

活細胞影像研究之展望



前言

1936年，Frits Zernike 所發明的位相差顯微鏡 (phase contrast microscope) 為擷取活體細胞影像奠定了最佳基礎；1938年，由 Carl Zeiss Jena 繼續發展，形成一套實用的方法。Kurt Michel 和 Loss Kohler 於 1941 年首創以位相差的方法呈現活細胞之染色體。位相差顯微鏡系統係利用對比的方式使影像呈現階段性的微小變化，透過這個發明，加速了細胞學和許多維持生命過程之複雜動力學的研究，活細胞的神秘面紗逐漸褪去，細胞內到底如何運作的謎團逐漸被解明。

現況

由 Zernike 和 Nomarski 初步建立的視覺影像擷取技術，近年來因為相關科技的突破，有了快速的進展。包括：一、將雷射技術應用於精密的共軛焦雷射掃描和多光子顯微鏡系統；二、數位攝影技術的發展使得影像擷取更加便利；三、藉由多元而價格合理的電腦程式，顯微鏡及攝影器材的功能更能充分發揮，易於自動化；四、發現基因可以控制生物體的發光機制，藉此作用來標定細胞蛋白質，科學家因此較易標定活體細胞及獲取細胞不同功能及結構特徵等資訊。

顯微鏡功能的日趨精密，已使光學顯微

趙乃賢、蔡馥擘

水產試驗所水產養殖組

鏡可以取代部分利用生物物理、生物化學及活體外觀察等方式以獲取影像的方法。研究者也已藉由這些技術的應用，史無前例地證實了在活體細胞內蛋白質的活動及其間的交互作用。由於顯微鏡及影像獲取技術的快速發展，促使活體細胞影像成為未來細胞研究領域的主流，利用這些技術可陸續偵測出各種蛋白質種類及各別蛋白質的行為。而顯微鏡製造廠商則快速積極地研發功能更為多樣化的顯微鏡系統。綠色螢光蛋白的發現，使得觀察活細胞影像的技術有了重大的革命性進展，因為具有自發性螢光的小分子可以利用基因重組的方法與我們想研究的蛋白質 cDNA 結合。綠色螢光蛋白為基礎的生物感測技術，為光學科技開啟了許多可能的領域，尤其是在各個不同層次訊息傳遞物質的探針的研發。

光學顯微鏡術之應用

目前科學界對蛋白質與脂質如何在細胞內互動進而支配生長、修護以及各胞器的功能，已由細胞外重建細胞生理過程跨越到利用原子層次的分析來解答這些現象。但是這些方法只能提供靜態的、素描的細胞影像，若能利用光學顯微鏡直接觀察到細胞內正在發生的生理過程，則對細胞各個生理功能的解明將有突破性的進展。



一、螢光造影

綠色螢光蛋白的發現對活細胞影像的觀察技術造成革命性的進展。綠色螢光蛋白為基礎生物感測技術開啟許多可能的領域，例如應用於探針 heterotrimeric G protein 的活性或是 phosphoinositide signaling，或可將綠色螢光蛋白標定運用在特定的胞器上，用以分析鈣離子的動態等。

FLAsH (fluorescence arsenical helix binder) 的標定技術提供了另一種方法，它是利用四個鍵結的 cysteine (tetracysteine, CCXCC) 與欲標定的蛋白質結合。此結構的化合物送入細胞之後，再與一種本身不帶螢光性質的雙砷化合物反應而產生螢光。但是這項技術的弱點是在於 FLAsH 進入細胞後會同時與其他同樣帶有 CCXCC 相似結構的蛋白質結合而造成偽陽性。

還有許多其他具有開發潛力的探針可以應用於標定細胞。特定的螢光性脂質分子以及標定特定胞器的染料，它們通常都是可以直接加入細胞培養基，並且能夠直接透過細胞膜，或是利用顯微注射的方式進入細胞。

二、活細胞造影

觀測活細胞時，必須注意三項重點，即偵測工具之靈敏度、獲取影像的速度以及樣品本身的存活力。在許多情況下，沒有任何單一種影像系統是完美的，必須從中妥協，如提高影像擷取速度時，相對地可能提高樣品之破壞和雜訊之產生。

(一) 影像偵測的能力

1. 三維造影 (three-dimensional imaging)

共軛焦顯微鏡能夠獲得三維影像。以傳統顯微鏡觀測樣品，當其偏離焦平面時，會產生散焦的情況，而對於焦平面所產生的影像造成干擾，而此時影像中心的強度亦會隨著降低，但經共軛焦顯微鏡所取得影像的強

度隨散焦距離的變化則比傳統顯微鏡劇烈得多，也就是說共軛焦掃描顯微鏡僅在聚焦面上形成清晰的影像，若我們逐步移動聚焦面，則可取得觀測樣品深淺有序的截面，將這些截面的影像經由電腦處理，即可重組出相對應的三度空間影像。

2. 多光子激發法用在活體造影 (multiphoton approaches to in vivo imaging)

雙光子激發相對於單光子激發有明顯的優點，它可以利用較長波長激發光得到較深的穿透深度，降低光漂白效應。若在焦點附近形成有效的激發，可以觀察到該位點的影像，並且可直接分析整個器官或組織。本系統可應用在直接觀察腫瘤的發育或是透過較薄的骨，觀察神經發育。

(二) 擷取影像速率

數據的擷取速度很重要，尤其在許多感光物質同步被造影或是要分析單一探針比例時。雷射光束的切換或將單色光作輸出都會降低影像擷取速率。光碟共軛焦顯微鏡能夠提供每秒最大360張影像的速率；而靈敏度和影像擷取速率對於Nipkow disk系統，取決在CCD的品質。一般相機無法勝任所有的情況，因此只有正確的搭配光學與電子元件方能達到最佳表現。

(三) 限制細胞損傷

由於激發螢光物質的光束除了會造成光漂白之外，也會傷害細胞，所以要儘可能降低光束照射的強度和時間，最基本的要求是在不需要光照時將它關閉，並且小心排除未使用到的波長光束。此外，不應只倚賴簡單的激發光束濾片，其他方法如將培養基中的酚紅與血清移除亦會有助於降低背景螢光。

此系統需要仰賴最佳的光源，所以應使用高孔徑數的鏡頭並且儘可能減少光通路中的光學元件數量。感光元件的靈敏度是此系

統的關鍵，越靈敏的感測器越可以降低光束照射所需的強度，例如後照明 (back-illuminated) CCD (charged-coupled device) 照相機，現在已經可以用晶片控制來增加它的感測性。另一個簡單提升靈敏性的方式是利用多像素整合的方式，不過可能會降低影像的解析。

三、其他應用在生物影像方面的顯微鏡

亮視野影像，主要搭配螢光顯微鏡，能提供有關細胞外型、位置的影像，其中位相差 (phase contrast) 與微分干涉差 (differential interference contrast, DIC) 顯微鏡是最常被應用的。全反射 (total internal reflection, TIR) 系統可觀察許多只侷限在胞內某些區域發生的細胞生理現象，如細胞膜上。全反射螢光顯微鏡系統 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) 能夠提供細胞與黏附基材交界處縱深約 100 nm 的生理現象影像；若應用在活細胞中，可以觀察細胞骨架中的肌動蛋白在胞飲作用所扮演的角色，也可以連結光漂白或寬視野影像。光漂白實驗是由於掃描式雷射共軛焦顯微鏡能夠將光束控制在固定的區域；其主要分為光漂白後螢光回復 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 以及光漂白期螢光消退 (fluorescence loss in photobleaching, FLIP) 兩種，目前廣泛的使用在探討某個連結綠螢光蛋白的蛋白質在細胞中動態散布的能力。螢光共振能量轉換 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 過程發生在兩個光譜能量重疊的螢光物質很接近的時候，能量可以由一個供給者探針遞給接受者探針，而使接受者探針被激發。這項技術由於螢光共振能量轉換常常沒有效率而有所限制，許多原先假定的螢光共振能量轉換組合並不會真的在活細胞中產生

螢光共振能量轉換，發生螢光共振能量轉換的情況通常是這兩個被標定的蛋白質彼此以共價鍵結。螢光生命期造影 (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) 量測該螢光探針在細胞中的生命期；螢光共振能量轉換發生的時候，處於激發態的分子衰退得很快，而螢光生命期造影則是量測這類衰變的良好工具，例如可應用在計算活細胞中的激酶活性。

結語

活細胞影像的擷取技術仍有極大的挑戰空間。有效改善影像擷取的技術有助於提升使用活細胞樣本的可能性。目前許多儀器設計廠商對於活細胞圖像的擷取裝置的設計能力仍有改進的空間。未來對於活細胞的分子標定過程需要更快速的影像擷取速率才能達成。另外，也必須降低活細胞影像擷取技術的成本，使得更多使用者能更輕易地使用。

或許未來所要面臨的更大挑戰是如何獲取整個生物體的活細胞影像。今後活細胞影像的快速發展需仰賴生物學家積極投入開發不同的螢光探針 (fluorescent probes)，以應用到我們想研究的不同種類蛋白質；也需要物理學家帶動顯微鏡系統及軟體的改進。藥廠及生物科技公司對活細胞影像可以有極大的貢獻，目前正有許多發展中的高通量與高容量平台朝向應用於細胞內局部動態的自動化分析；另一個平行發展的方向則是利用螢光性的生物感測材料提供細胞生理反應的造影。可以肯定的是未來在光學顯微鏡的應用會更進一步發展，而且對於生物科技以及其他我們所好奇的細胞研究都將有相當大的幫助。