

基于光遗传学的在体高空间分辨率神经调控技术

孔令杰^{1, 2*}, 靳程¹, 金国藩¹

¹清华大学精密仪器系精密测试技术与仪器国家重点实验室, 北京 100084;

²清华-IDG/麦戈文脑科学研究院, 北京 100084

摘要 相比传统电生理方法, 基于光遗传学的神经调控技术具有低侵入性、可结合基因工程实现特定神经元选择性激发等优势, 近年来在脑科学研究领域得到广泛应用。对基于光遗传学的神经调控方法进行了系统回顾, 详细介绍了双光子光遗传技术及其在在体高空间分辨率神经调控方面的研究进展, 包括串行螺旋扫描激发、串行扩展光斑扫描激发以及基于广义相衬和计算机生成全息图的并行激发技术等。此外, 还讨论了目前双光子光遗传技术在激发精度及激发视场等方面存在的问题及解决方案, 并指出将双光子成像与双光子光遗传结合的全光电生理技术可实现神经活动的同步观测与调控, 进而极大地推动神经环路解析等神经科学研究。

关键词 材料; 光遗传学; 光敏蛋白; 双光子激发; 计算全息算法; 全光电生理系统

中图分类号 R318.51

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202148.1507003

1 引 言

当前, 世界各国纷纷推出“脑计划”开展脑科学研究, 其中神经技术的发展成为其重要的推动力。为了精确解析神经环路, 人们不仅需要进行神经网络活动观测, 还需要对神经活动进行精准调控^[1-3]。光学技术凭借低侵入性、高空间分辨率、可并行测量等优点, 在生物医学, 尤其是神经网络活动的观测与调控领域极具潜力^[4-5]。2005 年, Boyden 等^[6]首次将光敏感通道蛋白-2 (Channelrhodopsin-2, ChR2) 表达在大鼠神经元中, 并使用蓝光激发实现了毫秒量级的神经元激活。这种基于光敏感蛋白的神经调控技术被称为光遗传学 (Optogenetics) 技术。相比于传统电生理技术, 基于光遗传学的神经调控技术由于结合了基因工程技术, 除具有光学技术的固有优点外, 还可实现选择性、特异性神经元激活或抑制, 近年来在神经科学研究中得到广泛应用。

为了实现基于光遗传学的神经调控, 需要采取恰当的光激发方案。传统光遗传技术使用基于单光子激发的宽场照明激发策略, 在整个照明区域内均

可实现神经元激发, 其激发效率正比于光照强度, 无法实现对单个神经元的选择性、特异性激发。同时, 受生物组织散射和吸收的影响, 传统光遗传技术中激发光的穿透深度较浅。然而, 在双光子光遗传中, 光敏蛋白需要同时吸收两个光子才可能产生双光子吸收效应。此时, 激发效率正比于光强的平方, 只有在焦点附近才有足够高的光子密度实现双光子激发。因此, 双光子光遗传技术具有三维分辨能力^[7], 可实现单神经元分辨率的定向激发。此外, 考虑到双光子激发所用的近红外光, 相对于单光子激发所用的可见光, 具有更小的散射系数^[8], 因此双光子激发具有更深的穿透深度。目前, 双光子光遗传技术已被广泛应用于在体高分辨率神经调控, 实现了深层脑组织中单神经元分辨率的多个神经元激发^[9-12], 极大地推进了神经环路解析等脑科学研究。

本文对当前常用的光遗传激发方法进行了归纳总结, 指出了各种光调控技术的基本原理和优缺点。其中, 第二部分简要概括了基于光遗传学的常规在体神经调控技术, 第三部分详细介绍了基于光遗传学的在体高空间分辨率神经调控技术, 第四部分讨

收稿日期: 2021-03-16; 修回日期: 2021-05-14; 录用日期: 2021-06-02

基金项目: 国家自然科学基金(61831014, 61771287, 32021002)、清华大学自主科研计划(20193080076)、清华大学 Bio-Brian+X 高端成像仪器开发种子基金

通信作者: *konglj@tsinghua.edu.cn

论了基于光遗传学的光激发技术存在的局限和解决方案。与现有相关综述文章^[13-15]不同,本文着重介绍了并行双光子激发光斑生成时常用的全息算法及其优缺点,提出了计算全息算法在双光子光遗传并行激发领域中的改进方向。此外,本文给出了近年来双光子光遗传技术的生物应用实例,为相关领域的研究者提供参考。

2 基于光遗传学的常规在体神经调控技术

光敏蛋白的发展极大地推动了基于光遗传学的神经调控技术研究。常用的兴奋型光敏蛋白主要包括:1)野生型 ChR2 和 ChR2 突变体 [ChR2 (H134R), ChR2 (E123T/T159C), ChETA 等^[16-19]];2)由光敏感通道蛋白-1(ChR1)和来自团藻的变种 (VChR1) 结合而成的光敏蛋白 (C1V1)^[20]。其中,ChR2(H134R)产生的光电流是野生型 ChR2 的两倍,但响应速度减半;ChR2 (E123T/T159C)可使用蓝光打开,使用绿光或黄光关闭,可以实现长达 30 min 的离子通道开放;ChETA 可以显著提高动作电位发放频率极限,可将野生型 ChR2 的 40 Hz 提升至 200 Hz。C1V1 光敏蛋白的单光子激发波长在红光波段,相比 ChR2, C1V1 有更大的双光子光电流和更长的激活寿命^[21],更有利于实现双光子激发。常见的抑制型光敏蛋白如下。1)盐细菌视紫红质 (Halorhodopsin, NpHR)^[22],在黄绿光的照射下会引起氯离子流入神经元,进而抑制神经元活动。2)古紫质 (Archaeorhodopsin-3, Arch)^[23],在黄绿光的照射下会引起氢离子流出神经元,引起神经元抑制响应。3)黄斑细球虫真菌视蛋白 (fungus leptosphaeria maculans, Mac)^[23],在蓝光的照射下会引起氢离子流出神经元,导致神经元抑制。

在光遗传学技术发展初期,人们通常采用基于单光子激发的宽场照明方法,即将荧光灯或发光二极管 (light-emitting diode, LED) 等扩展光源与机械快门相结合,对含光敏蛋白的神经元进行激活或抑制。此时多为离体培养神经元实验^[6, 21]。离体培养组织的光散射影响较小,使用宽场照明可以满足要求。然而,对于在体神经调控而言,宽场照明光会受到生物组织散射和吸收的影响,随着穿透深度的增加,激发效率显著降低。因此,宽场照明只适用于皮层浅层的神经调控,通常使用将小型 LED 直接安装在薄颅骨或玻璃颅窗上的方式进行光激发^[17, 24]。

对于深层脑区的激发,需要使用光纤传输的方式,即将激光器或 LED 的发射光耦合至光纤的一端,再将另一端定位到目标脑区并加以固定^[25]。同样地,受脑组织光散射、吸收的影响,光纤耦合方法的激发范围受限。以小鼠脑皮层为例,距离光纤尖端 $\sim 500 \mu\text{m}$ 位置处的激发光功率密度相比光纤尖端会下降 $\sim 90\%$ ^[26-27]。使用基于宽场照明或光纤耦合照明的常规在体神经调控技术,人们在神经科学领域取得了多项突破,主要成果包括映射神经环路与特定行为^[28-30]、分析局部神经环路活动^[31-33]、探索与病理和治疗相关的神经环路^[18, 34-35]、恢复视网膜光感受器丧失后的部分功能^[36-38]等。

然而,常规照明方法基于单光子吸收效应,激发效率与照明光强度成正比,因此位于照明区域内所有标记有光敏蛋白的神经元都有可能被激活(或抑制),难以实现单细胞或亚细胞分辨率水平的选择性照明。事实上,属于同一类型、位于同一脑区的不同神经元可能具有不同的反应模式^[39-40];同时,神经元集群的集中激活或抑制也与真实神经网络活动不符。为了实现对神经元的精细调控,进而对脑功能进行精确解读,需要将照明的空间分辨率尺度从神经元集群缩小到单个神经元乃至亚神经元结构。此外,由于单光子激发中所用的可见光在生物组织内的散射系数较大,随着穿透深度的增加,光激发效率显著降低。为了打破上述局限,人们发展了基于双光子光遗传的神经调控方法。

3 基于光遗传学的在体高分辨神经调控技术

与基于单光子吸收效应的宽场激发技术相比,双光子激发技术具有深穿透深度、可三维空间定位等优势。但是传统双光子荧光显微成像中的点扫描模式难以实现有效的双光子光遗传激发。这是由于双光子激发光斑的横向分辨率通常在亚微米量级,而小鼠脑皮层的神经元直径为 $10\sim 20 \mu\text{m}$,单个焦点激发打开的光敏蛋白通道数量受限,且考虑到光敏蛋白通道的电导率较低,单焦点激发产生的膜电位变化无法达到神经元的兴奋(或抑制)阈值,进而无法产生(或抑制)动作电位。而且,与典型荧光分子相比,光敏蛋白 ChR2 有着较大的双光子吸收横截面 ($260 \text{ GM @ } 920 \text{ nm}$)^[41]和较长的激发态寿命 (近 10 ms)^[9],这两个特性会导致基态粒子的快速耗尽,因此不能通过提高照明功率的方式实现单焦点激发下的神经激活^[9]。为了解决上述问题,人们

相继提出了串行激发技术和并行激发技术,下面分别介绍对应的技术实现方案,随后介绍双光子光遗传技术的生物应用实例。

3.1 串行激发

3.1.1 串行螺旋扫描激发

2009年, Rickgauer 等^[41]使用螺旋扫描激发方法实现了对标记有 ChR2 光敏蛋白神经元的双光子光遗传激活(图 1)。如图 1(b)所示,使用低数值孔径物镜生成聚焦高斯光斑,在物镜后焦面(或其共轭面)处放置扫描振镜,设定扫描振镜的振动方式和速率,即可完成对整个神经元胞体的快速连续扫描。实验证明,采用螺旋扫描方式可以产生良好的光电流响应^[41]。为了实现最优激发,需要对多个参数进行控制,其中包括照明光对整个胞体的扫描时间

T_s 、聚焦光斑的大小、扫描速度和照明功率等。扫描时间 T_s 要短于光敏蛋白的光门控电流衰减时间,这样随着光焦点的移动,不同位置产生的光电流才能有效叠加,产生(或抑制)动作电位。聚焦光斑大小则决定了扫描单个位置时能同时激发的光门控通道的数量。扫描速度和照明功率共同决定了每个位置的激发速率。为了实现多个神经元的激发,可以精确设置振镜的偏转角度,使振镜每完成一次对神经元胞体的扫描后,可以快速移动到下一神经元开始新的扫描。设光斑在两个神经元之间移动所需的定位时间为 T_i , 激发每个神经元所需的扫描时间为 T_s , 激发神经元数目为 N , 则完成一次串行扫描激发所需的总时间 T 为

$$T = N \times T_s + (N - 1) \times T_i. \quad (1)$$

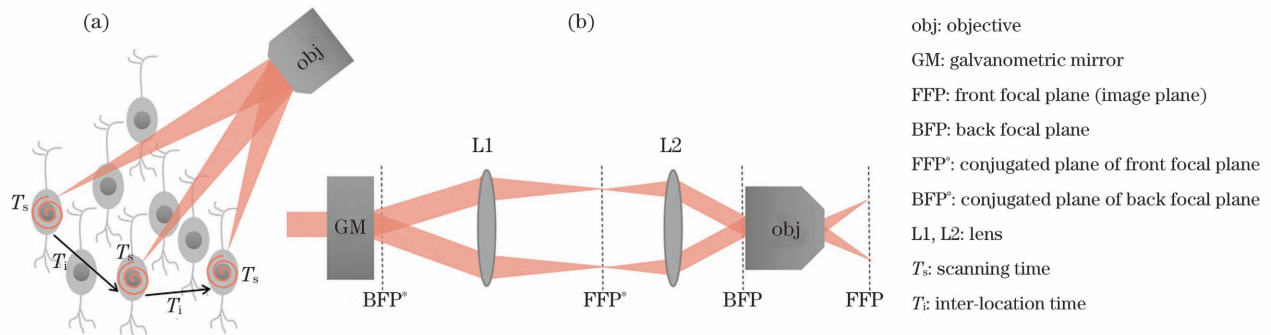


图 1 串行螺旋扫描激发^[41]。(a)原理示意图; (b)光路图

Fig. 1 Serial excitation with spiral scanning^[41]. (a) Principle diagram; (b) optical path

随着新型红移光敏蛋白 C1V1 的诞生,人们发现,与 ChR2 相比, C1V1 有更大的光电导率和更长的激活寿命($\sim 60 \text{ ms}$ ^[41]),因此更适合于串行扫描激发。Prakash 等^[10]和 Packer 等^[11]相继进行了 C1V1 光敏蛋白的双光子串行螺旋扫描激发实验。

然而,串行螺旋扫描激发方法需要在目标神经元上逐个进行螺旋扫描,耗时较长。为了提升时间分辨率,2014年 Rickgauer 等^[12]提出了使用扩展光斑实现串行双光子光遗传激发的方法。

3.1.2 串行扩展光斑扫描激发

与串行螺旋扫描不同,串行扩展光斑扫描激发方法直接生成横向尺度可以覆盖神经元胞体的扩展光斑,再结合光束扫描,即可完成对多个目标神经元的串行激发,其原理示意图如图 2(a)所示。为了得到扩展光斑,可使用低数值孔径透镜聚焦。但是,此时轴向分辨率通常无法达到单个神经元尺度。为了提高轴向分辨率,人们引入了时空聚焦(Temporal focusing, TF)技术^[42-43]。如图 2(b)所示,在基于时

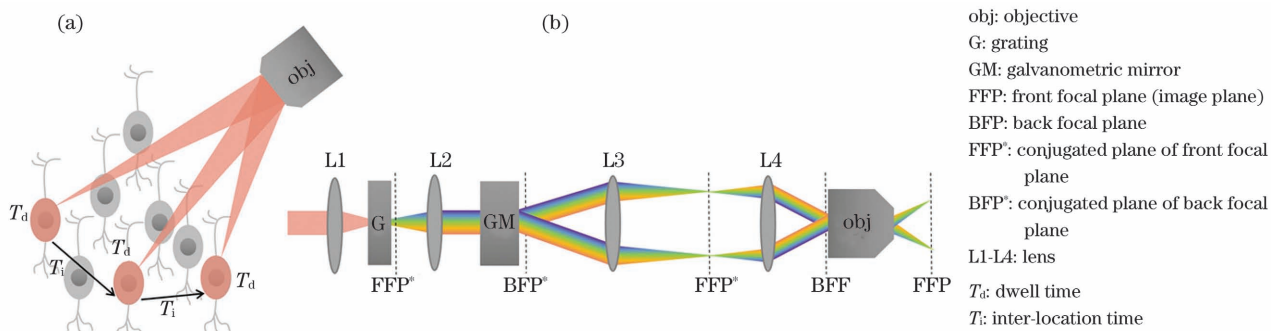


图 2 串行扩展光斑扫描激发。(a)原理示意图; (b)光路图

Fig. 2 Serial excitation with extended pattern. (a) Principle diagram; (b) optical path

空聚焦技术的串行扩展光斑激发技术中,在物镜焦面的共轭面位置放置光栅引入色散,超短脉冲经物镜聚焦,只有焦面位置处的色散可以得到完全补偿^[44],以保持原有脉宽和高双光子激发效率;而非焦面位置处的光斑由于色散而出现脉宽展宽,双光子激发效率显著降低,从而实现扩展光斑的高轴向分辨率约束。同时,结合时空聚焦方法生成的扩展光斑也有较好的抗散射能力^[45]。

需要指出的是,在上述两种串行扫描激发方案中,激发光斑均需多个目标神经元间快速移动,难以实现多个神经元的同步激发。尤其是串行螺旋扫描,激发单个神经元需要一定时间内的光电流叠加,其只适用于离子通道关闭速度较慢的光敏蛋白。尽管串行扩展光斑扫描激发方式可以节省扫描时间,但在多个神经元间切换时仍会耗费时间。为了进一步提升时间分辨率,人们发展了并行激发方案。

3.2 并行激发

并行激发方案通过引入光机元件,对激发光场进行调控,从而实现多个神经元的同步激发,如图 3(a)所示。通常,并行激发光遗传照明包括强度调制和相位调制两大类。强度调制方案通过 LED、数字微镜器件(digital micromirror device, DMD)、振幅调制空间光调制器等器件,在焦面的共轭面位置直接进行光场强度调制,将非目标光滤除。这样,在焦面位置仅保留与待激发目标神经元匹配的光强

分布,从而实现对多个神经元的同步激发[图 3(b)]。但是强度调制方法会引入大量激光能量损耗,这限制了其在双光子光遗传激发中的应用。相位调制方案通过相位型空间光调制器(spatial light modulator, SLM)来实现对像空间光场分布的间接调控,主要包括对物镜焦面共轭面处相位作调制的广义相衬(generalized phase contrast, GPC)技术以及对物镜傅里叶面(或其共轭面)处相位作调制的计算机生成全息图(computer generated holography, CGH)技术。相对于强度调制方法,相位调制方法引入的能量损耗较少,被广泛应用于基于双光子光遗传的高空间分辨神经活动调控中。

3.2.1 GPC 技术

GPC 技术^[46]是一项共路干涉技术,像面位置得到的图像是信号光与参考光之间的干涉结果。GPC 技术将泽尼克相衬技术的小相位变化范围扩展到整个相位区间 $[0, 2\pi]$ 。如图 3(c)所示,相位调制器件(如 SLM)被放置在物镜焦面的共轭面处。首先,将理想目标强度分布转换成二进制 $[0, \pi]$ 相位映射,并将此相位映射加载到相位调制器件上。然后,将相位调制器件调制的光束聚焦到一个相衬滤波器(phase contrast filter, PCF)上,在轴上聚焦分量(非衍射光)和高阶衍射分量之间施加适当的相位延迟,即可在物镜焦面位置产生目标强度分布。

使用 GPC 技术生成目标光斑时,无需额外计算

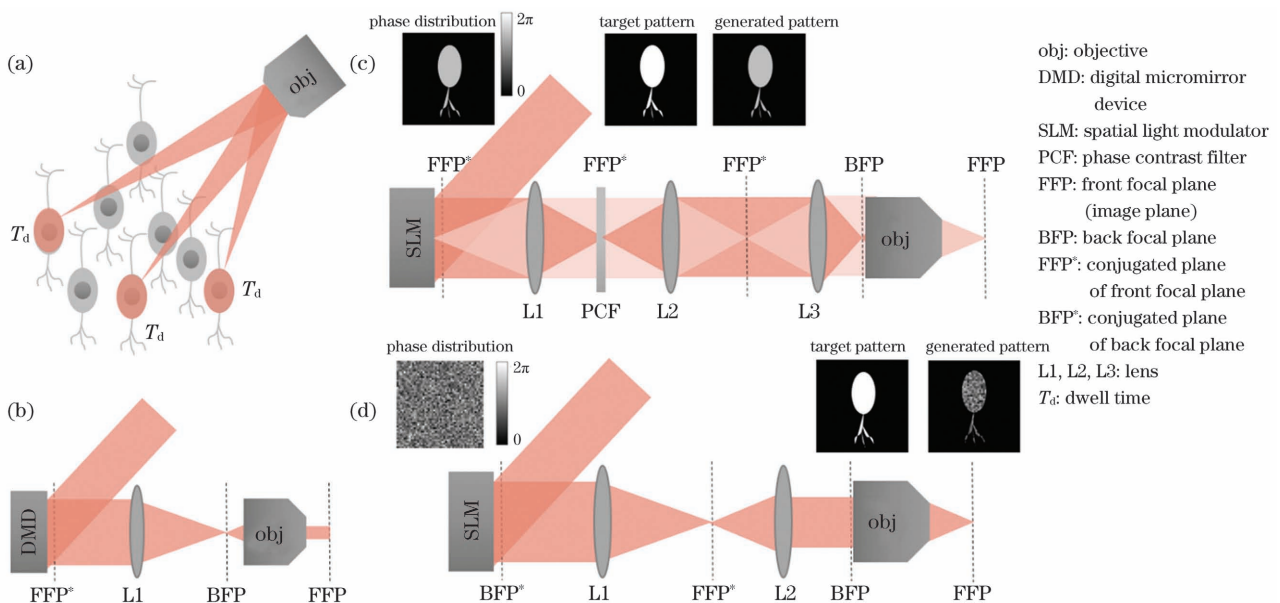


图 3 基于并行激发的光斑生成方法。(a)并行扫描激发示意图;(b)强度调制光路图;(c)广义相衬光路图;(d)计算机生成全息图光路图

Fig. 3 Pattern generation methods based on parallel excitation. (a) Schematic of parallel scanning excitation; (b) optical path for intensity modulation; (c) optical path of GPC; (d) optical path of CGH

在 SLM 上加载的相位分布,因此这种方法简单、直接。同时,使用 GPC 技术生成的光斑均匀性好,可以实现对精细结构的高效激发。同时,使用二值化相位全息图时,可以用铁电液晶相位调制器件进行高速调制,进一步提高系统的时间分辨率。

但是,GPC 技术在双光子光遗传中的应用并不广泛,这主要受限于以下几点。1) GPC 技术生成光斑的灵活性差。为了达到最大干涉对比度条件,二值化相位分布中置 1 的像素数与总像素数的比值应该为 1 : 4,这一约束限制了激发图案面积的大小。2) GPC 技术只能在焦面位置生成光斑,无法在不同轴向深度生成光斑。3) GPC 技术能量利用率低。4) GPC 技术生成光斑的轴向分辨率很差^[47]。为了提升轴向分辨率以实现单细胞分辨率的激发,一般需要结合时空聚焦技术^[42-43]。

3.2.2 CGH 技术

CGH 技术的基本思想如图 3(d) 所示。首先确定物镜焦面附近的目標强度分布,然后使用计算全息算法得到物镜傅里叶面处的二维相位分布,并将此相位加载在位于物镜傅里叶面(或其共轭位置)的 SLM 上,即可在像空间物镜焦面附近实现目标强度的高度近似重建。重建精度取决于使用的算法和目标强度的具体分布情况。

目前,基于双光子光遗传的高空间分辨率神经网络调控领域所使用的全息算法主要有叠加算法^[48-49]、Gerchberg-Saxton(GS)算法^[50-53]、非凸优化(non-convex optimization, NOVO)算法^[54]和深度计算全息(DeepCGH)算法^[55]。叠加算法所需的计算时

间较短,但由于没有引入不同目标层之间的相关性,在计算多层目标时,计算精度较小。图 4 是 CGH 算法框图,其中 F, F' 为傅里叶面处的复振幅, A, A' 为傅里叶面处的振幅, φ 为傅里叶面处的相位, $\Delta\varphi$ 为相位变化量, V 为像面的目标强度分布, I, I' 为像面处的复振幅, a, a' 为像面处的振幅, Φ 为像面处的相位, FFT, IFFT 分别为傅里叶变换和傅里叶逆变换, L 为损失函数, CNN 为卷积神经网络。GS 算法是目前双光子光遗传学领域中应用最广泛的算法,流程图如图 4(a) 所示,在具有单个神经元分辨率的光遗传激发中,除了希望激发光可以精准激发特定的目标神经元外,还需要避免光在某些不希望被激发的神经元位置有较高的能量密度,以免引起误激发。此处,将希望被激发的目标称为亮目标,将不希望被激发的目标称为暗目标。在 GS 算法中,只能指定亮目标区域,而无法对暗目标区域进行限制^[54],这可能导致计算得到的光场在暗目标区域有较高的能量密度,产生误激发。NOVO 方法将求解傅里叶面处目标光场所对应的相位分布问题视作优化问题,流程如图 4(b) 所示。值得注意的是,NOVO 方法可以定义同时包含亮目标和暗目标的损失函数,非常适用于双光子光遗传应用。但是相对于 GS 算法,NOVO 算法所需的计算时间稍长。DeepCGH 方法通过训练无监督学习的卷积神经网络实现全息图生成,流程图如图 4(c) 所示。这种方法前期需要进行大量样本的预训练,且不同类型三维目标之间的迁移准确性难以保证。

基于 CGH 的并行激发技术主要包括多焦点生

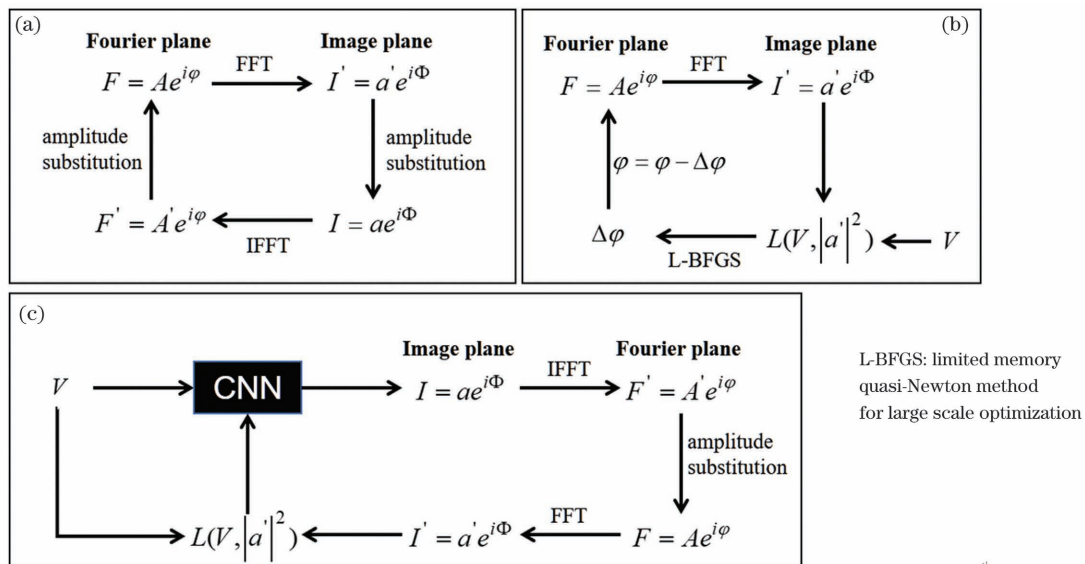


图 4 CGH 算法框图。(a)GS 算法; (b)NOVO 算法; (c)DeepCGH 算法

Fig. 4 Block diagrams of CGH algorithms. (a) GS algorithm; (b) NOVO algorithm; (c) DeepCGH algorithm

成结合螺旋扫描技术和多扩展光斑激发技术两类。在多焦点生成结合螺旋扫描激发技术中,人们利用计算全息算法生成三维空间中不同位置的多个焦点,再采用振镜进行螺旋扫描实现每个神经元胞体的激发^[56]。相比串行扫描激发方法,多焦点生成结合螺旋扫描激发方法无需在多个神经元之间进行焦点移动,可提高时间分辨率。但是,螺旋扫描本身会导致神经元响应的延迟和抖动,不利于模拟真实的神经活动。这种方法只适合于离子通道关闭速度较慢的光敏蛋白。多扩展光斑激发技术则是利用计算全息算法直接生成与神经元胞体尺寸匹配的多个激发光斑。此外,该技术也可以定制激发光斑形状以激发精细亚神经元结构,比如树突棘和树突分支^[57]。使用这种激发方式,激发光可以同步到达待激发目标,时间分辨率与光敏蛋白的动力学响应和待激发目标的数量无关,不易出现螺旋扫描导致的光电流抖动和延迟现象。但是,相对扫描激发方式而言,它需要更高的激发能量。

实验证明,使用 CGH 生成的双光子扩展光斑,其轴向分辨率与横向扩展光斑半径成正比^[55]。当生成大尺寸扩展光斑图案时,即使在双光子激发的条件下,光斑的轴向分辨率也会迅速恶化。因此,人们将时空聚焦技术引入计算全息光路中,扩展光斑的轴向分辨率得到显著提升^[58],但是此方法只能在焦面位置实现轴向分辨率的提升。为了在三维空间中实现多个具有高轴向约束的扩展光斑激发,Hernandez 等^[59]引入了双空间光调制器,实现了焦面位置的时空聚焦光斑的轴向位置搬移。但这种方法光路结构复杂,能量损耗大。随后,Pégard 等^[60]提出 3D-SHOT 技术,首先生成横向扩展的高斯圆盘型光斑,再使用时空聚焦方法对其进行轴向压窄,最后使用空间光调制器实现光斑的分束和三维空间定位。这种方法会引入次焦点,降低激发效率,而且生成的扩展光斑只有一种尺寸,无法实现多尺寸扩展光斑的同时生成。为了实现多尺寸扩展光斑的同时生成,Accanto 等^[61]提出了 MTF-MS 方法,即使用一个空间光调制器进行振幅整形以生成不同尺度的光斑形状,另一个空间光调制器则用来调制光斑的位置。表 1 为在体高分辨神经调控技术的比较。

使用 CGH 方法计算傅里叶面处的二维相位分布时,通常只对像空间光场的强度分布进行限制。因此,像空间光场的相位分布通常是随机的,而相邻位置的随机相位会导致光场发生随机的相长干涉或

相消干涉,进而产生散斑,导致像空间能量分布不均。在基于 CGH 的双光子光遗传学中,由于双光子效应与入射光强度的平方成正比,因此散斑导致的能量涨落相比单光子激发的情况更加明显。研究表明,在基于单光子、双光子激发的 CGH 技术中,散斑问题导致的能量不均匀性分别约为 20% 和 50%^[58, 62]。这种不均匀性会降低双光子光遗传的激发效率,尤其影响亚细胞精细结构(如树突)的有效激发。目前,人们提出了多种提升激发光斑均匀性的方法,一个基本策略是将多个照明光斑进行时间平均,不过这是以降低时间分辨率为代价的。具体而言,可以在全息光束中引入旋转散射片^[62],将目标图像划分为由稀疏对象点组成的多个对象点组,并按时间顺序显示多个对象点组^[63],将生成的全息图进行循环移动^[64]或使用无散斑相位算法^[65]来实现散斑抑制,以提升激发光斑的均匀性。使用卷积神经网络也可实现全息散斑噪声的良好抑制^[66]。

尽管 CGH 技术凭借高时间分辨率、高空间分辨率等优点已成为目前双光子光遗传激发的主流方案,但是它仍有一定的改进和提升空间。例如,如何降低甚至消除散斑的影响,如何在保证计算精度的前提下提升计算速度,如何在算法层面生成具有高轴向分辨率的扩展光斑等。这些问题的解决将显著提升 CGH 技术在双光子光遗传领域中的应用范围和影响力。

3.3 生物应用实例

双光子光遗传技术为在体高空间分辨率神经调控提供了有力工具。但是,为了实现对神经环路的精细解析,在进行神经活动调控的同时,还需要进行同步神经网络活动观测。近年来,人们通过将双光子成像与双光子光遗传技术相结合,成功实现了具有单神经元分辨率乃至亚神经元分辨率的神经网络活动同步观测与调控,称为全光电生理技术^[67]。例如,Forli 等^[68]使用光谱区分度较高的蓝光敏感光敏蛋白 ChR2(激活类)、GtACR2(抑制类)进行神经活动调控,使用红移钙指示剂 jRCaMP1 进行神经活动观测,实现了小鼠在体神经元的高空间分辨率双向调控与成像。Marshall 等^[69]和 Carrillo-Reid 等^[70]利用全光电生理系统证明,通过调控神经环路中的主要神经元,可以在撤除视觉输入时复现该神经环路所对应的行为。可以预见,基于双光子光遗传及成像的全光电生理系统在神经环路解析研究中具有巨大潜力。

表 1 在体高分辨神经调控技术的比较

Table 1 Comparison among *in vivo* high-spatial-resolution neural manipulation techniques

Technique	Core component	Advantage	Disadvantage
Serial excitation with spiral scanning ^[9-11]	Galvanometric mirror	Single cell accuracy and high power efficiency	Low time resolution and only being compatible with slow turn-off opsins
Serial excitation with extended pattern ^[12]	Galvanometric mirror and grating	Single cell accuracy and high power efficiency	Low time resolution
Parallel illumination by GPC based phase modulation ^[45]	SLM and PCF	High time resolution, high pattern uniformity, matching target morphology, and single cell accuracy (with temporal focusing)	Low power efficiency and power subdivided among targets
Multi-foci generation based on CGH with spiral scanning ^[56]	SLM and galvanometric mirror	Single cell accuracy and high power efficiency	Only being compatible with slow turn-off opsins
Parallel illumination with extended pattern generated by CGH ^[59-60]	SLM	High time resolution, matching target morphology, and single cell accuracy (with temporal focusing)	Power subdivided among targets and low pattern uniformity

为了进一步提升全光电生理系统的性能,人们还致力于开发更优性能的光敏蛋白、引入更先进的器件。例如,为了更好地研究感知和行为背后的神经环路机制,需要对神经元集群中单个细胞产生动作电位的时间进行精确控制。为此,Chen 等^[71]使用快变光敏蛋白(如 ChrimsonR)结合 CGH 时空聚焦并行激发方案,实现了毫秒量级的双光子光遗传调控。Marshall 等^[69]使用 ChrimsonR 光敏蛋白结合两个刷新速率为 2 ms 的 SLM,实现了 kHz 切换速率的双光子光遗传激发。为了实现深层脑组织的高空间分辨率神经活动观测与调控,Accanto 等^[72]引入渐变折射率透镜植入深层脑区。

4 讨论与总结

近年来,人们发展了新型光敏蛋白及光激发技术,极大地推进了在体神经调控技术的发展,但仍然存在需要进一步改进的问题。例如,由于传统光敏蛋白的全局表达特性,在神经元胞体和树突上的激发光都可能引起神经冲动响应,考虑到神经组织的致密性及激发光的空间分辨率,高强度激光可能会激发周围其他神经元的树突,难以实现单神经元分辨的选择性激发。为了提高激发精度,人们尝试研究可局部表达的光敏蛋白。近期,Mardinly 等^[73]研制了只在神经元胞体表达的兴奋型光敏蛋白 ST-ChroME 和抑制型光敏蛋白 IRES-ST-eGtACR1,可实现高精度的神经元调控。此外,双光子激发光斑的生成依赖于飞秒脉冲(100~200 fs)光源,其较短

的相干长度(30~60 μm)也限制了双光子光遗传的有效激发视场。对于脉宽为 140 fs,物镜数值孔径为 $NA = 0.8$ 的双光子激发系统,其视场仅为 65 μm 。为了研究跨脑区的神经网络调控^[74-76],亟需提升光遗传激发的视场。Yang 等^[77]和 Sun 等^[78]相继提出将全息生成结合振镜扫描以扩展激发视场的方案,在 1.3 ms 内实现了 1.3 mm 视场范围的双光子激发^[78]。

综上,本文围绕基于光遗传学的神经调控技术所使用的光激发方案展开讨论。常规在体神经调控依赖于单光子激发,无三维定位和深度分辨能力。基于双光子激发的在体高空间分辨率神经调控技术克服了上述缺点,可实现单神经元分辨率的选择性神经活动调控。本文详细介绍了双光子光遗传的技术方案,包括串行激发和并行激发的具体实现方法及其各自的优缺点。此外,讨论了双光子光遗传技术的生物应用,并指出将神经网络活动观测与调控相结合的全光电生理技术在神经科学研究中具有广阔前景。最后,讨论了双光子光遗传技术在激发精度及激发视场等方面存在的问题和可能的改进方案。

参 考 文 献

- [1] Kandel E R, Spencer W A, Brinley F J, Jr. Electrophysiology of hippocampal neurons: I. sequential invasion and synaptic organization [J]. *Journal of Neurophysiology*, 1961, 24(3): 225-242.
- [2] Ditterich J, Mazurek M E, Shadlen M N.

- Microstimulation of visual cortex affects the speed of perceptual decisions[J]. *Nature Neuroscience*, 2003, 6(8): 891-898.
- [3] Salzman C D, Britten K H, Newsome W T. Cortical microstimulation influences perceptual judgements of motion direction[J]. *Nature*, 1990, 346(6280): 174-177.
- [4] Li Z L, Li S W, Zhang S L, et al. Coherent Raman scattering microscopy technique and its biomedical applications[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207005.
李姿霖, 李少伟, 张思鹭, 等. 相干拉曼散射显微技术及其在生物医学领域的应用[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207005.
- [5] Sancataldo G, Silvestri L, Mascaro A L A, et al. Advanced fluorescence microscopy for *in vivo* imaging of neuronal activity[J]. *Optica*, 2019, 6(6): 758-765.
- [6] Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. *Nature Neuroscience*, 2005, 8(9): 1263-1268.
- [7] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [8] Jacques S L. Optical properties of biological tissues: a review[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2013, 58(11): R37-R61.
- [9] Mattis J, Tye K M, Ferenczi E A, et al. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins[J]. *Nature Methods*, 2011, 9(2): 159-172.
- [10] Prakash R, Yizhar O, Grewe B, et al. Two-photon optogenetic toolbox for fast inhibition, excitation and bistable modulation[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(12): 1171-1179.
- [11] Packer A M, Peterka D S, Hirtz J J, et al. Two-photon optogenetics of dendritic spines and neural circuits[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(12): 1202-1205.
- [12] Rickgauer J P, Deisseroth K, Tank D W. Simultaneous cellular-resolution optical perturbation and imaging of place cell firing fields[J]. *Nature Neuroscience*, 2014, 17(12): 1816-1824.
- [13] Oron D, Papagiakoumou E, Anselmi F, et al. Two-photon optogenetics[J]. *Progress in Brain Research*, 2012, 196: 119-143.
- [14] Papagiakoumou E, Ronzitti E, Chen I W, et al. Two-photon optogenetics by computer-generated holography[M]//Stroh A. *Optogenetics: a roadmap*. *Neuromethods*. New York: Humana Press, 2018, 133: 175-197.
- [15] Huang P Y, Song Y T, Zhang N, et al. Optogenetics based on light-gated protein-protein interactions and its applications[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207010.
黄培元, 宋禹桐, 张宁, 等. 基于光控蛋白质相互作用的光遗传学技术及其应用[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207010.
- [16] Nagel G, Brauner M, Liewald J F, et al. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses[J]. *Current Biology*, 2005, 15(24): 2279-2284.
- [17] Gradinaru V, Thompson K R, Zhang F, et al. Targeting and readout strategies for fast optical neural control *in vitro* and *in vivo* [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2007, 27(52): 14231-14238.
- [18] Gunaydin L A, Yizhar O, Berndt A, et al. Ultrafast optogenetic control[J]. *Nature Neuroscience*, 2010, 13(3): 387-392.
- [19] Berndt A, Schoenenberger P, Mattis J, et al. High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(18): 7595-7600.
- [20] Yizhar O, Fenno L E, Prigge M, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction [J]. *Nature*, 2011, 477(7363): 171-178.
- [21] Carmi I, de Battista M, Maddalena L, et al. Holographic two-photon activation for synthetic optogenetics[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(3): 864-900.
- [22] Zhang F, Wang L P, Brauner M, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry [J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 633-639.
- [23] Chow B Y, Han X, Dobry A S, et al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps[J]. *Nature*, 2010, 463(7277): 98-102.
- [24] Airan R D, Thompson K R, Fenno L E, et al. Temporally precise *in vivo* control of intracellular signalling[J]. *Nature*, 2009, 458(7241): 1025-1029.
- [25] Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis A R, et al. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures [J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(3): 439-456.
- [26] Adamantidis A R, Zhang F, Aravanis A M, et al. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons [J]. *Nature*, 2007, 450(7168): 420-424.

- [27] Aravanis A M, Wang L P, Zhang F, et al. An optical neural interface: *in vivo* control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology [J]. *Journal of Neural Engineering*, 2007, 4(3): S143-S156.
- [28] Ciochi S, Herry C, Grenier F, et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits [J]. *Nature*, 2010, 468(7321): 277-282.
- [29] Witten I B, Lin S C, Brodsky M, et al. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning [J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2010, 330(6011): 1677-1681.
- [30] Domingos A I, Vaynshteyn J, Voss H U, et al. Leptin regulates the reward value of nutrient [J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14(12): 1562-1568.
- [31] Cardin J A, Carlén M, Meletis K, et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses [J]. *Nature*, 2009, 459 (7247): 663-667.
- [32] Sohal V S, Zhang F, Yizhar O, et al. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance [J]. *Nature*, 2009, 459 (7247): 698-702.
- [33] Adesnik H, Scanziani M. Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits [J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1155-1160.
- [34] Kravitz A V, Freeze B S, Parker P R, et al. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry [J]. *Nature*, 2010, 466(7306): 622-626.
- [35] Gradinaru V, Mogri M, Thompson K R, et al. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry [J]. *Science*, 2009, 324(5925): 354-359.
- [36] Bi A D, Cui J J, Ma Y P, et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration [J]. *Neuron*, 2006, 50(1): 23-33.
- [37] Lagali P S, Balya D, Awatramani G B, et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration [J]. *Nature Neuroscience*, 2008, 11(6): 667-675.
- [38] Tomita H, Sugano E, Isago H, et al. Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats [J]. *Experimental Eye Research*, 2010, 90 (3): 429-436.
- [39] O'Connor D H, Huber D, Svoboda K. Reverse engineering the mouse brain [J]. *Nature*, 2009, 461 (7266): 923-929.
- [40] Curtis J C, Kleinfeld D. Phase-to-rate transformations encode touch in cortical neurons of a scanning sensorimotor system [J]. *Nature Neuroscience*, 2009, 12(4): 492-501.
- [41] Rickgauer J P, Tank D W. Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(35): 15025-15030.
- [42] Papagiakoumou E, Anselmi F, Bègue A, et al. Scanless two-photon excitation of channelrhodopsin-2 [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(10): 848-854.
- [43] Papagiakoumou E, Ronzitti E, Emiliani V. Scanless two-photon excitation with temporal focusing [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(6): 571-581.
- [44] Durst M E, Zhu G, Xu C. Simultaneous spatial and temporal focusing in nonlinear microscopy [J]. *Optics Communications*, 2008, 281(7): 1796-1805.
- [45] Papagiakoumou E, Bègue A, Leshem B, et al. Functional patterned multiphoton excitation deep inside scattering tissue [J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(4): 274-278.
- [46] Glückstad J, Mogensen P C. Optimal phase contrast in common-path interferometry [J]. *Applied Optics*, 2001, 40(2): 268-282.
- [47] Oron D, Papagiakoumou E, Anselmi F, et al. Two-photon optogenetics [J]. *Progress in Brain Research*, 2012, 196: 119-143.
- [48] Leseberg D. Computer-generated three-dimensional image holograms [J]. *Applied Optics*, 1992, 31(2): 223-229.
- [49] Shimobaba T, Ito T, Masuda N, et al. Fast calculation of computer-generated-hologram on AMD HD5000 series GPU and OpenCL [J]. *Optics Express*, 2010, 18(10): 9955-9960.
- [50] Gerchberg R W. A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures [J]. *Optik*, 1972, 35: 237-246.
- [51] Pasienski M, DeMarco B. A high-accuracy algorithm for designing arbitrary holographic atom traps [J]. *Optics Express*, 2008, 16(3): 2176-2190.
- [52] Makowski M, Sypek M, Kolodziejczyk A, et al. Iterative design of multiphase holograms: experiments and applications [J]. *Optical Engineering*, 2007, 46(4): 045802.
- [53] Pozzi P, Mapelli J. Real time generation of three dimensional patterns for multiphoton stimulation [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2021, 15: 609505.
- [54] Zhang J Z, Pégard N, Zhong J S, et al. 3D computer-generated holography by non-convex optimization [J]. *Optica*, 2017, 4(10): 1306-1313.
- [55] Eybposh M H, Caira N W, Atisa M, et al. DeepCGH: 3D computer-generated holography using

- deep learning [J]. *Optics Express*, 2020, 28(18): 26636-26650.
- [56] Yang W J, Carrillo-Reid L, Bando Y, et al. Simultaneous two-photon imaging and two-photon optogenetics of cortical circuits in three dimensions [J]. *eLife*, 2018, 7: e32671.
- [57] dal Maschio M, Difato F, Beltramo R, et al. Simultaneous two-photon imaging and photostimulation with structured light illumination [J]. *Optics Express*, 2010, 18(18): 18720-18731.
- [58] Papagiakoumou E, de Sars V, Oron D, et al. Patterned two-photon illumination by spatiotemporal shaping of ultrashort pulses [J]. *Optics Express*, 2008, 16(26): 22039-22047.
- [59] Hernandez O, Papagiakoumou E, Tanese D, et al. Three-dimensional spatiotemporal focusing of holographic patterns [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11928.
- [60] Pégard N C, Mardinly A R, Oldenburg I A, et al. Three-dimensional scanless holographic optogenetics with temporal focusing (3D-SHOT) [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1228.
- [61] Accanto N, Molinier C, Tanese D, et al. Multiplexed temporally focused light shaping for high-resolution multi-cell targeting [J]. *Optica*, 2018, 5(11): 1478-1491.
- [62] Lutz C, Otis T S, DeSars V, et al. Holographic photolysis of caged neurotransmitters [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(9): 821-827.
- [63] Takaki Y, Yokouchi M. Speckle-free and grayscale hologram reconstruction using time-multiplexing technique [J]. *Optics Express*, 2011, 19(8): 7567-7579.
- [64] Golan L, Shoham S. Speckle elimination using shift-averaging in high-rate holographic projection [J]. *Optics Express*, 2009, 17(3): 1330-1339.
- [65] Guillon M, Forget B C, Foust A J, et al. Vortex-free phase profiles for uniform patterning with computer-generated holography [J]. *Optics Express*, 2017, 25(11): 12640-12652.
- [66] Zhou W J, Zou S, He D K, et al. Speckle noise reduction of holograms based on spectral convolutional neural network [J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(5): 0509001.
周文静, 邹帅, 何登科, 等. 频谱卷积神经网络实现全息图散斑降噪 [J]. *光学学报*, 2020, 40(5): 0509001.
- [67] Yang W J, Yuste R. Holographic imaging and stimulation of neural circuits [M] // Yawo H, Kandori H, Koizumi A, et al. *Optogenetics. Advances in experimental medicine and biology*. Singapore: Springer, 2021, 1293: 613-319.
- [68] Forli A, Vecchia D, Binini N, et al. Two-photon bidirectional control and imaging of neuronal excitability with high spatial resolution *in vivo* [J]. *Cell Reports*, 2018, 22(11): 3087-3098.
- [69] Marshel J H, Kim Y S, Machado T A, et al. Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception [J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2019, 365(6453): eaaw5202.
- [70] Carrillo-Reid L, Han S T, Yang W J, et al. Controlling visually guided behavior by holographic recalling of cortical ensembles [J]. *Cell*, 2019, 178(2): 447-457.
- [71] Chen I W, Ronzitti E, Lee B R, et al. *In vivo* submillisecond two-photon optogenetics with temporally focused patterned light [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2019, 39(18): 3484-3497.
- [72] Accanto N, Chen I W, Ronzitti E, et al. Multiplexed temporally focused light shaping through a gradient index lens for precise in-depth optogenetic photostimulation [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 7603.
- [73] Mardinly A R, Oldenburg I A, Pégard N C, et al. Precise multimodal optical control of neural ensemble activity [J]. *Nature Neuroscience*, 2018, 21(6): 881-893.
- [74] Sofroniew N J, Flickinger D, King J, et al. A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for *in vivo* imaging [J]. *eLife*, 2016, 5: e14472.
- [75] Tsai P S, Mateo C, Field J J, et al. Ultra-large field-of-view two-photon microscopy [J]. *Optics Express*, 2015, 23(11): 13833-13847.
- [76] Stirman J N, Smith I T, Kudenov M W, et al. Wide field-of-view, multi-region, two-photon imaging of neuronal activity in the mammalian brain [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(8): 857-862.
- [77] Yang S J, Allen W E, Kauvar I, et al. Extended field-of-view and increased-signal 3D holographic illumination with time-division multiplexing [J]. *Optics Express*, 2015, 23(25): 32573-32581.
- [78] Sun S Y, Zhang G L, Cheng Z Y, et al. Large-scale femtosecond holography for near simultaneous optogenetic neural modulation [J]. *Optics Express*, 2019, 27(22): 32228-32234.

Advances on *in vivo* High-Spatial-Resolution Neural Manipulation Based on Optogenetics

Kong Lingjie^{1,2*}, Jin Cheng¹, Jin Guofan¹

¹ State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instruments, Department of Precision Instrument, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

² IDG/M^c Govern Institute for Brain Research at Tsinghua, Beijing 100084, China

Abstract

Significance Recently, neuroscience has attracted great attention around the world. To prompt the study of neuroscience, a lot of countries have launched brain projects, in which the development of advanced neural techniques is regarded as the driving force. Optical techniques own the advantages of being less-invasive and high spatial resolution, etc, promising for neural activity recording and manipulation. Compared to traditional electrode stimulation methods, optical stimulation based on optogenetics could selectively excite or inhibit specific neural ensembles, benefiting from the introduction of gene engineering. So far, a variety of opsins have been developed for the activation or inhibition of neural activity. On the other hand, to achieve selective manipulation at single-neuron resolution, the techniques for two-photon optogenetics are emerging. Here, we review various strategies for illumination in two-photon optogenetics. We summarize their technical principles, and discuss their advantages and disadvantages.

Progress Illumination strategies in optogenetics can be classified as conventional illumination strategies based on single-photon absorption and high-spatial-resolution illumination strategies based on two-photon absorption.

In the early days of optogenetics, the wide-field illumination strategy based on single-photon absorption was used to manipulate neurons with opsins. Due to the scattering and absorption of biological tissues, the power of illumination light decreases significantly with the increase of penetration depth in wide-field illumination strategy. For neuron manipulation in deep tissues, fiber-coupled illumination is performed, in which the excitation light is guided through the fiber to the targeted depth. However, specific manipulation of neural activity at single-neuron resolutions is not achieved in neither wide-field illumination nor fiber-coupled illumination, due to the fact that all neurons with opsins in the illumination region would be excited.

For specific manipulation of neural activity at single-neuron resolution or sub-neuron resolution (such as a dendrite or a dendritic spine), the two-photon illumination strategy has to be adopted, which ensures high spatial resolution in three-dimensional (3D) space. Besides, the longer wavelength in two-photon excitation is more robust to scattering and leads to a deeper penetration depth than that of the conventional illumination strategies.

In general, the two-photon illumination strategies can be classified as serial scanning illumination and parallel illumination based on phase modulation. In the former, a single focus is steered to perform spiral scanning on a neuron to open enough ion channels for neuron excitation before being switched to another neuron (Fig. 1). Or, serial scanning with soma-patterned illumination can be employed (Fig. 2). However, the temporal resolution in these methods is low, which makes it only compatible with opsins of slow turn-off time. Besides, parallel illumination can be achieved based on phase modulation (Fig. 3), in which the phase can be calculated by the generalized phase contrast (GPC) method and the computer generated holography (CGH) method. The phase modulation plane of GPC is the conjugate plane of the focal plane, while that of CGH is the conjugate plane of the Fourier plane. The GPC method has good uniformity of excitation patterns but is of a poor energy efficiency. Based on the theory of CGH, two illumination schemes have been developed, i. e. the multi-foci generation combined with the spiral scanning strategy, and the multiple extended-pattern generation strategy. The former has a high energy efficiency and can realize the excitation of 3D distributed neurons, but it is of poor temporal resolution and only works with opsins of slow turn-off response time. The latter can directly generate a multiple expanded-pattern and excites multiple neurons simultaneously. Combined with the temporal focusing technology, this method has high temporal resolution and high axial resolution, however, its energy efficiency is low. At the same time, we summarize the commonly used CGH algorithms for parallel illumination based on phase modulation, which contain superposition algorithm, Gerchberg-Saxton (GS) algorithm, non-convex optimization (NOVO) algorithm, and DeepCGH algorithm. The

diagrams of different algorithms are presented (Fig. 4). The basic ideas, advantages, and disadvantages of these algorithms are briefly pointed out.

Conclusion and Prospect Conventional neural manipulation *in vivo* relies on single-photon illumination, which is not good for specific excitation of neural ensembles at high spatial resolution. To this end, several techniques of two-photon optogenetics have been proposed, and have achieved *in vivo* neural manipulation at high-spatial-resolution. We summarize the development of two-photon illumination strategies, and compare their advantages and disadvantages. Then we discuss the potential issues in the practical employment of two-photon optogenetics, such as excitation precision and field-of-view. We expect that, the all-optical physiology, in which two-photon imaging and two-photon optogenetics are combined, is promising in neuroscience, benefiting from the simultaneous monitoring and manipulating of neural circuits *in vivo*.

Key words materials; optogenetics; photoreactive opsin; two-photon excitation; computer generated holography algorithm; all-optical physiology system

OCIS codes 160.1435; 350.4855; 320.7110