

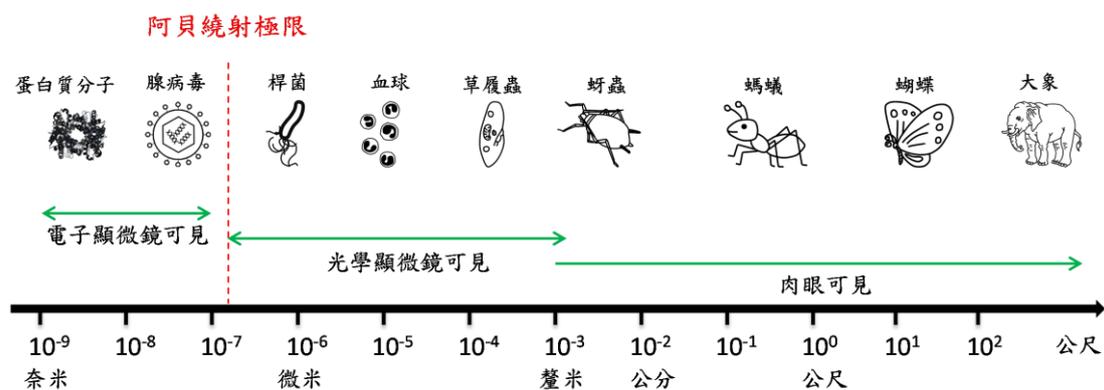
顯微鏡變顯「奈」鏡了！

超解析度螢光顯微鏡的發明，獲得了 2014 年諾貝爾化學獎的肯定。本文淺談目前光學顯微鏡的進展，如何將光學影像解析度從微米尺度縮小到奈米尺度。

林宮玄 (中央研究院物理研究所)

前言

在十七世紀光學顯微鏡發明後，微米 (10^6 公尺) 大小的細胞映在人類眼前，開啟了微生物學。1873 年，恩斯特·阿貝(Ernst Abbe)證明了光學顯微鏡的解析度只能達到光波長的二分之一左右，稱為阿貝繞射極限 (Abbe diffraction limit)。於人類所能看到的光波長在 400 奈米(10^9 公尺)到 700 奈米左右，因此 200 奈米或 0.2 微米一直是一般光學顯微鏡解析度無法突破的瓶頸。如圖一所示，在光學顯微鏡發明後的幾百年間，微米左右的物體一直是人類所能觀察到的最小尺度。「微」這個字，被用來形容非常小的物體。顯微鏡的英文為 Microscope，而微米的英文為 Micro-meter。直到二十世紀初電子顯微鏡 (Electron microscope) 的問世，人類才開始看到奈米大小的物體。之後英文多了一個新名詞 Nanoscope，強調該儀器能看到 Nano-meter (奈米)大小物體，但是「顯奈鏡」這個名詞在中文並沒有被廣泛使用。現今，「顯微鏡」這個名詞不管是中文還英文，已不代表只能看微米尺度的儀器。顯微鏡的功用是將微小物體的影像放大，使肉眼能讓看見。不過生活用語中的顯微鏡，仍大多指光學顯微鏡。



圖一 生物體的尺度圖及一般儀器能看到的物體大小。

既然電子顯微鏡的解析度能看到奈米物體，為什麼一般光學顯微鏡仍是生命科學的重要工具呢？主要原因在於電子顯微鏡只能觀察經過冷凍切片處理的生物樣品。換言之，樣品是死的。原子力顯微鏡 (Atomic Force Microscope, 簡稱 AFM) 也是擁有奈米解析度的儀器，目前已發展到可觀察水中的活細胞。然而原子力顯微鏡只能觀察到樣品表面的形貌，無法看到細胞內部的構造。雖然一般光學顯微鏡的解析度遠比電子顯微鏡與原子力顯微鏡解析度差，但是具有觀察活細胞內部構造隨時間變化的優勢。因此，光學顯微鏡至今仍是研究生命科學很普遍的利器。

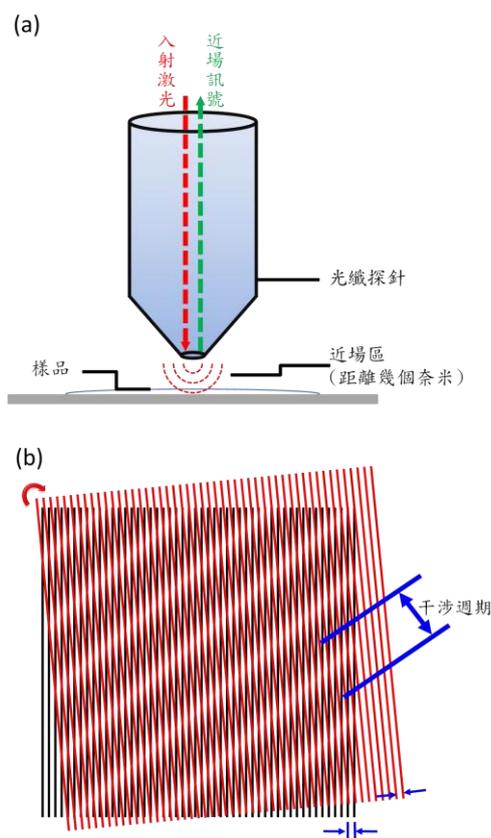
超解析度螢光顯微鏡 (Super-resolution fluorescence microscope)的發明出現了新契機，所謂「超解析度」的意思是突破阿貝繞射極限，讓解析度進入幾十奈米，使科學家可以觀察活細胞內奈米物體變化。譬如研究分子如何在腦內神經細胞之間形成突觸，追蹤與巴金森氏症或阿茲海默症相關的蛋白質聚集。2014 年，瑞典皇家科學院將諾貝爾化學獎頒給了美國霍華德休斯醫學研究所 (Howard Hughes Medical Institute) 的艾瑞克·貝齊格 (Eric Betzig)，德國馬克斯·普朗克生物物理化學研究所 (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry) 的史蒂芬·海爾 (Stefan W. Hell) 以及美國史丹福大學 (Stanford University) 的威廉·莫納 (William E. Moerner) 三人，表揚他們將光學顯微鏡帶到奈米世界的貢獻。

與阿貝繞射極限的直接對抗

阿貝繞射極限 (Abbe diffraction limit)證明了一般光學顯微鏡的解析度，物理上只能達到光波長的二分之一左右。然而，科學家們仍然想盡各種辦法能夠突破阿貝繞射極，直接看到超高解析度光學影像。近場光學掃描顯微鏡 (Near-field scanning optical microscope, 簡稱 NSOM) 是其中一個直接的方法。

如圖二(a)所示，近場光學顯微鏡的原理與原子力顯微鏡很類似。當針尖非常靠近待測物表面到幾個奈米距離時，樣品表面會對針尖產生斥力。藉由偵測斥力而能使針尖與待測物維持相同距離，利用針尖掃描待測物表面，可得到高低差影像。由於掃描的定位系統精確度可小於 1 奈米，影像的解析度其實是由針尖大小所決定。近場光學顯微鏡利用光纖當作針尖來掃描待測物，發射或收集光訊號。目前的科技可以把光纖的針尖削到只有 50 奈米以下，然而並不是針尖愈小，光學解析度就可無限制的提高。當光纖的直徑小於光的波長的時候，會形成消逝波 (Evanescent wave)。雖然消逝波可以讓光點縮小到光纖大小的二分之一波長以下，但無法傳播的很遠，即光「消逝」的很快。目前近場光學顯微鏡的解析度可以到 20 奈米，然而最大的應用問題與原子力顯微鏡一樣，只能量測表面的訊號。另一方面，利用消逝波收集光訊號到光纖的效率較低，當生物螢光訊號很弱的時候，

不易利用近場光學顯微鏡觀察。



圖二 (a)近場光學顯微鏡的原理，物體表面的光點大小直接決定光學解析度。(b) 構造化照明顯微術利用照明光的週期圖案與待測物的干涉形成雲紋圖形，產生較大的干涉週期使一般光學顯微鏡容易解析。利用數值運算，可將光學影像解析度提升兩倍以上。

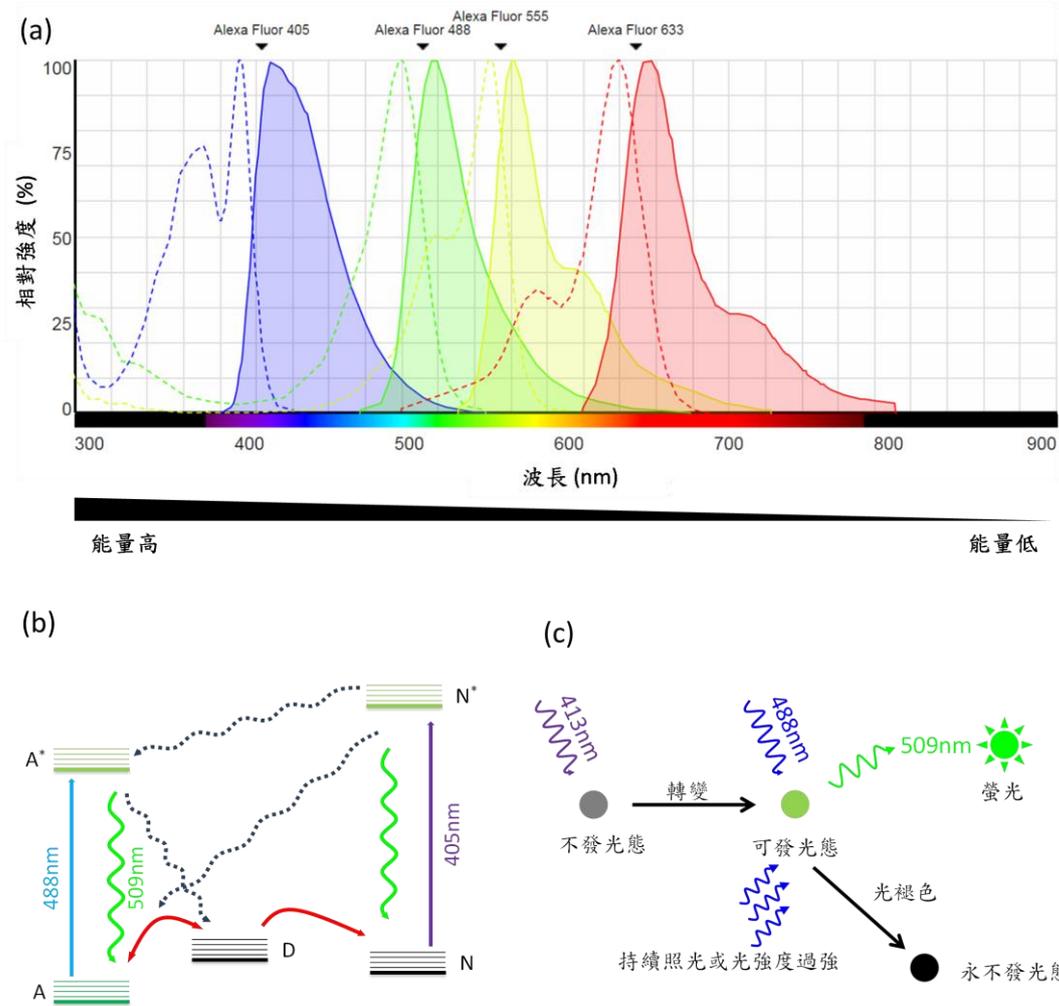
一般光學顯微鏡的解析度，是指物體被均勻光照明後，透過一般物鏡所成像的解析度，或是光源聚焦到待測物的光點大小，無法突破阿貝繞射極限。然而，如果對於照明光源的物理特性瞭若指掌，可以藉由數學分析，得到超解析度光學影像。譬如，構造化照明顯微術 (Structured illumination microscopy, 簡稱 SIM)藉由控制光的照明，並將影像經過計算後，其解析度可突破繞射極限。構造化照明顯微術主要是利用照明光的週期圖案與待測物的干涉形成雲紋圖形 (Moiré pattern)。圖二(b)簡單介紹了雲紋圖形的原理。兩個很密的週期圖案旋轉一個小角度的時候，原本小的週期結構會變成較大的週期圖案，使得一般光學系統容易解析。經由數值方法傅立葉分析 (Fourier analysis)，構造化照明顯微術可以將一般光學影像的解析度提高到二倍以上。目前有許多方法，藉由照明光的控制及影像後處理分析，提升光學影像解析度。譬如空間調制照明 (Spatially modulated illumination, 簡稱 SMI)，利用雷射干涉條紋精細掃描待測物位置，觀察條紋變化

而運算出較高解析度影像。國內中研院應用科學研究中心李超煌所發明的超解析度光學顯微鏡，也是利用調控光源與待測物的交互作用，藉由影像後處理得到小於 200 奈米以下的解析度。

在了解單一螢光分子後

螢光分子在受到高能量(短波長)的光激發以後，會放出較低能量(長波長)的光，稱為螢光 (Fluorescence)。圖三(a)顯示了一些常用螢光分子的激發光波長及螢光顏色。藍光的波長較短，能量較高。反之紅光的波長較長，能量較低。螢光顯微鏡已經是生命科學中很常見的工具，藉由抗體來標定細胞內的特定胞器或分子，再將螢光分子鍵結到抗體後，即可由螢光的放光位置，追蹤染色的特定胞器在細胞內的形態。綠螢光蛋白質 (Green fluorescent protein, 簡稱 GFP) 的發現，使得細胞不需經由額外螢光染色便可直接觀察，成為活細胞動態變化觀察的強力工具。因此，諾貝爾獎在 2008 年表彰綠螢光蛋白質的合成技術，讓螢光顯微鏡能用來觀察活細胞的形態變化。

雖然在二十世紀初，已有理論提出單一分子中有一些隨機行為，但是有很久一段時間，沒有實驗方法去研究單一分子，只能研究上百萬分子的整體統計行為。1989 年，莫納首度量測到單一分子對光的吸收，開啟了單一分子的研究領域，並吸引了許多科學家投入研究。1997 年，莫納在單一綠螢光蛋白質分子的突變體 (Single molecules of mutants of the GFP) 有重要的發現。如圖三(b)所示，在 488 奈米的雷射光激發下，他發現綠螢光蛋白質並不會一直持續發光，而是隨時間閃爍。在間歇性的發光幾個週期之下，這個單一分子就很穩定的進入不發光狀態 (Dark state)。最令人驚訝的是，這個單一分子再被 405 奈米的雷射光照射後，又可被活化成可發光狀態。這個發現，引發了許多利用光活化來控制綠螢光蛋白質發光的研究。譬如 2002 年，美國國家衛生院的珍妮弗·利平科特·施瓦茨 (Jennifer Lippincott-Schwartz) 在美國「科學」(Science) 雜誌發表了一種綠螢光蛋白質突變體。如圖三(c)所示，原本不會發光的綠螢光蛋白質突變體，在 413 奈米雷射光照射後會變成活化態，被 488 奈米光激發可放出螢光。而在持續使用 488 奈米光激發下，綠螢光蛋白質突變體最後會因為光褪色 (photobleaching) 效應，無法再被活化而放出螢光。



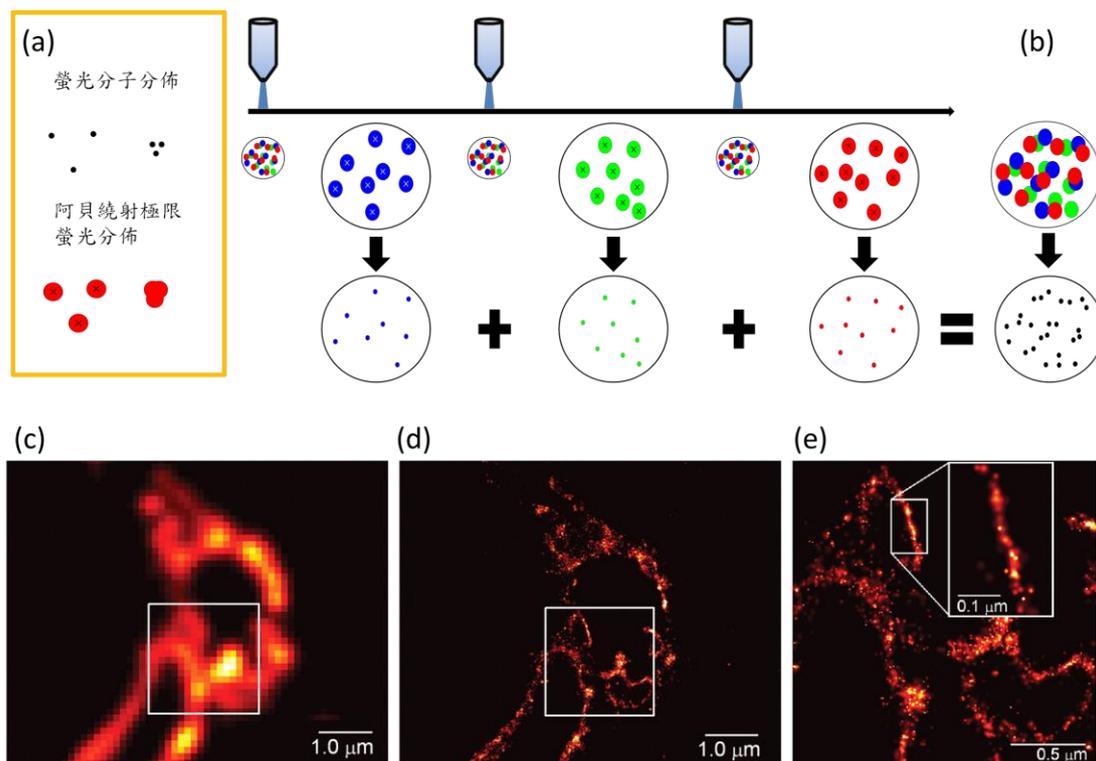
圖三 (a) 生物樣品染色常用的螢光分子。虛線表示可激發的光顏色範圍，實線表示該螢光分子的螢光顏色範圍。(b) 莫納在 1997 年發現的單一綠螢光蛋白質的發光特性。電子在 A 態時，可放螢光。在 D 態時不會放螢光。因為電子隨時間在 A 及 D 態中跳躍，所以螢光會隨時間亮或暗。電子跳到 N 態後，就沒辦法跳回 D 態，因此永不發光。當電子被 405 奈米光激發後，又可回到 A 或 D 態。(c) 珍妮弗·利平科特·施瓦茨在 2002 年發表的綠螢光蛋白質發光特性。(a)取材自 Life Technologies 網站 (<http://www.lifetechnologies.com/>)。

開關螢光分子閃過阿貝繞射極限

一個很小的點光源(譬如奈米大小的螢光分子) 經過一般光學成像系統後，這個小光點會大到跟光波長的尺度差不多。這個成像光點的光強度變化，可以用點擴散函數 (point spread function, 簡稱 PSF) 來描述。如圖四 (a) 所示，如果兩個螢光分子分的很開，其實一般顯微鏡還是能看到。更重要的是，因為點擴散函數的

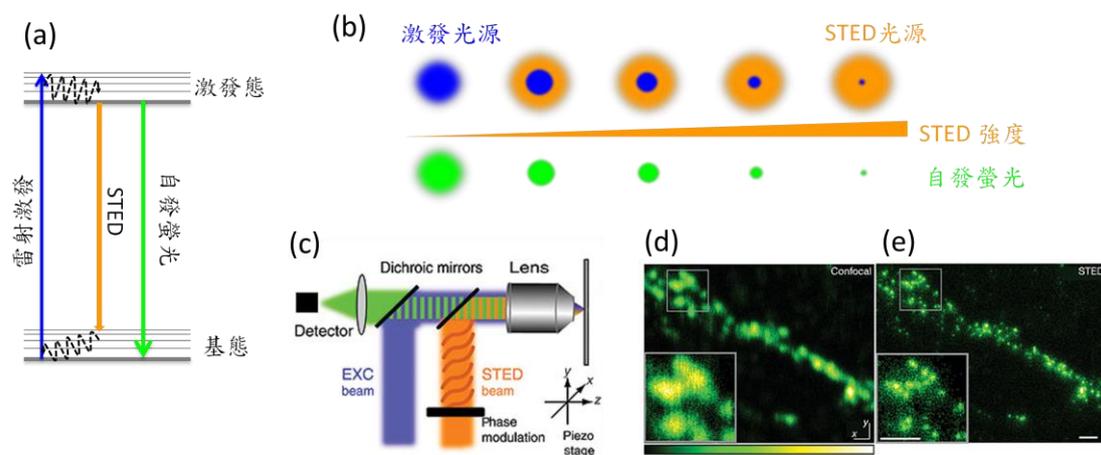
中心點光強度最強，藉由分析兩個螢光分子的點擴散函數，其實是可以把兩個螢光分子的位置與距離精準定位。理論上定位誤差是沒有極限的，實驗上雖然有雷射雜訊、樣品載台微震動等因素，定位誤差還是可以達到奈米等級。然而，阿貝繞射極限主要強調的是解析度，即分辨兩個小物體距離的能力。當兩個螢光分子的距離靠的很近時(小於光波長的二分之一)，兩個螢光分子的點擴散函數重疊在一起，就無法分辨是一個螢光分子還是兩個螢光分子。

1995 年，貝齊格提出了利用螢光分子提高解析度的想法。如圖四(b)所示，如果可以將不同顏色的螢光分子均勻的染色的在樣品中，每個顏色之間的距離都大於阿貝繞射極限。那只要在一般的顯微鏡利用濾鏡記錄不同顏色的螢光分子，並分析點擴散函數把每個螢光分子的位置精準定位，最後再將每個顏色的子圖組成影像。利用這個方法，即使不同顏色的螢光分子距離只有幾奈米，還是能解析出來。不過，要把這個想法實現很困難。譬如要如何將不同顏色的螢光分子奈米等級的均勻染色？這些螢光分子的顏色變化是否大到可以分辨的出來？



圖四 (a) 螢光分子位置及經由光學成像後的光點。(b)貝齊格在 1995 年提出利用螢光分子不同顏色，提高影像解析度的想法。利用(c)一般光學顯微術及(d)光活化定位顯微術所取到的溶小體螢光影像。(e)將(d)的倍率再放大，證明解析度可達幾十奈米。(c)-(e)取材自 *Science* 313, 1642 (2006)。

經過了好幾年，貝齊格看到了 2002 年利平科特·施瓦茨在「科學」雜誌發表的實驗結果，發現綠螢光蛋白質的獨特光學性質有機會實現他在 1995 年提出的想法。他發現實驗上，並不需要區分螢光顏色，還是可以利用不同時間活化綠螢光蛋白質的方式，來組合超高解析影像。利用圖三(c)中綠螢光蛋白質突變體的性質，首先用很弱的 413 奈米光，可以隨機的讓少數螢光蛋白質突變體活化，因此活化的綠螢光蛋白質之間的距離都比阿貝繞射極限還要大。再用 488 奈米的雷射激發活化的綠螢光蛋白質，然後根據每個螢光的點擴散函數把每個綠螢光蛋白質的位置以奈米等級的精確度定位，成為第一個子圖。當第一組活化的綠螢光蛋白質因為光褪色無法再被活化後，可再用很弱的 413 奈米光，隨機的讓其他少數螢光蛋白質突變體活化。再不斷重覆上述步驟，記錄下許多子圖，最後就可以組成一張超解析度影像。他把這個技術稱為光活化定位顯微術 (Photoactivated localization microscopy, 簡稱 PALM)。貝齊格與利平科特·施瓦茨合作實現了這個想法，將會發光的蛋白質接在溶小體(lysosome)的膜上面，圖四(d)是 2006 年他們發表的溶小體螢光影像，光活化定位顯微術所取到的影像解析度比圖四(c)的傳統顯微鏡影像提升了許多倍。圖四(e)再將圖的倍率再放大，幾十奈米的東西可以被清楚的解析出來，證明光活化定位顯微術可達到超解析度。



圖五 (a)螢光分子自發性放射螢光與受激放射光性質。(b)利用受激放射特性，可讓自發性放射螢光的區域縮小。(c)海爾在 1994 年發表的受激放射耗乏顯微術實驗架構。利用(d)一般光學顯微術及(e)受激放射耗乏顯微術所取到的神經末稍突觸螢光影像。(c)-(e)圖取材自 *Nature* 440, 935 (2006)。

過去二十年海爾也一直想著如何突破阿貝繞射極限，而他是從螢光分子的另一個性質著手。如圖五 (a) 所示，螢光分子有基態 (Ground state) 跟激發態 (Excited state)，基態與激發態中還有不同能量的振動態 (Vibrational state)。當激發

光源提供螢光分子中的電子能量時，電子會發生躍遷 (transition) 到激發態。接下來約 0.1 奈秒 (nanosecond, 10^{-9} 秒) 左右的時間內，電子在激發態中的能量，會從高振動態遞減到最低振動態並停留大約幾個奈秒。最後當電子躍遷到基態中任何一個振動態而放出的光，即稱為自發性放射 (Spontaneous emission)。一般螢光顯微鏡所觀察的光即是自發性放射的螢光。然而，若電子在激發態時，遇到另一道光剛好對應在電子可躍遷的能量時，電子會受到刺激而馬上躍遷到基態並放出光，即受激放射 (Stimulated emission)。譬如，如圖五(a)所示，光子能量對應到激發態中最低振動態到基態中的最高振動態時，電子就會在這兩個能態間躍遷並發出相同能量的光。

當海爾了解螢光分子受激放射 (Stimulated emission) 的性質後，他想到了一個利用螢光的開關來提升影像解析度的方法。1994 年，海爾發表了受激放射耗乏 (Stimulated emission depletion, 簡稱 STED) 顯微術。如圖五(b)所示，他先利用一般受繞射極限的雷射光聚焦激發螢光分子中的電子，然後選擇螢光中能量較低 (波長較長) 的光，聚焦成甜甜圈的形狀，來產生受激放射耗乏。在電子還沒自發性放光前，甜甜圈形狀的光將中點外圍的電子受激放射。由於自發性螢光的顏色與受激放射的螢光顏色不一樣，因此就可以利用濾鏡只觀察來自中點附近的自發性螢光。如圖五(b)所示，理論上甜甜圈形狀的光強度愈強，來自中點附近的自發性螢光的區域就愈小，不受阿貝繞射所限制。實際上，如果光太強會造成光褪色，使分子無法再螢光，所以這個方法無法無限制縮小螢光光點。

2000 年以後，海爾開始實驗上證明這個想法是可行的。如圖五(c)所示，結合激發雷射與受激放射耗乏雷射，藉由奈米精確度的掃描生物樣品可得到超解析螢光影像。如圖五(e)所示，神經元被螢光分子染色後，圖形中的螢光點顯示了神經末梢突觸 (Synaptic nerve terminal) 的位置。與圖五(d)的一般螢光顯微影像比較，圖五(e)因為解析度提高而能分辨更多不同位置的神經末梢突觸。

超解析螢光顯微鏡的啟發

貝齊格在 1995 年提出定位顯微術的構想後，2006 年利用綠螢光蛋白質的光活化性質，證明了光活化定位顯微術的可行性。同一年，美國哈佛大學 (Harvard University) 的莊曉薇 (Xiaowei Zhuang) 也參考了貝齊格 1995 年的構想，證明了利用其他生物常用的螢光分子也可以達到超解析度，並命名為隨機光學重建顯微術 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, 簡稱 STORM)。因為單一螢光分子隨時間是隨機的放光，因此鄰近的螢光分子同時放螢光的機會不大。藉由不同時間下記錄許多子圖並由點擴散函數定位，最後也可以組成一張超解析度影像。比光活化定位顯微術更方便的是，隨機光學重建顯微術用一道激發雷射就可以將生物

常用的螢光分子隨機的開或關。通常生物常用的螢光分子無論亮度與耐用度都比綠螢光蛋白質好，2006 年後發展至今，隨機光學重建顯微術應用在生命科學的研究進展，似乎比光活化定位顯微術還要快。

超解析螢光顯微鏡提供了發展光學顯微鏡一個不同的思維。在沒有利用螢光分子的特殊性質前，超解析光學顯微鏡是利用對光性質的了解去設計的，與所要觀察的樣品無關。超解析螢光顯微鏡的原理所帶來的啟發，是可以針對觀察物的性質，譬如螢光的開關控制或其它像飽和等非線性行為去進一步提升光學影像解析度，國內部分研究就是受到這個概念所啟發。譬如中研院原子與分子科學研究所張煥正利用螢光奈米鑽石 (fluorescent nanodiamond)發展受激放射耗乏顯微術。臺大物理學系朱士維利用金奈米粒子的飽和作用，達成超解析光學影像。筆者就讀臺大光電工程學研究所時與指導教授孫啟光發表了利用脈衝雷射在氮化銦鎵奈米薄膜產生音波的非線性效應，突破光學繞射極限取得奈米解析度超音波影像。

結合人類原本就對光傳播性質的了解，利用調控光源與待測物的交互作用及螢光分子的特殊性質，讓超解析螢光顯微鏡發展更快。譬如本文之前提到的構造化照明顯微鏡，可藉由螢光分子的飽和效應進一步提升解析度，稱為飽和構造化照明顯微術 (Saturated structured illumination microscopy, SSIM)。超解析螢光顯微鏡也搭配光源的分析，進一步發展出三維奈米解析度的光活化定位顯微術 (3D-PALM)、三維隨機光學重建顯微術 (3D-STORM)、三維受激放射耗乏顯微術 (3D-STED)等。

超解析螢光顯微鏡未來的方向

雖然超解析螢光顯微鏡已經證明可以直接觀察活細胞內奈米等級的蛋白質與胞器，然而科學家是不會永遠滿足於目前的解析度的。超解析螢光顯微鏡的解析度有賴於好的螢光分子特性，譬如開關的控制或隨機性及被雷射光打壞的功率上限。發展出好的螢光分子，更方便的染在活細胞裡，是一條很清楚的路。

顯微鏡除了在解析度的追求，科學家也希望提升影像速度，方便觀察細胞內快速動態行為。受激放射耗乏顯微術需要時間做雷射精密掃描，光活化定位顯微術或隨機光學重建顯微術需要一定時間內取不同子圖，並利用電腦運算處理，目前這些技術最快也需要一秒左右取得一張高解析二維影像。為了解決影像速度的問題，近幾年來，光片照明顯微術 (Light-sheet microscopy) 開始蓬勃發展，今年從貝齊格實驗室回國的陳壁彰也開始在中研院應用科學中心發展光片照明顯微術。我們期待更好的光學顯微鏡能幫助科學家未來在生命科學領域有突破發現，幫助人類

對抗疾病，改善人類的生活。

筆者感謝中研院應用科學研究中心陳壁彰博士協助校稿，中研院物理所生物影像核心設施吳紫綾小姐協助潤稿及繪圖。

參考資料

1. 諾貝爾獎官方網站 2014 年化學獎，有興趣者可進一步看聲明稿中引用文獻
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/
2. 內文提及之國內學者網站與發表文獻