

蛍光ビーズを用いた点分布関数の測定法

(2008年6月12日 稲田のりこ)

用意するもの: 四色蛍光ビーズ TetraSpeck 0.1 μm (Invitrogen, T7279)
褪色防止剤(非蛍光グリセロール、Invitrogen Slow Fade など)
松波 No.1S カバーガラス

< 試料の調整 >

1. 蛍光ビーズを蒸留水で 1/1000、1/10000 に希釈
2. 20 μL の希釈蛍光ビーズをカバーガラス上に垂らす
3. 65 度に 1, 2 時間置き、液体を完全に乾燥させる
4. 褪色防止剤をスライドガラス上にマウント

< 観察 >

顕微鏡の画像取得条件は、顕微鏡の種類、使用可能な励起光、フィルターセット、検出器の数によって異なる。ここでは Zeiss LSM510 と Leica TCS-SP5 で画像取得したときの二つの例を示す。

1. Zeiss LSM510META での観察条件

- (ア) ダイクロイックミラー: HFT UV/488/543/633
- (イ) 対物レンズ: PlanApochromat x63/1.4 Oil DIC
- (ウ) 4 倍ズーム、0.1 μm ステップ X35、Average 4 回

	緑	オレンジ	赤
励起レーザー (nm)	Ar (488)	HeNe (543)	HeNe (633)
蛍光フィルター	LP505	BP560-615	BP636-722
ピンホールサイズ	106 μm (1 A.U.)	96 μm	94 μm

2. Leica TCS-SP5 での観察条件

(ア) 対物レンズ: x63/ 1.4 Oil

(イ) 5 倍ズーム、1024x1024 pixel、スキャンスピード 400 Hz、Line Average 4

	緑	オレンジ	赤
励起レーザー (nm)	Ar (488)	DPSS (561)	HeNe (633)
蛍光取得波長幅	492-550	570-625	640-722
ピンホールサイズ	1 A.U.	1 A.U.	1 A.U.

得られた蛍光像について、それぞれのビーズの蛍光強度の変化をZ軸に沿って定量化することにより、焦点面からの蛍光の広がりを現す関数(点分布関数)を求めることが出来る。下に、Leica TCS-SP5 の水浸レンズ(x63/1.2)と油浸レンズ(x63/1.4)それぞれの点分布関数を示す。

Comparison of PSF between Oil and Water Lenses

