

層光螢光顯微鏡近期發展及其在生物上的應用

Recent Developments in Light Sheet Fluorescence Microscopy and Its Biological Applications

曹杰、陳壁彰

Chieh Tsao, Bi-Chang Chen

層光螢光顯微鏡可提供高三維空間分辨率、高訊噪比、快速成像採集速率以及較低的光毒性和光損傷效應，這些特性使其在生物醫學領域中至關重要，並涵蓋了廣泛的應用範圍，從單個細胞的動態學到大型生物體內發育動態的高解析度成像。在這篇簡述中，我們提供了層光螢光顯微鏡的歷史發展及其變體和改進的討論，以及層光螢光顯微鏡的最新技術進展及其在細胞、單分子偵測和大型組織的應用。

Light sheet fluorescence microscopy provides high three-dimensional spatial resolution, high signal-to-noise ratio, fast imaging acquisition rate, and low phototoxicity and photodamage effects. The characteristics are important in the biomedical field from the dynamics of single cells to developmental dynamics in large organisms. In this article, we provide a discussion on the historical development of light sheet fluorescence microscopy, the latest technological advances, and its applications in cells, single molecule detection and large tissues.

一、前言

1. 顯微鏡發展歷史

光學顯微鏡是重要的可視化工具，從 17 世紀最早的顯微技術的研究到現今，顯微鏡發展快速，科學家利用這些技術發現和解決眾多生物的難題⁽¹⁾。然而隨著時間的推演，生物的謎題越來越多，所以對於複雜和動態活體系統量化分析的需求日趨漸多，而且也希望在觀測樣品時樣品不要受到損傷，使實驗更加可信。1873 年，Abbe 和 Helmholtz 發現了繞射極限 (diffraction limit) 的現象，並對解析度極限做公式化的描述，如式 (1)，其中 d 為解析度極限， λ 為光波波長，NA 為數值孔徑 (numerical aperture)。

$$d = \frac{\lambda}{NA} = \frac{\lambda}{n \sin \theta} \quad (1)$$

由於繞射極限，使得光學顯微鏡在解析度有所侷限，為了使得光學顯微技術可以更加突破達到更高解析度，科學家開始利用不同方式及光學設計，像是激發發射耗盡顯微技術 (stimulated emission depletion microscopy, STED)、三維結構照明顯微技術 (3D structured illumination microscopy, 3D SIM)、光激活定位顯微技術 (photoactivated localization microscopy, PALM)、隨機光學重建顯微術 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM) 和晶格層光顯微技術 (lattice light-sheet microscopy, LLSM) 來達到超高解析度 (super resolution)。

2. 層光顯微鏡的演進

早在 1903 年，層光 (light sheet) 的概念就有被提及，顧名思義層光就是很薄的平面，但真正的應用在顯微技術上是在 1993 年由 Voie 實驗室所提出的正交平面螢光光學切面 (orthogonal plane fluorescence optical sectioning, OPFOS)，其是用層光去做掃描，以取得三維影像，如圖 1 所示²。圖 1 為基本 OPFOS 的架構，也就是現今常稱的層光螢光顯微技術 (light sheet fluorescence microscopy, LSFM)，而在這個系統中層光是利用圓柱透鏡所產生。架設方面有兩個正交物鏡，一個為激發物鏡，用來產生層光；一個為偵測物鏡，用來偵測螢光訊號。

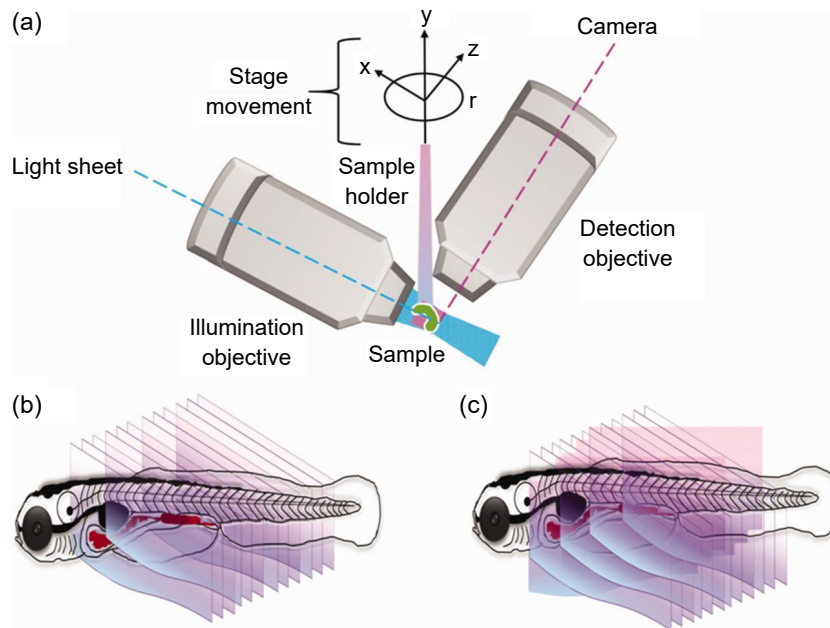


圖 1. 層光顯微技術示意圖⁽²⁾。(a) 層光顯微鏡架設概念圖 (b) 三維影像的擷取方式 (c) 多視角圖像。

雖然層光用在生物樣品的概念一直被 Voie 所推廣，但是直到 2004 年此種技術才開始蓬勃發展。2004 年，Huisken 等人應用層光技術在螢光顯微鏡內，也就是所謂的擇面照明螢光顯微術 (selective plane illumination microscopy, SPIM) 來觀察青鱗 (Medaka fish; *Oryzias latipes*) 和黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 的胚胎⁽³⁾。2008 年，為了達到更快拍照速度和提高成像品質，Keller 等人發展出數位掃描雷射層光螢光顯微技術 (digital scanned laser light

sheet fluorescence microscopy, DLSM)⁽⁴⁾，如圖 2。其基本概念為使用掃描透鏡 (f -theta lens) 和雷射掃描器 (laser scanner) 經由快速掃描光束 (light beam) 的方式來產生虛擬層光 (virtual light sheet)，並照射樣品。

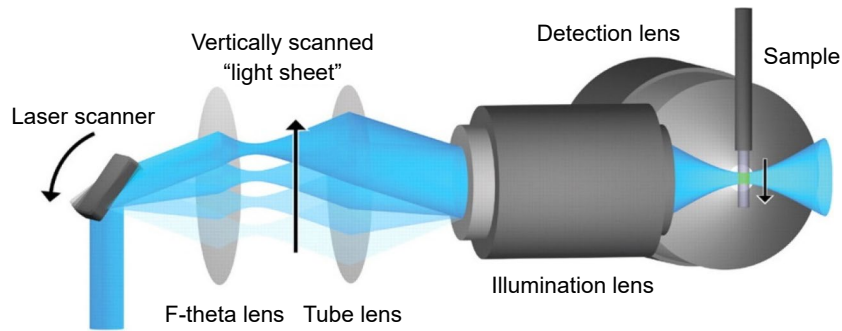


圖 2. 數位掃描雷射層光螢光顯微鏡示意圖⁽⁴⁾。

很多光學設計都是基於 SPIM 和 DLSM 這兩套系統去做變化和改良 LSFM。有科學家為了降低拍攝大樣品時因為散射和吸收所造成的影像扭曲而結合了 SPIM 和多視角顯微技術 (multiview microscopy, MuVi) 發展了 MuVi-SPIM 5，如圖 3。此系統主要是利用四個物鏡來記錄四個三維影像 (二個用來產生虛擬層光，兩個用來收集訊號)，此外結合 sCMOS 相機高速採集每個方向的影像，簡單來說，它允許從四個方向對大樣本進行高速取樣，並利用重建技術來還原真正高解析度的影像。

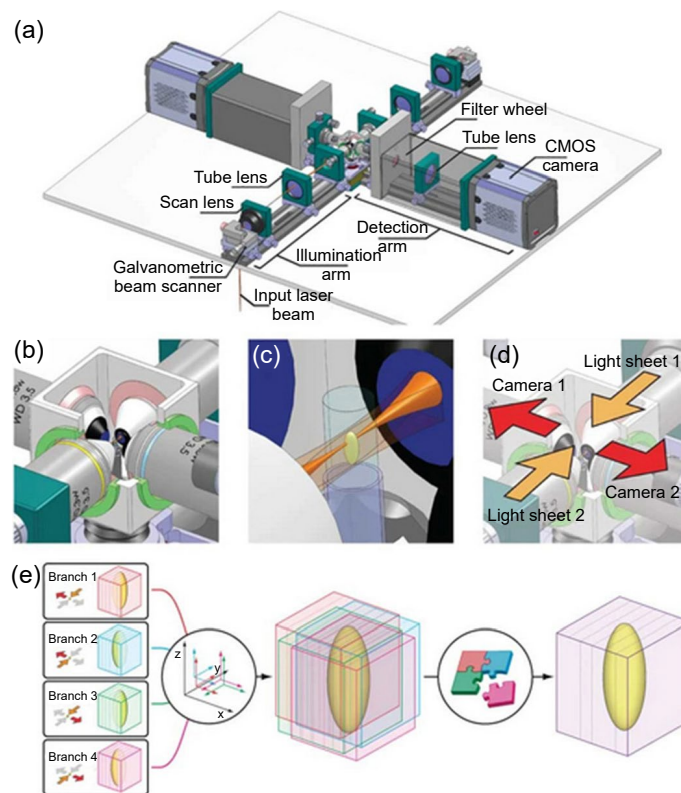


圖 3. 多視角擇面照明螢光顯微術示意圖⁽⁵⁾。(a) 裝置架設圖 (b) 腔體內部圖 (c) 虛擬層光與樣品圖，深橘色為光束，淺橘色為虛擬層光 (d) 鏡頭功用圖 (e) 影像重建示意圖。

除了做裝置上的改進，科學家還有對形成虛擬層光的光束做研究，目前常用的光束為高斯光束 (Gaussian beam)，雖然其產生的層光可以成功的觀測到活體動態變化，但是因為高斯光束太厚，所以影像解析度不夠應用於更微小的結構觀察，為了解決此現象，貝索光束 (Bessel beam)⁽⁶⁾ 和晶格光束 (lattice beam)⁽⁷⁾ 相繼出現。圖 4 展現出不同光束產生的層光模擬圖、光束在照明物鏡的入瞳面 (pupil plane) 圖以及不同光束拍攝的點擴散函數 (point spread function, PSF)，其中 PSF 與解析度有關。下面將簡單講述三種光束的差別。

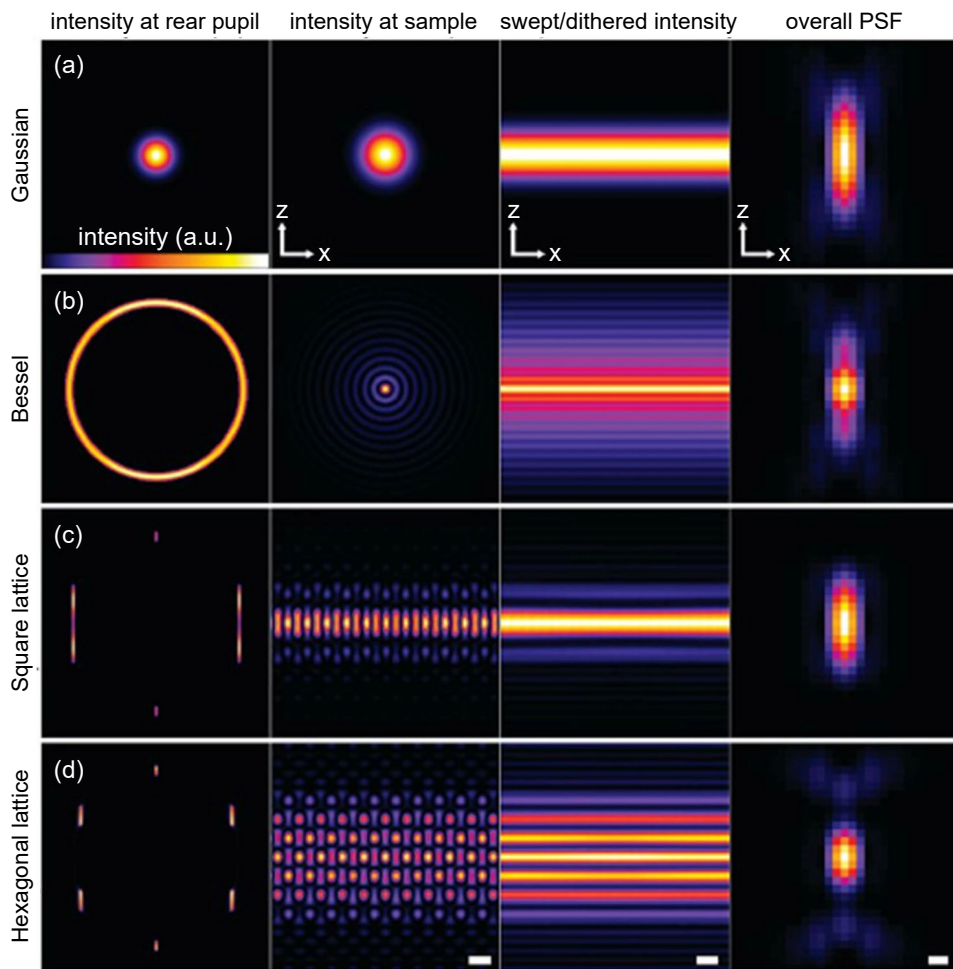


圖 4. 各種光束產生層光以及點擴散函數的模擬圖⁽⁸⁾。(a) 高斯光束 (b) 貝索光束 (c) 平方晶格 (d) 六方晶格，比例尺都為 1 mm。

高斯光束為最基本的光束，只要平行雷射光經過物鏡，基本上產生的即為高斯光束，接著經由掃描器 (scanner) 就可以得到所謂的虛擬層光。平行光光斑大小和鏡頭的選擇會改變光束的長短，影響所謂的視野大小 (field of view, FOV)；光斑大小還會影響層光的厚度。高斯光束的缺點除了光束通常太過短小，最大缺點為其層光厚度相較於其他光束的層光還要厚，進而降低光學切面的效果，使解析度無法與其他光束產生的層光相比。光束的解析度可以分成側向 (lateral) 和軸向 (axial)，如圖 5。式 (2) 和式 (3) 為高斯光束層光側向和軸向解析度和系統設計的關係式，其中 NA_{det} 為接受螢光訊號物鏡的 NA， λ_{em} 為發射的螢光波長，

NA_{exc} 為產生激發光鏡頭的 NA， λ_{exc} 為激發光的波長， n 為樣品所在介質的折射率， θ_{det} 為收光的半角度。

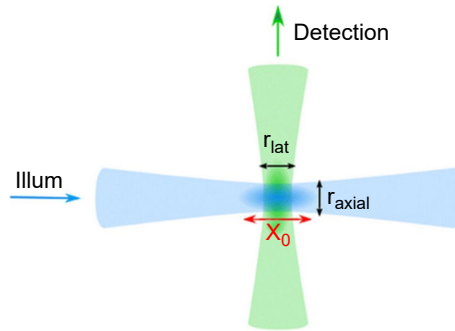


圖 5. 側向及軸向示意圖⁽⁹⁾。

$$n_{lateral} = \frac{\lambda_{em}}{2NA_{det}} \quad (2)$$

$$r_{axial} = \left[\frac{2NA_{exc}}{\lambda_{exc}} + \frac{n(1 - \cos \theta_{det})}{\lambda_{em}} \right]^{-1} = \left[\frac{2NA_{exc}}{\lambda_{exc}} + \frac{n \left(1 - \sin^{-1} \frac{NA_{det}}{n} \right)}{\lambda_{em}} \right]^{-1} \quad (3)$$

如上述所提，高斯光束具有層光太厚和光束太短的缺點，而貝索光束改善了這方面的缺點，貝索光束不同於高斯光束在照明物鏡的入射面上的光斑，其為貝索環，如圖 4(b)，由圖可以發現，貝索光束比起高斯光束更薄，使得產生的層光也可以更薄。除了更薄外，其產生的層光通常又更長，如圖 6 所示。但是貝索光束還是有其缺點，主要的缺點為其有一堆同心圓的背景值，可由圖 4 (b) 看出。

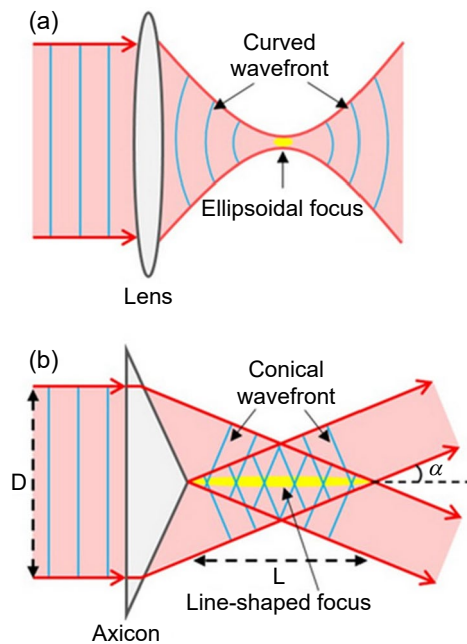


圖 6. 高斯光束與貝索光束的示意圖⁽¹⁰⁾。(a) 高斯光束 (b) 貝索光束。

為了解決貝索光束背景值較高的問題和降低光束掃描時間，晶格光束所產生的晶格層光就出現了⁽⁸⁾。此技術同時產生大約 100 多束的貝索光束，經由彼此間的光學干涉，而形成背景值較低的多光束，由於一次產生多光束，使得掃描器只要稍微抖動 (dithering) 一下即可完成掃描，大幅降低掃描時間，更使得科學家可以觀察到時間間隔更小的樣品動態學，而掃描時間的降低使得光損害的影響也降低了，可見圖 7。由於此項技術剛問世，在生物研究上的應用，還是處於啟蒙的階段，而且在低光損害、空間及時間上的高分辨率情況下，或許可以看到以前所沒有辦法觀察到的生物動態研究。

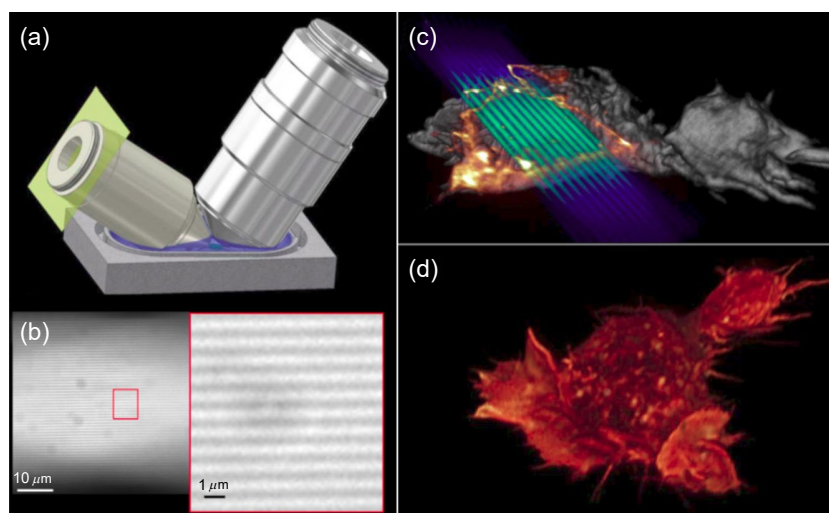


圖 7. 晶格層光顯微鏡 (LLSM) 架設及掃描樣品示意圖⁽⁸⁾。(a) 晶格層光顯微鏡的示意圖，照明物鏡和偵測物鏡正交放置並浸在細胞培養液中 (b) 實驗中所看到多束干涉後的貝索光束，可以看見彼此間的距離約 $1 \mu\text{m}$ ，經過振鏡的局部掃描，就可形成均勻的層光照明 (c) 一個細胞的三維影像是如何形成的，由多束的貝索光束形成的薄層光大約 $0.5 \mu\text{m}$ 厚，有高的光學切面效果，螢光訊號只產生在當此薄層光存在的照明面，而此螢光訊號會被高速照相機以寬場的方式錄下，再移動樣品或照明面，如此的面掃描，可以快速取得三維影像 (d) 是由 150 個面切片，每一切面是用 5 ms 曝光時間，也就是說不到一秒的時間，就可組成的一個三維血癌細胞 (HL-60) 影像。

二、細胞的觀測

1. 細胞的動態觀測

非破壞性的動態觀測細胞，一直以來都是科學家所追求的，期望可以利用藉由觀測細胞隨時間的變動來看細微的變化。上述所提到晶格層光顯微鏡 (LLSM) 在這領域是佼佼者，目前它是有能力觀測到細胞在進行有絲分裂的每個階段時微管 (microtubule) 的三維動態⁽⁸⁾，如圖 8 所示。這個研究分別用 EBI-GFP和Tag-RFP-H2B 兩種螢光蛋白來標定海拉細胞 (HeLa cells) 的微管末端和染色體 (chromosomes)，藉由分析其三維的影像，研究人員確認了整個細胞的生長期、尖端位置和整個細胞的成長。經由研究 12 個細胞，可以發現微管從一開始的速度到前中期速度的增長，到最後速度又降低了，此外，此項技術還可以了解有絲分裂時期內質網 (endoplasmic reticulum, ER)、粒線體 (mitochondria) 和染色體的空間關係^(11, 12)。

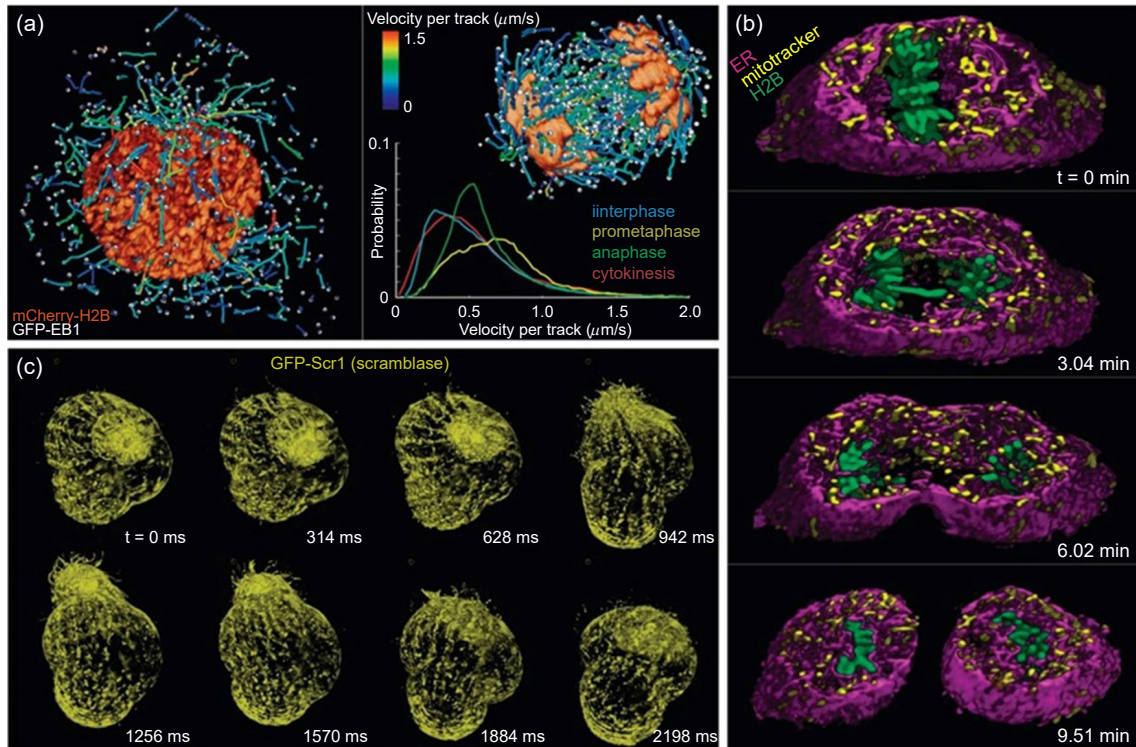


圖 8. 細胞內的三維動態學圖⁽⁸⁾。(a) 細胞在前期(左)和後期(右)組織蛋白(Histones)及經由三維線追蹤的微管末端圖 (b) 組織蛋白(綠色)、粒線體(黃色)和內質網(洋紅色)在細胞內的三維空間關係圖 (c) 經由立體渲染(Volume rendering)處理的原生嗜熱棲熱菌(*T. thermophila*)在 8 個時間節點圖。

除了單純的層光顯微鏡外，科學家也會結合其他技術來增加解析度，像是有科學家結合貝索層光顯微鏡和結構照明顯微技術或是非線性光學的技術，使得層光更薄，並達到解析度接近 300 nm 的效果。這套系統除了可以觀測粒線體、絲狀偽足(filopodia)、膜褶皺(membrane ruffles)、細胞內囊泡(intracellular vesicles)和有絲分裂染色體(mitotic chromosomes)。也有其他科學家用此套系統對骨肉瘤細胞(U2OS cells)有絲分裂過程的染色體進行核型分析(karyotyping)⁽¹³⁾。

2. 細胞間和細胞與基質的作用力

細胞間和細胞與基質間的化學作用常常扮演重要的腳色，所以這種互動關係的觀察就非常重要，而層光顯微鏡的優點，非常適合拍攝此類型樣品。Ritter 等人就經由 LLSM 觀察細胞毒性 T 細胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)的免疫突觸(immunological synapse)破壞標靶細胞過程隨時間序列的變化⁽¹⁴⁾。這項研究專門披露了肌動蛋白(actin)重組對觸發中心體極化(centrosome polarization)和分泌顆粒(granule secretion)的關鍵作用。當 CTLs 最初辨識到目標時，肌動蛋白開始於投影的前沿積累，從而開始了肌動蛋白富集的接觸和向後流動的肌動蛋白。在接近標靶細胞後的很短時間內(約 1 分鐘)，肌動蛋白耗竭開始發生，導致中心體極化和分泌啟動。作者主要是利用 LFSM 中的 LLSM 觀察其機制，並提供了高時空分辨率的成像來敘述這個現象，如圖 10。

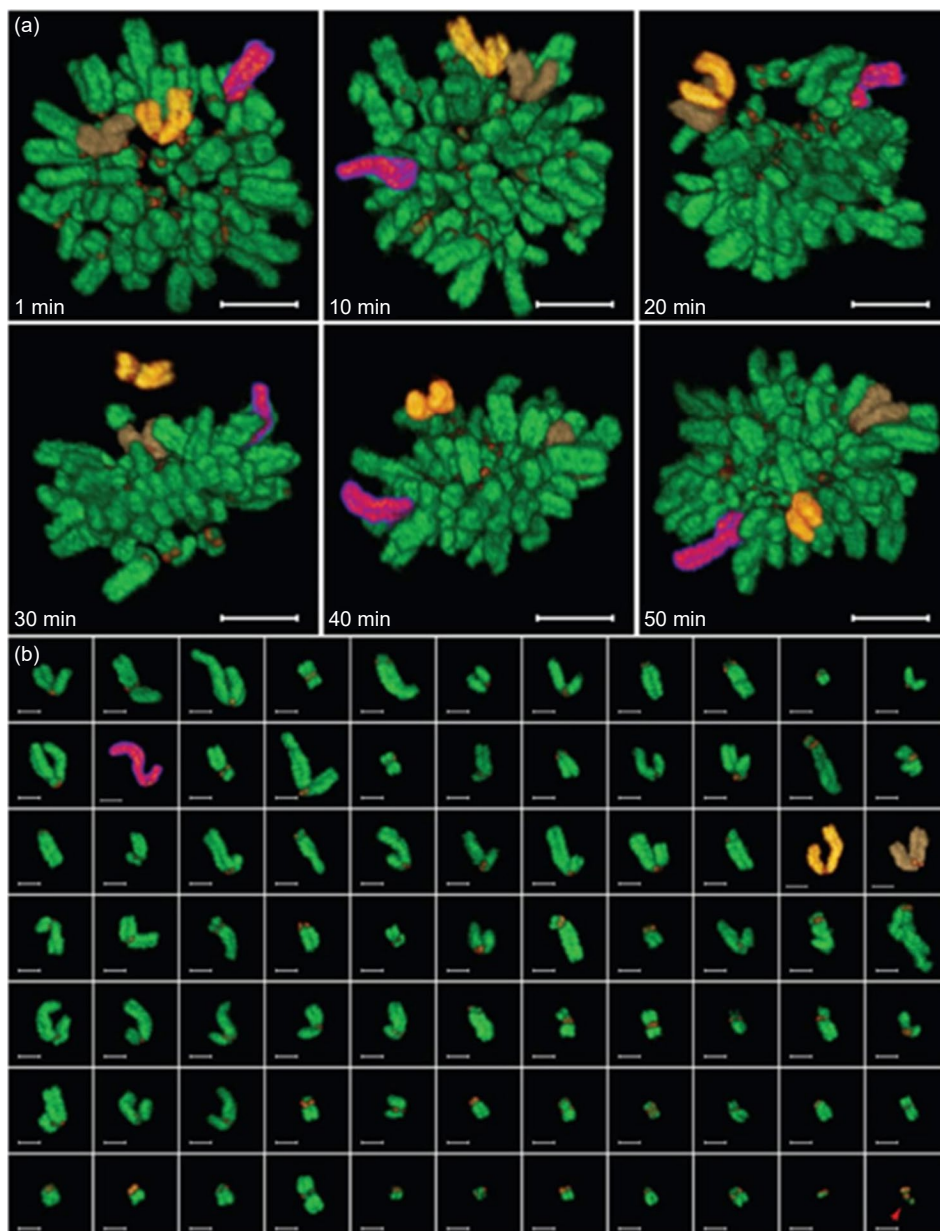


圖 9. 雙色骨肉瘤細胞成像的核型分析⁽¹³⁾。(a) 有絲分裂的前中期和中期階段的染色體 (綠色) 和動植物 (紅色) 的時序成像，比例尺 $5\mu\text{m}$ (b) 透過手動分割記錄染色體隨時間的核型，比例尺 $2\mu\text{m}$ 。

在此項研究還有一個重點是，在遇到靶標後，肌動蛋白的重組發生得非常快 (突觸形成後 2 分鐘內)，因此需要高速成像技術，與目前常見的轉盤式共聚焦顯微鏡 (spinning disc confocal microscope, SDCM) 相比，LLSM 技術可提供更好約為 3 倍的光學切片效果，並且在時間分辨率上提高超過 15 倍。即使 LLSM 和 SDCM 能夠對相似的肌動蛋白動態過程進行成像，例如在前移邊緣形成的突起和在遷移性 CTL 中向著腳足的肌動蛋白向後流動，LLSM 顯著記錄了皮質肌動蛋白從突觸中心的初始消耗並重新定位在最初的突觸形成過程中，片狀脂質體肌動蛋白聚合到突觸周圍富含肌動蛋白 (dSMAC) 的遠端環，而 SDCM 無法揭示這一點。

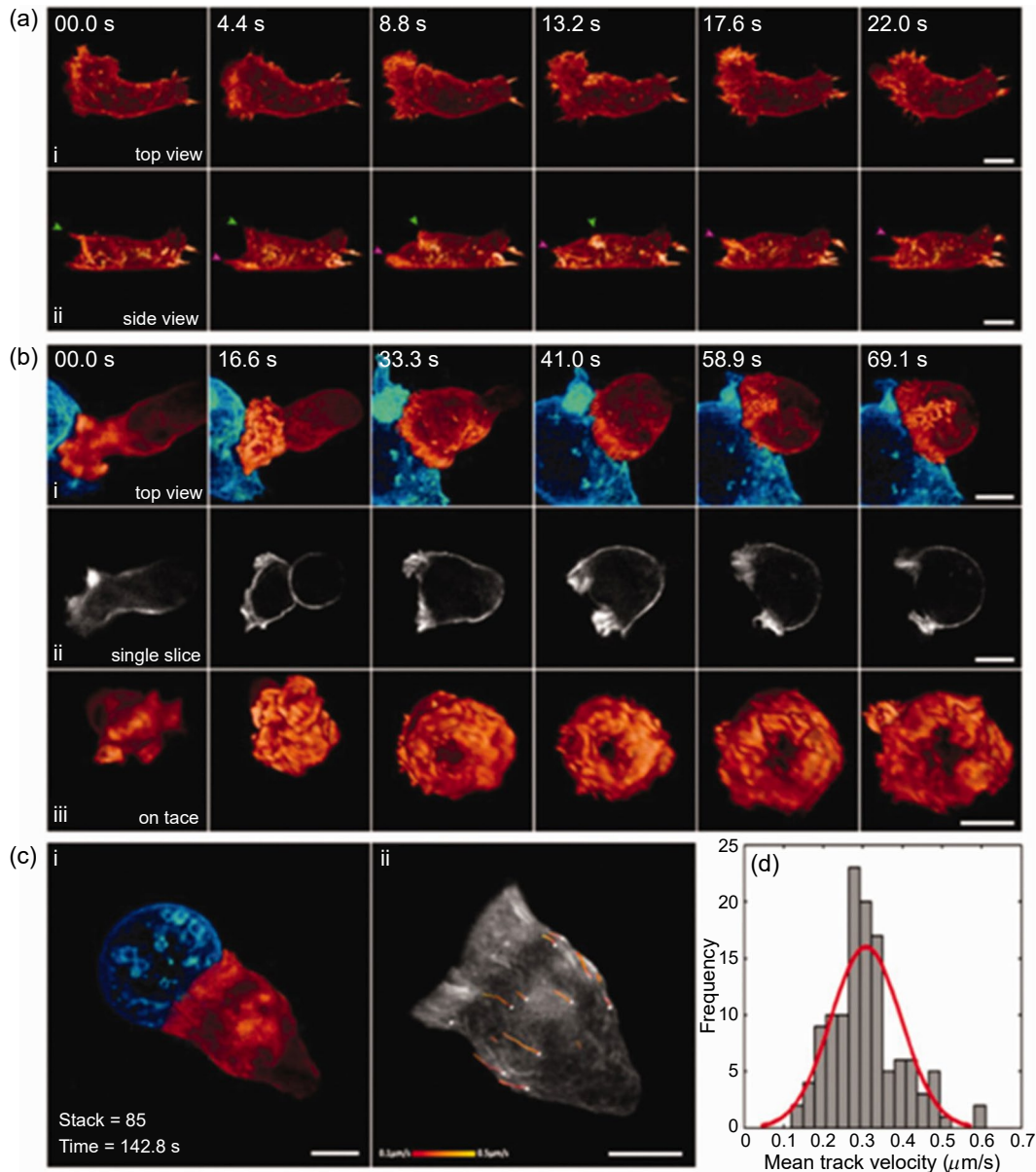


圖 10. T 細胞中肌動蛋白動力學的光片螢光顯微鏡 (LSFM) 圖像⁽¹⁴⁾。(a) 細胞毒性 T 細胞遷移連續圖。綠色和洋紅色箭頭分別代表細胞背側的皺褶 (b) MIP 圖分別為 (i) 細胞毒性 T 細胞 (橘色) 和標靶細胞 (青色) 的作用過程 (ii) 突觸中心的切面圖 (iii) 細胞毒性 T 細胞面對圖 (c) (i) 細胞毒性 T 細胞 (橘色) 和標靶細胞 (青色) 作用過程的 MIP 圖 (ii) 可見肌動蛋白結構粒子的三維追蹤圖 (d) 每個追蹤線中平均速度的直方圖，比例尺為 $5\ \mu\text{m}$ 。

除了觀察 T 細胞的行為外，也有研究學者把 LSFM 應用在免疫學上，目前 LSFM 已經成功用於檢測其相應天然環境中的免疫細胞亞群 (cell subsets)。幾種組織清除技術以及 LSFM 被用於鑑定淋巴組織內部的淋巴細胞和樹突狀細胞^(15, 16)。此外，近年來也有科學家用多色 LSFM 在單細胞解析度下觀察大型組織的免疫過程，像是利用三色成像技術結合組織透明化 (tissue clearing) 和優化抗體穿透性，解決培氏斑塊 (Peyer's patches) 中細胞黏附分子-1 (MAdCAM-1) 和 T 細胞的反應，從而有效量化黏膜血管的模式變化。LSFM 還能夠在造血細胞移植後定位單個 T 細胞並檢測罕見的細胞變化⁽¹⁷⁾。

三、單分子偵測技術

1. 顆粒偵測

雖然顯微鏡用在觀測細胞是非常厲害的，但科學家並不滿足於觀察到細胞尺度的狀況，他們想要看到更小，看到單分子層級，LSFM 也不意外的被科學家拿來改良，目前 LSFM 拿來看單分子的架設整理如圖 11 所示⁽¹⁸⁾。

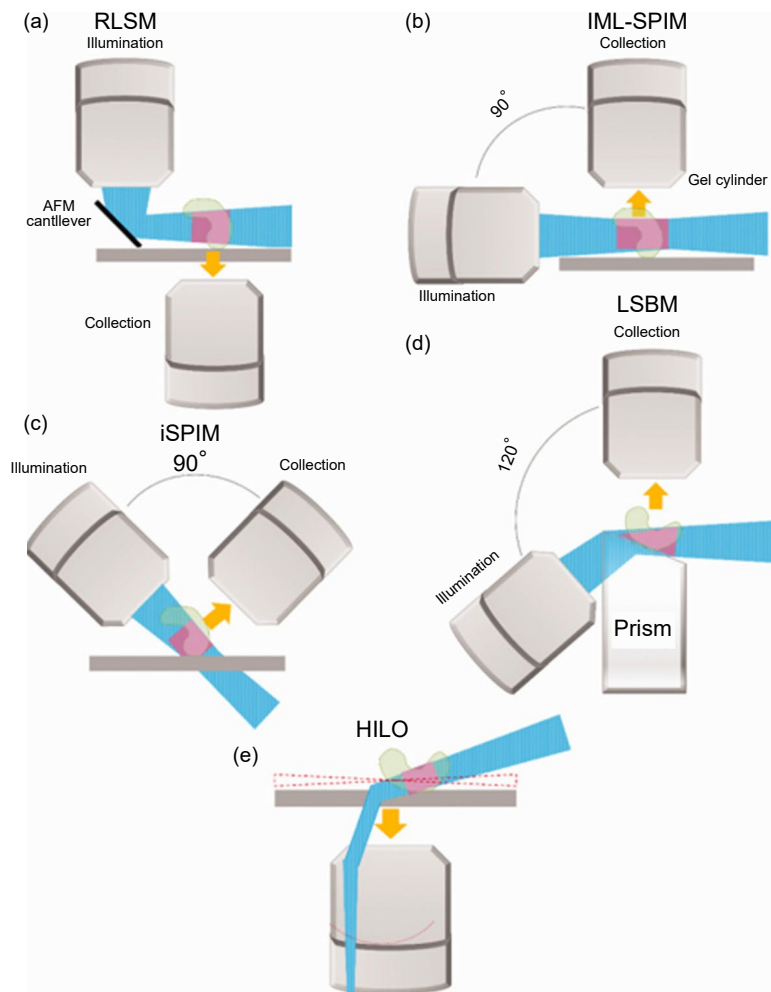


圖 11. 不同的層光螢光顯微鏡 (LSFM) 用於單分子偵測的架設圖⁽¹⁸⁾。(a) 反射層光顯微鏡 (reflected light-sheet microscope, RLSM) (b) 單分子定位擇面照明螢光顯微鏡 (individual molecule localization-SPIM, IML-SPIM) (c) 逆向擇面照明螢光顯微鏡 (inverted SPIM, iSPIM) (d) 稜鏡耦合層光貝葉斯顯微鏡 (prism-coupled light-sheet Bayesian microscope, LSBM) (e) 高傾斜層壓光學片顯微鏡 (highly inclined laminated optical sheet microscope, HILO)。

Ritter 等人利用 LSFM 追蹤幼蟲唾液腺細胞核中單個天然訊息核糖核酸蛋白顆粒 (messenger ribonucleoprotein particles, mRNP) 的移動，並發現三種移動圖形的巴爾比尼氏環 (Balbiani ring, BR)⁽¹⁹⁾。也有科學家利用 LSFM 研究富含絲氨酸 (Serine) 的磷酸化與秀麗隱桿線蟲 (*C. elegans*) 胚胎中的 P-顆粒 (P-granules) 相互作用的動態學⁽²⁰⁾，如圖 12。他們發現，

在 P 顆粒中與 MBK-2 / DYRK 和 PP2A / PPTR-1-2 相互作用以調節裝配或分解的磷酸化蛋白啟動子屬於母體效應種系缺陷 (maternal-effect germline defective, MEG)。利用這種高分辨率顯微鏡，他們能夠觀察到 P 顆粒和帶有綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 標記 MEG3 間的作用動態學，MEG3 滲透並圍繞每個顆粒的方式遵循帶狀的路徑。他們得出的結論是，胚胎中非均質 P 顆粒的組裝主要受磷酸化作用調控。

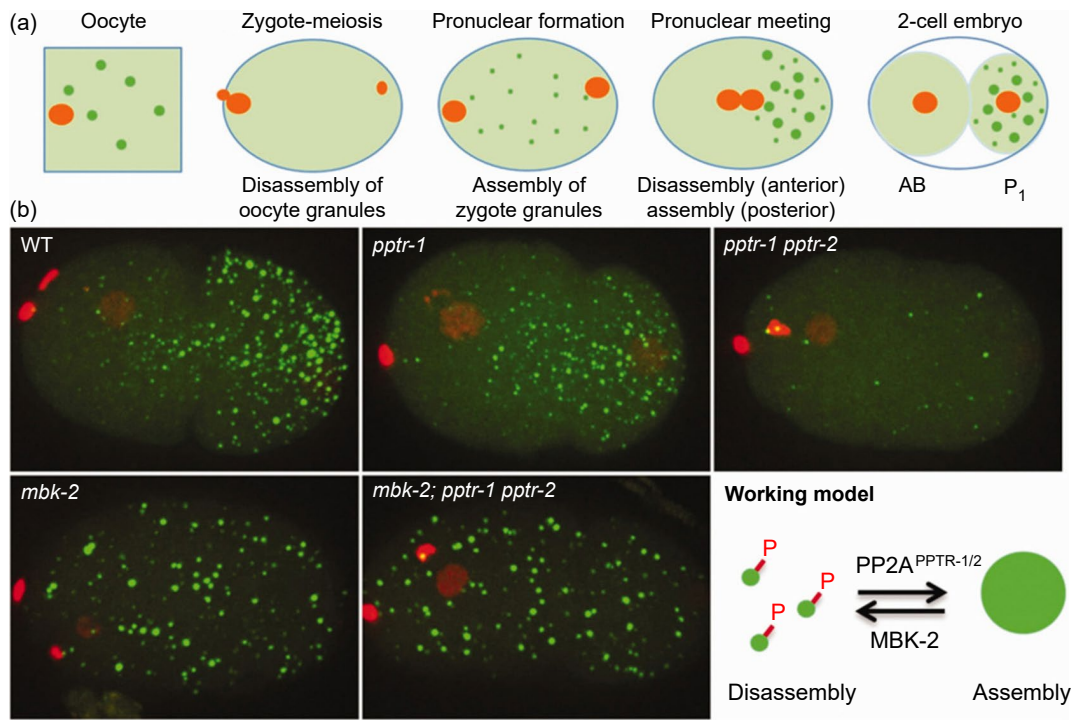


圖 12. MBK-2 和 PP2A/PPTR-1/2 的相對激酶/磷酸酶對⁽²⁰⁾。(a) 秀麗隱桿線蟲在卵母細胞向胚胎進化過程中觀察到的 P 顆粒動力學 (b) 表達 GFP:PGL-1 和 mCherry: Histone 2B 的受精卵相關基因型的原核遷移 (pronuclear migration)。該模型代表了 MBK-2 分解顆粒的磷酸化和 PP2A/PPTR-1/2 組裝顆粒的去磷酸化。

2. 超高解析度層光顯微技術

雖然科學家可以捕捉到單顆粒的動態學，但是解析度會是個問題，為了達到次繞射極限的解析度和提高訊噪比來偵測生物樣品，科學家開始再度改良光學設計，Zanacchi 等人結合超高解析度顯微技術和層光顯微技術開發出 IML-SPIM⁽²¹⁾，如圖 11(b)。與 PALM 技術類似，他們將可光活化的單體 Cherry (monomeric Cherry, mCherry) 融合到組蛋白 H2B 上 (H2B-PAmCherry)，從而允許將 H2B-PAmCherry 融合蛋白定位在直徑為 50 到 150 nm 的 MCF10A 細胞球體中，並達到側向和軸向分辨率分別為 63 和 140 nm 的連續 3D 成像。

為了再提高空間時間解析度，RLSM 相繼而生，這種設計為了將生成的層光反射到水平面，在樣品附近安裝了一個反射鏡，為用於水平切片的高 NA 物鏡創造了很大的空間，如圖 11(a) 所示。層光的應用增加了訊噪比，並允許捕獲高達 100 Hz 的單個螢光蛋白圖像。Gebhardt 等人通過在樣品表面附近添加拋光的原子力顯微鏡 (atomic force microscope, AFM) 懸臂垂直反射層光來設計 RLSM⁽²²⁾。在他們的系統中，使用 40 倍 NA 0.8 的水浸式物鏡來產

生激發光，並使用 100 倍 NA 1.35 或 NA 1.4 的油浸式物鏡作為檢測物鏡。圖 13 顯示了使用 RLSM 技術與 MCF-7 細胞中可光激活的螢光蛋白 mEos2 融合的組蛋白 H4 的單分子檢測，並且將圖像與 HILO 生成的圖像進行了比較。結果表明，RLSM 提高了訊噪比。在該實驗中，測定了各種低聚合 (oligomerization) 階段下以及糖皮質激素受體 (glucocorticoid receptor, GR) 和雌激素受體 α (estrogen receptor- α , ER) 突變體的去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 停留時間，揭示了 DNA 與 GR 結合的不同模式。Zhao 等人也使用了類似的技術檢查巨大唾液腺或哺乳動物核內核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 聚合酶聚類聚合的可能性⁽²³⁾。

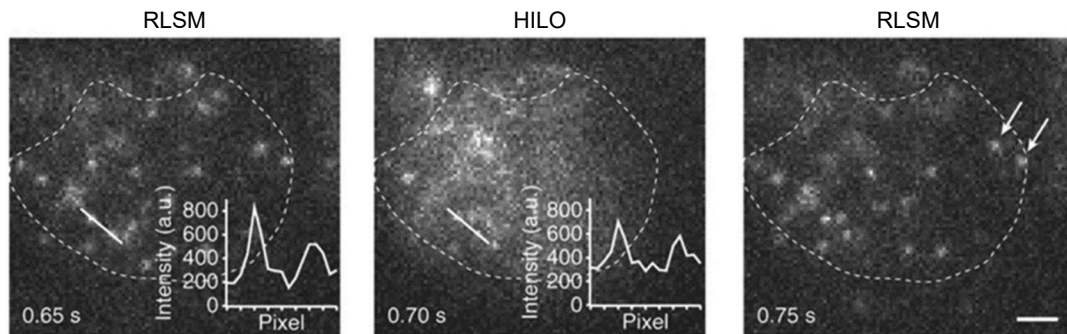


圖 13. 用 mEos2-histone H4 表達的 MCF-7 細胞用不同技術的圖像⁽²²⁾。分別使用 RLSM 和 HILO 技術拍攝 mEos2-histone H4 表達的 MCF-7 細胞的圖像比較，虛線表示核殼的輪廓。

Hu 等人有提出另一種設計，被稱為貝葉斯層光高解析顯微技術 (light sheet Bayesian super-resolution microscopy)⁽¹⁸⁾，如圖 11(d)。這個技術最與眾不同的地方，在於他們使用了貝林-布洛卡稜鏡 (Pellin-Broca prism) 放置在照明物鏡和偵測物鏡間，這樣可以增加空間的可用性。此系統可以用來追蹤在肺癌細胞 (A549 細胞) 的頂膜 (apical membrane) 上 ATTO565 染料綴合的單個表皮生長因子受體 (epidermal growth factor, EGF)⁽²⁴⁾，如圖 14。可以觀察到 EGF 與受體的對接現象直到顆粒的內化 (internalization) 或光漂白以及追蹤到 EGF 的擴散行為，平均擴散係數為 $0.13 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。

四、大組織的觀測

最近 LSFM 在神經科學以及發育生物學也有重大的應用，在神經科學領域，LSFM 達到了大腦成像的三維單細胞解析度，並且可以對大腦迴路辨識與分析，從而提供高速拍攝速度、亞微米解析度和低光漂白。在發育生物學中，LSFM 可以對動物發育中分子、細胞、遺傳和進化程度進行了解，此外它對組織內細胞間相互作用、胚胎發育、轉錄控制機制以及對發育中的動物進行系統研究必不可少的生長因子等特定領域也具有廣闊的應用前景。

在用於量化神經元活動的電生理技術 (electrophysiological techniques) 中，全細胞記錄的使用仍然是測量神經活動的首選方法，而鈣成像已被廣泛用於測量神經元突刺的行為，但記錄的神經元僅代表大腦中存在的神經元的一小部分，因此無法研究大腦不同部分中存在的神經元的相互作用。與標準電記錄中採用電極插入方法形成鮮明對比的是無侵入式成像技術，無侵入式成像技術不僅提供來自大量神經元群體的數據，而且還提供有關神經元位置和形態的關鍵信息。事實證明，層光成像在小型脊椎動物和無脊椎動物中是個全腦成像的出色工

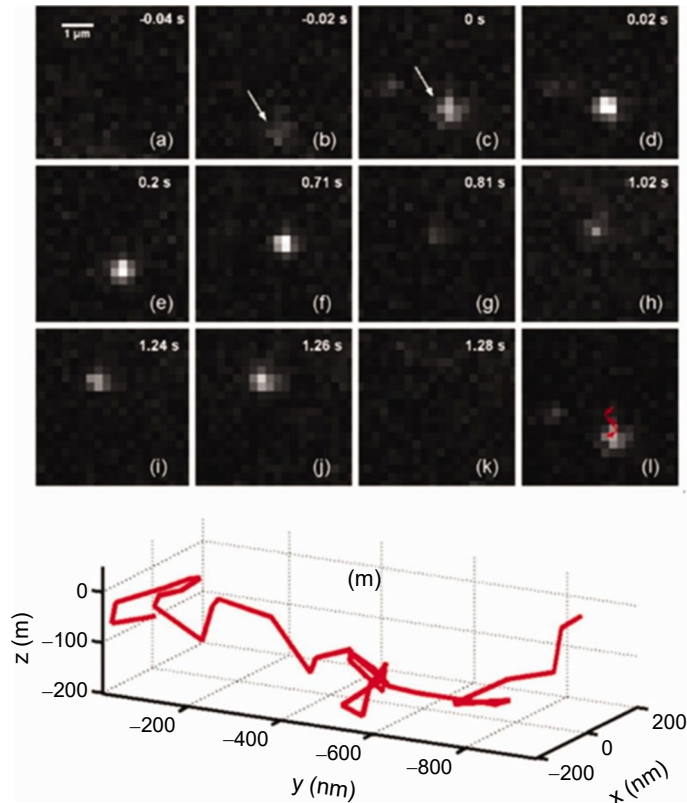


圖 14. 表皮生長因子受體-生物素-鏈親和素-ATTO565 複合物 (EGF-biotin-streptavidin-ATTO565 complex) 隨時間序列的移動直到其消失在 A549 細胞的頂膜⁽²⁴⁾。(a) 沒任何粒子 (b) 顯示初步的結合 (c)–(h) 顯示粒子各時間點的移動，粒子的亮點會先顯著下降再上升 (i) (j) 顯示了粒子在最終狀態前出現的圖像 (k) 為顆粒因為內化或光漂白而消失的圖像 (l) 為顆粒在第 0 秒到第 8 秒的軌跡 (m) 粒子的軌跡圖。

具，並且同時提供了有關神經元形態及其在大腦不同區域的活動之間的關係的信息。

大腦與中樞神經系統 (central nervous system, CNS) 的相互作用可以通過解決神經網絡活動的圖案來進行解密。Amat 等人能夠處理容量非常大的斑馬魚、果蠅和老鼠的四維圖像⁽²⁵⁾。這種每分鐘 26,000 個細胞的成像速率 (每個時間點最多 20,000 個細胞) 可以研究果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 的胚胎發育，特別是研究神經系統發育來探討神經母細胞動力學，如圖 15。

即時記錄大腦中所有神經元活動的能力可以解決各種問題，例如在特定動作 (游泳等) 過程中大腦不同部位存在的不同神經元的功能和相互作用，這是現有電生理技術無法解決的，因為它們無法同時從不同的大腦區域收集來自大型神經元的信息。腦部成像研究中最常見的模型生物之一是青鱗魚。Stelzer 等人使用了數位掃描層光共聚焦顯微鏡 (digital scanned light sheet confocal microscope, DSLM) 來獲得整個青鱗魚胚胎的定量數據⁽²⁶⁾，如圖 16 所示，並將結果與共聚焦和雙光子螢光顯微鏡兩種成熟的顯微鏡技術進行了比較，結果表明，與共聚焦和兩光子螢光顯微鏡相比，DSLM 的成像採集速度提高了多達 50 倍，具有很高的訊噪比 (10–100 倍)，同時不用提供高能量 (低三個數量級)。

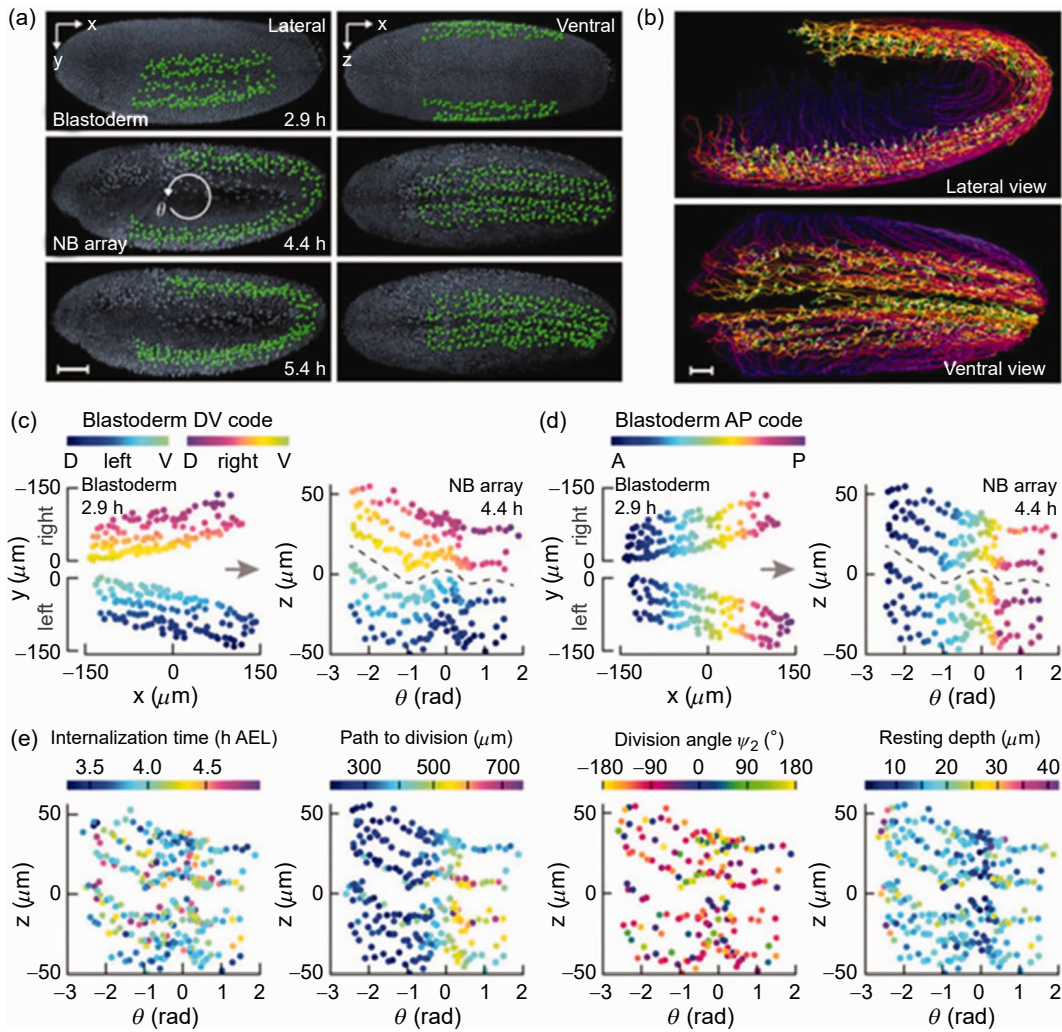


圖 15. 果蠅早期胚胎神經系統⁽²⁵⁾。(a) 果蠅胚胎內神經元前體在不同時間點 (h after egg laying, h AEL) 的不同位置 (b) 側面和腹側神經前體細胞 (c) 在囊胚細胞的前腹 (DV) 和前後側 (AP) 位置的成神經細胞前體中單細胞分辨率的彩色編碼圖 (e) 在 AEL 的 4.4 小時，使用成神經細胞陣列中的顏色編碼測量所有神經前體的細胞行為特徵。y 起點表示胚胎的後端。比例尺：(a) 50 μm (b) 20 μm 。

五、結論

LSFM 發展的未來方向取決於各個領域的合作程度以及研究人員之間知識的轉移，研究人員已經意識到整合的重要性，包括計算、生物學和圖像採集都佔有重要的地位。這種狀況迫使各種研究小組要熟悉 LSFM 的工作原理和應用，從而導致 LSFM 在解決不同研究領域中各種複雜問題方面的適用性不斷提高。人類平均壽命以及生活質量的提高和各種疾病的了解以及通過早期發現來減輕疾病有關，通過 LSFM 的應用，可以檢測出產前各種疾病的起源，並採取治療措施有效地消除或控制這些疾病。雖然還有一段路要走，但這項技術有很大的可能填補對疾病的有限了解中的空白。

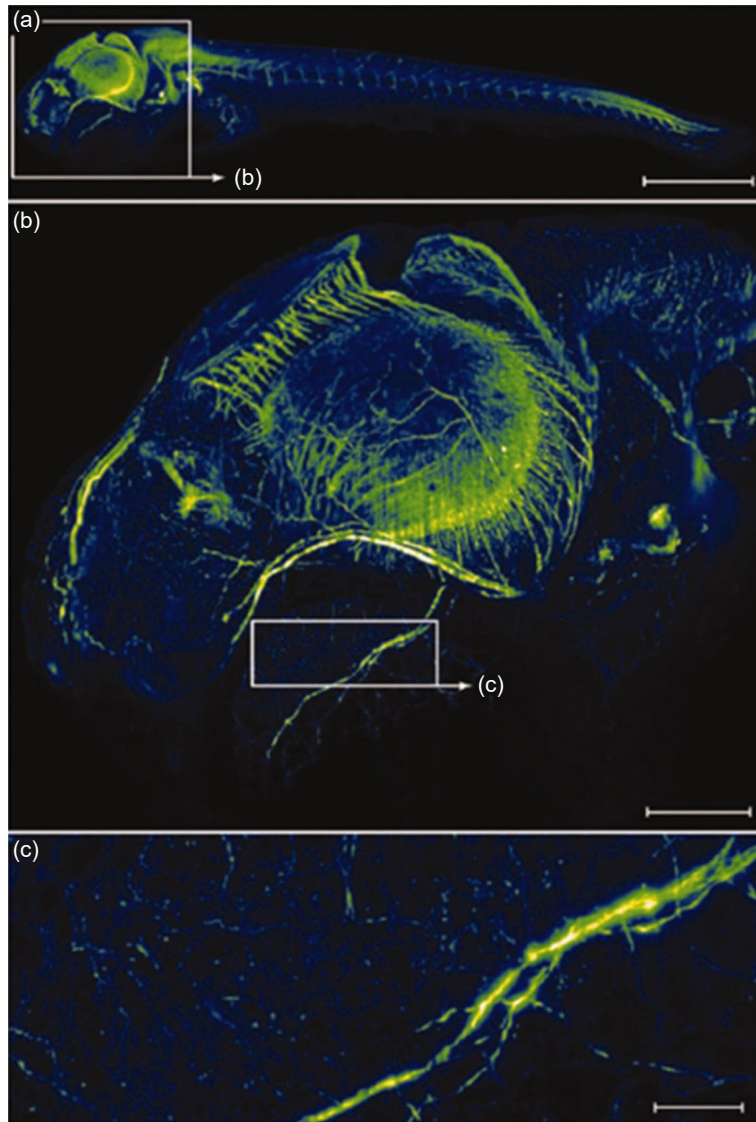


圖 16. 青鱒魚胚胎的數位掃描圖像 (通過乙酰化微管蛋白免疫染色染色)⁽²⁶⁾ 比例尺 (a) 500 mm (b) 100 mm (c) 20 mm。

參考資料

1. Krishnendu Chatterjee et al., *Applied Spectroscopy*, **72** (8), 1137 (2018).
2. Voie, A. H., Burns, D. H., and Spelman, F. A., *Journal of Microscopy*, **170** (3), 229 (1993).
3. Jan Huiskens et al., *Science*, **305** (5686), 1007 (2004).
4. Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J., Stelzer, E. H. K., *Science*, **322** (5904), 1065 (2008).
5. Krzic, U. et al., *Nature Methods*, **9** (7), 730 (2012).
6. Planchon, T. A. et al., *Nature Methods*, **8** (5), 417 (2011).
7. Betzig, E., *Optics Express*, **13** (8), 3021 (2005).
8. Chen, B.-C. et al., *Science*, **346** (6208), (2014).
9. Power, R. M., Huiskens, J., *Nature Methods*, **14** (4), 360 (2017).
10. Xiaoming Yu, Meng Zhang, Shuting Lei, *Journal of Micro and Nano-Manufacturing*, **6** (1), 010901 (2018).
11. Naoko Taguchi et al., *Journal of Biological Chemistry*, **282** (15), 11521 (2007).

12. Lei Lu, Mark S Ladinsky, Tom Kirchhausen, *Molecular Biology of the Cell*, **20** (15), 3471 (2009).
13. Liang Gao et al., *Cell*, **151** (6), 1370 (2012).
14. Alex T. Ritter et al., *Immunity*, **42** (5), 864 (2015).
15. Fernanda M. Coelho et al., *Blood*, **121** (20), 4101 (2013).
16. Jürgen Mayer et al., *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, **2012**, (2012).
17. Brede, C. et al., *Journal of Clinical Investigation*, **122** (12), 4439 (2012).
18. Ying S Hu et al., *Optical Nanoscopy*, **2** (7), 2 (2013).
19. Jörg Gerhard Ritter et al., *PLOS ONE*, **5** (7), e11639 (2010).
20. Jennifer T Wang et al., *eLife*, **3**, e04591 -(2014).
21. Francesca Cella Zanacchi et al., *Nature Methods*, **8**, 1047 (2011).
22. J Christof M Gebhardt et al., *Nature Methods*, **10** (5), 421 (2013).
23. Ziqing W Zhao et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111** (2), 681 (2014).
24. Yu Li, Ying Hu, and Hu Cang, *The Journal of Physical Chemistry B*, **117** (49), 15503 (2013).
25. Fernando Amat et al., *Nature Methods*, **11** (9), 951 (2014).
26. Philipp J Keller , Ernst H K Stelzer, *Current Opinion in Neurobiology*, **18** (6), 624 (2008).

作者簡介

曹杰先生為國立臺灣大學化學所碩士，現擔任中央研究院應用科學研究中心陳壁彰老師實驗室的研究助理。

Chieh Tsao received his M.S. in Chemistry from National Taiwan University. He is currently a research assistant at Research Center for Applied Sciences, Academia Sinica.

陳壁彰先生為美國德州大學奧斯汀分校化學暨生化系博士，現為中央研究院應用科學研究中心副研究員。

Bi-Chang Chen received his Ph.D. in Chemistry & Biochemistry at the University of Texas at Austin. He is currently an associate research fellow at Research Center for Applied Sciences, Academia Sinica.