

顯微鏡下螢光漫遊

台北市立聯合醫院陽明院區 新陳代謝科 王繁棻

螢光分子，照亮細胞

光學顯微鏡的發明，距今已有三百多年的歷史；之後歷經不斷地改良，到了二十世紀更是進步神速，包括螢光顯微鏡、共軛焦顯微鏡相繼被發明，乃至於近年的全反射顯微鏡，及可顯示蛋白質間交互作用的螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer)，更將顯微鏡的應用往功能化推進。

目前臨床上，光學解析顯微鏡與螢光顯微鏡仍是十分基本而重要的工具，臨床工作人員或研究者可觀測並記錄一個或數個單一生命體的內部型態或數位化影像。螢光顯微鏡的原理，是利用螢光染劑或螢光蛋白等的發光特性，由雷射產出的激發光經物鏡聚焦後打在樣品上，樣品上的染劑分子散射產生比先前激發光波長較長的螢光訊號，此訊號再透過電荷耦合元件(charge-coupled device)轉換為數位影像。而可利用的螢光分子，包括離子螢光染劑、蛋白質免疫螢光染劑、遺傳物質染劑、及綠螢光蛋白；其中參與綠螢光蛋白發明與改進的三位科學家 - 下村脩、Martin Chalfie及錢永健，因此獲得2008年的諾貝爾化學獎肯定其貢獻。

螢光免疫分析法(fluorescence immunoassay)

螢光免疫分析法也稱為螢光抗體法，如同組織免疫染色一般也可分為直接與非直接的方式。直接螢光免疫分析法是將抗體或抗原標記上螢光化合物，然後與相對應的抗原或抗體發生反應；而非直接螢光免疫分析法則是在與第一抗體作用的第二抗體上標上螢光。螢光免疫分析法本身的敏感度約在 $1.0 \mu\text{g/ml}$ ，與radioimmunoassay ($0.0006\text{-}0.006 \mu\text{g/ml}$)，

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ($<0.0001\text{-}0.01 \mu\text{g/ml}$)、flow cytometry ($0.06\text{-}0.006 \mu\text{g/ml}$)相差很多；然而，它應用於顯微鏡下的觀察，可呈現不同物質間型態位置的關係(如圖)，則是其他免疫分析法無法達到的。

運用tyramide進行訊號放大

螢光顯微鏡下的世界宛如夜晚的天空，無訊號時漆黑一片；當訊號出現，有時則如繁星閃耀般美麗。在使用多色螢光時，每次只能觀察一種激發光下產生的影像，分別照相儲存再以電腦軟體組合，才呈現色彩斑斕的景象。然而螢光免疫分析有二大缺點，一是前述的敏感度，另一則是螢光強度的快速萎凋(decay)；常常在3、4天後，螢光訊號已較第一天減弱許多。

早在約二十年前，就有學者發表使用Tyramide可催化phenolic group的活化，使已標記的受質結合到固態表面上，而使訊號放大。最初此技術被應用於ELISA或西方點墨法上，能讓可偵測濃度的下限降低200倍；後來被使用於免疫組織染色，則可讓第一抗體的稀釋倍率提高，而達到較佳的染色效果。筆者在螢光免疫染色上也曾嘗試使用tyramide，當之前看不到的皮釋素受體，經使用了tyramide後，在螢光顯微鏡下呈現一個個發亮的圓圈，當時的興奮至今仍難以忘懷。另外，tyramide還可使螢光存在的時間延長，在筆者的經驗可維持至二個月，而是怎樣的機制造成螢光分子半衰期的改變則仍未知。不過，在敏感度提高的同時，相對而來的便是特異性的考量，主要是自體螢光(autofluorescence)的問題。減少自體螢光干

擾的最好方法是使用共軛焦顯微鏡，因其有針孔(pinhole)的裝置使得僅有極小頻寬(<5nm)的雷射光可到達樣本；若是使用一般的螢光顯微鏡，則可能需要加入化學藥劑以盡量降低背景值。

結語

雖然顯微鏡與螢光免疫染色談不上是尖端前衛的儀器與技術，但是每一次的觀察都是研究者與真正存在於患者身上的細胞組織的直接對話。很多人喜歡暢遊五湖四海欣賞美麗景緻，而在顯微鏡下的微觀宇宙，透露著生命的奧秘，也是這世界的另一番風景。(圖1)

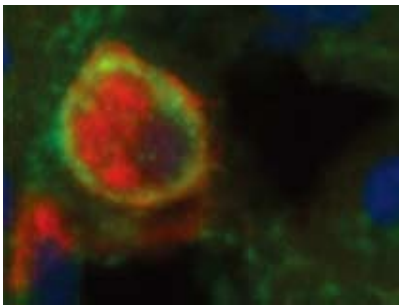


圖1 在腦下垂體的促皮狀質細胞(corticotrophic cell)上呈環狀的皮釋素受體(corticotropin-releasing hormone receptor, CRHR)。綠色螢光(fluorescein)，標記皮釋素受體；紅色螢光(Alexa Fluor 568)，標記腎上腺皮促素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)；藍色螢光(DAPI)，標記DNA(即細胞核所在)。以螢光顯微鏡(Zeiss)拍攝。

參考文獻

1. 楊德明、戚錦文：電荷耦合元件在生物螢光顯微鏡之應用。行政院國家科學委員會精密儀器發展中心，科儀新知 2002; 24(2): 56-77.
2. 楊德明：影像分析系統操作手冊。台北榮民

總醫院教學研究部公用儀器中心。

3. 分子檢驗。分子檢驗與生物資訊教學資源中心主編。教育部 2003年七月。
4. Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, et al: Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification: application to immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 1989; 125: 279-85.
5. Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, et al: The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *Journal of Immunological Methods* 1992; 150, 145-9.
6. Volante M, Pecchioni, C & Bussolati, G: Post-incubation heating significantly improves tyramide signal amplification. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2000; 48: 1583-5.
7. Robertson D, Savage K, Reis-Filho JS, et al: Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biology* 2008; 9: 13.
8. Long DJ, 2nd Buggs C: Microwave oven-based technique for immunofluorescent staining of paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Histology* 2008; 39: 1-4.
9. Won JG, Tseng HS, Yang AH, et al: Clinical features and morphological characterization of 10 patients with noninsulinoma pancreatogenous hypoglycaemia syndrome (NIPHS). *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2006; 65: 566-78. ㊦