کمی‌سازی توزیع مولکول‌های فام‌ساز نزدیک به سطح در تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی

الهام شیخی[1]، بهناز شجاع‌الدین[2]، شراره تودد[3]، محمدامین بصام[4]، حسین نادری‌منش[5*]، بتول سجاد[6*]

1- دکتری، گروه فیزیک، دانشکده فیزیک و شیمی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
2- کارشناسی ارشد، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- محقق پسادکتری، دانشکده فیزیک و اخترشناسی، دانشگاه ادینبورگ، ادینبورگ، بریتانیا
4- دکتری، گروه فیزیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
5- استاد گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
6- دانشیار گروه فیزیک، دانشکده فیزیک و شیمی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

دریافت: 1398/9/24 پذیرش: 1399/8/6

*نویسندگان مسئول:
naderman@modares.ac.ir
bsajad@alzahra.ac.ir

چکیده:

میکروسکوپِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی ابزاری کارا، برای مشاهده و ثبت پدیده‌های رخ‌داده در فاصله‌ای کمتر از صد نانومتر است. از این ویژگی منحصربه‌فرد میکروسکوپ، برای بررسی کیفی اسکلت سلولی، در نزدیکی سطح زیرینِ سلول استفاده می‌شود. در این مقاله، توزیع اکتین‌ها در فاصله کمتر از صد نانومتری از سطحِ تماسِ سلول با بستر زیرین، با استفاده از میکروسکوپِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی برپایه منشور تصویربرداری شده است. کمّی‌سازی اکتین‌های اسکلت سلولی برای بررسی خزیدن سلول‌ها از لحظه اتصال اولیه به بستر زیرین تا آغاز حرکت از اهمیت بالایی برخوردار است؛ بدین‌جهت در این مقاله، با استفاده از محاسبه توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز، روشی برای کمّی‌سازی توزیع مولکول‌های فام‌ساز در نزدیکیِ سطح زیرین سلول ارائه شده است. این روش جدید، امکان مطالعه خزیدن سلول براساس تصویربرداری لحظه‌ای از سطح سلول را از طریق محاسبه توزیع موضعی مولکول‌های فام‌ساز در آن ناحیه فراهم می‌کند.

کلیدواژگان: میکروسکوپِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی، کمّی‌سازی، مولکول فام‌ساز، تابع-توزیع-احتمال، توزیع سطحی- حجمی.

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

محاط یا محیط شده است. سپس، بیضی به قاچ‌هایی با زاویه مرکزی برابر تقسیم شده، و توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر قاچ به دست آمده است. با معلوم‌بودن توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر قاچ، نمودار تابع-توزیع-احتمال سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر تک‌سلول بر حسب زاویه رسم شده است.

با انتخاب تک‌سلول‌هایی که در مراحل مختلفِ چسبیدن به سطح زیرین یا گسترش هستند، نمودار تابع-توزیع-احتمالِ سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز هر سلول به دست آمده و با یکدیگر مقایسه شده است.

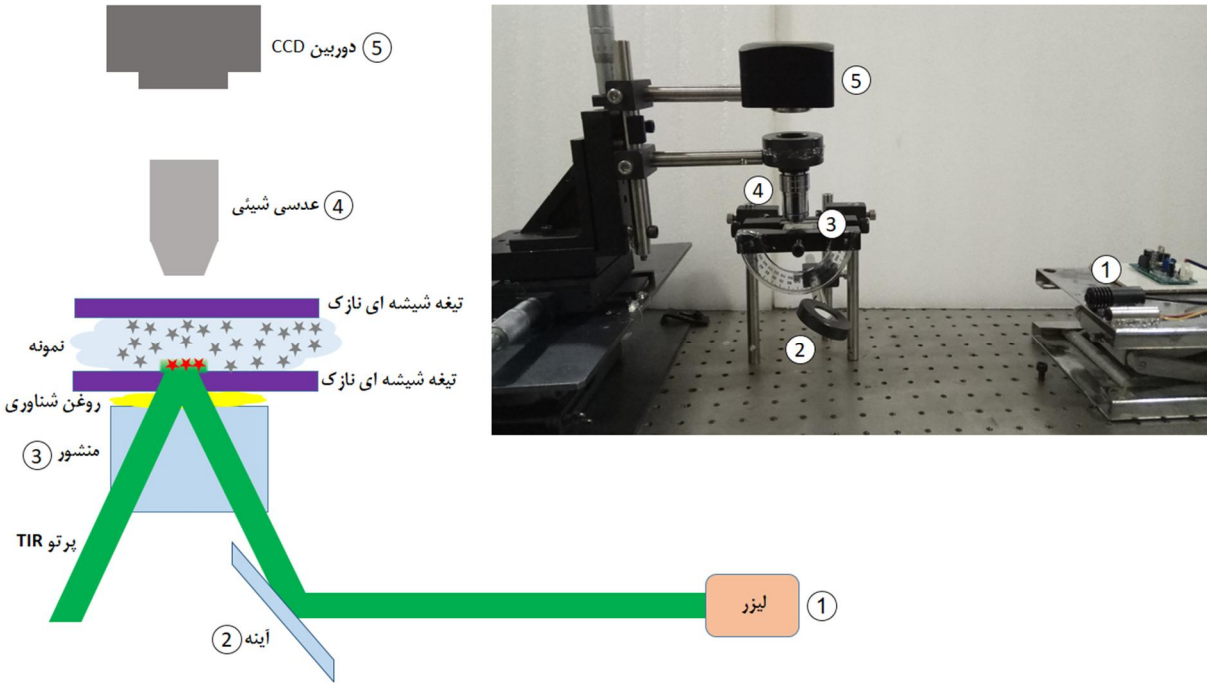
مواد و روش‌ها

تهیه و رنگ‌آمیزی سلول‌های زیستی

سلول‌های سرطانی پوست با منشأ انسانی (A-375) از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در ترکیبی از محیط DMEM (BIO_IDEA)، 10% سرم جنین گاوی (Gibco) و 1% آنتی بیوتیک‌های پنیسیلین و استرپتومایسین (BIO-IDEA)، و شرایط محیطی دمای 37 درجه سانتی‌گراد، و 5% دی اکسید کربن رشد داده شدند. سپس، سلول‌ها با چگالی سطحی تقریبی 3000 سلول بر سانتی‌متر مربع، روی سطح شیشه‌های نازکی با پوشش فیبرونکتین قرار داده شدند. شیشه‌های نازک را داخل محیط کشتی که در بالا گفته شد فرو برده و به مدت 24 ساعت در شرایط دمای 37 درجه سانتی‌گراد، و 5% دی اکسید کربن نگهداری شده، تا سلول‌ها به لایه فیبرونکتین چسبیده و برای رنگ‌آمیزی اسکلت سلولی آماده شوند. برای تثبیت سلول‌های رشد داده‌شده روی لایه فیبرونکتین، سلول‌ها به مدت 30-10 دقیقه در معرض پارافرمالدهید با غلظت حجمی 4% (Sigma-Aldrich) و بعد از شستشو با پی بی اس (فسفات بافر سیلانت)، به مدت 5-3 دقیقه در معرض تریتون x-100 با غلظت حجمی 0/1% (Sigma-Aldrich) قرار داده شدند. بعد از شستشوی مجدد سلول‌ها با پی بی اس، به مدت 90 دقیقه، در معرض فالویدین کروز فلور 633 (Cruz Santa) با غلظت حجمی 1% (رقیق شده با بافر بی اس اِی 1%) قرار داده شدند تا فالویدین به داخل سلول نفوذ و به رشته‌های اکتین اتصال یک-به-یک پیدا کند. لازم است مرحله رنگ‌آمیزی در تاریکی انجام شود و سپس سلول‌ها در محیط خشک و خنک و به دور از تابش نور نگهداری شوند.

تصویربرداری از سلول‌های زیستی و اسکلت سلولی

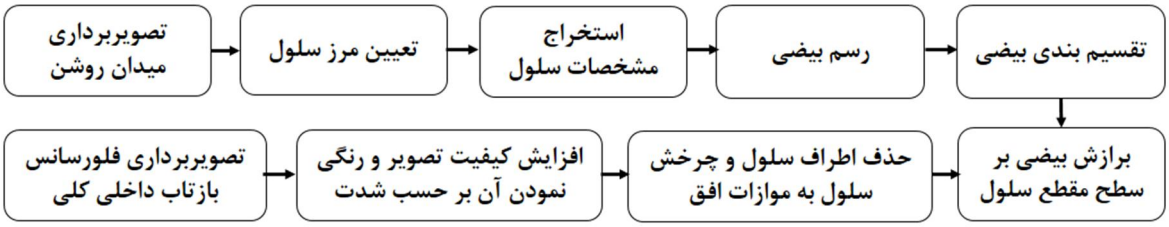
تصویربرداری با یک میکروسکوپِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی که بر پایه منشور طراحی‌شده، انجام شده است. چیدمان آزمایشگاهی (شکل 1)، به این ترتیب است که نور لیزر نئودمیوم یاگ با طول موج 532 نانومتر و توان اسمی 60 میلی وات با برخورد به آینه تخت بازتاب می‌یابد. با تنظیم آینه، نور تحت زاویه‌ای به منشور شیشه‌ای با ضریب شکست 1/52 تابیده می‌شود که در مرز نمونه، بازتاب-داخلی-کلی رخ دهد. بدین‌ترتیب، سطح سلول با استفاده از میدان الکتریکی میرای تولیدشده روشن می‌شود. تابش گسیلی (تابش فلورسانس) مولکول‌های فام‌ساز متصل به اکتین‌ها به‌وسیله یک عدسی با بزرگنمایی 100 برابر، و عدد گشودگی 1/25 (ACHRO, OIL)، در کانون عدسی جمع‌آوری می‌شود. دوربین دیجیتالی ToupCam (U3CMOS) در کانون عدسی قرار گرفته و تصویر خاکستری، با تعداد پیکسل 3584×2746 و 8 بیت ثبت شده است. مدت زمان نوردهی به نمونه‌ها یکسان (0/5 ثانیه، زمان برانگیختگی مولکول فام سازِ متصل به فالویدین) درنظر گرفته شده و تصویربرداری در دو حالت میدان روشن و فلورسنت انجام شده است.



شکل 1 طرح‌واره و چیدمان میکروسکوپیِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی بر پایه منشور

پردازش تصویر اسکلت تک‌سلول

پردازش تصویرهای میدان روشن، و فلورسنت با نرم‌افزار متلب انجام شده است. الگوریتم مربوط به مراحل پردازش در شکل 2 نشان داده شده است. در مرحله نخست، با نرم‌افزار متلب، مرز سلول از روی تصویر میدان روشن به دست آمده و براساس مرز تک‌سلول، و با استفاده از نرم‌افزار متلب، مشخصات هندسی سلول مثل مساحت (A)، محیط (P) و مرکز هندسی (C) به دست می‌آید. علاوه بر آن، نرم‌افزار متلب شبیه‌ترین بیضی را با قطرهای کوچک و بزرگ (قطر کوچک (b)، و قطر بزرگ (a)) بر تک‌سلول، محاط یا محیط می‌کند.



شکل 2 الگوریتم پردازش تصویرهای میدان روشن و تصویر تابش، مولکول‌های فام‌ساز

با دانستن این موضوع که نزدیک‌ترین شکل هندسی به سطح مقطع سلول در صفحه تصویر، بیضی است و با دراختیارداشتن مرکز هندسی سلول، و دو قطر کوچک و بزرگ، ویژگی‌های ظاهری سلول بر اساس سه کمیت مساحت (A)، خروج از مرکز $(e=\sqrt{1-\frac{b^2}{a^2}})$ و ضریب دایروی‌بودن سلول $(c=\frac{4\pi A}{P^2})$ بررسی می‌شود [18] و [24].

خروج از مرکز، میزان کشیدگی سلول را بیان می‌کند. این کمیت برای سلول‌های گسترده‌نشده (سطح مقطع دایره‌ای‌شکل) به مقدار صفر میل می‌کند و برای سلول‌های گسترده‌شده، دوکی‌شکل (سطح مقطع بیضی‌شکل) به مقدار یک میل می‌کند. بنابراین، کمیت خروج از مرکز می‌تواند معیاری برای جداسازی سلول‌های گسترده‌شده از سلول‌های گسترده‌نشده در نظر گرفته شود.

ضریب دایروی‌بودن معیار خوبی برای تشخیص میزان نزدیکی و دوریِ شکل هندسی سطحِ مقطعِ سلول به دایره، ضمن در نظر گرفتن "همواری" در محیط آن است. هرچه این کمیت به یک نزدیک‌تر باشد شکل سطح مقطع سلول به دایره شبیه‌تر و مرز آن هموارتر است و این یعنی سلول هنوز باز نشده است. با فاصله‌گرفتن این کمیت از عدد یک، سطح مقطع سلول از شکل دایره دورتر و مرز آن ناهموارتر (دارای گوشه و ضلع) خواهد بود که این امر از گسترده‌شدن سلول حکایت می‌کند.

در مرحله بعد، تصویر فلورسانسِ سلول پردازش می‌شود. در میکروسکوپِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی، تغییرات شدت موج میرا تابعی نمایی از فاصله مرز بازتاب-داخلی-کلی است. اگر شدت موج برانگیزاننده در عمق نمونه، یکنواخت بود، با فرض اینکه بین شدت نور تابش‌شده به نمونه برای برانگیختگی، با شدت نور تابش-شده از مولکول‌های فام‌ساز (در اینجا فام سازهای متصل به اکتین) یک تناسب خطی وجود دارد، و شدت نور ثبت‌شده از مولکول‌های فام‌ساز با چگالی حجمی مولکول‌های فام‌ساز رابطه خواهد داشت. درحالی‌که، در میکروسکوپِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی، شدت موج برانگیزاننده در عمق نمونه یکنواخت نیست و به صورت نمایی با فاصله از سطح بازتابان (در اینجا محل تماس لایه فیبرونکتین با سلول) رابطه دارد. ازاین‌رو، کمیت‌های "شدت" یا "تباین در شدت"، برای بررسی مولکول‌های فام‌ساز و کمی‌سازی توزیع اکتین‌ها معیاری مناسب نیستند. در ادامه، روش دیگری برای کمّی‌سازی مولکول‌های فام‌ساز در نمونه معرفی شده است که در آن از مساحت پیکسل‌های نورخورده به جای مقدار شدت استفاده می‌شود.

با درنظرگرفتن اینکه در تصویر ثبت‌شده با میکروسکوپِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی، فقط توزیع سطحی مولکول‌های فام‌سازی که در یک حجم با ضخامت کمتر از 100 نانومتر حضور دارند ثبت شده است، بنابراین، توزیع فام‌سازها با تقریب خوبی یک توزیع سطحی در یک حجم ناچیز است که از تعبیر توزیع سطحی- حجمی استفاده خواهیم کرد. با معلوم بودن مرکز هندسی هر سلول و قطرهای بیضی محاطی یا محیطی، بیضی رسم‌شده به قاچ‌هایی با زاویه‌های مرکزی برابر تقسیم می‌شود. به این ترتیب، سطح مقطع سلول نیز به قاچ‌هایی با زاویه‌های مرکزی برابر تقسیم و تعداد پیکسل‌های نورخورده در هر تک‌قاچ کمّی‌سازی می‌شود.

تعداد پیکسل‌های نورخورده با توزیع سطحی-حجمی مولکول‌های فام‌ساز در حجم محدود و مؤثر در میکروسکوپِ بازتاب-داخلی-کلی متناسب است. بنابراین به جای بررسی اندازه شدت در هر پیکسل و ربط‌دادن آن با توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر پیکسل، توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز در یک قاچ بررسی می‌شود. بدیهی است که هرچه قاچ‌ها کوچک‌تر باشند، این کمّی‌سازی، اطلاعات دقیق‌تری در اختیار قرار خواهد داد. در هر قاچ، نسبت مساحت پیکسل‌های نورخورده (متناسب با توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز) به مساحت سلول در هر قاچ (مساحت محدود شده از سلول در یک قاچ) می‌تواند به-عنوان یک کمیت معنادار در نظر گرفته شود. این کمیت به جای وابستگی به مقدار شدتِ پیکسل‌ها، به مساحت و تعداد پیکسل‌ها وابسته است و در نتیجه دقت و معنای بیشتری در میکروسکوپِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی

دارد. با شمارش تعداد پیکسل‌های نورخورده، و نورنخورده داخل بخش‌هایی از سلول که در هر قاچ محصور شده است و معلوم‌بودن مساحت هر پیکسل از تصویر، می‌توان توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر قاچ را به دست آورد. اگر مساحت پیکسل‌های روشن در هر قاچ را که با توزیع سطحی مولکول‌های فام‌ساز در یک قاچ متناسب است با A_θ^L، و مساحت بخشی از سلول را که در یک قاچ محدود شده است با A_θ^T نمایش دهیم، می‌توان رابطه زیر و نسبت آن را به دست آورد:

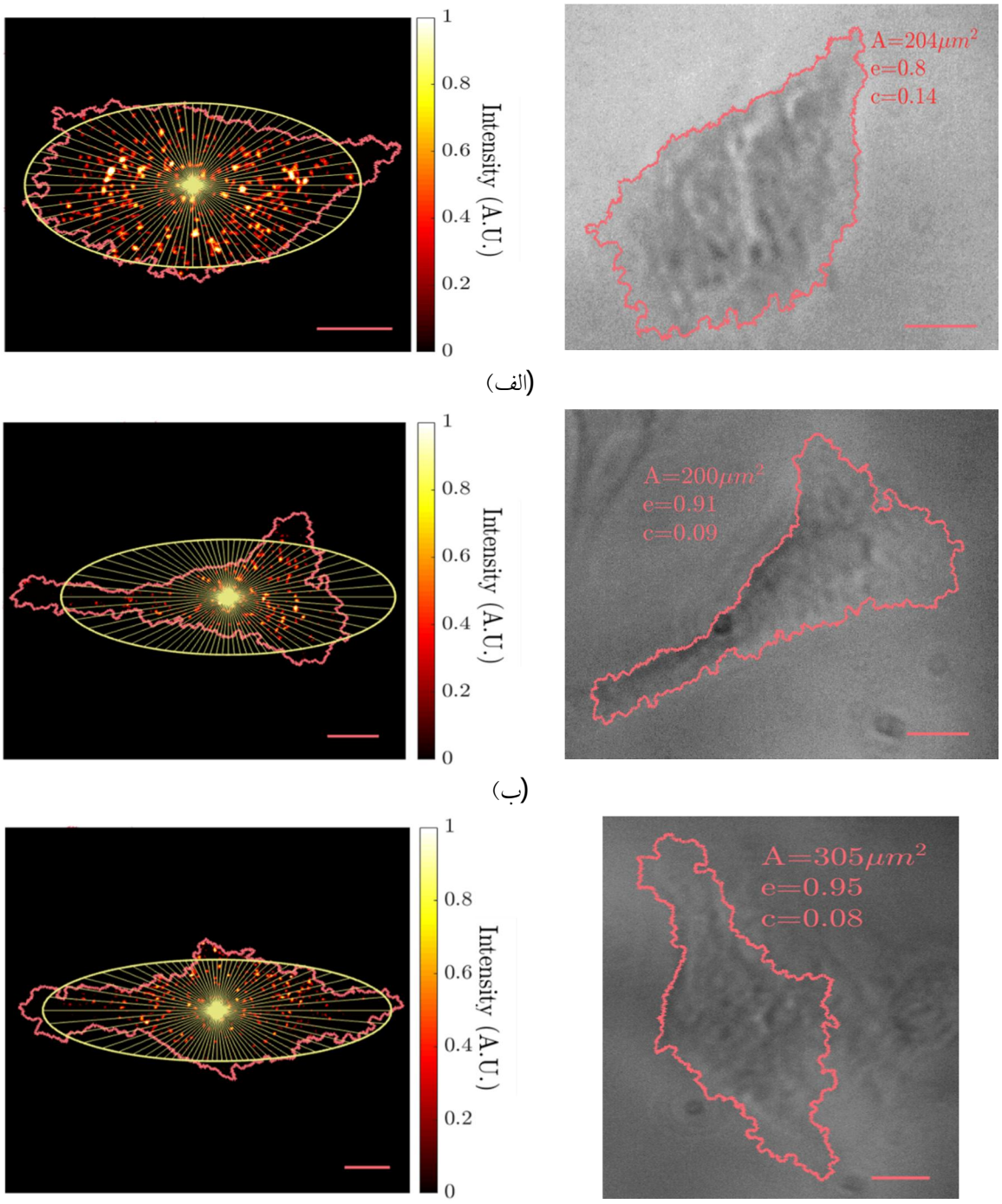
$$r_\theta = \frac{A_\theta^L}{A_\theta^T} \qquad (1)$$

با به‌دست‌آوردن توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر قاچ (r_θ)، و برای تمام قاچ‌های بیضی که سطح سلول را جاروب می‌کنند، می‌توان نمودار توزیع سطحی-زاویه‌ای مولکول‌های فام‌ساز را برحسب زاویه‌های مرکزی برابر (θ) رسم کرد. هرچه زاویه مرکزی قاچ‌ها کوچک‌تر باشد، وضوح زاویه‌ای افزایش خواهد یافت و نتیجه دقیق‌تر خواهد بود. اگرچه در این حالت باز هم مساحت قاچ‌ها با یکدیگر مساوی نیستند ولی «هر دو قاچ مجاور به هم» نزدیک‌ترین مقدار مساحت را دارند.

نتایج و بحث

قرارگیری سلول بر سطح زیرین در سه مرحله انجام می‌شود. در اتصال اولیه، سطح مقطع سلول تقریباً دایره‌ای‌شکل است و در اصطلاح سلول باز نشده است. با گسترده‌شدن سلول بر سطح زیرین، سطح مقطع سلول به بیضی نزدیک‌تر و سلول نیمه‌باز می‌شود. درنهایت که سلول برای حرکت آماده یا در اصطلاح باز و گسترده شده است، سطحِ مقطعیِ عموماً چند ضلعی دارد. شکل 3، سه تک‌سلول را در مراحل مختلف چسبیدن به سطح و نیز نحوه تقسیم‌بندی زاویه‌ایِ سطحِ مقطع سلول‌ها را نشان می‌دهد. مشخصات هندسی سلول -مساحت (A)، خروج از مرکز (e)، و ضریب دایروی‌بودن (c) هر سلول- گزارش شده است. شکل 3-الف سلولی را نمایش می‌دهد که در اتصال اولیه با بستر زیرین است. این سلول هنوز روی بستر گسترده نشده و سطح مقطع آن به دایره نزدیک‌تر است. شکل 3-ب سلولی را نشان می‌دهد که اتصال بیشتری با بستر زیرین یافته و گسترده‌تر شده است. مشاهده می‌شود سلول نیمه باز شده، و تقارن دایره‌ای خود را از دست داده است. در مرحله نهایی سلول کامل روی بستر زیرین، باز و برای حرکت آماده می‌شود. همان‌طور که در شکل 3-ج مشاهده می‌شود سلول بازشده، ظاهری کشیده و شبیه بیضی دارد.

برای هرکدام از سلول‌های نمایش داده‌شده در شکل 3، توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر قاچ (r_θ)، و برای تمام قاچ‌های بیضی که سطح سلول را جاروب می‌کنند، ارائه شده است. با بهنجارکردن نمودار توزیع سطحی- حجمی بر حسب زاویه، تابع-توزیع- احتمال سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز (f_{r_θ}) بر حسب زاویه (θ) در هر سلول به دست می‌آید. در این نمودار، محور شعاعی توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز (f_{r_θ})، و محور قطبی زاویه‌های مرکزی قاچ‌ها (□) نمایش داده شده است.

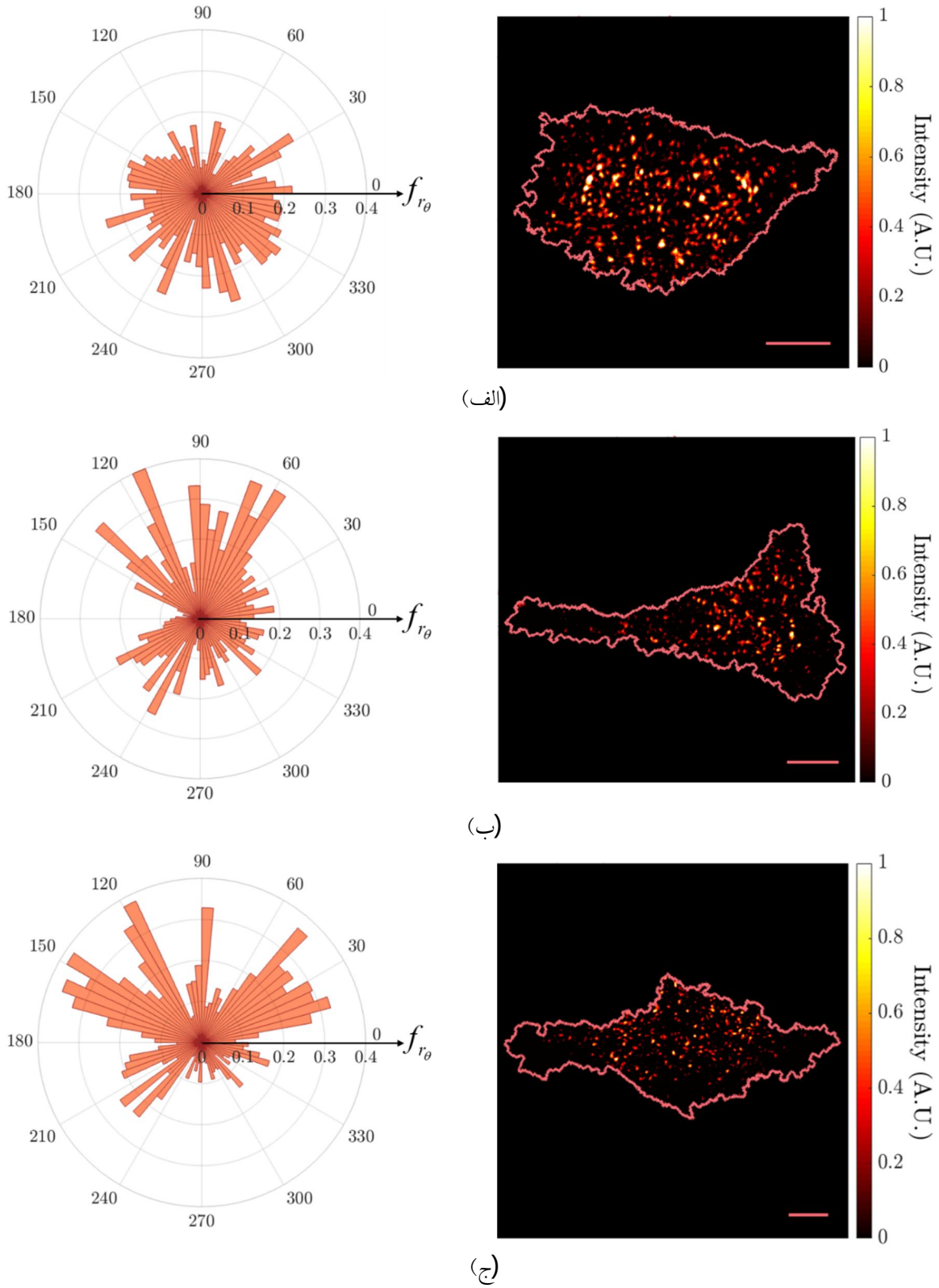


شکل 3 در سمت راست، تصویر میدان روشن سلول (الف) بازنشده، (ب) نیمه‌باز و (ج) بازشده، همراه مرز تعیین‌شده و مشخصات هندسی سلول که عبارت است از مساحت (A)، خروج از مرکز (e) و ضریب دایروی‌بودن (c) قرار دارد و در سمت چپ، بیضی محاط یا محیط‌شده به 72 قاچ با زاویه‌های مرکزی مساوی 5 درجه بر سطح مقطع سلول رسم شده است.
خط مقیاس 5 میکرومتر را نشان می‌دهد.

در شکل 4، نمودار تابع-توزیع-احتمال سطحی-حجمی مولکول‌های فام‌ساز بر حسب زاویه هریک از تک‌سلول‌های شکل 3 نمایش داده شده است. سلول بازنشده علاوه بر آنکه سطح مقطع تقریباً دایره‌ای‌شکل دارد، تابع-توزیع-احتمال سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز برحسب زاویه آن نیز نسبت به قطر بزرگ و قطر کوچک سلول متقارن است (شکل 4- الف). درحالی‌که برای سلول، نیمه‌بازشده (شکل 4- ب)، سطح مقطع آن از شکل دایره (که معیاری برای تشخیص آغاز چسبیدن است) خارج و تقارن تابع-توزیع-احتمال سطحی-حجمی مولکول‌های فام‌ساز بر حسب زاویه نیز نسبت به قطر بزرگ و قطر کوچک سلول شکسته شده است. اگرچه مساحت دو سلول بازنشده و نیمه‌بازشده تقریباً برابر است، ضریب دایروی‌بودن سلول نیمه‌بازشده کوچک‌تر از سلول بازنشده است که این امر نشان‌دهنده طولانی‌تربودن مرز (محیط) سلول نیمه‌بازشده نسبت به سلول بازنشده است. این تابع، برای سلولی که کامل باز شده و برای حرکت آماده است (شکل 4- ج)، نسبت به قطر بزرگ و قطر کوچک سلول به‌شدت نامتقارن است. از مقایسه نمودار تابع-توزیع-احتمال سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز بر حسب زاویه در تک‌سلول در وضعیت‌های مختلف نسبت به بستر زیرین که در شکل 4 نشان داده شده است، می‌توان نتیجه گرفت که تقارن در توزیع سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز نسبت به قطر کوچک و قطر بزرگ سلول با تغییرِ وضعیت چسبیدن سلول، شکسته می‌شود.

نتیجه‌گیری

در روش‌های میکروسکوپی معمول، کمّی‌سازی اکتین‌های اسکلت سلولی اغلب بر مبنای محاسبه شدت میانگین ثبت‌شده از مولکول‌های فام‌ساز در سلول‌هاست. در این روش‌ها، شدت میانگین فلورسانس ثبت‌شده با غلظت مولکول‌های فام‌ساز موجود در حجم سلول متناسب است. غلظت مولکول‌های فام‌ساز نیز متناسب با چگالی حجمی اکتین‌های اسکلت سلولی در نظر گرفته می‌شود. درحالی‌که در میکروسکوپیِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی، تغییر شدت در مولکول‌های فام‌ساز فقط ناشی از تغییر غلظت مولکول‌های فام‌ساز نیست. بلکه فاصلهٔ عمودی مولکول‌های فام‌ساز از بستر سلول نیز می‌تواند به کاهش یا افزایش شدت تابش گسیلی از مولکول‌های فام‌ساز منجر شود. این پیچیدگی، به علت کاهش نمایی شدت موج میرا (به‌عنوان میدان برانگیخته‌کننده مولکول‌های فام‌ساز) با فاصله عمودی از بستر سلول است. این مسئله سبب می‌شود کمّی‌سازی شدت ثبت‌شده از مولکول‌های فام‌ساز معیار مناسبی در بررسی چگالی حجمی اکتین‌ها نباشد. در این کار، برای رفع این کاستی در روش میکروسکوپیِ فلورسانسِ بازتاب-داخلی-کلی روشی ارائه شده است که بتوان احتمال حضور اکتین‌های سطح سلول را با استفاده از مساحت نسبی فلورسانس ثبت‌شده در تصویر به دست آورد. به‌ویژه، در گذر زمان می توان به تابع-توزیع-احتمال- سطحی- حجمی مولکول‌های فام‌ساز بر حسب زاویه دست یافت و آن را بررسی و مقایسه کرد.



شکل 4 درسمت راست، تصویر رنگی فلورسانس بازتاب داخلی کلی و در سمت چپ، نمودار دایره‌ای تابع-توزیع-احتمال توزیع سطحی-زاویه‌ای مولکول‌های فام‌ساز قرار دارد.

سلول الف، بازنشده، سلول ب، نیمه‌باز و سلول ج، بازشده است. خط مقیاس 5 میکرومتر را نشان می‌دهد.

منابع

1. E. T. Spiliotis, E. P. Karasmanis, and L. Dolat, *Fluorescence microscopy of actin- and microtubule-associated septins in mammalian cells*, vol. 136. Elsevier Ltd, 2016.

2. B. A. Smith, J. Gelles, and B. L. Goode, *Single-molecule studies of actin assembly and disassembly factors*, 1st ed., vol. 540. Elsevier Inc., 2014.

3. P. T. Yam *et al.*, "Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility," *J. Cell Biol.*, vol. 178, no. 7, pp. 1207–1221, 2007.

4. J. Weichsel, E. Urban, J. V. Small, and U. S. Schwarz, "Reconstructing the orientation distribution of actin filaments in the lamellipodium of migrating keratocytes from electron microscopy tomography data," *Cytom. Part A*, vol. 81 A, no. 6, pp. 496–507, 2012.

5. S. Basu, C. Liu, and G. K. Rohde, "Localizing and extracting filament distributions from microscopy images," *J. Microsc.*, vol. 258, no. 1, pp. 13–23, 2015.

6. Hohmann and Dehghani, "The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork," *Cells*, vol. 8, no. 4, p. 362, 2019.

7. M. Melak, M. Plessner, and R. Grosse, "Actin visualization at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 3, pp. 525–530, 2017.

8. S. Na, Z. Sun, G. A. Meininger, and J. D. Humphrey, "On atomic force microscopy and the constitutive behavior of living cells," *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 3, no. 2, pp. 75–84, Nov. 2004.

9. M. Cardoso Dos Santos, R. Déturche, C. Vézy, and R. Jaffiol, "Topography of Cells Revealed by Variable-Angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy," *Biophys. J.*, vol. 111, no. 6, pp. 1316–1327, 2016.

10. H. Colin-York *et al.*, "Cytoskeletal actin patterns shape mast cell activation," *Commun. Biol.*, vol. 2, no. 1, p. 93, Dec. 2019.

11. S. D. Hansen, J. B. Zuchero, and R. D. Mullins, "Cytoplasmic Actin: Purification and Single Molecule Assembly Assays," vol. 1046, A. S. Coutts, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 145–170.

12. M. C. Dos Santos, C. Vézy, and R. Jaffiol, "Nanoscale topography of cells and vesicles in adhesion revealed by quantitative Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy," in *European Microscopy Congress 2016: Proceedings*, vol. 112, no. 483, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016, pp. 975–976.

13. Y. Jiang and S. Huang, "Direct Visualization and Quantification of the Actin Nucleation and Elongation Events in vitro by TIRF Microscopy," *Bio-Protocol*, vol. 7, no. 5, 2017.

14. L. Marcotte and M. Tabrizian, "Sensing surfaces: Challenges in studying the cell adhesion process and the cell adhesion forces on biomaterials," *Itbm-Rbm*, vol. 29, no. 2–3, pp. 77–88, 2008.

15. I. Fujiwara, S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu, and S. Ishiwata, "Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments," *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 9, pp. 666–673, 2002.

16. I. Fujiwara, D. Vavylonis, and T. D. Pollard, "Polymerization kinetics of ADP- and ADP-Pi-actin determined by fluorescence microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 21, pp. 8827–8832, 2007.

17. J. R. Kuhn and T. D. Pollard, "Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 2, pp. 1387–1402, 2005.

18. J. B. Manneville, "Use of TIRF microscopy to visualize actin and microtubules in migrating cells," *Methods Enzymol.*, vol. 406, no. 2004, pp. 520–532, 2006.

19. K. J. Amann and T. D. Pollard, "Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 26, pp. 15009–15013, 2001.

.20. C. L. Asbury, "Data analysis for total internal reflection fluorescence microscopy," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, no. 5, pp. 471–473, 2016.

.21. A. Elosegui-Artola *et al.*, "Image analysis for the quantitative comparison of stress fibers and focal adhesions," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, 2014.

22. Z. Zhang, S. Xia, and P. Kanchanawong, "An integrated enhancement and reconstruction strategy for the quantitative extraction of actin stress fibers from fluorescence micrographs," *BMC Bioinformatics*, vol. 18, no. 1, pp. 1–14, 2017.

23. Y. Liu, K. Mollaeian, and J. Ren, "An image recognition-based approach to actin cytoskeleton quantification," *Electron.*, vol. 7, no. 12, 2018.

24. M. Schmid, M. Vetterli, and K. Wegener, "Polymer powders for laser-sintering: Powder production and performance qualification," in *AIP Conference Proceedings*, 2019, vol. 2065, no. February, p. 020008.

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Quantification of Superficial Distribution of Fluorophores in a Total-Internal-Reflection Fluorescence Microscope

Elham Sheykhi[1], Behnaz Shojaedin[2], Sharareh Tavaddod[3], Mohammad Amin Bassam[4], Hosein Naderi-Manesh[5*], Batool Sajad[6*]

1- PhD, Department of Physics, Faculty of Physics & Chemistry, Alzahra University, Tehran, Iran
2. MSc, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- PhD, School of Physics and Astronomy, University of Edinburgh, Edinburgh, UK
4- PhD, Department of Physics, Faculty of Physics, Malek Ashtar University of technology, Tehran, Iran
5- Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
6- Associate Professor, Department of Physics, Faculty of Physics & Chemistry, Alzahra University, Tehran, Iran

Accepted: 2020/10/27 Received: 2019/12/15

*Corresponding authors:
naderman@modares.ac.ir
bsajad@alzahra.ac.ir

Abstract:
Total-Internal-Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) is a useful tool to visualize and record the phenomena that happen below 100 nm thickness of the sample surface. This unique property of TIRFM helps to perform a qualitative study of cytoskeleton near the cell-substrate contact. Here, by staining the actins filaments of the human melanoma cell and implementing the prism-based total-internal-reflection fluorescence microscope, a method to quantify distribution of fluorophores at cell-substrate contact is proposed.

Keywords: total-internal-reflection fluorescence microscope, quantification, fluorophore, probability-distribution-function, surface-volume distribution