

單一細胞之單光子與雙光子自發螢光顯微光譜：阿拉伯芥的原生質體與 PC12 細胞

One- and Two- Photon Auto-Fluorescence Micro-Spectroscopy of A Single Cell: Protoplast of *Arabidopsis Thaliana* And PC12 Cells

郭合哲、高甫仁

He-Je Kuo, Fu-Jen Kao

螢光分析為生命科學領域中極為重要的工具。而雷射與顯微鏡的結合，已將螢光的激發與分析帶至一新的境界。本文介紹如何利用超快雷射的聚焦形成光阱，並同時以雙光子激發產生螢光，進而以光譜儀分析。因細胞之自發螢光往往可反映其內部之狀態，本文亦將介紹如何利用上述方法對阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 之原生質體與 PC12 系列之單一細胞的雙光子自發螢光進行顯微光譜分析，提供細胞研究之重要資訊。

Fluorescence analysis is an important tool in life science research. The employment of laser in optical microscopy has greatly facilitated the advance in fluorescence excitation and analysis. In this article, we introduce the use of ultrafast laser in simultaneously forming optical trap and generating two-photon excitation. Specifically single cells prepared from the protoplast of *Arabidopsis thaliana* and PC12 cell culture are used to demonstrate the application of auto-fluorescence in monitoring the cellular status.

一、前言

雷射與顯微鏡的結合在不同的學科領域已形成一極為重要的工具，例如共焦顯微鏡可用以擷取次微米解析度、栩栩如生之 3D 影像。藉由高數值孔

徑物鏡聚焦雷射光束亦可形成光鉗，在顯微鏡下操縱微米大小的物件。超快雷射的應用，更使得雙光子 (two-photon) 的激發成為可能，例如雙光子螢光激發、二倍頻與三倍頻產生等。雙光子激發之光譜量測和顯微術已成一用於研究細胞組織螢光特性的

制式方法⁽¹⁻³⁾。螢光法可使我們探知細胞的新陳代謝過程、螢光物質的濃度、細胞內的變化情形與交互作用，乃至分子或結構的物性^(4,5)。但在高強度的雷射激發之下，亦極易對樣品造成光漂白 (photobleaching) 與光破壞 (photodamaging)。如此造成之變化往往有賴光譜量測做進一步的分析。本文將介紹如何利用光纖耦合光譜儀，分析雷射激發下之自發螢光 (auto-fluorescence)，並藉以分析樣品的時序 (time-lapsed) 改變。在這篇文章中，我們所觀測的樣本主要為阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的原生質體與 PC12 細胞。

雙光子螢光的激發來自同時吸收兩個入射的近紅外光子 (NIR)，如此激發具有下述獨特的優點。舉例而言，近紅外光子不像 UV 光子般易引起光破壞。大幅降低的散射 (Rayleigh's law) 亦使近紅外光束具有較高的穿透能力，較長之波長亦能降低顯微成像的球面像差。除此之外，其 3D 定點激發的特性亦可消除不在聚焦面的光漂白與光破壞。此外，若利用活體樣本內之自發螢光則不需要外加螢光標示。

自發螢光是由細胞本身的螢光物質所產生，以往在螢光顯微術或生物晶片螢光標定等檢測中通常被視為背景雜訊⁽⁶⁾。在螢光相關的研究中，通常會

設計一些特別的方法來區隔自發螢光⁽⁷⁾。細胞內部的螢光物質，可在細胞、組織結構內或新陳代謝過程中發現，這些物質的螢光極可能反映結構或代謝的改變、功能狀態，乃至病變等^(8,9)。近來因高性能偵測器的發展，使低量子效率的自發螢光偵測有極顯著的進步。

在本文所述的研究中，光阱 (optical trapping) 效應亦可方便螢光光譜和影像的取得。光阱是利用高數值孔徑的物鏡聚焦雷射光束，並產生高梯度的光強場。如此產生之光場即可用以捕捉折射係數異於介質的微米大小物體⁽¹⁰⁾。超短脈衝近紅外雷射光束可同時捕捉細胞，並以雙光子效應激發被捕捉細胞的自發螢光。光阱之應用使細胞便於放置與控制，並標準化量測的條件。例如在活體病毒、細胞和次細胞器器的研究中，光阱已經成為一個強而有力的工具^(11,12)，並且極利與光譜儀結合⁽¹³⁾。

二、實驗架設

本文所述的量測方法考慮到非破壞與非侵入性，亦即基於細胞不會有效地吸收近紅外光，且脈衝雷射的平均功率極低。利用細胞內在的自發螢光，則可避免外加螢光標示。另一方面，在活體細

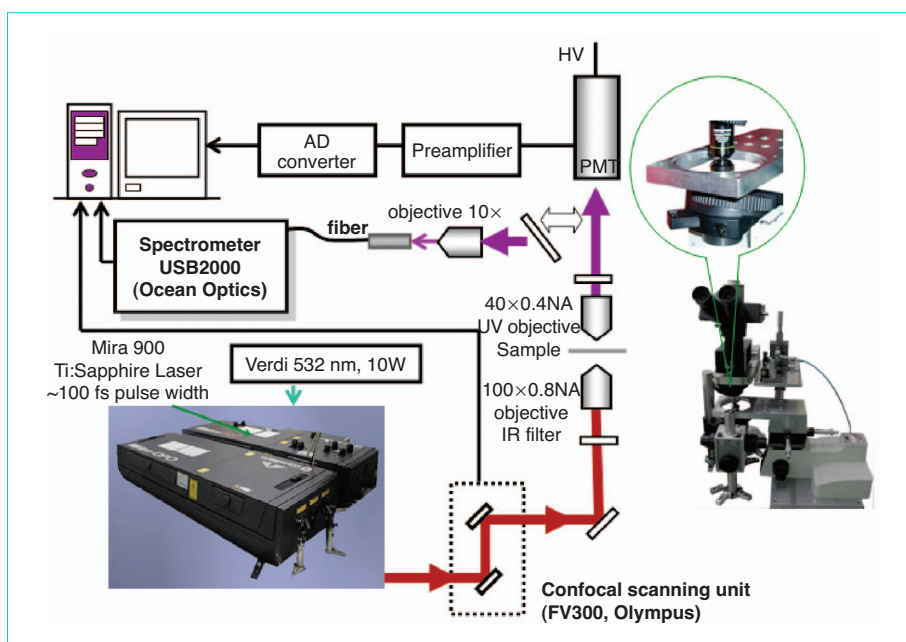
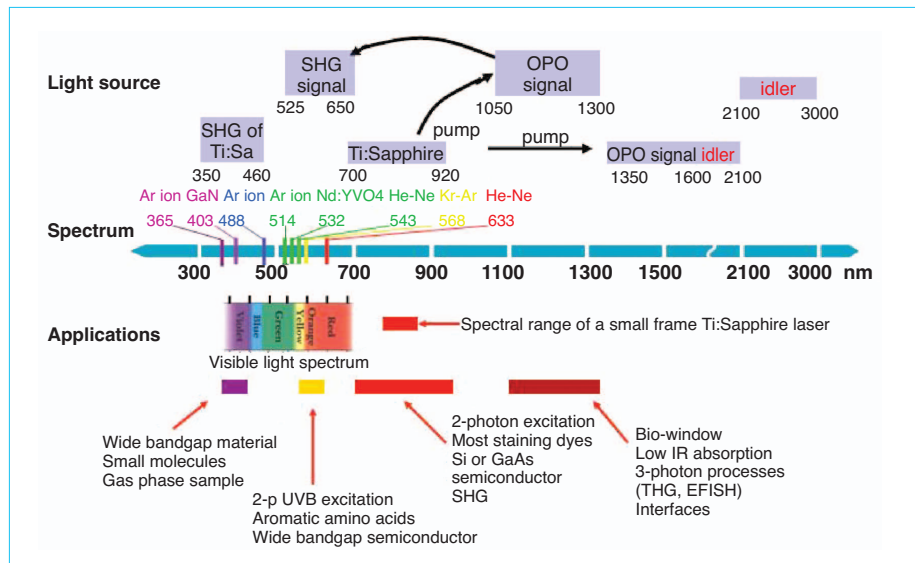


圖 1. 光阱、顯微光譜儀與顯微影像的實驗架設圖。這個架構的特點之一在於能迅速改變工作組態，如箭頭所示。

圖 2.
常用於單／多光子顯微術之雷射光譜分布圖。



胞中飛秒 (femtosecond, fs) 近紅外雷射亦可能引發熱和光致毒性 (phototoxicity)，而造成不利生物的改变^(12,14,15)，這包含無形、未立即可見的反應，如同先前的研究所報導^(13,16,17)。因此，所使用的雷射功率和觀察時程相當受限於光破壞的影響。許多不同的標準已用於測度光破壞的影響，如細胞生存能力、分裂活性和新陳代謝狀態的改变等^(16,18,19)。

如圖 1 所示，一套雷射掃描顯微光譜系統的架設包括 (1) 光源、(2) 掃描儀與耦合光學組件、(3) 顯微鏡主體、(4) 偵測器 (含光纖耦合裝置)。光源包括各式 CW 雷射，以行單光子激發，而鎖模 (mode-locked) 鈦藍寶石 (Ti:sapphire) 則為最常用之雙光子激發超快雷射，如圖 2 所示。鎖模鈦藍寶石雷射 (Mira-900, Coherent) 產生的脈衝約在 100 fs 左右，重複頻率一般約為 76–100 MHz，它是由一腔內倍頻的半導體激發固態雷射所幫浦，其輸出波長可調範圍在 700–920 nm 之間。掃描儀與耦合光學組件為掃描成像所不可或缺的關鍵系統組件。顯微鏡主體在單獨使用下，即為傳統之光學顯微鏡，與上述系統搭配則可形成雷射掃描顯微系統。光電倍增管 (photomultiplier tube) 為最廣泛使用的掃描成像偵測器。光纖耦合極利於連接光譜儀，進一步達成光譜分析的功能。低雜訊之 CCD 則為最常與光譜儀搭配使用之偵測器。

光阱的架設如圖 1 所示，夾於兩蓋玻片的細胞

樣品置於三維的移動平台之上。一高倍之物鏡 100×/0.80 將入射的雷射光束聚焦於樣品之上，以捕捉細胞並產生雙光子螢光的激發。另一同軸物鏡 40×/0.40 則架設於樣品的另一邊，以即時觀察樣品與偵測螢光。如此可在反射和透射的模式下，觀察並記錄捕捉的情況。螢光光譜係藉由一光纖耦合光譜儀 (USB-2000, Ocean Optics) 取得。影像則藉一 NTSC 輸出規格之 CCD 觀測。

選擇單一細胞進行光譜量測的方法為：將雷射聚焦於選定之細胞之上，使得細胞被雷射產生的光阱所捕捉並且激發出相應之雙光子螢光。在落射照明下，記錄顯微鏡下的細胞影像。當照明關掉後，則可以清楚的見到由細胞發出的雙光子自發螢光，並且可用光譜儀量得其光譜。樣品的顯微影像，亦可使用雷射掃描顯微鏡 (FV300, Olympus) 搭配光電倍增管取得穿透或反射方向影像，如前所述^(6,15)。

為了得到經統計平均之細胞時序螢光強度對時間的演化曲線，量測的方式係在一群細胞中取出幾十個單一細胞，並對每個細胞測量其自發螢光強度之後，平均其光譜範圍 510–515 nm 處之螢光強度，並且在等間隔的時間後，反復進行上述步驟。如此即可繪出如圖 3 中的 DMEM 和 PBS 中與時間相關的包封 (envelop) 曲線。

入射雷射光束功率對細胞的影響如圖 9(b) 和圖 10(b)。雷射功率密度的變動範圍在 $0.3 - 1.7 \times 10^8$

W/cm^2 之間。來自每個細胞的光譜也被連續的量測 4–5 分鐘。對於每個指定的雷射功率，量測數個細胞的照射（曝光）時間與其雙光子螢光間的關係，並且取其平均值。

三、樣品製備

1. 阿拉伯芥原生質體

阿拉伯芥種子係種植於 $20 \times 8 \times 4 \text{ cm}^3$ (L × W × H) 的平坦泥土中，置於室溫日/夜溫度為 25/22 °C 的成長室中，以日/夜時間 16/8 小時為週期，使用螢光管 (FL40D-Ex, Mitsubishi) 照射一個頻譜到達 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ (at the rosette level) 之近日光光源。植物放置 4 到 5 週後即可使用。Mesophyll 原生質體藉由細胞壁酵素的作用來分離，並且保存於培養介質之中。為利於顯微觀測，原生質體被懸浮於一個玻璃覆蓋的腔體中。

2. PC12 細胞

PC12 細胞來自老鼠的特殊腫瘤 (pheochromocytoma)。若加入神經元成長因子 (NGF) 於 PC12 細胞，可使其表現神經元的特性，為一廣泛地使用於展現神經元細胞生理機能⁽²⁰⁾ 的 *in vitro* 模型系統，如生存與繁殖⁽²¹⁻²³⁾、分化⁽²⁴⁾ 與自行凋亡 (apoptosis)⁽²⁵⁾ 等。在雙光子激發之下，PC12 細胞呈現 500–530 nm 之淺綠色螢光。我們推測其自發螢光的強度與細胞的生存狀態相關。而細胞的生存狀態差異則來自不同介質的使用與隨時間的演化。

PC12 細胞保存於含 10% 馬的血清蛋白加上 5% 胚胎血清蛋白之 DMEM 緩衝液或磷酸鹽緩衝液溶液 (PBS)。懸浮液的細胞密度約 $10^6/\text{mL}$ 。次取的 10 μml 懸浮液置於兩蓋玻片之間進行自發螢光測量。一極薄之塑膠隔片則用以防止細胞被擠壓於兩蓋玻片之間，以確保細胞形體之完整性。

四、量測結果與討論

1. 阿拉伯芥原生質體

(1) 單光子漂白的數學模型

我們用以下的模型來描述光漂白：假設螢光訊

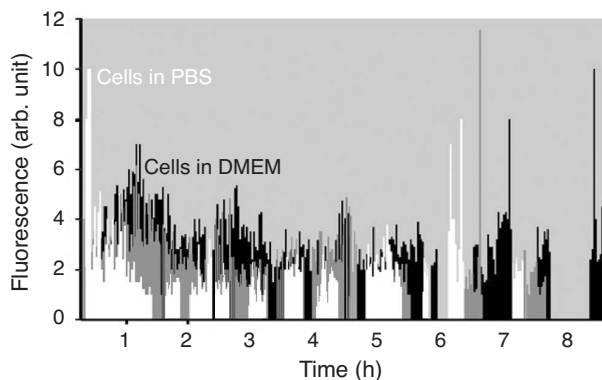


圖 3. 在 DMEM 和 PBS 溶液中，由單一細胞激發的自發螢光時序圖。其中所使用的雷射波長為 770 nm，功率密度約 10^8 W/cm^2 。

號的改變量為 ΔP ，並與入射之累積雷射能量密度和螢光訊號 P 成比例關係，可得^(26,27)。

$$\Delta P = Pg(F) \quad (1)$$

$g(F)$ 為一與螢光衰減相關的照射能量密度函數，照射能量密度 F 之單位為光子/ cm^2 且 $F = I\Delta t$ 。 $g(F)$ 可化簡為 $\sigma F/h\nu$ 其中 I 為雷射光束的入射強度， σ 為光漂白過程的截面， $h\nu$ 為入射光子能量。將式 (1) 對時間積分可得

$$P(t) = P_0 e^{-\left(\frac{\sigma}{h\nu}\right)t} \quad (2)$$

(2) 多光子漂白的數學模型

若激發來自脈衝雷射照射下多光子效應， F 則代表在單一雷射脈衝之下單位面積的光子數， $g(F) = \beta(F/h\nu)^M$ ，其中 M 表示非線性之指數， β 表示多光子漂白的有效截面，其單位為 $(1/\text{cm}^2)^M$ 。將式 (1) 對入射的雷射脈衝數積分，可得

$$P(N) = P_0 e^{-\beta\left(\frac{F}{h\nu}\right)^M N} \quad (3)$$

對於一個鎖模雷射而言，一個單一脈衝的照度 F 可表示為 $I\tau$ ，其中 I 為平均雷射強度， τ 為脈衝間的週期。脈衝的累積數量因此表示為 $N = ft$ ，其中 $f = 1/\tau$ ，表示雷射脈衝的重複率。故式 (3) 可以重新改寫為

$$P(t) = P_0 e^{-\beta \left(\frac{I\tau}{h\nu}\right)^M t} \quad (4)$$

如此，雙光子激發的等效截面可以定義成

$$\sigma_{\text{eq}} = \frac{\beta \left(\frac{F}{h\nu}\right)^M}{F} = \frac{\beta \left(\frac{I\tau}{h\nu}\right)^M}{I\tau} \beta \left(\frac{I\tau}{h\nu}\right)^{M-1} \quad (5)$$

其中 $M = 2$ 。以上式所定義的雙光子激發漂白截面將呈現與入射強度或脈衝照度相關的函數。因此在增加入射強度之下，雙光子激發的光漂白截面將快速的增加。

(3) 由單光子激發所誘導的漂白

圖 4 為在 CW 雷射 488 nm 之下，葉綠體的時序 (time-lapsed) 自發螢光光譜。其光譜的時間順序繪圖如圖 4(a) 所示，其 3D 圖如為圖 4(b) 所示。在 CW 雷射照射之下，葉綠體的紅色自發螢光以 690 nm 為中心波長，並以指數型式衰減。圖 4(c) 擬合之衰減近似曲線，其曲線為表示兩個不同光漂白程序之指數衰減函數。我們可得到兩個單光子漂白截面分別為 $8 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ 與 $5.4 \times 10^{-25} \text{ cm}^2$ 。若假設葉

綠體激發的吸收截面為 10^{-16} cm^2 ，約一染料分子之大小，則對應的光漂白量子效率約為 10^{-8} 。此相對低的漂白率顯示葉綠素較多數的染料穩定⁽²⁸⁾。

(4) 雙光子激發所誘導的光漂白

圖 5 為在雙光子激發之下，一個典型時序的漂白光譜。相對於單光子激發單色的光譜，由雙光子激發的葉綠體螢光為彩色分布，其範圍為 450–700 nm。在 495 nm 處的螢光可能為 $1^1 B_u$ 狀態結合所發出的。在 525 nm 處之螢光則可能為 $n^1 A_g$ 狀態所發出的，而在 620 nm 處之特徵則可能為類胡蘿蔔素的 $21 A_g$ 狀態所發出⁽²⁹⁾，這是已知葉綠體的光合成過程中一串接的能量轉移鏈反應^(30,31)。這個現象亦反映在光譜中，由於紅色螢光衰減且綠色螢光上升，顯示出類胡蘿蔔素與葉綠素兩者之間的交互作用。類胡蘿蔔素能在強烈照射之下，吸收額外的能量來保護葉綠體^(30,31)。純淨的葉綠素不會顯現出多彩的頻譜，如圖 5 所示。綠色螢光反映一連串連鎖反應的發生。

圖 5(c) 所示的數據，係由式 (3) 使用非線性最小平方近似法所得最佳的衰減函數擬合。由式 (5) 所得出相對應的截面為 2.8×10^{-26} 、 2.6×10^{-26} 、 2.3×10^{-26} 、 1.0×10^{-25} 和 $2.0 \times 10^{-25} \text{ cm}^2$ ，其相對應的螢

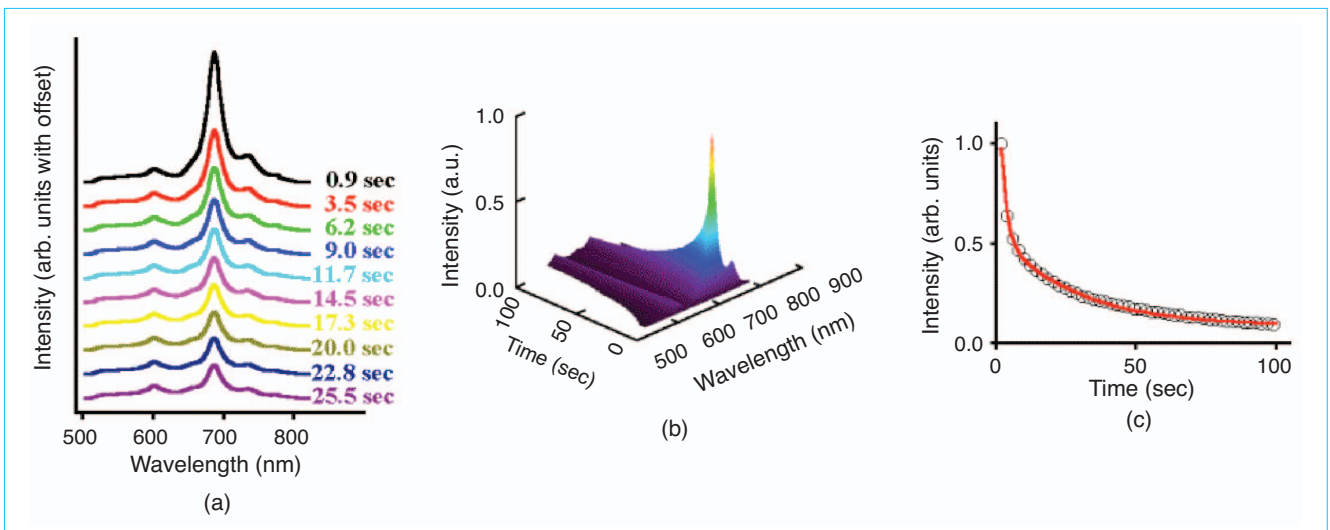


圖 4. 在波長 488 nm 的雷射激發下，透過顯微光譜儀所量測的葉綠素時序螢光光譜。(a) 時間順序光譜；(b) 光譜的三維表面漸層描圖；(c) 中心波長為 687 nm 的螢光衰減曲線，擬合 (fitting) 曲線係利用兩指數的衰減函數 (double exponential decay) 以最佳擬合光漂白過程。

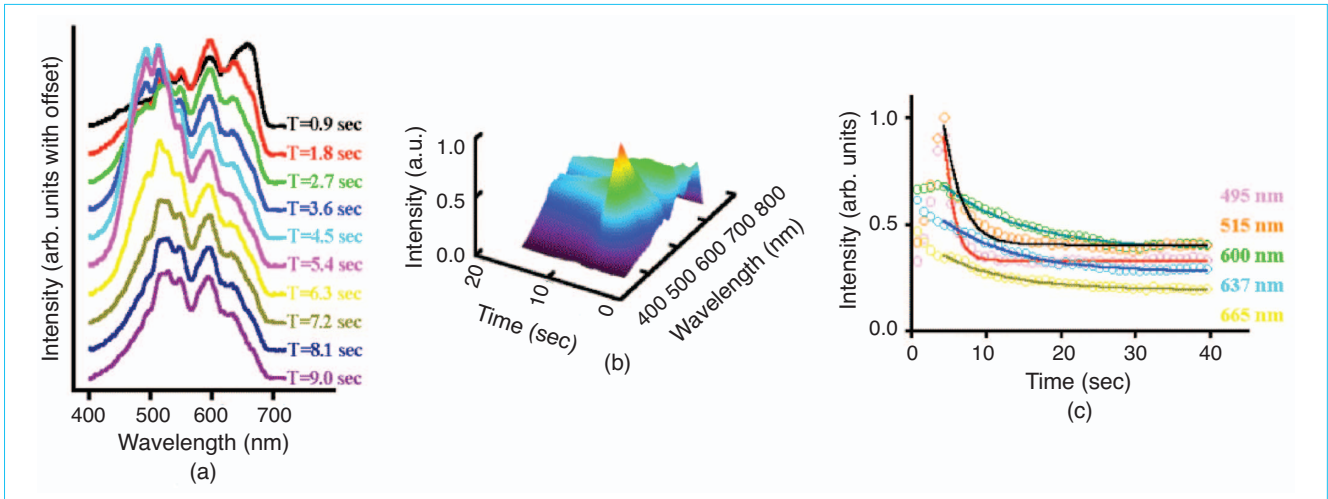


圖 5. 雙光子激發下的時序螢光光譜。(a) 光譜的時間順序描繪；(b) 光譜的三維表面漸層描圖；(c) 495 nm、515 nm、600 nm、637 nm 和 665 nm 螢光衰減曲線。

光波長分別為 665、637、600、515 和 495 nm。在這個實驗中，雙光子激發中較低的漂白截面表示在雙光子激發下有著較小的破壞。但實際上極高 NIR 強度常被用於取得與單光子激發相同的自發螢光量。也因此雙光子激發下光漂白率的結果會比單光子激發的結果較高。

圖 6 為在脈衝雷射照射之下的原生質體。在經數次掃描之後，紅色螢光的降低意味著原生質體的衰減。在葉綠體中，綠色的自發螢光的產生與紅色螢光的衰減有著緊密的關係。在強烈脈衝雷射之照射下，能對細胞造成迅速和劇烈的傷害，這個現象可由照射與觀察含有 Calcein AM 染料的原生質體中更進一步地證實。

2. PC12 細胞

(1) 細胞之影像與光阱的捕捉

PC12 細胞的影像如圖 7 所示，(a) 為傳統反射式影像，(b) 為雙光子螢光之掃描影像。由圖 7(b) 可知，自發螢光遍布於整個細胞上。但是細胞的不同部分 (organelles) 會呈現出不同的螢光強度，反映細胞內螢光物質的分布。PC12 細胞 (細胞大小約為 5–10 μm) 係保存於 PBS 或 DMEM 介質中，並可自由移動或由雷射光束所操縱，以控制單一細胞之位置便利觀測。每個細胞所發出的自發螢光強

度不見得相同。這可歸因統計上的差異或細胞內部狀態的不同，以及測量情況的變動所致。光阱捕捉無疑使量測條件能更形標準化 (例如防止被觀測的細胞漂移)。

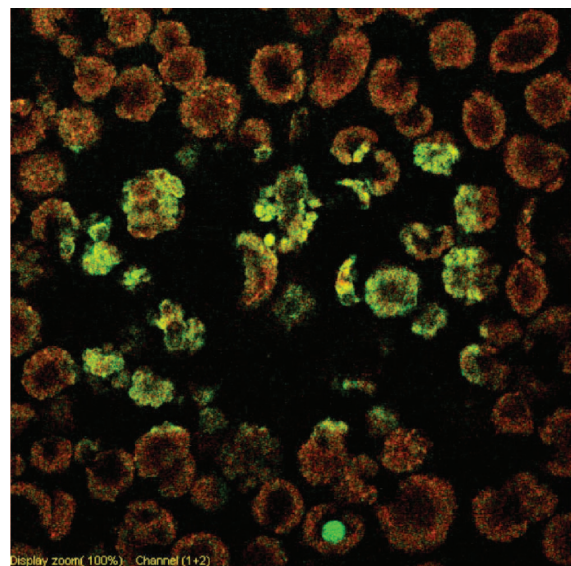


圖 6. 透過雙光子螢光影像可以顯現之前遭受光破壞的區域 (中間為綠色螢光區域)。這張影像的中央矩形區域先以每畫面 3.3 秒的近紅外脈衝 (780 nm) 雷射及較高倍率 (zoom-in) 掃描一遍，再以較低倍率 (zoom-out) 掃描所得。

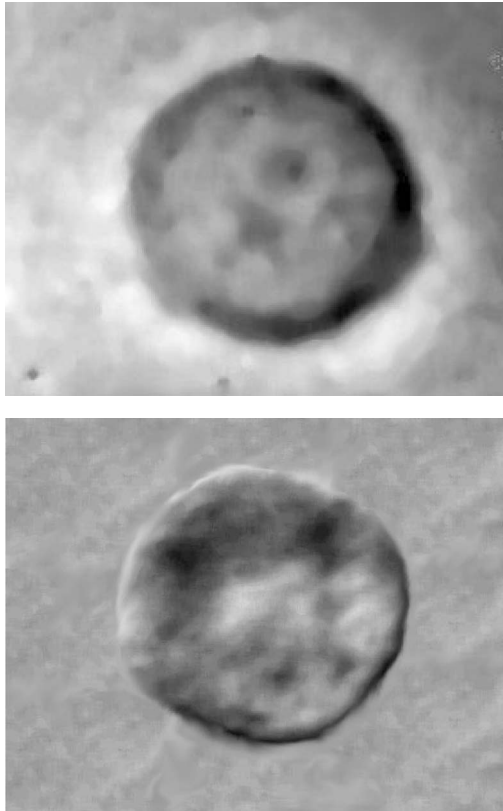


圖 7.(a) 顯微鏡下的 PC12 細胞—傳統的穿透影像；(b) 雙光子螢光掃描影像。

(2) 細胞和與其培養介質之雙光子螢光

PC12 細胞淺綠色的雙光子螢光在光譜的分布稍寬，且它的本質尚待了解。此外，緩衝介質也顯現出類似的螢光。在相同的照射條件下，介質的螢光強度遠弱於細胞所發出的，如圖 8(a) 所示。在圖 8(b) 中，為細胞介質中各式各樣成分的雙光子螢光光譜：DMEM、DMEM 加上 NaHCO_3 、飽和的 NaHCO_3 溶液、馬的血清蛋白與胚胎血清蛋白溶液。如同預料的一樣，血清蛋白溶液、DMEM 和 DMEM 加 NaHCO_3 之溶液的雙光子螢光光譜是非常相似的，它們也有著相同區域的峰值位置。即便如 NaHCO_3 (碳酸氫鈉) 溶液亦顯現雙光子自發螢光。

許多細胞中的化合物，例如 NADH、NAD(P)H 和槲黃素 (flavins) (皆為新陳代謝之氧化還原反應中的化合物)，結構蛋白質如膠原蛋白 (collage) 皆會產生高強度的自發螢光，並且可能是細胞內自發螢光之主因^(8,32-34)。自發螢光可用以追蹤氧化還原反應，乃至正常或異常之新陳化謝反應⁽¹²⁾。細胞和介

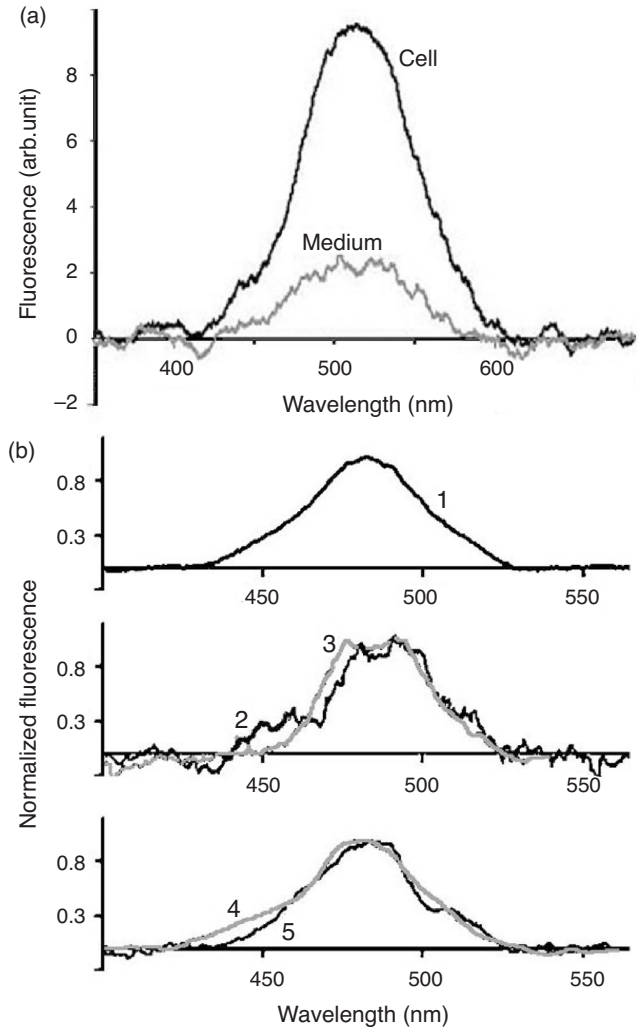


圖 8.(a) PC12 細胞和介質的雙光子自發螢光光譜，其入射光波長 770 nm、功率密度 $1.0 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；(b) 對 DMEM (1)、DMEM + NaHCO_3 溶液 (2)、 NaHCO_3 飽和溶液 (3)、馬的血清蛋白溶液 (4) 與胚胎血清蛋白 (5) 的雙光子螢光之歸一化光譜，其功率密度為 $3.0 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ，波長為 770 nm。

質自發螢光的相似性，可能肇因於普遍存在於許多有機化合物或物質中之某些化學官能基。

(3) 細胞對時間的相關性

雙光子自發螢光強度隨著時間變化可由圖 3 看出，儘管每次量測間之細胞自發螢光有所變異，時間平均下之自發螢光乃顯現出一個有如阻尼的振盪衰減曲線。這個特性圖案如圖 9(a) 和 10(a) 所示，

分別顯示在 DMEM 和 PBS 之細胞自發螢光的變化。對於懸浮在 DMEM 的細胞，自發螢光顯示出了阻尼振盪衰減般的演變。相對於 PBS 中懸浮細胞的自發螢光則顯現出一個隨著時間指數衰減之函數。

(4) 雷射對細胞的破壞

圖 9(b) 為 DMEM 中的懸浮細胞在雷射照射之下，細胞的雙光子自發螢光與照射時間的關係。由圖 9(b) 可看出，懸浮於 DMEM 中的細胞可在長時

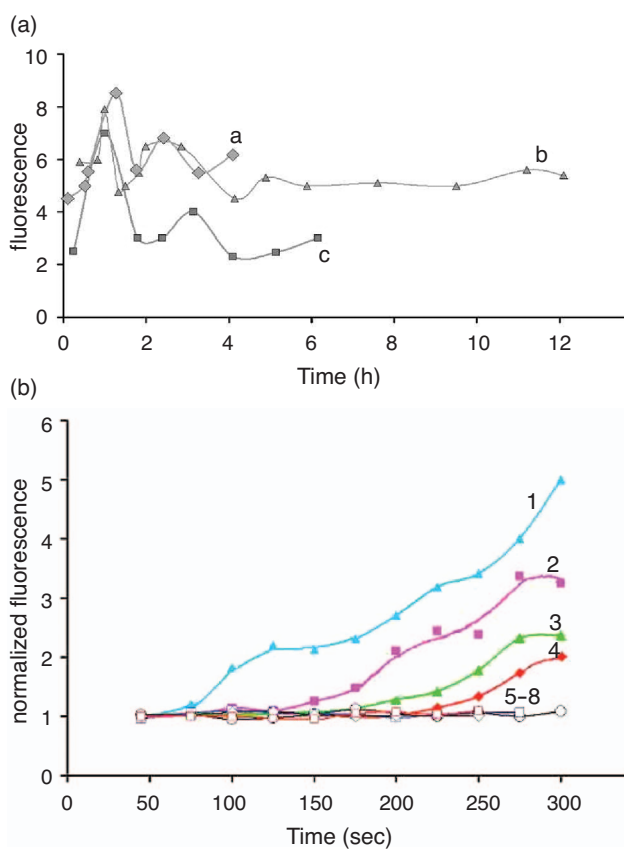


圖 9. (a) 典型的 PC12 細胞雙光子螢光與時間的關係。在 DMEM 介質中的 PC12 細胞，雷射功率密度： $1 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 如 a 所示； $0.9 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 如 b 所示； $0.75 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 如 c 所示。(b) 在 DMEM 介質溶液中，由雷射照射之 PC12 細胞的自發螢光反應。雷射波長 740 nm，功率密度：1— $1.5 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；2— $1.3 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；3— $1.1 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；4— $1.0 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；5— $0.8 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；6— $0.7 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；7— $0.5 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；8— $0.3 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 。

間照射下仍保持著它原始的螢光狀態。觀察細胞自發螢光強度隨時間 (4—5 分鐘) 產生的變化得知，當雷射功率密度在 $0.3-0.8 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 的範圍之間，細胞自發螢光強度沒有太大的變化，這是由於雷射光束尚未對細胞產生太大的破壞。但當功率密度超過 $0.8 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 時，隨著量測時間的增加，螢光強度產生很大的變化。隨著功率密度的上升，螢光強度隨時間的變化也迅速上升。這極可能肇因於雷射光束對細胞產生的光破壞。從遭受光破壞的細胞可觀察到非常強的自發螢光⁽³⁵⁾，這反映出細胞自發螢光對細胞內部狀態的關係。

圖 9 和圖 10 比較在 DMEM 與 PBS 兩種溶液之中懸浮細胞對照射時間的變化。在 0—1.5 小時的時間間隔中，雷射功率密度為 $0.3 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 時，兩種溶液中懸浮細胞之單量測的自發螢光沒有太大改變。但當雷射功率密度超過 $0.6 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 時，單次量測中 PBS 溶液的細胞 (圖 10(b)) 與 DMEM 溶液的細胞 (圖 9(b)) 有激烈反應，並且極為相似。之後細胞內部狀態的改變和其對照射時間的反應變得較不強烈，僅只顯現出與雷射功率微弱的相關性。利用自發螢光量測方法也顯現出，PBS 中的懸浮細胞只能生存 1—1.5 小時。大體而言，細胞螢光時序的變化與雷射功率有很好的對應關係。在 PBS 和 DMEM 溶液中，因不同的外在條件，細胞有著不同的反應。

五、總結

螢光量測為生命科學研究中極為重要的方法。透過細胞自發性螢光的觀測，可以推得細胞內的一些重要資訊，如細胞內部之變化、新陳代謝等。本文介紹將超快脈衝雷射、掃描式共焦顯微鏡以及光譜儀組合之後，可成為量測單一細胞自發螢光光譜的有力工具。且因量測方式為非接觸性，對細胞的影響較能控制。從時序螢光光譜量測結果的分析，可得到與細胞相關的資訊，如細胞對於不同介質的螢光反應、雷射光對細胞的破壞程度等。本文為利用阿拉伯芥原生質體和 PC12 細胞分別代表植物與動物細胞，利用上述之光學架設與時序性螢光光譜分析，得到前述之結果。此光學架設不僅可用於生

物細胞樣本上，經過適當變更亦可用於不同科學領域，如奈米材料等。

我們預期若再引進螢光半衰期 (fluorescence lifetime) 的分析，將可進一步闡明螢光標示與周遭環境之交互作用，乃至相關之物理、化學的變化。隨著新科技的發展，光子相關計數的高速電子系統已在這樣的要求下發展出來 (FLIM, <http://www.becker-hickl.com/>)，進而得到分子層次的資訊。這也是目前極為熱門之研究主題。

參考文獻

1. W. Denk, J. H. Stricler, and W. W. Webb, *Science*, **248**, 73 (1990).
2. J. R. Lakowich, *Principles of Fluorescent Microscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 698 (1999).
3. F. L. Labarthe and Y. R. Shen, *Nonlinear Optical Microscopy, in Optical Imaging and Microscopy, Techniques and Advanced Systems*, ed. P. Török, F. J. Kao, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 169-193 (2003).
4. R. Drezek, K. Sokolov, U. Utzinger, I. Boiko, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, *Journal of Biomedical Optics*, **6** (64), 365 (2001).
5. H. Petty, R. Worth, and A. Kindzelskii, *Physical Review Letters*, **84** (12), 2754 (2002).
6. P. C. Cheng, B. L. Lin, F. J. Kao, C. K. Sun, Y. S. Wang, T. M. Liu, Y. M. Wang, J. C. Chen, M. K. Huang, and I. Jonson, *Proceedings of SPIE*, **4082**, 87 (2000).
7. M. Neumann and D. Gabel, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **50** (3), 437 (2002).
8. M. Dellinger, M. Geze, R. Santus, E. Kohen, C. Kohen, J. G. Hirschberg, and M. Monti, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **28**, 25 (1998).
9. A. C. Croce, A. Spano, D. Locatelli, S. Barni, L. Sciola, and G. Bottiroli, *Photochemistry and Photobiology*, **69** (3), 364 (1999).
10. A. Ashkin, *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)*, **94**, 4853 (1997).
11. K. O. Greulich, *Micromanipulation by Light in Biology and Medicine (The Laser Microbeam and Optical Tweezers)*, Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin, 300 (1999).
12. K. Koenig, *Histochemistry and Cell Biology*, **114**, 79 (2000).
13. X. Wei, Z. Zhang, T. B. Krasieva, P. A. Negulescu, M. W. Berns, M. D. Cahalan, G. J. Sonek, and B. J. Tromberg, *Proceedings of SPIE*, **2983**, 22 (1997).
14. P. C. Cheng, B. L. Lin, F. J. Kao, M. Gu, M. G. Xu, X. Gan, M. K. Huang, and Y. S. Wang, *Micron*, **32**, 661 (2001).
15. F. J. Kao, Y. M. Wang, J. C. Chen, P. C. Cheng, R. W. Chen, and B. L. Lin, *Optics Communications*, **201**, 85 (2002).

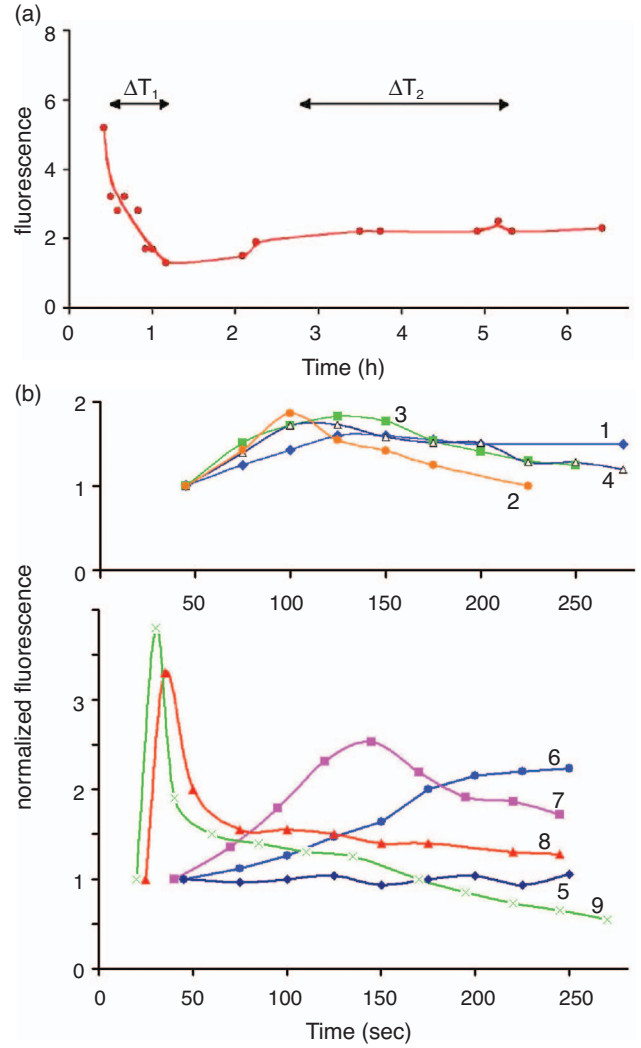


圖 10. (a) 在 PBS 溶液中，細胞的雙光子自發螢光強度與時間之關係。入射雷射光波長為 780 nm，功率密度為 10^8 W/cm^2 ；時間間隔如圖上所示，其對應描繪的量測如圖 (b) 所示： ΔT_1 繪於 5-9； ΔT_2 繪於 1-4。(b) 在 PBS 溶液中，由雷射照射之 PC12 細胞所產生的自發螢光反應。雷射波長 740 nm，功率密度為：1- $1.3 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；2- $0.75 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；3- $0.95 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；4- $1.55 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；5- $0.3 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；6- $0.7 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；7- $10.5 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；8- $1.2 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ ；9- $16.6 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$ 。

16. K. Koenig, S. Kimel, L. O. Svaasand, B. J. Tromberg, T. B. Krasieva, M. W. Berns, K.-J. Halhuber, P. T. So, and W. W. Mantulin, *Proceedings of SPIE*, **2983**, 37 (1997).

17. A. Vogel, J. Noack, G. Huttman, and G. Paltauf, *Proceedings of SPIE*, **4633A** (2002).
 18. Y. Sato, A. Sekihata, Y. Yanagisava, M. Yamamoto, Y. Shimada, K. Ozaki, and A. Kusumi, *Journal of Microscopy*, **185**, 9 (1997).
 19. K. Koenig, T. W. Becker, P. Fischer, I. Riemann, and K.-J. Halbhauer, *Optics Letters*, **24**, 113 (1999).
 20. M. Straub, P. Lodemann, P. Holroyd, R. Jahn, and S. W. Hell, *European Journal of Cell Biology*, **79**, 726 (2000).
 21. Y. Kato, R. I. Tapping, S. Huang, M. H. Watson, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee, *Nature*, **395**, 713 (1998).
 22. C. Piel, J. Zezula, A. Spittler, A. Kattinger, H. Reither, M. G. Garon, and O. Hornykiewicz, *FASEB*, **15**, 1607 (2001)
 23. R. Lee, P. Kernani, K. K. Teng, and B. L. Hempstead, *Science*, **294**, 1945 (2001).
 24. Y. Ito, G. Chen, Y. Imanashi, T. Morooka, E. Nishida, Y. Okabayashi, and M. Kasuga, *Journal of Biochemistry*, **129**, 733 (2001).
 25. K. P. Shaker, K. K. Biswas, M. Yamakuchi, K. Y. Lee, T. Hahiguchi, M. Kracht, I. Kitajima, and I. Maryyama, *Journal of Neurochemistry*, **85** (1), 50 (2003).
 26. F. J. Kao, D. G. Busch, D. Cohen, D. Gomes da Costa, and W. Ho, *Phys. Rev. Lett.*, **71**, 2094 (1993).
 27. F. J. Kao, D. G. Busch, D. Gomes da Costa, and W. Ho, *Phys. Rev. Lett.*, **70**, 4098 (1993).
 28. J. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, chap. 16, Plenum Press, New York (1995).
 29. T. G. Owens, A. P. Shreve, and A. C. Albrecht, *Research in Photosynthesis*, vol I, 179-186, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992).
 30. R. Buchanan, W. Grissem, and R. L. Jones, *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, 573-580 (2000).
 31. H. A. Frank, A. Cua, V. Chynwat, A. Young, D. Gosztola, and M. R. Wasielewski, *Photosynthesis Research*, **41**, 389 (1994).
 32. J. Lippincott-Schwartz and G. H. Patterson, *Science*, **300**, 87 (2003).
 33. W. Zipfel, R. Williams, R. Christie, A. Nikitin, B. Hyman, and W. Webb, *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)*, **100**, 7075 (2003).
 34. W. Mohler, A. C. Millard, and P. J. Campagnola, *Methods.*, **29**, 97 (2003).
 35. K. Koenig, P. T. C. So, W. W. Mantulin, and E. Gratton, *Optics Letters*, **22** (2) 135 (1997).
-
- 郭合哲先生為國立中山大學光電所碩士班學生。
 - 高甫仁先生為美國康乃爾大學物理博士，現任國立中山大學光電所教授。
 - He-Je Kuo is currently a master student in the Institute of Electro-Optical Engineering at National Sun Yat-Sen University.
 - Fu-Jen Kao received his Ph.D. in physics from Cornell University, USA. He is currently a professor in the Institute of Electro-Optical Engineering at National Sun Yat-Sen University.