Laser Technology Laboratory (RIKEN Advanced Science Institute)　　理研基幹研究所・緑川レーザー物理工学研究室

超広帯域光パルスの位相変調を用いた 2 光子蛍光顕微鏡

Two-photon fluorescence microscopy employing phase modulation of ultra-broadband pulses

Objectives

2 光子蛍光顕微鏡は 1 光子蛍光顕微鏡を超える様々な利点を有する。その中でも、複数種類の蛍光分子を同時に観察するマルチカラーイメージングや分子間相互作用を可視化する蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）イメージングは生命現象の解明には欠かせない技術である。我々は超広帯域光パルスのスペクトル位相を変調するだけで、これらのイメージング技術を瞬時に切り替えることが可能であることを実証する。

Two-photon fluorescence (TPF) microscopy has become a powerful tool for investigating biological phenomena due to its inherent advantages. In particular, multicolor microscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy are key techniques for visualizing the movement of biomolecules and their interactions with components in living cells. We demonstrate that the spectral phase modulation of ultra-broadband pulses provides rapid and easy switching for multi-color imaging and FRET imaging.

Achievements

- 複数種類の蛍光分子の中から特定種類の蛍光分子のみを選択的に励起するスペクトル位相変調法や、各種類の蛍光分子から発生する蛍光強度を独立に制御した同時励起を可能とするスペクトル位相変調法を確立した。
- HeLa 細胞の核と細胞質をそれぞれ BFP、GFP で標識した後、選択的励起と同時励起によるマルチカラーイメージングを実証した。
- カルシウムイオン指示タンパク質 Cameleon を細胞質に標識した HeLa 細胞を試料として、選択的励起による FRET イメージングに成功した。

- We developed a spectral modulation technique capable of selectively exciting particular fluorescent proteins among various different fluorescent proteins, and which is capable of simultaneous excitation through arbitrary intensity control.
- Selective excitation and simultaneous excitation were applied to multicolor imaging of a HeLa cell multi-labelled with BFP and GFP.
- We also demonstrated selective excitation using FRET imaging of a HeLa cell labelled with a calcium sensor Cameleon.

Fig. 1

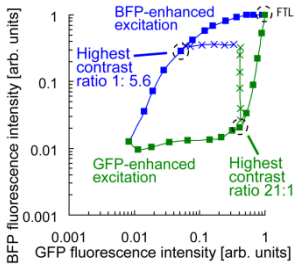

Fig. 2

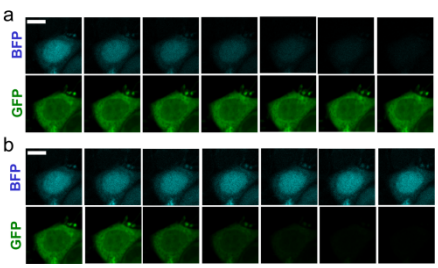

Fig. 3

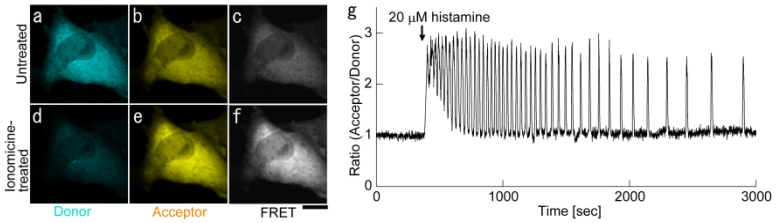

Fig. 1: Simultaneous control of TPF intensities from two fluorescent proteins by spectral phase modulation.
Fig. 2: Multicolor imaging with simultaneous excitation with arbitrary intensity control.
Fig. 3: FRET imaging with selective excitation.

References

1) K. Isobe, A. Suda, M. Tanaka, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, “Multifarious control of two-photon excitation of multiple fluorophores achieved by phase modulation of ultra-broadband laser pulses,” Opt. Express **17**, 13737 (2009).