

# 極限之上—超解析度結構照明顯微術

## Beyond the Limit—Superresolution Structured Illumination Microscopy

陳思妤

Szu-Yu Chen

基於光的波動特性，遠場光學顯微術的解析度因為光的繞射而受限於繞射極限，大約為光波長的一半。然而，隨著生醫研究越來越深入生物組織中超過繞射極限範圍的微小結構，對於光學顯微技術解析能力的要求亦逐漸提高，傳統受限於繞射極限的光學顯微術已然不敷使用。因此，光學顯微術的研究團隊興起了一股超解析度的風潮，在短短的二十年間即百花齊放，開發出多種可超越繞射極限的超解析度光學顯微術，並已嘗試運用於生醫的研究上。本文將針對目前在生醫研究上最普遍被應用的遠場超解析度顯微術之一—結構照明顯微術 (structured illumination microscopy, SIM) 進行原理及技術發展的介紹，並探討其在生醫應用上的優點及可能面臨的挑戰。

Based on the wave nature of light, the spatial resolution of far-field optical microscopy is limited by diffraction limit due to diffraction and this limit is about half of the light wavelength. However, as the biomedical researches gain insight into much smaller structures of bio-tissues beyond the diffraction limit, the resolving power requirements of the optical microscopy also get higher and higher and traditional optical microscopes under diffraction limit are yet to fill these requirements. Therefore, superresolution technique became a hot research topic in the field of optical microscopy and in the past two decades, various superresolution optical microscopes were developed to break the resolution barrier and demonstrated on the biomedical researches. This article focuses on one of the far-field superresolution microscopy, structured illumination microscopy (SIM), which is so far the superresolution technique most commonly applied to the biomedical researches. Both the principles and the development of structured illumination microscopy are introduced in this article, and in addition, the advantages and the possible challenges of these techniques for biomedical applications are also discussed.

### 一、簡介

光學顯微術最早的歷史可追溯至 1590 年代由 Zacharias Jansen 所發明的第一部複式顯微鏡 (compound microscope)，因光源取得的便利性，

光學顯微術較其他生醫影像技術如 X 光攝影、超音波、核磁共振 (MRI) 及核醫影像等發展早了許多，是最早被運用來觀察生物組織及細胞結構的影像技術。因光的波長介於 400–1300 nm 之間，光學顯微術的解析度可達數百奈米，足以讓我們

一窺生物組織及細胞內的結構。在 17、18 世紀時英國科學家 Robert Hook 首度以改良的複式顯微鏡觀察到軟木組織內的結構，建立了生物組織是由「細胞」組成的概念，而荷蘭科學家 Antonie van Leeuwenhoek 則是透過光學顯微術觀察到細菌、精子等微生命體，開創了微生物學的研究。在數百年來生物醫學的發展中，光學顯微術一直扮演著極重要的角色，是生醫研究不可或缺的工具，而隨著生醫研究對影像品質及功能的要求越來越高，光學顯微術也持續地發展創新，不斷地追求更高的解析度、靈敏度、穿透度及功能性。早期研究著重於廣域顯微術的開發，如暗場 (dark-field)、相位對比 (phase contrast)、微分干涉對比 (differential interference contrast, DIC) 及螢光顯微術等，主要目的在增加影像的對比度，因系統架構的複雜性低，目前皆廣泛運用在薄切片或體外培養細胞的觀察上；另一方面，為突破樣本厚度的限制，自 1960 年代起即發展出一系列的光學切片顯微技術，如共軛焦 (confocal)、雙光子螢光 (two-photon fluorescence) 及倍頻顯微術 (harmonic generation microscopy) 等，可用來在厚組織裡進行虛擬切片，在不破壞樣本的狀況下取得次細胞級解析度的影像。

然而，基於光具有波動性質，在有限孔徑大小的光學系統中會產生繞射現象，因而使影像的解析度受限於所謂的繞射極限 (diffraction limit)。根據 Ernst Karl Abbe 所提出的阿貝成像理論 (Abbe theory of imaging)<sup>(1)</sup>，光學系統的繞射極限與波長及數值孔徑有關，此極限約為波長的 1/2 倍，若所使用的光源為可見光，最高能達到的橫向解析度約為 200 nm，許多生物組織及細胞內小於此繞射極限的結構將無法被解析。為了滿足生醫研究對於探究微小結構的需求，除了近場顯微術 (scanning near-field optical microscopy, SNOM)<sup>(2)</sup> 的應用外，近二十年來有許多研究團隊致力於開發各式各樣超解析度的遠場光學顯微術，藉由對螢光分子的調控或特殊的激發方式，期能獲得超越繞射極限的解析度。

1992 年 Hell 和 Stelzer 首度開發了 4Pi 及 I<sup>5</sup>M 顯微術<sup>(3-4)</sup>，成功地以激發光或訊號的干涉來增

加影像的縱向解析度。1994 年 Hell 和 Wichmann 則開始發展目前相當熱門的受激放射耗乏顯微術 (stimulated emission depletion microscopy, STED)<sup>(5)</sup>，以點對點的雷射掃描系統為基礎，藉由使螢光分子產生受激放光 (stimulated emission) 來抑制螢光的產生，縮小等效的點分散函數 (point spread function, PSF) 以提高解析度。1997 年 M. G. L. Gustafsson 提出了廣域的結構照明顯微術<sup>(6)</sup>，利用兩道同調光在樣本上干涉產生明暗相間的橫紋，由結構式的照明搭配影像重建來擴大等效光傳遞函數 (optical transfer function, OTF) 的範圍，進而增加影像中空間頻率的高頻成分來提高空間解析度。此外，近年來迅速發展的隨機光學重建顯微術 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)<sup>(7)</sup>，亦利用螢光分子發光狀態的切換，搭配激發光縱向形狀的調變來達成三維的超解析度影像。這些超解析度顯微系統所利用的原理各不相同，但都可將空間解析度大幅推進至一百多奈米至數十奈米的等級，有助於解析生物組織及細胞內細微的結構，甚至取得分子影像。本文將以眾多超解析度顯微術中的結構照明顯微術為例，針對其原理及目前相關技術的發展進行介紹，並探討其優缺點及可能面臨的挑戰，而在這之前，我們必須先了解光學顯微系統之解析度是如何被定義的。

## 二、光學顯微術之解析度

在幾何光學中，所有的光都必須是直進的，一個點光源經由光學系統成像後仍然會重建回一個點，在這個假設下所有光學系統的解析度都是無限小的。然而在真實的物理世界裡，因光具有波動的特性，在遇到邊界時會產生繞射的現象，使得光不再如幾何光學所描述的直進傳播。若在光學系統的孔徑為無限大的條件下，光不會產生邊界的繞射，幾何光學的假設則可以被滿足，但實際上所有光學系統的孔徑都是有限的，因此繞射的現象將不可被忽略。根據阿貝成像理論，點光源在經過有限孔徑大小的光學系統後會在像平面呈現一繞射圖形，而無法重建回一個點，此繞射圖形即為系統的點分散函數 (如圖 1(a))。根據雷利準則 (Rayleigh criterion)

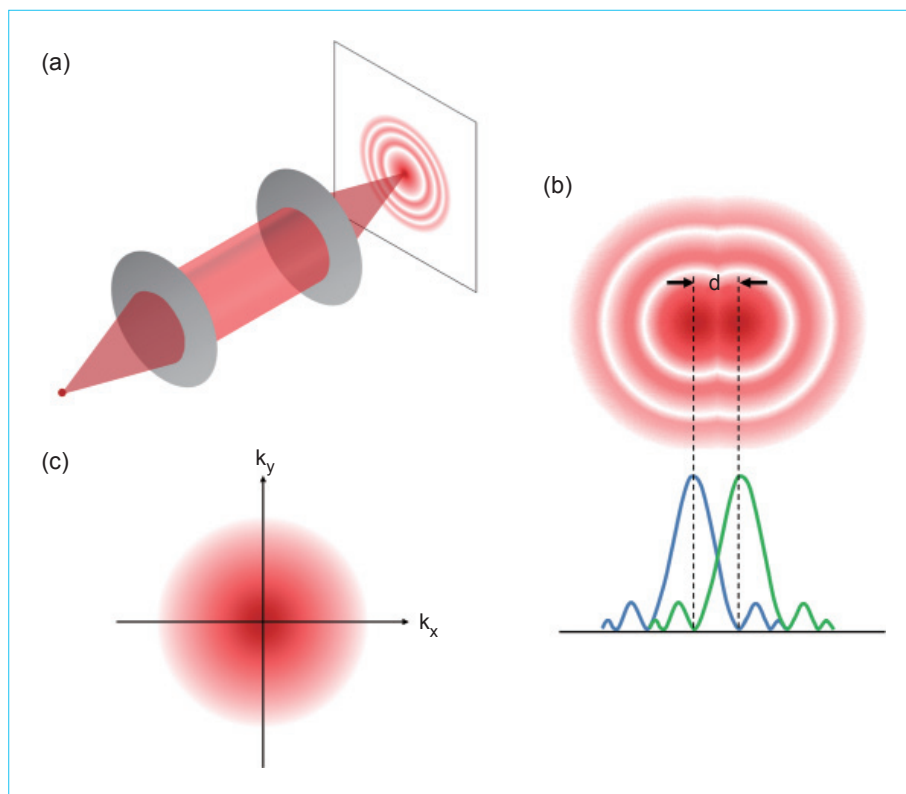


圖 1.

(a) 光學系統點分散函數之示意圖；(b) 兩個點光源間可被解析之最小距離， $d$  為雷利準則所定義之系統解析度；(c) 在傅氏空間中光學系統光傳遞函之示意圖。

<sup>(8)</sup>，PSF 的大小將決定兩個點光源間可被系統解析的最小距離，此距離即為系統的解析度 (如圖 1(b))，可描述如下式，

$$d = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (1)$$

其中  $\lambda$  為光的波長，NA 為系統的數值孔徑 (numerical aperture, NA)，根據此式所獲得之解析度  $d$  即為繞射極限，越大的 NA 值或越短的波長則可得到越小的 PSF，系統的解析度也越高，若能在相同波長及 NA 下獲得更小的 PSF，使解析度高於上式計算的結果，即為超解析度的光學系統。

除了從像空間的 PSF 來看系統的解析度外，亦可由頻率空間的角度來加以討論。根據傅氏光學的理论<sup>(8)</sup>，所有空間中物或像的結構都可藉由傅氏轉換將之拆解為不同空間頻率的成分，結構較大者的空間頻率較低，而越細微的結構則具有越高的空間頻率，光學系統的解析度將決定於系統所能接收的空間頻率範圍，接收範圍越大者則能在影像上呈現越細微的結構。等效光傳遞函數 (OTF) 為 PSF

經過傅氏轉換的結果 (如圖 1(c))，其在傅氏空間中所描述的，即為系統所能接收的空間頻率的範圍。根據傅氏轉換的特性，越小的 PSF 所對應的 OTF 越大，能接收的空間頻率也越高，系統將具有較高的影像解析度，若能增加 OTF 的有效範圍，使之大於繞射極限所限制的大小，則可獲得超解析度的影像。

### 三、結構照明顯微術的基本原理

如前段所述，OTF 的範圍代表了該光學系統可記錄的空間頻率範圍，超解析度的影像可透過增加 OTF 的有效範圍來達成，而將這個概念發揮到極致的，就是結構照明顯微術。結構照明顯微術，顧名思義是以有結構的光來做為顯微術的照明，自 1997 年被發表以來，最早發展也是目前普遍被應用的是廣域的結構照明<sup>(6, 9-10)</sup>。在各種產生廣域結構照明的方法中，最常見的是使用光柵來產生激發光的多階繞射光，並使其中兩道繞射光 (通常為  $-1$  及  $1$  階繞射) 經過物鏡在樣本上重疊產生一個維度

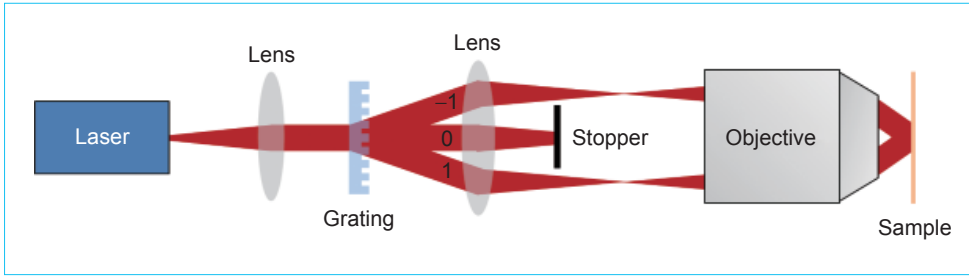


圖 2. 廣域結構照明顯微術中以干涉方式產生一維結構照明之架構示意圖。

的干涉橫紋 (如圖 2)，此干涉橫紋在樣本上產生的照明強度分布 (如圖 3(a))，可描述為<sup>(11)</sup>

$$I_{\text{ex}}(r) = 1 + \cos(\omega_r \cdot r) \quad (2)$$

$\omega_r$  為該弦波的空間頻率， $r$  為物空間的座標。若樣本上螢光濃度的分布函數為  $F(r)$ ，則在此照明下樣本所產生的螢光強度分布 (如圖 3(b)) 為

$$I_{\text{em}}(r) = I_{\text{ex}}(r)F(r) \quad (3)$$

而根據成像原理，經過成像系統所取得的螢光影像應為螢光強度與系統 PSF 旋積 (convolution) 的結果：

$$I_{\text{im}}(r) = [I_{\text{ex}}(r)F(r)] \otimes P_{\text{em}}(r) \quad (4)$$

其中  $I_{\text{em}}(r)$  為螢光影像強度的分布， $P_{\text{em}}(r)$  則為系統的 PSF。若對式子 (2) 和 (4) 做傅氏轉換，在傅氏空間中  $I_{\text{ex}}(k)$  和  $I_{\text{im}}(k)$  (如圖 3(c) 和 (d)) 將可分別描述為：

$$I_{\text{ex}}(k) = \delta(k) + \frac{1}{2}\delta(k + \omega_r) + \frac{1}{2}\delta(k - \omega_r) \quad (5)$$

$$I_{\text{im}}(k) = \left[ F(k) + \frac{1}{2}F(k + \omega_r) + \frac{1}{2}F(k - \omega_r) \right] O_{\text{em}}(k) \quad (6)$$

其中  $O_{\text{em}}(k)$  為系統的 OTF，此函數定義了可被系統接收的頻率成分。由式子 (6) 及圖 3(d) 可見，在  $I_{\text{im}}(k)$  函數中除了原本樣本的空間頻率函數  $F(k)$  之外，還包含因結構照明而產生位移的空間頻率函數  $F(k - \omega_r)$  和  $F(k + \omega_r)$ 。這兩個函數的出現，顯示有部分原本不在系統 OTF 範圍內的高頻成分，將因函數的位移而進入 OTF 的範圍。從另一個角度來

看，就等同於擴大 OTF 的有效範圍 (如圖 3 (e))，這代表所取得的影像中將包含更多的高頻資訊，也意味著解析度的提升。然而，因影像中同時包含  $F(k)$ 、 $F(k - \omega_r)$ 、和  $F(k + \omega_r)$  三項未知的函數，要進行影像的重建，就必須先取得各個函數的解，而普遍的做法是對照明進行兩次的相位位移，照明強度分布經相位位移後，在像空間及傅氏空間中可分別描述為

$$I_{\text{ex}}(r) = 1 + \cos(\omega_r \cdot r + \phi_n) \quad (7)$$

$$I_{\text{ex}}(k) = \delta(k) + \frac{1}{2}\delta(k + \omega_r)e^{-i\phi_n} + \frac{1}{2}\delta(k - \omega_r)e^{i\phi_n} \quad (8)$$

而根據式子 (4)，所取得的影像在傅氏空間中可描述為

$$I_{\text{im}}(k) = \left[ F(k) + \frac{1}{2}F(k + \omega_r)e^{-i\phi_n} + \frac{1}{2}F(k - \omega_r)e^{i\phi_n} \right] O_{\text{em}}(k) \quad (9)$$

由上式可知，經過兩次相位位移後將可取得另外兩張亦包含此三個未知函數的影像，如此將能與無相位位移的影像 (式子 (6)) 聯立求出  $F(k)$ 、 $F(k - \omega_r)$  和  $F(k + \omega_r)$ ，以重建影像。基於  $I_{\text{ex}}(r)$  本身受限於繞射極限，弦波最高的空間頻率為  $\omega_{r\text{max}}$ ，約等於  $O_{\text{em}}(k)$  的截止頻率  $\omega_{\text{em}}^c$ ，影像重建後可取得的空間頻率範圍則受限於  $\omega_{\text{eff}}^c = \omega_{r\text{max}} + \omega_{\text{em}}^c$ ，約為原本空間頻率範圍的兩倍，也就是空間解析度可提高為原來的兩倍。而除了照明分布的兩次位移外，因上述內容中只針對一個維度作調變，亦即只增加一個維度的解析度，若要增加其他維度的解析度，則必須將照明的橫紋做不同角度的旋轉。在過去文獻中提出<sup>(6)</sup>，將橫紋旋轉三次，每次旋轉角度為  $60^\circ$ ，即

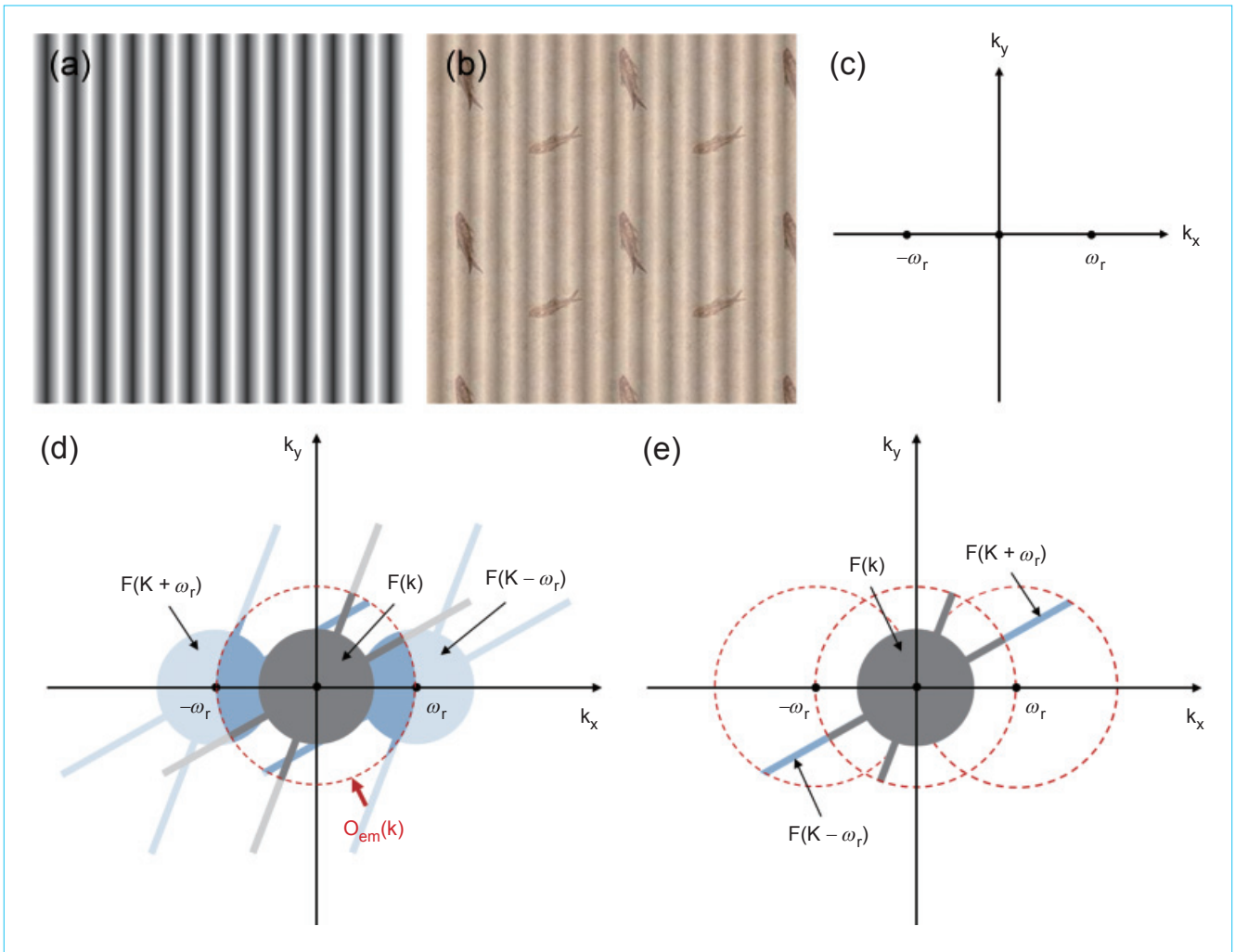


圖 3. (a) 一維結構照明之強度分布圖；(b) 於圖 (a) 之結構照明下取得之螢光影像；(c) 於圖 (a) 之結構照明於傅氏空間中的頻率分布；(d) 於圖 (a) 之結構照明下螢光影像於傅氏空間中的頻率分布，灰色圖形表示樣本之空間頻率分布，藍色圖形分別表示經結構照明後產生頻率位移之樣本空間頻率分布，包含正頻率及負頻率的位移項，紅色虛線所描述的為光學系統光傳遞函數的範圍，紅色虛線內是所取得之螢光影像的空間頻率資訊，而在虛線外的則無法被系統記錄。

可獲得足夠的改善 (如圖 4)。綜合上述，要運用結構照明重建出一張解析度為兩倍的影像至少需取得九張影像，包含三次角度的旋轉，及每個角度下三個不同的相位。

#### 四、非線性結構照明

廣域結構照明顯微術經影像重建後可獲得約 100 nm 的解析度<sup>(10)</sup>，因系統光路的架設上相對簡單，目前已在許多生醫的研究上被用來觀察細胞

內細微的結構，如細胞骨架<sup>(10)</sup> 及染色體結構<sup>(12)</sup> 等 (如圖 5)。而除了上述的基本做法外，近年來有許多的方法陸續被開發來進一步提升系統的性能。2005 年 M. G. L. Gustafsson 等人在文章中提出了非線性結構照明顯微術的概念與研究成果<sup>(9)</sup>，藉由使螢光分子的激發能階進入飽和狀態來產生非弦波的結構照明，亦稱為飽和結構照明顯微術 (saturated structured illumination microscopy, SSIM)。因所產生的照明結構接近方波，在傅氏空間中具有許多高頻項 (如圖 6(a) 和 (b))，能使樣本的空间頻率函數

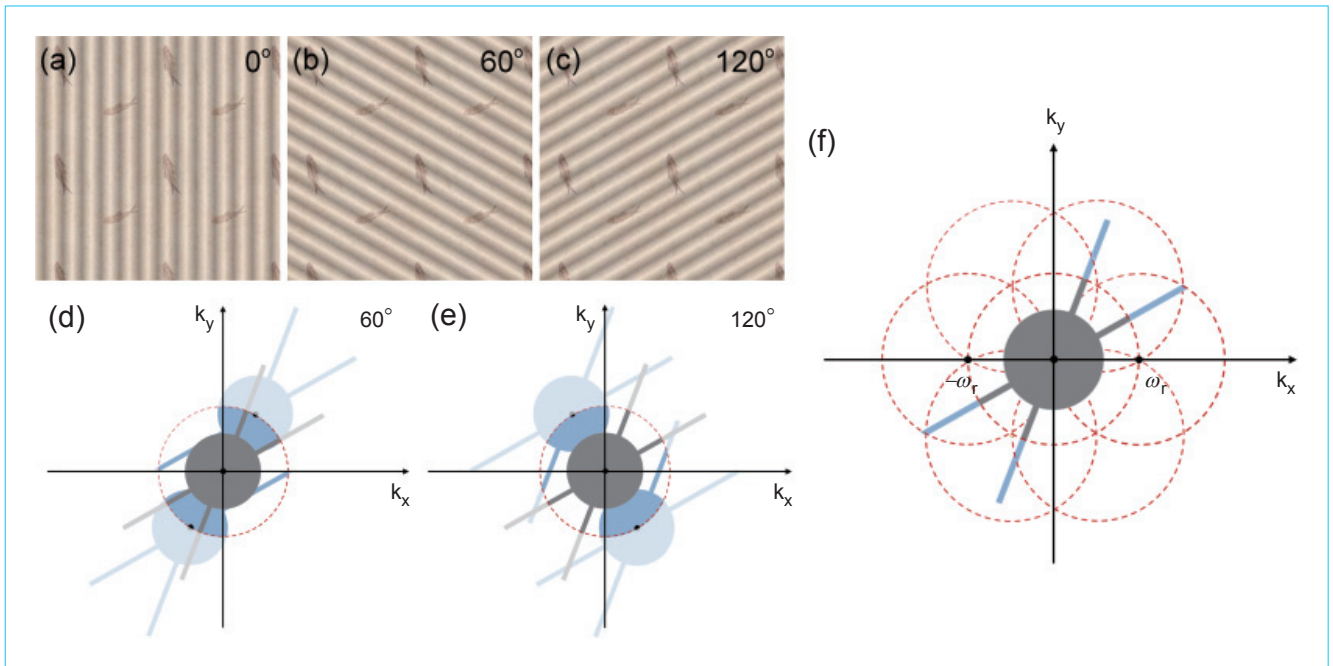


圖 4. (a)、(b) 和 (c) 分別表示將一維結構照明旋轉  $0^\circ$ 、 $60^\circ$  及  $120^\circ$  後所取得之螢光影像；(d) 和 (e) 分別表示圖 (b) 和 (c) 中螢光影像在傅氏空間中之空間頻率分布，灰色圖形表示樣本之空間頻率分布，藍色圖形分別表示經結構照明後產生頻率位移之樣本空間頻率分布，紅色虛線所描述的為光學系統光傳遞函數的範圍，紅色虛線內是所取得之螢光影像的空間頻率資訊，而在虛線外的則無法被系統記錄；(f) 經三次旋轉後所取得之等效光傳遞函數範圍 (紅色虛線內之範圍) 及可記錄之空間頻率資訊。

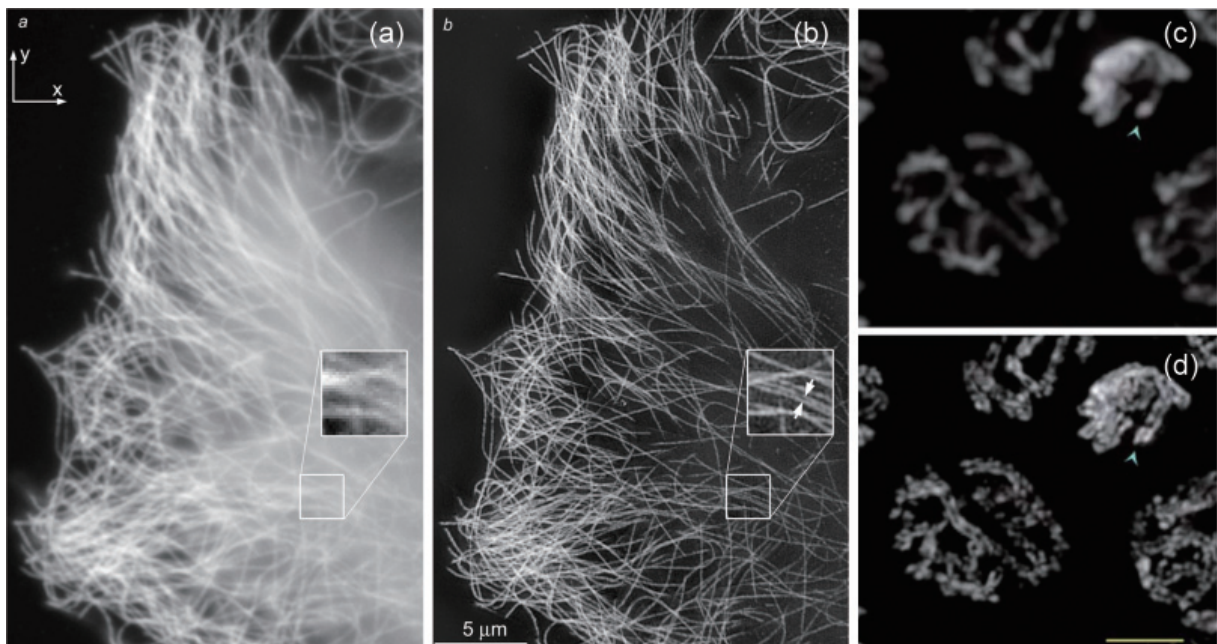


圖 5. (a) 和 (b) 分別為以傳統光學顯微術及 3D 結構照明顯微術取得之細胞骨架影像，由圖中放大的影像可見，傳統光學顯微術 (a) 無法解析的微小管在結構照明顯微術下可被清楚解析，解析度在  $125\text{ nm}$  以下<sup>(10)</sup>；(c) 和 (d) 分別為以傳統光學顯微術及 3D 結構照明顯微術取得之細胞核內染色體的影像，在結構照明顯微術下 (d) 可清楚看見成對的染色體結構<sup>(12)</sup>。

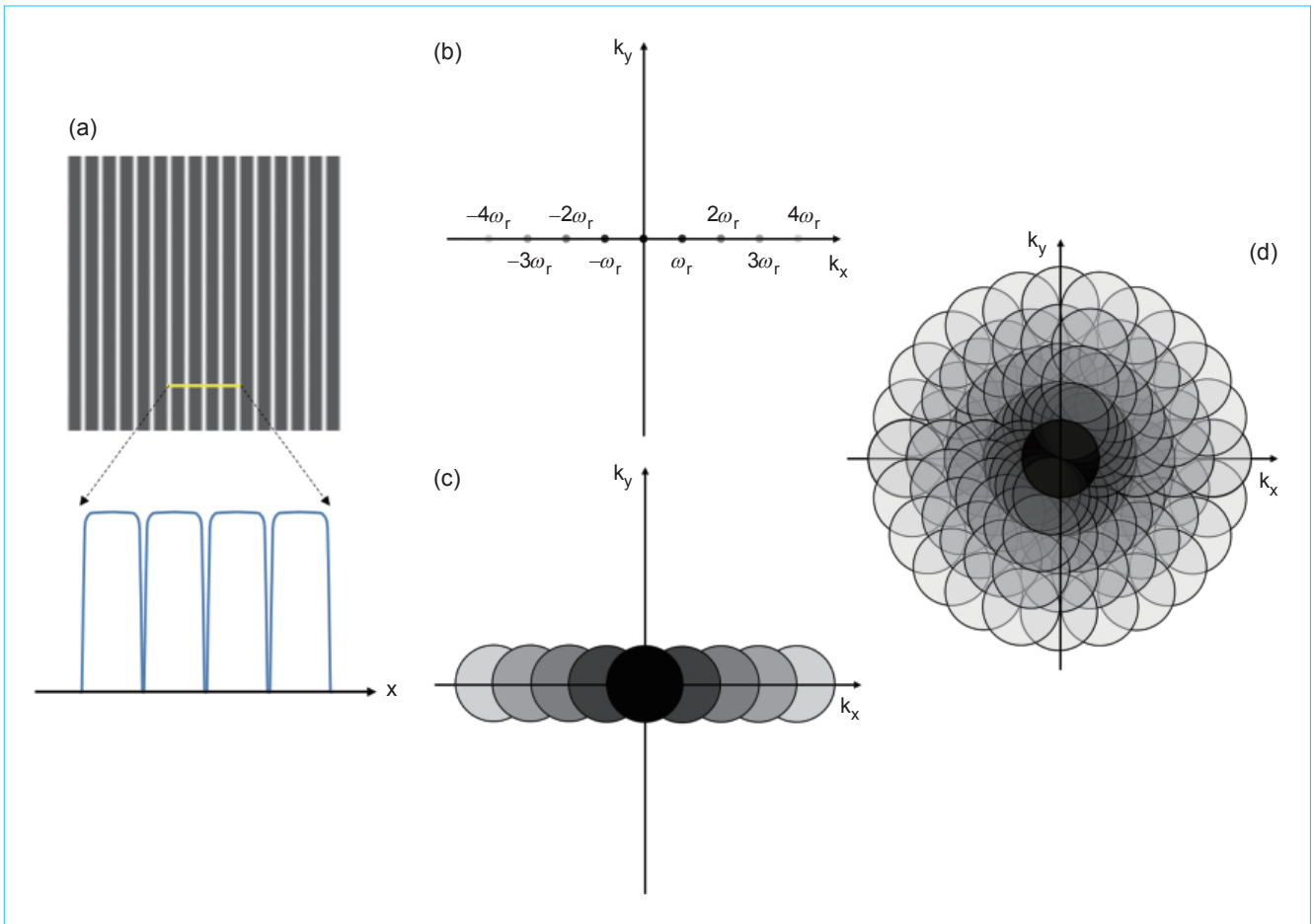


圖 6. (a) 以飽和結構照明方式在樣本上所產生的接近方波的照明強度分布圖；(b) 於圖 (a) 之結構照明在傅氏空間中的頻率分布，因照明強度分布接近方波，故具有較多之高頻項；(c) 於圖 (a) 之結構照明下得到的等效光傳遞函數；(d) 在圖 (a) 之結構照明下，需進行 12 次角度的旋轉方可取得完整之等效光傳遞函數。

產生至少兩階以上的位移，獲得更高的空間解析度。然而因有高階位移的產生，結構照明的相位位移次數必須增加，以進行影像的重建，而為了使整個擴大的 OTF 範圍能被填滿，結構照明的旋轉次數也必須增加。

以五個高階的位移為例<sup>(9)</sup>，影像解析度可大幅提升至約 50 nm，但欲完成一張重建影像，必須取得 60 張影像 (12 個角度，5 次相位位移) (如圖 6(c) 和 (d))，所使用的時間相對較多，對樣本的光破壞也會隨之增加，如何善用演算法來減少所需影像的張數，即成為相當重要的課題。而除了上述的 SSIM 外，在 D. Debarre 等人於 2008 年的文章中，亦探討了系統像差在結構照明顯微系統中所造成

的影響，並藉由適性光學 (adaptive optics) 來改善像差的問題，獲得與理論相符的理想解析度<sup>(13)</sup>。C. W. See 等人於 2010 年的文章，則利用各種紋路的光罩直接調變在樣本上的光強度分布<sup>(14)</sup>，此方法運用在廣域的照明調變上，可達成許多由干涉無法獲得的照明結構 (如方波)，同樣能達成非線性的結構照明，進而得到更高的頻率成分。

## 五、縱向解析度之提升

除了開發各種照明方式來增加高頻的成分外，另一個重要的研究課題即為縱向解析度的改善。因廣域照明縱向的 OTF 上存在 missing cone 的問題

<sup>(10)</sup> (如圖 7(a))，在縱向上的解析度相當低，早期多應用於薄切片或體外培養細胞的應用上。為了能提升縱向解析度，M. G. L. Gustafsson 等人在 2008 年的文章中，提出以三道同調光在樣本處交會，同時產生橫向及縱向的干涉圖形 (如圖 7(b))，除了能增加橫向的解析度外，亦可藉由在傅氏空間中縱向的頻率位移來解決 missing cone 的問題，將縱向的解析度提升至約 280 nm<sup>(10, 12)</sup>，有助於取得細胞內 3D 的結構資訊。然而，因為是廣域的照明，可應用於結構照明顯微術的樣本厚度仍然受到局限，若要將結構照明的技術運用於較厚的樣本或是活體的觀察，則必須試著與共軛焦顯微術或雙光子螢光顯微術等具有光學切片能力之影像技術進行結合。

相對於廣域的照明，共軛焦顯微術 (confocal microscopy) 採用了點對點的掃描。根據光學成像的原理，點光源透過光學系統後會成像在共軛焦平面，而遠離點光源的光將不會成像於該平面。利用這個原理，共軛焦顯微術將激發光聚焦於樣本的一

個點上，並在焦點的共軛焦平面上放置一個針孔 (pinhole)，如此可以將焦點以外的訊號加以過濾，保留焦平面的訊號，以獲得較好的縱向解析度，可用來在較厚的組織內取得光學的切片影像<sup>(15-16)</sup>。除此之外，非線性光學顯微術，如雙光子螢光顯微術 (two-photon fluorescence microscopy, TPF)，因訊號強度與激發光強度之間成非線性的正比關係 ( $I_{TP} \propto I_{ex}^2$ )，使得可被激發的區域將局限在焦點附近<sup>(17-19)</sup>，即使不放置針孔也可獲得極佳的縱向解析度，如此不但能增加訊號收集的效率，又因沒有焦點外的激發 (off-focus excitation)，可減少焦點外光破壞及光漂白的問題，降低對樣本的傷害<sup>(20-21)</sup>。為結合結構照明及共軛焦顯微術的概念，T. Kim 等人在 2009 年<sup>(22)</sup> 及 M. K. Ahn 在 2011 年<sup>(23)</sup> 發表的文章嘗試將結構照明應用到線掃描的共軛焦顯微術上，使該線型聚焦區域的強度分布為一弦波 (如圖 8)。根據模擬的結果，雖然在橫向上可獲得較傳統共軛焦顯微術約 1.43 倍的解析度改善，但受限於掃描

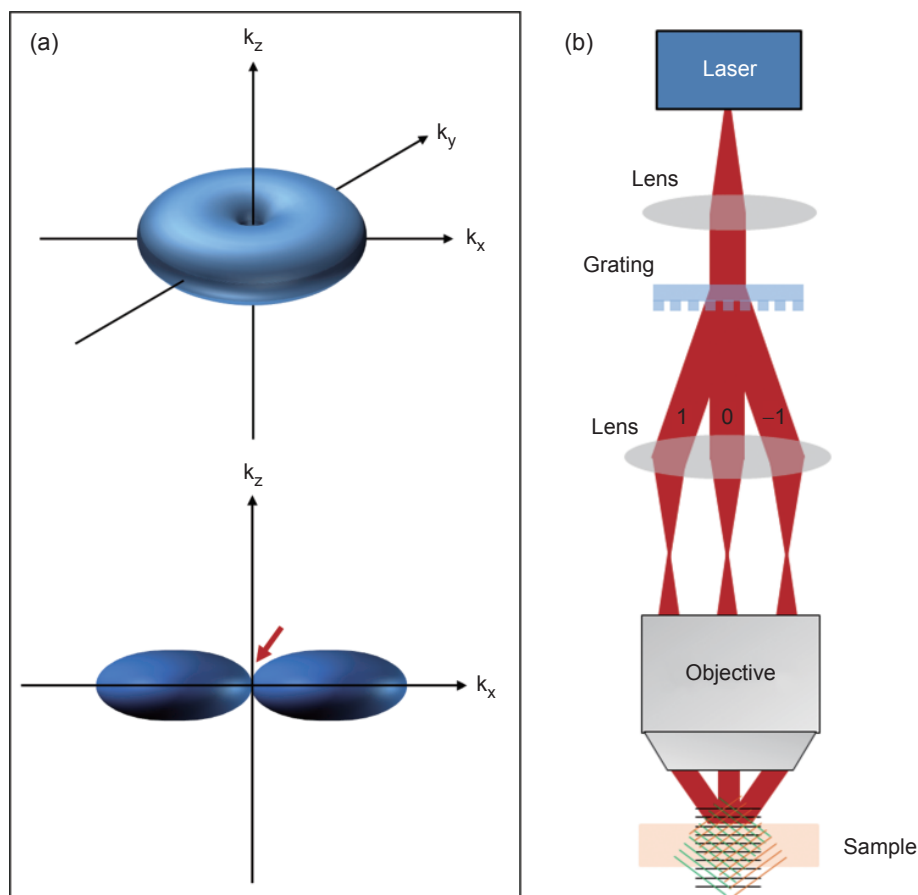


圖 7.  
(a) 廣域照明之光傳遞函數，上圖為 3D 示意圖，下圖則為  $k_x - k_z$  平面之示意圖，由下圖可見廣域照明具有 missing cone 的問題 (紅色箭號)，因此缺乏縱向解析力；(b) 以三道同調光同時產生橫向及縱向結構照明來提升縱向解析度之系統架構圖。

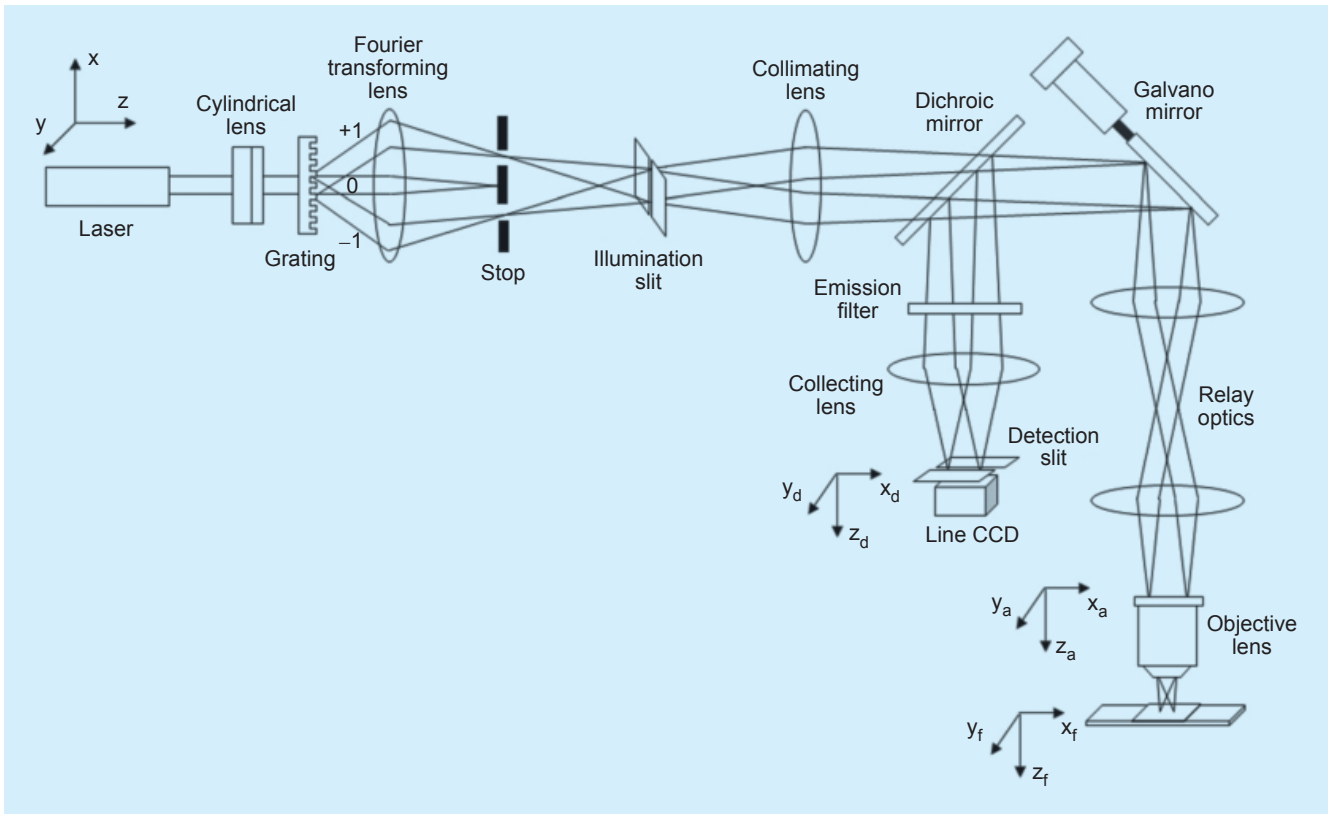


圖 8. 將結構照明應用於線掃描共軛焦顯微術之系統架構圖<sup>(22)</sup>。

的方式，縱向上的解析度較傳統的共軛焦顯微術差了 15%，然而即便如此，此系統仍然成功地改善了結構照明顯微術缺乏縱向解析度的問題。

相較於結合共軛焦顯微術的概念，本研究團隊在國科會計畫的支持下，首度嘗試建立一雙光子螢光結構照明顯微術，參考 X. S. Xie 和 J. W. Lichtman 團隊在 2009 年提出的 scanning patterned illumination (SPIN) microscopy 和 scanning patterned detection (SPADE) microscopy 兩種系統架構<sup>(11)</sup>，在點掃描的架構下，將結構照明的概念與雙光子螢光顯微術進行結合。為了在生物組織上進行雙光子螢光的激發，我們使用一近紅外光 (800–1300 nm) 超快雷射作為激發光源。與廣域結構照明顯微術不同的是，本系統的結構照明將藉由一對電流計掃描鏡 (galvanometer mirror) 及一聲光调制器 (acoustic-optical modulator, AOM) 來達成 (如圖 9)，電流計掃描鏡負責進行空間的二維掃描，而聲光调制器則

負責調變激發光的強度，通過電控系統精準的同步控制，激發光將在樣本上掃描出一有光強度調變的方形區域來完成結構照明。而在訊號偵測方面，本系統採用背向收集的架構，激發出來的雙光子螢光訊號經由同一個物鏡收集後，以二維的 CMOS 偵測器記錄雙光子的螢光影像。不同於廣域照明的成像原理，以點掃描的方式來等效呈現結構照明時，在樣本上所形成的激發光強度分布及其在傅氏空間中的分布將改寫為

$$I_{\text{ex}}(r) = \int I_{\text{ex}}^{\text{max}}(t) P_{\text{ex}}(r-t) dt = I_{\text{ex}}^{\text{max}}(r) \otimes P_{\text{ex}}(r) \quad (10)$$

$$I_{\text{ex}}^{\text{max}}(t) = 1 + \cos(\omega_t \cdot t) \quad (11)$$

$$I_{\text{im}}(k) = O_{\text{ex}}(0)F(k) + \frac{1}{2}O_{\text{ex}}(\omega_t)F(k + \omega_t) + \frac{1}{2}O_{\text{ex}}(-\omega_t)F(k - \omega_t) \quad (12)$$

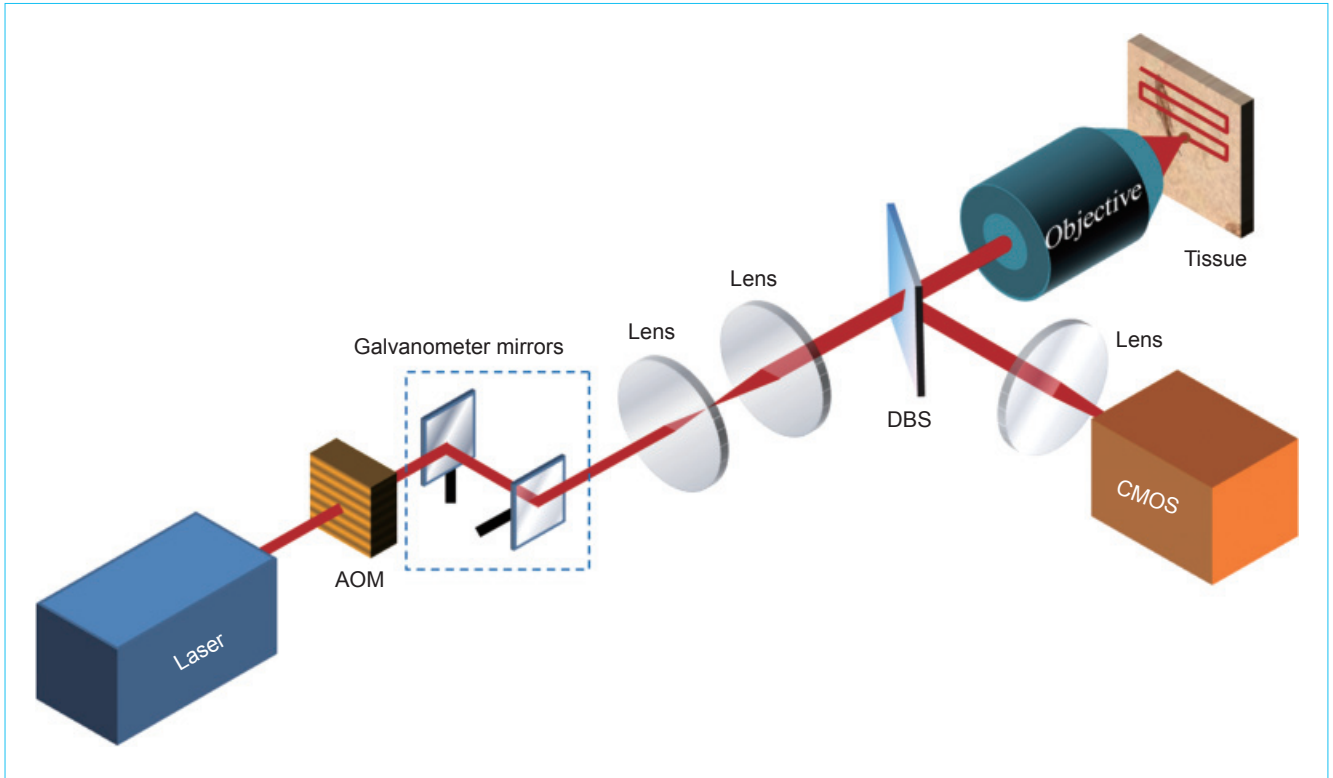


圖 9. 雙光子螢光結構照明顯微術之系統架構圖。

其中  $P_{\text{ex}}(r)$  為每個掃描點的 PSF， $\omega_l$  為光強度的調變頻率， $I_{\text{ex}}^{\text{max}}(t)$  則為掃描點光強度的最大值。在此結構的激發下，經 CMOS 記錄所取得的影像及其在傅氏空間中的分布可描述為

$$\begin{aligned}
 I_{\text{im}}(x) &= \int I_{\text{ex}}(r)F(r)P_{\text{em}}(x-r)dr \\
 &= \int \left[ \int I_{\text{ex}}^{\text{max}}(t)P_{\text{ex}}(r-t)dt \right] F(r)P_{\text{em}}(x-r)dr \quad (13) \\
 &= \left\{ \left[ I_{\text{ex}}^{\text{max}}(x) \otimes P_{\text{ex}}(x) \right] F(x) \right\} \otimes P_{\text{em}}(x)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 I_{\text{im}}(k) &= \left\{ \left[ I_{\text{ex}}^{\text{max}}(k)O_{\text{ex}}(k) \right] \otimes F(k) \right\} O_{\text{em}}(k) \\
 &= \left[ O_{\text{ex}}(0)F(k) + \frac{1}{2}O_{\text{ex}}(\omega_l)F(k-\omega_l) + \right. \\
 &\quad \left. \frac{1}{2}O_{\text{ex}}(-\omega_l)F(k+\omega_l) \right] O_{\text{em}}(k) \quad (14)
 \end{aligned}$$

其中  $P_{\text{em}}(x)$  為成像系統的 PSF， $O_{\text{ex}}(k)$  及  $O_{\text{em}}(k)$  分別為激發光點及成像系統的 OTF。由式子 (14) 可見，光強度的調變頻率  $\omega_l$  受限於  $O_{\text{ex}}(k)$  的截止頻率，且影像所記錄的空間頻率的範圍亦受限於

$O_{\text{em}}(k)$  的截止頻率，在此架構下可獲得最大的頻率範圍為  $\omega_{\text{eff}}^c = \omega_{\text{ex}}^c + \omega_{\text{em}}^c$ ，而因為在雙光子激發下， $O_{\text{ex}}(k)$  的截止頻率將較廣域照明時為大，解析度的改善程度將較廣域結構照明顯微術為高，且因雙光子螢光顯微術本身具有光學切片的能力，此系統將可以被運用在厚組織甚至是活體內來取得超解析度的光學切片影像。本系統除了能藉由雙光子激發來獲得良好的縱向解析度外，點掃描架構亦提供了一個極高的自由度，不受限於干涉所能產生的結構，只要電控系統的同步能精準，且 AOM 的調變速度夠快，此系統將能產生任何我們所想要的照明結構，給予更多的發展空間。

## 六、未來展望

挑戰極限一直是驅動人類進步的原始動力，每一次的突破都意味著下一次挑戰的開始。光學顯微術在近二十年的努力後戰勝了繞射極限，但等在前方的的是更艱難的課題，目前所有的超解析度顯微技

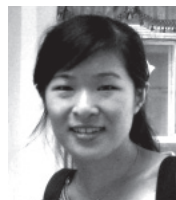
術都陷入在取像時間、光破壞性及解析度的拉鋸戰中，似乎要獲得高解析度就勢必要犧牲取像時間或是無法避免產生樣本的光破壞，而此問題在結構照明顯微術中又更為明顯，要獲得更高的頻率成分，就必須取得更多的影像來解開未知的函數及填滿更大的 OTF 區域。要解決這個問題，除了改善硬體的速度及靈敏度之外，有些研究團隊已開始著力於演算法的改善，期能藉由演算法的進步來降低所需的影像個數，若能成功地將取像時間大幅縮短，則活體內或臨床上的應用將指日可待。

## 誌謝

本文中雙光子結構照明顯微系統的研究及開發由國科會研究計畫 (NSC 100-2218-E-008-017) 及邁向頂尖大學計畫全力支持，特此感謝。

## 參考文獻

1. E. Abbe, *Archiv. Fur. Mikroskopische Anatomie*, **9**, 413 (1873).
2. B. Hecht, B. Sick, U. P. Wild, V. Deckert, R. Zenobi, O. J. F. Martin, and D. W. Dieter, *J. Chem. Phys.*, **112**, 7761 (2000).
3. S. Hell and E. H. K. Stelzer, *J. Opt. Soc. Am. A*, **9**, 2159 (1992).
4. M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, and J. W. Sedat, *J. Microsc.*, **195**, 10 (1999).
5. S.W. Hell and J. Wichmann, *Opt. Lett.*, **19**, 780 (1994).
6. M. G. L. Gustafsson, *J. Microsc.*, **198**, 82 (2003).
7. M. J. Rust, M. Bates, and X. W. Zhuang, *Nat. Methods*, **3**, 793 (2006).
8. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, 3rd ed. Englewood, Colorado, USA: Roberts & Company (2005).
9. M. G. L. Gustafsson, *PNAS*, **102**, 13081 (2005).
10. M. G. L. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. R. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard, and J. W. Sedat, *Biophys. J.*, **94**, 4957 (2008).
11. J. Lu, W. Min, J. A. Conchello, X. S. Xie, and J. W. Lichtman, *Nano Lett.*, **9**, 3883 (2009).
12. P. M. Carlton, *Chrom. Res.*, **16**, 351 (2008).
13. D. Debarre, E. J. Botcherby, M. J. Booth, and T. Wilson, *Opt. Express*, **16**, 9290 (2008).
14. C. W. See, C. J. Chuang, S. Liu, and M. G. Somekh, *Appl. Opt.*, **49**, 6570 (2010).
15. C. J. R. Sheppard and D. M. Shotton, *Confocal Laser Scanning Microscopy*, Oxford, UK: BIOS Scientific Publisher (1997).
16. B. Selkin, M. Rajadhyaksha, S. Gonzalez, and R. G. Langley, *Dermatol. Clin.*, **19**, 369 (2001).
17. J. Squier and M. Muller, *Rev. Sci. Instrum.*, **72**, 2855 (2001).
18. Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg, *Appl. Phys. Lett.*, **70**, 922 (1997).
19. T. M. Ragan, H. Huang, and P. T. C. So, *Methods Enzymol.*, **361**, 481 (2003).
20. J. M. Squirrell, D. L. Wokosin, J. G. White, and B. D. Bavister, *Nature*, **17**, 763 (1999).
21. C. K. Sun, S. W. Chu, S. Y. Chen, T. H. Tsai, T. M. Liu, C. Y. Lin, and H. J. Tsai, *J. Struct. Bio.*, **147**, 19 (2004).
22. T. Kim, D. Gweon, and J. H. Lee, *Meas. Sci. Technol.*, **20**, 055501-1 (2009).
23. M. Ahn, T. Kim, Y. Kim, D. Gweon, and J. H. Lee, *Meas. Sci. Technol.*, **22**, 015503-1 (2011).



陳思妤小姐為國立台灣大學光電博士，現任國立中央大學光電系助理教授。

Szu-Yu Chen received her Ph.D. in photonics and optoelectronics from National Taiwan University. She is currently an assistant professor in the Department of Optics and Photonics at National Central University.