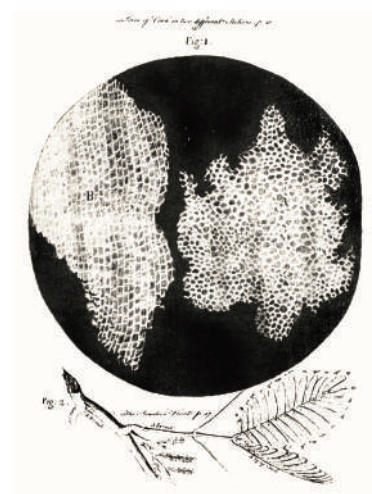
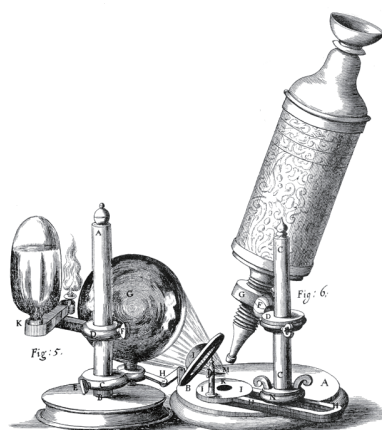


習以為常的智慧結晶——細胞顯微技術

培養細胞時我們每天都使用的顯微鏡，似乎是再平常不過的基本配備，但您知道嗎？其中許多的技術在過去曾經撼動整個世界，本篇將以常見的細胞用顯微鏡為例，一一細數其中包含的智慧結晶。

最早的顯微鏡可追溯到 16 世紀，而奠定現代顯微鏡基礎的則是我們耳熟能詳的虎克(Robert Hook)，他在17世紀60年代創造了一台近似現代構造的顯微鏡(圖一)；隨後李文霍克(Van leeuwenhoek)運用此技術首次觀察到了微生物，使西方醫學在此之後突飛猛進；而1893年克勒(August Kohler)運用光圈與透鏡的組合使燈源均勻並聚焦於樣本上，日後稱此技術為克勒式照明；光學顯微鏡至此大抵定形。

其中有一段較少被提到卻對細胞顯微技術相當重要 - 倒立顯微鏡的發明，1850年史密斯(J. Lawrence Smith)將燈源與物鏡位置對調，使載台能有更多空間放樣本，大幅改進傳統正立顯微鏡可接受樣本厚度的限制(圖二)；時至今日，倒立顯微鏡使我們能將培養皿(dish)或培養瓶(flask)放上載台，搭配長工作距離物鏡(Long working distance objectives)則能穿透塑膠容器壁，聚焦於容器中；但早在20世紀初細胞培養技術蓬勃發展之前人們就已經注意到了一個問題：顯微鏡很難看到透明的物體。

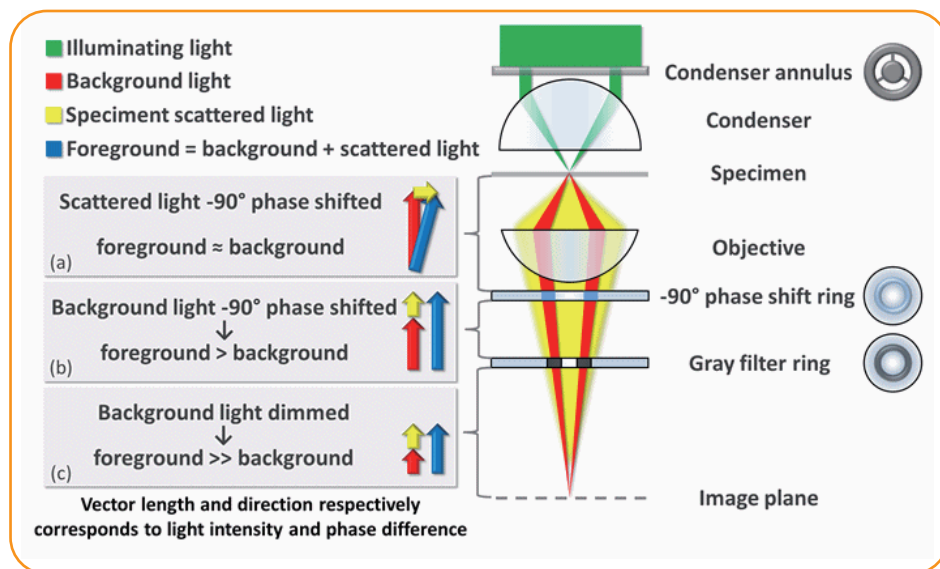


圖一、上：虎克顯微鏡手稿。下：以虎克顯微鏡所觀察到的植物細胞壁。



圖二、標準倒立顯微鏡。

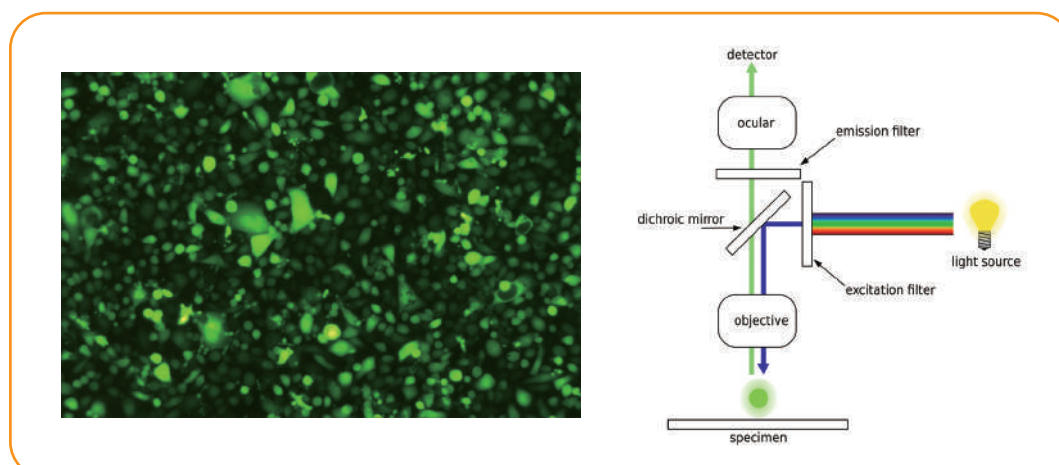
我們經常認為顯微鏡能看見細胞是理所當然的，但如同上文所述，對於100年前的科學家來說，要看見透明的細胞是不可能的任務。1932年，一項革命性技術的出現克服了此一困難 - 相位差系統(Phase Contrast)。此技術由荷蘭物理學家賽諾克 (Frits Zernike) 所發明，利用光源前方的環狀光閘 (condenser annulus)製造空錐形光源，搭配物鏡內的相位差環 (phase shifting ring) 改變光波的相位 (phase)，提高樣本不同結構間的對比度 (contrast)，使未經染色的透明樣本如細胞也變得清晰可見(如今多以相位差板代稱環形光閘)。裝置雖然簡單，但其中的原理絕對可稱為智慧的結晶：光在穿透結構不同的透明樣本時，小部分成為折射光，相位發生偏轉，但此過程光強度改變不大，難以被人眼偵測，因此很難在傳統光學顯微鏡中分辨透明樣本與背景；此時可選擇將以相位差板偏轉背景光，使其與折射光重合，造成樣本較背景更明亮，進而能以明暗分辨，稱為明相差 (Bright Contrast)，此為最普遍的相位差模式(圖三)；另一種則恰恰相反，利用相位差板偏轉折射光，使其與背景光相消，造成樣本比背景更暗，稱為暗相差。



圖三、明相差系統原理。

綠：入射光，紅：背景光，黃：折射光，藍：前景光 (重合的背景光與折射光)。
 步驟一：由環狀光閘產生的空錐狀入射光照射樣本，產生折射光與背景光，折射光發生偏轉。
 步驟二：物鏡內的相位差板偏轉背景光，使其與折射光重合。
 步驟三：以物鏡內減光片減除背景光，使折射光於視野內明顯可見。(圖片取自wikipedia)

當科學家能清楚看見細胞的外觀後，理所當然開始希望能看見細胞的內部構造，但想要在透明樣本中分辨內部的細微構造實在太困難，因此重新出現了進行“染色”的想法，然而傳統染色法無法分辨細胞內的胞器，更遑論各種分子。在免疫學快速發展的20世紀80到90年代，抗原抗體的專一性反應很快就被應用在分子生物學研究領域；幾乎在同一段時間，科學家開始認識水母螢光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的獨特性質：只受藍光(488nm)激發而產生綠光(509nm)，此特性很快地受到矚目，並在往後的20年間開發出了上千種螢光蛋白，與專一抗體結合，便發展出了能觀察到特定分子的螢光標定技術(圖四左)。此技術成功地實現了科學家觀察細胞內分子的願望，但仍需要一些顯微鏡配備的支援：首先是能發出特定波長的光源，過去因為無單色光源，因此只能使用高強度的汞燈配合濾鏡產生單波長光(現可由高強度LED取代)，我們稱為激發光(excitation)，被標定樣本接受激發光後會產生另一波長的光，稱為散射光(emission)，此時藉由另一濾鏡濾除激發光後，我們便能看見螢光影像(圖四右)；另一方面，由於螢光的亮度較低，需要聚光能力較高的物鏡才能觀察，因此一般需使用半復消色等級以上的物鏡(semi-apochromatic lens)進行觀察，由於廣泛應用於螢光顯微實驗中，此等級的物鏡經常被稱為螢光物鏡(fluorites)；而擁有以上配備而擁有觀察螢光樣本能力的顯微鏡稱為螢光顯微鏡，目前在生物研究領域擁有相當廣泛的應用。



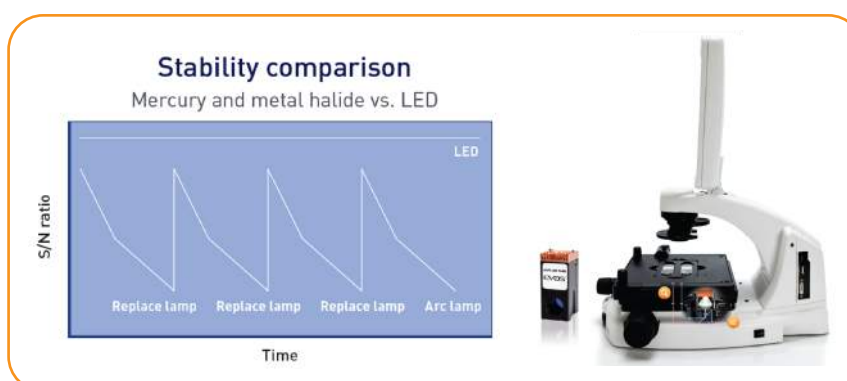
圖四、左：經基因轉殖技術修改而表現GFP的細胞。右：螢光顯微鏡運作原理。藍：激發光，綠：散射光。

岑祥不僅僅提供傳統配置的螢光顯微鏡，更有次世代的螢光顯微攝影系統 - EVOS。EVOS除擁有傳統螢光顯微鏡的功能外，更有許多嶄新設計，改進過去的缺點：首先，EVOS全系列皆為整合式影像系統，機體內包含顯微鏡、科學相機、電腦的三合一設計，大大減少占用空間；且全機僅一條電源線即可使用，不只移動方便，更不會有過去龐雜的線路需要整理；以LCD取代目鏡，減低長時間螢光實驗的用眼負擔，同時能多人及時觀察(圖五左)，並使在無菌操作台(Laminar flow)內操作顯微鏡變成可能(圖五右)！



圖五、左：多人同時於EVOS系統觀察樣本。右：於無菌操作台內使用EVOS系統。

EVOS光源系統也採用業界領先設計，全系列皆使用高強度LED光源取代氙氣燈與汞燈，不僅強度穩定(圖六左)，壽命更長達50000小時，大大節省燈泡更換成本。嶄新的鏡體設計，使光徑長度僅有傳統顯微鏡的10分之1(圖六右)，有效減少訊號損失。搭配 Hard coated 濾鏡，提高 25% 透光度，擷取波長較傳統soft coated濾鏡更準確，減少色偏問題。



圖六、左：高強度LED與汞燈訊號穩定度比較。右：EVOS系統螢光光路示意圖。

EVOS FL 為 EVOS 系列旗艦機種，搭載整合式 LED-濾鏡組 (Light Cube)、內建相位差系統與高感度 SONY CCD，無論明視野、相位差、螢光影像皆有高水準表現(圖七左)。滑動式載台讓使用者能更快速尋找物標物，其上可選多種容器夾，不論是玻片、培養皿、培養盤皆能方便固定(圖七右)。軟體支援1鍵多通道疊圖、縮時攝影、細胞計數等功能，並大幅簡化參數調校過程，初學者也能輕鬆拍出完美影像！



圖七、左：EVOS FL外觀。右：滑動式載台與容器夾。

EVOS系列頂級機種EVOS FL AUTO搭載業界少見高規格硬體，除標準螢光與相位差系統，雙晶片相機讓您一次擁有高敏感單色影像與真實彩色影像，22吋獨立觸控螢幕使操作更方便，結合電動載台，達成顯微鏡全自動化(圖八左)！這套由軟體控制的顯微系統能輕鬆地做到自動對焦、玻片或多孔盤自動掃描，圖片拼接、Z軸堆疊或多通道疊圖當然也沒問題！還可搭配載台迷你培養箱，實現活細胞縮時攝影，將顯微鏡工藝推向極致(圖八右)！



圖八、左：EVOS FL AUTO與獨立觸控螢幕。右：EVOS FL AUTO搭配載台迷你培養箱。

顯微鏡經過5個世紀發展，由簡單走向精密，再由精密走向自動化，未來必定能突破更多限制，使我們對細胞內精細的構造有更多認識，不再是偵測，而是眼見為憑。

