

超分解能蛍光顕微鏡で どこまで見えるか

Principles of Super-resolution Microscopy

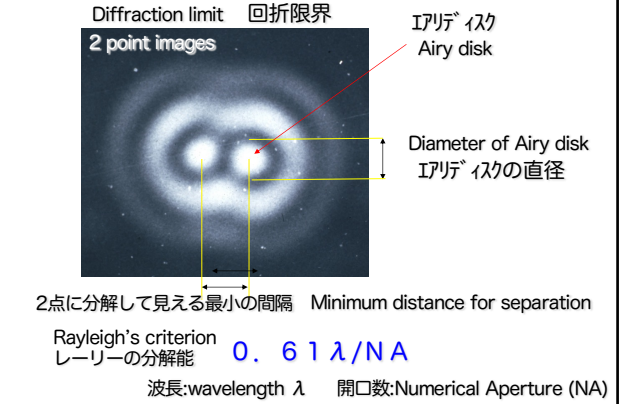
平岡 泰
Yasushi Hiraoka

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

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越えるのか
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

Resolution そもそも、光学顕微鏡の分解能の限界とは

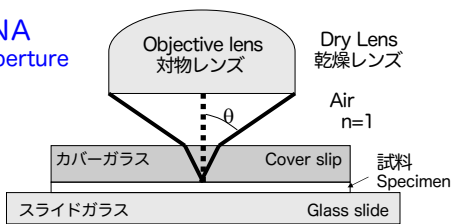


1

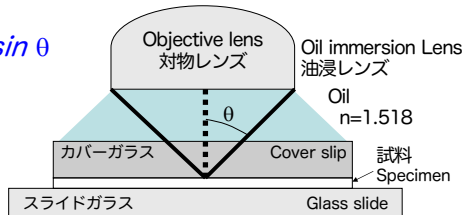
2

3

開口数 NA Numerical Aperture

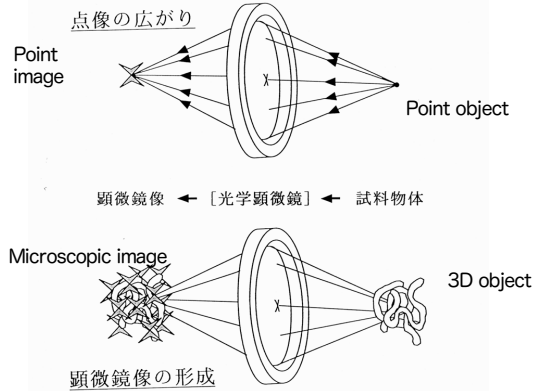


$$NA = n \sin \theta$$



顕微鏡像はどのように作られるか

Formation of microscopic images



4

5

6



Formation of microscopic images
顕微鏡像 ← [光学顕微鏡] ← 試料物体

Microscopic image 3D object

Convolution 畳み込み積分

$$i(u,v,w) = \iiint O(x,y,z) S(u-x, v-y, w-z) dx dy dz$$

Image Object PSF
顕微鏡像の輝度分布 試料物体の輝度分布 点像分布関数

7

Convolution
顕微鏡像 ← [光学顕微鏡] ← 試料物体

顕微鏡像の形成

$$i(u,v,w) = \iiint O(x,y,z) S(u-x, v-y, w-z) dx dy dz$$

Deconvolution

8

どのようにして限界を越えるのか

Types of Super-resolution microscopes

SIM
Zeiss Nikon API
Wide-field

STED
Leica
Confocal

PALM/STORM
Zeiss Nikon
Wide-field

Schermele L. et al. (2010) JCB 190: 165-175.

9

Eric Betzig
The Nobel prize
2014

Wide-field microscope

PALM/STORM

Photoactivation Localization Microscopy
Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

10

PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)

50 nm

Time

Activation

Bleach / inactivate

Activation

Inactive molecules

Short activation pulse

11

PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)

Drosophila metaphase chromosomes

PALM raw data Conventional image


1 μm

12

Confocal microscope

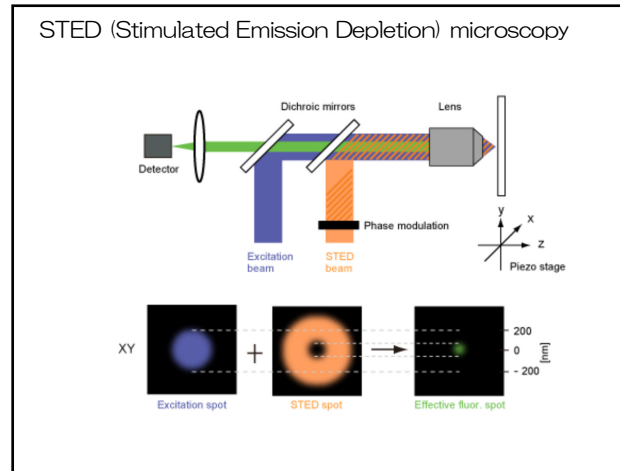
STED

Stimulated Emission Depletion

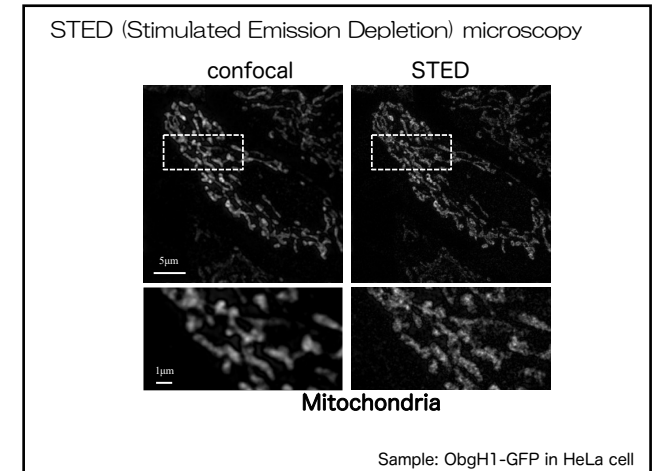


Stephan Hell
The Nobel prize 2014

13



14




15

Wide-field microscope

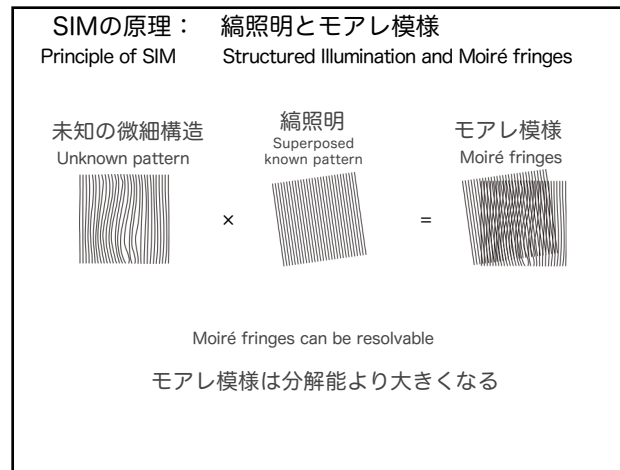
SIM

Structured Illumination Microscopy

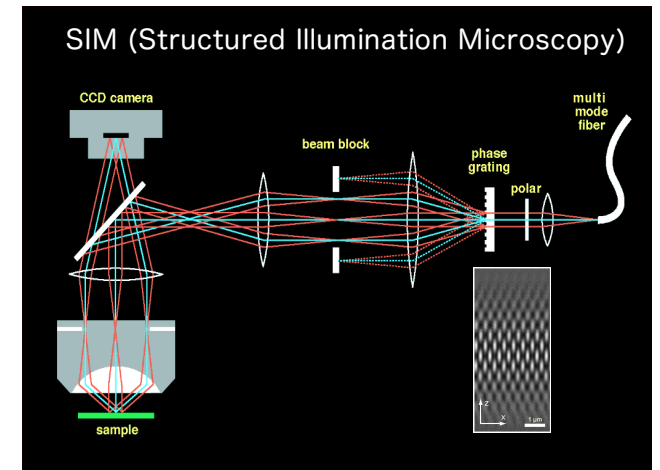


Mats Gustafsson
(1960-2011)

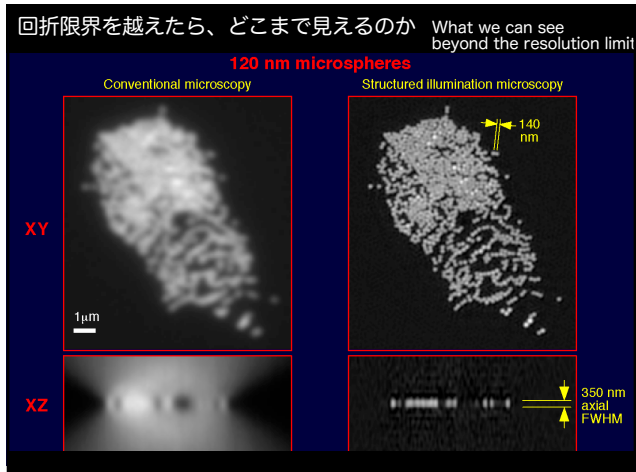
16



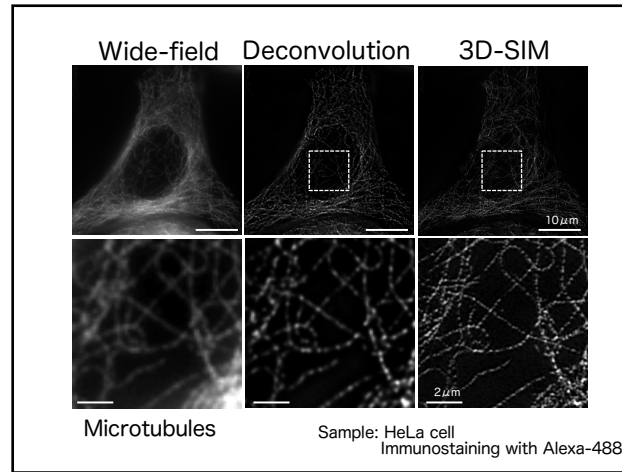
17



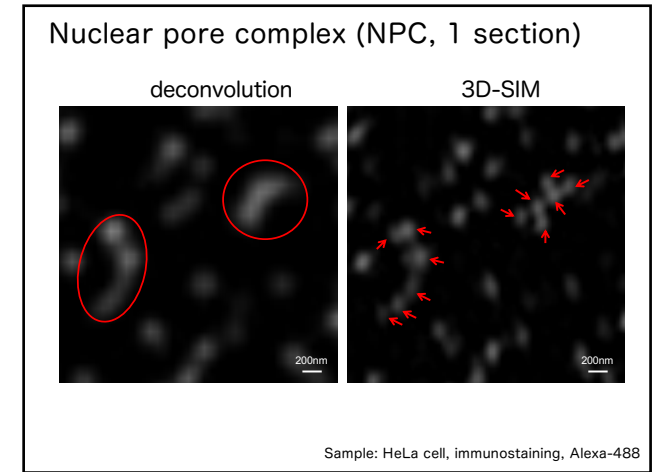
18



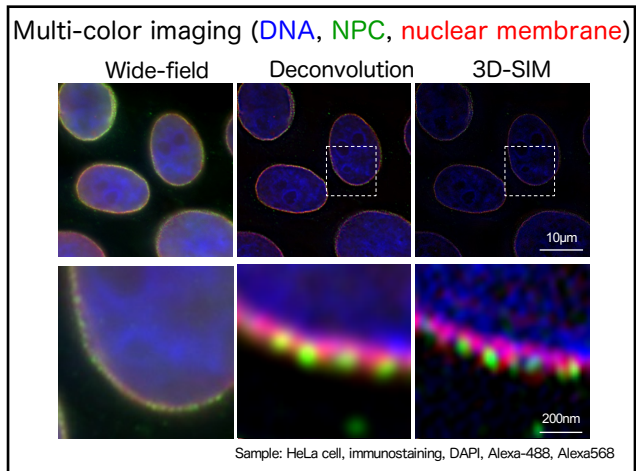
19



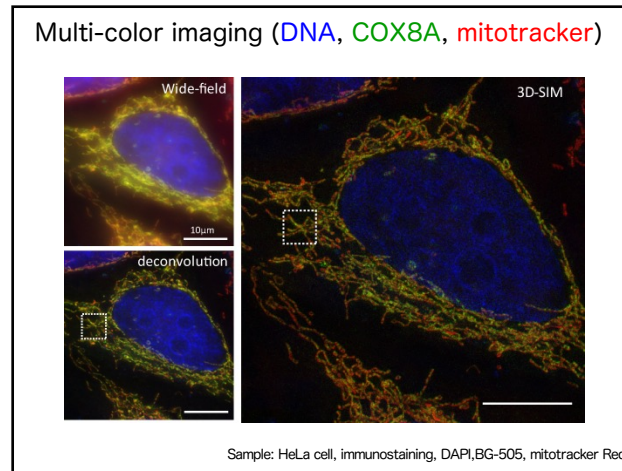
20



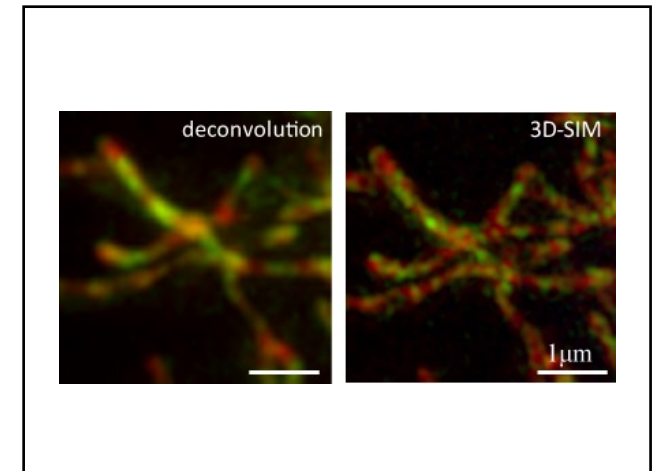
21



22



23



24

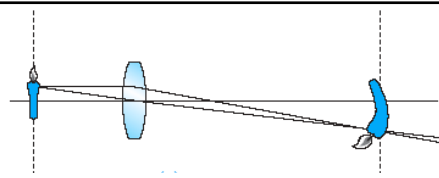
分解能を台無しにする方法

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

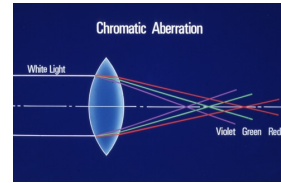
Important to minimize aberrations especially in super-resolution microscopy
収差を低減することは、超解像イメージングでは特に重要

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

像面湾曲収差

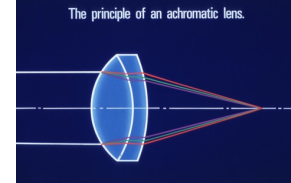


色収差



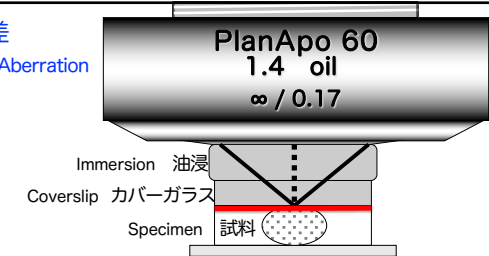
波長の長短により、集光位置がずれてしまう

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

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ガラスを使用し、
- (2)正しい屈折率の液浸（水浸・油浸等）をし、
- (3)試料がカバーガラスの直下（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

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

- ・ カバーガラスの厚さ
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

オイル	屈折率	1.518
グリセロール		1.47
水		1.33
細胞質		~1.4

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
阪大・北大 顕微鏡コースブック

FLUORESCENCE IMAGING

新・生細胞
蛍光イメージング

原口 隆子 著
木村 宏 監修
宇野 泰 監修

共立出版