

利用差動式共焦顯微系統觀測生物樣本

Fang-Wen Sheu^{a,b} (許芳文) and Ya-Ting Chen^a (陳雅婷)

^a Department of Applied Physics, National Chiayi University, Chiayi 60004, Taiwan

^b Graduate Institute of Optoelectronics and Solid State Electronics, National Chiayi University, Chiayi 60004, Taiwan

(國立嘉義大學^a應用物理學系, ^b光電暨固態電子研究所)

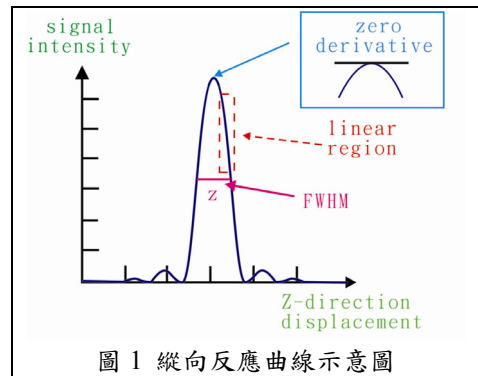
Telephone: 05-2717993; Fax: 05-2717909; E-mail: fwsheu@mail.ncyu.edu.tw

摘要 --- 差動式共焦顯微術為具有高空間解析度以及非侵入式量測的光學顯微技術,其原理為利用繞射效應產生的陡峭縱向變化,得到數奈米的縱向解析度。實驗開始先以反射鏡當樣本量測系統的縱向解析度,但所測得的解析度不足以對生物樣本作光學切片觀察,於是應用醫院病理科常用的石蠟切片技術,取得厚度為6~8 μm 的樣本進行橫向的掃描觀測,再把結果與傳統光學顯微鏡作對比,希望未來能針對縱向解析度加以改進,進而對活體樣本做三維的觀測。

關鍵字 --- 差動式共焦顯微術(Differential Confocal Microscopy)、石蠟切片(Paraffin Section)

1. 差動式共焦顯微系統原理

本系統是參考由中研院原分所汪治平與李超煌博士所發展出來的差動式共焦顯微系統,先以高空間同調性的光束經由高倍物鏡聚焦於樣本上,而樣本的反射光、螢光、散射光通過空間濾波器濾波之後,在焦點處被光偵測器所接收到的訊號會最強,而此偵測到的光信號強度與被測物距離的關係,由繞射理論可推導出為 sinc 平方的函數(圖1);再將被測樣本放在縱向反應靈敏的線性區域中,此光信號大小的改變對於高度的微小差異會極為敏感,所以可以達到奈米級的縱向解析度。原先的系統是將掃描訊號轉換為樣本的表面顯微高度分佈,而本系統則將其轉換為生物樣本的組織結構顯微圖。



2. 共焦顯微系統的解析度分析

2.1 縱向解析度定義

由參考文獻[2]與[3]得知,一般將共焦顯微系統的縱向解析度定義為反應曲線的半高全寬度 z (如圖1),通常表示為 $z = \frac{0.22\lambda}{\sin^2(\alpha/2)}$,其中 λ 為光源波長, $\sin \alpha$ 為物鏡的數值孔徑 N.A.。當 λ 越

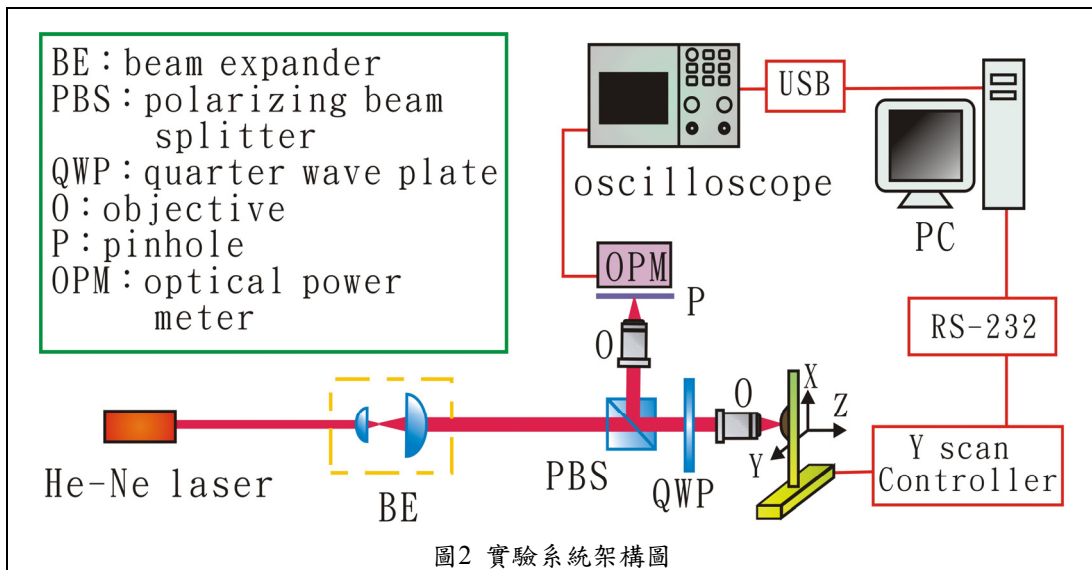
短或 N.A. 值越高時,可以得到越高的縱向解析度。

2.2 橫向解析度分析

同樣由參考文獻[2]與[3]得知,傳統顯微鏡之橫向解析度受限於光的繞射極限,根據 Rayleigh 條件 (criterion), Airy 光斑決定了可解析的距離,其半徑 r 即為系統之橫向解析度 $r = 0.61 \frac{\lambda}{\sin \alpha}$,而共焦顯微術因為多了針孔濾波,所以其橫向解析度較好,可表示為 $r = 0.5 \frac{\lambda}{\sin \alpha}$,當 λ 越短或 N.A. 值越高時,即有較佳的橫向解析度。

3. 實驗系統與步驟

圖 2 為本實驗系統架構圖,利用波長 632.8 nm 的線性極化氬氖雷射作為光源,先調整其線性極化方向讓通過極化分光器的光最大之後,再加入光束擴束器 (beam expander, BE)、極化分光器 (polarizing beam splitter, PBS) 以及四分之一波片 (quarter wave plate, QWP),讓雷射光擴束之後能與反射的光束分離,再以 20 倍物鏡將光束聚焦於樣本,而樣本產生的反射光會反射至空間濾波器 (由 25 μm 針孔和 10 倍物鏡組成) 再到達光功率計,此光功率計將偵測到的光強度轉變成電訊號,再傳送至數位示波器中,由電腦操控並儲存所需數據;在平移台控制系統方面, Y 軸是由利用 RS-232 為介面的步進馬達所控制, X 和 Z 軸則由最小單位 10 μm 的微調螺旋推動桿調控。每微調一次 X 軸,就由示波器擷取一次步進馬達掃描數據,重複此步驟再將數據集結,使用 Origin 軟體的 Plot \rightarrow Image Plot 功能 \rightarrow 選用 Matrix 作圖,並設定灰階顯示模式,即可得到 X-Y 平面的樣本顯微影像圖。



4. 實驗結果與分析討論

4.1 系統縱向解析度量測與分析討論

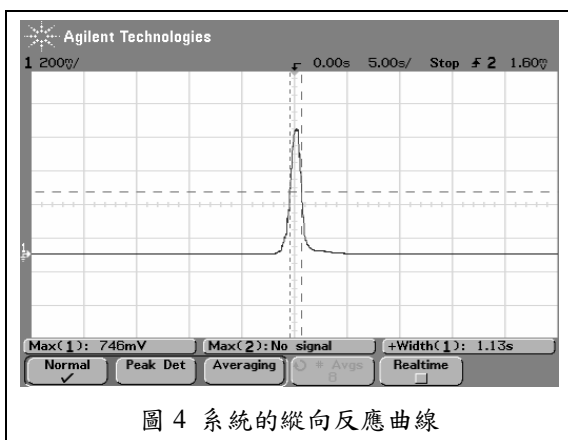


圖4 為本系統的縱向反應曲線，其步進馬達的移動速度為 $53.20(\mu\text{m}/\text{s})$ ，半高全寬為 $1.13(\text{s})$ ，測得縱向解析度的實驗值 $53.2 \times 1.13 = 60.12(\mu\text{m})$ ，理論值由式子 $z = \frac{0.22\lambda}{\sin^2(\alpha/2)}$ ，將

波長 $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ 、數值孔徑 $\sin\alpha = 0.45$ 代入得到縱向解析度的理論值約為 $2.6 \mu\text{m}$ 。推測原因為對光不夠準直或是針孔不夠小，導致濾光的效果不佳，形成理論值與實測值誤差頗大。以生物組織為樣本的話，為求提高解析度可換倍率大於20的物鏡，或是波長低於 632.8 nm 的光源，但因為波長太短容易對生物細胞造成傷害，故挑選更高倍的物鏡為較適宜的方法。

4.2 系統橫向(二維)的量測結果與分析

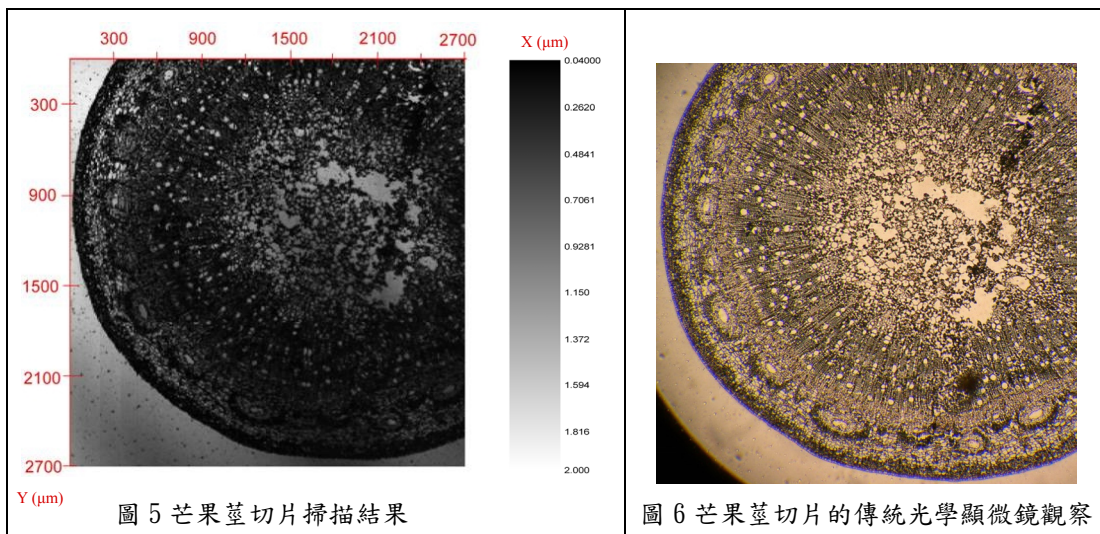


圖 5 為系統掃描芒果莖切片的結果，圖 6 為 40 倍光學顯微鏡下的視野圖。根據式子 $r = 0.5 \frac{\lambda}{\sin \alpha}$

可以得到橫向解析度的理論值為 703 nm，而傳統光學顯微鏡的解析度可由式子 $r = 0.61 \frac{\lambda}{\sin \alpha}$ 計算，假設光源波長 600 nm(黃光)，4 倍物鏡的 N.A. 值為 0.1，算得解析度為 3660 nm，由理論值看來本系統的解析度應超越傳統光學顯微鏡，但圖 7 與圖 8 比較之後，發現是傳統光學顯微鏡的圖比較清晰，因為本共焦顯微系統的 X 軸方向是以 10 μm 為最小移動單位做手動數據擷取，必然無法超越傳統光學顯微鏡，這是本系統的一大缺點，改善的方法則是將 X 軸的手動平移裝置更換為步進馬達控制的自動平移台。

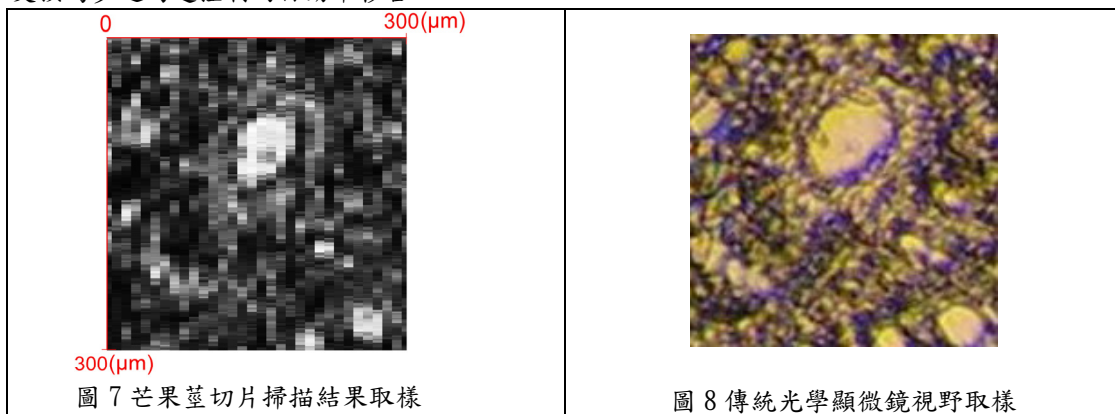


圖 7 芒果莖切片掃描結果取樣

圖 8 傳統光學顯微鏡視野取樣

5. 結論

本系統的第一個缺點為解析度不佳，量測生物樣本上還需要改進；第二點為自動化不足，就三維樣本平移台而言，只有 Y 軸裝設步進馬達，剩餘兩軸都是手動式調控，不但造成實驗數據不夠精密，也很耗費人力與時間，尤其是沒有整合掃描與數據擷取元件的電腦介面與程式來操控系統，就實用度而言此點為最需要改進的地方。

未來待本系統的縱向解析度改善且自動化之後，可以對一般的生物組織進行光學切片掃描，或者是與螢光顯微技術結合，對特定生物細胞染色得到不同的量測對比度，以達到更好的顯微觀察，期望可以做出更多方面的生醫光電應用與研究。

參考文獻

- [1] 李超煌、汪治平，“差動共焦顯微術及其應用”，物理雙月刊(二十卷五期)。
- [2] 王義閔、魏良安、高甫仁，“共焦顯微鏡雜記”，物理雙月刊(廿三卷二期)。
- [3] 陳柏菁，“共焦顯微術系統之設計與裝置”，國立台灣大學電機工程研究所碩士論文(2002)。
- [4] 郭開文，“結合差動共焦顯微術與雷射光鉗在蛋白質彈性研究之應用”，國立陽明大學生醫光電工程研究所碩士論文(2005)。