

繰り返し誘導遷移を利用した超解像非線形蛍光顕微鏡

Superresolution nonlinear fluorescence microscopy using repetitive stimulated transition

株式会社ニコン 研究開発本部, °嶽文宏, 福武直樹, 林世莉, 瀧優介

Research & Development Division, Nikon Corporation,

°Fumihiko Dake, Naoki Fukutake, Seri Hayashi, Yusuke Taki

E-mail: Fumihiko.Dake@nikon.com

光の回折限界を超えた超解像蛍光顕微鏡はバイオイメージングにおいて不可欠なツールとなっている¹⁻⁴⁾。本稿では、繰り返し誘導遷移(REST, Repetitive stimulated transition)を利用した超解像非線形蛍光顕微鏡を提案する。REST 顕微鏡では、2 色のレーザー光が誘起する励起(誘導吸収)遷移と誘導放出遷移を複数回経て生じた非線形蛍光をロックイン検出することで画像を取得する。

Fig. 1 に線形蛍光と非線形蛍光の概念図を示す。光源として蛍光分子を励起する Pump 光と誘導放出を誘起する Probe 光を用いる。Fig.1(a)は通常の蛍光であり、Pump 光による励起を受けて、蛍光が発生する。Fig.1(b)は Pump-probe fluorescence(PF)⁵⁾であり、Pump 光による励起、Probe 光による誘導放出の結果、2 つの入射光の積に比例する非線形蛍光が発生する。今回提案する REST 過程では、Pump 光による励起、Probe 光による誘導放出を経た蛍光分子の一部は、更に Pump 光により励起されると考える(Fig.1(c))。これを経て発生する非線形蛍光信号は、Pump 光の 2 乗に、Probe 光の 1 乗に比例することが期待される。従って、REST 信号の発生領域が入射光の点像強度分布の多重積で決定されるため、通常の蛍光や PF と比較して、分解能向上が期待される。

光源として、2 色のピコ秒パルスレーザー(Pump: 532 nm, Probe: 640 nm)を用いて原理確認実験を実施した。Pump 光を f_1 で、Probe 光を f_2 で強度変調し、復調周波数をそれぞれ $f_{\text{dem}} = f_1 - f_2$, $2f_1 - f_2$ とすることで蛍光ビーズ(直径 500 nm)の PF 像と REST 像を取得した(Fig.2)。非線形蛍光の検出波長帯域は 593 ± 23 nm である。PF 画像に比べて REST 画像では、シャープなビーズ画像が得られた。この結果は、REST による分解能向上効果を明瞭に示している。

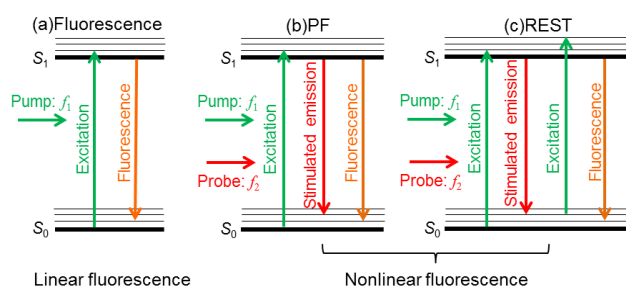


Fig. 1 Phenomenological model.

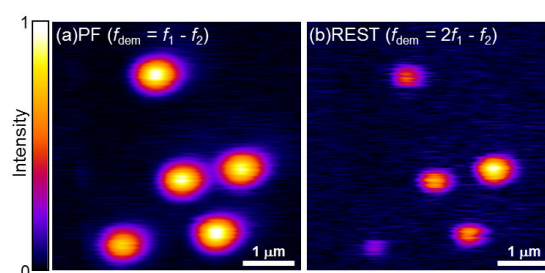


Fig. 2 Imaging results of fluorescent beads.

参考文献

- 1) B. Hein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 14271 (2008).
- 2) E. Betzig, *et al.*, *Science* **313**, 1642 (2006).
- 3) D. Li, *et al.*, *Science* **349**, 944 (2015).
- 4) K. Fujita *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **99**, 228105 (2007).
- 5) C. Y. Dong *et al.*, *Biophys. J.* **69**, 2234 (1995).