

# 層光顯微鏡應用於模式動物研究

## Applications of Light Sheet Microscopy in Small Animal Model System

朱麗安、張煒堃

Li-An Chu, Wei-Kun Chang

層光顯微鏡具有低光毒性與高速成像的兩大優點，加上最近在更薄光切片的新設計致使解析度大為提升，以及影像處理電腦效能提升的兩大前提之下，已經漸漸成為用來觀察生物影像的光學顯微鏡系統中的主力之一。因為這些優勢，在不管是基因轉殖後的動物活體影像觀察，或是組織澄清後的結構性影像，層光顯微鏡特別適合長時間觀察樣品中三維的細胞移動，或高速變化的訊號，或是用來拍攝澄清化後的超大樣品如整隻老鼠，或整個人腦。這些新的發現也是生命科學研究目前最重要的基石之一。

There are two major advantage of applying light sheet microscopy onto biological sample: high-speed and low photo toxicity. Recently, due to the higher optical sectioning ability of new light sheet design and high-performance computing, light sheet microscopy has become a major player in the bio-optical imaging field, including live imaging or structural imaging in various transgenic animal models. Light sheet microscopy is particularly good at long-term tracking of 3D cell movements, high-speed activity changes, or imaging huge cleared specimen such as whole mice or whole human brain. These new findings are becoming the most important foundations in the biology field.

### 一、層光顯微鏡特性

#### 1. 速度

過去三十年，共軛焦顯微術 (confocal microscopy) 在螢光顯微影像 (fluorescent microscopy imaging) 的領域，扮演舉足輕重的角色，由各大顯微鏡廠商的生產產品線便可略窺一二。共軛焦顯微鏡比傳統螢光顯微鏡更得使用者青睞的原因，主要是因為其提供樣品的三維解像能力。當雷射光聚焦於生物樣品上時，除了焦點上的螢光分子會受到激發而放出螢光訊號，沿著雷射光光軸路徑進出樣品所碰到的螢光分子都有機會被激發。而此時共軛焦顯微鏡透過針孔光圈 (pinhole) 將來自樣品非焦點的螢光訊號給阻擋或是弱化，以增加來自聚焦點發射出訊號光的訊雜比。共軛焦顯微鏡的雷射光會在物鏡視野範圍內 (field of view) 藉由激發光的聚焦點進行二維平面方向上的掃描，即可達成光切片的目標，再搭配樣品或鏡頭的垂直移動，達到三維成像。這個成像方法利用單一鏡頭搭配雷射掃描模組，即可達到相當

高解析度 (接近光學繞射極限的解析度) 的生物樣品螢光影像，為整個生物影像領域帶來了劃時代的變革，也隨著演算法的演進，部分廠商更開發出以掃描顯微鏡為基底的超解析顯微鏡 (超越光學繞射極限的解析度)，例如蔡司公司的 Airyscan，就是利用在頻率空間獲得更多的訊息，將光學解析度從 250 奈米一舉推進到 140 奈米左右。但共軛焦顯微鏡因為需要將雷射光點做二維掃描，並且因為現代的螢光分子亮度仍然偏低，使得雷射在掃描視野範圍中每一個畫素 (pixel) 的收集訊號時間無法無止盡的縮短，造成掃描的時間解析度有一定的限制，所以近年來，科學家把興趣轉移到了另一個不算新穎的技術身上，也就是層光顯微鏡 (light sheet fluorescent microscopy, LSFM)，或稱選定平面照明顯微術 (selective/single plan illumination microscopy, SPIM)。

現代的層光顯微鏡，是由 1993 年的 Voie 團隊發展出來的光學系統 orthogonal plane fluorescence optical sectioning (OPFOS) 演進而成<sup>(1)</sup>。有別於過去在生物學界最廣泛被使用的掃描式的共軛焦顯微鏡，Voie 團隊藉由把激發光鏡頭與影像擷取做垂直正交，再加上藉由柱狀透鏡 (cylindrical lens) 將激發圓形光束調製成長扁橢圓形光束，進而利用光束在瑞利距離 (Rayleigh length) 內產生一個平坦如刀片一樣的照明光片，再搭配高敏感度相機，便可一次激發並擷取所有在影像擷取鏡頭焦平面上的螢光影像。這樣的取像方法，相較於單點二維式的掃描，提升了百倍的掃描速度，讓生物學家能夠在觀察樣品的時間解析度往上提升了很大的層級。

## 2. 光毒性 (photo toxicity) 與縱軸解析度 (axial resolution)

層光顯微鏡的另一個優點，便是能只針對焦平面的螢光分子做激發，讓非焦平面的螢光分子免於被激發用罄亦減少非焦平面的螢光分子光干擾訊號。過去掃描式共軛焦顯微鏡雖然能夠在影像擷取的同時去除非焦平面的光，但是並沒有辦法排除在掃描的同時也會照亮且激發非焦平面的螢光分子，即使是使用轉盤式共軛焦顯微鏡，能夠有接近層光顯微鏡的影像拍攝速度，也沒有辦法迴避對非焦平面的螢光分子產生光毒性的問題。而在層光顯微鏡的設計中，越好的縱軸解析度，因為有著越薄的激發光層，同時就伴隨著越輕微的非焦平面光毒性，可以說是一石兩鳥的設計方向。過去如果要達到非常薄的激發光層，光束就必須聚焦的更小，但在光學系統強聚焦就會強發散的限制下，光層厚度在瑞利距離內維持相當薄的長度就會大幅減少，也大幅減少一次能夠拍攝的視野範圍 (field of view) 大小。(圖 1 左)。近年來，各種創新的方法使得這層如刀片的照明光層越來越薄，同時也越來越長，例如貝索光 (Bessel beam) 就是一個很好的延展光層的方法。但貝索光有一個先天的限制，就是雖然焦平面上的光可以又長又薄，但因為干涉現象，同時有非常多的背景光，似乎還是無法將其忽略。2014 年陳壁彰研究員以及貝齊格團隊發表的晶格光層顯微術<sup>(2)</sup>，進一步地將貝索光改良為晶格光 (lattice beam)，利用空間相位差調整器 (spatial light modulator) 快速切換貝索光束而形成平面中的點陣，並搭配檢流計振盪產生連續而平整的二維掃描面，並利用光束的建設性及破壞性干涉延展光層長度及去除原先貝索光的背景，大幅降低原先因貝索光造成的非焦平面光毒性，使得層光顯微鏡能夠更長時間的被應用在活體影像。晶格光唯一使用上的困難點在於，只能使用不到原始雷射光源 5% 的能量，所以針對需要高強度雷射激發的樣本，應用上的限制會較多。2020 年陳壁彰研究員與高亮博士團隊更進一步提出平鋪層光顯微鏡 (tiling light sheet microscopy)，能夠在不增加光層厚度的情況下，延長光層長度，以達到更大的掃描範圍 (圖 1 右)<sup>(3)</sup>。

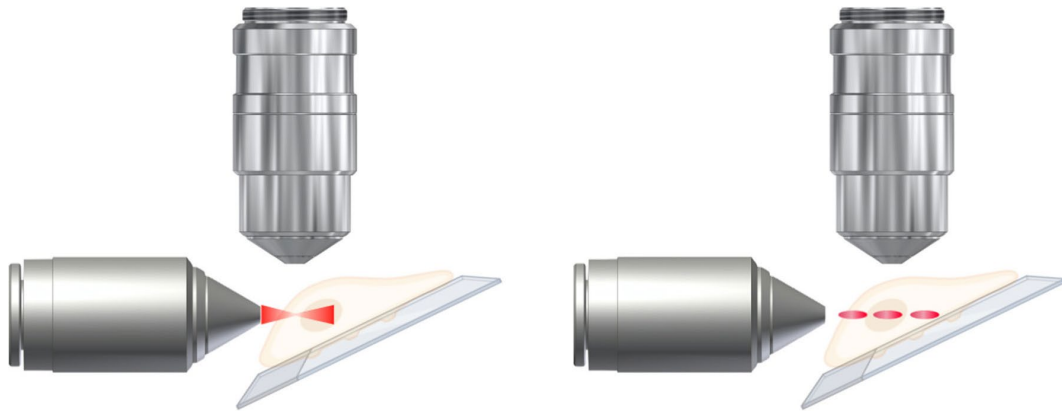


圖 1. 層光顯微鏡示意圖。(左) 激發光源為高斯層光，(右) 激發光源為平鋪層光。

### 3. 利用滾動快門提升訊噪比

降低激發光層的厚度可最直接地減少雜訊光的產生而提升影像解析度，而除了使用晶格貝索光所干涉的方法外，滾動快門在層光顯微鏡上的應用，可以利用控制光感測器上的每個像素曝光的時間和順序，幫助了雜訊光的濾除且等效上薄化激發光層。藉由一維掃動聚焦貝索光所干涉形成的薄光層，有著因干涉產生的旁波瓣 (sidelobe) 所造成等效激發厚度增厚的問題，可以利用激發光與滾動快門 (rolling shutter) 而非全快門 (global shutter) 同步的方式，使相機在收集訊號時，只收取薄光層所激發並成像在光感測器上對應的位置，藉此濾除旁波瓣所激發的雜訊 (圖 2)。另外，藉由聚焦橢圓光型所產生的薄光層，其光層厚度與聚焦的焦距長短有關。為了得到越薄的光層，常使用越短焦的透鏡，卻犧牲光層的長度。然而，如果在激發光路架上一個可變焦透鏡 (如 electrically tunable lenses, ETL)，使得激發光束的瑞利範圍可以沿著光軸前後移動，並搭配相機滾動快門取像，便可以等效上維持光層的薄度且延長光層的長度。

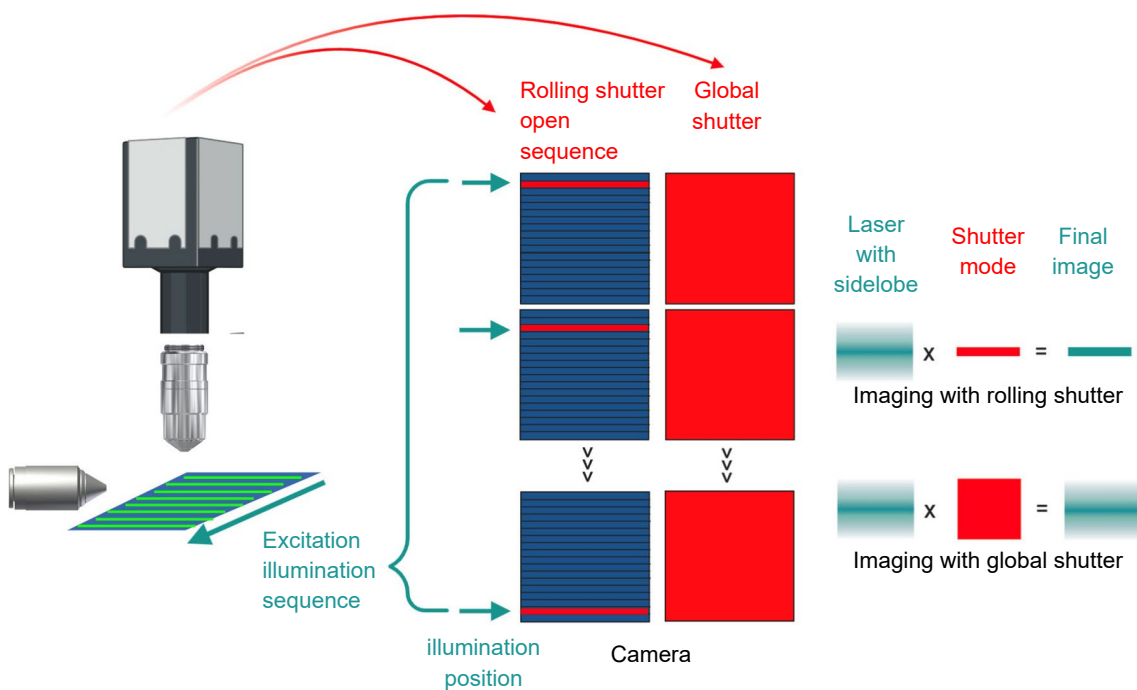


圖 2. 滾動快門工作原理。

## 二、四維活體影像

主流的小型模式動物系統有線蟲、果蠅、斑馬魚、老鼠，而大型的則有狗、猴子、猩猩以及人類。小型模式動物被大量使用的主要原因是其特殊、方便的基因轉殖系統，再加上過去完整的基因定序以及目前被大量使用的 CRISPR 基因剪輯技術，使得科學家幾乎能夠任意的新增或減少模式動物體內的特定基因，也能幾乎任意在特定細胞上表達外來的蛋白質例如螢光蛋白。由於層光顯微鏡需利用側邊打入激發光源，若生物樣本本身不是通體透明，則容易干擾入射光品質，也直接影響成像品質。幸好，有許多的模式生物天生就幾乎是通體透明，例如線蟲、果蠅幼蟲、斑馬魚胚胎等，非常適合利用層光顯微鏡進行高速、高解析度且長時間的四維（三維立體時間性影像）觀察（圖 3）<sup>(4)</sup>。

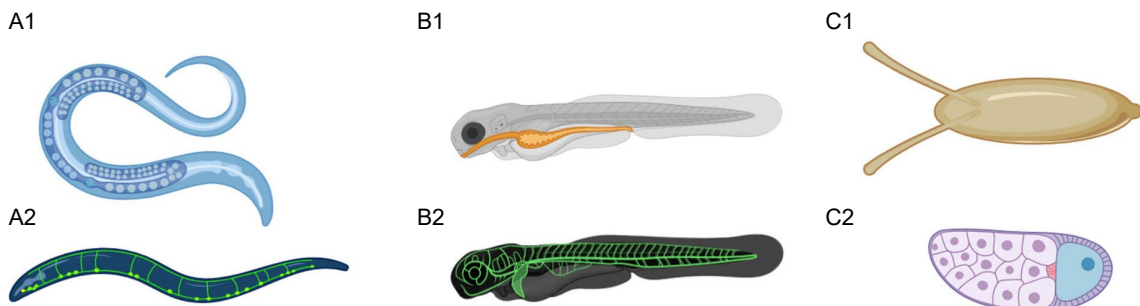


圖 3. 適合利用層光顯微鏡進行活體拍攝影像的動物 (A-C) 線蟲、斑馬魚胚胎、果蠅胚胎。(A1) 線蟲外皮以及體內臟器位置；(A2) 線蟲外皮及神經系統位置；(B1) 斑馬魚胚胎之腸道系統 (B2) 斑馬魚胚胎之血管系統 (C1) 果蠅卵外殼 (C2) 發育中果蠅胚胎。

### 1. 線蟲

線蟲是目前最小的模式生物，尤其是在神經科學領域最受重視。線蟲全身總共有 302 顆神經細胞，七千個連結，在 2019 完成世界第一個神經網路被完全解構的生物。利用神經網路體被解構的優點，科學家已經可以在活體上任意的神經細胞表現具有可以反映鈣離子活性的螢光蛋白，再利用螢光顯微鏡，觀察活體線蟲在活動當中，神經活性的變化，再搭配觀察動物本身的及時活動，便可以解構出神經網路之間訊號傳遞與動物活動之間的直接關聯<sup>(5)</sup>。除此之外，層光顯微鏡經常被應用在觀察腺體或細胞在線蟲發育過程中，不同時間點大量細胞的三維的移動<sup>(6)</sup>。

### 2. 果蠅

果蠅的胚胎是目前世界上最常拿來被用在研究胚胎發育的模式動物。果蠅的受精卵會在很短的時間，分化出不同的細胞，其三維活體的細胞移動軌跡，在真利尼雅研究中心，飛利浦凱勒的實驗室被一覽無遺<sup>(7)</sup>。透過基因轉殖特定的螢光蛋白到生殖細胞上，果蠅胚胎在細胞分裂期間仍然在每一個新生成的細胞都帶有螢光，非常容易利用螢光顯微鏡直接觀察。果蠅模式生物利用從酵母菌引進的基因調控系統 Gal4 以及 UAS。Gal4 是一種轉錄因子，可以被接在任意的基因序列之後，而用來標定特定的果蠅細胞。當特定的細胞產生 Gal4 時，這些轉錄因子就會啟動在同一個細胞裡的上游基因序列 (upstream activator sequence, UAS)，進

而表現 UAS 後面所接的外來基因序列而產生特定蛋白，例如綠色螢光蛋白 (GFP) 就可以用來標定特定細胞，或是核糖核酸干擾 (RNAi) 就可以用來降低特定蛋白質在特定細胞的表現量。如果剛好研究者想要觀察兩種不同的細胞在同一個果蠅個體內的交互作用，也可以很容易的在不同的細胞標定不同的螢光蛋白，再利用層光顯微鏡做高速的影像擷取，便可以很容易的獲得完整的四維多色螢光影像<sup>(6, 8)</sup>。

### 3. 斑馬魚

斑馬魚的幼蟲通體透明，是最早被拿來利用層光顯微鏡觀察其發育過程的生物樣本。在 2020 年的 Nikon small world in motion 比賽中，第一名的參賽者就利用層光顯微鏡連續三天觀察同一隻活體斑馬魚胚胎的三維神經發育，非常令人讚嘆。真利尼雅實驗室飛利浦凱勒博士的研究團隊，除了前述利用多角度層光顯微鏡觀察果蠅胚胎發育，也用相同的技術，同時觀測斑馬魚幼體全腦的神經活性。他將能對鈣離子濃度變化產生相對應亮度變化的 GCaMP 蛋白表現在斑馬魚全腦的腦神經當中，並將幼體包裹在低融點的洋菜膠中，便可觀察到隨著時間推移，幼魚的全腦神經會針對不同的刺激產生相對應的活性變化<sup>(9)</sup>。

### 4. 鼠腦腫瘤

光學顯微鏡應用於活體影像，最大的挑戰就是不透明的樣品。昆蟲以及小型哺乳類的大腦因為有脂肪或是皮膚層，一般可見光的激發雷射光源因為瑞利散射的影響是非常難以達到樣品的深處，最多只能在表面一兩百微米的厚度激發螢光分子。但是，如果透過更換激發光源由可見光變為較長波長的紅外光，則可輕易的增加光線的穿透深度，這也是普遍雙光子顯微鏡的工作原理。在 2019 年，史丹佛大學戴宏傑博士的團隊，打造出特殊的螢光分子，再利用單鏡頭暨超長波長之遠紅外光雙光子層光顯微鏡，觀察到沒有去除腦皮的鼠腦上，觀察接近一釐米深度的腫瘤血管，並且記錄超高時間解析度的腫瘤血管的動態變化。該團隊也同時利用組織透明化的方法，搭配層光顯微鏡的造影，來取得鼠腦腫瘤的大範圍影像。我們將在下一個段落深入探討這個做法的優勢<sup>(10)</sup>。

## 三、組織透明化與結構性影像

如果生物體本身就是透明的，那無論是結構性的影像或是活體影像，都可以很容易地利用層光顯微鏡做觀察。然而，如果生物體本身不是透明的，激發光層就沒有辦法有效地深入樣品當中，當然也就只能觀測生物體非常表面的螢光訊號。但在結構性的研究當中，因為不需要維持生物樣品的活性，就可以對樣品做一些手腳，例如把樣品變透明就是一個很好的方法，因為既不會傷害到樣品本身的三維結構，也能利用層光顯微鏡輕易地取得大體積的圖像。非脫水性的組織澄清方法起源於大約二十年前，清華大學的江安世院士首先發表了一個名為 FocusClear 的組織澄清液<sup>(11)</sup>，能夠在數秒內，將原本不透明的果蠅腦變為完全澄清透明，並且完全不影響果蠅腦原本的結構。這樣的技術與概念在最近的 10 年間被多方的應用，許多新的技術也隨之被發展出來。其中最著名的就是在卡爾、岱瑟羅斯實驗室所發表的 Clarity 技術<sup>(12)</sup>。因為 FocusClear 直接浸泡並沒有辦法澄清較大的組織如公分級的鼠腦，Clarity 技術即是藉由去除鼠腦中的脂質，再將去脂過後的鼠腦泡入 FocusClear 或相類似的

澄清溶液內，便可以達到幾乎完全透明的全鼠腦。過去想要取得澄清後的小動物腦如果蠅、斑馬魚的結構性影像，因為體積較小，又沒有時間解析度的要求，可以輕易地使用共軛焦顯微鏡獲取完整的高解析度三維影像。但隨著公分級組織透明化的發展，如果持續利用點掃描的方式擷取影像，一個樣品可能會需要耗費數月才能完成掃描。而層光顯微鏡非常適合此類透明化的大型樣品掃描。要快速掃描大型樣品，時常需要仰賴低倍率、大視野範圍的物鏡。但此類的物鏡過去搭配掃描式顯微鏡最大的缺點就是過低的數值孔徑 (numerical aperture)，以及過厚的聚焦層，導致取像時的縱軸解析度過低。由於層光顯微鏡系統的縱軸解析度是拍攝物鏡 (detection objective) 的景深與光層厚度的卷積 (convolution) 品，只要能確認光層厚度夠薄，就可以在維持縱軸解析度的情況下，用低倍率的鏡頭獲得大範圍掃描的優勢。這樣的優點，讓目前全鼠腦具有細胞解析度的影像，利用層光顯微鏡來拍攝的時間長度，可以縮短到一小時之內完成。這也讓這個新的生物樣品研究模式，在最近一兩年開始得到相當大的重視<sup>(13)</sup>。

## 1. 鼠

齧齒類可謂是目前所有模式生物中，全世界最多實驗室使用的動物，包括小鼠、大鼠、天竺鼠等。而小鼠也有非常多基因工具可供選擇。相較於果蠅與斑馬魚的保種相對困難，需要靠不斷地活體飼養，哺乳類動物的卵因為可以冷凍，美國的傑克森實驗室目前就保存了幾乎是全世界最大量的種源，各國的科學家也可以輕易地引進帶有不同基因序列的鼠類，進而對特定細胞、基因做功能性的調控，例如在特定神經標定綠色螢光蛋白，或是剔除肥胖基因等等。而因為前述的層光顯微鏡與全器官澄清化與染色技術的興起與普及，有許多實驗室目前正大規模的利用這樣的技術，研究如疾病模式的老鼠，多巴胺神經在全腦分布的走勢或細胞數量因為服用藥物而造成的改變等等。這些過去只能利用薄切片完成的分析，現在利用這樣器官層級的高解析光學造影技術，搭配發展已久的小鼠模式生物，必定能解開過去因為只看到小部分樣品而無法解開的謎團 (圖 4)。

## 2. 猩猩與人

靈長類可以說是與人類最接近的模式生物。許多在人身上有的特殊行為例如認識鏡中的自己，或是學習複雜的工具使用技巧，都只能在靈長類身上看到類似的行為。過去在飼養實驗猩猩的過程中，最為人詬病的便是基因背景 (genetic background) 的複雜性。無論是小鼠、果蠅、斑馬魚等小型模式生物，在研究過程中都會利用克隆 (clone) 方法產生相同的基因背景種源，以降低不同基因背景造成天生個體上的差異過大。因此，普慕明博士帶領的團隊在前年開始進行一項猴子的克隆，也成功培育出幾隊具有完全相同基因背景的猴子子代，並以積極投入藥物篩檢等重要的預臨床試驗流程<sup>(14)</sup>。而在今年，畢國強團隊成功的將整個猴腦，甚至整個人腦都做了透明化以及用層光顯微鏡做了拍照。這樣的研究結果，也讓顯微術與過去的功能性核磁共振造影技術 (functional MRI) 有相當大的機會直接接軌，科學家便可在動物活體的時候，用功能性核磁共振造影技術長時間追蹤動物大腦的活動，而在動物犧牲後，再利用高解析度的螢光影像取得細胞層級的全腦影像，反推在活體期間特定細胞的變化等等，都是以前無法想像的研究模式。

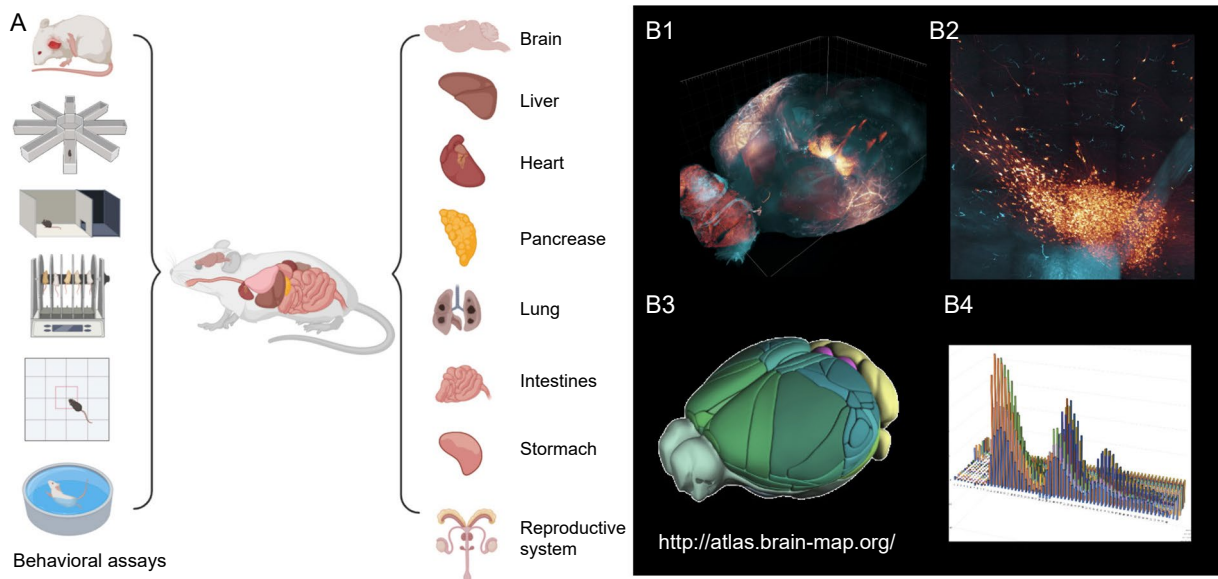


圖 4. 小鼠模式動物研究方法。(A) 科學家會利用不同的行為學測試方法，嘗試理解在不同基因組合、不同外在刺激、不同疾病模式，或是不同年齡、性別的老鼠，在外顯行為上的差異。得到實驗組與控制組的資料之後，接下來便可以針對不同研究取下不同的器官，搭配不同組織的透明化方法以及層光顯微鏡拍攝，得到超高解析度的分子影像。(B) 例如全鼠腦的影像已經可以廣泛地利用在許多與大腦相關的疾病或分子機轉研究上。(B1) 全腦層光顯微影像、(B2) 橘色為腦中部分的多巴胺細胞、(B3) 艾倫研究所提供的標準鼠腦分區模型 (B4) 科學家可藉由影像分析，直接獲得不同腦區的細胞數量、神經密度、細胞大小等許多量化的資料 (示意圖)。

#### 四、結論

層光顯微鏡搭配不同的基因轉殖工具，或組織透明化及高速染色的方法，已經逐漸要成為模式生物研究的主流工具之一。舉凡生物、醫學、化工、材料等等領域，只要需要使用模式動物作為其驗證工具，絕大多數都能得利於這樣新技術的普及。但是，伴隨著高速的影像擷取，大量的影像資料會被立刻傳至電腦。在 2019 年貝齊格博士與愛德華波登博士實驗室發表的，利用晶格層光顯微鏡掃描擴張樣品的論文中，他們影像擷取的速度來到每張圖 3 ms<sup>(15)</sup>，而完整的超解析果蠅腦檔案也來到 10 TB 的層級。過去雖然也有許多高速影像系統如高素攝影機，可以達到每秒數千甚至數萬幀數，但大多不會做長時間的拍攝。目前層光顯微鏡因廣泛的被利用在拍攝長時間活體影像，或拍攝超大型組織如人腦、猴腦，影像的產量已經逼近過去連續切片的電子顯微鏡，或是天文望遠鏡的範疇。例如前述在今年所發表的猩猩全腦完整掃描，檔案大小已經到來 750 TB 的層級。目前各個實驗室因為仍然缺乏好的資料分析模式，只能像軍備競賽一般把硬碟源源不絕的送進實驗室，但這些影像的分析以及未來這樣影像擷取模式的普及化，是這個領域最困難的地方，也是這個領域最急需人才的一環<sup>(13)</sup>。

## 誌謝

本文內容感謝清華大學江安世教授實驗室同仁、中研院陳壁彰實驗室同仁提供寶貴意見。

## 參考文獻

1. A. H. Voie, D. H. Burns, F. A. Spelman, *Journal of Microscopy*, 170, 229 (1993).
2. B. C. Chen et al., *Science*, **346**, 1257998 (2014).
3. L. Gao, W. C. Tang, Y. C. Tsai, B. C. Chen, *Optics Express*, **27**, 1497 (2019).
4. Y. Wan, K. McDole, P. J. Keller, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **35**, 655 (2019).
5. S. Kato et al., *Cell*, **163**, 656 (2015).
6. L. A. Royer et al., *Nature Biotechnology*, **34**, 1267 (2016).
7. R. Tomer, K. Khairy, F. Amat, P. J. Keller, *Nature Methods*, **9**, 755 (2012).
8. W. C. Lemon et al., *Nature Communications*, **6**, 7924 (2015).
9. N. Vladimirov et al., *Nature Methods*, **15**, 1117 (2018).
10. F. Wang et al., Light-sheet microscopy in the near-infrared II window. *Nature Methods* **16**, 545 (2019).
11. A. S. Chiang et al., *Journal of Comparative Neurology*, **440**, 1 (2001).
12. Kwanghun Chung, Karl Deisseroth, *Nature Methods*, **10**, 508 (2013).
13. H. R. Ueda et al., *Nature Reviews Neuroscience* **21**, 61 (2020).
14. D. Cyranoski, *Nature*, **566**, 15 (2019).
15. R. Gao et al., *Science*, **363**, (2019).

## 作者簡介

朱麗安博士為國立清華大學生物科技研究所博士，現為國立清華大學生醫工程與環境科學系助理教授。

Li-An Chu received her Ph.D. in Institute of Biotechnology from National Tsing Hua University. She is currently an assistant professor in Department of Biomedical Engineering and Environmental Science at National Tsing Hua University.

張煒堃博士為國立中央大學光電科學與工程所博士，現為國立清華大學腦科中心博士後研究員。

Wei-Kun Chang received his Ph.D. in Department of Optics and Photonics from National Central University. He is currently a postdoctoral fellow in Brain Research Center at National Tsing Hua University.