

# 從顯「微」技術到顯「奈」技術

## From Microscopy to Nanoscopy

林伯彥、林奕呈、呂宏洲、高甫仁

Po-Yen Lin, Yi-Cheng Lin, Hong-Chou Lyu, Fu-Jen Kao

隨著雷射及偵測技術的進步，促使光學顯微鏡的應用更加廣泛，特別在生醫領域研究上，光學顯微鏡非侵入式及活體觀測的優點，使其扮演無可取代的重要角色。然而光的波動性也限制了光學顯微鏡的空間解析能力（約為半波長），使得光學顯微鏡無法清楚辨別更微小的結構如細胞器等，此即 Abbe 於百餘年前所預測之繞射極限。最近發展的超解析遠場顯微技術如 STORM、PALM、STED、SSIM 已突破這個繞射屏障，目前遠場光學顯微鏡空間解度已進展至數十奈米左右。顯微術已然推進至顯「奈」術。

Optical microscopy has been widely applied in numerous disciplines, especially in biological science due to its noninvasiveness, high contrast, and high sensitivity for *in vivo* imaging. However, the diffraction limit of the far-field light microscopy, as predicted by Abbe's theory (two objects cannot be resolved when they are separated by less than half of the incident light wavelength), has plagued the achievable spatial resolution for over a century. In recent years, the novel advances in optical microscopy, such as photoactivated localization microscopy (PALM), stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), stimulated emission depletion (STED), and saturated structured illumination microscopy (SSIM) have, nonetheless, surpassed optical microscopy resolution limit beyond the Abbe's barrier. These advancements will bring unprecedented impact to the future development of critical bio- and nano-technologies.

### 一、前言

視覺是人類探索世界最重要的方式之一，其所衍生的光學與顯微技術大量地豐富了人類的科技與文明。光學與顯微技術的應用源遠流長，在科技的發展上扮演了極為重要的角色，對現今社會的影響更是與日俱增。在新近光電科技的刺激與對光的本質更深入的了解之下，使得顯「微」科技已進一步邁向顯「奈」科技。這樣的進展對以生醫與奈米科技為發展重點的今天，尤顯得影響重大。光的本質

具有波動與粒子的特性，稱之為雙重性 (duality)<sup>(1)</sup>，一直是科學上的關鍵主題。牛頓是最早提出光的「粒子性」之代表人物，他認為光的直線傳播、偏振現象等特性可以用粒子說解釋，並於 1675 年於其所著之 *Optiks* 敘述此一假說。牛頓認為光是從光源發出一種微粒，在均勻介質中以一定的速度傳播。但顯然地粒子說在解釋為何光可同時發生反射和折射，以及幾束光線相遇後可彼此毫不妨礙地繼續向前傳播等現象時，則難以得到令人滿意的解釋。

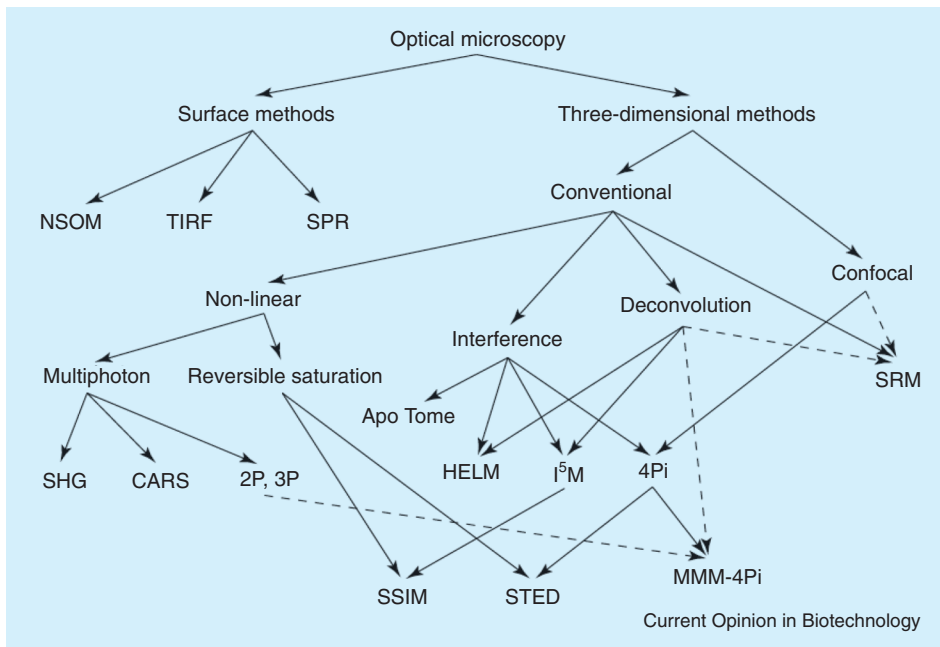


圖 1. 多模態的光學顯微鏡與其相互關聯性。有些新穎的方法則是結合了一種以上的技術<sup>(2)</sup>。

另一方面，在 1690 年海更斯建立了光波動說。在「粒子說」所遭遇的困境皆可輕易透過「光波動」的模型有效解決，如波動可同時發生反射和折射、波動在行進的同時能夠自由地互相穿過而影響彼此。光波動說藉由許多干涉與繞射之研究，在十九世紀大放異彩，而馬克斯威爾和赫茲更分別在電磁理論和實驗上嚴謹地證實了光的波動性。直到光電效應現象發現時，才使光波動說面臨了本質上的困難。在 1905 年愛因斯坦提出光電效應理論後，對光本質的研究有了突破性發展。愛因斯坦引用「光子」的概念解釋了光電效應，並確立了光具波動與粒子的雙重性。無獨有偶地，最近光學顯微術的發展亦開始自光強度的量測（視光為波動）之外，引進光子計數（視光為粒子）作為成像的模式。

## 二、繞射極限

光學顯微鏡為基於光學波動性質所發展出的顯微技術，而光學顯微鏡配合新近發展的各種光電科技，如雷射、影像技術與高性能的偵測器，更衍生出多種功能強大、極富巧思的成像模式，如圖 1 所示。

然而，在圖 1 所列出的顯微術中，除了新進發展的顯微技術，如飽和結構照明 (saturated

structured illumination microscopy, SSIM)<sup>(3)</sup> 及受激放射耗乏顯微術 (stimulated emission depletion microscopy, STED microscopy)<sup>(4)</sup> 具有超解析能力外，這些根據光波動性質所發展出來的光學顯術，其空間解析能力亦同受到繞射限制(附註)。

在現今奈米科技與生命科學發展需求下，一般光學系統已無法滿足更高解析能力的需求。然而，目前具有奈米等級解析度的顯微技術所在多有，如電子顯微術 (SEM 與 TEM) 及掃描式探針顯微術 (SPM) 等，這些技術早已達到原子或分子等級的解析度，遠小於繞射極限的限制，但應用上亦有其限制，如高能粒子束極易造成活體樣品或細胞的破壞，其觀察方式也受到侷限 (真空環境、樣品需具導電性的要求)。另一方面，掃描式探針顯微術則受限於觀察範圍僅限於樣品表面。在生命科學上的應用，遠場光學顯微術往往是考量空間解析度與非侵入式觀察的最佳選擇。此外，以光束為基礎的檢測技術與觀察，更具有大量、快速且成本較低的優勢。

## 三、突破繞射極限的遠場光學顯微技術

螢光具有高靈敏及專一性的優勢，使螢光顯微鏡其在生命科學應用上佔有極重要的地位，科學家

們利用螢光 (fluorescence) 的特性，透過光物理化學 (photophysics and photochemistry) 的過程，已有效地挑戰了 Ernst Abbe 逾百年前發現的繞射極限。螢光的產生一般係使用較短波長的光去激發螢光分子，使其放出較長波長的光 (稱為螢光)；透過免疫螢光標定的方法，我們便能利用螢光顯微鏡觀察生物體內所標定螢光分子的分布，進一步觀察其結構特徵。然而，激發光焦點的範圍受繞射極限的限制，也就是在繞射限制範圍內的分子都會受到激發而發出螢光，使得我們無法解析小於繞射極限的物體。因此，在螢光顯微鏡中若要提高解析度便是縮小激發或觀測範圍，如掃描式共焦顯微鏡 (confocal microscopy)<sup>(5)</sup> 及全反射式螢光顯微鏡 (total internal reflection microscopy, TIRFM)<sup>(6)</sup>。其中 TIRFM 雖可有效地限制螢光在軸向的激發範圍於約 150 nm 內，但僅限於表面，無法解析軸向的立體構造。至於共焦顯微鏡雖具有空間切片掃描的能力及利用針孔 (pin hole) 空間濾波的功能來提高解析度，但效果有限，且軸向及橫向解析能力不同 (軸向解析度約為 500 nm)。而共焦顯微鏡軸向解析能力的提升，直到  $4\pi$  全立體角顯微鏡的出現才得以解決。

$4\pi$  全立體角顯微術主要由德國馬克斯-普朗克研究院 (Max-Planck Institute) 的 Stefan Hell 博士所發展。藉著干涉儀式的顯微聚焦架設，將共焦顯微鏡的軸向解析度改進到 7 倍之多<sup>(7)</sup>。

一般使用物鏡都是以單向聚焦，如圖 2(a) 所示，這樣聚焦模式無法產生完整的球面波前，使其軸向解析度遠不如使用全立體角式的雙向聚焦模式，如圖 2(b) 所示。 $4\pi$  全立體角顯微術的實驗架構如圖 2(c) 所示，將一道入射光源分成軸向兩邊

同時聚焦在同一點上，使之可以得到近於  $4\pi$  的入射角度，激發後再一起回到偵測器。由圖 2(d) 中可以看出，與共焦顯微鏡的軸向解析度相比，確有過人之處。然而，這些顯微技術雖然提高了空間解析能力，但本質上仍然受繞射限制。直到 1994 年 Stefan Hell 博士提出的受激放射耗乏顯微術 (STED)，才真正打破 Abbe 的繞射屏障，使遠場光學顯微術的解析度不再受到限制，如圖 3 所示。

### 1. 受激放射耗乏顯微術<sup>(4)</sup>

STED 的基本概念是透過受激放射 (stimulated emission) 的方式，將受激分子的能量以非螢光過程 (non-fluorescent transition) 釋放，如此一來，便可利用受激放射有效限制螢光產生的範圍，這個方式並不受 Abbe 理論限制，而是取決於提供能態躍遷分布的區域大小。假設螢光分子存在 A、B 二態，如圖 4 所示。分子由 A 態躍遷至 B 態的速率常數以  $k_{A \rightarrow B}$  表示；同理， $k_{B \rightarrow A}$  表示分子由 B 態回到 A 態的速率常數，且其分布於 A 態及 B 態的分布機率 (population probability) 分別為  $N_A$ 、 $N_B$ ，則其隨時間的動力學變化可表示為：

$$\frac{dN_A}{dt} = -k_{A \rightarrow B}N_A + k_{B \rightarrow A}N_B = -\frac{dN_B}{dt} \quad (1)$$

當達到平衡狀態時，即  $t \gg (k_{A \rightarrow B} + k_{B \rightarrow A})^{-1}$ ，A 態分布機率為

$$N_A^\infty = \frac{k_{B \rightarrow A}}{(k_{A \rightarrow B} + k_{B \rightarrow A})} = \frac{k_{B \rightarrow A}}{(\sigma I + k_{B \rightarrow A})} \quad (2)$$

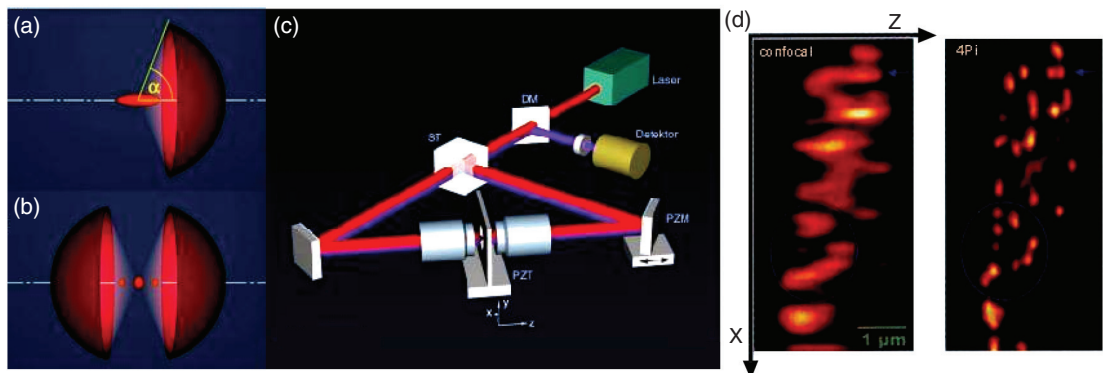


圖 2.  $4\pi$  共焦顯微鏡原理、架構與軸向解析度比較<sup>(8)</sup>。

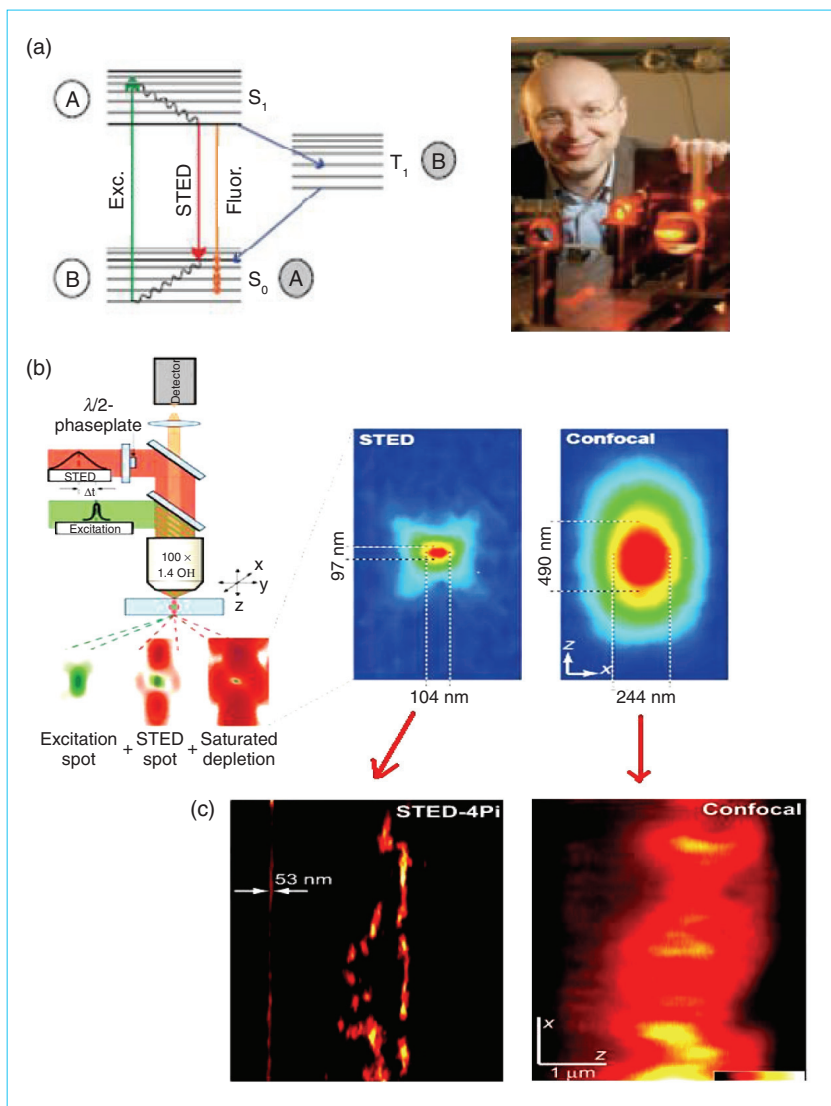


圖 3. STED microscopy 的 (a) 成像原理與 (b) 架構，使用兩道不同波長雷射 (excitation 和 STED) 幾乎同時入射，並由同一偵測器接收。(c) 共軛焦顯微術成像解析與 STED-4 $\pi$  成像解析比較，人像圖為 Stefan W. Hell 博士，此方法之發明者<sup>(6)</sup>。

因此，分子處於 A 態或 B 態與速率常數有關。同時我們能透過光來引發分子的躍遷，即其速率常數  $k_{A \rightarrow B}$  與光強度  $I$  的關係為

$$k_{A \rightarrow B} = \sigma I \quad (3)$$

其中， $\sigma$  為等效截面積。由上式可知，我們可藉由調控光的強度  $I$ ，來可影響分子在 A 態的分布機率，且入射光強度愈強， $N_A^\infty$  之值越小。故我們可定義飽和強度  $I_{\text{sat}} = k_{B \rightarrow A} / \sigma$ ，若入射光強度恰等於  $I_{\text{sat}}$ ，即  $N_A^\infty = 1/2$ ，表示分子處於狀態 A 與 B 的機率各為 50%。當我們進一步將入射光強度提升至  $I \gg I_{\text{sat}}$ ，即  $k_{A \rightarrow B} \gg k_{B \rightarrow A}$ ，使得  $N_A^\infty$  趨近於零，也

就是 A 態幾乎被耗乏掉了 (depleted)，表示在此遠大於飽和強度的光強激發下，分子分布機率將會從原本的 A 態全部轉換為 B 態。值得注意的是，由於態的轉換是可逆的，當耗乏條件消失，處在 B 態的分子仍可藉由吸收或釋放能量再回到 A 態。這個想法並發展成可逆式飽和螢光躍遷 (reversible saturable optical linear fluorescence transition, RESOLFT) 的概念<sup>(9)</sup>，也就是透過調控能態的分布來限制產生躍遷的區域，並提高顯微鏡空間解析能力。廣義而言，STED 屬於實現 RESOLFT 概念的其中一種方式。一開始分子的初始 A 態為能量較高的激發態 (excited state)，而 B 態為能量較低的基態 (ground state)，利用雷射光誘使分子由激發態 A

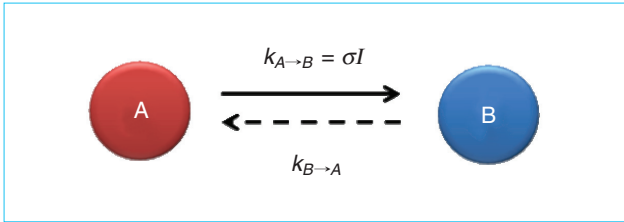


圖 4. 能態躍遷示意圖。

釋放能量轉換至基態  $B$ ，即為受激放射的過程。因此，STED 便能限制分子螢光產生的區域，觀察到遠小於繞射極限所限制的解析範圍。在 STED 顯微術中，解析度有了新的定義<sup>(7)</sup>：

$$d \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{\max}/I_{\text{sat}}}} \quad (4)$$

其中， $I_{\max}$  為觸發分子產生受激放射的雷射強度，稱為 STED beam，只要提高 STED 雷射強度大於飽和強度，便能得到更高的解析度。

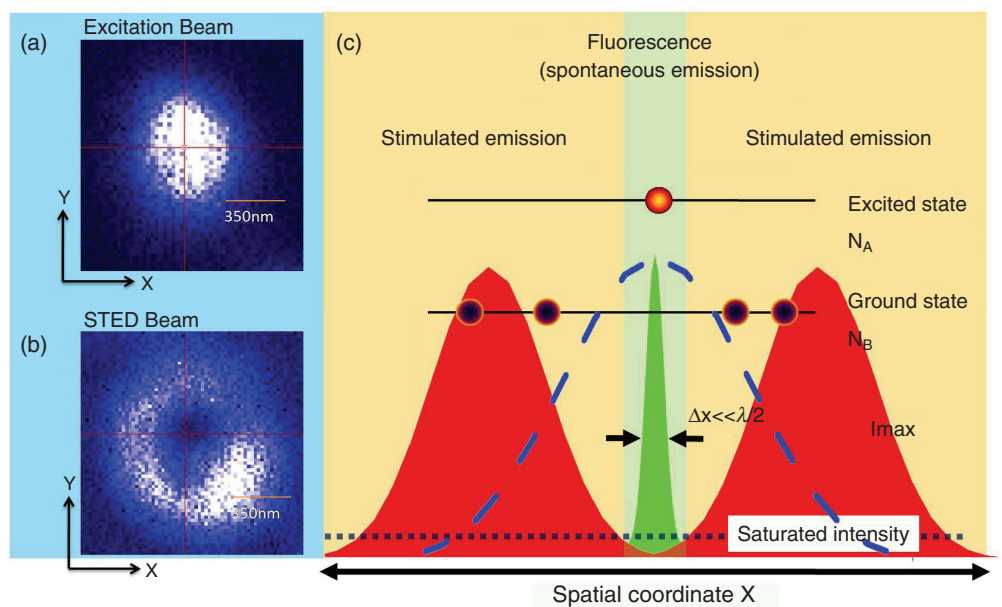
在螢光顯微鏡中，焦點大小即為螢光產生的區域，如圖 5(a)，因此，如能使激發分子的範圍有效縮小，便能提高解析度。在實驗上，是讓引發受激放射的雷射光 (STED beam) 通過螺旋相位板 (vortex phase plate) 或光空間調制器 (spatial light modulator) 產生中心強度為零的環形雷射光 (亦稱

donut beam)，抑制焦點外圍的區域，如圖 5(b)，限制螢光發生於焦點中心，如圖 5(c) 所示，在激發光焦點區域內 (藍色虛線) 的螢光分子被激發至激發態，紅色區域為促使分子產生受激放射的區域。然而 STED beam 大小仍然受到繞射限制，但只要增加 STED beam 的強度，其超過飽和強度的範圍便能縮小，便可使處於激發態  $N_A$  的分布範圍縮小進而限制了螢光產生的區域，以達成超解析的螢光影像。透過 STED 這種抑制螢光產生區域的方法，除了提高橫向解析能力，在軸向解析只需透過調整 STED beam 的焦點軸向位置即能獲得驚人的改善<sup>(10)</sup>。在使用操作上，影像取得與一般共焦顯微鏡方法類似，利用此允許產生螢光區域的小點掃描螢光樣品，即可達成繞射限制下的解析，這也使得 STED 在應用上能結合共焦顯微鏡。

然而，目前 STED 這種超高分辨技術只能在螢光顯微術中實現，原因在於一般螢光分子具有螢光半衰期 ( $\tau$ ) 的特徵，也就是激發態分布減少至  $1/e$  會有一定的時間，因此我們才能透過受激放射的方式去限制能態躍遷的區域。倘若分子半衰期極短，或是處於虛態 (virtual state)，我們便很難去調控其能態躍遷。因此，目前 STED 的技術尚未在光與物質交互作用極短的過程實現，如散射或反射訊號。

在 STED 中是透過調控能態的躍遷的方法以取得超解析影像。另一方面，利用螢光飽和現象也是

圖 5. 突破繞射限制的螢光顯微術示意圖，(a) 激發雷射及 (b) STED beam 強度分布，(c) 能態分布與 STED beam 強度關係。



突破繞射限制的方法之一，由於螢光分子具有一定的半衰期及焦點內有限分子數目，使得螢光訊號在激發光強度增加下，並不會一直增加，而是達到其飽和強度，也就是螢光訊號強度與激發光強度呈非線性關係 (non-linearity)。此非線性關係的高階項 (higher harmonics) 包含更多空間頻率的資訊 (space frequency)，因此，只要透過後續影像處理及頻譜分析，亦可達到超解析顯微技術，如飽和結構照明<sup>(3,11)</sup> 與飽和激發 (saturated excitation, SAX)<sup>(12)</sup>。

## 2. 光子統計影像重組技術

除了上述所討論透過縮減 PSF 來提高顯微鏡解析度的方法外，近年來，亦有其他極富巧思的光學顯微概念，使得繞射不再是觀察微小樣品的障礙。在 Abbe 的理論中，只限制顯微鏡解析二物體的距離，並無限制觀察單一分子的能力 (single molecular detection) 以及找出分子的位置 (localization)，光敏定位顯微術 (photoactivated localization microscopy, PLAM)<sup>(13, 14)</sup> 及隨機光學重建顯微術 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)<sup>(15, 16)</sup> 便是利用單分子偵測技術及光子統計方法將單分子的位置標定出來進而獲得重組影像。在技術上先收集區域內單分子影像 (解析度仍受 Abbe 理論限制)，而影像中單分子的位置準確性與誤差則與所收集光子數有關，因此，這類影像技術巧妙地透過光子統計分析方法繞過 Abbe 理論的限制，在取得一連串의影像及分析重組後，便可獲得高解析度重組影像。

上述的新發展也顯示了光學顯微成像已逐漸從利用光的波動性，進展至利用光的粒子性與伴隨而至的統計特性。影響所及，已足使顯「微」鏡更名為顯「奈」鏡。

## 3. 從空間解析到時間解析

超高空間解析光學顯微術的進展，無疑已開啟了一新的里程碑。但達成空間上的超解析並非毫無代價或限制。在測不準原理的規範下，超解析的達成往往需大幅犧牲可資利用的光子數。如此一來，光子統計造成的誤差 (Poisson fluctuation)、螢光分子的光漂白效應、光源強度等，便成為影響解析度

與影像品質的因素。STED 目前已達成之最佳空間解析度為 5.8 nm 左右。但此一解析度係利用奈米鑽石所實現<sup>(17)</sup>，一般常用的有機染劑達成的解析度約為 20 nm，仍遠低於解析分子交互作用的關鍵距離 (1–10 nm)。

分子間交互作用係透過分子偶極矩的近場電場為之，其作用強度約略為凡得瓦爾力，並與分子間距離的六次方成反比。基於以上認知，若欲直接以超高空間解析力的方式觀測分子間的交互作用，仍是目前技術所未及的。但若利用量測螢光生命期的方式，即利用在時間軸的量測並應用偶極-偶極交互作用的模型，間接推算分子間的距離與交互作用的強度，則可「觀測」(或推測) 分子動力學。這樣的想法即是藉時間解析成像量測螢光生命期進而推知分子間交互作用的基礎<sup>(18)</sup>。

在時間解析成像中並不嘗試改善光學顯微術的點擴散函數 (亦即解析度)，它是藉偵測螢光分子發光生命期的變化，用以推測分子間作用的強度與距離。時間解析顯微成像 (time-resolved microscopy/spectroscopy) 已成為最近快速發展且極為重要之主題，其具體之技術則為 FLIM/FRET (fluorescence lifetime imaging microscopy/fluorescence resonance energy transfer)。螢光衰減之時間常數，反映了螢光分子之間或與周遭環境的交互作用，即螢光共振能

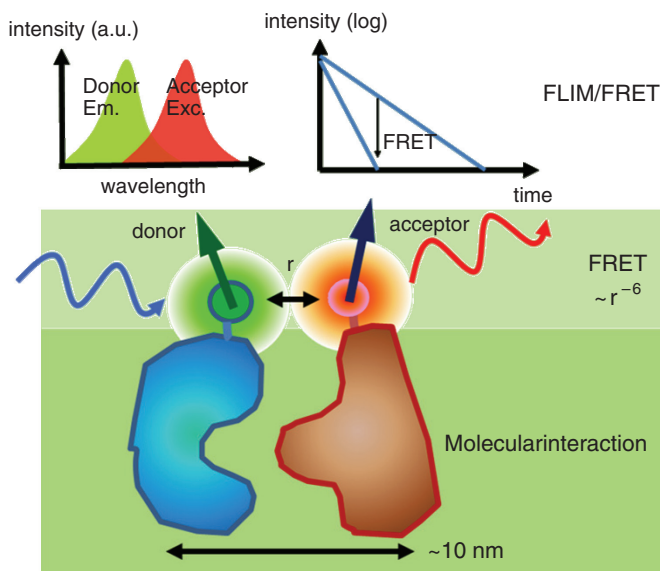


圖 6. 螢光共振能量轉移示意圖。

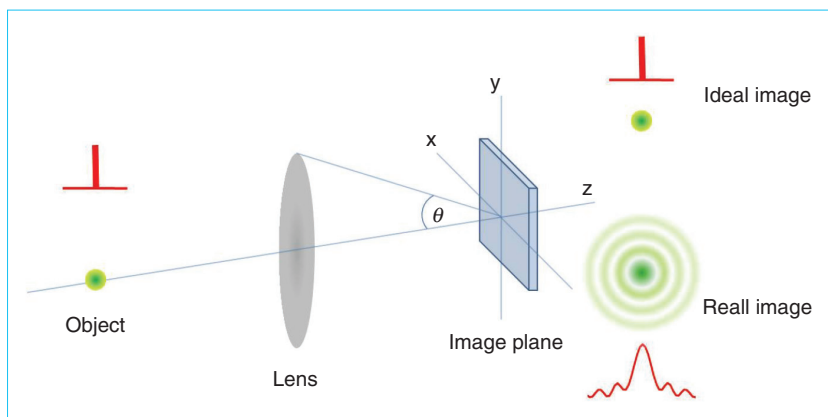


圖 7.  
點光源成像示意圖。

量轉移 (FRET) 效應。而產生螢光共振能量轉移效應，如圖 6 所示，需滿足四項條件：

- (1) 施體 (donor) 的放光頻譜與受體 (acceptor) 吸收頻譜重疊大於 30%。
- (2) 二個交互作用螢光分子的距離須在 1 nm 至 10 nm 之間。
- (3) 施體與受體的偶極矩在相互平行的方向上。
- (4) 施體的螢光放射具有高的量子效率。

它的特點是如此轉移的效率與分子間距離的六次方成反比，因此對分子間距離的細微變化極為敏銳。

#### 四、結語

在生醫光電領域蓬勃發展下，國內在過去十餘年於光學顯微技術的進展上，已累積了相當不錯的成果。整體而言，國內在光學顯微技術的研究上已不僅純然地被動接受商業化的系統，而能針對切合主題的應用，進行特定成像模式的開發。目前，國內已有不少實驗室正著手進行顯微技術的發展，相信在不久的將來，能提供國內研究更多樣性的應用及探索更微小的結構變化。

#### 附註<sup>(19)</sup>

在 1873 年德國科學家 Ernst Abbe 提出顯微鏡成像理論中，以光的繞射觀點來解釋顯微鏡成像過程。在以透鏡為主的成像系統中，如圖 7 所示，一個點光源在理想的光學成像系統所觀察到的影像應該完全與物體一樣。然而，在真實的成像系統中，

由於光的繞射現象及透鏡大小的限制，所觀察到的影像並非只有一個點，而是形成繞射圖形，稱為 Airy disk。在數學上，利用點擴散函數 (point spread function, PSF) 來描述點光源成像過程及繞射圖形產生，也就透過點擴散函數來決定顯微鏡的解析能力。而根據萊利準則 (Rayleigh criterion) 所定義影像的解析度為此繞射圖形中心最亮的位置到第一暗帶間的距離，即  $d = 0.61 \lambda / \text{N.A.}$ ，其中  $\lambda$  為光波長，N.A. 為數值孔径。例如波長為 500 nm、N.A. 為 1.2 的光學成像系統中，其橫向解析度約為 250 nm，當二個物體間的距離小於這個範圍時，我們便無法辨別這二個物體。

#### 參考文獻

1. E. Hecht, *Optics*, 4th ed., Addison Wesley (2001).
2. Y. Garini, B. J. Vermolen, and I. T. Young, *Current Opinion in Biotechnology*, **16** (1), 3 (2005).
3. M. G. L. Gustafsson, *PANS*, **102** (37), 13081 (2005).
4. S. W. Hell and J. Wichmann, *Opt. Lett.*, **19** (11), 780 (1994).
5. M. Minsky, “共焦系統應用於顯微鏡”，美國專利編號為 3,013,467, <http://www.patentstorm.us/patents/5452125-description.html>
6. [Http://www.olympusamerica.com/seg\\_section/Seg\\_tirfm.asp](http://www.olympusamerica.com/seg_section/Seg_tirfm.asp)
7. S. W. Hell, *Science*, **316**, 1153 (2007).
8. S. W. Hell, MPI BPC/Department of NanoBiophotonics, <http://www.mpibpc.gwdg.de/groups/hell/>, STED-Microscopy, <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/200/STED.htm>
9. S. W. Hell, S. Jakobs, and L. Kastrup, *Appl. Phys. A*, **77**, 859 (2003).
10. C. K. Ullal, R. Schrader, S. W. Hell, and A. Egner, *Nano Lett.*, **9**, 2497 (2009).
11. R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer, *J. Opt. Soc. Am. A*, **19** (8), 1599 (2002).
12. K. Fujita, M. Kobayashi, S. Kawano, M. Yamanaka, and S.

Kawata, *Phys. Rev. Lett.*, **99**, 228105 (2007).

13. G. H. Patterson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, *4th IEEE International Symposium*, **12** (15), 940 (2007).
  14. E. Betzig, *SCIENCE*, **313**, 1642 (2006).
  15. M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, *Nature Methods*, **3** (10), 793 (2006).
  16. X. Zhuang, *Nature photon*, **3**, 365 (2009).
  17. E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling, and S. H. Hell, *Nature Photon*, **3**, 144 (2009).
  18. J. R. Lakowicz, *Principle of fluorescence*, 3rd ed., Springer, 497 (2006).
  19. [http://en.wikipedia.org/wiki/Point\\_spread\\_function](http://en.wikipedia.org/wiki/Point_spread_function)
- 



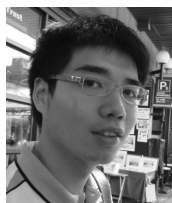
高甫仁先生為美國紐約州康乃爾大學物理博士，現任國立陽明大學生醫光電研究所教授兼所長與副研發長。

Fu-Jen Kao received his Ph.D. in physics from Cornell University, USA. He is currently a professor in the Institute of Biophotonics at National Yang-Ming University. He also serves as the associate dean in the Office of Research and Development.



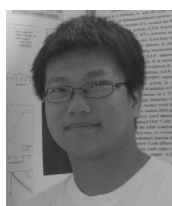
林伯彥先生目前為陽明生醫光電研究所博士班學生。

Po-Yen Lin is currently a Ph.D student in the Institute of Biophotonics at National Yang-Ming University.



林奕呈先生為國立陽明大學生醫光電研究所碩士。

Yi-Cheng Lin received his M.S. in biophotonics from National Yang-Ming University.



呂宏洲先生為國立陽明大學生醫光電研究所碩士。

Hong-Chou Lyu received his M.S. in biophotonics from National Yang-Ming University.