

全反射螢光顯微術於生物物理的應用

邱宗凱 錢正浩 國立台灣大學物理系
連偉男 林奇宏 國立陽明大學微免所
E-mail: b7202009@ms.cc.ntu.edu.tw

摘要

全反射式顯微鏡可以在縱向上達到奈米等級的解析度，加上高訊號/背景比及其他許多優點，使的他在細胞表面及單分子偵測上有的許多便利之處，本文中介紹了全反射式顯微術的原理，各種光路架設跟比較，及一些生物上的應用。

前言

全反射現象發生在光從高折射率的介質入射到低折射率介質時，入射角大於臨界角的時候。而在全反射發生的介面會產生一種漸逝波，他的強度是成指數衰減的^[1]。利用這種性質，全反射式的顯微鏡可以僅僅激發介面上數十奈米的螢光分子，而達到奈米級的解析度^[1]。另外，由於僅僅激發表面的螢光分子，他的訊號/背景比比起其他的顯微技術都要高的很多^[2]。另外，由於全反射式顯微鏡是由 CCD 接收，接收訊號的頻率可以達到 200HZ，而一般掃描式的顯微鏡如共軛焦或雙光子顯微鏡大約只到達 0.1~5HZ^[3]。所以全反射式顯微鏡可以很容易的做到快速的顯影。雖然全反射式顯微鏡沒辦法像共軛焦或雙光子顯微鏡做到 3D 的斷面顯影，但是全反射式顯微鏡很容易可以跟其他光學技術配合，截長補短，得到具有不同性質的影像^[3]。以下我們會簡介全反射式顯微術的原理，光路的搭設及一些應用。

原理：

漸逝波的強度

當一道光束從折射率高的介質傳播到折射率較低的介質時，如果入射角大於臨界角時，就會有全反射現象的發生。根據 Snell' Law，我們可以得到臨界角 θ_c 為

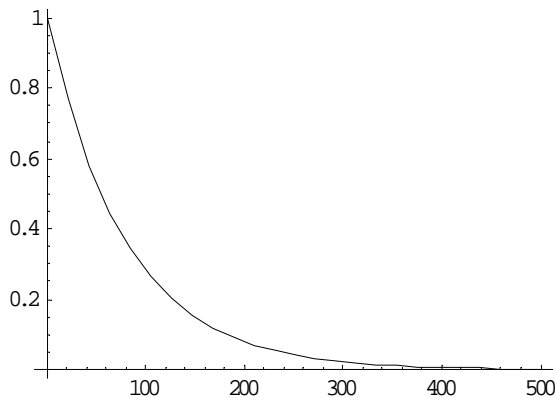
$$\theta_c = \sin^{-1}(n_2 / n_1) \quad (1)$$

在上列的公式中， n_1 及 n_2 分別為入射面及折射面的折射率。根據幾何光學來看，若發生全反射，光完全不會傳遞到折射面內。但是若是以電磁波的觀點來看，在發生全反射的介面，電磁場會透入一小段距離，我們叫這個波為漸逝波 (evanescent wave)。漸逝波是一個不會傳播的波，他的強度是成指數衰減的，但是如果在非常靠近介面的地方，有會吸收光的物質，例如螢光分子，漸逝波仍然是有能力去激發這個螢光分子，因而產生螢光。這個漸逝波的電場強度為

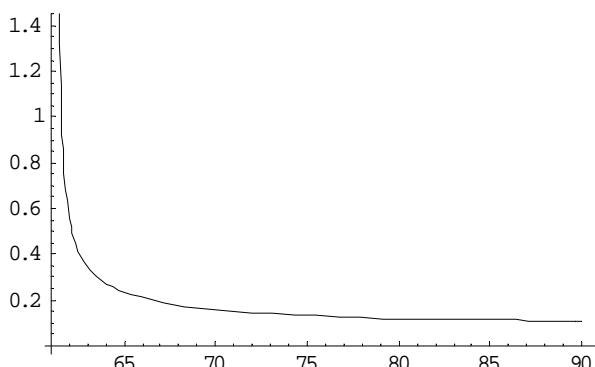
$$I_z = I_0 e^{-z/d} \quad (2)$$

$$d = \lambda / 4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2} \quad (3)$$

在上列公式內 I_0 為入射光強度, z 為縱軸距離, λ 為波長。由上式我們可以發現大於臨界角時越接近臨界角, d 越大, 入射的強度衰減的就越慢。除了入射角等於臨界角時, d 約小於或等於入射波長, 如此一來, 藉由調整光的強度及入射的角度, 我們就可以只激發介面上數十到兩三百奈米的螢光分子, 獲得介面上縱方向上奈米等級的解析度。



圖(一) I_0/I_z versus z (nm) 入射角:70 度 由折射率 1.515 到折射率 1.33 的介面中



圖(二) d verse 角度 由折射率 1.515 到折射率 1.33 的介面

漸逝波的電場

從 Maxwell Equations 中, 我們可以推導出漸逝波的各方向電場與強度 (s 和 p 波) 跟其角度和振幅的關係, 如下式[1]

$$E_s(z) = 2A_s \cos \theta (1 - n^2)^{-1/2} e^{-i\delta_s} e^{-z/2d} \hat{y} \quad (3)$$

$$E_p(z) = 2A_p \cos \theta (n^4 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta - n^2) e^{-i\delta_p} \times e^{-z/2d} [-i(\sin^2 \theta - n^2)^{1/2} \hat{x} + \sin \theta \hat{z}] \quad (4)$$

$$I_s(z) = \frac{(4 \cos \theta)(2 \sin^2 \theta - n^2)}{n^4 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta - n^2} e^{-z/d} \quad (5)$$

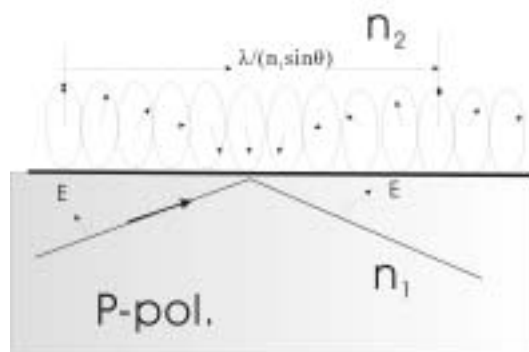
$$I_p(z) = \frac{(4 \cos^2 \theta)}{1 - n^2} e^{-z/d} \quad (6)$$

其中

$$\delta_s = \tan^{-1}[(\sin^2 \theta - n^2)^{1/2} / n^2 \cos \theta] \quad (7)$$

$$\delta_p = \tan^{-1}[(\sin^2 \theta - n^2)^{1/2} / \cos \theta] \quad (8)$$

值得注意的是, p-偏振方向沿著表面呈現一種以 $\lambda/(n_1 \sin \theta)$ 為空間週期的橢圓偏振, 如圖所示



圖(三) p-polarization 在全反射介面上的情形

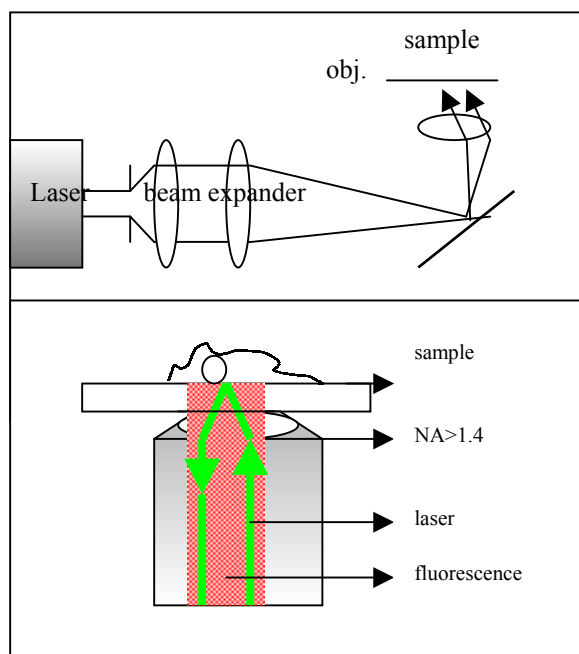
這種特別的偏振現象, 可以利用來測定表面螢

光分子的方向性及轉動^{[1][4]}。

全反射式顯微鏡的結構

全反射式顯微鏡主要可以分成兩種，一種是利用光透過稜鏡進行全反射，另外一種是利用特別的高 NA 值物鏡進行全反射(一般稱為 prism less 式的設計)^{[1][7][8]}，不論在哪一種設計，入射面及折射面的折射率都是很重要的，一般最常見的例子是透過蓋玻片觀察細胞表面，接下來會分別討論這兩種全反射式顯微鏡。為了方便起見，我們先假設我們是為了觀察黏附在載蓋玻片上的細胞表面。蓋玻片的折射率為 1.515，細胞表面的折射率為 1.38，如此一來，臨界角為 65 度，若是細胞沒有接觸到蓋玻片表面，則要考慮的是水溶液，折射率是 1.33，則臨界角為 61 度^[5]。

透過高 NA 值物鏡式之全反射顯微鏡設計



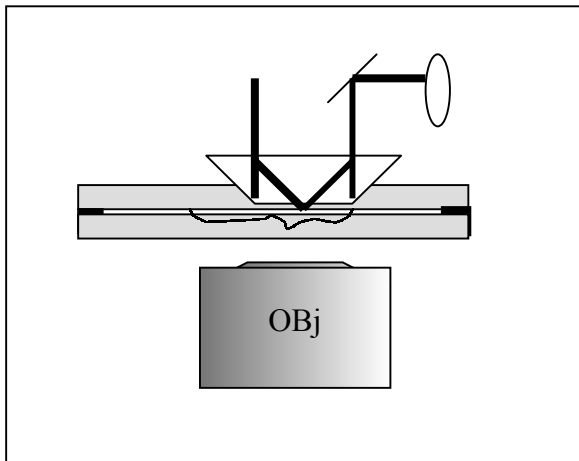
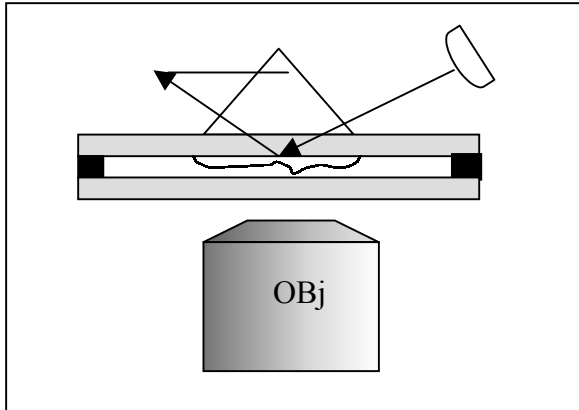
圖(四),圖(五)為物鏡式全反射顯微鏡基本的光路設計

光源經過擴束後打到物鏡的外圍，經過物鏡的偏折在蓋玻片和樣品的介面產生全反射。如果我們使用的是一般高 NA 值的物鏡，例如 NA=1.4 的油鏡，細胞表面折射率為 1.38，透過 Snell's Law，我們可以知道臨界角等於 80 度，如此一來光束只能打在物鏡的邊緣(可用範圍約為 2.8%)，而且產生的全反射相當接近臨界角，漸逝波的強度就會變得很強，以致激發的深度加深許多，另外由於表面本身性質的不均勻，會造成一些入射的光不是以全反射而變成了折射。所以透過物鏡的全反射式顯微鏡要透過特製的高 NA 值物鏡來建造^[1]。目前有兩種選擇，一個為 Olympus NA=1.65 的物鏡，如此一來臨界角變為 57 度，可以調整的角度範圍就大幅提昇了(約為 25%)。使用這顆物鏡的缺點在於需要另外定製高折射率的蓋玻片跟物鏡油。另外一種物鏡的選擇是 Olympus or Zeiss NA=1.45 的物鏡，用這顆物鏡，可以使用標準的蓋玻片及物鏡油，且可以使用足夠的物鏡範圍(約為 10%)，這個是目前一般認為比較好的選擇^{[1][3]}。透過高 NA 值物鏡的全反射式顯微鏡的好處是光路的搭設簡單，顯微鏡的台子會有更多的空間可以用來操作。且透過高 NA 值的物鏡，可以有較好的解析度跟亮度。而他的缺點是會收到不是由全反射所激發出的螢光，主要的原因是由於細胞表面的不平整會造成的散射，還有物鏡本身發出的冷光^{[1][3]}。

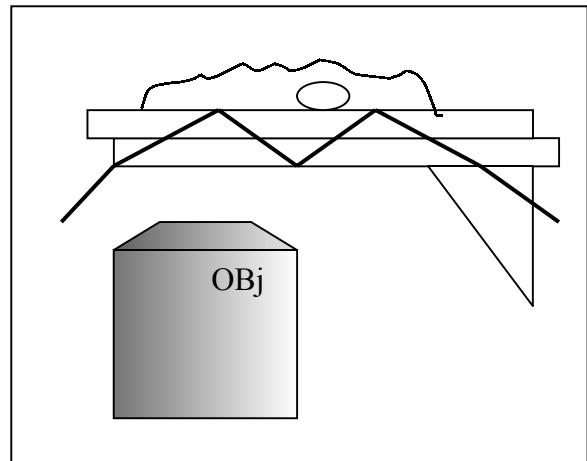
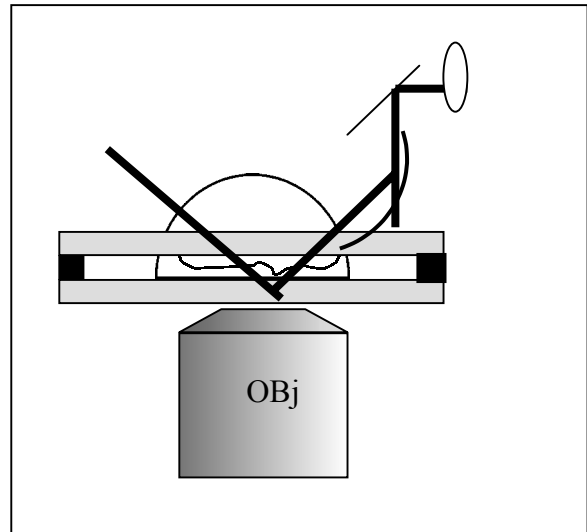
稜鏡式的全反射式顯微鏡

稜鏡式的全反射式顯微鏡一般都搭在倒立式顯微鏡之上，因為這樣會有比較多的空間去加裝一些光學物件，但正立式顯微鏡仍然有相當的便利性。基本的光路設計都是將光打入稜鏡，在蓋玻

片的表面進行全反射，稜鏡的所則有很多種，可以適用在不同目的的實驗上。下圖是一些常見的光路設計



圖(六) 圖(七)



圖(八) 圖(九)

圖(六)的設計相當的簡單便利，光從三角形稜鏡的側面打入，在下方進行全反射。圖(七)這種設計是利用一個 60 度的稜鏡加工，光可以垂直射入，好處是再替換樣品以後，光很容易可以打到原來的位置。圖(八)這個設計中的鏡子是拋物面鏡，焦點對準半圓形稜鏡的圓心，如此一來，變換角度時也可以打到同一點，只要垂直的變化光入射的位置，就可以變化入射的角度了。圖(九)這個設計和前面的設計比較不一樣，稜鏡是放置在下方的，光從稜鏡進入後，在蓋玻片內做多次全反射，如同波

導一般。這個設計的好處是他上方有很大的空間可以利用，而且更換樣品也很容易，只需要換上層的蓋玻片就可以了。但是這個設計就不能使用油鏡，只能使用水鏡或空氣鏡^[1]。

上面這些透過稜鏡式的全反射式顯微鏡跟物鏡式的比較起來，(1)造價便宜很多(2)角度變化的範圍很大，也且也很容易變換。但可利用的空間較少。而且由於高 NA 值的油鏡工作距離相當短，樣品的兩片蓋玻片之間距離很近，很難去作微流和其他的操作工作。如果是採用(九)圖的設計又不能使用油鏡。另外，解析度也不如物鏡式的全反射顯微鏡。

綜觀兩種全反射式顯微鏡，都可以搭建在一般標準的顯微鏡上，照價和共軛焦顯微鏡比較起來也便宜很多，而且可以提供更好的縱向解析度，另外全反射式顯微鏡也很容易和很多的顯微方法結合，例如 FCS，FRAP，FRET，FLIM，光鑷子，共軛焦顯微鏡，雙光子顯微鏡，原子力顯微鏡等等^{[1][3][4]}。

全反射式顯微鏡的應用

許多生化上的反應都是發生在細胞膜和周圍環境的介面，例如膜蛋白質的運動，生物巨分子的傳輸與交互作用等等^{[8][9][10]}，全反射式顯微鏡可以說是一種非常好的觀察工具，另外，由於全反射式顯微鏡的高訊號/背景比例，近年來也開始以全反射式顯微鏡配合其他光學技術，做單分子的觀測^{[11][12]}。下面會概略的介紹一些應用全反射式顯微鏡的例子。

蛋白質-細胞膜的結合平衡與動態

在很多情況之下，表面螢光的強度正比於膜蛋白的密度，藉由量測表面的螢光強度，我們可以得知和表面結合的膜蛋白的密度變化，如此一來就可以得到膜蛋白和細胞膜表面的結合速率，平衡常數的訊息^{[13][14]}。

分子的方向性和旋轉速率

如同式(3),(4)所示，我們可以使用偏振化的漸逝波來測量表面的螢光分子吸收/發散偶極矩的方向性，可以用來測量細胞膜表面方向性的變化^{[15][16]}。另外，配合螢光分子專一位置結合和 FRET 的技術，也可以用來測量單分子的旋轉，結構的改變等等^[17]。

受器的叢生(Receptor Clustering)

在很多的情況中，受器的叢生代表細胞膜表面調整訊號的轉換，利用全反射式顯微鏡配合 FCS，可以測量到受器叢生的發生^{[18][19]}。使用全反射式顯微鏡的好處除了低背景和高縱向解析度以外，由於全反射式顯微鏡是固定區域已 CCD 接收影像，跟以 PMT 接收，一點一點掃描的顯微鏡比起來，全反射式顯微鏡是 Autocorrelation 的，這在資料分析上會有很大的方便性^[20]。

高時間解析度的測量

所以利用全反射式顯微鏡可以作為在介面上高時間解析度的螢光測量，配合快速傅立葉轉換，將時域轉為頻域，可以達到奈米秒等級的時間解析度^[21]，如果利用一種相位解析漸逝波的方法，可以達到皮秒的時間解析度。這種方法是利用一個高頻的正弦光波做全反射^{[22][23]}。

單分子的偵測

單分子的偵測再近年來造成一股生物物理界的熱潮,但是由於單分子的顯影最大問題在於訊號/背景比太低了, Funatsu et al. 試著非常小心的設計出一套背景最低的光學系統,大約可以將背景降低到數千到 140 個光子每秒每繞射極限面積(0.25×0.25)^[4], 而利用同一套系統配合全反射式顯微鏡, 可以將背景降至 3 個光子每秒每繞射極限面積, 這在單分子的偵測上面有著非常大的便利^[4]。而且全反射式顯微術很容易跟別的光學技術搭配, 例如 Yanagida 等人利用光鑷子配合全反射式顯微術, 觀察到了 RNA 聚合酶單分子在 DNA 上的運動^[24], 還有 Chu 也利用全反射式顯微術觀察單 ribozyme 分子的結構變化^[28]。

結論與展望

我們在這篇文章中簡介了全反射式顯微鏡的原理, 光路上的設計和一些應用。其間還有很大的發展空間。在技術的改進方面, 一個方向是將全反射式顯微鏡和各種光學技術結合, 例如我們提到過的 FCS, AFM, FRET 等等, 另一方面是做多色的全反射式顯微鏡, 如此一來就可以同時觀察細胞表面不同分子的交互作用^[29], 另外配合一些特別的螢光分子, 例如啶黃素核甘酸(flavin nucleotide)的類似物和量子點(quantum dots), 因為其特殊的光學性質和生物相容性, 可以在單分子偵測上有相當的便利。在研究的題目方面, 除了表面分子的性質外, 全反射式顯微鏡在細胞骨架(cytoskeleton)和基質之間的作用(例如微小(microtubules)和肌動蛋白(actin)的研究)也是相當重要^{[25][26][27]}。另外, 最近相當熱門的研究就是利用綠色螢光蛋白(GFP)做為

蛋白質的螢光標記來研究蛋白質在細胞中的表現, 而全反射式顯微鏡就是其中一個分析的最佳工具之一。縱上所述, 全反射式顯微鏡有著很多特別的優點, 包括奈米等級的縱向解析度, 高訊號/背景比, 架設容易便宜, 和其他的光學方法容易結合等等, 毫無疑問的, 不論在細胞和單分子的顯影, 偵測上, 全反射式顯微鏡都占有相當重要的地位。

參考文獻

- [1] Daniel Axelrod, Nancy L. Thompson, Thomas P. Burghardt, *Methods in cellular imaging*, p.362-380, Oxford University Press
- [2] W. Patrick Ambrose, Peter M. Goodwin, and John P. Nolan *Cytometry* 36:224-231 (1999)
- [3] Derek Toomre and Dietmar J. Manstein *TRENDS in Cell Biology* Vol.11 No.7 July 2001
- [4] Nancy L. Thompson *Current Opin. In Biotech.* 1997, 8:58-64
- [5] Oheim, M. *Imaging transmitter release. II. A practical guide to evanescent-wave imaging.* *Lasers Med. Sci.* (in press)
- [6] Steyer, J.A. and Almers, W. (2001) A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 268-275
- [7] Terakawa, S. et al. (1997) Development of an objective lens with a high numerical aperture for light microscopy. *Bioimages* 5, 24
- [8] Schmoranzler, J. et al. (2000) Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 149, 23-32

- [9]Zenisek, D. et al. (2000) Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406, 849–854
- [10]Anshu Bagga Mathur, George A. Truskey, and W. Monty Reichert, *Biophysical Journal* Volume 78 April 2000 1725–1735
- [11]Pierce, D. and Vale, R.D. (1999) Single-molecule fluorescence detection of green fluorescence protein and application to single-protein dynamics. *Methods Cell Biol.* 58, 49–73
- [12]Ishii, Y. and Yanagida, T. (2000) Single molecule detection in life science. *Single Mol.* 1, 5–16
- [13]W Vanden broek et al. , *Biophys J Abstr* 1995, 68: A406
- [14]Hsieh HV et al. , *Biochemistry* 1995, 34:12481-12488
- [15]Bos M et al. , *Langmuir* 1996, 12:3980-3985
- [16]Bos M et al. , *Langmuir* 1995,68:2566-2572
- [17]Chang I et al. *Langumir* 1995, 11:2083-2089
- [18]Huang Z, et al. *Biophy J* 1996, 70:2001-2007
- [19]Wang MD et al. *Bioimaging* 1994, 2:22-35
- [20]W Vande broek et al. *Biophys J Abstr* 1996, 70:A423
- [21]Bickness S et al. *Biophys J* 1993, 65: 1272 -1282
- [22]Hamai S, et al. *J Phys Chem* 1995, 99: 4980 -4985
- [23]Phimphivong S: *Anal Chim Acta* 1995, 307: 403-417
- [24] Yoshie Harada, Takashi Funatsu, Katsuhiko Murakami, Yoshikazu Nonoyama, Akira Ishihama, and Toshio Yanagida *Biophysical Journal* Volume 76 February 1999 709–715
- [25]Susan E. Sund, Joel A. Swanson, and Daniel Axelrod *Biophysical Journal* Volume 77 October 1999 2266–2283
- [26]Funatsu, T. et al. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* 374, 555–559
- [27]Vale, R.D. et al. (1996) Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* 380, 451–453
- [28]Zhuang XW, Kim H, Pereira MJB, Babcock HP, Walter NG, Chu S *SCIENCE* 296 (5572): 1473-1476 MAY 24 2002
- [29]Sako, Y. et al. (2000) Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 168–172