



一沙一世界： 顯微鏡下的景色

文／林宮玄、吳紫綾

17 世紀光學顯微鏡的發明，讓我們的眼界進入比一粒沙還小的世界。近十幾年來，光學顯微鏡技術有重大的突破，使我們能看到更小的奈米世界。「超解析螢光顯微鏡」獲得 2014 年諾貝爾化學獎肯定，是幫助科學家了解生命與疾病的重要工具。

一沙一世界

「一沙一世界，一花一天堂，無限掌中置，剎那成永恆。」這是徐志摩翻譯 18 世紀英國詩人布萊克（William Blake）的名句，寓意是人們若用心觀察身邊細微的事物，即使是一顆微小的沙粒，也能發現許多樂趣。眼睛是人類觀察世界最原始的方式，在光線照映下所呈現的周遭是我們所熟悉的事物。然而，人類能看到的宇宙萬物其實很有限，太遠或太小的東西都無法看見。兩千年前，少部分哲學家已經在思

考物體是否由原子組成，並了解看不到不代表不存在；也知道使用放大鏡將物體的影像放大，但放大的效果有限。直到 17 世紀光學顯微鏡發明後，才發現原來肉眼看不到的微生物世界有多麼精彩！20 世紀初電子顯微鏡發明後，人類所能看到的世界又是另一番的景象，甚至可以看到組成物體的一顆顆原子。自古以來「眼見為憑」一直是很有說服力的方式，而顯微鏡讓我們的眼界進入了比一粒沙還小的世界，把微小物體放大進而呈現到我們的視野裡。

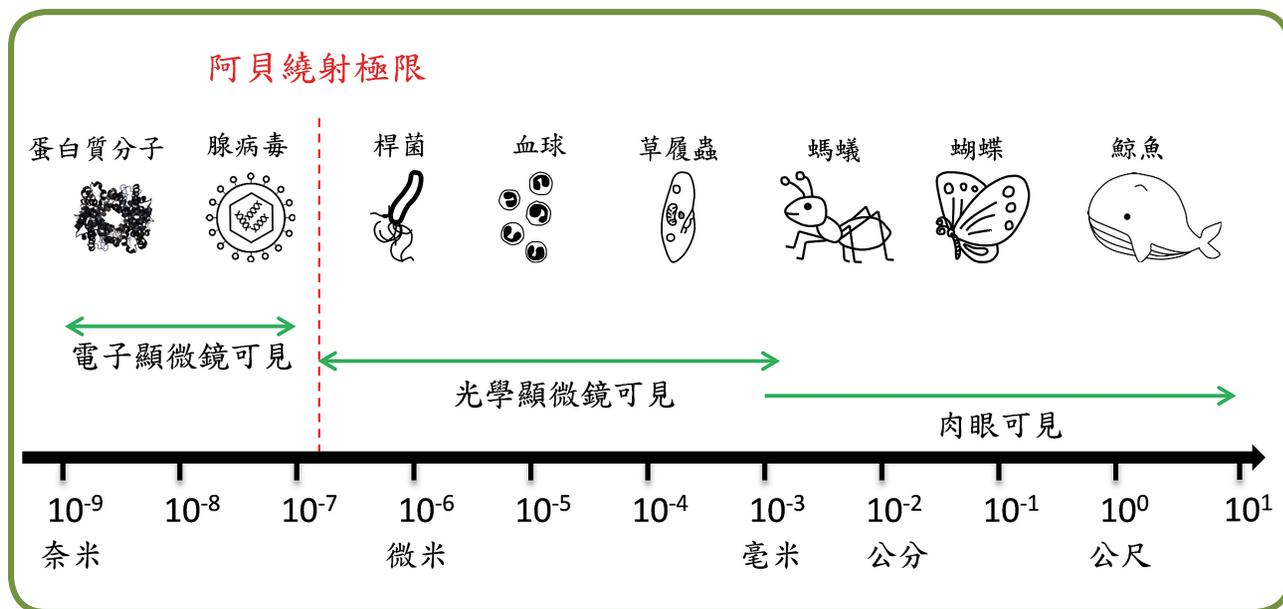


圖 1 生物體的大小尺度。

物體的大小

既然顯微鏡的功用是把物體放大到人眼看得到的程度，自然就會問需要放到多大（或放大率），才能讓物體呈現在我們眼前，這就牽涉到我們想要看到多小的物體。圖 1 是生物體的一個尺度表，人類的眼睛可以輕易看到公釐等級以上的生物體，公釐等級以下的物體則須借助儀器辨識。通常小於 100 微米（0.1 公釐或毫米）的生物我們稱為微生物，這些微生物就必須依賴顯微鏡來觀察。

一般的光學顯微鏡如圖 2 所示，當生物體被光照射後，從物體來的光分別會經過物鏡及目鏡，最後成像在我們的眼睛。首先物鏡產生一個被放大實像，人眼再經過目鏡觀察這

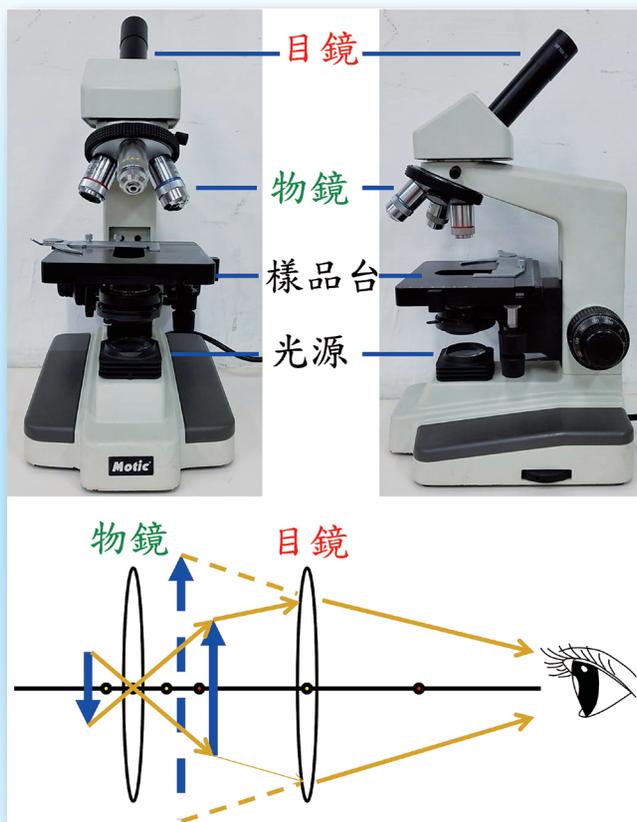


圖 2 一般顯微鏡及影像放大示意圖。（圖片來源：新北市新莊高中楊俊浩老師）



個已經被放大的實像，所以放大倍率是由物鏡跟目鏡共同決定的。18 世紀光學顯微鏡的放大倍率已經可到 1,000 倍，也就是微米等級的物體可以放大到公釐等級的影像讓人眼觀察到。當時的人們已經能用眼睛看到微生物的形狀及大部分生物的內部結構，譬如塵蟎、細菌、血液中的紅血球等。然而，直到 20 世紀初電子顯微鏡問世，人類才開始看到如病毒等奈米大小的物體。主要的原因在於恩斯特·阿貝 (Ernst Abbe) 在 19 世紀時，證明了光學顯微鏡的解析度只能達到光波長的 1/2 左右，稱為阿貝繞射極限 (Abbe diffraction limit)。由於人類所能看到的光波長在 400 ~ 700 奈米之間，因此 200 奈米一直是一般光學顯微鏡解析度所無法突破的瓶頸。

光學顯微鏡為什麼還是很普遍？

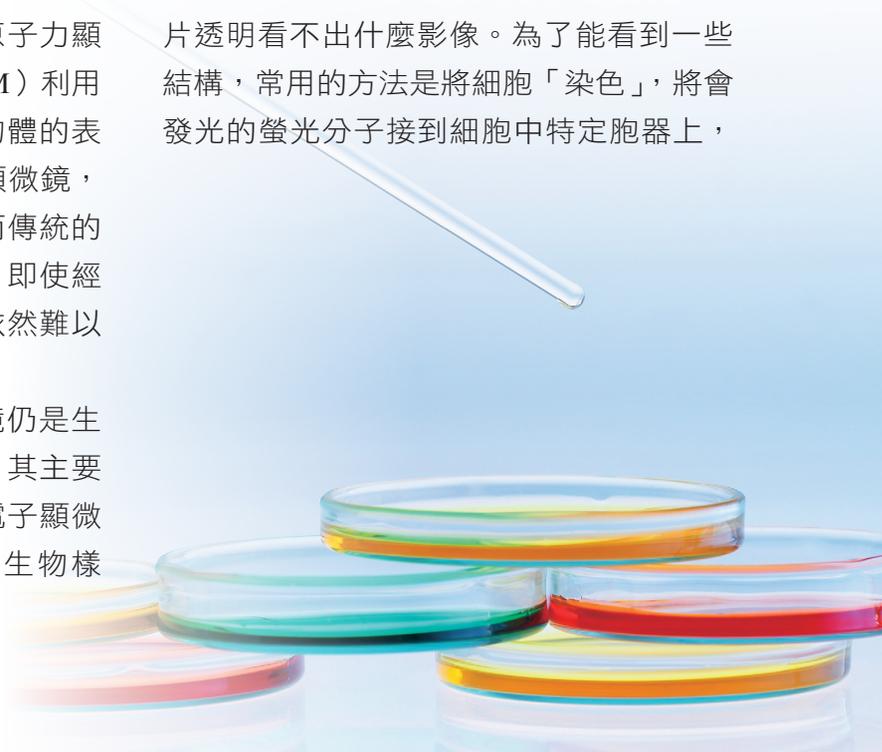
科技發展至今已經有許多儀器都可以達到奈米等級的解析度，看到比 1 奈米還小的原子。譬如電子顯微鏡不利用光，而是將電子射到物體並取得影像。原子力顯微鏡 (atomic force microscope, AFM) 利用一根細達奈米等級的探針，掃描物體的表面取得影像。這些非光學方法的顯微鏡，放大率可以輕易達到幾十萬倍，而傳統的光學顯微鏡受限於阿貝繞射極限，即使經過兩、三百年來的發展，放大率依然難以突破兩千倍。

既然如此，為什麼光學顯微鏡仍是生命科學領域中重要的研究工具呢？其主要原因在於樣品所呈現的真實性，電子顯微鏡只能觀察經過冷凍切片處理的生物樣

品；原子力顯微鏡雖然可以觀測活細胞卻也只能觀察到細胞表面的形貌，無法看到細胞內部的構造。因此即使光學顯微鏡的解析度遠不如電子顯微鏡與原子力顯微鏡，但可觀察活細胞內部構造隨時間的變化，這優勢使得光學顯微鏡至今仍是研究生命科學很重要的工具之一。

超解析螢光顯微鏡

近十幾年來，光學顯微鏡有重大的突破，2014 年諾貝爾化學獎表彰了超解析螢光顯微鏡 (super-resolution fluorescence microscope) 的發明。在這裡所謂「超解析」的意思是突破阿貝繞射極限，讓影像解析度進入幾十奈米，或是讓放大率增加到上萬倍，使科學家可以觀察活細胞內奈米物體的變化，這是電子顯微鏡與原子力顯微做不到的。要了解超解析螢光顯微鏡，首先我們要先知道什麼是「螢光」及「解析度」。大部分的小生物體如細胞或細菌等，若直接用光學顯微鏡觀察，常會一片透明看不出什麼影像。為了能看到一些結構，常用的方法是將細胞「染色」，將會發光的螢光分子接到細胞中特定胞器上，



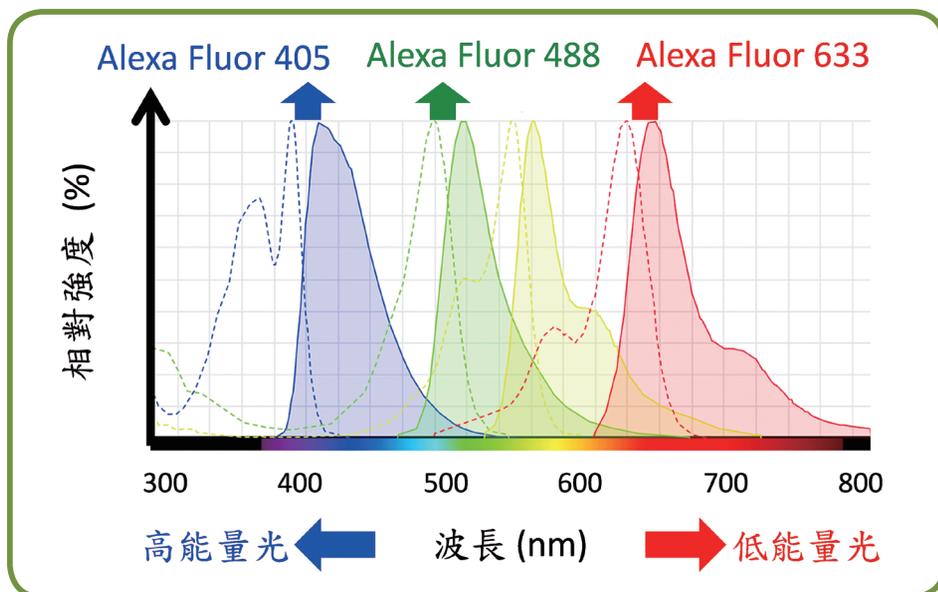


圖 3 以會發藍光、綠光、紅光的 Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 633 的螢光分子為例子。虛線表示激發光的波長範圍，實線表示放光的波長範圍。（圖片來源：Life Technologies 網站）

我們就能藉由光看到它的結構。圖 3 顯示了一般常用的螢光分子及他們對應到的激發波長及螢光波長。螢光分子要發光，必需利用「高能量」的光激發，而螢光分子會發出「低能量」的光。所謂高能量的光指的是波長較短的光，低能量的光是波長較長的光。以 Alexa Fluor 405 這個螢光分子為例，可利用波長 300 ~ 400 奈米的紫外光雷射激發這個螢光分子，而放出波長 400 ~ 460 奈米的藍色螢光。

超解析螢光顯微鏡的解析度概念可以透過圖 4(a) 的示意圖來了解。螢光分子其實非常小，通常只有幾個奈米大。如果只有一個螢光分子發光，經過物鏡及目鏡光學成像後，我們的眼睛還是能看到這個光點，但是光點看起來會比原先的大小來的大。所

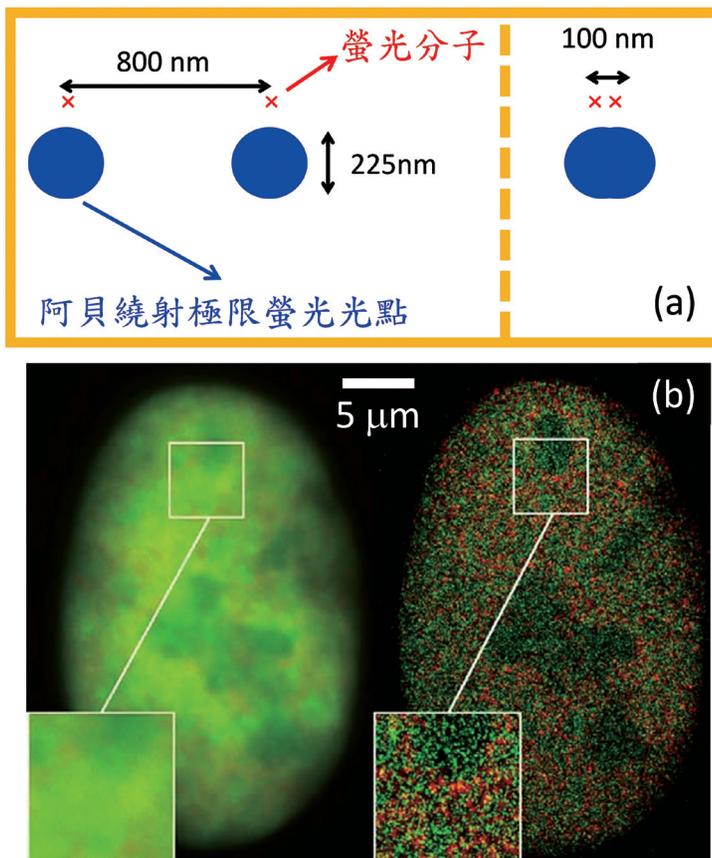


圖 4 (a) 阿貝繞射極限的成像光點示意圖；(b) 一般光學顯微鏡與超解析顯微鏡取到的影像圖比較。（b 圖片來源：Wikipedia: Super-resolution Microscopy）

謂阿貝繞射極限就是在描述這個奈米光點經過光學成像以後，即使再聚焦，最小也只能到光波長的一半而已，譬如 450 奈米的藍光光點，最後成像時最小只能小到 225 奈米。現在重點來了，雖然我們可以看到奈米大小的螢光分子所發的光，但這並不代表解析度可以到達奈米等級。如圖 4(a) 所示，如果當兩個奈米大小的螢光分子開始相互靠近時，我們看到的影像會開始慢慢變化，當兩個光點的距離越來越近時，兩個成像後的大光點會漸漸重疊進而糊成一團形成一大光點，因此無法分出是幾個螢光分子所發出來的光了！因此解析度的定義是當兩個螢光分子距離多近時，還能解析出是兩個分子的距離。

超解析螢光顯微鏡技術可突破傳統光學解析度 200 奈米的阿貝繞射極限，分辨出兩個距離幾十奈米的螢光分子。圖 4(b) 比較了一般螢光顯微鏡及超解析螢光顯微鏡所得到骨癌細胞核的影像，綠光跟紅光分別來自綠螢光及紅螢光蛋白質分子。由

圖中可以看出一般的螢光顯微鏡解析度差，所有的光點都重疊而糊成一團難以辨識，相較之下超解析螢光顯微鏡解析螢光分子的能力是不是高上許很多呢？

2014 諾貝爾化學獎所表彰的技術，主要分成兩類。第一類是讓螢光分子在不同的時間點發光。圖 4(a) 中，當只有一顆螢光分子的時候，雖然光學成像後的光點變大了，我們還是可以利用電腦運算定位出中點的位置達到奈米精確度。圖 5 的示意圖中，我們故意用不同顏色來區分不同時間點發光的螢光分子。如果全部螢光分子一起發光，光點成像後就會互相重疊糊成一團。但是讓不同群組的螢光分子發光時，每個群組中光點成像後不會互相重疊，因此可以把每個螢光分子的中心點位置定位出來。所以我們可以讓距離很近的螢光分子在不同時間發光並擷取影像，把每張影像中螢光分子的光點定位重組後，就能獲得一張超解析螢光影像。

另一類是讓激發光點中心外圍部分的

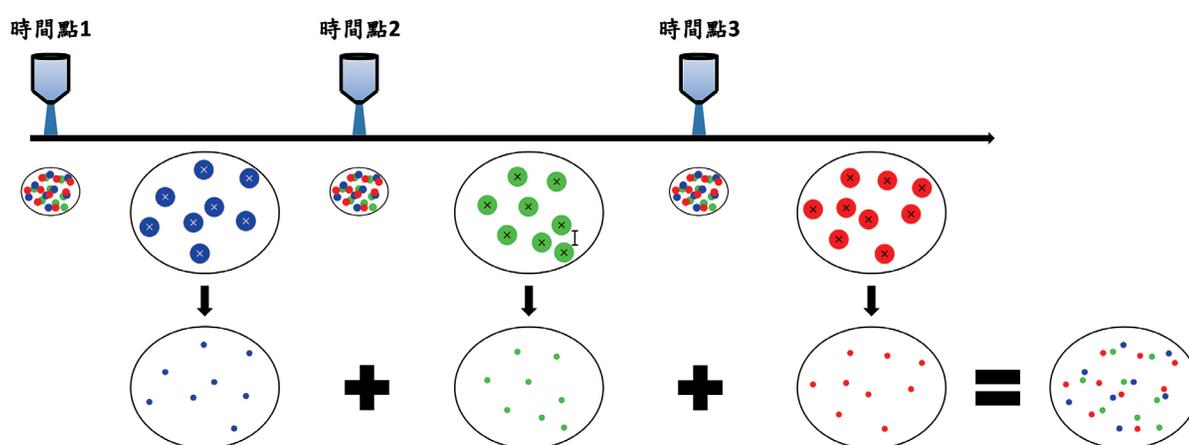


圖 5 控制螢光分子在不同時間發光的超解析顯微鏡示意圖，顏色只是用來區分不同時間點所發出的螢光。

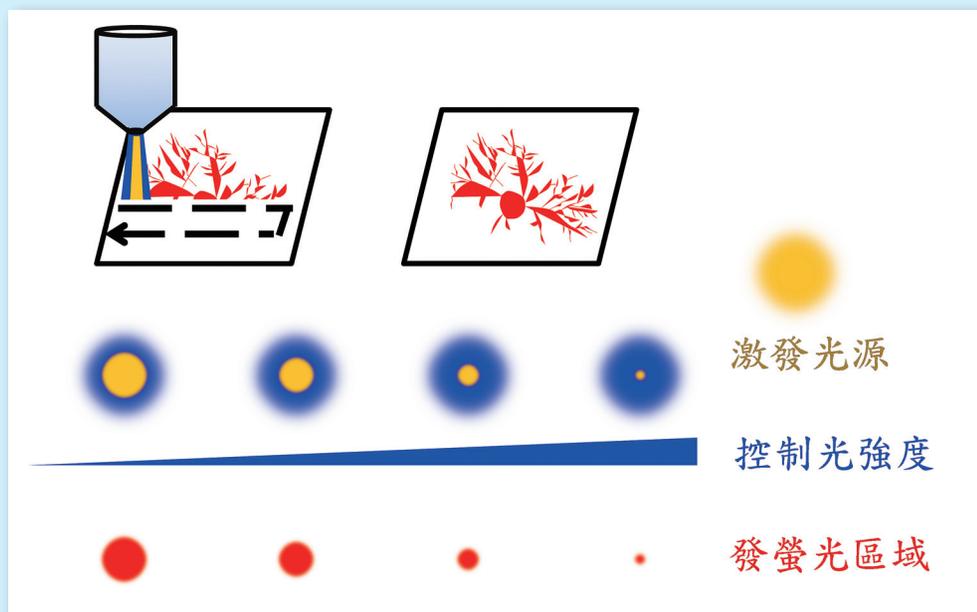


圖6 控制螢光分子在特定區域不發光的超解析顯微鏡示意圖。

螢光分子不發光。如圖 6 所示，將聚焦的雷射光點在樣品上掃描，是另一種取得螢光影像的方式。因為被雷射光點照到的區域都會發螢光，因此影像解析度由聚焦光點大小決定。雖然雷射激發螢光分子的光點受限於阿貝繞射極限，但是可以利用另一道甜甜圈形狀的雷射（控制光），讓中心點周圍的螢光分子不發光。控制光強度愈強時，中間會發螢光的區域就愈小。因此，藉由結合這兩道激發雷射與控制雷射精細地掃描樣品，也可以得到超解析螢光影像。

解析度多小才夠？

目前超解析螢光顯微鏡解析度已經可以達到 20 奈米左右，然而科學家仍積極研究是否有更好的技術繼續提高解析度。另一方面，生命科學家亦積極利用超解析螢

光顯微鏡研究以往受限於設備而無法觀察或探討的議題。譬如分子如何在神經細胞之間傳遞訊息？阿茲海默症及帕金森氏症是否跟神經細胞中那些蛋白質折疊錯誤或堆疊有關？我們期待奈米解析度的顯微鏡可幫助人類更了解生命並對抗疾病。

延伸閱讀

林宮玄，〈顯微鏡變顯「奈」鏡了！〉，《科學月刊》，第 45 卷第 12 期，頁 912-917 (2014)。

張宜仁、周家復，〈超解析度光學顯微術簡介〉，《物理雙月刊》，第 37 卷第 1 期，頁 65-78 (2015)。

林宮玄 中央研究院物理研究所研究助技師
吳紫綾 中央研究院物理研究所生物影像核心設施管理人