

全反射原理及在生物螢光顯微鏡之應用

The Principle and Applications of Total Internal Reflection on Biological Fluorescence Microscope

楊德明、林夏玉、蔡定平

De-Ming Yang, Hsia Yu Lin, Din Ping Tsai

隨著活體螢光染色技術如綠螢光蛋白、以及光學技術的快速進展，生物螢光顯微鏡的發展與應用已到達一個成熟而多樣的地步，生物螢光顯微鏡學已成為一個熱門且實用的實驗工具。本文將介紹一種另類螢光顯微鏡—全反射式螢光顯微鏡，其工作原理是利用全反射時所產生的消散波作為螢光激發光源，強調只激發樣品表面螢光分子的特性，加上高解析的物鏡搭配，這類顯微鏡在表面材料科學以及生物學，特別是單一分子偵測的應用上，逐漸受到重視。這類顯微鏡的架構以及生物學上的相關應用等也將在本文中詳述。

The developments and applications of biological fluorescence microscope had achieved to a status of maturity and versatility due to the usage of vital fluorescence labeling technique such as green fluorescence protein (GFP) and optimized optical techniques. The biological fluorescence microscope has been a popular tool in experimental sciences. In this article, the authors introduce an alternative type of biological fluorescence microscope—total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM). The basic principle of TIRFM is to generate an evanescent wave at the interface of the total internal reflection. The limited depth of the evanescent field can excite the fluorescent labeling molecules at the very shallow surface of the sample. TIRFM detects only the fluorescence image of the sample surface without the conventional background, and can be effectively applied to the study of biological sciences.

一、前言

自虎克 (Robert Hooke) 於 1665⁽¹⁾ 年發明顯微鏡以來，至今已超過三百年，現代顯微鏡術的發展已趨於多樣化，各個領域如：生物、材料、物理、化

學、甚至電子產業的應用更是不勝枚舉，顯微鏡下的世界大大地改進了人類對自然界的認知。在生物樣品上，由於螢光染色法的廣泛使用，以螢光顯微鏡術 (fluorescence microscopy) 為主軸而設計的顯微影像工具及相關搭配技術，在基礎生物的研究中業

已成為主流，例如：日趨成熟的共軛焦雷射掃描顯微鏡 (confocal laser scanning microscope, CLSM)、螢光相關係數顯微鏡 (fluorescence correlation microscope, FCM)、全反射螢光顯微鏡 (total internal reflection fluorescence microscope, TIRFM) 等顯微鏡技術，以及螢光光漂白回復法 (fluorescence photobleaching recovery, FPR)、螢光共振能量轉換法 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 等技術。螢光顯微鏡學已成為熱門且實用的顯微光學實驗技術與學問。筆者在本文將論述全反射螢光顯微鏡 (TIRFM) 的基本工作原理以及其在生物螢光顯微上之應用。

二、螢光顯微鏡基本原理

螢光樣品均有與特定螢光分子鍵結之部分，螢光分子之電子被一定能量之入射光激發後，由低能階狀態躍遷至高能階，電子在高能階狀態下，會先掉落至一個亞穩態，再由亞穩態回到原來的低階能狀態而釋放出光子 (如圖 1)。

由於代表較高能量的入射激發光波長，和撞擊螢光分子後產生的較低能量的輻射光波長並不相同

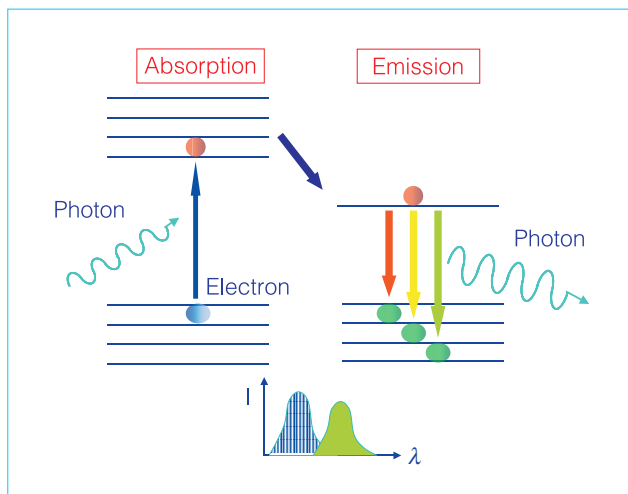


圖 1. 一個典型的螢光發生時之電子能態變化過程，吸收光子躍遷至高能階狀態再落到一個亞穩態，從亞穩態落回原來的低能階時，會釋放出螢光的光子，激發的過程往往是一個短波長的光子，釋放出一個長波長的光子。

(通常入射光波長較短)，在顯微鏡的觀察時必須使用一個含有三個濾鏡的濾鏡組，如圖 2 所示，將入射光反射至樣品，只讓被激發的螢光穿透至影像接收處。以波長為 488 nm 的雷射入射光激發綠螢光蛋白來產生螢光為例，當入射光遇到第一片濾鏡 (稱為激發濾鏡 exciter, EX) 時，其只讓波長介於 470–490 nm 的光通過，因此入射光得以穿透到達第二片濾鏡 (稱為雙色鏡 dichroic mirror, DM)，雙色鏡因只讓波長 505 nm 以下的光反射、505 nm 以上的光穿透，因此波長 488 nm 的入射光經過物鏡到達樣品處，激發光與樣品作用所產生的輻射光波長若在 510 nm 以上，即可穿透雙色鏡直接到達第三片濾鏡 (稱為發射濾鏡 emitter, EM)。發射濾鏡僅讓波長大於 520 nm 的光通過，最後螢光的影像可從目鏡或是電荷耦合元件 (charge-coupled device, CCD) 或光電倍增管 (photoelectric multiplier tube, PMT) 等偵測器上觀察到。故螢光顯微觀察一般是依據不同的入射光或激發光作必需且適當的濾鏡選擇組合。

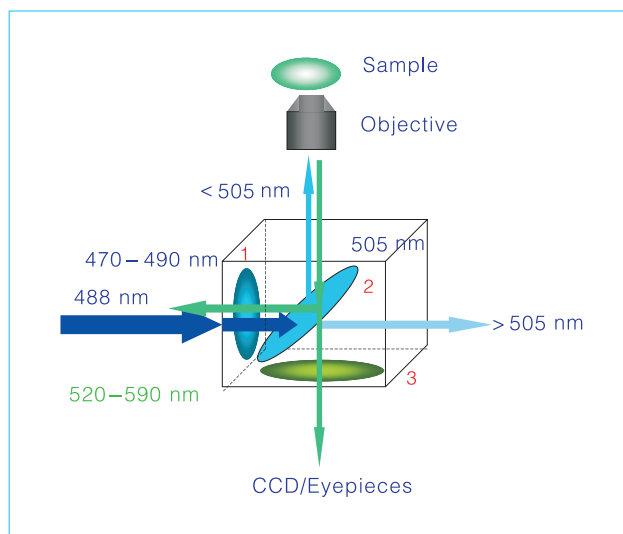


圖 2. 一個典型的螢光顯微濾鏡組的結構與工作原理，其通常是由三個濾片組成，例如入射光通過第一個濾鏡時，僅讓波長 470–490 nm 的光通過，第二片雙色鏡會反射 505 nm 以下的光，使入射光到達樣品時激發出螢光，再沿原路徑遇到第二片雙色鏡，讓波長在 505 nm 以上的光可以通過，再經過第三片濾鏡讓選擇的螢光波段如 520–590 nm 的光通過。

三、全反射螢光顯微鏡之光學原理

當光由一密介質進入另一個折射率不同的疏介質時，在介面會產生反射與折射。若根據斯涅耳定律 (Snell's law)，當入射角的角度到達臨界角 (critical angle) 時，會產生所謂全反射 (total internal reflection) 作用，即折射之穿透光不再存在。然而實際上在第二個介質中的介面處，仍存在有極微量的入射光，通常稱之為消散波 (evanescent wave) 或消散場 (evanescent field) (圖 3)。而利用此一微小的消散波作為激發光源，可以將帶有螢光之樣品在介面處激發而產生所謂全反射螢光影像。

由佛涅耳方程式 (Fresnel' equation)，可以知道光在全反射的情況下，在第二個介質中的穿透光強度與介面的距離呈指數衰減的關係⁽²⁾，即

$$I(z) = I(o)e^{-z/d} \quad (1)$$

其中 $I(o)$ 是入射光在介面的強度， $I(z)$ 是光在第二個介質中的強度， z 為在第二個介質中垂直介面的距離， d 為衰減長度 (decay length)，其關係式如下：

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{-1/2} \quad (2)$$

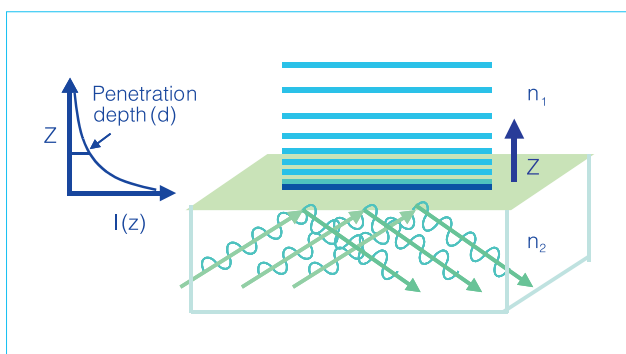


圖 3. 光由密介質到疏介質時，當入射光的入射角大於臨界角時，於界面處會產生所謂的全反射作用，並於界面處疏介質產生消散波，消散波之光強度 $I(z)$ 隨著穿透的深度 (z) 成指數衰減。

其中 λ_0 是入射光波長， θ 為入射角， n_1 與 n_2 分別為第一與第二個介質的折射率。由這個方程式可知，在入射角大於臨界角時，入射角的不同造成有效衰減長度的不同。以 488 nm 的藍光雷射為例，對於一個折射係數為 1.33 的細胞而言，若蓋玻片折射係數為 1.5，在入射角為 68° 的情況下，其衰減長度約為 97 nm。

因為全反射螢光顯微鏡只激發樣品表面處於全反射介面處極淺的一個表面範圍內，且能避免激發其他區域的螢光團，因此可得到極為清楚的表面螢光影像，這和一般的螢光顯微鏡觀察到整個樣品的螢光訊息是截然不同的，但與共軛焦顯微鏡的光學切片道理有異曲同工之處。此外，理論上，一般以燈絲為光源之弧光燈，也可以作為全反射螢光顯微鏡之光源，不過實際上要將這些不同的光束以相同之適當角度並且仍保有足夠的強度來做為全反射光源，是相當困難的，因此一如共軛焦顯微鏡技術，

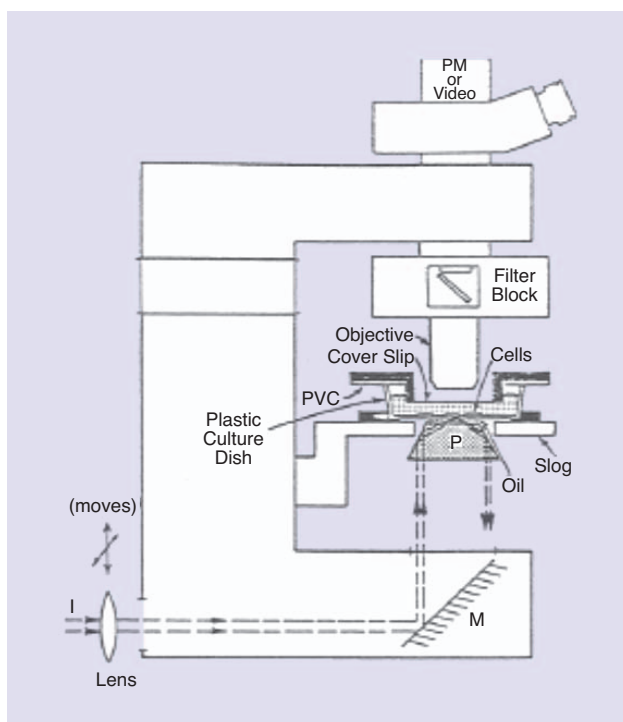


圖 4. 一個架構在正立顯微鏡上的稜鏡式全反射顯微鏡的典型例子⁽³⁾。光源自顯微鏡本體下方進入，透過稜鏡 (P) 產生全反射以激發細胞培養基上的螢光生物樣本。

全反射式螢光顯微鏡通常是以雷射為光源。但是全反射螢光顯微鏡是完全相容於標準螢光、亮視野、暗視野或位相差顯微鏡技術的，因此可以快速切換於各種不同的照明方式中。

四、物鏡式全反射螢光顯微鏡

依光之入射路徑，全反射顯微鏡一般略可分成稜鏡式 (prism type) 與物鏡式 (objective type) 兩類。在稜鏡式方面，一個用正立顯微鏡與稜鏡方式產生全反射的典型例子如圖 4 所示，而倒立顯微鏡使用稜鏡式的架構則有許多典型的類型，如圖 5 所示。物鏡式全反射顯微鏡目前一般只見於在倒立顯微鏡的架構上，如圖 6 所示。

物鏡式全反射顯微鏡在架構上比稜鏡式更為簡單，而且操作方便，如圖 6(b) 所示，它改變入射

光對物鏡中心的徑向距離，使原本應從物鏡中心通過如圖 6(a) 中的入射光，改由物鏡之鏡頭邊緣通過。由於通常其所使用之物鏡是高折射係數與高數值孔徑 (numerical aperture, NA) 的油鏡，且是複式鏡片組，會使入射光在表面的介面產生一個大角度的全反射。另外如圖 6(b) 所示，在物鏡上加上合適的高折射係數油及蓋玻片後，會使全反射作用發生於蓋玻片與樣品接觸的介面上。圖 6(b) 中物鏡式全反射螢光顯微鏡即是以此一全反射作用在樣品與蓋玻片介面處所產生的消散波，來激發樣品在表面之區域，約是 100 nm 左右範圍內的螢光物質，再同時以高數值孔徑之同一油鏡來收集螢光顯微鏡影像。這個方法可有效地去除掉出現在一般螢光顯微鏡如圖 6(a) 中所示結構中之螢光背景雜訊，專注於樣品表面僅 100 nm 左右之深度的物件研究。

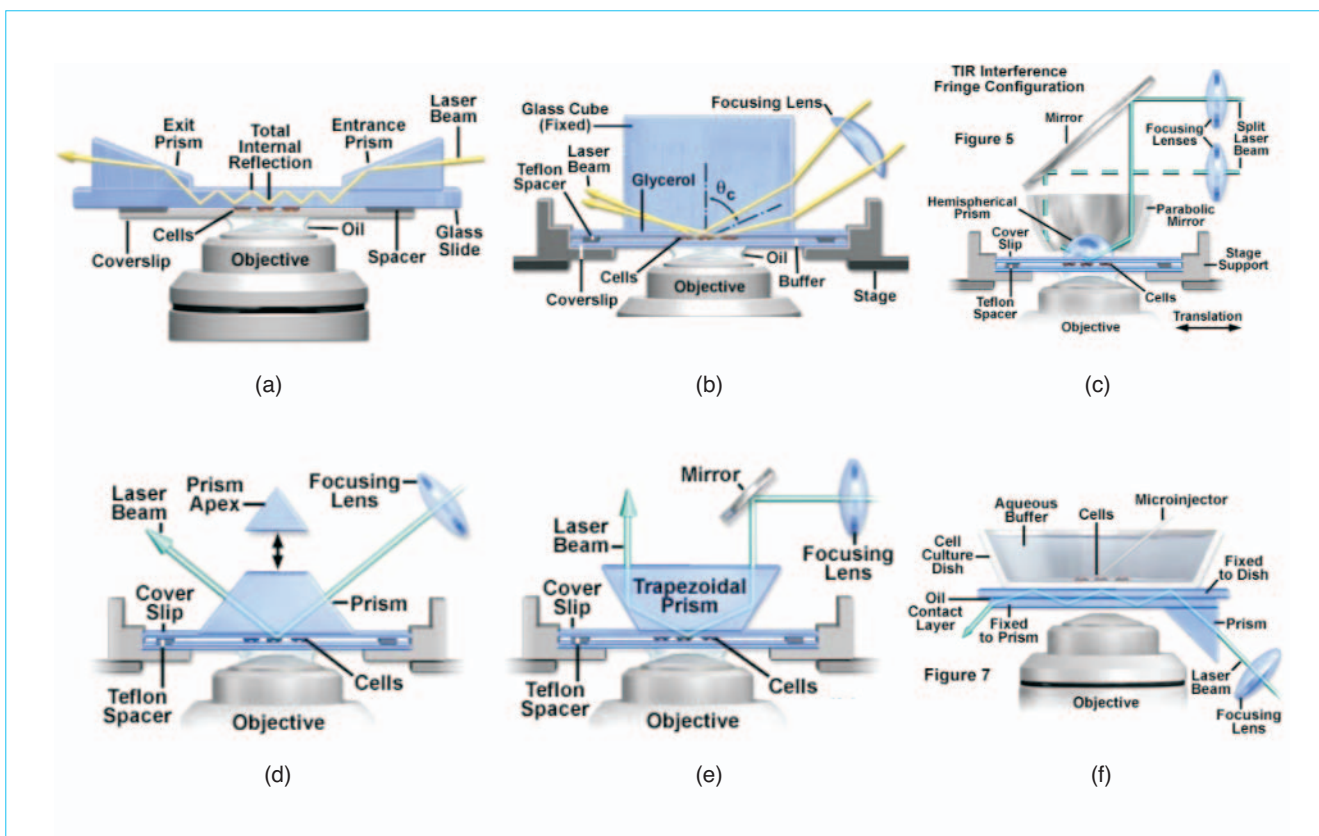


圖 5. 六種稜鏡式全反射顯微鏡架構在倒立式顯微鏡上的例子。(a) 基板稜鏡型 (substrate/prism)，(b) 玻璃柱型 (glass cube)，(c) 半球型 (hemispherical)，(d) 角稜鏡型 (prism apex)，(e) 梯型 (trapezoidal)，(f) 平台型 (substage)。(本圖源自於 Olympus America, Inc. Website)。

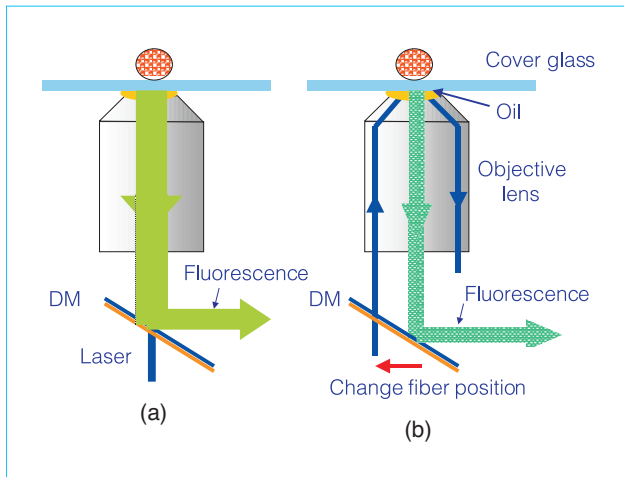


圖 6. (a) Epi-fluorescence，入射光由物鏡中心通過。(b) TIRFM，入射光由透鏡邊緣入射造成一大入射角。

根據雷立準則 (Rayleigh criterion)⁽⁴⁾，繞射作用使得一般光學顯微鏡分辨一物體所能達到的最大解析度為

$$dL = 0.61 \frac{\lambda}{N.A.} \quad (3)$$

其中 dL 表示能夠分辨的最小距離， λ 為使用的光波波長， $N.A.$ 為物鏡的數值孔徑 (numerical aperture, NA)，其值為 $n \sin \theta$ ， n 為介質的折射係數， θ 為用來收集或聚光至感測器所用的物鏡之光學孔穴半角。因此提高顯微鏡解析度的方法，一是使用較低波長的入射光源，另一則是改變介質的折射率，也就是油鏡的使用。因為油的折射率大於空氣，因此一般來說物鏡式全反射螢光顯微鏡使用數值孔徑大於 1 的油鏡 (例如 $N.A. = 1.45$) 及激發螢光的短波長 (例如 488 nm 的藍光)，故其顯微鏡之解析力比一般光學顯微鏡來得高 (約 200 nm 左右)。

物鏡式全反射螢光顯微鏡的設備可大致分成六部分。(1) 顯微鏡主體：例如倒立顯微鏡主體平台，具有入射光之出入口，且可搭配能將入射光聚焦成一平行光的聚光鏡及特殊物鏡的顯微鏡。(2) 物鏡：可用來當作物鏡式全反射顯微鏡的物鏡，其物鏡的數值孔徑值必須大於或等於 1.40，目

前市面上有兩個規格，一個是超高數值孔徑 ($N.A. = 1.75$) 的 100 倍油鏡，但必須使用特殊的高折射係數油及石英蓋玻片，來搭配這個特殊物鏡；另一個是高數值孔徑 ($N.A. = 1.45$) 的 60 倍油鏡，可直接適用一般的玻片及高折射係數油。(3) 光源：一般用波長為 488 nm 的藍光氬離子雷射或是波長為 532 nm 的綠光 Nd:YAG 雷射。(4) 影像擷取記錄器：通常高速與高靈敏度的 CCD 感測器是必需的。(5) 影像擷取軟體：CCD 感測器影像訊號的快速擷取與影像處理與運算之軟體。(6) 其他相關配件：如濾鏡組、電腦與儲存裝置 (如大容量硬碟)、防震平台、顯微操作組合等⁽⁵⁾。

五、生物應用實例：細胞膜附近之特定分子動態影像研究

在生物學上的研究方面，全反射螢光顯微鏡已被大量地應用在蛋白質、細胞膜及核糖核酸等研究實驗上⁽⁶⁾，並且與其他技術相結合，如單一分子偵測 (single molecular detection)、螢光相關係數光譜儀 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS)、螢光漂白回復法 (fluorescence photobleaching recovery, FPR) 及螢光共振能量轉換法 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 等。在此筆者僅簡單地介紹曾經研究過的例子：細胞胞吐 (膜運送, membrane traffic) 之研究。

膜運送在細胞生物學的領域中，其概念相當於囊泡週期 (vesicular cycle)。一些膜運送過程是發生在胞器與胞器之間，例如蛋白質及脂質合成時，在 ER 與高基氏體之間囊泡 (vesicle) 的傳送，有一些則發生在囊泡與表面細胞膜之間。這個過程涵蓋了幾個步驟：停泊 (docking)、膜融合 (membrane fusion，或稱胞吐, exocytosis、分泌, secretion)、胞吐後蛋白質機器組成分之回收 (reuptake or recycle)、以及胞飲 (endocytosis)。本文中的研究重點在停靠與膜融合，以內分泌細胞為例，「刺激」所引發的生理意義在於能使細胞產生細胞膜之膜電位 (membrane potential) 改變，隨之產生去極化 (depolarization) 或動作電位 (action potential)。這個動作的結果是：使訊號反應得以在極短時間內完

成，如在數百個 ms 內，內分泌激素會藉由胞吐釋出至細胞外，如血液中或細胞間質附近。細胞胞吐機制的研究至今已逾 50 年了，雖然已知參與胞吐的諸多蛋白質資訊，提供了膜融合的分子模型的雛形，但仍然有許多未達詳知之處，如 GTP 結合蛋白 (Rab3) 在參與胞吐作用中的真正詳細角色。因此我們針對這些相關蛋白分子，進行一些基礎研究。

筆者以分子生物技術為工具，將能代表細胞分泌泡的蛋白質基因 (Rab3) 與加強型綠螢光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 的基因黏接，製成融合蛋白。結合上述物鏡式全反射螢光顯微鏡設備，筆者已經可以拍攝得到代表單一細胞分泌行為之 EGFP 螢光動態影像。

1. 細胞前處理

將序列已確定之 EGFP 融合蛋白基因，經轉染 (transfection) 程序送入老鼠腎上腺瘤細胞株 (rat adrenal pheochromocytoma cell line, PC12) 中，讓細胞表現至少 24 小時後，再將細胞置於室溫下之生理緩衝溶液中。將蓋玻片裝在載具中、置於已裝配全反射螢光器之倒立式顯微鏡上 (Olympus, IX70)，使用高數值孔鏡 ($N.A. = 1.45$) 的 60 倍油鏡。

2. 數據擷取及分析

(1) 靜態圖像擷取

全反射螢光顯微鏡設備的好處就是可以快速地切換一般螢光以及全反射螢光之架構，以比較這兩

種照明下產生出來的影像的差異。圖 6 顯示明視野下 (圖 7(a))、一般螢光下 (圖 7(b))，以及全反射螢光下 (圖 7(c))，同樣細胞樣品的影像。在全反射螢光顯微鏡的觀察下，代表分泌泡之 EGFP 螢光明顯較一般螢光下為清晰，而且易於分辨與分析。

(2) 動態圖像擷取

接下來是研究者使用動態擷取軟體 (SimplePCI)，拍攝一系列隨時間紀錄 (time-lapsed recording) 之螢光影像。EGFP 所代表之分泌泡的動態分析是擷取畫面中某個區域作輸出，再透過軟體作螢光強度的重新畫出⁽⁷⁾。如圖 8，是細胞接受短時間高鉀溶液去極化後，引發細胞內鈣離子增加，因而刺激細胞胞吐現象時偵測到的 EGFP 螢光動態追蹤，綠色箭頭指示的分泌泡，先是些許離開記錄之焦平面 (第 1.5 秒，圖 8(b))，接下來靠近在細胞膜附近之另一個分泌泡 (或有 EGFP) 所在之細胞膜上 (第 3 秒，圖 8(c))，最後與之融合 (第 6 秒，圖 8(d))。

六、結論

單一細胞膜運送作用之活體偵測，早期除了受限制的一般螢光顯微法，搭配苯乙烯基類 (styryl) 或 acridine orange 等染劑使用之外，就只得以電生理技術為基礎發展出的兩種方法：細胞膜電容法 (membrane capacitance technique) 及伏安法

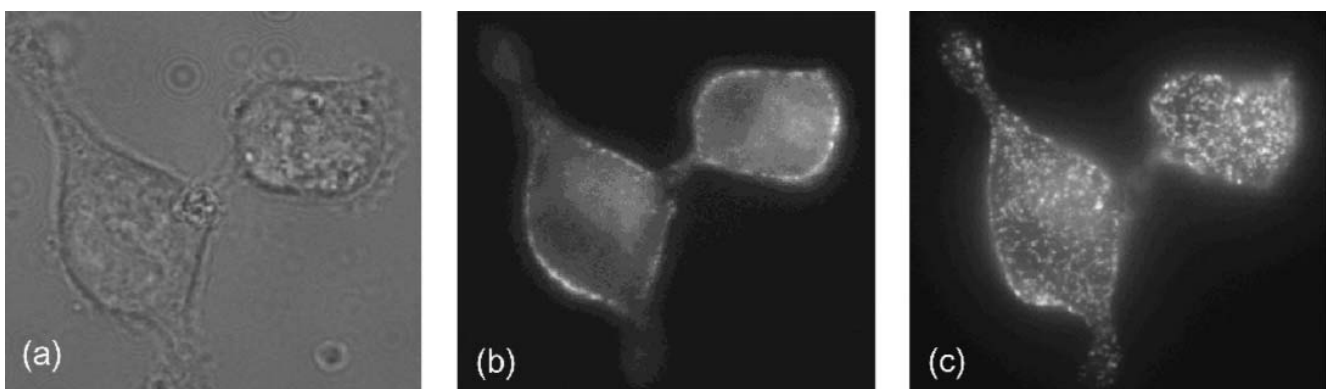


圖 7. 老鼠腎上腺細胞分泌泡在：(a) 明視野 (bright field) 下的影像；(b) 垂直入射螢光顯微鏡下的影像；(c) 全反射式螢光顯微鏡下的影像。

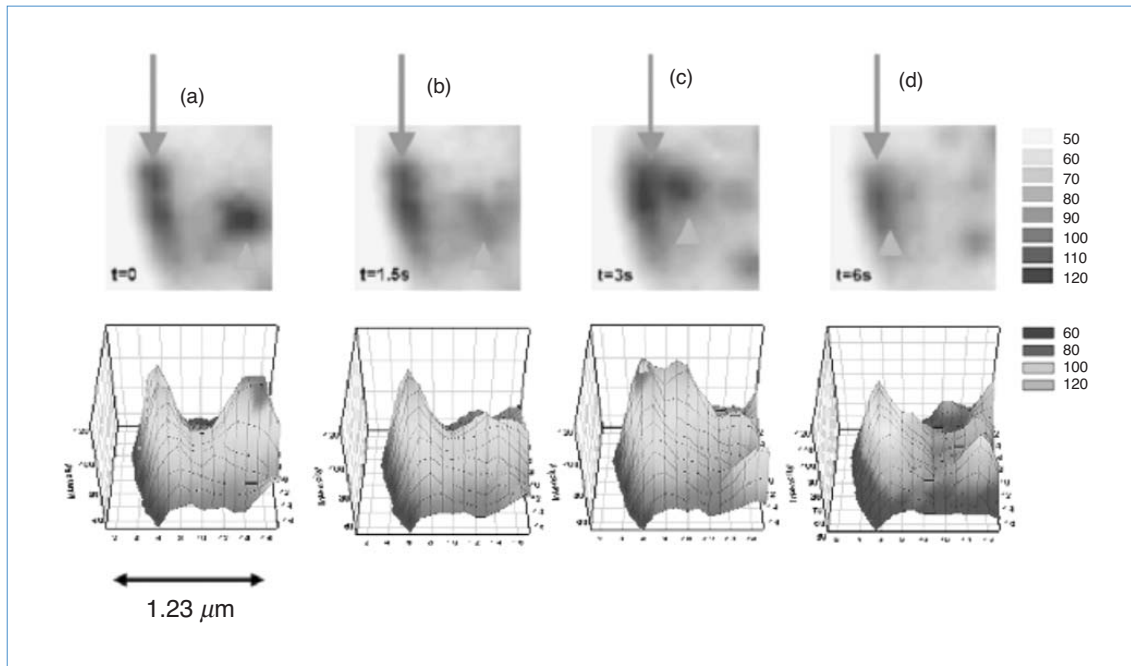


圖 8. 全反射螢光顯微鏡下分泌泡之動態影像及 3D 強度分佈圖。(a) 細胞受高鉀溶液去極化刺激後 ($t = 0$)，(b) 分泌泡 (綠色箭頭) 先是遠離焦平面 ($t = 1.5$ s)，(c) 之後朝左方的細胞膜表面 (紅色箭頭) 靠近 ($t = 3$ s)，(d) 最後與細胞膜融合 ($t = 6$ s)。

(voltammetry) 來執行。隨著螢光染劑開發技術之進展，綠螢光蛋白 (GFP) 於分子生物技術運用上之成熟，膜運送作用之活體及時影像取得不再是遙不可及的任務。雖然一般螢光顯微鏡下，以快速的、高敏感 (低照度) 的冷卻式電荷耦合元件 (cooled CCD) 組成之數位相機，已經可拍攝得到胞吐之影像，然而如圖 7 之比較，一般螢光顯微鏡沒有如共軛焦雷射掃描顯微鏡的 Z 軸光學切面，所得之影像受到太多的其他干擾。而共軛焦雷射掃描顯微鏡雖然擁有優異的非侵入性光學切片技術之高超功能，然而對於想要以快於掃描速度之時間擷取胞吐行為之影像，實際上是相當之困難，這是共軛焦顯微鏡在這領域應用上的限制。全反射螢光顯微鏡的出現，使得單一細胞膜運送作用的活體偵測有了更好的工具可供利用。

參考文獻

1. R. Hooke, *Micrographia* (1665).
2. G. R. Fowles, *Introduction to Modern Optics*, 2nd, 43.
3. D. Axelrod, *Methods in Cell Biology*, **30**, 245 (1989).
4. M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*, Oxford: Pergamon, 81 (1959).
5. 楊德明, 戚謹文, 科儀新知, **24** (2) 56 (2002).
6. Y. Ishii and T. Yanagida, *Single Molecule*, **1**, 5 (2000).
7. D.-M. Yang, C.-C. Huang, H. Y. Lin, D. P. Tsai, L.-S. Kao, C.-W. Chi, and C.-C. Lin, *J. Microscopy* (2003) (in press).

楊德明先生為國防醫學院生命科學博士，現任台北榮民總醫院教學研究部博士後研究員。

林夏玉小姐為國立台灣大學物理研究所博士班學生。

蔡定平先生為美國辛辛那提大學物理博士，現任國立台灣大學物理研究所教授。

De-Ming Yang received his Ph.D. in life science at National Defense Medical Center. He is currently a post doctor in the Department of Medical Research & Education at Taipei Veterans General Hospital.

Hsia Yu Lin is a Ph.D. candidate in the Institute of Physics at Taiwan University.

Din Ping Tsai received his Ph.D. in physics from Cincinnati University, USA. He is currently a professor in the Institute of Physics at Taiwan University.