

共軛焦雷射掃描顯微鏡技術

共軛焦顯微鏡最重要的功能為去除雜訊，而讓我們能夠清楚的觀察到厚片樣本組織內部螢光物體的顯微構造影像。在一般的光學顯微鏡由樣本組織非焦面所發散的訊息，會干擾真正焦點訊息的偵測，而使所得的影像模糊。共軛焦顯微鏡在 PMT (photomultiplier tube) 偵測器前，具有一針孔 (pinhole diaphragm) 裝置，可濾除樣本中非焦點部分所發散之雜訊，僅允許清楚的焦面影像通過，使其可對厚片樣本組織進行不同深度的光學截面掃描，而這些沿 Z 軸方向所紀錄下來的數個連續光學截面資訊則被紀錄成為一個影像資料組，可以進行各種三度空間上的立體結構重組或是定量上的分析。另外，共軛焦顯微技術除了用於會發散螢光的組織，也可用於其他會反射光線的樣本上，並且可與傳統光學顯微鏡中各種增強對比的方法相互合用。這樣的技術提供了研究細胞及組織內各種結構和功能上的突破，已成為現代生命科學研究領域中不可或缺的工具。

江安世

一、前言

近幾年來共軛焦雷射掃描顯微鏡已成為廣泛被使用的研究工具，其主要是應用於生物醫學上，研究一些會發散螢光的樣本以及生物的細胞或組織結構。除了螢光影像，共軛焦顯微鏡也可產生如傳統光學顯微鏡般的穿透式影像 (如相位差顯微影像)，且可將兩種影像合併以不同顏色呈現。另一個共軛焦顯微鏡的重要功能則為利用反射光的原理，來觀察具極性結構的樣本。因此共軛焦顯微鏡技術也普遍的用在材料科學上，或是運用在日常半導體迴路的品質管制上。

對於任何一位想要利用光學來觀察生物或非生

江安世先生為美國羅格斯大學博士，現任國立清華大學生命科學研究所教授。

物之平面或立體顯微結構的研究人員或學生，共軛焦雷射掃描顯微鏡將會是他最佳的選擇。共軛焦雷射掃描顯微鏡以高於傳統光學顯微鏡的解像力，不但可用於觀察物體表面，也可觀察活體組織的深部結構。以雷射為光源結合顯微鏡及電腦影像的分析技術，共軛焦雷射掃描顯微術不但提高了顯微影像的解析度，並可將連續光學截面的影像資料組重組為三度空間的立體影像。此一立體影像重組技術，可用於觀察並定量細胞內之各項結構、分子及離子之立體分布與瞬間變化，也可用於觀察組織內的細胞、血管及神經網路等之立體結構。這方面的技術在最近十年內快速的發展，並已廣泛的應用於細胞生物、神經生物、分子生物、生理學、免疫學、訊號生物及發育生物等學門之研究。在生命科學的領域當中，共軛焦顯微鏡被認為是自電子顯微鏡發明以來，研究細胞結構及功能最重要的必備儀器。近

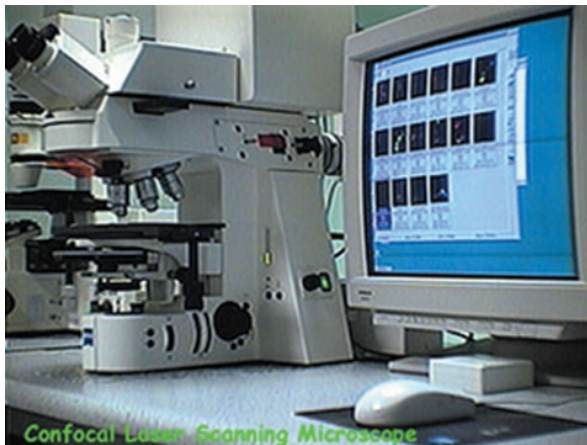


圖 1. 共軛焦顯微鏡 (Zeiss LSM 510) 之儀器設備。共軛焦顯微鏡工作站是由具調節雷射光源之掃描器、全自動螢光顯微鏡與高解析影像記錄電腦系統共同組成。清華大學生命科學系腦神經分子圖譜實驗室 (<http://www.life.nthu.edu>) 提供。

年來，更由於其高解析及樣品可免處理的特性，又被應用在電腦晶片及生物晶片的觀察與分析研究。以下即簡要的敘述共軛焦雷射掃描顯微鏡技術的基本原理以及其在生命科學研究上的應用。

二、基本原理

為了要得到高解析度的影像，共軛焦顯微鏡工作站是由雷射光源、全自動螢光顯微鏡與精密的電腦軟、硬體所共同組成 (圖 1)。突破了傳統式顯微鏡需要平均光照的原理，共軛焦顯微鏡是利用單點的光線 (雷射光) 為光源，經過一個高解析度的物鏡後，激發樣本組織內部所欲平面上的單一焦點，且幾乎不會產生光線繞射模糊影像的現象。但是，因為非焦面所產生的光線或是螢光樣本發散出的螢光，也會影響到焦平面的光子，進而使我們得到一對比不強且較模糊的影像。因此如何防止焦平面外傳回的影像，而只收集到自焦點上傳回的光子資訊，就變成最重要的事情了。在高解析度物鏡的焦點上，直接反射的光線或是螢光分子所產生的光線會經由此物鏡及一連串的鏡片被投射到一個極小的針孔 (pinhole diaphragm) 裝置上 (圖 2)，在樣本中的這個焦點和針孔裝置的相互配合，可以讓偵測器

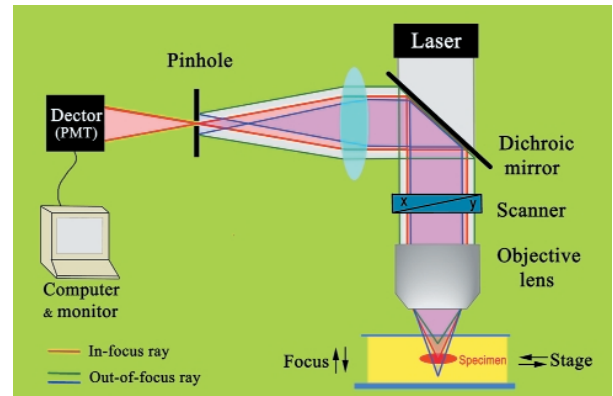


圖 2. 共軛焦顯微鏡之原理。共軛焦顯微鏡可藉由去除非焦面所產生的雜訊，以取得在樣本中不同深度之高解析度顯微影像。其主要原理可分為三個步驟來說說明：首先雷射光線可以經由物鏡聚焦成單一的光點，來照射樣品單點的特定深度；另外，由焦點反射或發散的光線還可經由物鏡聚焦成單一的光束，完全通過影像偵測器前的針孔 (pinhole aperture)；最後，其他在焦點之上及之下非焦點所產生的雜訊光子則在此針孔周圍被阻擋下來，因而確保偵測器獲取焦面訊號的準確性，進而達到所欲之不同深度高解析度的顯微影像。

得到一個相對應於樣本的共軛影像光點，這就是共軛焦顯微鏡的名稱由來。這樣的針孔裝置最重要的優點在於，它可以濾除絕大部分投射在針孔外圍的雜訊，而讓其後的偵測器只收集到單一焦點所傳回的光子資訊。因此針孔越小，便能去掉越多的雜訊，而得到專一且清晰的顯微影像了。

比較共軛焦顯微鏡與傳統式的顯微鏡，前者明顯的具有較多的優點：在傳統式的螢光顯微鏡中，若要觀察厚片生物組織 Z 軸方向的影像，僅能侷限的觀察到所使用物鏡景深之內的有限焦面範圍，超出了這個範圍，非焦面的光線將會嚴重的影響焦面的光線，致使對比消弱與影像模糊，若觀察的樣本同時會散發多種螢光，則欲得的各種單一螢光的影像都將混雜有其他光譜螢光的雜訊 (圖 3 上)；而共軛焦顯微鏡則是專對這些厚片螢光樣本 (如生物細胞組織) 所設計的，它的光學截面之功能可以大

幅減低傳統顯微鏡所無法去除的非焦面性雜訊，在多重螢光的樣本上，也能確切的分開不同光譜範圍的螢光訊息，而得到多重螢光厚片組織之不同深度的清晰顯微影像（圖 3 下）。除此之外，共軛焦顯微鏡還可達到傳統顯微鏡所不及之高解析度影像，但是必須特別注意樣本的製備、顯微影像的紀錄及影像的處理三大要點。

三、樣本之製備

沒有好的螢光樣本，共軛焦顯微鏡不可能產生高解析的影像。在準備共軛焦顯微鏡所使用的樣本時，必須要先確定在處理的過程中，如固定或包埋的步驟上，樣本整體三維結構之完整性。我們可以藉由比較固定完全之後的樣本與未經固定步驟的活體樣本來確認這項顧慮，但若樣本自身不具螢光特性，則可以螢光染劑標示以方便比較。舉例來說，NBD-C₆-ceramide 即為一方便使用的螢光染色劑，對細胞膜具有專一性，並具有活體染色的特性。因此，未經固定步驟仍可以此螢光染劑標定活的細胞，便可與固定完全且亦標定細胞膜構造的死細胞樣本相比較。將處理好的上述兩種樣本分別包埋在生理食鹽水 (PBS) 中，藉由比較相互間如樣本高度或型態上是否存有差異，便可確認樣本的固定過程是否適當。

一般來說，在完整保存樣本三維結構的方面，glutaraldehyde 是一個較佳選擇的固定劑，但是這種固定劑會使許多樣本產生自體螢光且降低樣本的抗原性，因此在一些螢光性或是免疫染色處理等的樣本上並不適用。另一方面，paraformaldehyde 因為不會產生自體螢光的問題且較能保存樣本的抗原性之故，也成為一常用的固定劑，但是其會造成樣本三維結構上的扭曲、破壞膜狀結構使細胞膜穿孔等的缺失，也是不可忽略的事實。為了解決這個問題，我們發現：只要事先以微波的方式，將置於生理食鹽水中之樣本組織稍微固定，再將樣本浸入 paraformaldehyde 中進行傳統式的固定，即能同時保存良好的樣本三維結構，並解決自體螢光以及樣本抗原性降低的問題。

另外，樣本的包埋也是一項影響樣本三維結構

完整性的重要因素。蓋玻片是否會壓迫所包埋的樣本，或是包埋液中的化學性質都可能會造成樣本型態上的扭曲變形。為了避免厚片組織樣本被蓋玻片擠壓，最好能在載玻片下架上小片的蓋玻片或是塗上指甲油，來撐高蓋玻片與載玻片之間的包埋間距。我們的方法是使用圓環形的加強圈來達到這個目的，而在包埋好樣本之後，建議使用不具自體螢光的指甲油來進行封片。

包埋液的選擇也是一門大學問，適當的包埋劑不但可以有助於樣本三維結構的完整性，一些特定的添加劑還可減緩樣本螢光物質的衰減，但一些如含有 polyvinyl alcohol 的包埋劑，則已證實會導致樣本的萎縮和變形。在這一方面，建議使用以生理食鹽水 (PBS) 調配的 30 - 50% 的甘油來當包埋劑，一些具減緩螢光衰減的化學物質也可另外加入，這種包埋劑可以保存樣本的外觀型態以達到我們的需求。其缺點則為澄清透明度不足。

其他製備樣本的小秘訣：

- (1) 標定物要染上正確的螢光，使雷射光可以有效的激發出強烈螢光。
- (2) 螢光染色需要有專一性，且整個背景訊號降到最低，以增加正確訊號和雜訊的比值。
- (3) 當進行多重標記時，選擇激發和放射光重疊最少的螢光是很重要的。
- (4) 當標定物很小時，應考慮以化學方法將訊號放大，以增加正確訊號和雜訊的比值。
- (5) 組織需要經由澄清以增加透明度。

四、共軛焦顯微鏡掃描和影像紀錄

1. 單一頻道的二維影像

從共軛焦顯微鏡的對焦平面製造一個完整的二維影像資訊有三個步驟：

- (1) 樣本在 XY 平面上是經由雷射光藉由 X 和 Y 方向兩個不同的鏡面交互掃描，一條線一條線的掃描所組成。
- (2) 以每一個 pixel 為單位，利用 PMT 偵測放射的螢光強度。
- (3) 將 PMT 的電子訊號數位化，一個 pixel 一個 pixel 從數位化記憶體中收集輸出到顯示器上。

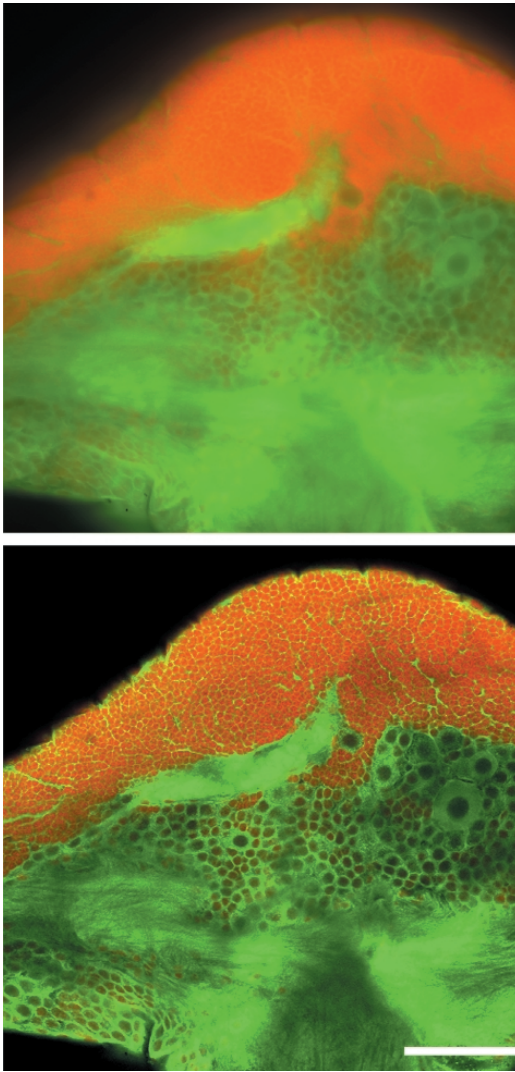


圖 3. 昆蟲腦部雙重染色之傳統螢光顯微鏡影像 (上圖) 與共軛焦顯微鏡影像 (下圖) 圖。紅色部分為以對去氧核糖核酸 (DNA) 專一的染劑 (propidium iodide) 所標定之細胞核；綠色部分則為以對細胞膜專一的染劑 (NBD-ceramide) 所標示之細胞質區域。在傳統螢光顯微鏡影像中，不但非焦面所產生的雜訊會削弱焦面所傳回的訊息，而且不同的染色訊息間亦會互相干擾，而使得影像資訊模糊不清，細部構造更多為兩種染色的混合結果；反之，在共軛焦顯微鏡影像中，組織的細部染色結構均可被清晰的辨別，並且所得的影像在對比和解析度上均有很明顯的改善。比例尺為 100 微毫米。

2. 多頻道的二維影像

共軛焦顯微鏡影像的形成原理，是由於 PMT 偵測器內收集到的光子，產生數位電流波動所產生的。這樣所產生的電流是沒有顏色的，因此需藉由紀錄器來將其轉換為黑白灰階的影像資料。但由於傳統的螢光顯微鏡即可分別擁有多種不同顏色的影像，各種不同的細胞內的胞器或其他物質都可藉由不同顏色的螢光分子標定，進而可以研究不同物質之間的相互關係，因此現今的共軛焦顯微鏡通常亦具有多頻道偵測多重資料組分析的功能設備 (目前可同時擁有多達四套紀錄螢光光子的資料組，及一套穿透光光子的資料組)。目前的共軛焦顯微鏡可藉由不同偵測器內的感測器 (sensor) 區分出不同螢光染劑所被激發傳回的光子資訊，因此不同資料組的灰階影像可以同時被完整的紀錄下來，這些影像可以並列的方式顯現出來，讓我們可以觀察並分析細胞內不同分子的交互作用或是特殊蛋白質在細胞內的分布，這種並排顯示多重灰階資料組的方式，不但可以將不同螢光分子顯示的細部影像都更清楚的表現出來，並且也可較清楚的觀察其相互之間分布差異與關係 (圖 4，上三圖)。

另一個顯示這些不同資料組的方法為，將紀錄不同螢光分子之不同灰階資料組，分別轉換成預設的不同顏色的顏色深淺資料組，若只使用二或三個資料組時，系統將仍可表現出最佳的影像強弱差異，這種表現方法的優點為：每一個顏色都代表了一種單獨的螢光資料組，而可在一個影像中同時顯示所紀錄的不同資料資訊 (圖 4，下)。

3. 多頻道三維影像的記錄

另外一個共軛焦顯微鏡獨特的地方是：它提供了重組三度空間顯微影像的功能。在一個單一的光學截面上，共軛焦顯微鏡能夠讓偵測器只偵測到自焦點散發並通過針孔而產生的光線，而除去其他非焦點所發散的干擾雜訊。因之，只要光線被樣本吸收的程度不高並且不超過物鏡的工作距離，便可以轉動顯微鏡對焦調節輪，來觀察到垂直方向任何深度的樣本結構。接下來，只要讓顯微鏡可以自動的從設定的樣本 Z 軸起始位置，由微馬達帶動著，依照預設之間隔距離，一片片光學截面的掃描紀

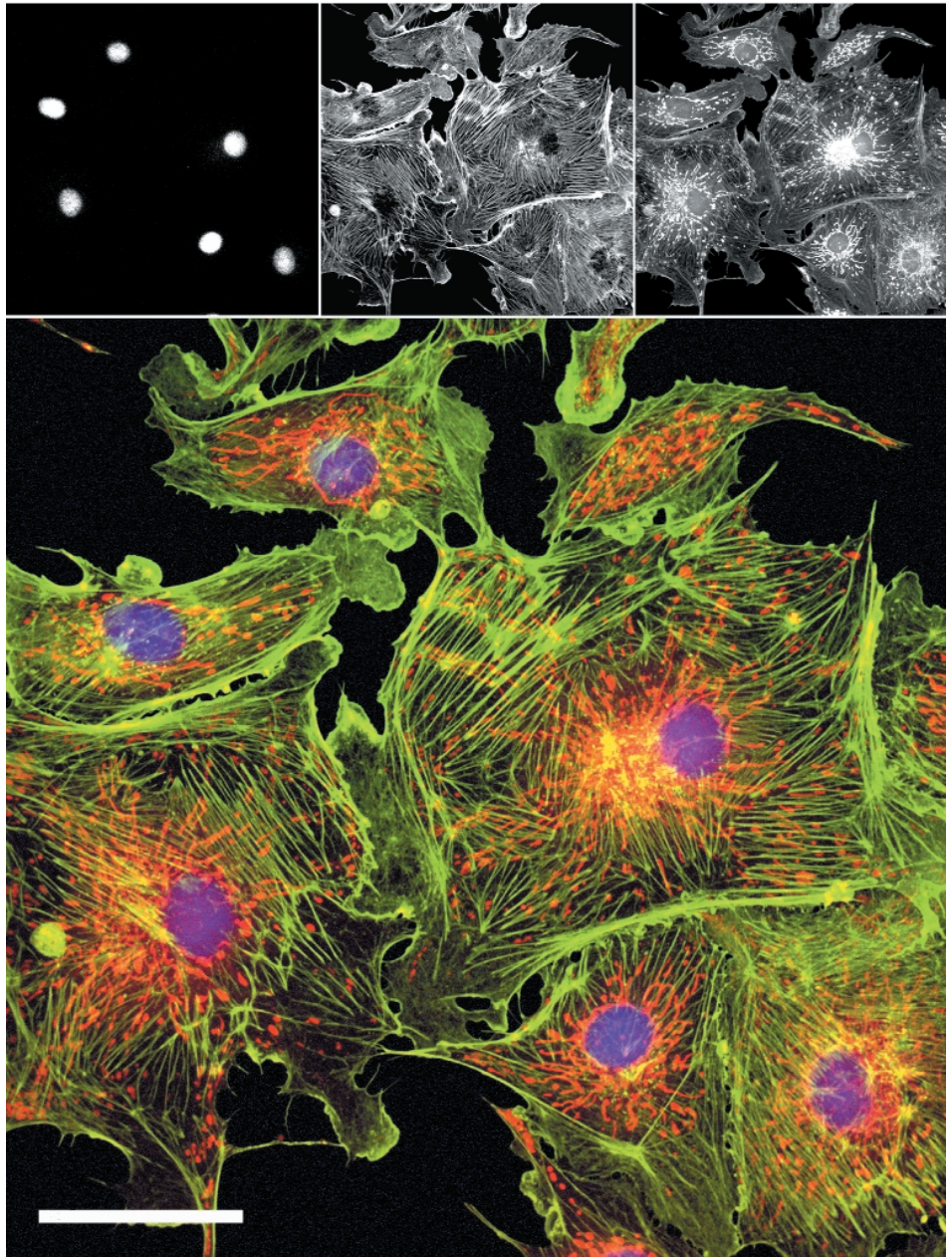


圖 4.
同時觀察三種螢光染色。纖維母細胞中層之共軛焦顯微光學切片影像顯示細胞核（藍色）、肌動蛋白纖維（綠色）及粒腺體（紅色）在細胞中之分佈情形。左上圖為以對去氧核糖核酸（DNA）專一的染劑（DAPI）所標定之細胞核；中上圖為由 Oregon Green 488 phalloidin 所標示之肌動蛋白纖維；右上圖為由 MitoTracker Red 所標示之粒腺體；下圖為電腦合併上述三種不同染色資料組所重組之高解析度（ $2048 \times 2048 \text{ dpi} \times 3$ ）影像圖。比例尺為 50 微毫米。

錄，至樣本 Z 軸的終止位置即可（圖 5）。需要特別注意的是，所設定的掃描間距必須小於光學截面一半的厚度，如此才不會漏失應得的影像資訊，而使影像變得不連續。這樣由連續掃描，自樣本表面至底部的一連串光學截面資訊資料組，便可由電腦儲存起來，這些資料便包含了樣本的所有三度空間的影像資訊。

4. 高解析度共軛焦顯微鏡影像的小秘訣

- (1) 用最小需求的雷射光能量避免光漂白。
- (2) 設定顯微鏡、濾片、鏡頭和屏蔽的途徑使得大量的光能通透並被偵測到。
- (3) 利用高數值光圈的鏡頭盡可能的提高解析度。
- (4) 考慮使用高數值光圈的水鏡，盡量減少球面像差。

- (5) 避免兩種不同螢光的相互干擾。
- (6) 針孔偵測獲得的像素大小需要適當。

五、影像處理

許多影像處理軟體可以藉由灰階的調整或亮度和對比的改善來增加影像的清晰度，或利用主要的標示影像減去背景影像有助於雜訊的消除。影像組的相加、相減、影像的比值、影像的過濾、影像相互的關係、影像的編輯、擷取、去模糊以及各種不同的影像處理，也可以經由更複雜的電腦軟體來處理。國家高速電腦中心鑑於電腦輔助生物顯微影像分析的快速發展，已於今年成立國家生物顯微影像中心伺服網站，引進一套高階 3D 顯微影像分析軟體 - IMARIS，提供國內相關研究工作人員高品質的電腦計算資源，進行生物影像的分析處理。該軟體備有分析及定量測量共軛焦顯微鏡 3D 影像的種

種功能，配合國家高速電腦中心的計算資源對於相關學術領域的發展極有幫助（相關功能及使用辦法請參考網址 <http://www.nchc.gov.tw/service/id.html>）。

六、立體影像合成

影像處理軟體可以收集像素重組成一個三維立體的顯微結構，同時也可以經由簡單的處理這些像素使得影像可以做三度空間的旋轉，可以從任何一個角度觀看影像。還有幾種不同呈現三度空間的方法可以從共軛焦影像資料組中處理得到。

1. 迴廊式的展示

如果將整個影像組一片接著一片的展開來，那麼整個 3D 的影像資訊可從中獲得。在這個呈現方式中，二維的影像資訊以單一的影像呈現，而三度空間的影像必須涵蓋所有這些順序排列的單一影

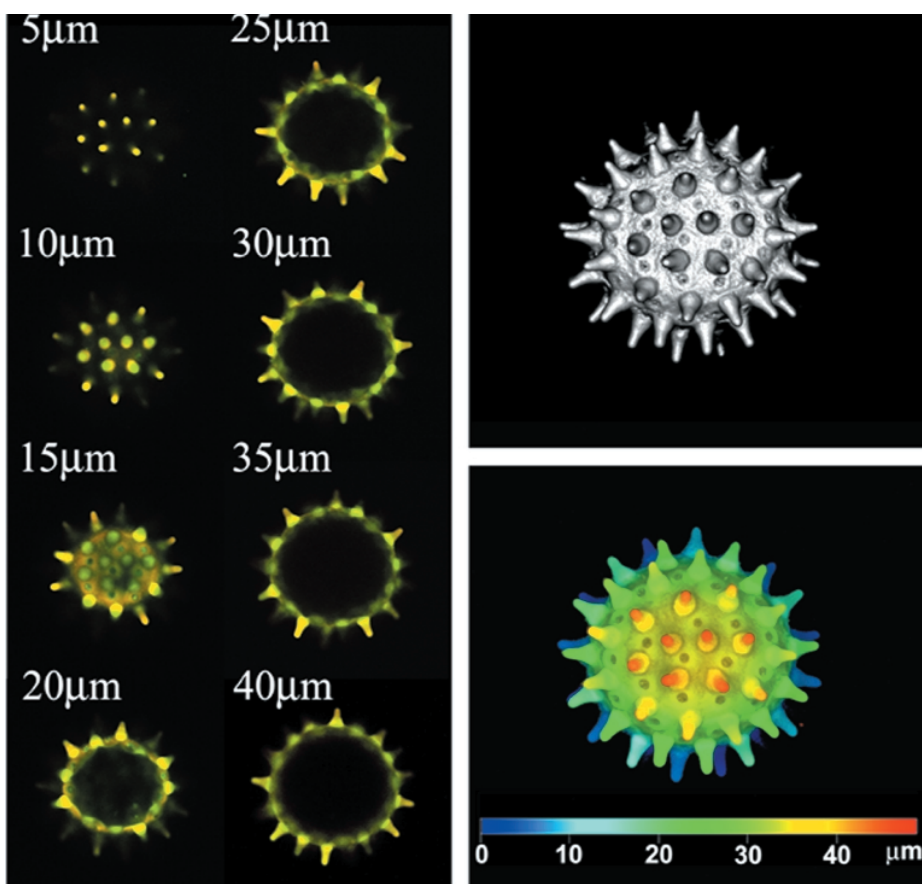


圖 5. 朱槿花粉之三度空間立體影像重組圖。左排圖為花粉表面到中間不同深度，以 5 微米為間距之共軛焦顯微光學切片圖；右上圖為由之左排圖共軛焦顯微光學切片資料組所重組之直徑約 0.5 公釐的花粉表面立體影像圖；右下圖為同一組資料以不同顏色代表距表面不同深度之花粉表面立體影像重組圖。

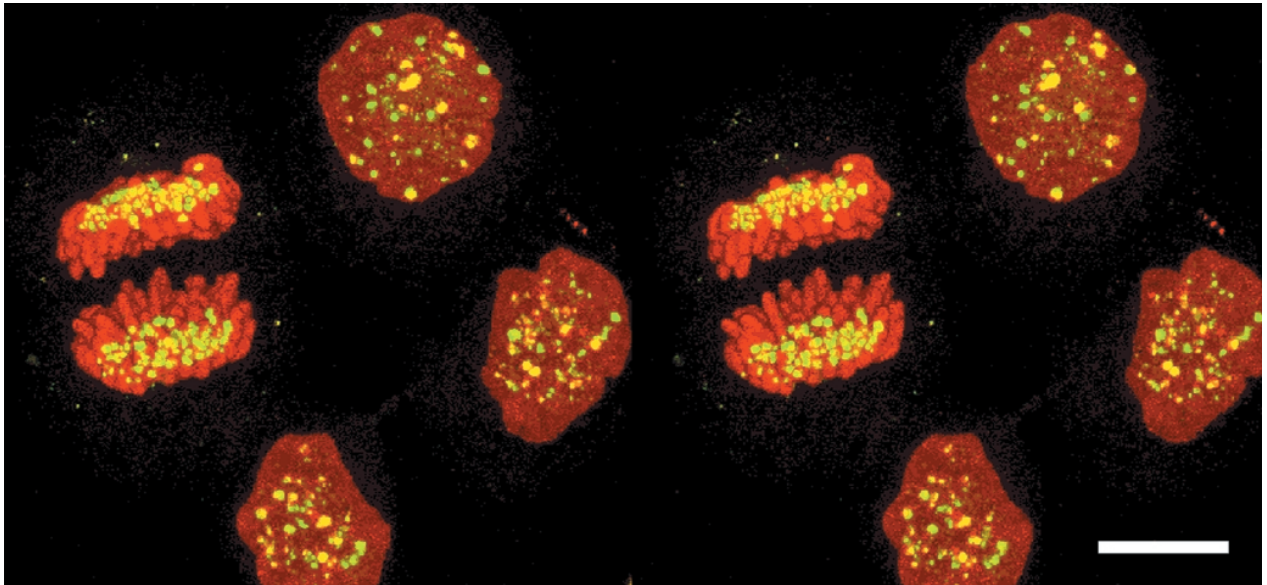


圖 6. 人體細胞染色體 (chromosome) 及著絲點 (kinetochore) 的三度空間共定位 (colocalization) 立體影像分析圖。染色體 (紅色) 上中心粒 (centromere) 與著絲點 (綠色) 之間的黏連在細胞有絲分裂 (mitosis) 或分裂間期 (interphase) 時都可以被觀察到。兩眼直視，可將左右兩個影像合併成為一個三維的影像。比例尺為 10 微毫米。

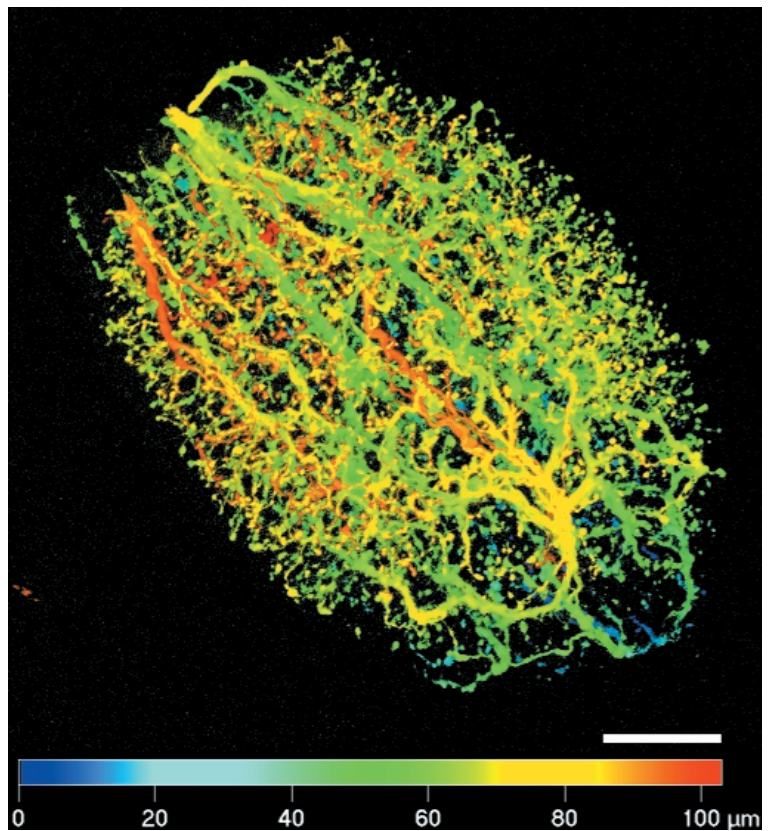


圖 7. 昆蟲腦部神經細胞與其內分泌系統咽側腺 (corpus allatum) 相接觸的突觸之三維立體影像重組圖，以不同顏色代表距表面不同深度。具有腦神經物質 allatostatin 之神經細胞末端影像，可利用免疫螢光染色的方式，以共軛焦顯微鏡掃描與記錄下來。比例尺為 50 微毫米。

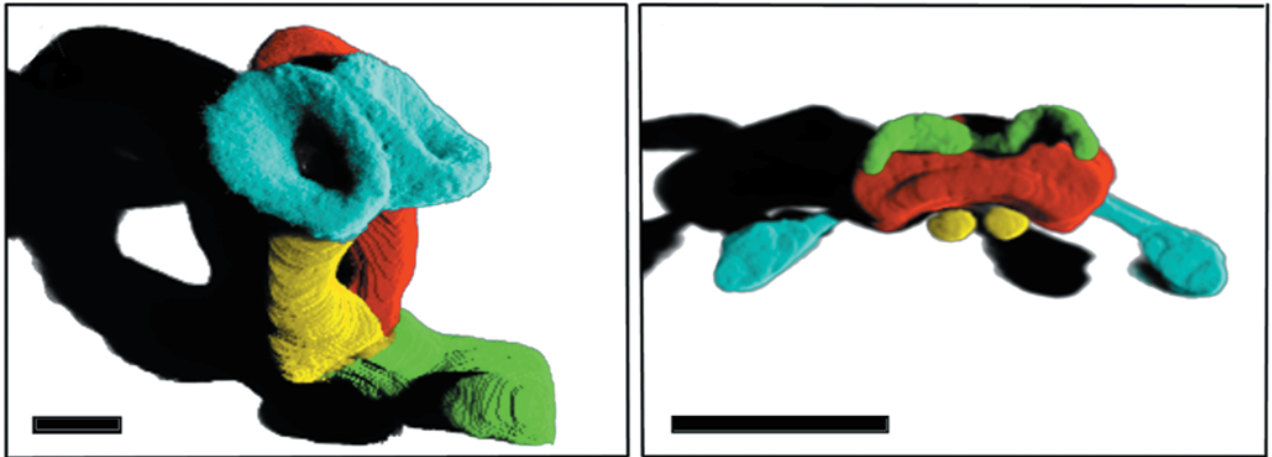


圖 8. 昆蟲腦內蕈狀體 (mushroom body) (左圖) 與中心體 (central complex) (右圖)。以共軛焦顯微鏡掃描並立體影像重組後，將虛擬的光源置於結構體的左前方照射，產生右後方的陰影以突顯其立體效果。比例尺為 100 微米。

像。在 Z 軸方向的每一個影像可以單一影像呈現 (圖 5, 左), 亦可選擇性的從原始資料中選擇部分影像重組。

2. 深度投射圖

假設從影像資料組壓縮所有的光學截面，將可以計算出一個全新的單一影像。這樣一個簡單的計算例子稱之為最大亮點的投影。每一個影像都是來自 Z 軸在不同截面中最亮的灰階值。這些影像中最亮值的位置被紀錄下來，所以一個從最表面到最底部對焦準確的影像就被呈現出來了 (圖 5)。

3. 立體影像

兩個相差小角度 (通常 6 - 8 度) 的投射圖相鄰的放在一起可呈現一對立體的影像 (圖 6)。觀看者必須將這兩個影像對焦在一起而形成一個 3D 影像。這個方法使我們得到一個多顏色的影像，但是眼睛必須能夠同時分別對焦兩個影像才能看出立體效果。有些人無法做到這一點，因此也可以將兩個影像分離為紅色和綠色互相重疊而形成一個 3D 影像。此時只要利用分別由紅色和綠色作成的紅綠眼鏡即可看到 3D 立體影像。這種影像不用眼睛特殊的對焦，不過只能呈現一種顏色。

4. 利用顏色標示深淺度

假設不同的光學截面用不同的顏色表現，則不同對焦深度的影像重組亦可表示出三維的影像。有顏色的標示條提供了不同顏色所代表的不同深度 (圖 5, 右下; 圖 7)。當然，這種表示方式只能用在染有一種顏色的樣本上。

5. 表面和體積的描繪

利用一個較複雜的步驟，例如將灰階加強或去除，可以使我們有興趣的主題的表面或體積重新的決定或描繪 (圖 5, 右上)。被重新決定或描繪的影像中圈選區域其 pixel 和 voxel 可以被定量出來，亦可以利用 IMARIS 的軟體製作一個有影子的 3D 影像 (Bitplane, Zurich) (圖 8)。

七、結論及未來發展

近年來，在樣本的製備、顯微鏡的解析度以及影像處理軟體各方條件的提昇下，共軛焦顯微影像的品質及使用率也跟著大幅的提高。首先，因為高訊號 / 雜訊比值的螢光標示方法與厚片組織樣本的透明度的改善，不斷的加強了雷射激發厚片組織螢光物質所得到影像的品質。另外，在會發散螢光之活體的樣本上，如研究基因表現中最常用的具綠螢

光蛋白的生物組織裡，共軛焦顯微鏡已成為其檢測方法當中最常使用的標準工具。繼之，更高解析度之共軛焦顯微鏡也正在日以繼夜的研究當中，各種新的方法技術如多光子激發、合併共軛焦顯微影像和數位影像去模糊的方法及 4π 與 θ 共軛焦顯微鏡上的研發，可能會突破古典光學解析度的極限。為了要提高解析度，高 NA 值及更長工作間距的新物鏡也正進行改良中。最後，在電腦軟體方面，像是數位去模糊、自動圈選與不同三度空間資料組間的套用等軟體，也都朝向高速、便宜與使用方便的方向進行。在這些技術及軟、硬體的相互配

合下，我們相信共軛焦顯微鏡三度空間重組影像的功能，配合電腦虛擬實境或模擬細胞相互作用等，將會成為生命科學領域當中，不論是教學上或是研究方面的最佳利器。

參考文獻

1. 江安世, 科學月刊, **24** (1), 32 (1993).
2. M. Minsky, *Scanning*, **10**, 128 (1988).
3. B. J. R. Sheppard, *Confocal Laser Scanning Microscopy*, Oxon: Information Press Ltd, 106 (1997).
4. S. W. Paddock, *Confocal Microscopy: Methods and Protocols*, New Jersey: Humana Press, 446 (1999).