

超分解能蛍光顕微鏡で どこまで見えるか

Principles of Super-resolution Microscopy

平岡 泰
Yasushi Hiraoka

大阪大学 大学院 生命機能研究科
Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

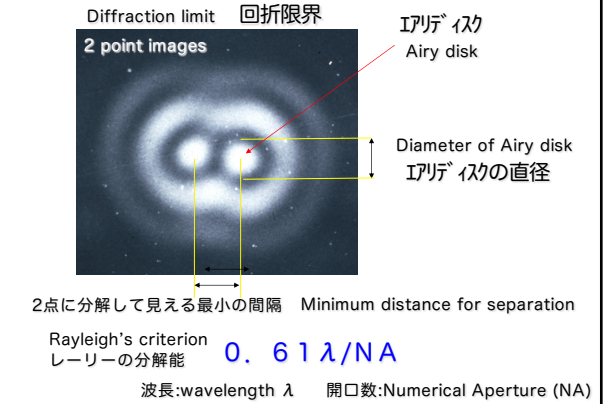
1

超分解能光学顕微鏡 Super-resolution microscope - 分解能の限界を超える Beyond the resolution limit

- そもそも、光学顕微鏡の分解能の限界とは
What the resolution limit is
- 顕微鏡像はどのように作られるか
How an image is generated through a microscope
- どのようにして限界を超えるのか
How we can go beyond the resolution limit
- 越えたら、どこまで見えるのか
What we can see beyond the resolution limit
- 分解能を台無しにする方法
How we can destroy the resolution

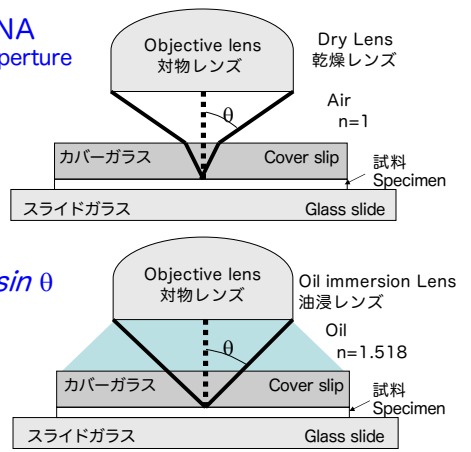
2

Resolution そもそも、光学顕微鏡の分解能の限界とは



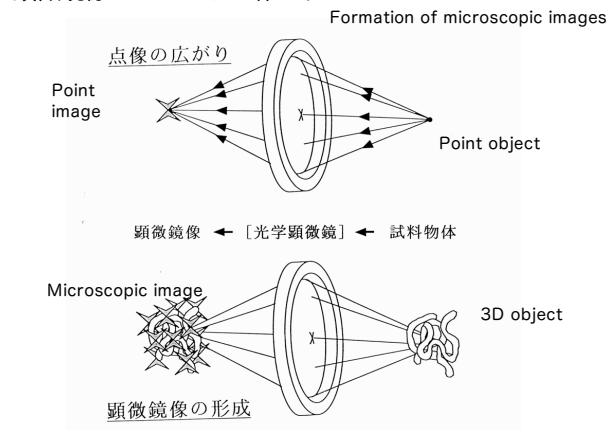
3

開口数 NA Numerical Aperture

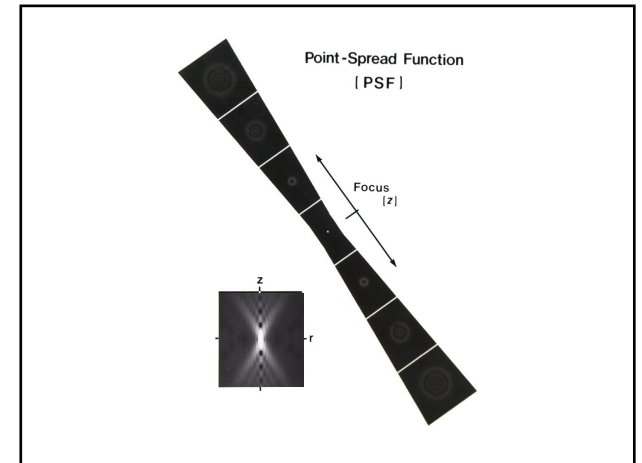


4

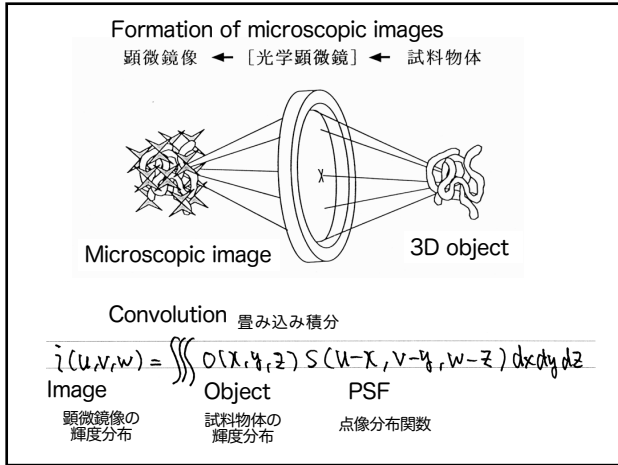
顕微鏡像はどのように作られるか



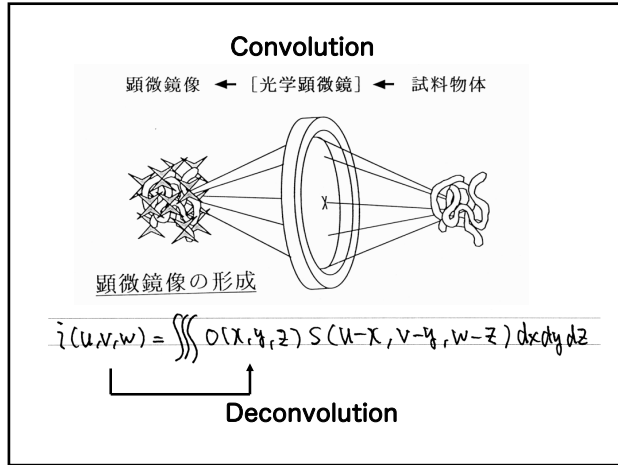
5



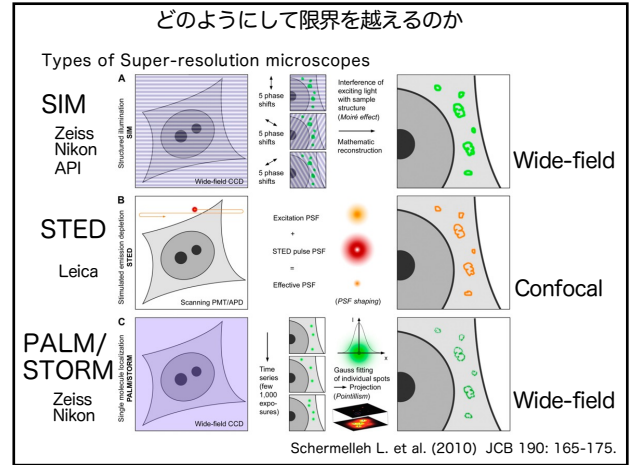
6



7



8



9

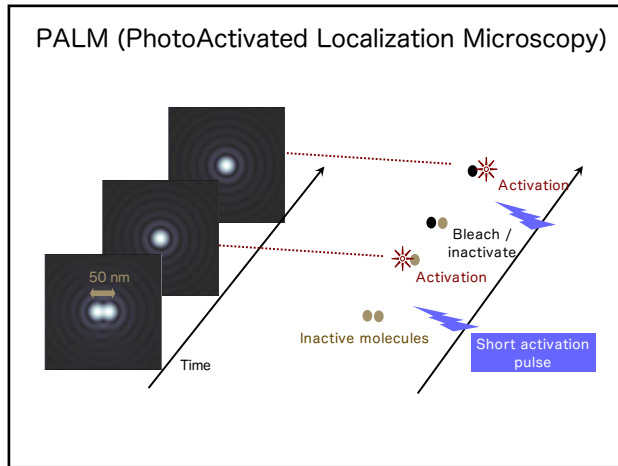
Eric Betzig
The Nobel prize
2014

Wide-field microscope

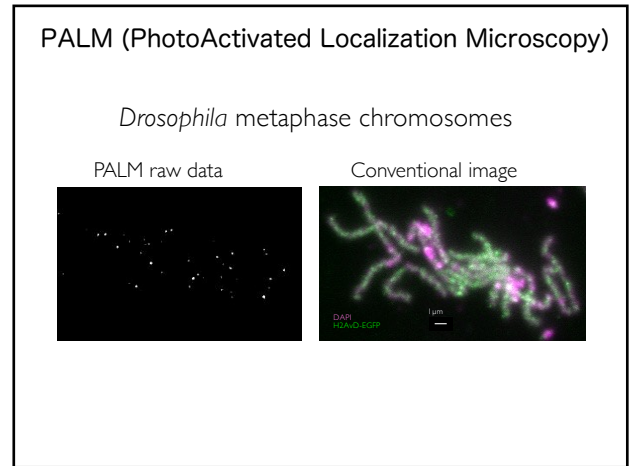
PALM/STORM

Photoactivation Localization Microscopy
Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

10



11




12

Confocal microscope

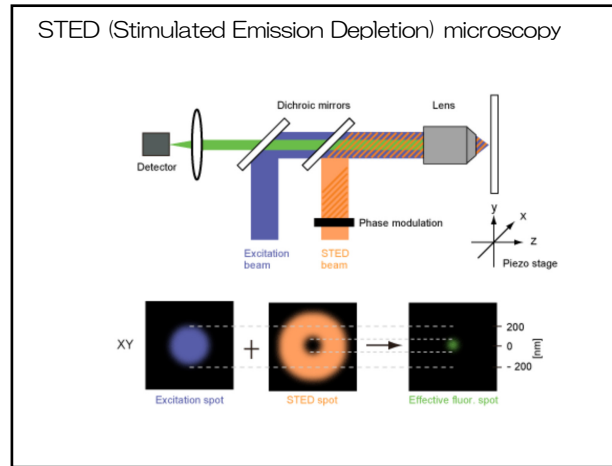
STED

Stimulated Emission Depletion

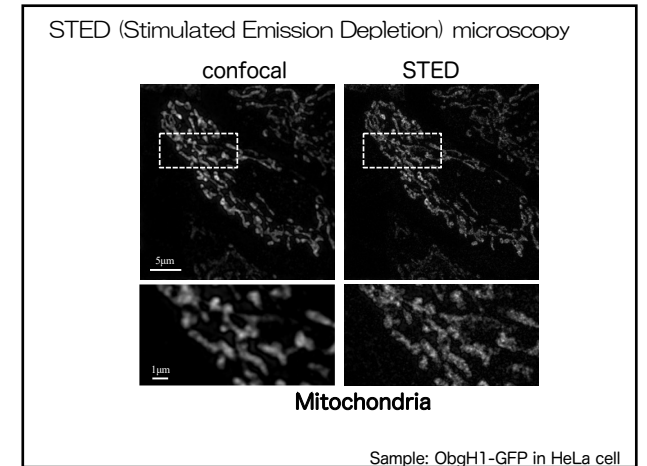


Stephan Hell
The Nobel prize 2014

13



14




15

Wide-field microscope

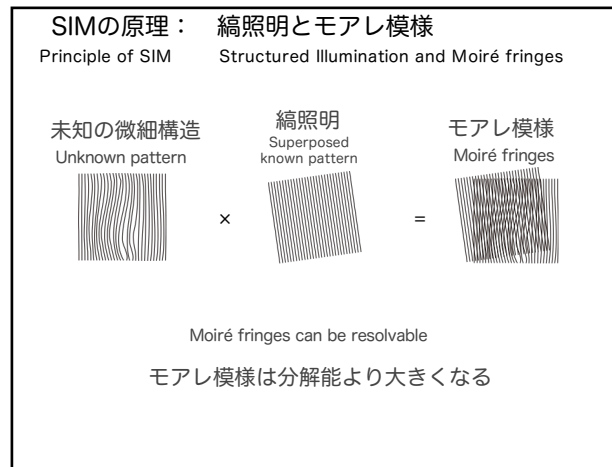
SIM

Structured Illumination Microscopy

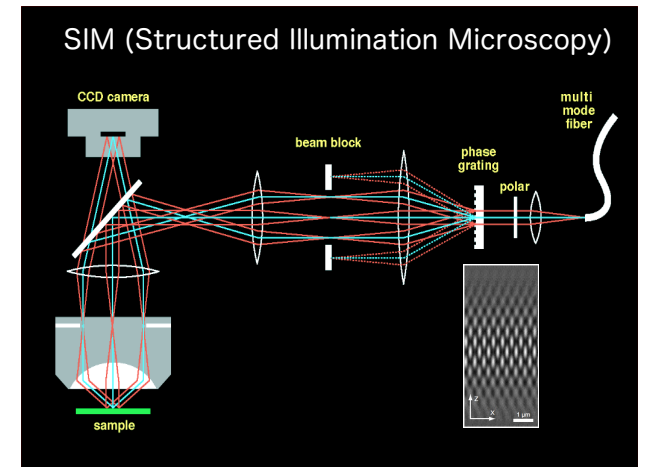


Mats Gustafsson
(1960-2011)

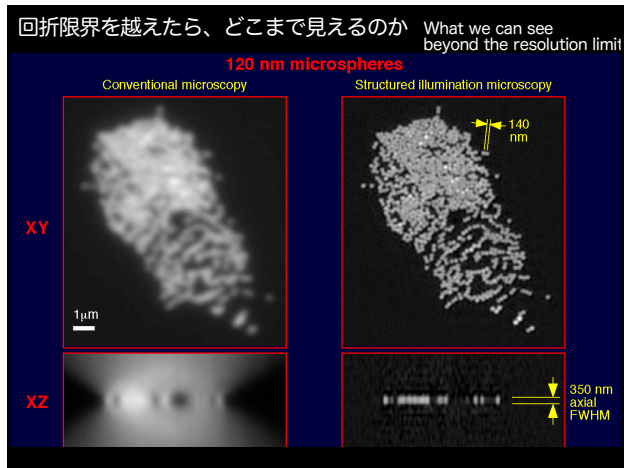
16



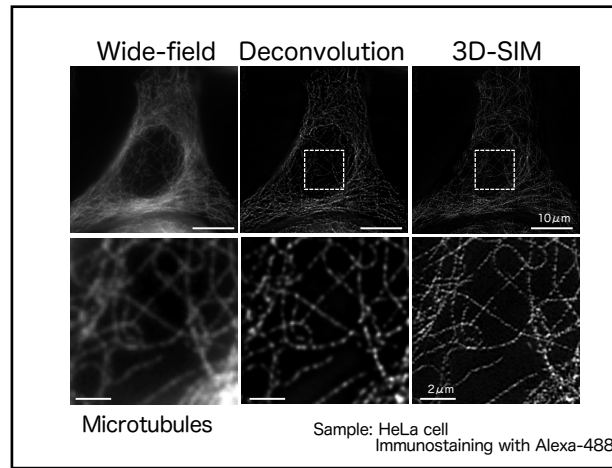
17



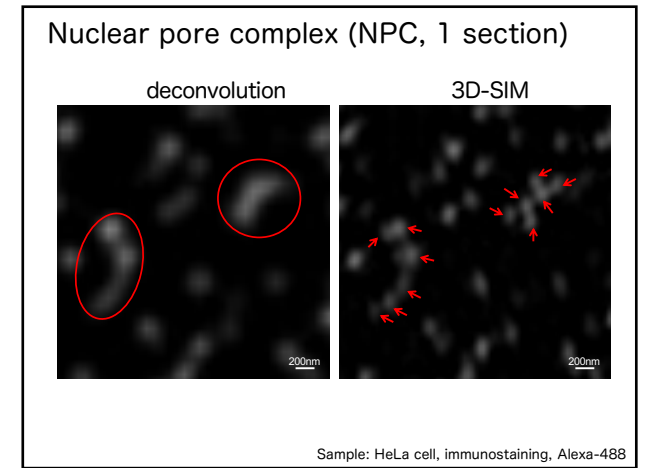
18



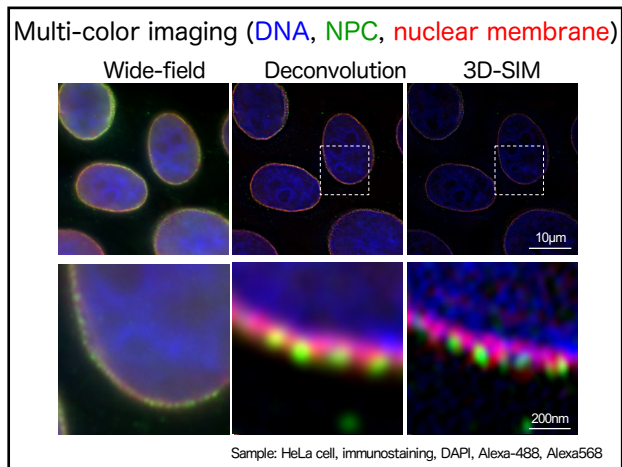
19



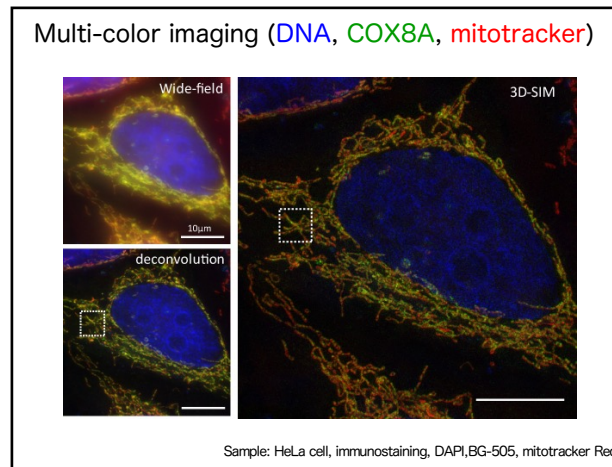
20



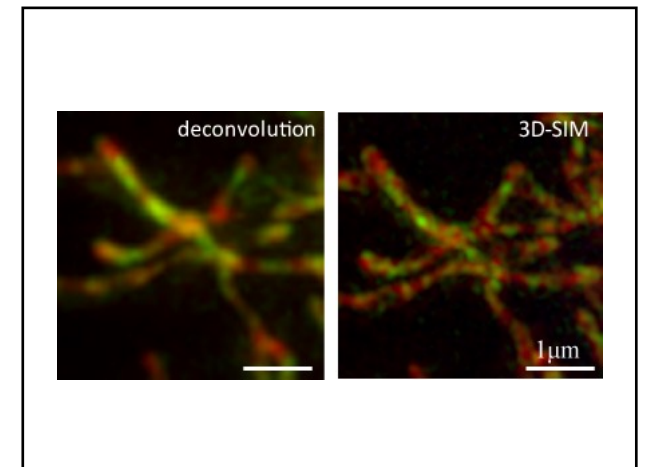
21



22



23



24

分解能を台無しにする方法

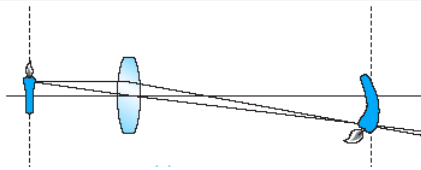
Aberration of the objective lens can easily destroy the resolution
対物レンズの収差が分解能を破壊する

Important to minimize aberrations especially in super-resolution microscopy
収差を低減することは、超解像イメージングでは特に重要

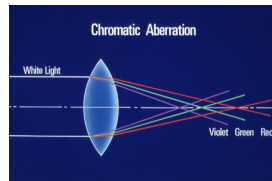
Chromatic Aberration	色収差
Curvature-of-Field Aberration	像面湾曲収差
Spherical Aberration	球面収差

25

像面湾曲収差

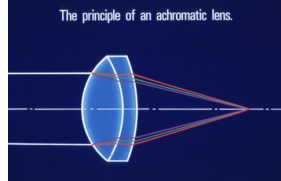


色収差



波長の長短により、集光位置がずれてしまう

色収差の補正

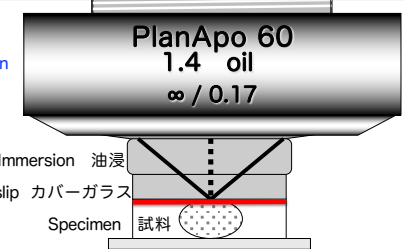


凸レンズと凹レンズの組合わせで打ち消す

26

球面収差

Spherical Aberration



対物レンズは、以下の条件を満たす時に球面収差が無いように補正されている

- (1)正しい厚さのカバースリップを使用し、
- (2)正しい屈折率の液浸（水浸・油浸等）をし、
- (3)試料がカバースリップの直下（直近）にある

Objective lenses are corrected for spherical aberration when: (1) immersion with correct refractive index is used (2) a coverslip with correct thickness is used (3) the specimen is immediately on the coverslip

27

球面収差 Spherical aberration

光路長の過不足（屈折率のミスマッチ）
Mismatch of refractive index

光路長の過不足を生じる要因
Causes of spherical aberration

- ・ カバースリップの厚さ
Mismatch of coverslip thickness
 - ・ 液浸（水浸、グリセロール浸、油浸）の屈折率
Refractive index of immersion
 - ・ 試料溶液の屈折率
Refractive index of sample solution
 - ・ 試料自体の屈折率
Refractive index of specimens
- | | | |
|--------|-----|-------|
| オイル | 屈折率 | 1.518 |
| グリセロール | | 1.47 |
| 水 | | 1.33 |
| 細胞質 | | ~1.4 |

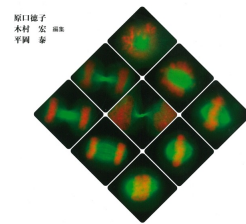
28

Textbook (in Japanese)

2007 初版

2015 新版

講義と実習
生細胞蛍光イメージング
版大・北大 顕微鏡コースブック



共立出版

FLUORESCENCE
IMAGING

新・生細胞
蛍光イメージング

藤口孝子・木村 空・平岡 豊 編

共立出版

29