

## [ 研究成果報導 ]

## 利用超高解析度 X 光顯微技術觀測次細胞結構

中央研究院物理研究所 胡宇光

## 摘要

X 光光學元件的製造及光源強度的進展使 X 光顯微鏡現在能利用達到奈米級的超高解析度。我們成功的以此項全新的技術，來分析細胞內之結構。一方面可以達到比光學顯微鏡更好之空間解析度，另一方面並能提供厚試樣三度空間以及表面形貌之影像。能夠達到這種前所未見的影像，關鍵因素主要是使用具高度同調性之同步輻射光源並搭配一高分辨率之相位波帶片 X 光顯微鏡，利用建立在折射率差異上之相對比機制來達成。目前以波帶片來放大穿透人類癌細胞後之 X 光影像時可獲得達 60 奈米之高品質影像。

## 一、前言

一個顯微技術之關鍵特性即在於其解析度與對比能力，而這些特性在 X 光顯微技術上可藉由不斷地增進在 X 光光源亮度與使用 X 光相對比(x-ray phase contrast)成像的方法來改進[1]。利用這些技術的進展我們證實了使用為分光的硬 X 光對在細胞層級以下之厚生物試樣進行 X 光相對比顯微成像具有相當多的優點。第三代同步輻射光源所產生之 X 光光源所具有的高同調性(coherence)使 X 光光學元素得以對 X 光有效的聚焦或放大，且亦解決因軟物質對 X 光微弱之吸收效應所導致成像對比不足的基本問題。解決對比不足的問題是藉由一種類似在可見光及電子光學中已被大量使用的一種之成像機制—利用物質中折射率（而不是吸收能力的）差異來生成像所需之對比。要能利用此項成像機制的先決條件是光源要具有相當的同調性。此機制在最近幾年內已成功的用來提高之空間解析度與對比，並被應用在解決傳統 X 光成像技術所不能解決的問題[1-6]。硬 X 光（波長小於 1Å）顯微技術之解析度之雖然可達到高奈米級的解析度

[7,8]，然而到目前為止並無任何實驗結果將此向新技術所顯示出奈米尺度之解析度應用在細胞層級以下之影像。

以高能量 X 光所具有的高穿透力，在完整或者是厚的試樣上在其自然狀態下作顯微觀察已經是 X 光顯微技術經常性的工作。藉由三度空間影像之成像與分析，我們可以探討結構與生物功能性間之相互關係。從近期初步的試驗裡我們以硬 X 光成功的取得活體狀態且未經染色之細胞的高解析度 X 光顯微影像，而利用這種方法所能使用的生物樣品之甚至可到幾公分厚。此外我們亦印證在不損失空間解析度情況下，可針對大量的厚試樣之投影影像以一合理且簡單之影像重組過程來完成此斷層攝影法。

以硬 X 光顯微技術所擷取之生物試樣影像解析度到底可以推展到什麼程度？就使用經驗來看，我們發現即使有同調性為主之機制下，生物試樣之自然對比仍有其極限。舉例來說，在研究蛋白質以及細胞胞器時需針對不同的特定目標顯像時，進行相當程度的標定可能是無法避免的。

在生物標定技術中免疫細胞化學技術最常被使用來做特定標記，以供後續之光學顯微鏡、螢光顯微鏡、雷射共焦顯微鏡以及穿透式電子顯微鏡觀測用。然而供顯微鏡技術所用而發展標記方法並不見得能符合 X 光顯微鏡之需求。因此依據特定之免疫細胞化學技術，我們發展出對特定細胞標記的方法，以供 X 光顯微鏡使用。在結合 X 光顯微鏡之高穿透性與高解析特性以及特定之免疫細胞化學技術下，我們可以研究特定之蛋白質結構以及其二度空間或三度空間分佈，且解析度更可達到奈米級之尺度。

在不使用 X 光放大元件的 X 光顯微鏡系統時，相對比可以利用變化調整樣品與探測器(影像裝置)間的距離，直接在影像中觀察到。即使是使用波帶片(zone plate)式的 X 光顯微鏡，相對

比也是可以利用不同的方式得到。利用類似於使用在光學顯微鏡上的裝置，針對 X 光顯微鏡利用奈米加工技術所製造的相位環有效的提高高解析度影像的成像對比。這些改進產生了第一個比光學顯微鏡解析度更佳的次細胞影像，並且大幅簡化樣品的製備。進一步的發展，包括提供在奈米解析度 X 光顯微造影上更多功能性的標記，以利於在奈米尺度下的吸收與相對比能力，我們的研究群已正在全面的進行。目前所達到的 30 奈米的解析度，距離 X 光繞射極限的限制尚遠，如果能在更佳的奈米製造技術下生產更高解析度的 X 光相波帶片，解析度一定可以再進一步提升。目前我們使用奈米科技國家型計畫所支持之中央研究院奈米核心設施，已能製造精度 30 奈米厚度超過 300 奈米的由電鍍金屬金所製造的高深寬比 X 光波帶片（例如圖一所示）。這樣的 X 光聚焦元件渴望將 X 光顯微技術的解析度進一步推進到 30 奈米（第一階繞設）/10 奈米（第三階繞設）的境地。利用更精密的 X 光光束線或者是使用亮度更高的 X 光源，我們能夠利用提高的 X 光亮度來改進 X 光顯微鏡的取像時間解析度，除了能直接觀察更快的動態現象外，同時也能減少活樣品中因移動所造成的影像模糊。

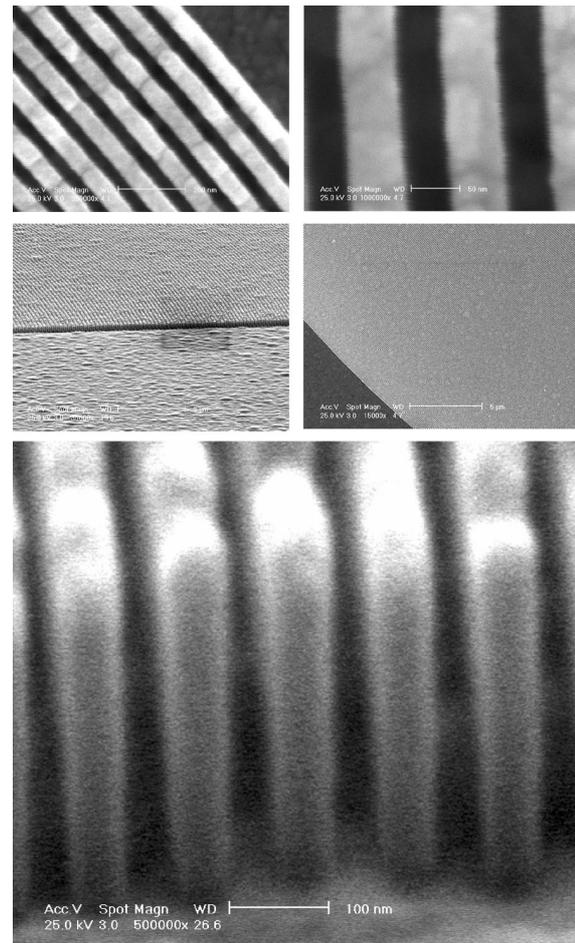
這裡所顯示的波帶片是由金所組成，最小線寬>50 奈米，高度>350 奈米。

## 二、實驗設施

利用國家同步輻射研究中心 BL01B 光束線之穿透式 X 光顯微鏡做為試片之觀察，由於此 X 光顯微鏡乃利用 Fresnel 波帶片所提供之三階繞射來使影像之倍率放大，其空間解析度可達到 30 奈米（使用非生物樣品作較長時間之取像），對於硬 X 光顯微鏡而言，此解析度已達到其世界紀錄。

除此之外，此顯微鏡亦可利用相對比之機制來成像，使用此成像機制時需要特別的聚焦鏡與相位環。相對比成像對於低吸收對比的物質特別有用，舉例來說，由於生物試片是由一些有機物質組成，所以其特別需要以相對比來成像。

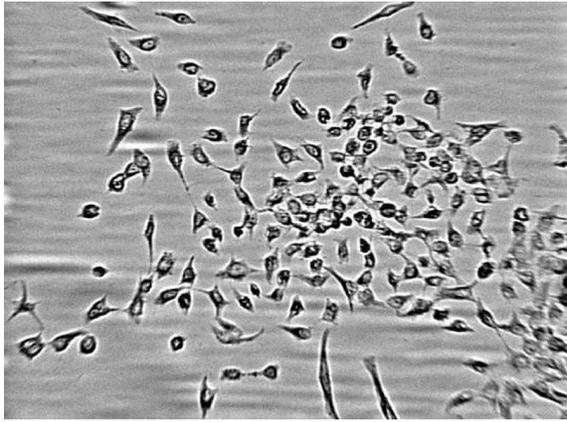
由於 X 光與細胞之作用，不論是吸收或者折射都相當微弱，當利用超高解析度顯微鏡來觀



圖一 利用奈米製造技術配合金屬微電鍍所製造出來的 X 光波帶片

察影像時即使相對比也已經不足以得到高對比的影像，因此非常可惜的是我們也必需利用細胞染色來增加其吸收對比。我們已成功的利用鎳奈米微粒染細胞器，並且清楚的利用超高解析度穿透式 X 光顯微鏡成像。為了使影像達到最佳化，波帶片之聚焦效率與 X 光之穿透深度將同時搭配 8 keV 的光子能量來做為調整。在此顯微鏡中，欲取得一幅放大倍率為 900 倍的影像，其所需之時間為 8 分鐘。

我們利用在參考文獻[6]中所提及之高速影像系統，並同時利用 X 光顯像術，來作為奈米級穿透式 X 光顯微鏡做的解析度測試。BL01A 的非單光光源由一個超導移頻磁鐵(SWLS)所提供，當 X 光穿透物體後，它的強度變化是由單晶的  $\text{CdWO}_4$  閃爍計數晶片(scintillator)轉換成可見光，再經由 CCD 相機加以記錄影像並儲存其資訊。



圖二 HeLa 癌細胞的高解析度 X 光顯微影像，次細胞結構經由使用 DAB/Ni-enhancement 的方式在 $\sim 1\mu\text{m}$  的解析度時已清晰可見。FOV =  $600 \times 450\mu\text{m}^2$

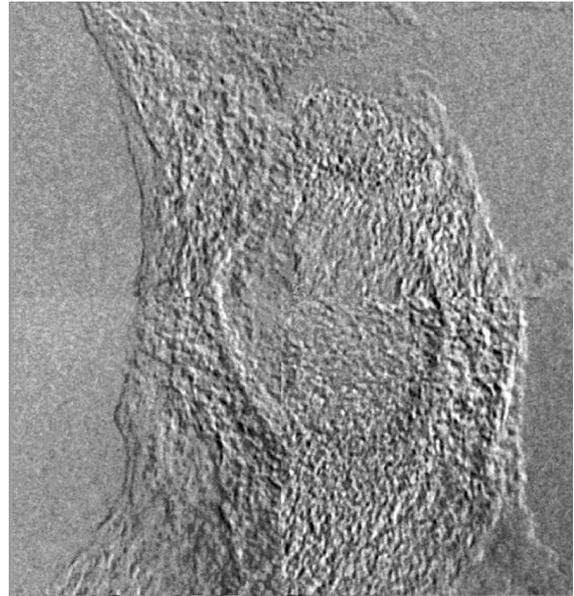
### 三、超高解析度顯微鏡及染色技術

我們利用 DAB-鎳對比染劑來鑑定 vimentin 在細胞中之分佈。Vimentin 為一細胞之中間絲蛋白(intermediate filament protein)其主要功用為支撐細胞膜，而交錯的 vimentin 更可作為固定細胞核與各種胞器。

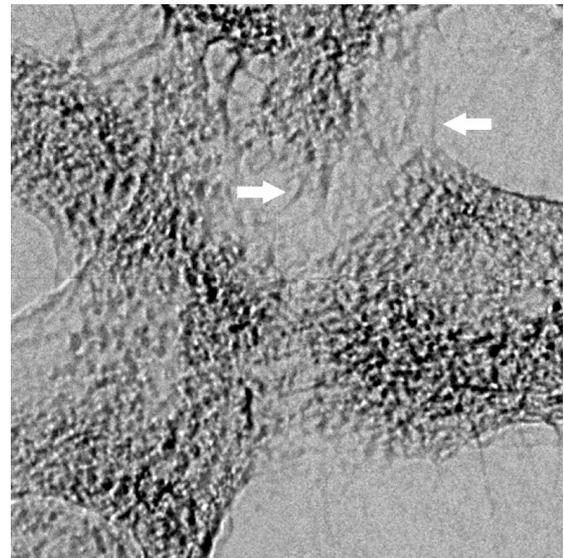
圖二是由高解析度 X 光顯微鏡所獲得之影像，視野為  $600\mu\text{m}$ 。從圖中我們可清楚看到添加額外的對比染劑能提供最佳的吸收對比。由於 vimentin 只存在於細胞質中，故當 vimentin 被染色時，細胞核的吸收對比並不會因此而被影響。然而，由於在細胞質中有許多之緻密的 vimentin，入射之 X 光會被大量已染色之 vimentin 所吸收，故相對的細胞質所呈現之影像較暗，此影相對比特別在細胞核周圍將更加明顯。圖三是由超高解析度(利用 X 光波帶片放大) X 光顯微鏡所獲得之影像，視野為  $30\mu\text{m}$ ，從圖四中我們可清楚看到 vimentin 在細胞質中排列如陣列般，且 vimentin 之束狀纖構可被清楚觀察到。

爲了要清楚瞭解分子、蛋白質與次細胞器的型態、功用及其所在之相對位置，特定的標示目標物是非常必要的。如同我們先前所提及，在光學與穿透式電子顯微鏡的領域中，免疫細胞化學技術(Immunocytochemistry)可廣泛的運用在標定特定之分子物上。

各式各樣的免疫細胞化學介質，如螢光探測、免疫金粒子、DAB 以及其他的染色體都被



圖三 HeLa 癌細胞(與圖二之樣品相同之 DAB/Ni-enhancement 處理)的超高解析度利用 X 光波帶片放大之 X 光顯微影像。解析度 $\sim 60\text{nm}$  的解析度時已清晰可見。FOV =  $30 \times 30\mu\text{m}^2$



圖四 HeLa 癌細胞(與圖二之樣品相同之 DAB/Ni-enhancement 處理)的超高解析度利用 X 光波帶片放大並使用 Zernike 型之相位板加強相對比後之 X 光顯微影像。我們可清楚看到 vimentin 在細胞質中排列如陣列般，且 vimentin 之束狀纖構可被清楚觀察到。FOV =  $30 \times 30\mu\text{m}^2$

當作特性蛋白質，對於光學顯微鏡或是穿透式顯微鏡，添加含鎳成份的 DAB 染色體是一種常見

免疫標記的方式，因為鎳的粒子可提供很好的對比。我們發現含鎳的 DAB 對於利用 X 光顯微鏡觀察時也能提供良好的對比。當我們觀察 vimentin 的網狀細小結構並且用 DAB 以及鎳粒子做標記的細胞時，利用 X 光顯微鏡的解析度比用光學顯微鏡的解析度高上五至十倍。

由此結果顯示，我們可用此一簡單方式來觀察蛋白質的結構及分佈。雖然免疫細胞化學是利用光學顯微鏡來觀察特殊標記的蛋白質，可是有些蛋白質以及蛋白質複合物的空間解析會被限制。為了可以觀察到蛋白質的精確位置以及蛋白質之間的相互影響，我們需要更高的解析度的影像來加以判別。

#### 四、結 論

由於生物學的組織的有限吸收以及迄今仍低的側向解析度，阻止了 X 光在個別的細胞和次細胞結構的輻射影像擷取。我們能利用同步輻射加速器 X 光的同調性特點克服此一限制。我們明確的對非常厚的樣品提出硬 X 光影像和 X 光斷層照相術重建，解析度可達 60 奈米。

此結果是透過同步輻射加速器光源之無單色性 X 光源所取得(有限的長度同調性是被要求)[1,5]，由於折射率的變動，X 光藉由高的側向解析度和偵測幾何學提高試樣對比。這種方法提供高的影像擷取速度和高解析度(<1 $\mu$ m)，同時樣品準備簡單化。我們也更進一步使用高解像力的波帶片使 X 光透過試樣被傳送同時被放大，大大的提升了偵測器解析度。也因此賦予了我們最佳

解析度 60 奈米，使我們能夠在一種相當自然的環境裡運用 X 光的能力來觀察大的樣品的內部的特徵。

這些結果其重要性是相當顯著的：此技術不僅與其他顯微術互補，有時亦能替換。例如，在組織的研究過程中所使用的穿透式電子顯微鏡有時無法對大或者是後的樣品進行觀察，而可見光顯微術又限於其解析度時，X 光顯微技術的奈米解析度以及能檢測厚度超過毫米的不透明樣品的這種特殊能力就可能非常有用。

#### 參考文獻

- [1] Y. Hwu, et al., *J. Phys. D*, **35**, R105 (2002).
- [2] W. L. Tsai, et al., *Nature*, **417**, 139 (2002).
- [3] S. K. Seol, et al., *Electrochemical and Solid-State Letters*, **7** C95 (2004).
- [4] Y. Hwu, et al., *Biophysical Journal*, **87**, 4180 (2004) [Biophotonics Research, Biophotonics International, Dec. 2004.].
- [5] Y. Hwu, et al., *Phys. Med. Biol.*, **49**, 501 (2004).
- [6] “What a Contrast!” Medical Technology in News and Views, *Nature*, **427**, 800 (2004).
- [7] J.-W. Miao, T. Ishikawa, B. Johnson, E. H. Anderson, B. Lai and K. O. Hodgson, *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 088303 (2002).
- [8] J. -W. Miao, K. O. Hodgson, T. Ishikawa, C. A. Larabell, M. A. LeGros, Y. Nishino, *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 110 (2003).