



台大醫學院第一共研電子報 創刊號

100年9月 第1期

本期目錄

- 創刊號序文 P1
- 顯微影像核心簡介 P2

專題報導

- 全內反射螢光顯微鏡之原理與應用 P15

下期預告

- 生醫資源暨模式生物中心介紹



序文

臺灣大學醫學院研究發展分處為協助全院同仁從事學術研究，以提升醫學校區整體研究品質及水準並促進醫療科技研究之發展，特別設立共同研究室，除了提供新進研究人員研究空間，並設置本院共通性之儀器，以集中有效運用資源，避免重複投資浪費。其中第一共同研究室，每年透過醫學院學術整合委員會的「研究儀器整合小組」，做研究儀器之規劃、整合、協調及採購，在共同研究室中集中技術較難操作或昂貴的儀器設備，訂定使用規則，並公開登記使用。每年亦定期辦理儀器操作講習訓練，訓練研究人員儀器操作技術，推廣新的儀器相關研究資訊。

第一共研於兩年前開始陸續設立核心實驗室，目前有核酸定序核心、細胞影像核心、流式細胞分選核心，以及生醫資源暨人類疾病模式中心。前三個核心實驗室皆有專職人員負責進行儀器操作、維護、修繕，以及提供技術諮詢，第四個核心實驗室則提供生物醫學實驗相關之材料與技術支援。

為了迎接網路時代的來臨，第一共研亦創設電子報，未來將詳細介紹各個核心實驗室，發送最新訊息與科研新知。竭誠歡迎您訂閱電子報，並請不吝指教！

第一共同研究室 指導教授

鄧述諄

本期編輯:黃呈彥 徐華蔓

編輯委員:李芳仁 鄧述諄 吳明賢 林淑華 林泰元

顯微影像核心(Imaging Core)簡介

目錄	●地點 P2	●儀器設備 P3	●申請及使用資格 P12
	●管理員 P2	●離線軟體 P11	●收費標準 P12
	●開放時間 P2	●服務項目 P11	●致謝 P14

地點

醫學院基礎醫學大樓R1448

管理員

R1448黃呈彥 博士 徐華蔓 技術員 (聯絡電話:23123456轉88930)

實機操作與軟體教用，軟硬體設備維護，樣品製備諮詢，夜間使用認證，全內反射螢光顯微鏡預約登記。

R1405李學良 技士 (聯絡電話: 231234565轉88505)

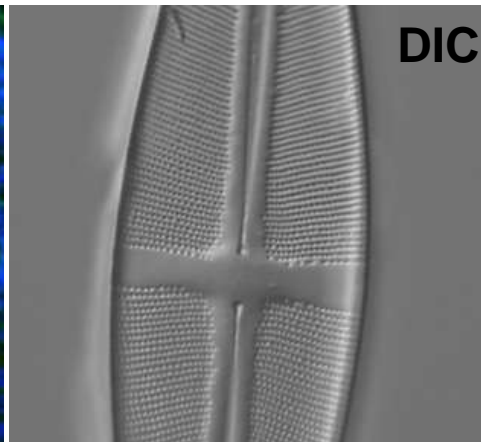
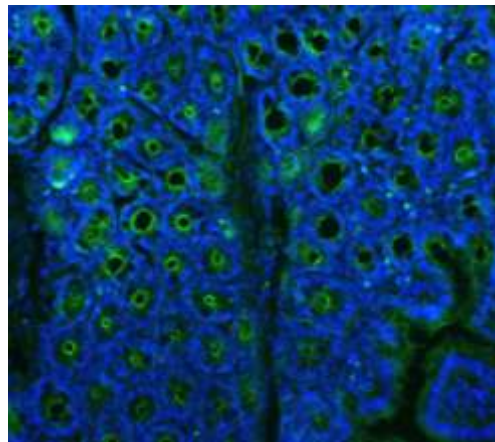
顯微鏡之預約登記，收取繳費單與開立收據，門禁卡申請與開卡事宜。

開放時間

日間: 8:30~17:00

夜間(僅供已經認證者以刷卡進出): 16:30~22:30

正立螢光顯微鏡 Upright Fluorescence Microscope



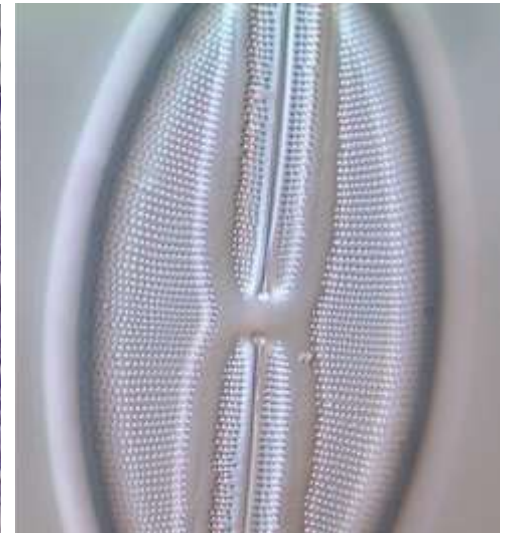
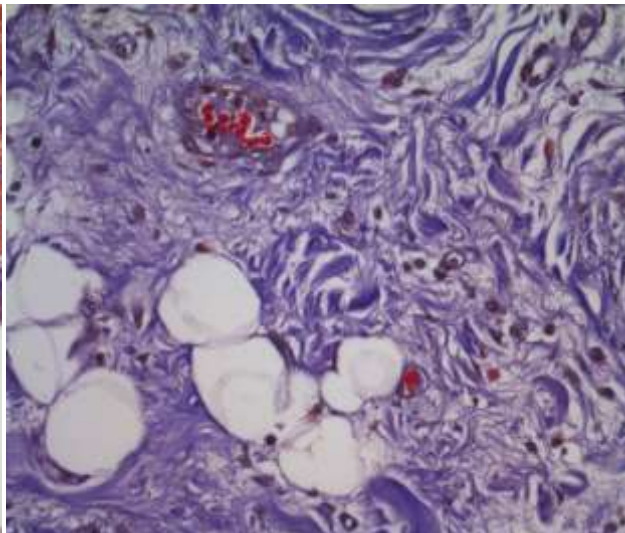
DIC

- Zeiss Axiolmager A1(A1)正立螢光顯微鏡
- Reflector: : DAPI, FITC, TRITC, Cy5, CFP, YFP
- Lens: 5x, 10x, 20x, 40x DIC, 100x DIC(oil)
- Camera:
 - B/W camera: ZEISS AxioCam 1388*1040P
 - Color camera: ZEISS AxioCam ICc 3 2080*1540P
- Software: AxioVision
- 建議應用於螢光、DIC樣品玻片觀察為主

正立顯微鏡 Upright Fluorescence Microscope



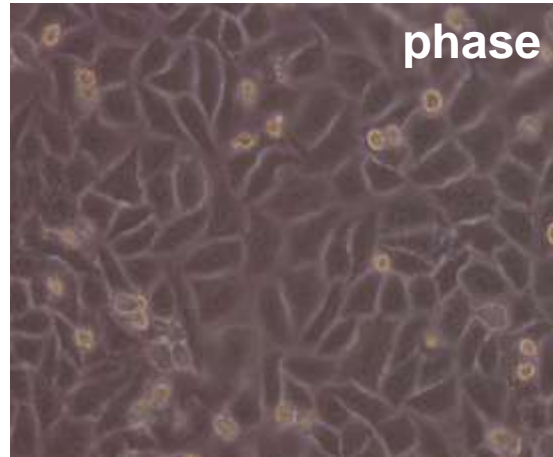
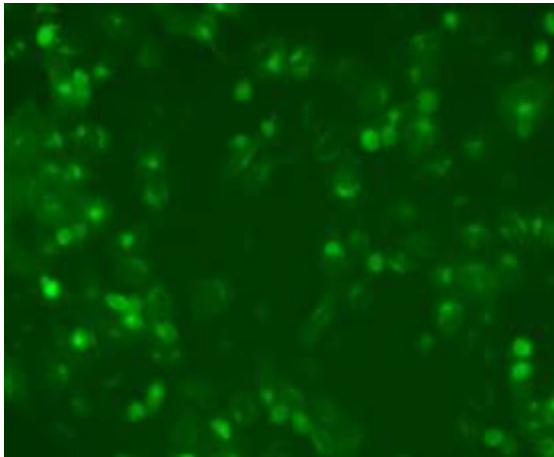
- Zeiss Axioplan 2 (A2) 正立螢光顯微鏡
- Reflector: **DAPI**, **FITC**, **TRITC**
- Lens: 5x, 10x Ph, 20xPh, 40x DIC, 100xDIC(oil)
- Camera: **OPTRONICS MicroFire** 1600*1200 pixels color camera
- Software: **PictureFrame**
- 建議拍攝彩色樣品，例如 **H&E staining**



倒立螢光顯微鏡 Inverted Fluorescence Microscope



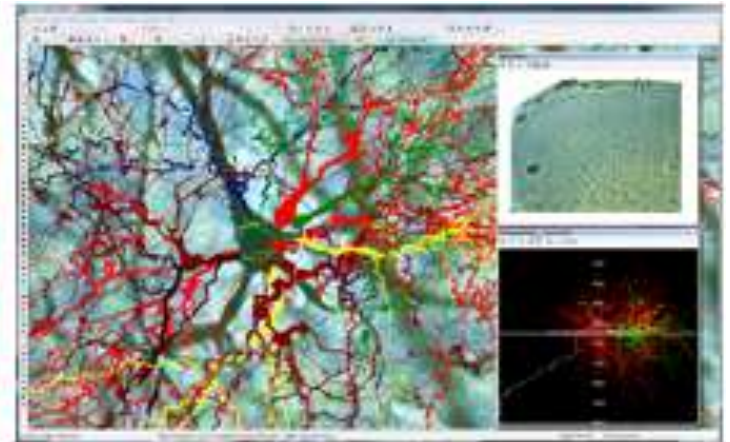
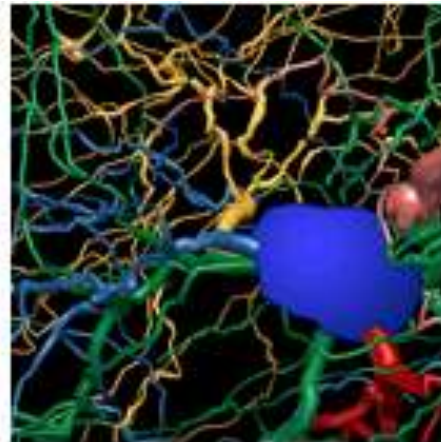
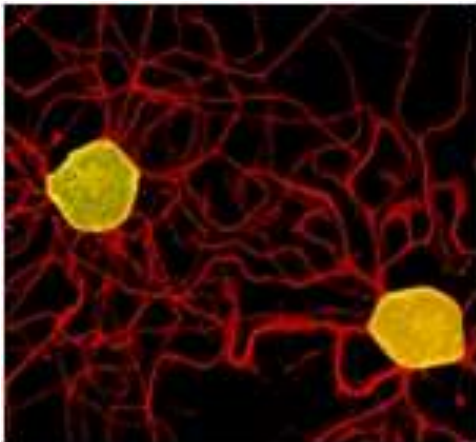
- Leica DMIRB 倒立螢光顯微鏡
- Reflector: DAPI, FITC, TRITC
- Lens: 10x Ph, 20x Ph, 40x Ph
- Camera: Leica DFC 490, 1088*816 pixels color camera
- Software: LAS
- 建議用於活細胞塑膠培養皿/盤，簡易 phase contrast 及 螢光觀察及影像記錄。



數位影像整合系統 MBF (MicroBrightField)



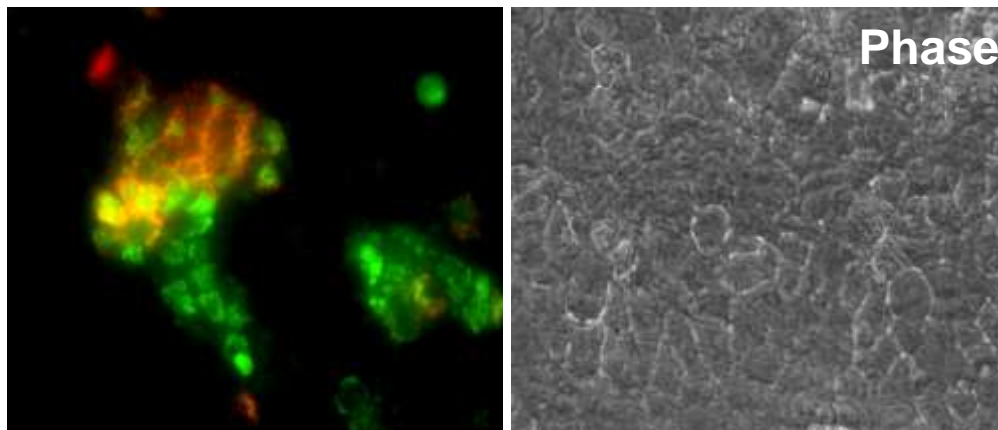
- Olympus BX 51正立螢光顯微鏡
- Reflector: **GFP**, **RFP**
- Lens: 4x, 10x, 20x, 40x(oil), 60x(oil), 100x(oil)
- Camera: mbf CX9000, 1600*1200P color camera
Hamamatsu Orca ER, 1344*1024P B/W camera
- Software: **SI-color**, **SI-mono**, **Neurolucida**
- 分析功能: neuron reconstruction,
3D mapping, and morphometry



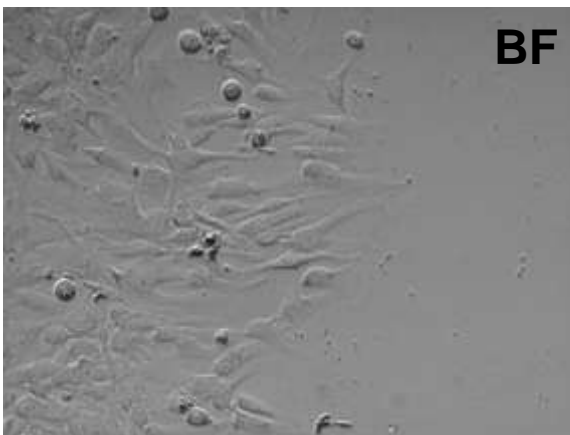
活細胞螢光顯微影像系統 Live Imaging system



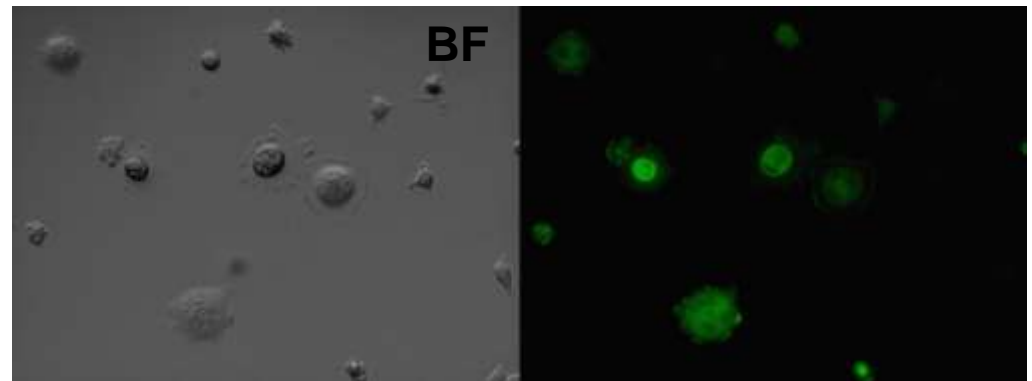
- Leica DMIRE2倒立螢光顯微鏡搭配 MetaMorph軟體
- Reflector: **DAPI**, **FITC**, **TRITC**
- Lens: 10x, 20x Ph, 40x Ph, 100x(oil)
- Camera: CoolSNAP HQ 1388*1040P B/W camera
- Software: MetaMorph
- 大型活細胞培養裝置，含溫度、濕度、CO₂控制
- 電動載物台
- 應用: 多重螢光、phase contrast相位差影像、Z section、長時間、多位置拍攝。可使用多孔盤細胞培養皿。



細胞培養即時顯像系統 Live Imaging system



- **ASTEC細胞培養即時顯像系統**: 於培養箱中以倒立顯微鏡觀察方式記錄細胞影像。
- **Lens: 10x**
- **螢光: GFP, Blue LED 470nm**
- **Software: CCM**
- **適合拍攝低倍細胞曠時影像 (time lapse) 應用**，例如 **cell migration, wound healing** 等，使用多孔細胞培養盤例如 **12-well plate**，長時間多位置拍攝穿透光 **BF** 影像，可在同時拍攝綠色螢光。



雷射共軛焦顯微鏡 Laser Scanning Confocal Microscope



- **Leica SP5** 正立雷射共軛焦顯微鏡

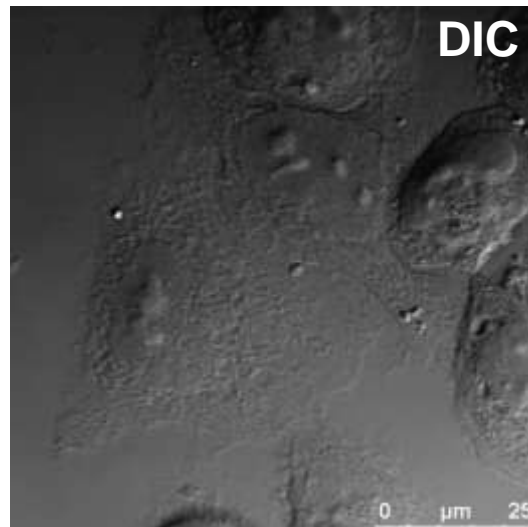
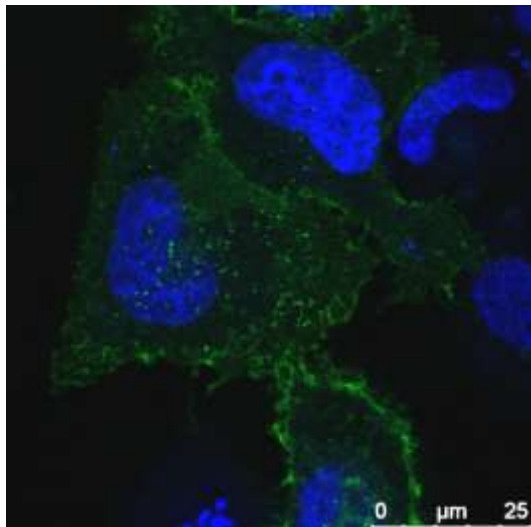
- **Laser:** 405, 458, 476, 488, 496, 514, 543, 633nm

- **Lens:** 10x, 20x DIC (oil), 40x DIC (oil), 63x DIC(oil), 100x DIC (oil)

- **PMT Detector:** 4 FL detectors + 1 TM detector

- **Software:** LAS AF Lite

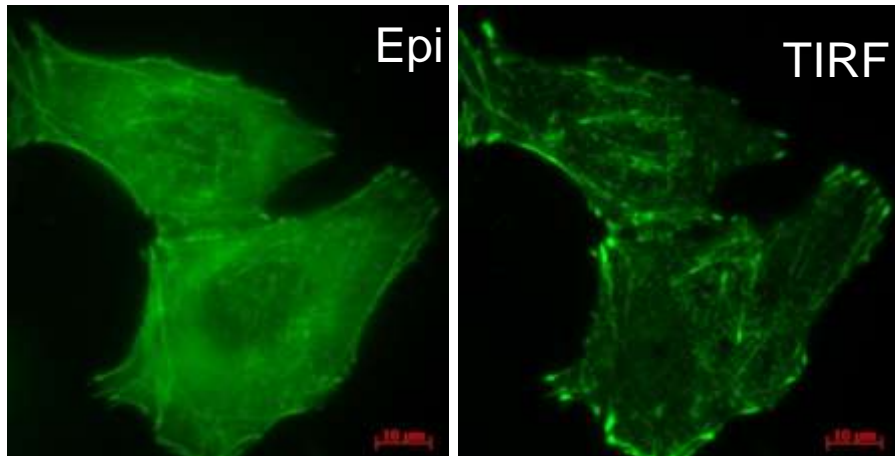
- **應用:** 一般標準玻片螢光影像澄清化，XYZ λ 多維螢光影像擷取。



全內反射螢光顯微鏡 Total Internal Reflection Fluorescence microscope(原理與應用請詳見專題報導 P15)

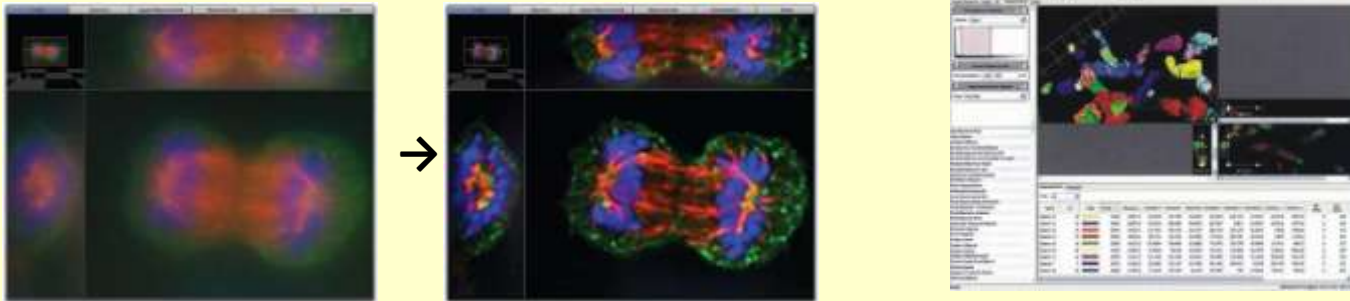


- Zeiss Axio Observer.Z1 倒立螢光顯微鏡
- TIRF 專用物鏡: α “Plan-Apochromat” 100x/1,46 Oil DIC 與 α Plan-Apochromat 100x/1.57 Oil-HI DIC Corr
- Laser : 405nm, 488nm, 561nm, 633nm AOTF control
- 電動 TIRF slider
- B/W Camera:
 - 高感度 EMCCD eVOLVe 512*512P
 - 高解析 CCD AxioCam MRm 1388*1040P
- TIRF 專用不透光大型細胞培養裝置
- 電動載物台
- 應用: TIRF 影像，可同時截取一般 xyzt 多維螢光影像，亦可應用於快速反應高速影像擷取等等。



離線軟體(Software)

- **Las AF Lite , AxioVision Lite** : 可開啟共軛焦顯微鏡(SP5) 、正立螢光顯微鏡與全內反射螢光顯微鏡所擷取之檔案並轉存成tif或jpg檔。使用者可安裝於各實驗室電腦。
- **MetaMorph 7.7, Image Pro Plus 6.0** : 二維影像之訂量分析。
- **Volocity 5.5 (PerkinElmer)** : 三維影像重組以及澄清化，三維影像之訂量分析，以及四維影像(三維影像之曠時攝影)之追蹤定量。



服務項目: 儀器設備以及離線軟體之教用及諮詢，委託操作共軛焦或全內反射螢光顯微鏡，活細胞影像擷取之委託設定。

- 教育訓練課程: 每年的十月份舉辦。
- 教學影片出借: 提供實機操作影片給急於使用機器但是未能參與教育訓練課程的使用者觀看，可抵教育訓練課程。目前錄製完成有: **Confocal SP5 ; Fluorescence microscopy (AxioImager.A1, AxioPlan 2) ; Live imaging (ASTEC & Leica)**
- 操作手冊: 每台儀器均放置簡易操作手冊供參考。
- 儀器與軟體使用教學與諮詢: 完成教育訓練首次上機者仍需管理員陪同操作，未參加教育訓練且未能觀看教學影片者將酌收教學指導費，詳見收費標準(P12)。

申請及使用資格：儀器開放對象為醫學院與附設醫院各系所及相關研究單位。

●親自操作儀器：

參加教育訓練 → R1405 紙本預約 → R1448 使用儀器 → R1405 交預繳費單

●委託操作：洽R1448管理員預約

●夜間使用：

日間使用五次

以上且 無不良紀錄者 → R1448 管理員認證 → R1405 紙本預約 → R1448 使用儀器 (需刷卡進出) → R1405 交預繳費單

●醫學院研究發展分處網頁(<http://www.mc.ntu.edu.tw/staff/ard/>)點選右側選單進入共用儀器網頁可下載預繳單，刷卡申請單等。門禁卡辦理請洽R1405。

收費標準(以1小時為計價單位)

儀器設備 (Fluorescence microscopy)	自行操作
Zeiss Axioplan 2	40 / hr
Zeiss Axiomager. A1	40 / hr
Leica DMIRB	40 / hr

無委託操作。管理員教學指導：每人100/hr

儀器設備	自行操作
數位影像整合系統 (MBF)	50元/hr

無委託操作。管理員教學指導：每人200/hr

儀器設備(Live image)	自行操作
ASTECC	50元/hr
Leica DM IRE 2	50元/hr

委託操作：200/hr(設定時間)。管理員教學指導：每人200/hr

儀器設備	自行操作	
共軛焦顯微鏡 Leica SP5	使用405雷射(450 / hr)	不使用405雷射(300 / hr)

委託操作：200/hr 管理員教學指導：每人200/hr

儀器設備	全內反射顯微鏡	4D影像追蹤軟體(Voloccity)
操作員操作	600/ hr	8:30~13:00 50/hr, 13:00~17:00 100/hr

☆全內反射顯微鏡為推廣使用，至100年12月底前僅收取50%費用。

●預約之後因故未使用，並且未於登記使用日前24小時取消預約者，須付50%費用。

 致謝第一共研顯微影像核心：為使顯微影像核心今後能順利運作，請使用者於發表文章時惠予致謝。

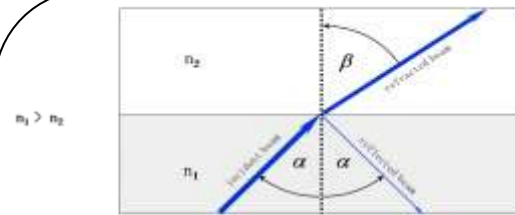
We thank the staff of the imaging core at the First Core Labs, National Taiwan University College of Medicine, for technical assistance.

對本核心實驗室如有任何指教，敬請不吝告知。

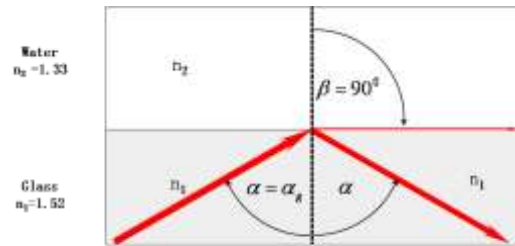
專題報導：全內反射螢光顯微鏡之原理與應用

醫學院第一共研新設置一台全內反射螢光顯微鏡，其原理與應用特色說明如下，歡迎全院、校同仁多加利用：

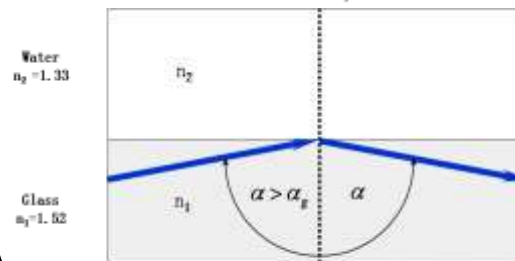
全內反射螢光顯微鏡(Total Internal Reflection Fluorescence Microscope)之原理



Snell 's law of refraction: $\frac{\sin(\alpha)}{\sin(\beta)} = \frac{n_2}{n_1}$



$\alpha = 61^\circ \Rightarrow \beta = 90^\circ$

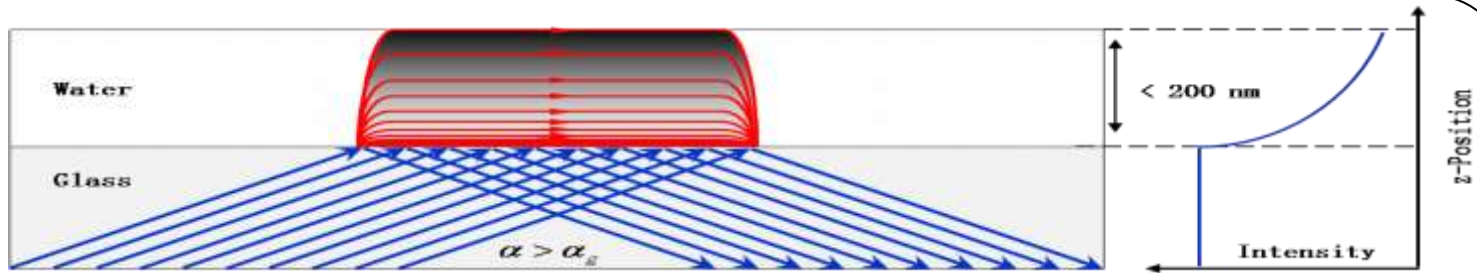


$\alpha > \alpha_g \Rightarrow \beta \text{ is not defined}$

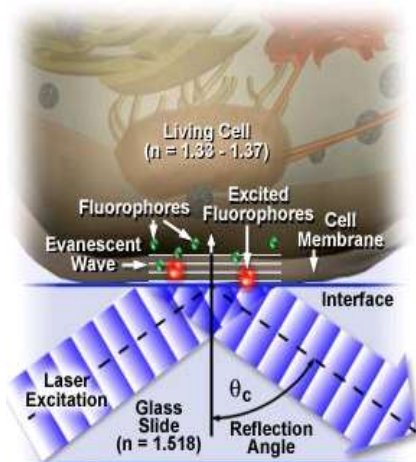
當光線通過不同介質時，由於折射係數 n 的改變，例如當由玻璃 $n_1=1.515$ 進入水 $n_2=1.33$ 的情況時， $n_1>n_2$ 光線會發生反射及折射。入射角 α 和反射角 β 與 n_1 ， n_2 之間的關係，可由**Snell's**定律求得。

如果持續增加光線的入射角度 α ，將會到達入射角度的臨界值 α_g ，此時折射角度 β ，為沿著兩界面前進的 90° 角。

當入射角度 α 大於臨界角 α_g 時，折射不再發生，此現象即為全反射。

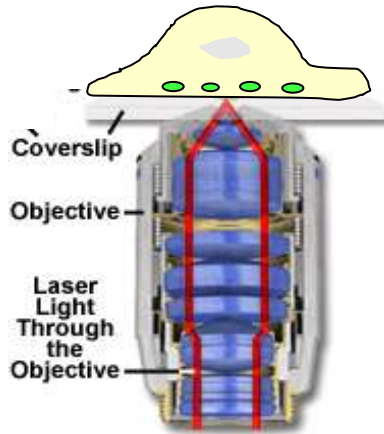


所謂全反射現象是指光線全反射，但若以電磁波的觀點來看，在發生全反射的介面，電磁場會透入一小段距離，我們叫這個波為漸逝波(**evanescent wave**)。漸逝波是一個不會傳播的波，他的強度是成指數衰減的，但是如果在非常靠近介面的地方有會吸收光的物質，例如螢光分子，漸逝波仍然有能力去激發這個螢光分子，因而產生螢光。此能量的傳遞的區間我們稱為**evanescent field** 漸逝區間，其深度大約為**200nm**，距離介面越遠能量越低。



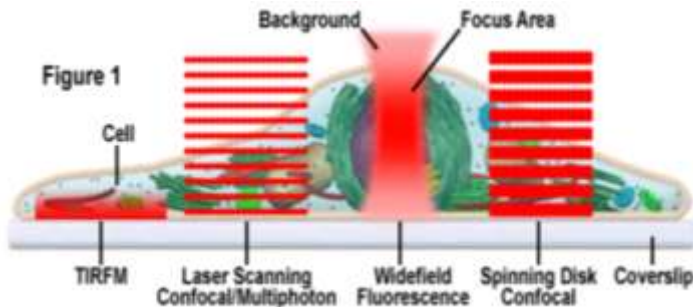
若將此特性應用在螢光顯微鏡上，例如利用漸逝波範圍，觀察貼附於靠近蓋玻片**200nm**以內的螢光標定物，例如表現於細胞膜附近的**focal adhesion**螢光蛋白。若超過此漸逝波可穿透的深度則不會被觀察到。

全內反射螢光顯微鏡之生物應用



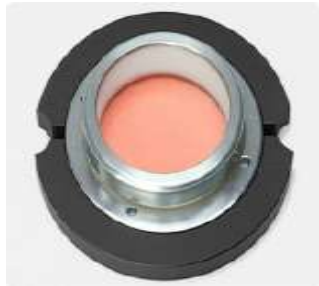
由於只觀察得到表面淺層的螢光訊號，所以TIRF影像於細胞模式應用時可避免細胞整體其他螢光訊號的干擾，而得以提升影像S/N ratio 得到清晰的細胞表面淺層訊號。TIRF顯微鏡應用範圍建議：觀察貼附於蓋玻片上之細胞膜行為，例如：胞吞、胞吐作用、細胞貼附及爬行過程、蛋白運送(protein trafficking)、細胞膜受體(receptor)與接合子(ligand)的反應等。

左圖為各種螢光觀察方式其光學切片與細胞的空間關係，左至右說明如下：



- TIRFM觀察的空間限於貼附於蓋玻片的表面。
- 雷射共軛焦顯微鏡（例如一共的Leica的SP5）則以pinhole篩選焦距面內的光進行觀察，達到光學切片的效果。
- 一般螢光顯微鏡，焦距面上下層螢光互相干擾，所以影像易模糊不清。
- Spinning Disc Confocal，利用佈滿pinhole高速轉盤製造光學切片效果。

TIRF上機樣品備製要點

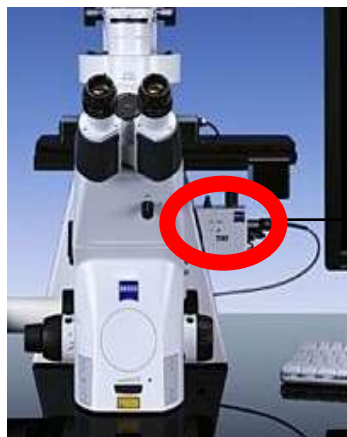


- 由於形成TIRF需要物理環境上折射率上的滿足，因此上機樣品請務必滿足以下條件，以免浪費時間準備樣品。
- 事先至第一共同研究室索取或自行準備下述規格圓形蓋玻片，將玻片置於培養皿中，使細胞長於蓋玻片上，上機前組合成左圖之chamber即可上機觀察。
- 玻片使用前以酒精消毒，置於無菌操作台UV燈下照射後使用，但勿滅菌。
- 玻片厚度為標準厚度0.17mm，折射率約為1.515，大小為直徑30mm或者42mm的圓形蓋玻片。
- 此外若需要使用100X N.A.1.57物鏡，需要使用折射率更高寶石片（折射率1.66），也可向一共購買該耗材，每片新台幣2000元。



- 下列樣品條件將**無法觀察TIRF**
- 載玻片樣品，由於沒有水存在形成折射率的差異，無法滿足形成全反射的條件。
 - 無貼附性樣品，例如果蠅胚胎，由於不像細胞是貼附生長於蓋玻片上所以一無法產生TIRF效果。
 - 於一般塑膠Petri Dish或厚玻璃底chamber slide 上的樣品。

第一共研全內反射螢光顯微鏡硬體搭配介紹：



TIRF
slider

- 電動TIRF slider：可以自動搜尋全反射角度。
- 倒立式螢光顯微鏡：適合活細胞觀察，搭配培養箱及CO₂與溫濕度控制器，可長時間的觀察紀錄。
- 增益型CCD/EMCCD：高感度的EMCCD擅於拍攝微弱的螢光訊號，並以極短的曝光時間增加每秒鐘的拍攝張數。
- TIRF專用物鏡： α “Plan-Apochromat” 100x/1,46 Oil DIC 與 α Plan-Apochromat 100x/1.57 Oil-HI DIC Corr，高N.A.值的物鏡：也就是大開口徑的物鏡，可容納更大的入射角才能達到全反射的效果。
- 405nm, 488nm, 561nm, 633nm四支雷射：雷射搭配AOTF具有精準快速切換的優點，適於應用在高速多重螢光活細胞影像。

第一共研全內反射螢光顯微鏡實機拍攝圖

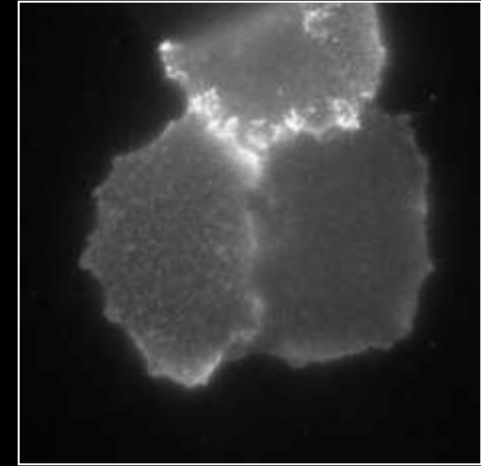
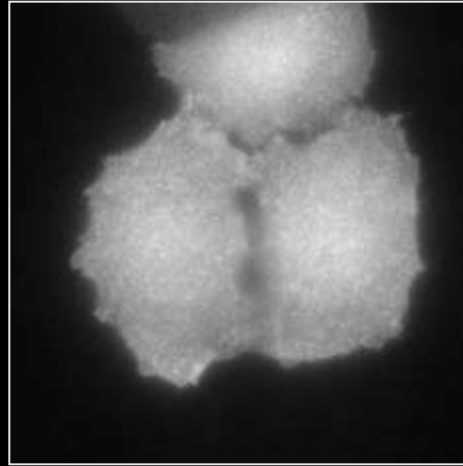
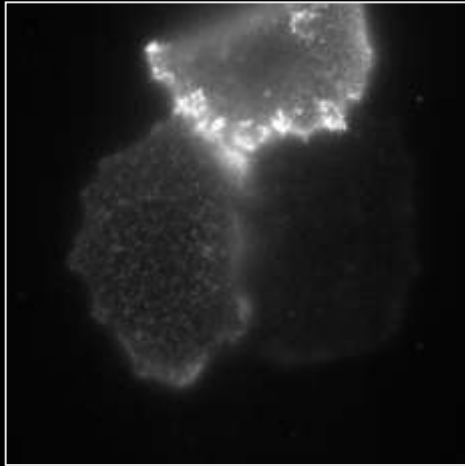
Membrane receptors

Protein A

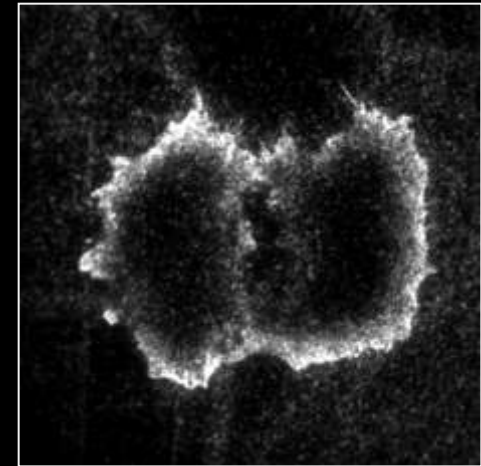
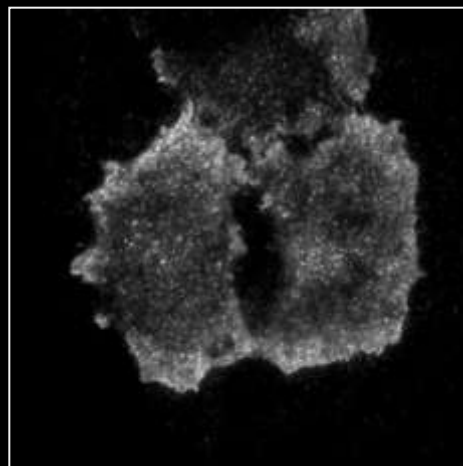
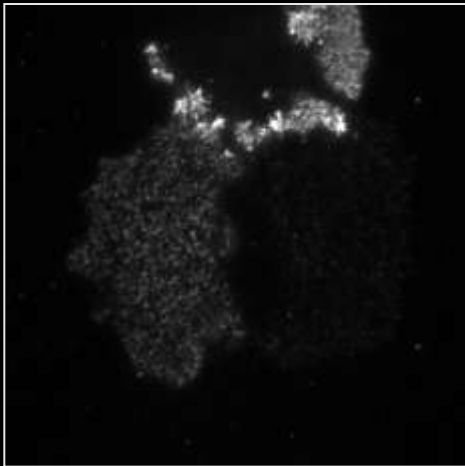
Protein B

Protein C

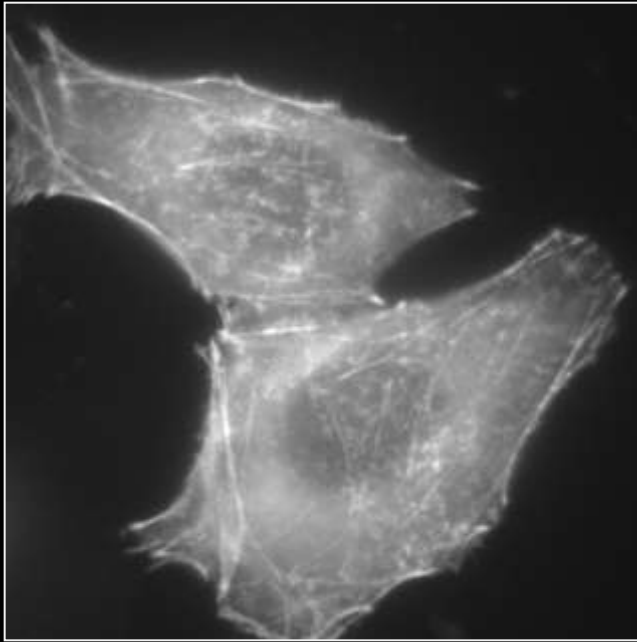
Epi
fluorescence



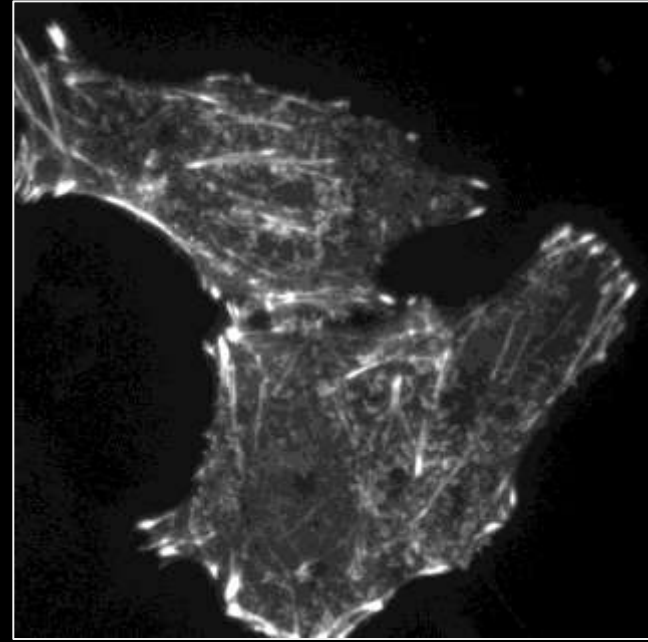
TIRF



EGFP-actin

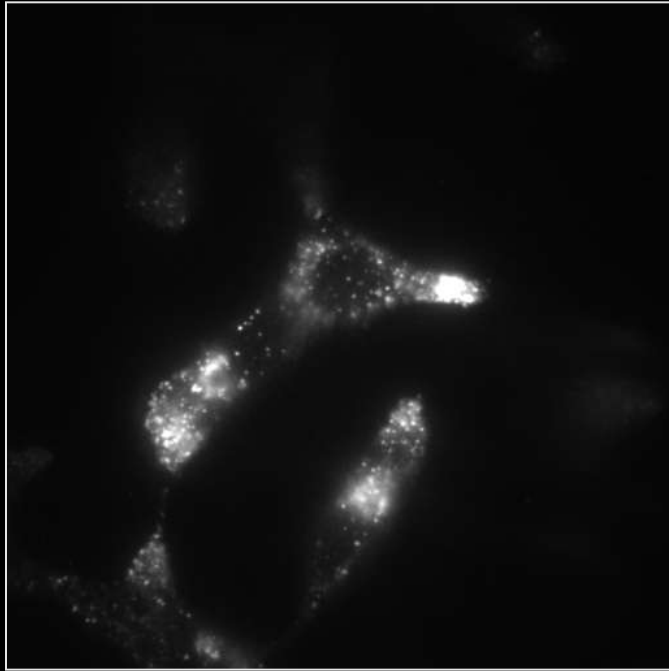


Epi fluorescence

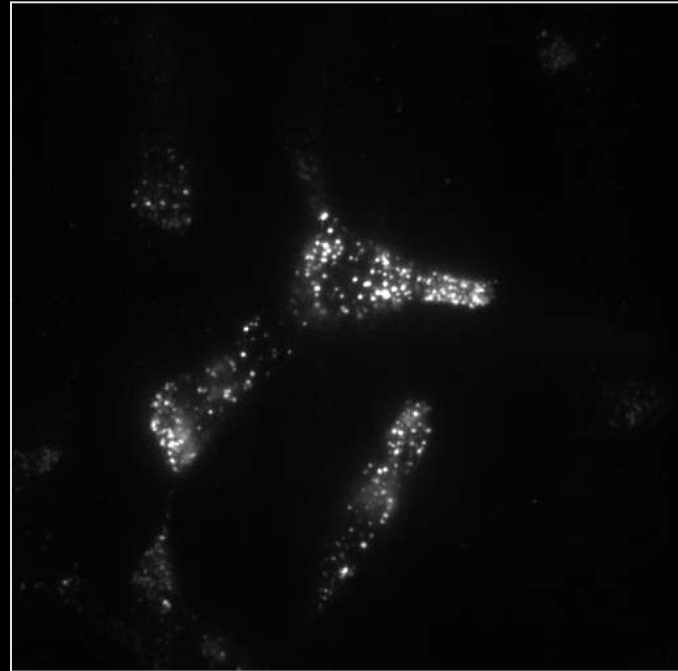


TIRF

Intracellular Vesicles



Epi Fluorescence



TIRF