

# 多模態非線性顯微影像術

如何看的更深，看的更仔細，看到別人看不到的東西，永遠是從事顯微影像工作者的目標。本文從古典的共焦顯微術開始，介紹目前最普遍的幾種非線性效應光學顯微術。本文亦討論最近本實驗室所發展之多模態非線性顯微影像術。本實驗室利用鉻貴橄欖石雷射所輸出之長波長紅外光對生物樣本具有高穿透度和低吸收低破壞的特性，因而同時得到活體生物標本深處的二倍頻、三倍頻以及多光子吸收螢光影像，以組成所謂的多模態非線性顯微影像。此多模態非線性顯微影像技術亦已應用於觀測藍光氮化鎵材料內部壓電場與雜質的分布影像。

朱士維、孫啟光

## 一、前言

顯微鏡的發明使得人們對世界的組成有了全新的認識。近年來在顯微影像技術上有許多重要進展，像是電子顯微術、共焦顯微術 (confocal microscopy)、螢光顯微術 (epi-fluorescence microscopy)、掃描式穿隧顯微鏡 (scanning-tunneling microscopy)、原子力顯微術 (atomic-force microscopy) 以及光學近場掃描顯微術 (near-field scanning optical microscopy) 等，都是新穎而重要的發明。顯微技術研發的一個重要目標就是要能夠觀測單一活體細胞內微器官在控制的生化環境中所表現出的即時動態行為。而要達到這個目標需要有高解析度、靈敏的感應度和選擇性，以及要能夠做高穿透度與三維影像的觀測。然而大部分的系統並不能夠同時滿足這些要求。

朱士維先生為國立台灣大學光電工程學研究所碩士班研究生。

孫啟光先生為美國哈佛大學應用物理博士，現任國立台灣大學光電工程學研究所副教授。

在螢光顯微技術中，通常必須先把我們所要觀察的特定物質染色，像是蛋白質、核酸或是其他細胞中的物質，再以紫外光或可見光燈源激發使其放出螢光，如此便可以觀察細胞中特定物質的分布，並大幅度提高選擇性。在適當的架構下，這樣的技術甚至可以觀測到單一發光分子團的動態行為。但是傳統的螢光顯微鏡在光前進方向無法達到很好的解析度，即軸向解析度 (axial resolution) 不好。如果想要提高解析度，必須結合所謂的共焦顯微術。下面我們就先來簡單的介紹何謂共焦顯微術。

## 二、共焦顯微術

由於傳統螢光顯微鏡是利用單光子激發 (single-photon excitation) 放光的機制，在樣本中只要有激發光經過的地方都會發光，而不是只有焦點處會放出螢光。於是收集螢光訊號時，就會連同焦點上下所發出的螢光都一起收集，而造成影像的解析度大幅的降低。為了解決這樣的問題，Marvin Minsky 在 1956 年提出了共焦顯微術的概念<sup>(1)</sup>。圖

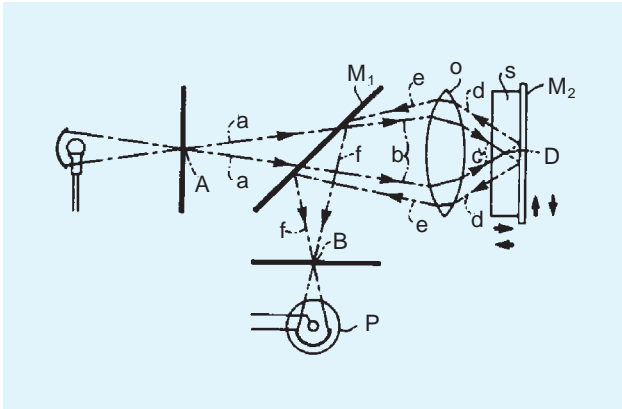


圖 1. 最早的共焦顯微鏡示意圖，左方為光源，A、B 為孔隙，D 為焦點，P 為光偵測器，M<sub>1</sub> 為分光鏡，M<sub>2</sub> 為反射鏡，abc 為入射光，o 為透鏡，def 為要收集的信號，s 為樣品。(取自 Marvin Minsky, *Microscopy Apparatus*, Nov. 7, 1957)

1 為共焦顯微鏡的基本架構<sup>(1)</sup>。左方光源發出的激發光經凹面鏡聚焦後通過一個微小的孔隙 (aperture A)，穿過分光鏡，再由透鏡將激發光聚焦在樣本上。樣本中被激發所發出的螢光經後方的反射鏡反射後由同一個透鏡收集回來經分光鏡反射，聚焦在另一個孔隙 B 上，也就是這個孔隙決定了解析度。若是孔隙 B 夠小，由非焦點處所發出的螢光信號就會被擋住而無法被偵測到，於是便可以只得到由焦平面發出的螢光所形成的單一深度影像。這樣的技術可提昇軸向解析度至 0.5 - 1.5 微米，橫向解析度更可高至 0.2 - 0.5 微米。將樣本沿光軸前後移動即可得到一連串的切片影像 (sectioned image)，甚至可將這整組切片影像合併而得到三維空間的立體影像。

共焦顯微技術最大的優點就是提供了很好的軸向解析度，不過卻也有許多的缺點。例如由於必須使用非常小的孔隙以提高解析度，同時也就會將訊號變得非常微弱而不易量測。此外，為了要得到足夠的訊雜比，需要較強的激發光。但光場太強又很容易會產生光漂白 (photo-bleach) 與光破壞 (photo-damage)，造成樣本的損傷。再加上螢光顯微術的觀測原理是基於對激發光源的吸收，因此無法達到較高的穿透深度 (因為激發光源多半是短波長光源，吸收及散射均較嚴重)。為了避免這些問題，

於是發展出了利用非線性現象來取代孔隙以達到高軸向解析度與高穿透度的技術。

### 三、非線性顯微影像術

在討論各種不同的技術前，讓我們先了解為何可以利用非線性現象來代替孔隙得到較佳的解析度。舉例而言，對於利用高斯雷射光束 (Gaussian beam) 聚焦產生二倍頻 (second harmonic generation, SHG) 這種非線性現象而言，入射光和所產生二倍頻的強度有如下的關係<sup>(2)</sup>：

$$A_2(z) = \frac{i4\pi\omega}{nc} \chi^{(2)} A_1^2 J_2(\Delta k, z_0, z)$$

$$J_2(\Delta k, z_0, z) = \int_{z_0}^z \frac{e^{i\Delta k z'}}{(1 + 2iz'/b)}$$

上式中， $A_2(z)$  和  $A_1$  分別代表二倍頻和入射激發光場的強度。由上式可看出所產生的二倍頻強度和激發光強度的平方成正比。焦點處的光場強度最強，離開焦點以外的地方，其二倍頻強度將會與距離成四次方衰減 (因為面積以平方比例隨距離變大，而光場強度和面積成反比)。所以利用非線性現象所得到的訊號可說全部都是來自焦點處而不會有任何的背景雜訊 (background-free)，自然可以得到非常好的解析度。接下來，我們簡單介紹幾種非線性顯微影像術。

#### 1. 雙光子螢光顯微影像術

首位預測有雙光子吸收現象的是 1931 年的諾貝爾物理獎得主 Maria Goppert-Mayer<sup>(3)</sup>，在他的博士論文中討論了原子或分子同時和兩顆光子相互作用的可能性。不過一直要等到雷射發明後，才真正實現了他的假設。至於想到將這樣的性質應用在顯微影像術上面則首推 Colin J. Sheppard<sup>(4)</sup>，而在 1990 年由 Winfried Denk 等人在科學期刊 (*Science*) 上首次發表雙光子螢光顯微影像的實驗結果<sup>(5)</sup>。

雙光子吸收放光的原理見圖 2(a)。樣本材料吸收了兩顆光子造成電子躍遷至較高的能態，當電子再度躍遷回到穩態時，就會放出一顆光子。通常其能量會略小於兩顆被吸收光子能量的總和。這個過

程牽涉到三階的非線性效應，所放出的螢光強度和入射光強度的平方成正比關係。圖 2(b) 是一個實際的例子，說明雙光子吸收螢光和單光子吸收螢光的不同。照片中右方是傳統的單光子吸收放光實驗，可以看到樣本中有激發光通過處都會有螢光。在這樣的情形下，若想要得到高解析度的顯微影像，就需要孔隙來擋住不是從焦點處發出的螢光。而左方的小光點則是雙光子吸收放光的結果，很明顯可以發現除了焦點有螢光訊號外，其他的地方完全不會放光，因此形成了非常好的自身切片能力 (auto-sectioning power)。如果用 700 奈米的光作為激發源，數值孔徑 (numerical aperture, N.A.) 為 1.4 的物鏡來聚焦，百分之八十的雙光子激發放光訊號會被限制在 0.3 微米乘 0.3 微米乘 1.0 微米的焦空間中<sup>(6)</sup>。因為沒有任何的背景螢光干擾，所以這樣的方式可以提供非常好的解析度。

除了能夠提供很好的解析度之外 (和共焦顯微術相當)，雙光子吸收放光反應還有一個最大的優點，就是大幅度的減少了光漂白或光破壞反應的發生機率。事實上，這也可以說是拜飛秒 (femtosecond) 脈衝雷射的發明之賜。因為像這樣的非線性現象要能夠發生，必須要有非常高的瞬間功率。而要達到這樣高的功率主要是利用雷射光為單一波長光，能夠聚焦到接近繞射極限 (diffraction limit) 的特性，所以能夠得到空間中非常小面積的聚焦點。再加上利用鎖模機制 (mode-lock mechanism)，在時間上把脈衝的能量壓縮在一百飛秒左右的等級，就能得到比共焦顯微術 (或說單光子激發放光) 高出  $10^6$  倍以上的瞬間功率。同時功率週期 (duty cycle) 又非常短，大約為  $10^{-5}$  左右，故其平均功率仍能維持只有數個毫瓦的等級，大致和共焦顯微術相仿。所以在激發的區域中幾乎不會造成破壞，樣本其他的部分當然就更不會了。

雙光子螢光顯微術所使用的激發光源通常是單光子激發所需的兩倍波長，這點也形成了另一項重大的優勢，那就是提高了穿透深度。其原因一方面是由於樣本的吸收降低許多。這有兩個理由：第一、顯而易見的，比起單光子激發來說，雙光子激發在樣本中只有在焦點處才会有吸收放光的反應；第二、生物細胞在近紅外光區的吸收遠低於紫外光

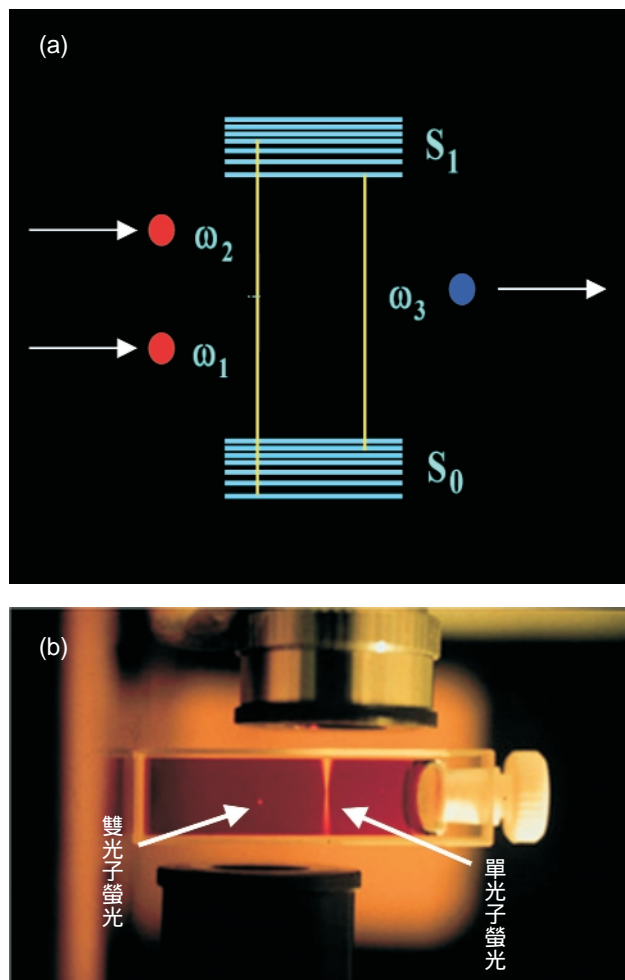


圖 2. (a) 雙光子吸收放光的原理示意圖，(b) 右方為單光子螢光，整個樣本都會放光，左方則為雙光子螢光，只在焦點處產生 (影像取自 Brad Amos MRC, Cambridge)。

或可見光區的吸收。另一方面則是因為用較長的波長做激發光源，在樣本中所受到的瑞萊散射 (Rayleigh scattering) 就會較小，因此能得到較深的影像，而這在顯微影像術中是非常重要的考量因素。

另外，由於不需要一個孔隙來提高解析度，雙光子螢光顯微影像術可以有較好的訊號收集效率。而且對於傳統需要用紫外光來做激發光源的螢光分子團，通常會需要兩組光學系統來處理入射的紫外光和發出的可見光。運用雙光子吸收的機制就可以使激發光和訊號光都落在近紅外光到可見光波長區，光學系統的架設上也比較容易。

## 2. 二倍頻顯微術

利用先前所提到的二倍頻效應來作為信號，這樣的技術也是在 1978 年由 Sheppard 等人首次發展出來的<sup>(7)</sup>。圖 3 是二倍頻的基本原理，和雙光子吸收不一樣的地方在於倍頻效應並沒有真正產生電子的能階躍遷，而只是經由虛擬的能階躍遷產生頻率恰為入射光頻率兩倍的光子。雖然它是最早被實驗證實的非線性光學現象，但也要一直到了雷射發明後，功率密度夠高才能實現。二倍頻是一個二階非線性效應，所產生的二倍頻光強度也是和入射光強度的平方成正比關係。所以很容易可以想像，二倍頻顯微術會類似於雙光子螢光顯微術，也可以不需孔隙就達到相當於共焦顯微鏡的解析度。至於其他雙光子螢光顯微術有的優點，可以說二倍頻顯微術都具備了。

除此之外，二倍頻顯微術還有一些雙光子螢光顯微術沒有的優點。由於並沒有牽涉到真正的能階躍遷，也就不會有廢熱的問題（例如，吸收了兩顆 1 電子伏特 (eV) 的光子而放出一顆 1.8 電子伏特的光子，就會有 0.2 電子伏特的廢熱累積）。因為之所以會有樣本被破壞的現象發生，常是由於入射光太強而在樣本中累積了太多廢熱。因此利用二倍頻做顯微術時，由於沒有廢熱產生，就完全不會有樣本被打壞的問題。而且用二倍頻做顯微術時，不需要像在做螢光顯微術時要加染色劑，也因此避免了光毒害 (phototoxicity) 的問題。另外，能夠產生二倍頻的材料，一定要沒有中心對稱性 (central

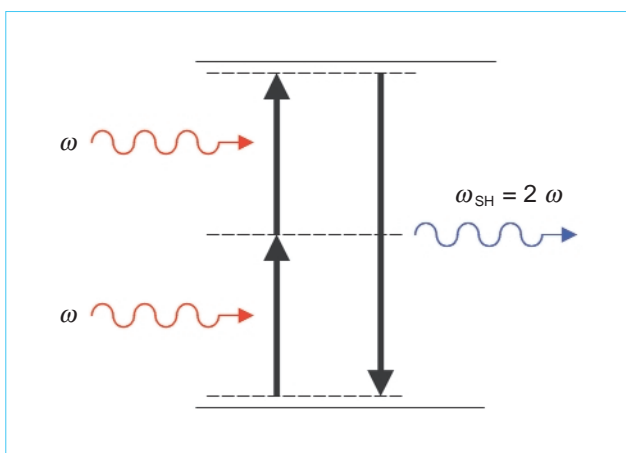


圖 3. 二倍頻原理示意圖。

symmetry)。因此我們也在去年提出了利用二倍頻找尋天然的光子能階晶體 (photonic bandgap crystal) 的可能，不過這方面目前仍在研究中。

## 3. 三倍頻顯微術 (Third Harmonic Generation Microscopy, THGM)

類似二倍頻效應，三倍頻也是沒有牽涉到真實電子躍遷的反應，所以也不會對樣本造成任何的傷害。不過這是三階的非線性效應，且三倍頻光的強度和入射光強度的三次方成正比，所以切片能力更好。理論上來說，在同質均勻 (homogeneous) 的材料中，在焦點前後的三倍頻互相形成相消干涉，產生的淨三倍頻是零<sup>(2)</sup>。但如果有些非同質均勻處在焦點附近，破壞了沿光軸的對稱性，便會產生可量取的三倍頻信號，最簡單的例子就是兩個不同材質的介面處。而且所有的材料都有三階非線性係數，但卻不一定會有二階非線性係數，所以三倍頻可以用來做比二倍頻用途更為廣泛的顯微術。在 1997 年由 Y. Barad 等人在光纖中首次運用三倍頻得到了介面影像<sup>(8)</sup>，緊接著就在隔年由 J. A. Squier 等人在生物樣本中用三倍頻得到了動態的影像<sup>(9)</sup>。

## 四、多模態非線性顯微影像術

這是由本實驗室在去年研發出結合了上述三種非線性效應優點的顯微技術，其實驗架構如圖 4。光源採用鉻貴橄欖石 (Cr:forsterite) 飛秒脈衝鎖模雷射，中心波長在 1230 奈米，脈衝長度為 100 飛秒。這樣子的波長剛好落在植物體吸收最弱的波長區域，使得穿透深度大為增加；而且也使得所產生的倍頻和多光子吸收放光的訊號都落在可見光波段中；同時可見光的訊號和近紅外光雷射的波長距離也相當遠，要用分光鏡分離它們也就比較容易，這些都使得量測工作較為簡單。接著藉由一顆高數值孔徑的物鏡來把光聚焦到半徑一微米左右的大小，接近繞射極限，再由另一顆相對放置的物鏡來收集所發出的螢光或倍頻信號。而為了不把光偵測器打壞，需要用濾色片 (color filter) 濾掉雷射光。接著把信號導入頻譜儀中以分離出各種不同的信號，最後再以一個靈敏度極高的電荷耦合光偵測器

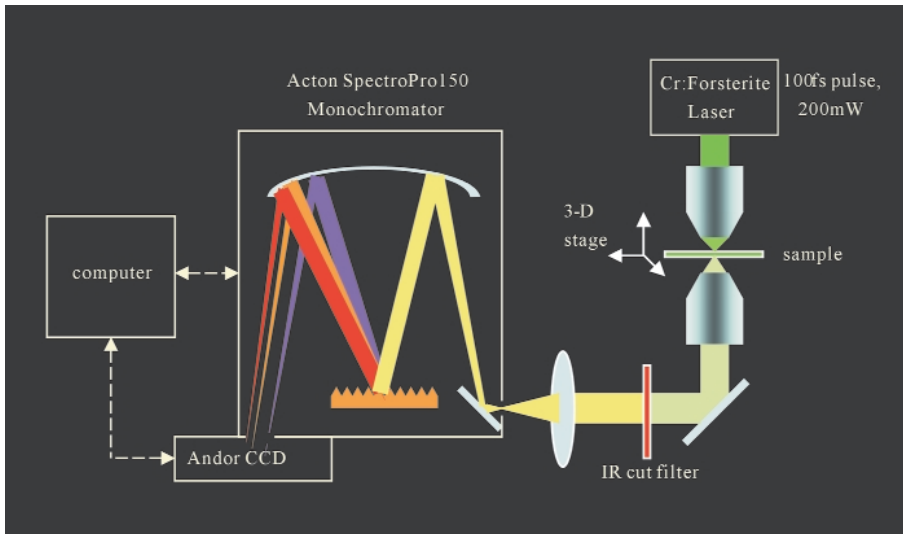


圖 4.

多模態非線性顯微術實驗架構圖。鉻貴橄欖石飛秒脈衝雷射經物鏡聚焦於固定在三維位移平台的樣本上。所發出的倍頻及螢光信號，由另一個相對的物鏡收集，濾掉紅外光雷射後，導入頻譜儀中將不同信號分離，接著以電荷耦合光偵測器來收集信號，並送入電腦中處理以取得掃描影像。

(charge-coupled device, CCD) 來測量這些非常弱的非線性信號。影像的形成則是採用所謂的雷射掃描顯微術 (laser scanning microscopy, LSM)，把樣本放在一個和電腦以及光偵測器同步的電動位移平台 (translation stage) 上，移動樣本作點陣式的掃描。

在這些訊號中，我們可以利用三倍頻來描繪出樣本的細微結構組成，並利用二倍頻來找出一些小於微米等級的超細構造。因為有這些構造的存在，破壞了組織的對稱性，才會產生較強的二倍頻信號，而同時又可以用多光子吸收的螢光信號來找出一些特定分子團的位置。接下來簡單介紹一些我們

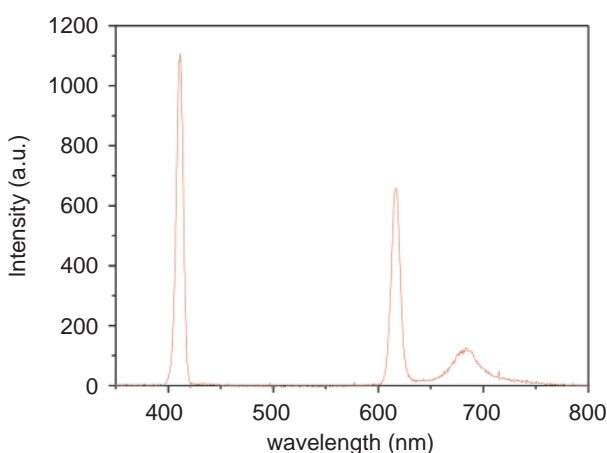


圖 5. 玉米莖基本細胞所取得的頻譜，最左方的對稱峰為三倍頻，中央的對稱峰為二倍頻，右方較寬的頻譜代表雙光子螢光。

的初步成果。

### 1. 生物方面的應用

在生物樣本方面我們首先選擇玉米，它堪稱是世界上最重要的經濟作物。我們在玉米莖的切片上得到了許多非常好的影像。圖 5 是玉米莖基本組織 (ground tissue) 細胞的頻譜，可以看出三個主要的訊號峰，由左到右分別是三倍頻 (410 奈米)、二倍頻 (615 奈米) 和雙光子螢光 (650 - 700 奈米)。隨著樣本移動，紀錄下這三個訊號的大小，就可以構成掃描影像。圖 6 是玉米莖基本組織的橫切面影像。圖 6(a) 是三倍頻的掃描影像，可以發現在垂直於光行進方向的介面處，三倍頻信號確實有很明顯的增強。至於二倍頻則是對平行於光行進方向的介面特別敏感，這點可由圖 6(b) 看出來。而圖 6(c) 的雙光子激發螢光信號則說明在細胞壁中也許有些特殊的分子團會放出螢光。圖 6(d) 則是三者的合併影像，可以看出各個信號分別在不同的位置產生，藉此能夠找出其來源以及訊號成因，以對細胞有更進一步的了解，這樣的方式提供給我們比單利用其中任一種顯微術更多的訊息。

圖 7 則是說明利用這樣的顯微技術，我們可以看到 0.5 毫米深度非常清楚的切面影像，這可以說是目前在未經特殊處理的生物樣本中所能達到最深的影像。圖 7(a) 中在 65 微米深度處可以看到三種不同的信號各有其最強的區域，分別代表了不同的

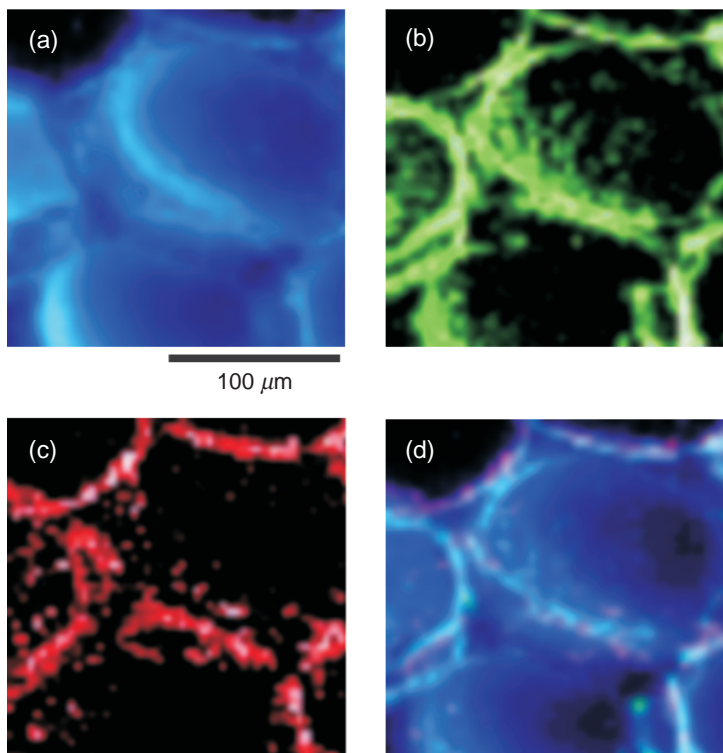


圖 6. 玉米莖基本組織細胞的橫切面影像：(a) 三倍頻影像 (用藍色代表)，(b) 二倍頻影像 (用綠色代表)，(c) 雙光子吸收螢光影像 (用紅色代表)，(d) 組合影像。

細胞組織 (記得顏色疊合的原理，例如紅色加藍色會變成紫色)。而在深處所掃描的圖 7(b) 中，三倍頻信號卻幾乎完全消失了。這主要是因為一方面在這麼深的地方雷射光受散射影響，聚焦效果會比較差，而三倍頻信號和雷射強度三次方成正比，所受的影響較大。另一方面是三倍頻的波長為紫光，原本在生物樣本中就會有比較強的吸收和散射，較不容易收集。另一個值得注意的地方是二倍頻在細胞壁附近似乎會分裂成兩條，我們的猜測是二倍頻是由二次細胞壁 (secondary wall) 所引起的。因為在植物的二次細胞壁上有著非常多細小的纖維狀組織 (fibril)，可能就是它們造成了中心對稱性的破壞，因而產生了較強的二倍頻。為了證實這樣的假設，我們找了植物細胞中二次細胞壁最厚的梨果肉細胞。因為它有非常厚的細胞壁，故又被稱為石細胞 (stone cell)。結果在石細胞的細胞壁上確實得到了更強的二倍頻，進一步支持我們的論點。

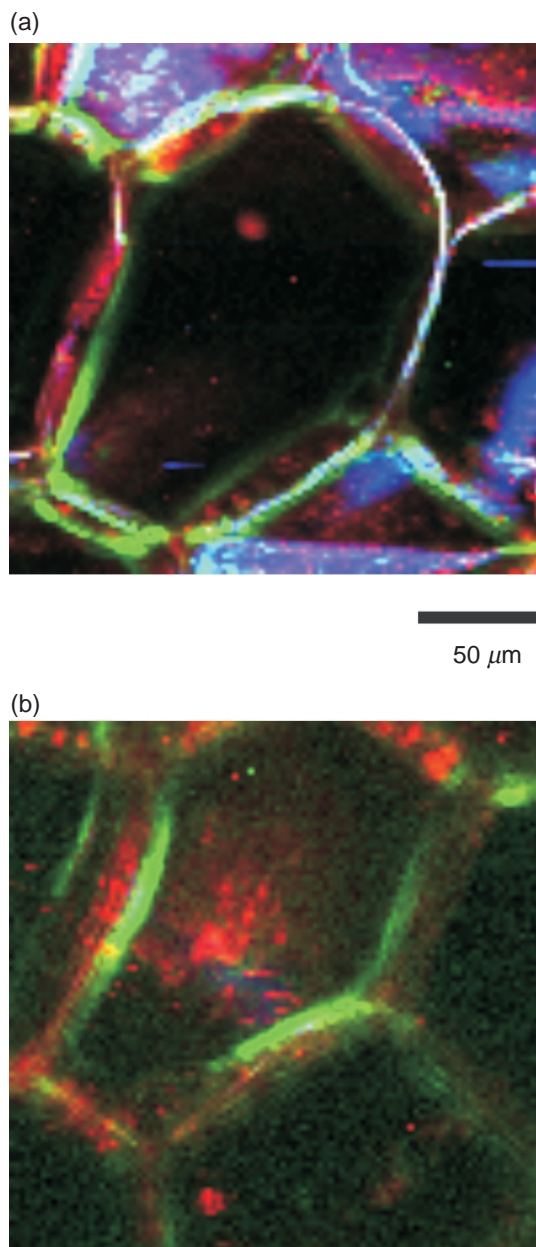


圖 7. 玉米莖基本組織細胞的橫切面影像在 (a) 65 微米深處和 (b) 415 微米深處。

接下來把焦點移到葉肉組織細胞的研究，我們選用鴨跖草的葉子。圖 8 是一組活體葉肉組織細胞的掃描影像，其中的葉綠體可以看得非常清楚。然而若仔細觀察，就會發現二倍頻的位置很特殊。由影像中可以看出，三倍頻和雙光子螢光都是均勻的分布在整顆葉綠體上。這很容易理解，因為三倍頻是由細胞質和葉綠體間的介面所引起的。而雙光子螢光的頻譜經對照後，認為應是由其中的葉綠素所

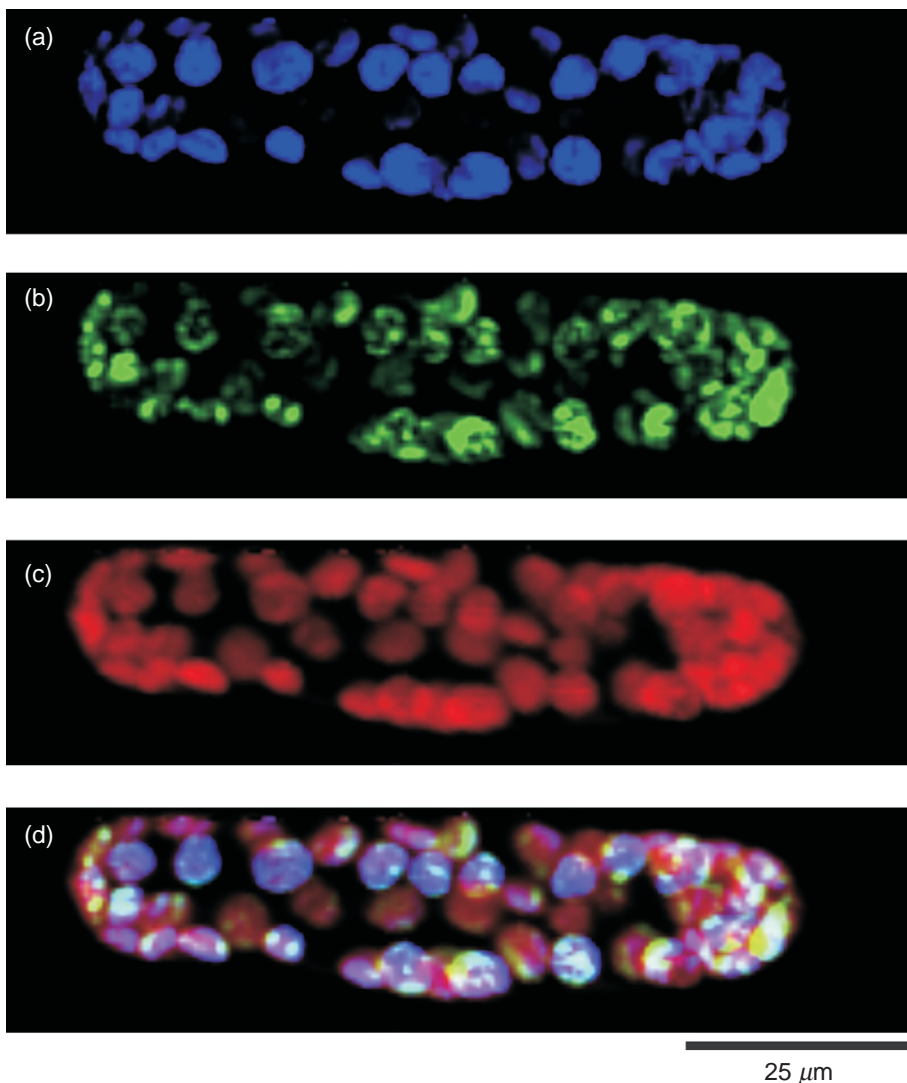


圖 8.  
一個完整的葉肉組織細胞切面  
影像：(a) 三倍頻影像，(b) 二  
倍頻影像，(c) 雙光子螢光影  
像，(d) 組合影像。

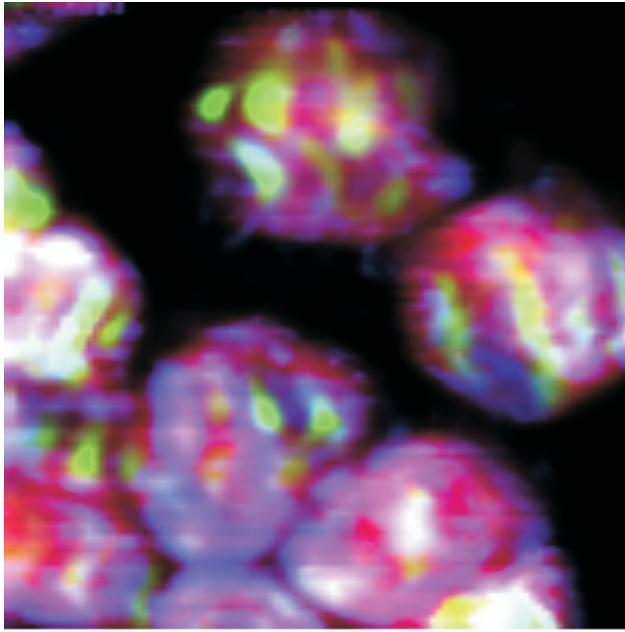
發出的螢光，所以整顆葉綠體都會有三倍頻和螢光是很正常的。但二倍頻則似乎只在某些特定的位置才會格外強，這個現象由圖 9 可以看得更為清楚。目前我們猜測這樣的二倍頻效應有可能是葉綠體中的葉綠餅 (grana) 構造所引起的。葉綠餅的結構就像是一疊非常小的圓形扁碟，若雷射光從特定方向進入，看到的結構失去中心對稱性，便可能產生較強的二倍頻。而這樣的效應和雷射光的極化方向也會有很大的關係，甚至同一顆葉綠體中的葉綠餅若隨時間轉動的話也會造成影響，這些都尚待進一步的研究。

## 2. 半導體材料方面的應用

除了在生物樣本中的應用外，顯微影像術，尤

其是非線性顯微影像術，近年來另一項重要用途就是用來研究固態材料的結構。例如用二倍頻研究鋅化硒表面結構<sup>(10)</sup> 以及二倍頻晶體三硼酸鋰 (LBO,  $\text{LiB}_3\text{O}_5$ ) 中二次非線性係數的分布情形<sup>(11)</sup>，還有像前面提到過用三倍頻來「看」光纖中的介面等。我們則利用這個技術來研究目前最熱門的藍光材料 - 氮化鎵 (GaN)，藉由非線性顯微術來了解氮化鎵中內建壓電場 (piezoelectric field) 和能帶缺陷態 (bandtail state) 的分布情形。由於目前對於氮化鎵的激發放光 (photoluminescence, PL) 機制乃至於更重要的雷射放光機制究竟是由壓電場還是缺陷態所主導的問題仍在激烈的爭論中，若能詳細了解兩者的分布情形，相信能對解決這個爭議有相當大的幫助。

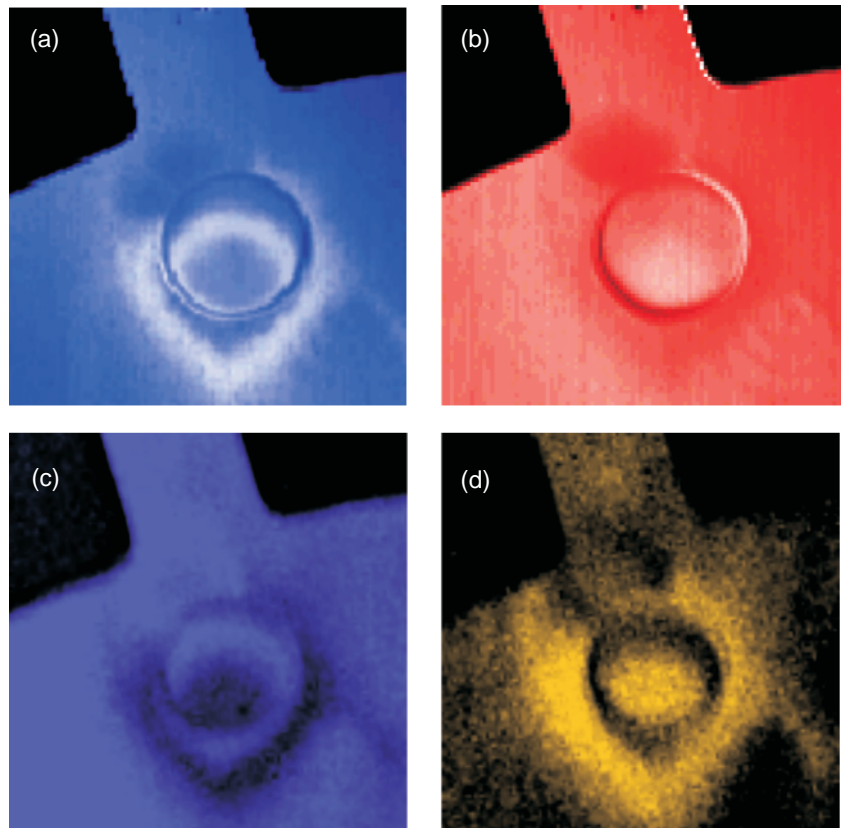
由於最近在氮化鎵中電場引起二倍頻增益效應



10  $\mu\text{m}$

圖 9. 葉綠體中二倍頻的分布並不像三倍頻和雙光子吸收螢光般均勻。

(electric field induced second harmonic, EFISH) 的發現<sup>(12)</sup>，遂讓我們有了可以用二倍頻來偵測氮化鎵中電場的分布情形的想法。另一方面，由於氮化鎵的能帶缺陷帶之吸收能隙 (bandgap) 約在 3.1 電子伏特，換算成波長就是 400 奈米，若用波長在 1200 奈米左右的光源則可產生和此能隙共振的三倍頻。也就是說，壓電場和能帶缺陷帶分別會引起二倍頻和三倍頻的增益效應。如此一來就可分別利用鉻貴橄欖石雷射的二倍頻和三倍頻來得知在氮化鎵晶體中壓電場和能帶缺陷態的分布。我們用一片原本是用來做霍爾量測 (Hall measurement) 實驗的氮化鎵晶體來實現此想法。長在藍寶石 (sapphire) 上的氮化鎵厚度為 2.5 微米，取此樣本邊緣一圓形缺陷處來執行雷射掃描顯微術。結果如圖 10(a) 與 (b)，顏色越白代表信號越強，可看出在缺陷處周圍的三倍頻特別強，而二倍頻則較圖上其他地方來得弱。為了解釋其原因，我們改用光子能量略大於氮化鎵能隙能量一半的鈦藍寶石 (Ti:sapphire) 雷射 (720 nm)，利用所產生的雙光子吸收螢光來找出能帶缺



100  $\mu\text{m}$

圖 10. 氮化鎵霍爾量測實驗樣本的邊緣 (a) 三倍頻影像，(b) 二倍頻影像，以及用鈦藍寶石雷射作的雙光子激發螢光影像，波長在 (c) 氮化鎵能隙 (365 奈米) (d) 缺陷態黃色螢光 (550 - 600 奈米)。

陷帶的位置。圖 10(c)(d) 為其結果，可以發現由缺陷帶引起的黃色螢光其位置和三倍頻增強的位置完全一樣，證實了我們可以用三倍頻來定位缺陷帶。至於為何二倍頻會減弱相當容易解釋，因為在氮化鎵中的壓電場是來自於不同分子晶格大小不同，所以長晶時會造成分子產生應變 (strain)，而導致內建強大壓電場的產生。但缺陷部分可能是由於晶體長得不好，這時分子就不會有太多應變，壓電場也就較小，而造成了二倍頻的下降。

## 五、結語

非線性顯微影像術可以說是近年來發展最快的顯微技術，運用非接觸性、非破壞性的光源來觀測各種生物或非生物體的細微結構。雖然解析度受限於光的波長，但其最大而目前無可取代的價值就是可以觀察到各種即時的反應，而這在生物實驗中是非常重要的。我們實驗室所發展出的多模態非線性顯微影像術，已經成功的在活體生物細胞中和氮化鎵晶體中得到了非常傑出的成果。但要走的路仍然很長，例如對於生物體中引起二倍頻和多光子吸收

的機制尚待進一步了解，以及建構一個即時影像系統等，都是我們未來要努力的方向。

## 參考文獻

1. Marvin Minsky, *Microscopy Apparatus*, **7** (1957). Or U.S. Patent 03013467.
2. Robert W. Boyd, *Nonlinear Optics*, New York: Academic Press, 94 (1992).
3. Goppert-Mayer M., *Ann. Phys.*, **9**, 273 (1931).
4. C. J. Sheppard and R. Kompfner, *Appl. Optics*, **17**, 2879 (1978).
5. W. Denk, J. H. Stricker, and W. W. Webb, *Science*, **248**, 73 (1990).
6. B. Herman, *Fluorescence Microscopy*, 2nd ed., Springer, 95 (1998).
7. J. Gannaway and C. J. R. Sheppard, *Opt. Quantum Electron.*, **10**, 435 (1978).
8. Y. Barad et. al., *Appl. Phys. Lett.*, **70**, 922 (1997).
9. J. A. Squier, M. Muller, G. J. Brakenhoff, and K. R. Wilson, *Opt. Express*, **3**, 315 (1998).
10. R. Hellwarth and P. Christensen, *Opt. Commun.*, **12**, 318 (1974).
11. R. Gauderon, P. B. Lukins and C. J. R. Sheppard, *Opt. Lett.*, **23**, 1209 (1998).
12. J. Miragliotta and D. K. Wickenden, *Phys. Rev.*, **B 53**, 1388 (1996).