

クライオ 1 分子顕微鏡の機械的安定化

東京工業大学 理学院 物理学系
富永波輝, 松下道雄, ○藤芳 暁

Mechanical stabilization of cryogenic single-molecule microscope

Namiki Tominaga, Michio Matsushita, ○Satoru Fujiyoshi
Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, Japan d

【Abstract】 We show mechanical stabilization of a reflecting microscope of an individual molecule at a temperature of 1.8 K. For a passive stabilization of the microscope, we improved the stiffness of the whole setup and dissolved mismatch of the thermal expansion coefficients of the optical holders. As a result, a short time stability of the microscope has reached sub-angstrom level. However, the long-time drift of a fluorescence image had been often deteriorating the resolution of the localization microscopy. We found that the long-time drift was due to thermal drift of the microscope. We have minimized this drift by using a water circulating system with a temperature stability of approximately ± 10 mK.

【序】 我々は細胞内部を分子レベルで可視化するために、クライオ 1 分子顕微鏡を開発している。目標とする高精度な画像化に大切なのが機械的安定性である。そこで、我々は剛性の高い顕微光学系を自作し、用いた材料の熱膨張係数を合わせることで、短い時間（約十分）ではサブオングストロームの安定性を実現した[1]。しかし、長時間（数時間から 1 日）では、ナノメートルを超えるドリフトが残っていた。我々はこのドリフトの原因が、実験室内の温度変化であることが分かった。この長時間のドリフトを小さくするために、恒温水循環装置（温度安定性 ± 10 mK）を用いた方法を提案する。

【結果】 図 1 は、我々が開発しているクライオ反射顕微鏡の光学配置である。一般に、顕微鏡の安定性に最も大切なのは試料と対物鏡との相対位置の固定である。そこで、冷媒である液体ヘリウムの温度 T_{IN_cryo} に対する画像ドリフトを測定すると、130 nm/K であった。幸いなことに、液体ヘリウムの温度は、簡単な制御で ± 0.1 mK に安定化できるので、このドリフトは無視できる[2]。一方、クライオスタットの外壁の温度

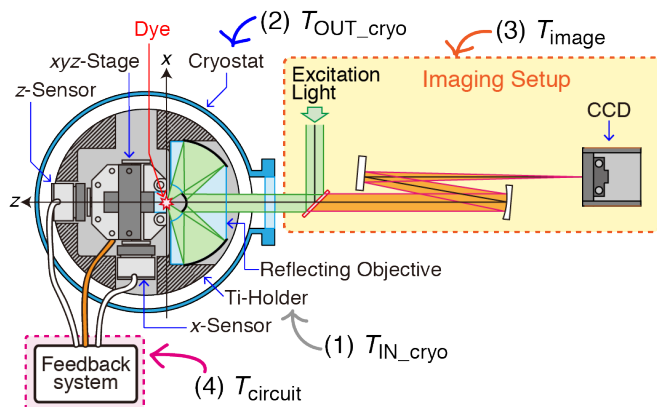


FIG. 1 | Optical arrangement of cryogenic reflecting microscope.

Table 1 | Thermal drift of the cryogenic reflecting microscope.

Position	Image drift
(1) Inside of cryostat	130 nm / K
(2) Outside wall of cryostat	} 10 nm / K
(3) Optics of Imaging Setup	
(4) Electrical circuits of position sensors	

($T_{\text{out cryo}}$)、結像光学系内の温度(T_{image})、位置センサーの電子回路の表面温度(T_{circuit})も 10 nm/K という無視できない温度係数を持つことが分かった。表 1 に結果をまとめる。

1 日の単位で部屋の温度を見た場合、 $\pm 1 \text{ K/day}$ 変化しており、蛍光イメージが $\pm 10 \text{ nm/day}$ 変化する。そこで、我々は、顕微鏡や回路が入った箱の表面にチューブや水冷ヒートシンクを配置し、その中に温度安定化した水を流すことで温度変化を抑え込んだ。図 2 はその作業の写真である。図 2A は、クライオスタット表面にシリコンチューブを巻いている時の写真である (図 2A 左側)。このシリコンチューブ内に恒温水を循環させている。さらに、室温の変化を受けにくいように、シリコンチューブの外側には断熱材を多重に巻いている (図 2A 右側)。図 3B はクライオスタット外部にある位置センサーの回路の温度安定化である。回路は xyz 軸の位置を別々に測定するために三つある。この回路の入った 3 つの箱を四枚の銅製のヒートシンクで挟んでいる。恒温水の温度安定性は $\pm 10 \text{ mK}$ なので、表 1 にある (2) ~ (4) の温度変化によるイメージドリフトは $\pm 1 \text{ \AA}$ となった。これは十分な安定性である。

循環水システムは温度安定化させるのと同時に、温度係数を定量するのにも役立った。ちなみに、表 1 の (2) ~ (4) の値はどうような測定から定量した。図 3 は位置センサーの回路の温度係数の実験結果である。図 3A は CCD で測定した Alexa Fluor 750 の 1 分子の蛍光イメージである (測定温度 1.8 K)。中心にあるディスクの重心から、色素の xy 位置を正確に知ることができる。図 3B は、センサー表面の温度と CCD で観測される重心位置である。温度の上昇と共に、位置が 50 nm 程度ドリフトしているのが分かる。これは、回路の温度が上がることで、位置センサーが位置を誤認し、誤認した位置にアクティブに制御された結果、CCD 上のスポットの位置がドリフトしている。

【参考文献】

- [1] T. Furubayashi *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 8990 (2017).
 [2] 資延啓ら 第 11 回 分子科学討論会 仙台, 1D12, (2017)

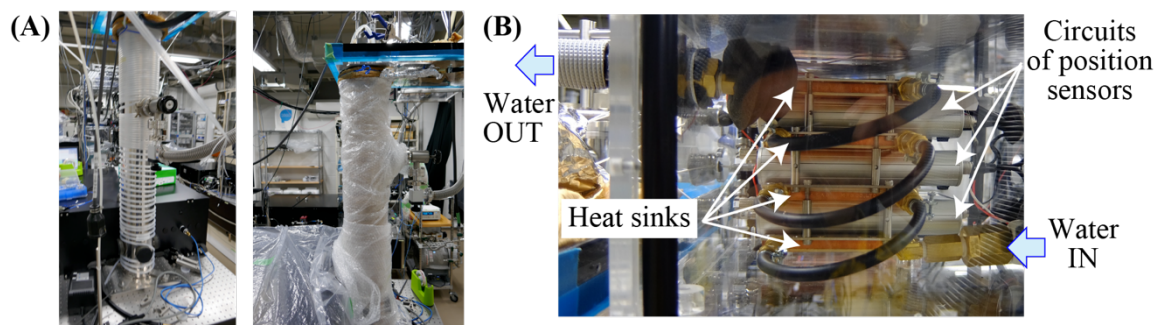


FIG. 2 | Photographs of water circulating system of (A) an outside wall of cryostat and (B) an electrical circuit of position sensors.

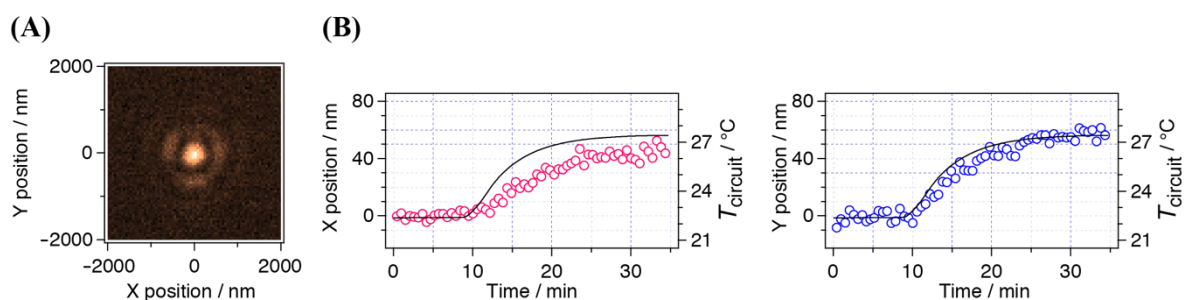


FIG. 3 | Image drift due to a temperature change of an electrical circuit of feedback system. (A) CCD Fluorescence image of an individual Alexa Fluor 750 molecule at 1.8 K. (B) Image drift by the temperature increase of circulating water at an electrical circuit of position sensors.