

## 蛍光差分顕微イメージング法の開発

### Development of High Sensitivity Fluorescence Emission Difference Microscopic Imaging

電通大脳科学, ○小林 孝嘉, 王 楠

Univ. of Electro-Communications, Takayoshi Kobayashi, Wang Nan

E-mail: kobayashi@ils.uec.ac.jp

新しい超解像顕微イメージングの方法論に蛍光差分法 (fluorescence emission difference (FED)法)がある。これは、STED 法[1]と同じコンセプトによって超解像を達成する方法である。この方法ではガウシアンスポット励起で得られた蛍光イメージから、ドーナツスポット励起で得られたイメージを計算機上で引く。FED 法では差分を数値計算して得るので、ガウス型スポットとドーナツ型スポットの波長は同一で良く、STED 光の波長の選択の際の制約と、STED 法の多色化に対する制限が緩和される。さらに、ドーナツスポットも蛍光の励起に用いられるので、STED 法のように高出力である必要が無く、退色などの試料の破壊の可能性が抑えられる。従来の FED 法では、ガウシアンスポット励起のイメージを取得後にドーナツスポット励起のイメージを取得し、差を観測するので、それぞれのイメージを取得する実験の時刻が異なる。従って試料のガウシアンスポット励起の場合とドーナツスポット励起の場合の測定点がずれるおそれがある。特に生きた生体試料などのダイナミックな試料の観測に大きな障害となる。今回開発した方法は、ガウス型ビームとドーナツ型ビーム由来のイメージを同時に得ることにより、それぞれのイメージの位置が異なってしまう問題を解決したものである。その装置を図 1 に示す。光源をガウス型ビームとドーナツ型ビームを得るために 2 分割し、双方を異なる周波数で強度変調する。片方のビームを位相板(VPP)に通し、ドーナツビームとする。双方のビーム同士が干渉しないよう、偏光ビームスプリッタ (PBS) 上で偏光方向を直交させて重ねる。これらビームを顕微鏡に入射し、試料を励起する。2 つのビームによって励起された蛍光 (黄色線で示す) を同時に検出する。検出信号を 2 台のロックインアンプ (2LIA) を使い、それぞれの周波数によって検波する。これによってガウスビームとドーナツビーム由来の同時刻のイメージをクロストーク無しに得ることができる。

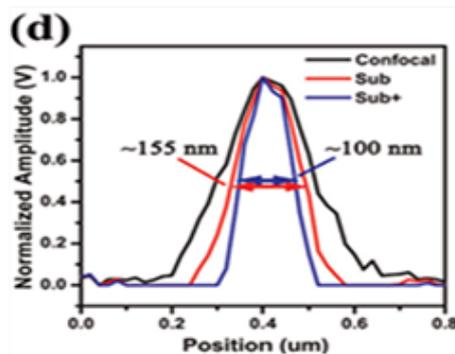
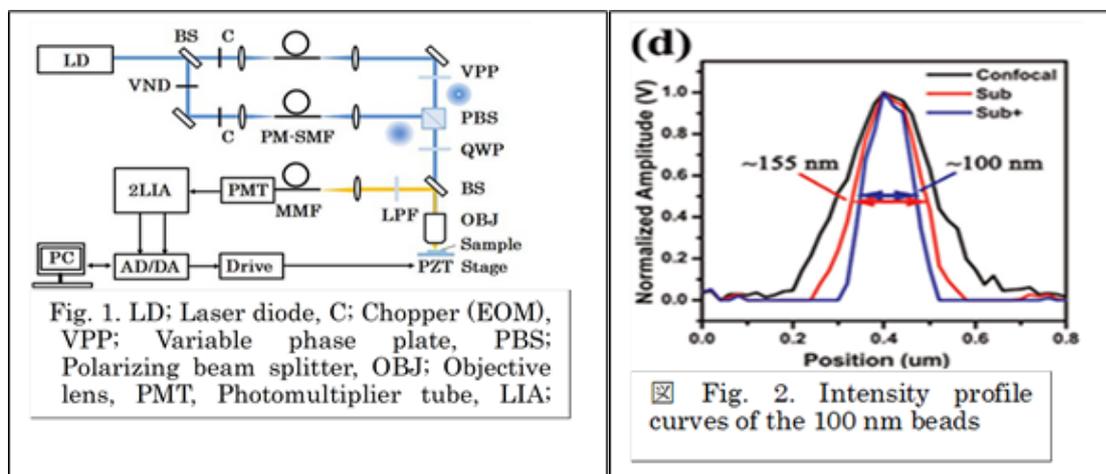


Fig. 2. Intensity profile curves of the 100 nm beads

[1], S. W. Hell and J. Wichmann, Opt. Lett. 19(11), 780–782 (1994).