

## 高開口数かつ広視野のクライオ対物鏡

東工大 物理

○石井 啓暉、虎谷 泰靖、藤原 正規、石田 啓太、藤芳 暁、松下 道雄

## Cryogenic reflecting objective with a high numerical aperture and wide field of view

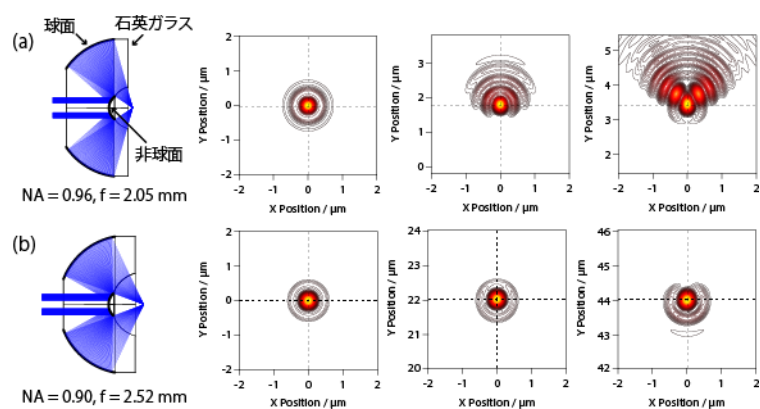
○Takaki Ishii, Yasuharu Toratani, Masanori Fujiwara, Keita Ishida, Satoru Fujiyoshi, Michio Matsushita

*Department of Physics, Tokyo Institute of technology, Japan.*

**【Abstract】** Fluorescence microscopy is capable of imaging noninvasively of biomolecules with a single-molecule sensitivity. However, 3D imaging of individual biomolecule with a molecular resolution is challenging. We have developed fluorescence microscopy of individual molecules under cryogenic conditions. For the observation, we designed a cryogenic reflecting objective with a high numerical aperture and wide field of view. The cryogenic reflecting objective is composed of an aspherical mirror and a spherical mirror. Because two mirrors are constructed on a single-component fused silica lens, the cryogenic reflecting objective works in superfluid helium. By using aspherical mirror, its numerical aperture is 0.90 and its field of view is larger than  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$  by optical simulation. We measured fluorescence imaging of individual Alexa750 molecules for  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$  with the cryogenic reflecting objective. The observed fluorescence spots were nearly diffraction-limited shape.

**【序】** 蛍光顕微鏡は、生体分子を非侵襲かつ1分子の感度でイメージングすることが可能である反面、生体分子の動きによって解像度が約百 nm に制限されている。このため、大きさが数 nm である個々の生体分子同士の相互作用を3次元イメージングすることは難しい。そこで、我々は極低温で生体分子の動きを凍結させて観察する、クライオ蛍光顕微鏡を開発している。ここで重要となるのが、クライオ顕微観察に適した対物レンズ(対物鏡)を開発することである。この対物鏡は顕微鏡の画像ドリフトを抑えるために試料と共に冷却しても使用でき、また、1分子からの微弱な蛍光を効率よく集めるために、対物鏡の開口数 NA を大きくする必要がある。一世代前の対物鏡では高 NA を実現するために視野が狭くなっていた。そこで我々は設計を見直し、高 NA を維持しながら  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$  という広視野の対物鏡を開発したので報告する。

**【設計】** 図 1(a)左は一つ前の世代のクライオ対物鏡である。この対物鏡は図のように球面と非球面を持つ石英レンズを研磨し、その表面にアルミを真空蒸着したものである。2つの鏡が一体成型されているため液

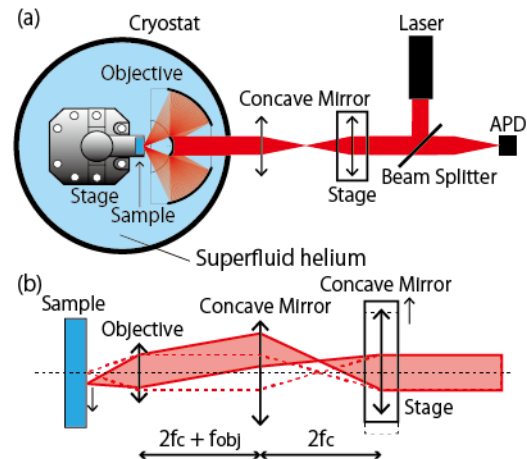


**Figure 1.** Optical simulation for field of view of cryogenic reflecting objectives.

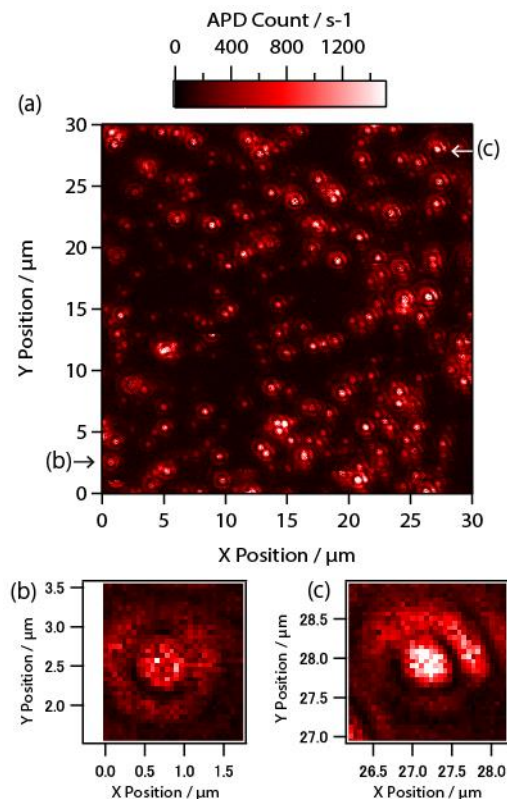
体ヘリウム温度でも使用可能である. 非球面鏡を用いることで、空気中での開口数 NA が 0.96 とほぼ理論限界(1.0)に近い値となっている. また、鏡を用いているため色収差がゼロである. しかし、このクライオ対物鏡は視野が数  $\mu\text{m}^2$  であるという問題があった. 図 1(a)右は対物鏡の視野の光学シミュレーションである. 焦点( $0\mu\text{m}, 0\mu\text{m}$ )に光を集めた時は理想的なスポットとなるのに対して、 $Y=2\mu\text{m}, 3\mu\text{m}$  と離れるとスポットは大きく崩れてしまうことが分かる. つまり、この対物鏡の視野は  $1 \times 1\mu\text{m}^2$  となる. 哺乳類細胞は小さいものでもその大きさが  $10 \times 10\mu\text{m}^2$  なので、観察を行うには視野が足りない. そこで、高開口数を維持しつつ広い視野も確保したクライオ対物鏡を設計した. その結果を図 1(b)で示す. 図 1(b)右は対物鏡の視野の光学シミュレーションで、焦点から  $40\mu\text{m}$  離れた位置でも中心ディスクがほぼ崩れていないことが分かる.

**【実験方法】** クライオ蛍光顕微鏡の概略図を図 2(a)に示す. 図中の矢印は凹面鏡を表す. レーザーからの励起光をビームスプリッターで反射し、レーザースキャン機構を持った凹面鏡(焦点距離  $f_c$ )を経由してクライオスタットに窓から入射する. クライオスタット内のクライオ対物鏡(焦点距離  $f_{obj}$ )で励起光を絞り、焦点位置にある試料に照射する. 試料からの蛍光は励起光の逆経路を通りビームスプリッターを透過して APD で検出する. 顕微鏡内の光学系は色収差を考慮して、全て鏡で統一されている. 対物鏡と試料は 1 つのホルダーに固定された状態でクライオスタット内に配置されているため、試料を広い範囲で観察するためには試料とクライオ対物鏡の焦点の位置関係を変えるために走査が必要である. 励起光を走査するレーザースキャン機構は、図 2(b)で示すように 2 枚の凹面鏡から成り立っている. 1 次元に動作可能なステージを 2 つ用いて凹面鏡を平面内に動かすことで、クライオ対物鏡に入射する平行光の角度を変化させ試料への照射位置を変える. 試料を走査するサンプルスキャンは、試料を載せた 3 軸直動ステージを動かすことで行う.

**【結果】** 新型のクライオ対物鏡を用いて、レーザースキャンで蛍光イメージングを行った結果が図 3 である. 試料は Alexa Fluor 750 である. 図 3(a)は  $30 \times 30\mu\text{m}^2$  の範囲を走査したものである. 図 3(b),(c)は画像の両端のスポットを拡大したものである. ここから、画像の範囲内では 1 分子からの蛍光スポットの形が崩れることなくイメージングできていることが分かった.



**Figure2.** (a) Setup of cryogenic fluorescence microscopy. (b) Optical principle of laser scanning.



**Figure3.** (a) Laser-Scanning Fluorescence imaging of individual Alexa750 molecules. (b) Dye at  $(0.75\mu\text{m}, 2.55\mu\text{m})$ . (c) Dye at  $(27.20\mu\text{m}, 27.95\mu\text{m})$ .