

從顯微鏡到 冷凍電鏡的進化

謝達斌、吳尚蓉、吳亞娜

「一砂一世界，一花一天堂。」自古以來，人類對探索肉眼不可見的微觀世界與維度的熱誠和需求從沒減少過。本篇文章就從光學顯微鏡如何演進發展到今日的冷凍電鏡，進行時光微旅，並對現今生物顯微鏡技術做一深入淺出的介紹。

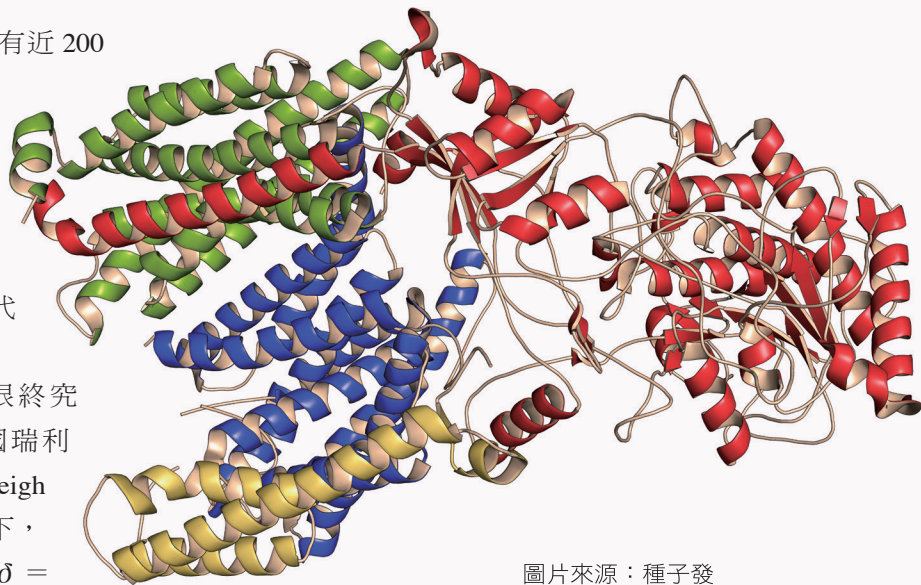
穿透式電子顯微鏡的誕生

17世紀光學顯微鏡誕生後，有近200年在技術解析上幾乎沒有顯著的突破。直到1850年德國蔡司公司開始延攬多位優秀的工程師進行光學研究，並大幅優化顯微鏡結構，才把解析極限推升到約200奈米（nm）的分辨率，奠定了現代光學顯微鏡基本構型的基礎。

但光學顯微鏡的解析度極限終究受制於可見光波長。19世紀英國瑞利爵士提出了瑞利判別準則（Rayleigh criterion），說明在光學顯微鏡下，兩點可鑑別的最小距離 δ 可由 $\delta = 0.61 \lambda / \mu \sin \beta$ 推導，其中 λ 是光源波長， μ 是介質的反射係數， β 是光進出透鏡時最大錐角的一半。

簡單來說，在相同條件下使用同一組鏡片時， $\mu \sin \beta$ 是固定值，那是每個物鏡特有的數值孔徑。這樣一來，解析度就是波長的0.61倍，大約是波長的一半。人類眼睛最敏感的波長是550nm綠光，因此理想條件下的光學顯微鏡解析度大約是300nm。

直到1925年，路易·德布羅意（Louis de Broglie）提出電子波動性理論。經科學家們證實波動性理論後，認為既然光學解析度是由波長決定的，波長比可見光更短的加速電子應能



圖片來源：種子發

提供新一代顯微鏡的「光源」，來挑戰原子等級的解析度。1932年德國科學家克諾爾（Knoll）和魯斯卡（Ruska）在論文中首度提出「電子顯微鏡」的名詞，並製作出第一台電子顯微鏡的原型機，可以說是電子顯微鏡發展史上最關鍵的一步。在接下來一年，電子顯微鏡立刻超越光學顯微鏡的解析度極限。

隨後幾年，電子顯微鏡的商業化逐漸開展。1939年，德國西門子公司開始量產商業型電子顯微鏡。因為電子束對樣本穿透力有限，因此電子顯微鏡樣本也受限於樣本厚度，即便至今的技術也受限於幾十個奈米到兩百個奈米。到了1949年，由於金屬材料樣本薄片製備技術大為提升，穿透式電子顯微鏡對這類材料樣本的研究有了許多貢獻。

1960年代更因為加速電壓的技術上限越來越高，因此能夠檢視的樣本也越來越厚，同時在硬體上因為零件、電子源等系統的大幅提升，使得這時期的電子顯微鏡最終達到了原子等級的解析度。1986年，製作出第一台電子顯微鏡原型機的魯斯卡獲頒諾貝爾物理學獎。

穿透式生物電子顯微鏡

穿透式電子顯微鏡和光學顯微鏡雖有相近的工作原理，但在光源上，前者利用加速電子產生波長極短的電子束取代可見光，以帶來更高的解析度。玻璃透鏡則以電磁場造成的電子束偏折替代鏡片造成的光學折射聚焦。

然而用這種原子等級解析度的顯微鏡觀測生物樣品卻有許多局限。其一是高電壓產生的電子束攜帶很高能量，往往容易破壞生物性樣本的分子結構，對電子密度較低的有機材料也無法形成足夠的對比。同時由於電子的穿透力有限，需要製備超薄樣品，因而早期的電子顯微鏡對生物性樣品的探索多有限制。然而，科學家陸續發展出解決這些困境的方法。

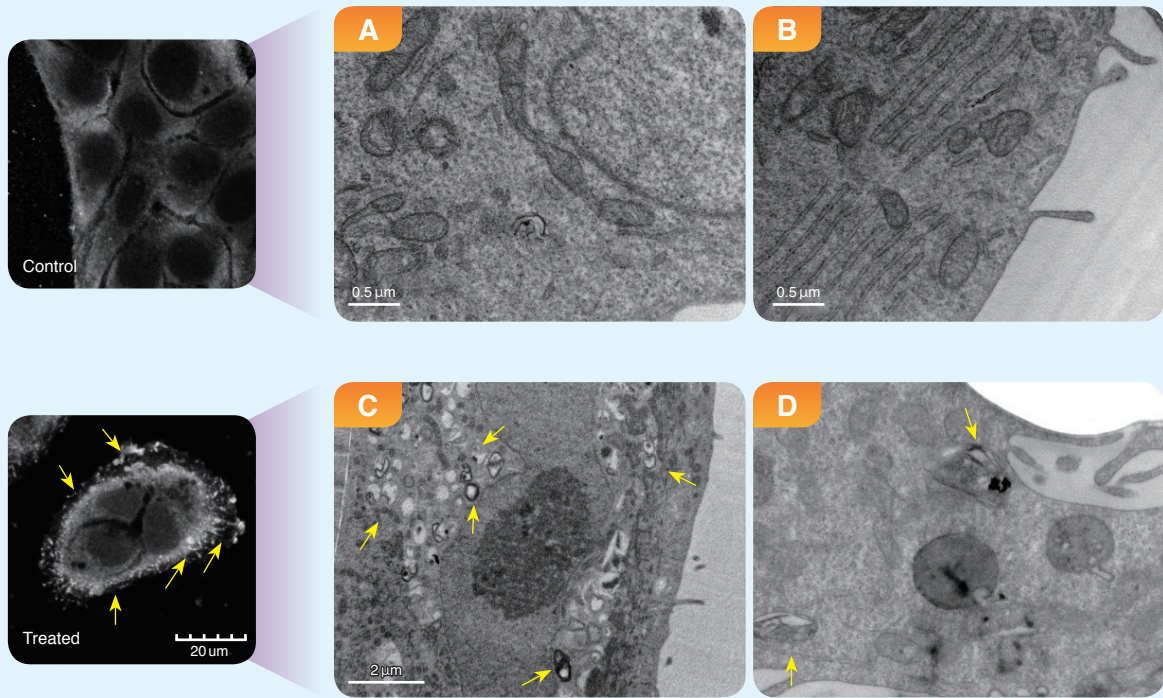
生物樣品的重金屬染色法

有機材料及由輕原子（C、H、O、N、S）組成的生物樣品，它們散射電子的能力弱，造成電子顯微鏡下電子密度對比度過低。1945年就有科學家使用重金屬鹽包覆生物樣品以增加電子散射，因而提高生物樣品本身與背景的對比度，如含鈾、鐵、鉛等元素的化合物都是常用的電鏡染劑。

使用重金屬染色樣品增加影像對比的方法包含了以下數種技術：直接對特定生物分子染色的正染；以重金屬鹽類沉積於樣本周圍的負染；對原始樣品或經由表面處理後的樣本以固定角度沉積金屬的鍍層法。

使用可以和有機分子官能基反應的重金屬染劑，如醋酸鈾、檸檬酸鉛、鐵酸等，經十幾分鐘與生物分子作用後沉積在微結構上產生電子密度對比。不同的染劑對不同生物分子與細胞結構有差異性的親和力，因此得以讓科學家進一步推測樣品的超微結構特性。例如，鐵酸對脂質具有極佳的親和力，因此多半能染出膜結構與脂質，醋酸鈾則會與帶負電性的羧基或磷酸結構以及帶正電荷

穿透式電子顯微鏡和光學顯微鏡雖有相近的工作原理，但在光源上，前者利用加速電子產生波長極短的電子束取代可見光，以帶來更高的解析度。



細胞切片多使用正染法。左上圖是口腔癌細胞體外培養螢光顯微鏡圖，(A)、(B)是口腔癌細胞經過化學固定、切片、重金屬染色處理後所得的細胞內微結構圖；左下圖是體外培養口腔癌細胞，經過癌細胞選擇性毒殺的奈米顆粒處理後的螢光顯微鏡圖，(C)、(D)是經處理治療後的口腔癌細胞染色切片圖，顯示胞內粒線體結構受到破壞。

的氨基親和，因此能增強樣品的對比。一般組織切片多半會混用多種重金屬染劑，以取得最佳的微結構影像對比。

負染非常簡單快速，把染劑滴在儲存在緩衝液中的生物樣品（如病毒顆粒）上並靜置數秒後，立刻把多餘的染劑移除，並自然乾燥，樣本就完成了。因重金屬鹽取代浸潤在緩衝液中病毒顆粒周圍的水，藉以包覆蛋白顆粒，不是直接與病毒有交互作用，因此命名為負染。生物樣品周圍沉積重金屬之後，造成低電子穿透度的深色背景，而樣品本體因立體結構上排開染劑藉以凸顯出它的型態。這類技術多半適用於分散的巨分子、病毒或有機聚合物。反之，正染，也就是染劑與生物樣品的胺基酸具有交互作用。

鍍層法則是利用真空濺鍍機或蒸鍍法，在樣本表面薄鍍一層重金屬原子，來產生高電子密度的殼層。由於金屬沉積得以選定固定角度，因此會受到樣本表面形貌產生不同程度的遮蔽，進而影響鍍層厚度，使得樣本在電子顯微鏡下顯現出類似3D立體影像的效果。另外，也可以搭配冷凍破裂（cryo-fracture）等方法強化細胞內胞器的立體構造對比。

重金屬可以阻擋比有機分子更多的電子，因此更能顯著提升影像對比，同時因為重金屬阻擋了電子，比較能降低電子束對有機分子的直接傷害。傳統上穿透式電子顯微鏡需要在高真空的環境下操作，因此樣本需要乾燥處理。然而，這類前處理會使得樣本因乾燥步驟而變形塌陷。

玻璃化水相較於冰晶具有極低的背景訊號，
能有效提升冷凍樣本的訊噪比，這項發現催生了冷凍電鏡技術的突破。

此外，染色步驟產生的各種人造假象也會造成干擾誤判，而且染色法會造成電鏡最終解析度上的限制。因此在進行傳統電鏡觀察時，需特別留意人為干擾的可能性，尤其近年來奈米醫學蓬勃發展，這類金屬染色產生的影像和重金屬奈米材料在型態上十分接近，不易判讀。如何在無染色狀態下強化電鏡的影像對比，成為重要的研究主題。

冷凍電鏡的濫觴

電子很容易與空間中的物質反應而影響其行進軌道，因此電子顯微鏡需要維持高度真空，並小心地控制電子束的行程，以利提高成像解析度與對比。生物樣本往往含有大量水分子，在真空中容易揮發而干擾電子束的行進。因此，生物學家在使用電子顯微鏡時需要儘量移除生物樣本中的水分。對水分子移除後容易聚集一些分子，並造成結構塌陷的問題，科學家發展出浸潤包埋的技術來固定微結構，再透過超薄切片達到生物樣本超高解析觀察的目的。

然而種種的複雜樣品處置過程，也造成科學家們對於「電子顯微鏡下看到的生物樣本是否失真」的長期疑慮。2017年諾貝爾化學獎得主之一雅克·杜巴謝（Jacques Dubochet）在1970年代就相信，搞定這個問題可以為所有的生物學家帶來驚喜。當然，能夠保留生物樣本中所有的水分，在原始狀態下觀測是最理想的，因此很早就有科學家想到，如果能保持低溫避免水分子揮發，應該有機會直接觀測生物樣本。

早在1960年，便開始有學者提出這個想法並且投入相關研究，結果卻不盡理想。

到1974及1975年關鍵的兩年，開始有學者陸續提出各種更佳的解決方案。

理察·韓德森（Richard Henderson）博士在生物樣本中使用葡萄糖液以避免樣本乾燥和電子束傷害。韓德森為了研究菌紫質膜蛋白結構，使用整個細胞膜在電子顯微鏡下觀測，滴上葡萄糖溶液來保護膜蛋白，使得樣本在真空環境下不至於乾掉變性，並且降低電子束強度進行觀測。韓德森透過傾斜樣本，藉以得到不同角度的蛋白質投影影像，並建立3D模型，當時結構解析度達到7Å。雖然不及X-ray晶體學的3Å，還是令許多人印象深刻。

當時電子顯微鏡下含水樣本影像出乎意料的良好，仍保有可見的生物分子細節。1974年，肯·泰勒（Ken Taylor）和羅伯特·格拉瑟（Robert Glaeser）博士發現冷凍樣品可以保持蛋白質的高解析度訊號，這可以說是冷凍電鏡應用於生物樣本的里程碑，給了當時的學者們莫大的信心繼續往冷凍狀態的生物樣本發展。凍結生物樣品容易產生冰晶而破壞細胞組織，其中一種解決方法就是把水超高速降溫冷凍，使冰晶來不及形成，而獲得類似玻璃化的固態水（vitrified water），也就是無結晶的固化水。

杜巴謝博士等科學家是全球第一個投入把銅網上的微小液滴進行高速冷凍的歐洲分子生物學實驗室團隊，他們的成員阿拉斯塔爾·麥克道沃爾（Alasdair McDowall）博士用液態乙烷取代液態氮作為冷凍介質，發現銅網上的液滴較過去的研究能產生更佳的玻璃化冷凍狀態。杜巴謝設計了一個像弓箭一樣的設備，把帶有高純度蛋白質薄水膜的銅網高速射入低溫的乙烷，

使薄膜水玻璃化以固定樣本於其間，這玻璃化的冰（vitreous solid water）就是無序（amorphous state）冰。

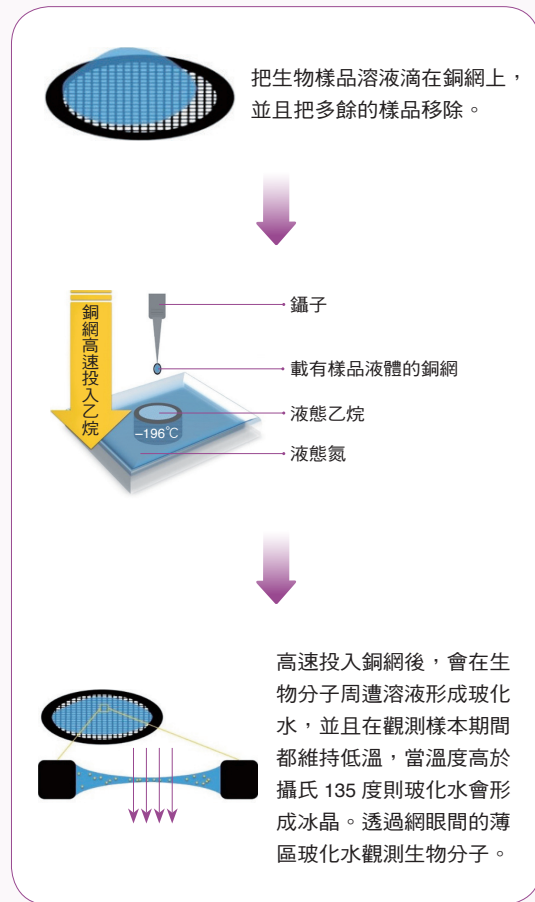
玻璃化水相較冰晶具有極低的背景訊號，能有效提升冷凍樣本的訊噪比，這項發現意外地催生了冷凍電鏡技術的突破。由於技術再現性高且非常穩定，因此到近年來大家還是沿用杜巴謝方法進行薄膜液滴玻璃化冷凍處理。這種速凍（plunge freezing）法讓生物樣品不需經過傳統的重金屬染色與脫水固定，也不需讓樣品保持含水狀態，以生物巨分子的蛋白質、病毒等樣本來看，更接近原本的生理條件。

冷凍電鏡的巨分子結構解析

由於杜巴謝博士的速凍法可以讓生物樣品保持含水狀態，不會受到傳統染色法的脫水造成結構破壞。但因為沒有重金屬鹽包覆來增加電子散射增強對比度，這些影像通常有相當高的背景值。

1981年姚阿幸·法蘭克（Joachim Frank）博士提出了單粒子分析的方法，稱作單粒子是因為樣品是單一來源的粒子（特別應用於大於 300 kDa 的巨分子如蛋白質，病毒等，因其成像效果較好）。大量的單一粒子隨機地分散在無序的冰中，然後使用低劑量的電子（ ~ 20 至 $40 e^- / \text{\AA}^2$ ）照射以避免樣本損傷。然而低劑量的電子束造成落在生物樣品上的電子束少，使得成像對比度更低。為了獲得更好的訊噪比，法蘭克提出使用大量 2D 投影影像分類後進行數據平均，並算出可能的投影相對角度來得到 3D 結構。

法蘭克和 Penczek 發展了一種「投影匹配」的方法，每張電鏡圖與初始的參考模型在不同方向上的二維投影進行一一



杜巴謝博士提出的速凍法的概念和流程，讓生物樣品不需經過傳統重金屬染色與脫水固定，而能讓樣品保持含水狀態。

比對，就可得該投影的實際投影方向，而今已經有更多種計算方法用來確定每張圖像所對應的相對角度。還有一種方法是由凡黑爾（Marin van Heel）所提出的，這原理是基於任意兩張圖片在三維空間中都擁有一條公共的三維結構中心線，藉由它得以確定各影像對應的空間方向角，再經由傅立葉轉換運算。

以上這些不同的分析方法已經開發成一系列的軟體，比如 Spider、EMAN（EMAN2）、

Frealign、SPARX、Xmipp、auto3DEM、Relion、cryoSPARC 等。這類技術不需長晶體，因此對於不容易長晶體的分子，如膜蛋白，能提供解析結構的方法。這些也是冷凍電鏡用以解析蛋白結構的基本概念。

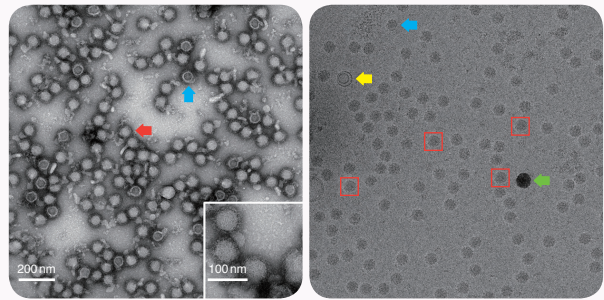
這樣的觀念非常根本且符合能普遍用於各種巨分子的需要，又可以完全免去晶體學對樣品苛刻的結晶要求。這個概念和技術引導了單分子重建技術的誕生和後續蓬勃發展，構成今日冷凍電鏡領域廣泛使用的巨分子結構解析方法的基礎。

隨著冷凍電鏡設備技術成熟以及單分子運算法的越趨成熟，終於在 2011 年取得核醣體接近原子等級的解析度里程碑，並且藉以了解核醣體內部非常精細的分子作動。

2013 年冷凍電鏡又取得革命性的進展，主要原因是電鏡影像記錄設備的硬體過去仰賴底片系統，雖然保有很高的解析度，然而需要額外數位化處理才能進行電腦圖像運算。

早期感光耦合元件影像系統（charge-coupled device, CCD）雖然能夠直接數位化記錄影像，但是有影像解析度不足的問題。直到互補式金屬氧化物半導體影像系統搭配電子直接探測器（direct detection device, DDD）的問世，利用光電效應記錄電子數位訊號，從而大大提高了電子訊號的轉換效率，有效增強了訊噪比，同時保有高解析的圖像訊息。

DDD 的特色是薄背矽晶片直接承受加速電子的打擊而產生電訊號，可以避免 CCD 需要經由電光轉換螢光頻間接成像而累積多重電子散射的效應，因此可以高速讀取單一電子訊號，甚至能進行高於像素



左圖：病毒負染電鏡影像，病毒顆粒周圍堆積重金屬鹽類使得病毒顆粒顯現出來。紅色箭頭是完整的病毒顆粒；藍色箭頭是中空顆粒。右圖：病毒無染色的冷凍電鏡影像。紅色框是完整病毒顆粒；藍色箭頭是不完整病毒顆粒；黃色箭頭是中空顆粒；綠色箭頭是冰晶汙染。

解析度的電子訊號分析。同時 DDD 出色的光敏感性和高速影像讀出功能，能用來校正電子束引起的樣本飄移、做動態校正，以大幅推升巨分子結構的解析度。

雖然冷凍電鏡技術一般建議用於分析 300kDa 以上的蛋白質，但在 2014 年科學家卻能藉以解出一個分子量僅 170kD 的酵素複合體結構，其解析度達 4.5 Å，改寫了冷凍電鏡適用的分子量範圍。此外，這項技術倚賴高純度的樣品（需高於 99%），才能達到接近原子等級的解析度。但由於一些分子，如核醣體，在自然狀態下具有不同狀態，因此處理異質性高的影像還有待各相關領域的科學家們繼續突破。

然而這項技術的迅速發展讓科學家們順利獲得沙門氏菌攻擊細胞的注射蛋白的超高解析立體結構，解析出聽覺壓力感測分子等巨分子結構，並且在巴西茲卡病毒疫情爆發後短短幾個月內，就解出茲卡病毒的

隨著冷凍電鏡設備技術成熟以及單分子運算法的越趨成熟，終於在 2011 年取得核醣體接近原子等級的解析度里程碑。

冷凍電鏡在單粒子分析的快速進展， 讓科學家比過去更容易獲取生物分子的詳細結構和可能的分子動態。

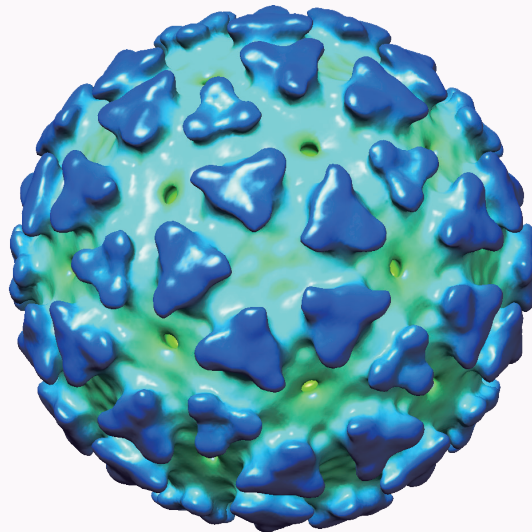
高解析結構，縮短其藥物開發的時程。而作為先驅者的雅克·杜巴謝、姚阿幸·法蘭克、理察·韓德森等，分別因為開發出了真正成熟可用的冷凍製樣技術、發明單粒子分析運算，以及最早全力投入使用電子顯微鏡，揭示膜蛋白發生 α 螺旋的機制的貢獻，在2017年共享諾貝爾化學獎殊榮。

冷凍電鏡在單粒子分析的快速進展，讓科學家比過去更容易獲取生物分子的詳細結構和可能的分子動態。近年已有一些文章發表的蛋白結構，解析度可達小於2Å，可說是近原子結構，讓蛋白質結構學進入了新時代。

台灣冷凍電鏡的近況

在台灣，目前僅數間大學擁有冷凍電鏡與相關設備，但已有很好的研究成果。近年來透過行政院部會署政策額度計畫支援中央研究院執行「台灣蛋白質計畫」(TPP: Taiwan Protein Project)，這項計畫透過中央研究院跨所、跨領域的蛋白質研究專家、資源的整合，共同激盪創新的思維和建立關鍵技術與精進方法學，為國內外重要生技醫藥議題找出解決方案。此外，依據政府「台灣生技起飛鑽石行動方案」，推動研發成果的產業化，進一步投入國人重大疾病的預防、診斷、治療及產品導向的應用研究。

其中以中央研究院核心設施冷凍電鏡FEI Titan Krios 300 keV及FEI Talos Arctica 200 keV與成功大學冷凍電顯核心設施形成冷凍電鏡聯盟，南北雙核心合作，在台灣



冷凍電子顯微鏡及立體結構重組技術解析屈公熱病毒結構。屈公病毒為二十面體構造，大小約為70奈米。

結構生物學專家學者及國際各跨領域學者的指導下，讓台灣結構生物學邁向另一個層級。藉由發展蛋白質結構解析的尖端及高解析度的技術平台，期能解決重要生技議題及重大疾病問題，以提高國內生物新藥開發能量及國際競爭力。

謝達斌、吳尚蓉
成功大學醫學院口腔醫學研究所

吳亞娜
中央研究院生物化學研究所
