

飽和励起イメージスキャニング顕微鏡法による超解像イメージング Saturated-Excitation Image-Scanning Microscopy for Super-resolution Imaging.

阪大応物¹, Jena Univ.², 阪大 iReC³ °天満健太¹, 桶谷亮介¹, René Richter²,

Rainer Heinzmann², Nicholas I. Smith³, 藤田克昌¹

Osaka Univ.¹, Jena Univ.², iReC Osaka Univ.³, °Kenta Temma¹, Ryosuke Oketani¹,

René Richter², Rainer Heinzmann², Nicholas I. Smith, Katsumasa Fujita

E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

共焦点顕微鏡は超解像観察を可能とするが、そのためには蛍光検出のピンホール径を小さくする必要があり、検出される信号光が少ないという問題がある。この問題を解決するために、CCDカメラなどのアレイ検出器による分割検出を行う方法が提案されており、イメージスキャニング顕微鏡法 (ISM) と呼ばれている[1,2]。本研究では、ISM を利用することで、飽和励起(SAX)顕微鏡 [3]の信号対雑音比(SNR) の向上を行った。試料からの蛍光強度は励起光強度に対して線形な応答を示すが、励起強度を上げていくと発光の飽和が起こり非線形な応答を示す。飽和による非線形信号は、高強度である励起集光スポット中心付近から現れるため、非線形信号のみを抽出することで、空間分解能を向上させることができる。非線形信号の抽出は、低い励起光強度で取得した非飽和の蛍光像と、高い励起光強度で取得した飽和成分を含む蛍光像の差分を計算することで行う[4, 5]。さらに高い励起光強度を利用すれば、より高次の非線形信号を抽出でき、さらなる空間分解能向上が可能である。ISM による SNR の向上の効果のため、従来のレーザー走査顕微鏡では利用が困難であった高次の非線形信号が取得可能となると期待できる。また、高い周波数空間の信号は強度が低く雑音に埋もれやすいが、SN 比の向上はこれを検出しやすくし、実効的な分解能を向上させる。

Fig.1 に直径 100nm の蛍光ビーズの蛍光イメージと蛍光強度のプロファイルを示す。従来の SAX 顕微鏡に比べ、ISM-SAX 顕微鏡によって取得した画像では信号量が 2.1 倍程度となり、SNR が向上していることがわかる。この結果より、ISM-SAX 顕微鏡は、従来の SAX 顕微鏡に対して多くの信号量を得ることができ、高い SN 比で超解像イメージングが可能である事が示された

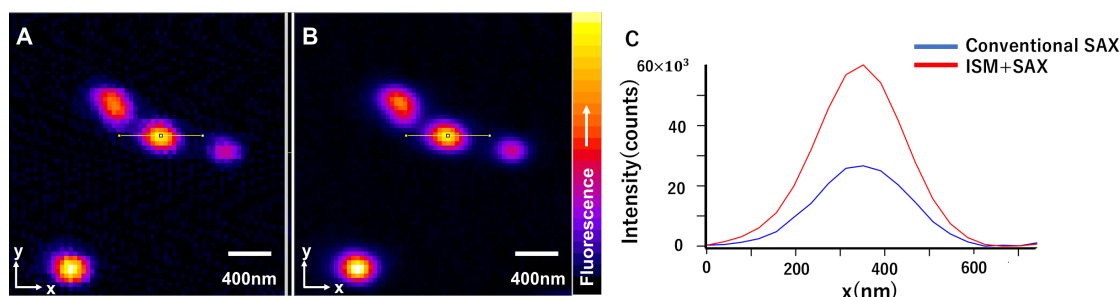


Fig. 1 Fluorescence images of fluorescent beads with the diameter of 100 nm. (A) Conventional SAX, (B) ISM+SAX. (C) Intensity profiles of beads in (A) and (B).

Excitation wavelength: 488 nm. Objective: Silicone oil-immersion with an NA of 1.3 .

References

- [1] C. J. R. Sheppard, *Optik* **80**(2), 53-54 (1988).
- [2] Müller and Enderlein, *Phys. Rev. Lett.* **104**(19), 198101 (2010).
- [3] Fujita et al., *Phys. Rev. Lett.* **99**(22), 228105 (2007).
- [4] Oketani et al., *Opt. Lett.* **42**(3), 571-574 (2017).
- [5] Nawa et al. (submitted).