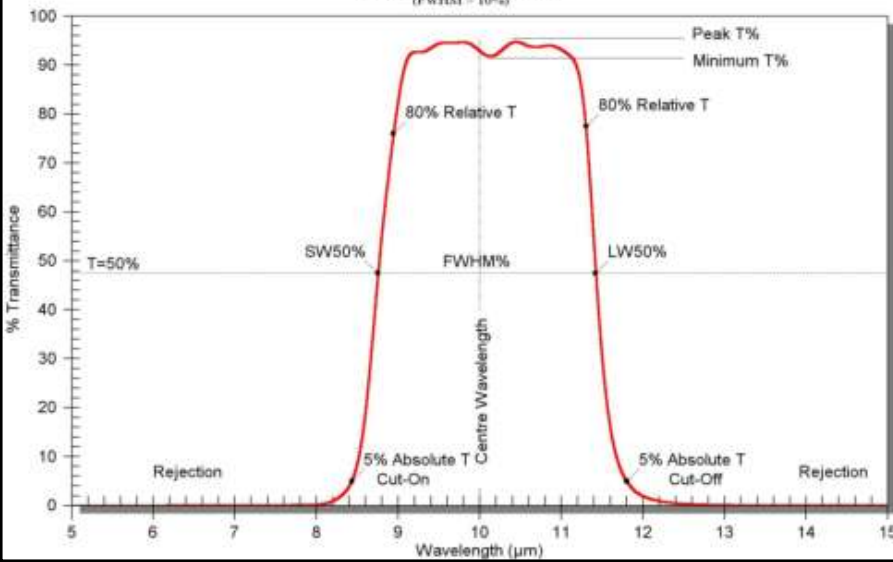
White Light Source

630 BP10

Transmitted Light

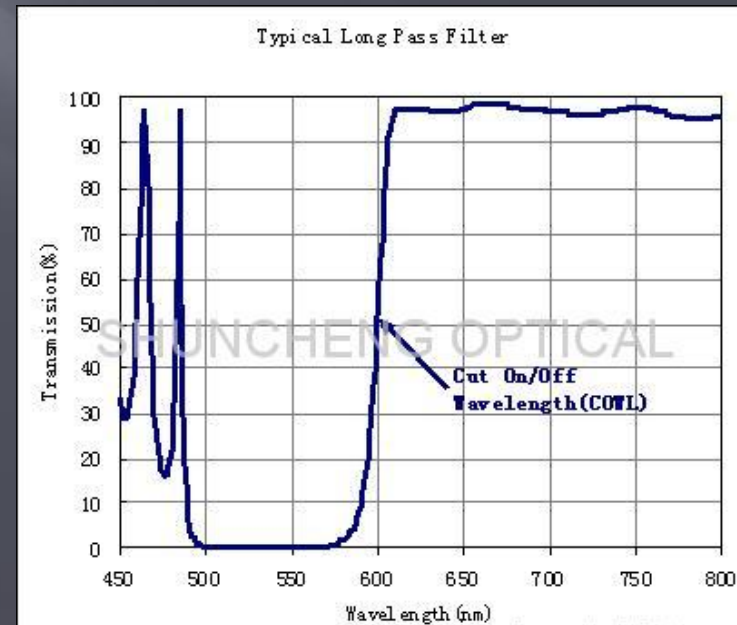
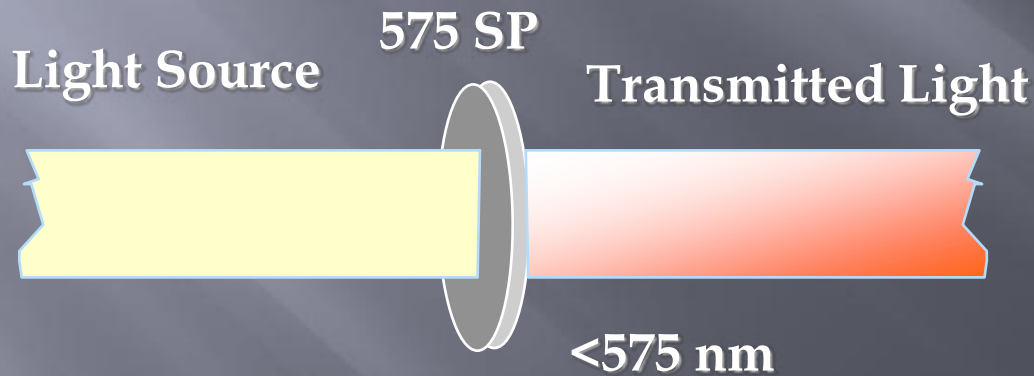
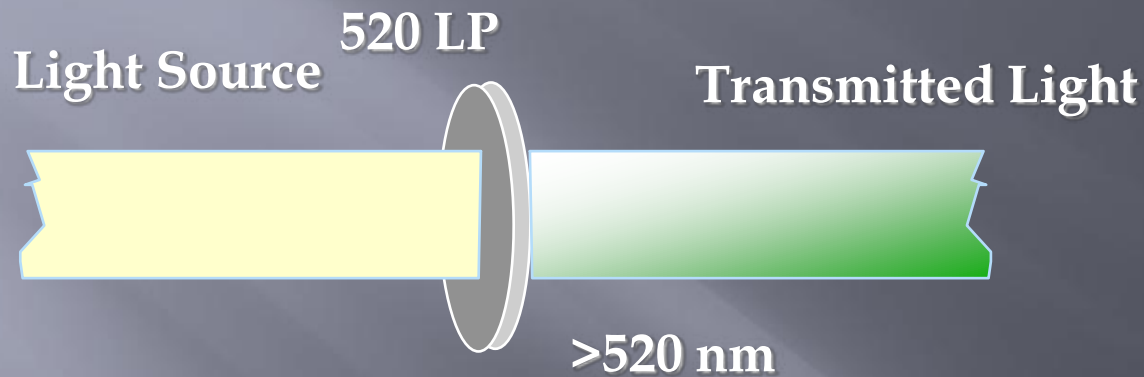


Wide Bandpass Filter
(FWHM = 10nm)



FWHM: Full Width at Half Maximum

ΦΙΛΤΡΑ

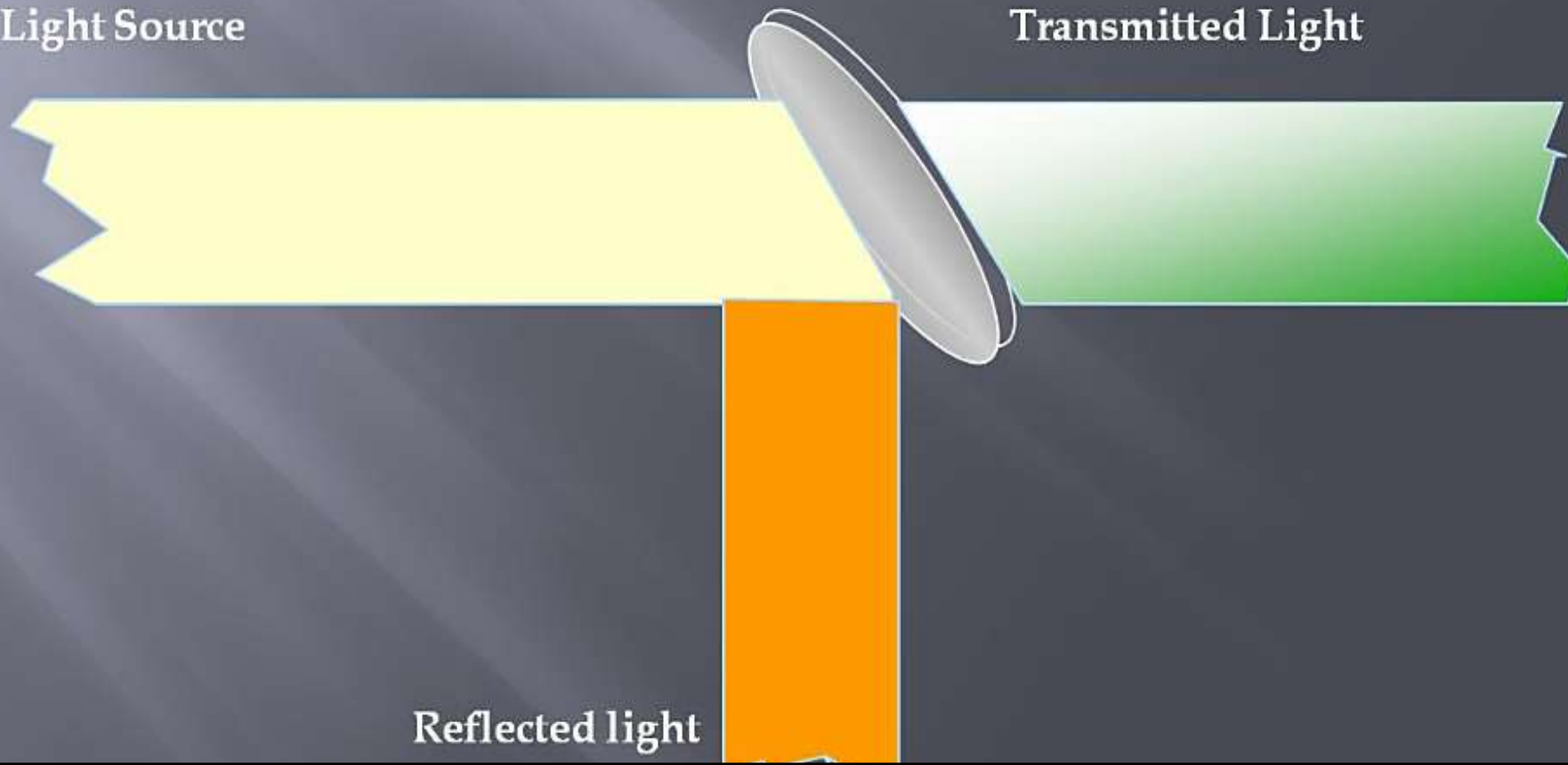


ΦΙΛΤΡΑ

Dichroic Filter/Mirror at 45 deg

Light Source

Transmitted Light



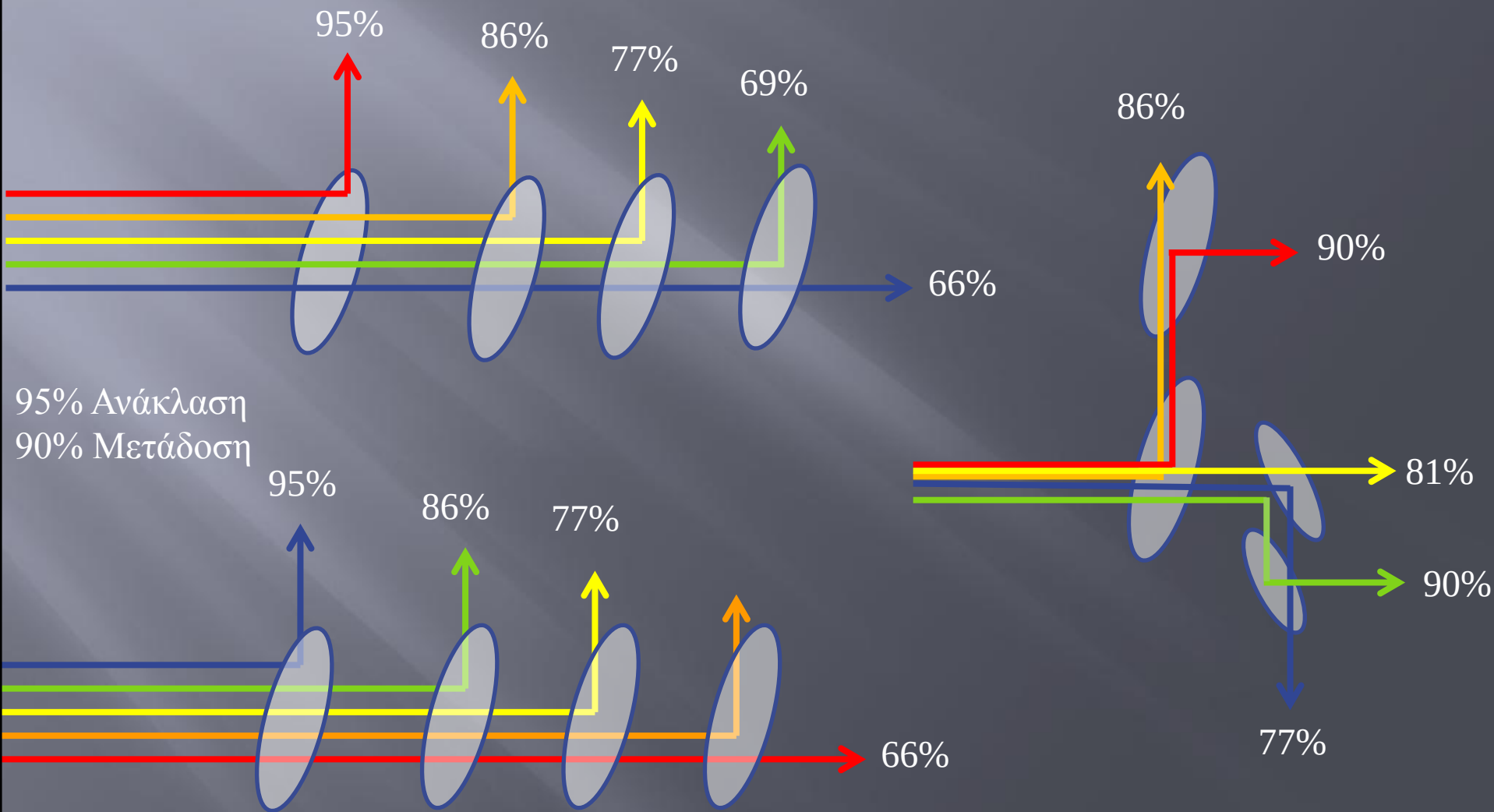
Neutral density filters (N.D.)

- ▣ Μειώνουν την ένταση της ακτινοβολίας στο συνολικά
- ▣ Η μείωση της έντασης γίνεται είτε με απορρόφηση είτε με παρεμβολή

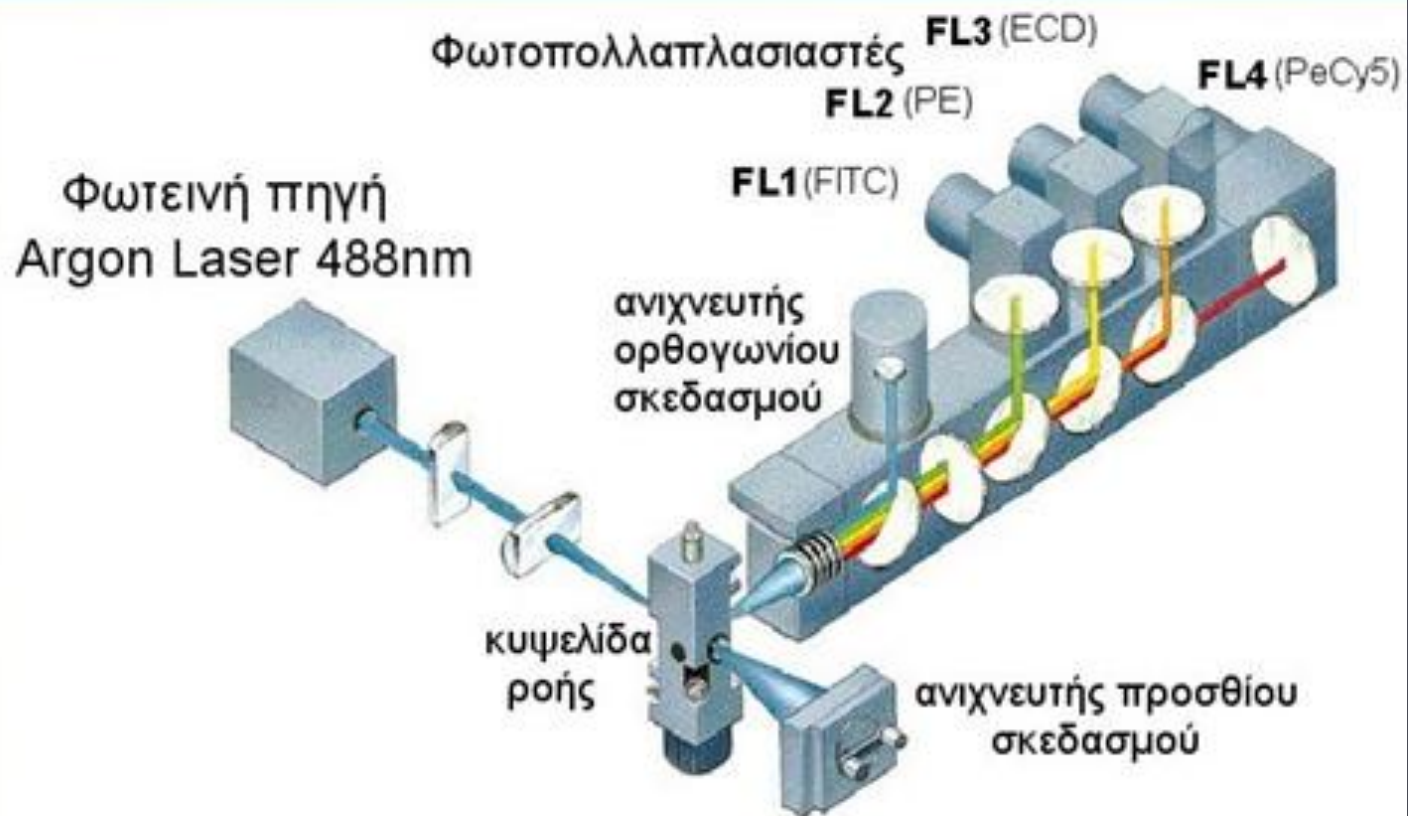
Beam splitters

- ▣ Είναι ND φίλτρα παρεμβολής που ανακλούν το 50% της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ενώ μεταδίδουν το υπόλοιπο.

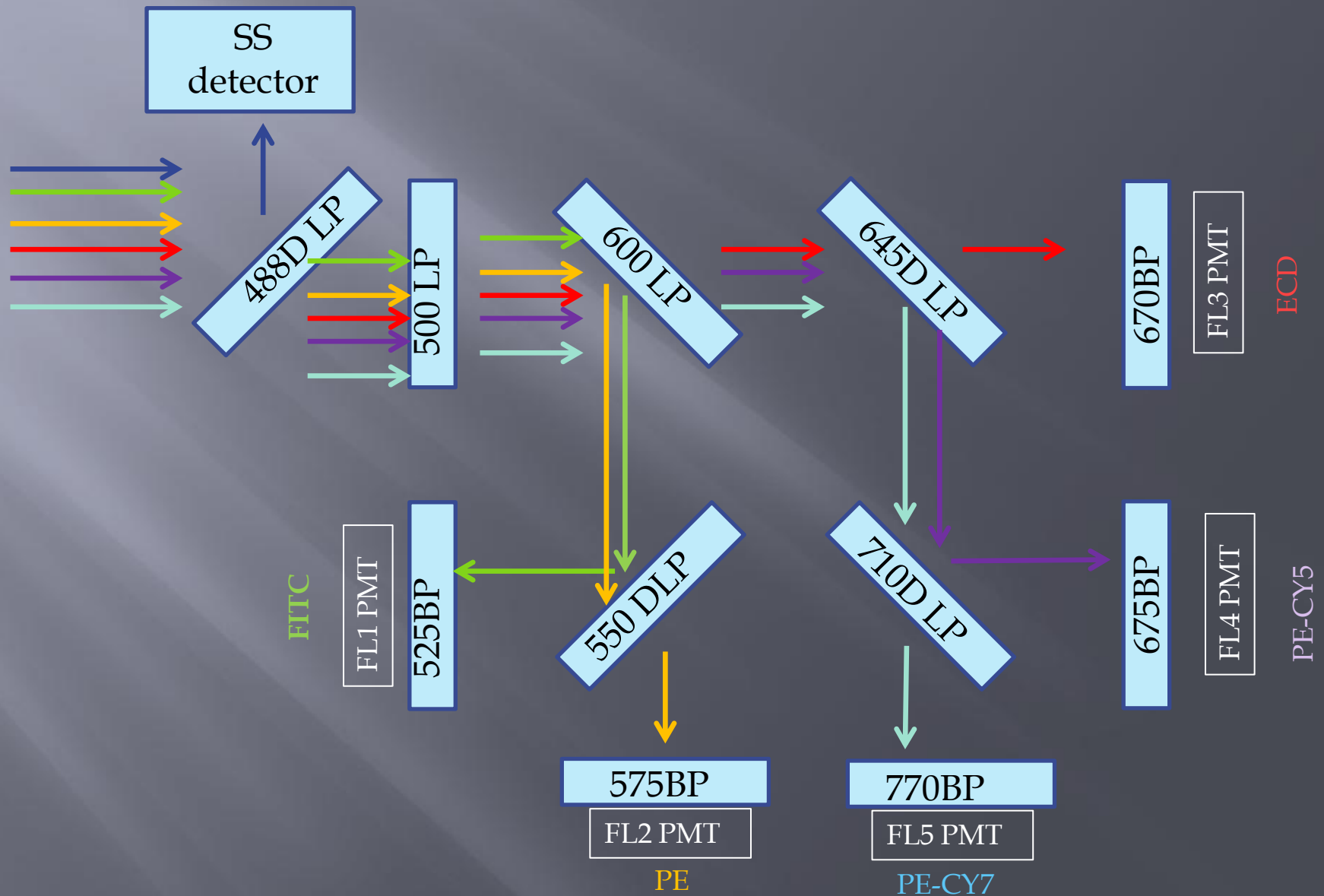
ΑΠΩΛΕΙΕΣ ΦΩΤΟΣ



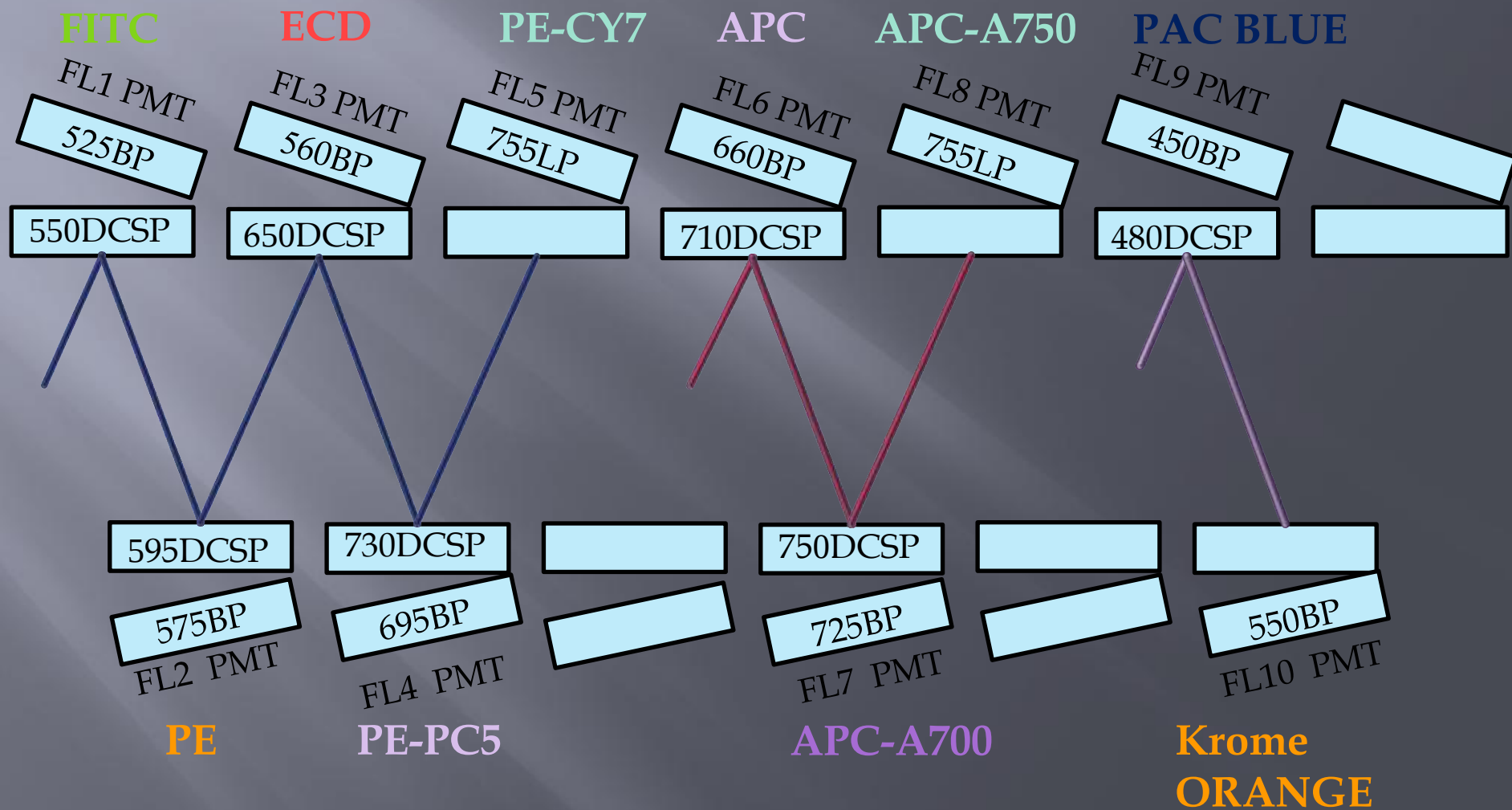
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



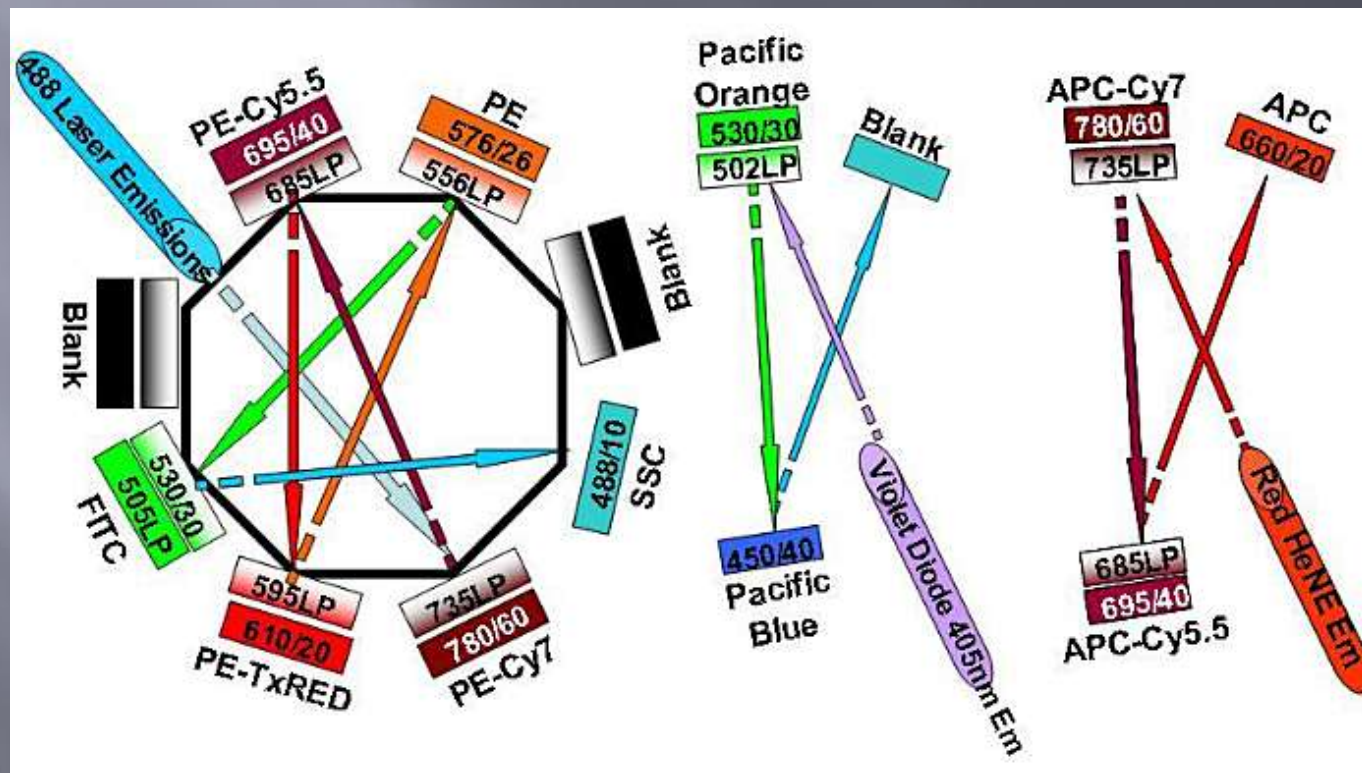
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



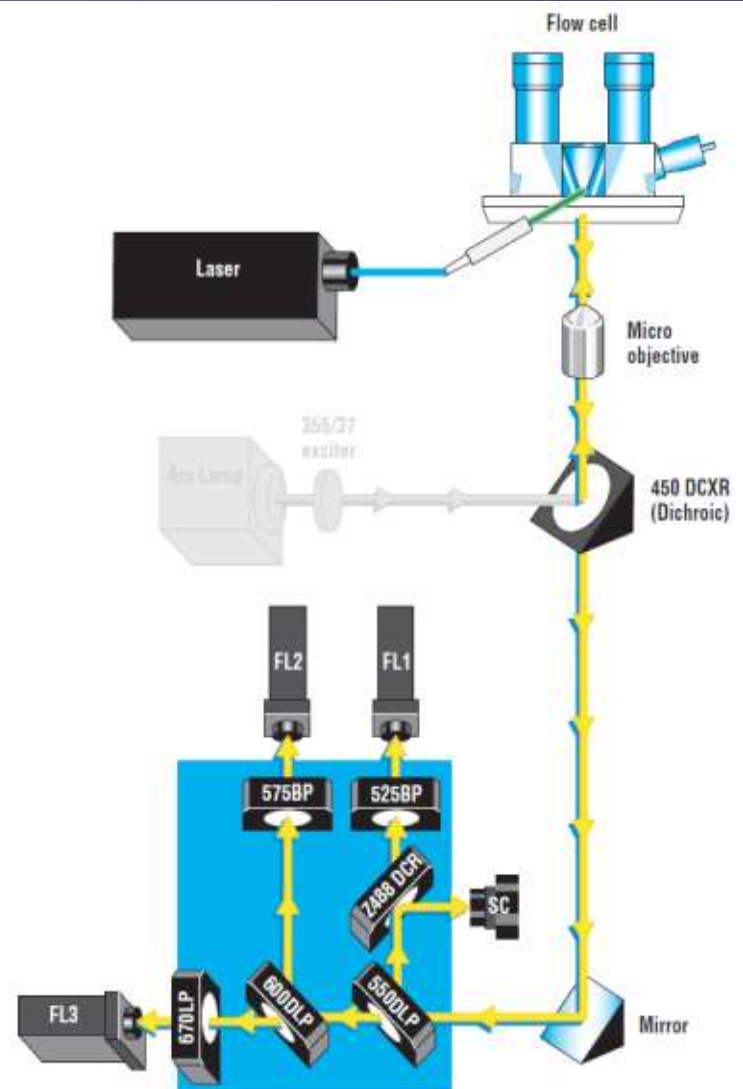
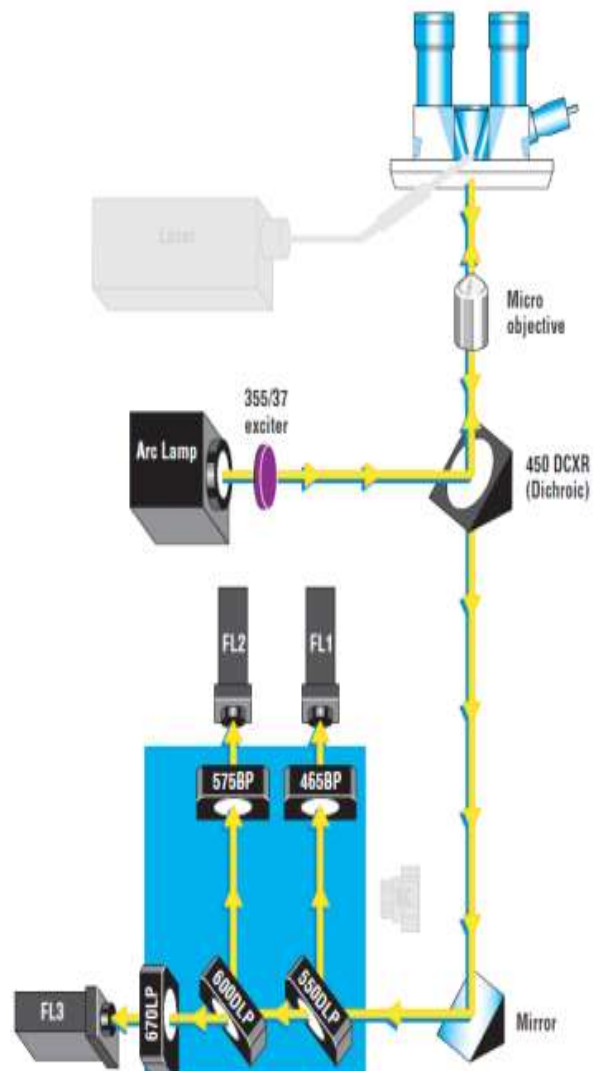
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



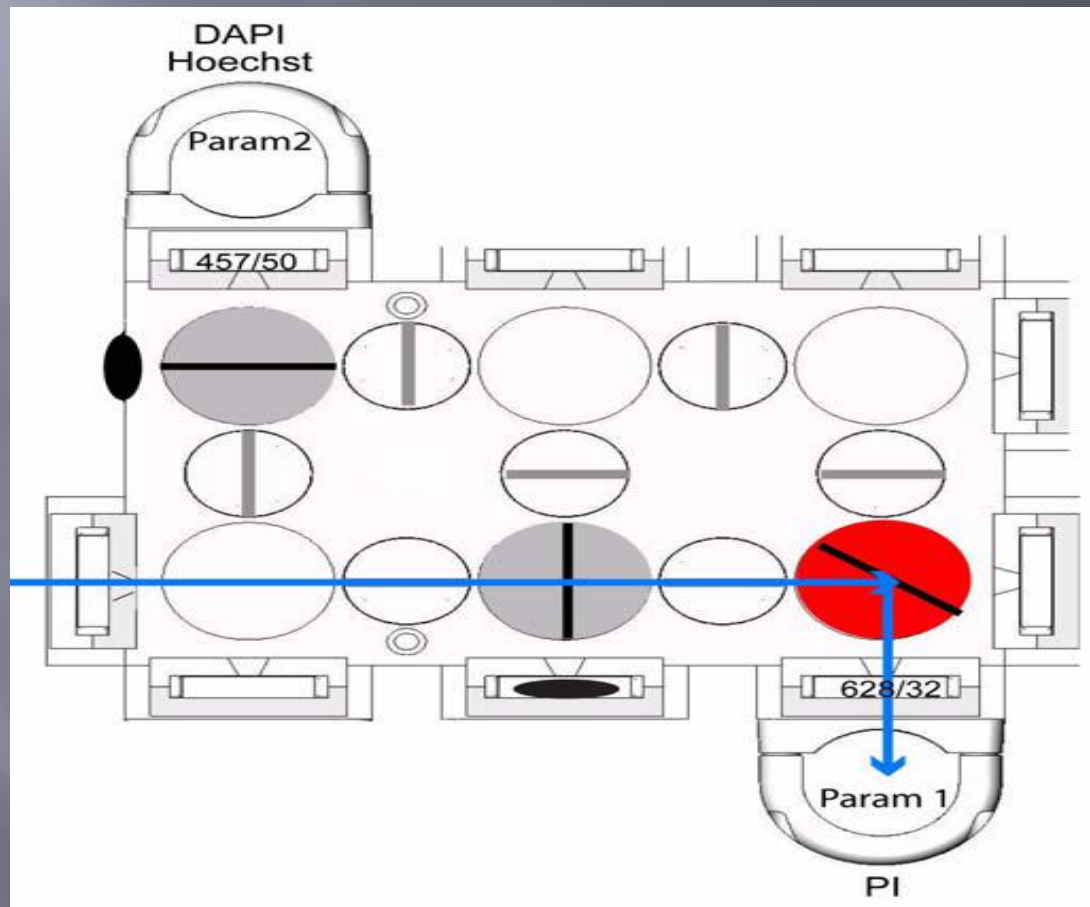
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



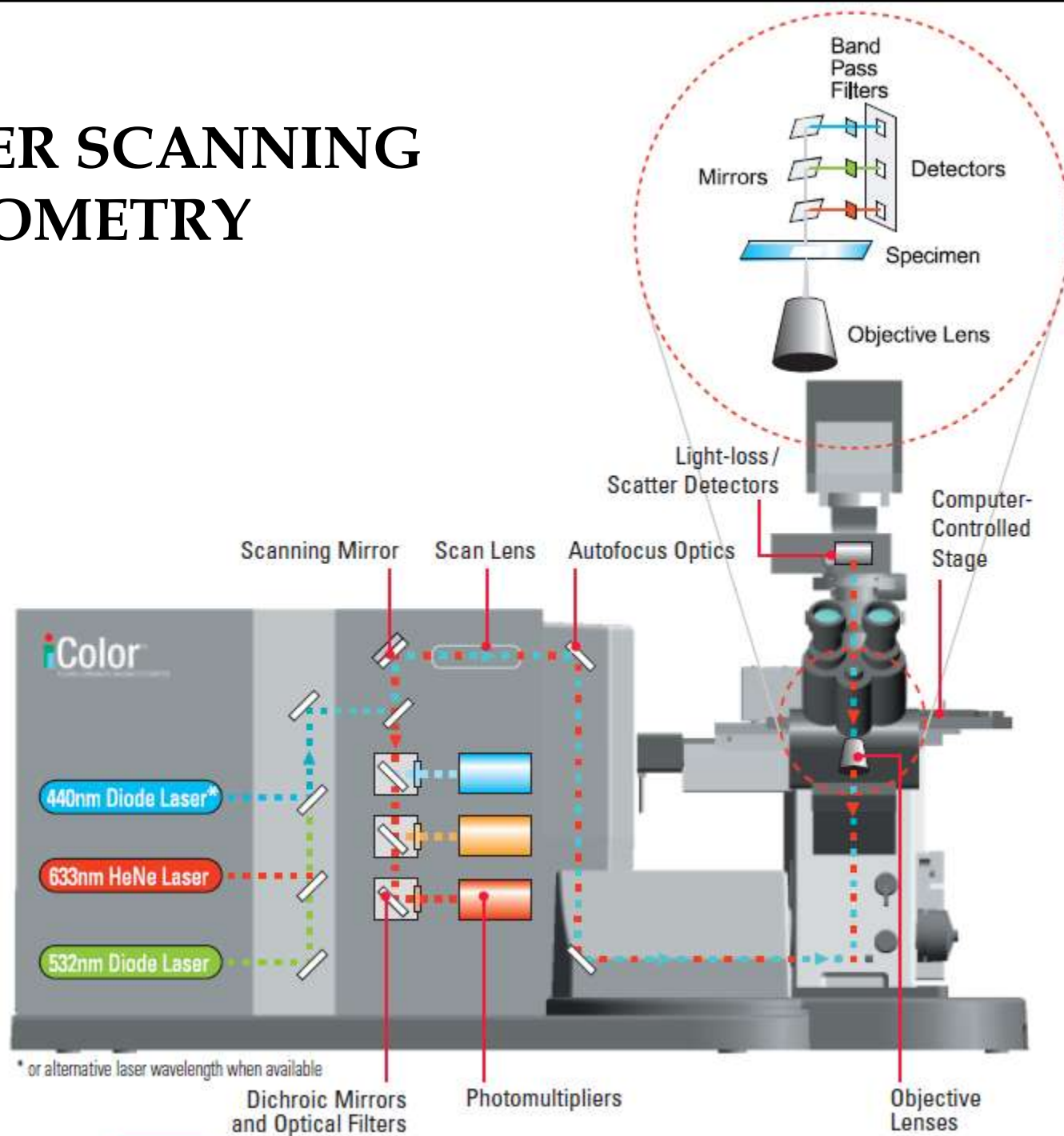
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

- ☐ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ
- ☐ ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΙ
- ☐ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
- ☐ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
- ☐ ΚΙΝΗΤΙΚΗ

LASER SCANNING CYTOMETRY



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ▣ **Practical Flow Cytometry**, Howard Maurice Shapiro - Wiley-Liss (2003) - ISBN 0471411256
- ▣ **PURDUE UNIVERSITY**
<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>
- ▣ **CURRENT PROTOCOLS IN CYTOMETRY , WILEY**
- ▣ **BECKMAN COULTER** www.beckmancoulter.com
<http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/flow-cytometry/webinar-symposium/index.htm>
- ▣ BECKMAN COULTER FC500 Flow Cytometer User and Service manual
- ▣ BECKMAN COULTER NAVIOS / GALLIOS Flow Cytometer User and Service manual
- ▣ BECKMAN COULTER MOFLO XDP Flow Cytometer User and Service manual
- ▣ BD BIOSCIENCES Canto II and LSRFortessa instrument brochures
- ▣ **INTERNET - INTERNET - INTERNET**