

·封面文章,特邀综述·

光片荧光显微成像技术及应用进展

于湘华¹, 刘超^{1,2}, 柏晨¹, 杨延龙¹, 彭彤¹, 但旦¹, 闵俊伟¹, 姚保利^{1,2*}

¹中国科学院西安光学精密机械研究所瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 陕西 西安 710119;

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要 生物医学研究的发展对光学显微成像的性能,如空间分辨率、成像速度、多维度信息、成像质量等提出了更高的要求。光片荧光显微采用一个薄片光从侧面激发样品,在正交方向探测成像,具有快速三维层析成像和对样品光漂白和光毒性小的优点,是活体生物样品长时间显微观测的理想工具。本文介绍了光片荧光显微成像技术的基本原理及其主要特点;综述了光片荧光显微面临的主要技术问题,以及为解决这些问题而发展出的新原理、新思路和新方法;列举了光片荧光显微成像技术在细胞生物学、发育生物学和神经科学等领域的应用;讨论了该技术的发展趋势及前景。该研究旨在帮助研究者系统了解光片荧光显微成像技术的基本知识、最新研究发展趋势和潜在应用,为该领域科学研究提供参考。

关键词 显微; 荧光显微; 光片照明; 三维成像; 生物医学成像

中图分类号 Q63

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP57.100001

Progress in Light-Sheet Fluorescence Microscopy and Applications

Yu Xianghua¹, Liu Chao^{1,2}, Bai Chen¹, Yang Yanlong¹, Peng Tong¹, Dan Dan¹,
Min Junwei¹, Yao Baoli^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics
and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710119, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract With the development of biomedical research, more advanced and comprehensive optical microscopy are required to enhance the imaging performances such as the spatial resolution, the imaging speed, the multi-dimensional information, the imaging quality, etc. Light-sheet fluorescence microscopy (LSFM), illuminating the specimen with a thin light sheet from the side and obtaining the optical sectioned image orthogonally, provides an ideal tool for long-term observation of live biological specimens due to its unique features of fast volumetric imaging speed and low photobleaching and phototoxicity to samples. In this paper, we first give an introduction to the principle and properties of LSFM. Then we address the key issues existing in LSFM and the solutions based on new principles, ideas and techniques. Some applications of LSFM in cell biology, developmental biology and neurosciences are exemplified, and the development trends and prospect of LSFM are discussed. The purpose of the paper is to help researchers systematically understand the principle, the state-of-the-art techniques, and the potential applications of LSFM, and provide some references for research in this field.

Key words microscopy; fluorescence microscopy; light-sheet illumination; Three-dimensional imaging; biomedical imaging

OCIS codes 180.2520; 180.6900; 170.3880

收稿日期: 2020-03-13; 修回日期: 2020-04-01; 录用日期: 2020-04-03

基金项目: 国家自然科学基金(11704405,61905277,91750106,61705256,81427802)

* E-mail: yaobl@opt.ac.cn

1 引言

17世纪荷兰科学家列文虎克发明的光学显微镜将神秘复杂、丰富多彩的微观世界呈现在人类面前。光学显微镜因具有对样品损伤低、非侵入和丰富的成像机制等优点,已成为生物医学研究不可或缺的重要工具^[1-3]。光学显微成像技术直接推动了细胞学、组织学、胚胎学、微生物学和古生物学等领域的快速发展,人类以此探知生命的演化、洞悉疾病的原理、解码基因的秘密。光学显微成像技术的不断革新为生物医学研究带来新的发现和突破,而生物医学的发展反过来又对光学显微的成像速度、空间分辨率、信息获取维度、成像质量等性能提出了更高的要求。

经典的宽场荧光显微(WFFM)具有结构简单、成像速度快的特点,但因采用落射式照明无法有效区分在焦信号和离焦背景,不具备三维(3D)层析成像能力。激光扫描共聚焦显微(LSCM)利用高度聚焦的激光三维逐点扫描样品激发荧光,利用针孔过滤离焦背景信号仅让在焦荧光信号被探测器收集,从而实现三维层析成像^[4]。但逐点扫描成像模式使得系统时间分辨率受到了很大的限制。此外,因强聚焦产生的较强光毒性(光对细胞的损伤)和光漂白性(荧光染料因过度激发而失效),使其不适合长时间观测活体生物样品。

光片荧光显微(LSFM),也被称作选择平面照明显微(SPIM)^[5]或正交平面荧光光学切片显微术(OPFOSM)^[6],是一种新型的三维显微成像技术。它采用正交光路设计,用一层薄光片从侧面激发样品,并在垂直于光片的方向上利用显微物镜和数码相机拍摄样品的二维荧光图像,通过轴向扫描光片或移动样品逐面成像,即可获取不同深度处的层析图像并实现样品的三维信息重构。它具有三维成像速度快、对比度高、光损伤小的优点,尤其适宜于对活体生物样品进行长时间三维成像^[7-11]。国际上许多著名大学和科研机构纷纷开展了光片荧光显微成像及其应用研究,如:欧洲分子生物实验室的Stelzer课题组^[5, 12-14],美国霍华德·休斯医学研究所的Betzig(因光学超分辨显微的贡献获得2014年诺贝尔化学奖)^[15]和Keller课题组^[16],斯坦福大学的Deisseroth课题组^[17],德州大学西南医学中心的Fiolka课题组^[18],德国马普分子细胞生物学和遗传学研究所的Huisken课题组^[19]等等。国内的光片荧光显微研究也方兴未艾,北京大学陈良怡课题组^[20-21]和孙育杰课题组^[22]、深圳大学牛憨笨院士课题组^[23]、华中科技大学

骆清铭院士课题组^[24]和费鹏课题组^[25-26]、中国科学院自动化研究所田捷课题组^[27]、中国科学院西安光学精密机械研究所姚保利课题组^[28-32]、中国科学院上海光学精密机械研究所刘军课题组^[33]、中国科学院长春光学精密机械与物理研究所穆全全课题组^[34]、中国科学院苏州生物医学工程技术研究所张运海课题组^[35]、浙江大学刘旭课题组^[36]、香港理工大学雷党愿课题组^[37]、南昌大学刘明萍课题组^[38]、西湖大学高亮课题组^[39]等都开展了各具特色的研究工作。

本文旨在帮助研究者们了解光片荧光显微成像技术的基本知识、发展趋势和潜在应用,为该领域科学研究提供参考。简介了光片荧光显微工作原理及主要特点,对比两种经典的光片生成方法;介绍了光片荧光显微面临的主要技术问题,如克服观测视场和空间分辨率相互制约的矛盾,提高三维成像速度、深度和成像质量,实现超分辨成像等,重点介绍为解决这些问题而发展的新原理、新思路和新方法;介绍了光片荧光显微成像技术在细胞生物学、发育生物学、神经科学等生物医学领域的应用;最后进行总结和展望。鉴于这个领域发展得非常迅速,本文不可能包含所有的相关工作,只能选择性地讨论一部分内容,在所难免会遗漏一些贡献。

2 光片荧光显微简介

2.1 光片荧光显微的特点

与图1(b)所示的传统落射式荧光显微构架不同,光片荧光显微成像使用如图1(a)所示的正交独立的激发和探测光路,从侧面用一层薄的光片照明样品,仅激发成像物镜焦面薄层区域的样品,在正交方向上进行探测成像,这样能有效避免离焦背景对成像质量的影响,具有成像对比度高和天然光学层析的优点^[10]。其所需激光能量仅为激光扫描共聚焦显微系统的1/1000,且避免了激光扫描共聚焦显微三维层析成像时激光对样品多次重复不必要的照明激发,极大地降低了光漂白和光毒性,因而适宜于对活体生物样品进行数小时甚至数天的长时间成像。与逐点扫描成像模式相比,光片荧光显微可使用高灵敏、高速的电子倍增电荷耦合器件(EMCCD)或科研级的互补金属氧化物半导体(SCMOS)面阵探测器,采用逐面成像方式,因此具有成像速度快的优势。光片荧光显微三维成像可通过轴向移动样品或扫描光片,利用数码相机同步拍摄样品一系列不同轴向位置处的二维荧光图像,然后利用图形处理软件进行三维可视化重构。

2.2 光片生成的方法

光片的生成是光片荧光显微成像技术的核心,目前主要分为柱面镜聚焦和光束扫描生成两类。

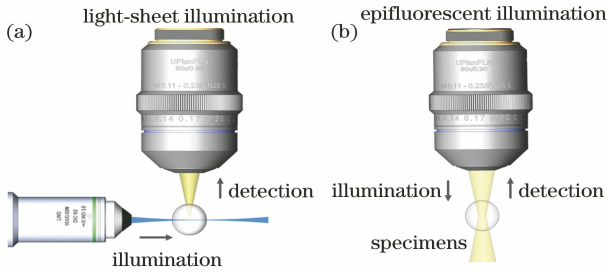


图1 两种显微成像方式对比。(a)光片荧光显微从侧面用薄片照明,只激发探测物镜焦平面处的样品发射荧光,在正交方向上收集荧光信号成像;(b)落射式荧光显微用同一物镜激发和收集荧光,光路经过的在焦和离焦样品都会被激发

Fig. 1 Comparison of two types of illumination and imaging schemes. (a) LSFM illuminates the sample from the side with a thin light-sheet and captures the optical sectioned image in orthogonal direction by another detection objective; (b) epifluorescence microscopy uses the same objective to illuminate and detect the sample, in which both the in-focus and out-of-focus portions are excited

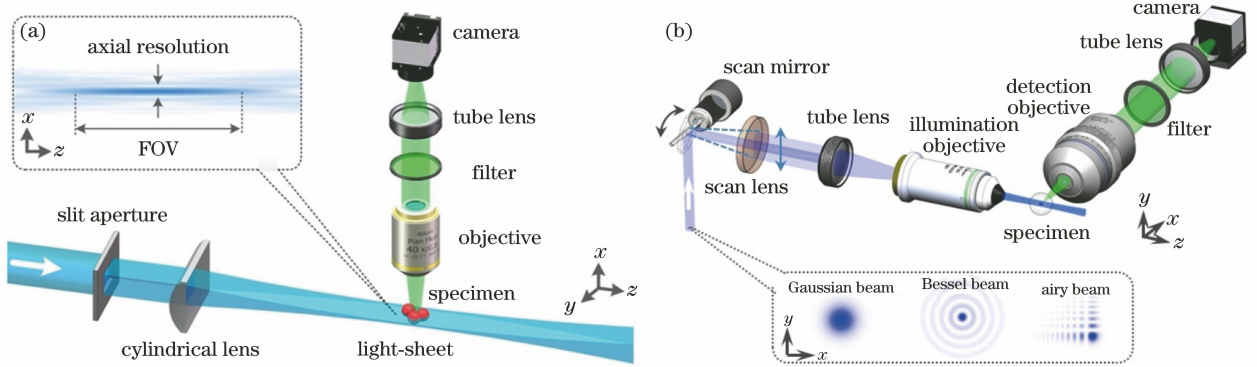


图2 两种光片生成方法的光片荧光显微原理图。(a)使用柱面镜聚焦方法生成光片;(b)利用振镜快速扫描光束生成光片,下部分为不同类型入射光束的横截面强度分布图

Fig. 2 Schematic diagrams for two types of LSFM with different light-sheet generation schemes. (a) Light-sheet is generated by focusing a laser beam with a cylindrical lens; (b) light-sheet is generated by rapidly scanning a laser beam with a scan mirror. Below are the transversal intensity patterns of various types of incident laser beams

3 光片荧光显微的主要技术问题

3.1 空间分辨率与视场相互制约

光片荧光显微成像性能与光片特性息息相关,系统的轴向分辨率由探测物镜的数值孔径与激发光片的厚度共同决定,观测视场(FOV)受限于光片宽度。传统高斯光片场的厚度(束腰半径: $w_0 = 0.61$

2004年, Huisken等^[5]提出的选择平面照明显微(SPIM)是第一种光片荧光显微技术,具有里程碑意义。如图2(a)所示,它使用柱面镜聚焦生成光片。但该方法存在以下局限:激光束经过狭缝后再由柱面镜聚焦生成光片,降低了激光能量利用率,仅为3%左右;柱面镜聚焦方法仅能生成高斯型光片场,限制了其他类型光片场的生成。2008年, Keller等^[12]进一步发展了光束扫描光片显微技术。如图2(b)所示,它用扫描振镜快速扫描激光束,并经过显微物镜聚焦后可生成一个动态虚拟的光片。光束扫描生成光片方法具有以下优点:1)扫描生成的光片场强度分布更均匀;2)激光的能量利用率显著提升,高达95%;3)光束扫描结合激光时空参量调控可以生成不同类型光片场,利用声光调制器调控激光器使得输出的光束强度随时间变化,经过扫描后可以生成条纹结构光片^[10],调控激光的振幅、位相或偏振等空域参量,可以生成贝塞尔光片^[40]、艾里光片^[41]等特殊类型光片场,提升系统的成像性能。基于以上优势,光束扫描生成光片法被应用在很多光片荧光显微成像系统中。此外,一些新的光片生成方法,如利用超构表面生成^[37]光片,正在积极探索之中,它们的突破有望改变光片荧光显微系统构架并拓宽应用。

λ_{in}/NA_{in} , 式中 λ_{in} 为照明光波长, NA_{in} 为照明物镜有效数值孔径)和宽度(瑞利长度: $FOV = 1.78n\lambda_{in}/NA_{in}^2$, 式中 n 为折射率)^[9]会随着柱面镜焦距的增大或照明物镜的数值孔径的减小而增大,较大的观测视场通常以牺牲轴向分辨率和三维层析成像能力为代价,如表1所示。

研究人员通过扫描具有无衍射特性的贝塞尔光

表 1 高斯型光片的视场和光片厚度关系表($n=1.33, \lambda_{\text{ill}}=0.5 \mu\text{m}$)

Table 1 Relation of FOV and thickness of Gaussian light-sheet ($n=1.33, \lambda_{\text{ill}}=0.5 \mu\text{m}$)

FOV / μm	15	50	100	200	300	400
$w_0 / \mu\text{m}$	1.09	1.98	2.80	3.96	4.86	5.61

束、艾里光束等生成如图 3(b)和(c)所示的新型光片场,以解决光片荧光显微系统观测视场与轴向分辨率相互制约的问题。Planchon 等^[15]通过一维扫描传播过程中能维持光束形貌不变的零阶贝塞尔光束生成强度均匀的贝塞尔光片,然而贝塞尔光束的同轴环状旁瓣产生的离焦背景噪声,既降低了成像对比度和系统轴向分辨率,又增大了光漂白和光毒性效应。Fahrbach 等^[42]结合共聚焦技术解决了贝塞尔光片荧光显微成像对比度和轴向分辨率低的问题,然而该方法合成一幅高对比度的二维图像需要拍摄上百幅低对比度的图像,系统的成像速度降低了两个数量级。Olarie 等^[43]利用双光子激发荧光有效抑制了贝塞尔光束旁瓣产生的离焦背景噪声,并保证了系统的成像速度,但高强度超短飞秒光脉冲的光漂白性强且难以进行多色荧光成像。Vettenburg 等^[44]将艾里光片应用到光片荧光显微中,在保证轴向分辨率前提下将视场扩大了 10 倍(视场 $173 \mu\text{m} \times 173 \mu\text{m}$,轴向分辨率 $0.86 \mu\text{m}$),但是艾里光片照明得到的荧光图像必须进行去卷积处理才能真实还原出样品信息。

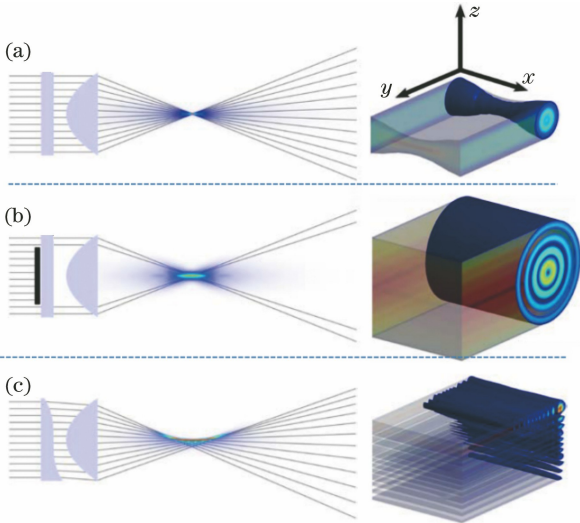


图 3 三种光片对比^[44]。(a)高斯光片;(b)无衍射贝塞尔光片;(c)无衍射艾里光片

Fig. 3 Comparison of three types of light-sheets^[44]. (a) Gaussian light-sheet; (b) nondiffracting Bessel light-sheet; (c) nondiffracting Airy light-sheet

本课题组也开展了基于无衍射光束的光片荧光显微研究,提出了互补光束相减光片荧光显微成像

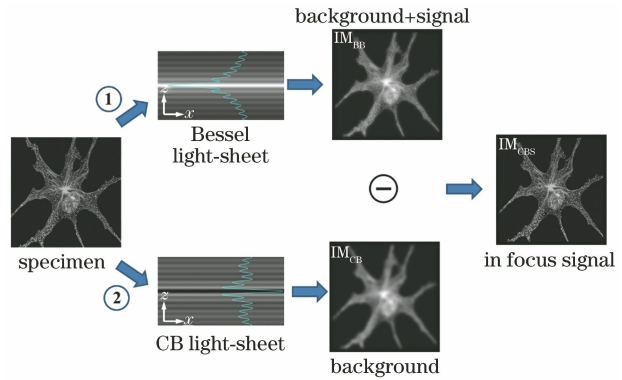


图 4 无衍射互补光束相减光片荧光显微的原理图
Fig. 4 Schematic diagram of non-diffracting complementary beam subtraction LSM

技术(CBS-LSFM)^[29],它的原理如图 4 所示。该方法的核心是设计并实验生成贝塞尔光束的互补光束,该互补光束也具有无衍射特性,可满足大视场成像需求;扫描该光束生成的互补光片中心光强为零,其他位置处强度分布和贝塞尔光片旁瓣强度分布一致^[45]。分别用贝塞尔光片和互补光片照明样品拍摄两幅荧光图像,然后将二者相减,可消除贝塞尔光束旁瓣对成像的影响,从而实现大视场高轴向分辨率成像(视场 $300 \mu\text{m} \times 210 \mu\text{m}$,轴向分辨率 $1 \mu\text{m}$,横向分辨率 $0.45 \mu\text{m}$)。互补光片相减法用于光片荧光显微同时引起其他科研人员的关注和研究^[38,46]。为解决实验系统噪声影响成像质量的问题,我们提出了一种基于压缩感知盲解卷和去噪图像处理^[30]。该方法可同时对荧光图像进行解卷和去噪处理,可有效抑制伪影,将信噪比提高 2 倍,显著提高图像对比度和质量。互补光束相减法需要拍摄两幅荧光图像才能计算出一幅高分辨、高质量的图像,成像速度受到一定限制且会额外增加光剂量。为了解决该问题,利用深度学习进行图像处理,可以直接从传统的贝塞尔光片拍摄的图像计算出与互补光片相减法一致的高质量图片,有效提高了成像速度并降低曝光剂量^[31]。

除了使用无衍射光束外,Dean 等^[47]利用超声调制折射率梯度(TAG)透镜以 200 kHz 的频率沿着光束传播方向高速扫描聚焦光斑,从而间接生成一个细长的“针状”光场,再利用扫描振镜快速扫描生成强度分布均匀的光片场,实现大视场成像。

Zong 等^[21]进一步将该技术应用到双光子光片荧光显微成像中,同时提高了轴向分辨率和成像深度(视场 $200\ \mu\text{m}\times 200\ \mu\text{m}$,轴向分辨率 $0.8\ \mu\text{m}$,横向分辨率 $0.44\ \mu\text{m}$)。Gao 等^[48]开发了平铺拼接光片荧光显微技术,利用铁电液晶空间光调制器控制光片沿着光束传播方向移动,依次拍摄多幅小视场高分辨图像,然后进行图像拼接,从而实现大视场高轴向分辨率成像^[49]。该技术被铂海生物科学仪器(上海)股份有限公司成功商业产品化,并在 2018 年推出了国产高端的商业光片荧光显微镜 Nuohai LS 18。Fei 等^[50]提出了亚体素光片荧光显微技术,通过获取多帧亚体素位移的低分辨率图像,利用极大似然估计重建算法恢复出高分辨的三维图像,在不牺牲空间分辨率的前提下将成像视场扩大了 25 倍。

3.2 超分辨光片荧光显微成像

普通光片荧光显微系统的横向分辨率受到瑞利-阿贝衍射极限的限制,由探测物镜的数值孔径和荧光波长决定,在可见光范围内横向分辨率只能达到约 $200\ \text{nm}$ ^[51-55]。近年来,以光激活定位显微(PALM/STORM)^[56-58]、受激辐射损耗显微(STED)^[59-60]、结构光照明显微(SIM)^[61-62]为代表的超分辨技术飞速发展,光片荧光显微与超分辨技术的有机结合可突破光学衍射极限实现超分辨三维成像。

格光片荧光显微(LLSFM)。光晶格是由几个波矢位于一个圆锥面上的平面波相干叠加生成的具有二维或三维周期性结构的准无衍射光场,如图 5(a)所示。它可以类比为三维结构照明中的明暗条纹,结合结构照明超分辨技术在 NA1.1 探测物镜和 NA0.65 照明物镜组合的光片显微系统中实现 $150\ \text{nm}$ 空间分辨率的超分辨成像。但由于光晶格无法多角度旋转,仅在横平面的一个方向上实现了超分辨成像。Chang 等^[64]提出了相干结构照明光片荧光显微技术(csiLSFM),如图 5(b)所示,利用两束相向传播的激光束干涉形成条纹结构光片场,然后通过改变光束传播方向来旋转条纹结构光片场,在横平面的各个方向上实现了超分辨成像,并将空间分辨率提高到 $100\ \text{nm}$ 。结构照明和光片荧光显微结合,虽然空间分辨率提升受限(线性结构照明超分辨最高能将空间分辨率提高 2 倍),但它适用于绝大部分荧光染料,能对活体样品实现快速超分辨成像。Zanacchi 等^[65]将单分子定位超分辨技术引入到光片荧光显微成像中,将空间分辨率进一步提高到 $60\ \text{nm}$ 。Gustavsson 和 Moerner(因光学超分辨显微的贡献分享了 2014 年诺贝尔化学奖)等^[66]结合双螺旋点扩展函数和单分子定位技术,实现了光片荧光显微的三维超分辨成像(横向定位精度为 $16\ \text{nm}$,轴向定位精度为 $24\ \text{nm}$)。然而单分子定位超分辨需要拍摄大量的图片才能重构出一张超分辨图像,成像速度受到

2014 年,Chen 等^[63]提出了一种全新的技术:晶

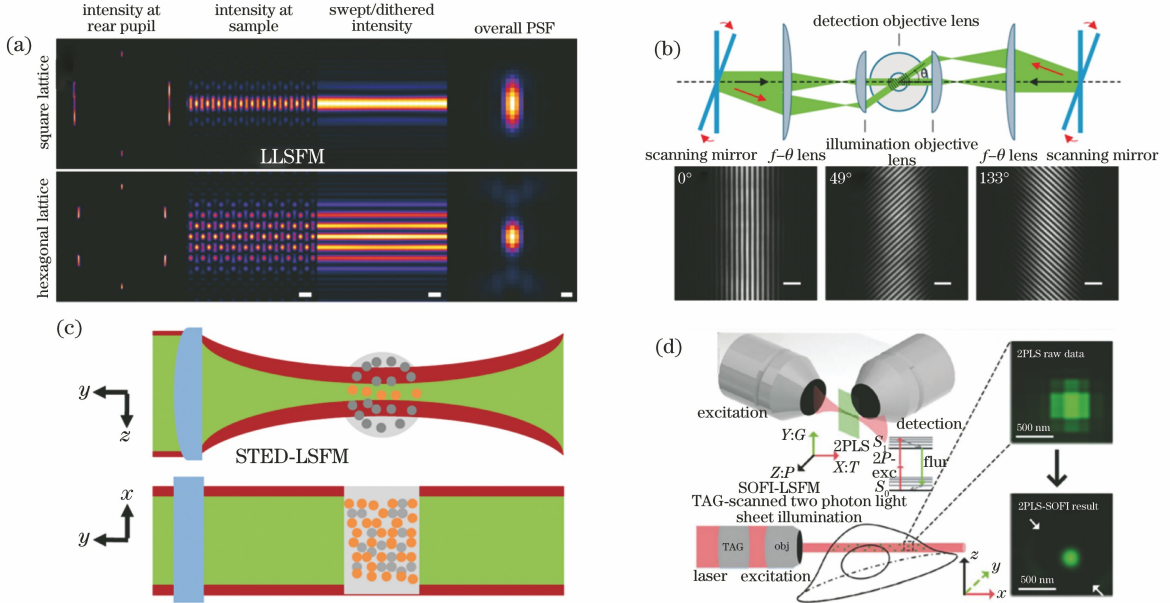


图 5 超分辨光片荧光显微。(a)晶格光片荧光显微^[63];(b)相干结构照明光片荧光显微^[64];
(c)受激辐射损耗光片荧光显微^[67];(d)随机光学涨落成像光片荧光显微^[22]

Fig. 5 Super resolution light-sheet fluorescence microscopy. (a) Lattice LLSFM (LLSFM)^[63]; (b) coherent structured illumination LLSFM^[64]; (c) stimulated emission depletion LLSFM^[67]; (d) stochastic optical fluctuation imaging LLSFM^[22]

了限制。此外,STED和随机光学涨落成像(SOFI)技术也已成功地和光片荧光显微结合^[22,67]。

3.3 提高三维成像速度

除了空间分辨率、观测视场等成像性能之外,成像速度(二维成像速度和三维成像速度)是衡量光片荧光显微性能的另一个非常重要的指标。光片荧光显微系统的二维成像速度主要由相机决定。英国Andor公司的Zyla4.2型、日本滨松公司的Flash4.0型商用SCMOS相机能达到100 frame/s @ 2048 pixle×2048 pixle的全画幅速度,通过设置感兴趣区域(ROD)减少相机使用像素数目可进一步提高速度,如400 frame/s@2048 pixle×512 pixle,1600 frame/s@2048 pixle×128 pixle。光片荧光显微的三维成像速度则受光片和样品相对移动速度、相机速度、硬件同步及数据传输等因素影响。早期的光片荧光显微系统^[5, 68]中光片和探测物镜保持静止不动,电动位移平台载着样品沿探测物镜轴向移动,相机同步拍摄一系列二维荧光图像实现三维成像,具有结构简单、价格便宜的优势。但受限于电动位移平台的移动速度,其三维成像速度较慢(约为10 frame/s),此外机械移动引起样品振动会影响成像质量。为了提高三维成像速度,Holekamp等^[69]提出了如图6(a)所示的物镜耦合平面照明显微技术(OCPIM),显微样品在该系统中保持静止,用移动速度较快的压电位移平台同时沿轴向移动光片和探测物镜进行三维成像,将速度提高到20 frame/s。因机械件将探测物镜和激发装置固定成整体,受压电位移平台承重限制,OCPIM要求激发装置简单轻便,仅适宜于高斯光片,限制

了其他类型光片的生成和使用。受OCPIM启发,科研人员发展了同步扫描移动技术,压电位移平台仅移动探测物镜,扫描振镜沿轴向同步移动光片并保证光片始终位于探测物镜焦平面,相机拍摄样品一系列不同轴向位置处的清晰二维荧光图像实现三维成像,从而将三维成像速度提高到50 frame/s左右^[70-72]。同步扫描移动对系统激发装置的结构和重量无特定要求和限制,方便新型光片场的生成及成像应用。

因压电/电动位移平台性能限制,基于机械移动的三维成像速度很难大幅提升。Fahrbach等^[73]通过在探测物镜和相机之间增加一个高速电动调焦透镜(ETL),通过调节ETL的焦距来改变探测物镜成像面的位置,并利用扫描振镜同步轴向移动光片以保证光片始终位于探测物镜的成像面,无需机械移动即实现了三维成像,将成像速度提高到510 frame/s(30 volume/s)。Olarte等^[74]在探测光路中加入三次相位板(CPM)来扩展系统景深,如图6(b)所示,在较大的空间范围内对样品都能进行较清晰的成像,仅需轴向扫描光片并用相机拍摄样品的一系列二维荧光图像实现三维成像,并将其命名为解耦合照明探测光片荧光显微(DID-LSFM),在ROI的前提下将成像速度提高到1600 frame/s(73 volume/s)。较高的成像速度都以减少相机有效使用像素为代价,会影响系统的观测视场和图像分辨率。此外,系统中引入ETL或CPM,成像放大率会随着成像位置的变化而改变,CPM扩展了景深,拍摄的图像必须经过去卷积才能真实复原,这些都会增加后期图像处理的工作量和难度。

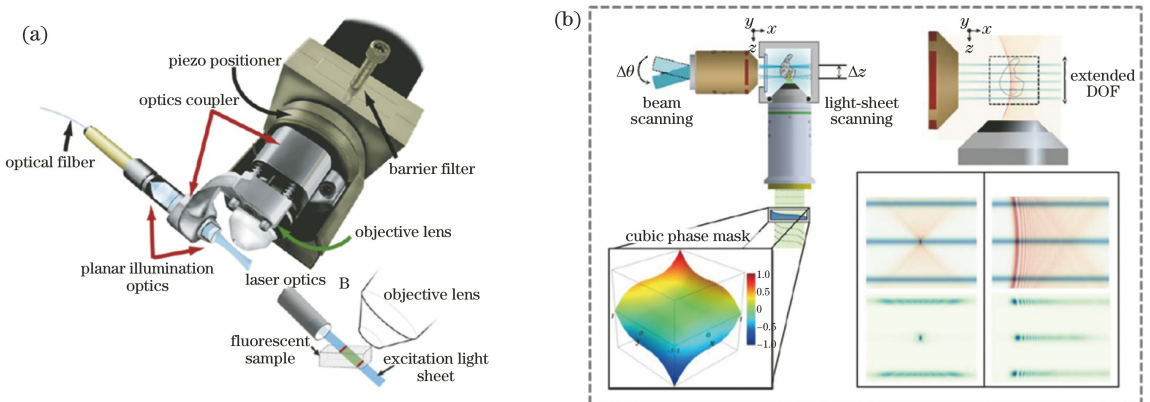


图6 两种用于快速三维成像的光片荧光显微技术。(a)物镜耦合平面照明显微示意图^[69];

(b)解耦合照明探测的光片荧光显微原理图^[74]

Fig. 6 Two kinds of light-sheet fluorescence microscopy for fast three-dimensional imaging. (a) Schematic of the objective-coupled planar illumination microscope^[69]; (b) concept of decoupled illumination detection in LSFM^[74]

3.4 提高成像质量和成像深度

对光学显微特别是三维显微技术而言,除了追求高时空分辨率和大视场,提高成像质量和深度也非常关键。显微系统或样品本身引起的像差会降低图像对比度和信噪比,影响成像质量,因此有必要对像差进行校正。Bourgenot 等^[75]在光片荧光显微的探测光路中增加变形镜,利用自适应光学技术同时校正样品和探测系统引起的像差,校正后成像质量提升效果明显。Wilding 等^[76]用波前探测器测量出光片荧光显微激发系统的像差,并用液晶空间光调制器校正像差来优化光片场的性能,提高了系统的

轴向分辨率和成像质量。光片荧光显微激发系统的像差会影响光片场质量,探测系统和样品引起的像差会影响成像质量,需要同时对激发系统、探测系统和样品本身引起的像差进行全面校正,才能得到优化成像结果。Liu 等^[77]将自适应光学技术引入到晶格光片荧光显微系统中[其光路如图 7(a)所示],分别使用空间光调制器和变形镜,结合双光子导星技术对激发系统、探测系统和样品引起的像差进行校正,实现了多细胞生物组织的亚细胞结构动态高质量成像,如图 7(b)所示。此外,利用各类软硬件方法消除条纹伪影可有效改善半透明样品的三维成像质量^[27,68,78,79]。

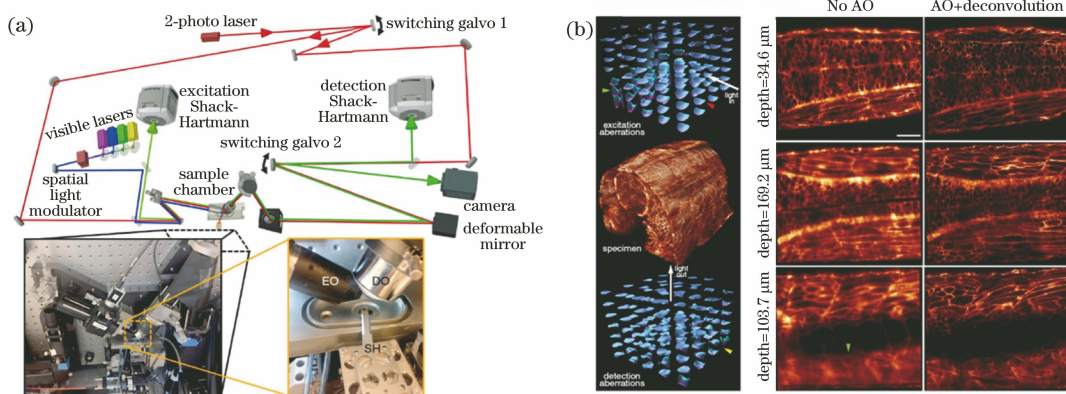


图 7 像差校正提高光片荧光显微成像质量。(a)自适应光学晶格光片荧光显微镜简化光路图;

(b)像差校正前后斑马鱼胚胎脊骨成像结果对比^[77]

Fig. 7 Improving the imaging quality of LSFM by aberration correction. (a) Simplified schematic of adaptive optical lattice light-sheet fluorescence microscopy; (b) imaging results of the spine of a zebrafish embryo before and after aberration correction^[77]

由于内源性色素以及组织内水、蛋白质、脂类等不同物质折射率的差异,生物组织会吸收和散射光,因此生物组织通常不太透明,对组织深部进行高时空分辨率无创三维光学成像具有一定的挑战性。生物组织对近红外光的吸收和散射比可见光弱,因此用近红外超短脉冲激光作为光源的双光子光片荧光显微可提高成像深度^[43,80,81]。Escobet-Montalbán 等^[82]发展的三光子光片荧光显微进一步提高了成像深度,达到 450 μm 。高强度的超短飞秒(皮秒)脉冲激光会增大对样品的光损伤,对比研究^[83]表明:超短激光脉冲照明成像 1 h 后,肿瘤细胞停止有丝分裂,而低功率连续激光照明成像时间可达 24 h。Wang 等^[84]在光片荧光显微系统中用近红外二区(波长 1319 nm)的连续激光作为光源,照明样品激发出中心波长为 1600 nm 的红外荧光信号,用相机拍摄荧光图像实现三维成像,将成像深度提高到 2 mm。低功率连续红外激光提高了成像深度,降低了光损伤,但荧光波长增大会降低空间分辨率。

除了革新和提升光片荧光显微成像系统软硬件外,利用生物化学技术对样品进行前期处理,改善和提高样品光学性能也是一种行之有效的策略。组织透明技术,利用一种或多种化学试剂,通过浸泡、电泳或灌注等处理方法,减少生物组织内部的折射率差异,使得大块组织在视觉或光学显微镜下透明可见^[85]。2007年,Dodt 等^[68]对出生 10 天的幼鼠进行组织透明化处理,结合光片荧光显微成像技术对鼠脑海马区的神经元进行了三维荧光成像。2019年,Gao 等^[86]利用生物组织膨胀技术来提高成像深度和质量,他们通过给果蝇大脑注射凝胶使其体积扩大 8 倍,让脑组织稀疏来降低光散射,然后用光片荧光显微对果蝇的整个大脑实现了亚细胞尺度的三维成像。组织透明化技术的发展让原本不透明的组织、器官甚至完整生物体的光学特性提升,避免传统组织切片技术对样品完整性的机械破坏,结合光片荧光显微实现亚细胞尺度的三维清晰成像,具有革命性意义。

除了克服视场和空间分辨率相互制约的矛盾,提高三维成像速度、深度和成像质量,实现超分辨成像之外,其他一些技术问题也需要关注,如:光片荧光显微成像系统中的样品放置和制备问题。大部分光片荧光显微成像系统需要使用定制的样品池放置显微样品^[5,10,12,63],不利于快速更换显微物镜,且样品的制备比较复杂,对该技术的大规模应用有一定的影响。倒置选择平面照明显微技术^[70](iSPIM)、高度倾斜薄片显微技术^[87](HILO)和横向干涉斜激发光片荧光显微技术^[88](LITE-LSFM)等,可以对标准的显微切片样品进行三维显微成像,在一定程度上解决了样品放置和制备复杂的问题。

4 光片荧光显微的应用

4.1 细胞生物学

分子扩散或动态平衡过程引起的分子空间不均匀分布,对细胞分裂、分化和迁移过程中的核组织和信号传导至关重要。为了充分了解其机制,需要对分子的丰度、扩散系数和相互作用进行追踪和定量测量。Ritter等^[89]利用光片荧光显微镜成功观察并追踪到摇蚊幼虫的唾液腺细胞核中的信使核糖核

蛋白颗粒(mRNP),研究了细胞中 mRNP 颗粒的扩散特性。Capoulade等^[90]结合光片荧光显微和荧光相关谱(FCS)技术,对狗肾和果蝇翅膀细胞核中异染色质蛋白进行了定量荧光成像,测量了活细胞内蛋白质浓度和扩散系数。Wohland等^[91]研究了发育48 h后活斑马鱼胚胎血流中荧光纳米珠的动力学过程,测量了注入到斑马鱼血液循环系统中的纳米荧光微球的扩散系数。

Chen等^[63]利用晶格光片荧光显微镜首次观测到了海拉细胞质中微管细丝的生长动态过程(图8),定量测量了单个微管细丝的生长速度、方向和生长期,为细胞水平上全面理解细胞驱动机制作出了重要贡献。Planchon等^[15]利用基于贝塞尔光束的光片荧光显微可对活细胞中线粒体、丝状伪足、膜褶皱、细胞内囊泡和有丝分裂染色体的动力学特性进行成像和分析。Li等^[92]结合非线性结构照明超分辨和光片荧光显微技术,拍摄了非洲绿猴SV40转化的肾细胞(COS-7)线粒体图像,人骨肉瘤细胞(U2OS)中的肌动蛋白细胞骨架及高尔基体图像。Lorenzo等^[93]用光片荧光显微对多细胞肿瘤球体中有丝分裂进行了三维成像,并研究了抑制有丝分裂药物-紫杉醇对肿瘤细胞有丝分裂的影响。光片荧

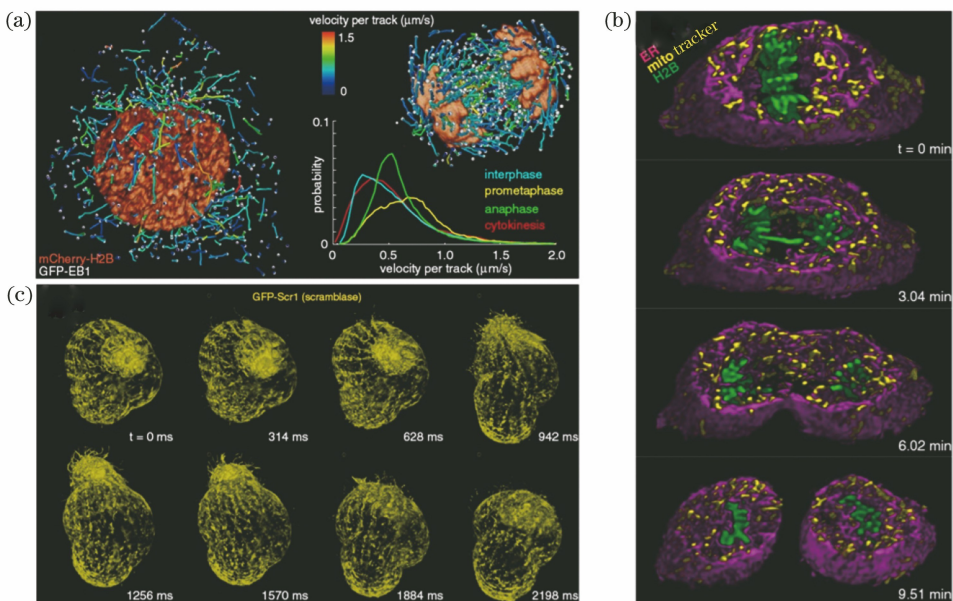


图8 光片荧光显微在细胞生物学中的应用。(a)细胞有丝分裂不同阶段的生长速率分布;(b)组蛋白(绿色)、线粒体(黄色)和内质网(品红色)在有丝分裂期间四个时间点处的3D空间关系;(c)原生动植物嗜热链球菌单个标本在八个连续时间点的体渲染图像^[63]

Fig. 8 Applications of LSFM in cell biology. (a) Distribution of growth rates at different stages of cell mitosis; (b) 3D spatial relationship of histones (green), mitochondria (yellow), and the endoplasmic reticulum (magenta) at four time points during mitosis; (c) volume renderings at eight consecutive time points of a single specimen of the protozoan *T. thermophila*^[63]

光显微用于研究细胞内分子扩散规律与机制、大分子间相互作用、细胞器精细三维结构、细胞有丝分裂、细胞与细胞之间的相互作用等各种生理规律,是细胞生物学研究领域中非常重要显微成像工具^[94]。

4.2 发育生物学

研究生物体从精子和卵子的形成、受精、发育和生长的奥秘,需要对活生物体进行长时间的显微观测,并且要求光学显微镜对生物体的光损伤尽可能低,从而减少对生物体生长发育的影响。与传统落射式荧光显微相比,光片荧光显微具有光损伤低和快速三维层析成像的优势,适宜对发育中的生物体进行长时间显微成像^[19]。Keller等^[12]用扫描光片荧光显微镜对斑马鱼胚胎实现了亚细胞空间分辨率的三维成像,对斑马鱼早期胚胎中所有的细胞进行追踪和重建,实验结果如图9(a)所示,揭示了合子

转录之前,与胚胎轴一致的初始形态动力学对称性断裂。此外,光片荧光显微还用于对果蝇^[5, 81]、秀丽隐杆线虫^[95]等模式动物的胚胎发育过程的长时间三维显微成像。图9(b)为果蝇胚胎发育过程中不同阶段的光片荧光显微成像结果。

除了对模式动物的胚胎进行长时间显微成像,光片荧光显微还能用于研究植物发育,研究植物早期发育过程中从细胞分化形成组织,不同组织构成器官的基本机理^[96-97]。Maizel等^[98]利用光片荧光显微观察了拟南芥根尖和侧根的发育,研究了细胞在器官生长过程中的增殖并追踪了根部单个内体的运动。Lucas等^[99]用光片荧光显微研究了拟南芥侧根的生成,由于细胞分裂和主根生长形成侧根,该研究有效回答了植物发育特别是根系形态变化的原因和机理问题。

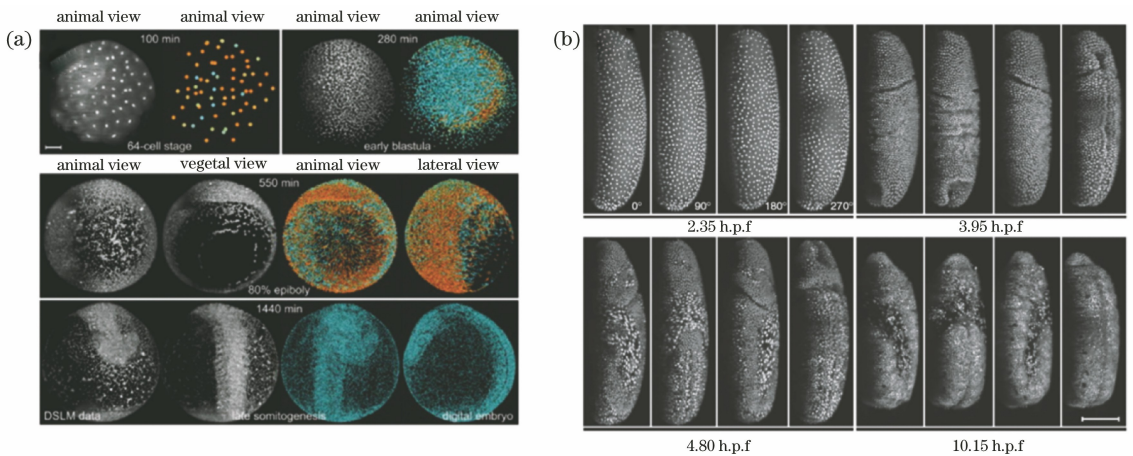


图9 光片荧光显微在发育生物学中的应用。(a)斑马鱼胚胎发育过程不同阶段的光片荧光显微3D图像^[12]; (b)果蝇胚胎发育过程不同阶段的光片荧光显微3D图像^[10]

Fig. 9 Applications of LSFM in developmental biology. (a) LSFM 3D images at different stages during the zebrafish embryonic development^[12]; (b) LSFM 3D images at different stages during the drosophila embryonic development^[10]

4.3 神经科学

在神经科学研究中,用于测量神经元活动的电生理和钙成像技术仅能对大脑中一小部分神经元进行测量,难以研究大脑不同区域的神经元的相互作用。对整个大脑进行细胞或亚细胞尺度分辨率的三维无创显微成像,获取全部神经元的位置、形态和行为信息,有利于研究神经回路进而理解脑内过程和神经机制。光片荧光显微是小型脊椎动物和无脊椎动物全脑成像的出色工具,它可以对脑中所有的神经元进行长时间三维成像并记录分析神经元活动特性,进而回答神经科学研究中的很多问题。Ahrens等^[100]利用光片荧光显微镜以0.8 Hz的频率记录了整个斑马鱼大脑的活动,并以单细胞分辨率捕获了超过80%的神经元。Dodt等^[68]结合光片荧光显微

和组织透明化技术,对鼠脑进行了三维成像,实验结果如图10所示。Silvestri等^[101]将光片荧光显微技术与共聚焦技术相结合来提高成像对比度,获得了具有亚细胞分辨率的宏观鼠脑神经图像。Amat等^[102]利用光片显微技术重建了果蝇早期神经系统的细胞谱系,整理分析了295个神经母细胞的轨迹和分裂信息,并根据细胞分裂的时间和方向信息对四种神经母细胞进行了高精度预测。Gao等^[86]用光片荧光显微镜对果蝇的整个大脑实现了亚细胞尺度的三维成像,观察到了全部10万个神经元,标记了所有多巴胺能神经元,并统计了整个果蝇大脑中存在的突触。这些研究有助于人类理解不同的神经环路如何组成、性别对大脑的影响以及疾病如何破坏大脑。

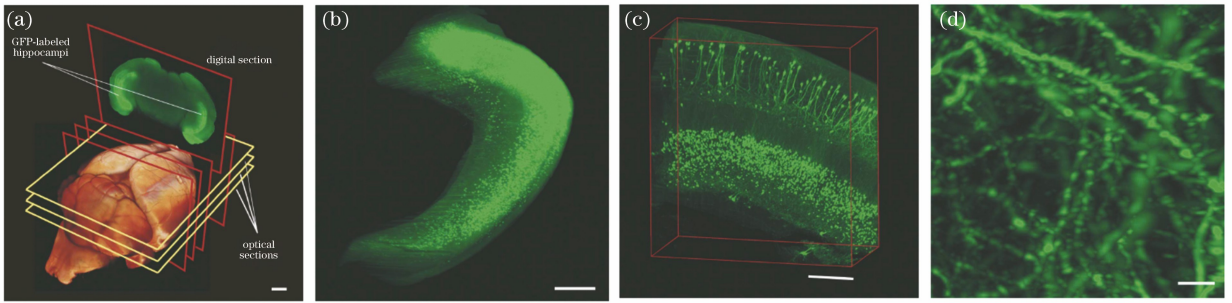


图 10 鼠脑光片荧光显微成像结果^[68]。(a)全脑图像重建结果;(b)切除的全海马区图像;(c)海马区部分图像重建结果;(d)神经元的树突棘。标尺:500 μm

Fig. 10 Mice brain imaging via LSFM^[68]. (a) Image reconstruction of an entire whole mouse brain; (b) images of an excised whole hippocampus; (c) image reconstruction of a specific part of hippocampus; (d) dendritic spines of the neurons. Scale bar: 500 μm

5 结束语

光片荧光显微成像技术具有高空间分辨率、低损伤、快速和三维层析成像的特点,已成功应用于细胞生物学、发育生物学和神经科学等领域,是活体生物样品长时间三维成像的理想工具。光片荧光显微成像技术近二十年快速发展,但在以下方面还有进一步改进的空间:1)系统硬件的改进升级对光片荧光显微的性能的提升具有很大的促进。如使用高功率稳定的激光光源,更快速高灵敏度的大面阵探测器,高刷新频率的空间光调制器,成像性能更好的物镜等;2)新的成像理论和技术的革新与发展。采用空间光场调控技术设计生成性能优异或与样品关联的智能化光片,控制系统的点扩展函数和全面校正像差等,新的超分辨技术与光片显微结合,图像处理过程中使用压缩感知和深度学习计算机技术,光学显微与电子显微以及其他成像技术的有机结合,实现跨尺度多模态成像等;3)生化技术改进荧光样品制备。开发使用更高效更稳定的荧光染料,更方便快捷的组织透明化技术和组织膨胀技术应用和推广;4)光片荧光显微技术商业推广和大规模应用,与终端用户深入沟通交流,设计供应用户操作简单、维护方便、系统稳定以及价格控制的产品,促进技术的大规模商业推广与应用进而反哺显微技术的发展,为人们探索生命的奥秘提供更有利的工具。

参 考 文 献

[1] Stephens D J. Light microscopy techniques for live cell imaging[J]. *Science*, 2003, 300(5616): 82-86.
 [2] Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy

[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2010, 190(2): 165-175.
 [3] Qian J, Lei M, Dan, et al. Full-color structured illumination optical sectioning microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14513.
 [4] Brakenhoff G J, van der Voort H T M, van Spronsen E A, et al. Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy [J]. *Nature*, 1985, 317(6039): 748-749.
 [5] Huisken J. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy [J]. *Science*, 2004, 305(5686): 1007-1009.
 [6] Voie A H, Burns D H, Spelman F A. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens[J]. *Journal of Microscopy*, 1993, 170(3): 229-236.
 [7] Strobl F, Schmitz A, Stelzer E H K. Improving your four-dimensional image: traveling through a decade of light-sheet-based fluorescence microscopy research[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(6): 1103-1109.
 [8] Reynaud E G, Peychl J, Huisken J, et al. Guide to light-sheet microscopy for adventurous biologists [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 30-34.
 [9] Olarte O E, Andilla J, Gualda E J, et al. Light-sheet microscopy: a tutorial[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2018, 10(1): 111-179.
 [10] Keller P J, Schmidt A D, Santella A, et al. Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet - based structured-illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(8): 637-642.
 [11] Verveer P J, Swoger J, Pampaloni F, et al. High-

- resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet - based microscopy[J]. Nature Methods, 2007, 4(4): 311-313.
- [12] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, et al. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy[J]. Science, 2008, 322(5904): 1065-1069.
- [13] Stelzer E H K. Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology[J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 23-26.
- [14] Engelbrecht C J, Stelzer E H. Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (SPIM)[J]. Optics Letters, 2006, 31(10): 1477-1479.
- [15] Planchon T A, Gao L, Millie D E, et al. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination[J]. Nature Methods, 2011, 8(5): 417-423.
- [16] Vladimirov N, Mu Y, Kawashima T, et al. Light-sheet functional imaging in fictively behaving zebrafish[J]. Nature Methods, 2014, 11(9): 883-884.
- [17] Tomer R, Lovett-Barron M, Kauvar I, et al. SPED light sheet microscopy: fast mapping of biological system structure and function[J]. Cell, 2015, 163(7): 1796-1806.
- [18] Chang B J, Kittisopikul M, Dean K M, et al. Universal light-sheet generation with field synthesis[J]. Nature Methods, 2019, 16(3): 235-238.
- [19] Huisken J, Stainier D Y R. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology[J]. Development, 2009, 136(12): 1963-1975.
- [20] Yang Y L, Zong W J, Wu R L, et al. Light-sheet fluorescence microscopy [J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(3): 0318007.
杨豫龙, 宗伟建, 吴润龙, 等. 光片荧光显微成像[J]. 光学学报, 2017, 37(3): 0318007.
- [21] Zong W J, Zhao J, Chen X Y, et al. Large-field high-resolution two-photon digital scanned light-sheet microscopy[J]. Cell Research, 2015, 25(2): 254-257.
- [22] Chen X Z, Zong W J, Li R Q, et al. Two-photon light-sheet nanoscopy by fluorescence fluctuation correlation analysis [J]. Nanoscale, 2016, 8(19): 9982-9987.
- [23] Yu B, Yu J, Li W H, et al. Nanoscale three-dimensional single particle tracking by light-sheet based double-helix point spread function microscopy [J]. Applied Optics, 2016, 55(3): 449-453.
- [24] Yang Z, Mei L, Xia F, et al. Dual-slit confocal light sheet microscopy for in vivo whole-brain imaging of zebrafish [J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(5): 1797-1811.
- [25] Xie X L, Chen R, Zhao Y X, et al. Combination light-sheet illumination with super-resolution three-dimensional fluorescence microimaging [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(3): 0307006.
谢新林, 陈蓉, 赵宇轩, 等. 结合光片照明与超分辨的三维荧光显微成像[J]. 中国激光, 2018, 45(3): 0307006.
- [26] Guan Z Y, Lee J, Jiang H, et al. Compact plane illumination plugin device to enable light sheet fluorescence imaging of multi-cellular organisms on an inverted wide-field microscope [J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(1): 194-208.
- [27] Liang X, Zang Y L, Dong D, et al. Stripe artifact elimination based on nonsubsampled contourlet transform for light sheet fluorescence microscopy [J]. Journal of Biomedical Optics, 2016, 21(10): 106005.
- [28] Wu D, Zhou X, Yao B L, et al. Fast frame scanning camera system for light-sheet microscopy [J]. Applied Optics, 2015, 54(29): 8632-8636.
- [29] Jia H, Yu X H, Yang Y L, et al. Axial resolution enhancement of light-sheet microscopy by double scanning of Bessel beam and its complementary beam [J]. Journal of Biophotonics, 2019, 12(1): e201800094.
- [30] Bai C, Liu C, Jia H, et al. Compressed blind deconvolution and denoising for complementary beam subtraction light-sheet fluorescence microscopy [J]. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2019, 66(10): 2979-2989.
- [31] Bai C, Liu C, Yu X H, et al. Imaging enhancement of light-sheet fluorescence microscopy via deep learning [J]. IEEE Photonics Technology Letters, 2019, 31(22): 1803-1806.
- [32] Li R Z, Zhou X, Wu D, et al. Selective plane illumination microscopy with structured illumination based on spatial light modulators [C]//SPIE BiOS. Proc SPIE 8949, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXI, San Francisco, California, USA, 2014, 8949: 89491S.
- [33] Zhang Q, Liang D, Bai L H, et al. Long-time

- stabilization imaging by light sheet fluorescent microscope[J]. Chinese Journal of Lasers, 2019, 46(4): 0407001.
- 张球, 梁东, 白丽华, 等. 光片荧光显微镜长时间的稳定成像[J]. 中国激光, 2019, 46(4): 0407001.
- [34] Zhang C H, Sun W Q, Mu Q Q, et al. Analysis of aberrations and performance evaluation of adaptive optics in two-photon light-sheet microscopy [J]. Optics Communications, 2019, 435: 46-53.
- [35] Xu H, Zhang Y H, Zhang X, et al. Airy beam light sheet microscopy with deconvolution [J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(3): 0318012.
- 徐豪, 张运海, 张欣, 等. 结合去卷积的艾里光束片状光显微成像研究[J]. 光学学报, 2017, 37(3): 0318012.
- [36] Le V, Wang X N, Kuang C F, et al. Axial resolution enhancement for light sheet fluorescence microscopy via using the subtraction method [J]. Optical Engineering, 2018, 57(10): 1.
- [37] Shi F H, Qiu M, Zhang L, et al. Multiplane illumination enabled by Fourier-transform metasurfaces for high-speed light-sheet microscopy [J]. ACS Photonics, 2018, 5(5): 1676-1684.
- [38] Deng S H, Xiao Y P, Hu J, et al. Sidelobe suppression in light-sheet fluorescence microscopy with Bessel beam plane illumination using subtractive imaging [J]. Chinese Optics Letters, 2018, 16(11): 111801.
- [39] Gao L, Tang W C, Tsai Y C, et al. Lattice light sheet microscopy using tiling lattice light sheets[J]. Optics Express, 2019, 27(2): 1497-1506.
- [40] Gao L, Shao L, Chen B C, et al. 3D live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy [J]. Nature Protocols, 2014, 9(5): 1083-1101.
- [41] Nylk J, McCluskey K, Aggarwal S, et al. Enhancement of image quality and imaging depth with Airy light-sheet microscopy in cleared and non-cleared neural tissue [J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(10): 4021-4033.
- [42] Fahrbach F O, Rohrbach A. Propagation stability of self-reconstructing Bessel beams enables contrast-enhanced imaging in thick media [J]. Nature Communications, 2012, 3: 632.
- [43] Olarte O E, Licea-Rodriguez J, Palero J A, et al. Image formation by linear and nonlinear digital scanned light-sheet fluorescence microscopy with Gaussian and Bessel beam profiles [J]. Biomedical Optics Express, 2012, 3(7): 1492-1505.
- [44] Vettenburg T, Dalgarno H I C, Nylk J, et al. Light-sheet microscopy using an Airy beam [J]. Nature Methods, 2014, 11(5): 541-544.
- [45] Jia H, Yu X H, Yang Y L, et al. Construction and optimization of the complementary beam of Bessel beam [J]. Acta Photonica Sinica, 2018, 47(7): 0708002.
- 贾昊, 于湘华, 杨延龙, 等. 贝塞尔光束的互补光束设计与优化 [J]. 光子学报, 2018, 47(7): 0708002.
- [46] Deng S H, Wang P, Zhang Y L, et al. Subtraction method via phase mask enables contrast enhancement in scanned Bessel light-sheet microscopy [J]. Journal of the Optical Society of America A, 2020, 37(1): 84-88.
- [47] Dean K M, Fiolka R. Uniform and scalable light-sheets generated by extended focusing [J]. Optics Express, 2014, 22(21): 26141-26152.
- [48] Gao L. Extend the field of view of selective plan illumination microscopy by tiling the excitation light sheet [J]. Optics Express, 2015, 23(5): 6102-6111.
- [49] Fu Q Y, Martin B L, Matus D Q, et al. Imaging multicellular specimens with real-time optimized tiling light-sheet selective plane illumination microscopy [J]. Nature Communications, 2016, 7: 11088.
- [50] Fei P, Nie J, Lee J, et al. Subvoxel light-sheet microscopy for high-resolution high-throughput volumetric imaging of large biomedical specimens [J]. Advanced Photonics, 2019, 1(1): 1-13.
- [51] Yao B L, Lei M, Xue B, et al. Progress and applications of high-resolution and super-resolution optical imaging in space and biology [J]. Acta Photonica Sinica, 2011, 40(11): 1607-1618.
- 姚保利, 雷铭, 薛彬, 等. 高分辨和超分辨光学成像技术在空间和生物中的应用 [J]. 光子学报, 2011, 40(11): 1607-1618.
- [52] Schulz O, Pieper C, Clever M, et al. Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(52): 21000-21005.
- [53] Hell S W. Microscopy and its focal switch [J]. Nature Methods, 2009, 6(1): 24-32.
- [54] Fu Y, Wang T L, Zhao S. Imaging principles and

- applications of super-resolution optical microscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56 (24): 240002.
- 付芸, 王天乐, 赵森. 超分辨光学显微的成像原理及应用进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56 (24): 240002.
- [55] Zeng Z P. Fluorescence fluctuation-based super-resolution nanoscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(3): 0307009.
- 曾志平. 基于荧光随机涨落的超分辨显微成像[J]. *中国激光*, 2018, 45(3): 0307009.
- [56] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313 (5793): 1642-1645.
- [57] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [58] An S, Ziegler K F, Zhang P Y, et al. Axial plane single-molecule super-resolution microscopy of whole cells[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(1): 461-479.
- [59] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [60] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [61] Schermelleh L, Carlton P M, Haase S, et al. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy [J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1332-1336.
- [62] Dan D, Lei M, Yao B L, et al. DMD-based LED-illumination Super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1116.
- [63] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution [J]. *Science*, 2014, 346(6208): 1257998.
- [64] Chang B J, Perez Meza V D, Stelzer E H K. CsiLSFM combines light-sheet fluorescence microscopy and coherent structured illumination for a lateral resolution below 100 nm[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(19): 4869-4874.
- [65] Zanicchi F C, Lavagnino Z, Perrone Donnorso M, et al. Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples [J]. *Nature Methods*, 2011, 8 (12): 1047-1049.
- [66] Gustavsson A K, Petrov P N, Lee M Y, et al. 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 123.
- [67] Friedrich M, Gan Q, Ermolayev V, et al. STED-SPIM: stimulated emission depletion improves sheet illumination microscopy resolution [J]. *Biophysical Journal*, 2011, 100(8): L43-L45.
- [68] Dodt H U, Leischner U, Schierloh A, et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain [J]. *Nature Methods*, 2007, 4(4): 331-336.
- [69] Holekamp T F, Turaga D, Holy T E. Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy[J]. *Neuron*, 2008, 57(5): 661-672.
- [70] Wu Y, Ghitani A, Christensen R, et al. Inverted selective plane illumination microscopy (iSPIM) enables coupled cell identity lineaging and neurodevelopmental imaging in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (43): 17708-17713.
- [71] Kumar A, Wu Y C, Christensen R, et al. Dual-view plane illumination microscopy for rapid and spatially isotropic imaging [J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(11): 2555-2573.
- [72] Wu Y C, Wawrzusins P, Senseney J, et al. Spatially isotropic four-dimensional imaging with dual-view plane illumination microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(11): 1032-1038.
- [73] Fahrbach F O, Voigt F F, Schmid B, et al. Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens [J]. *Optics Express*, 2013, 21(18): 21010-21026.
- [74] Olarte O E, Andilla J, Artigas D, et al. Decoupled illumination detection in light sheet microscopy for fast volumetric imaging [J]. *Optica*, 2015, 2(8): 702-705.
- [75] Bourgenot C, Saunter C D, Taylor J M, et al. 3D adaptive optics in a light sheet microscope [J]. *Optics Express*, 2012, 20(12): 13252-13261.
- [76] Wilding D, Pozzi P, Soloviev O, et al. Adaptive

- illumination based on direct wavefront sensing in a light-sheet fluorescence microscope [J]. *Optics Express*, 2016, 24(22): 24896-24906.
- [77] Liu T L, Upadhyayula S, Milkie D E, et al. Observing the cell in its native state: Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms[J]. *Science*, 2018, 360(6386): eaaq1392.
- [78] Liu Y, Lauderdale J D, Kner P. Stripe artifact reduction for digital scanned structured illumination light sheet microscopy[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(10): 2510-2513.
- [79] Preibisch S, Saalfeld S, Schindelin J, et al. Software for bead-based registration of selective plane illumination microscopy data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(6): 418-419.
- [80] Fahrbach F O, Gurchenkov V, Alessandri K, et al. Light-sheet microscopy in thick media using scanned Bessel beams and two-photon fluorescence excitation [J]. *Optics Express*, 2013, 21(11): 13824-13839.
- [81] Truong T V, Supatto W, Koos D S, et al. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(9): 757-760.
- [82] Escobet-Montalbán A, Gasparoli F M, Nylk J, et al. Three-photon light-sheet fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 2018, 43(21): 5484-5487.
- [83] Andilla J, Jorand R, Olarte O E, et al. Imaging tissue-mimic with light sheet microscopy: a comparative guideline[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44939.
- [84] Wang F F, Wan H, Ma Z R, et al. Light-sheet microscopy in the near-infrared II window [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(6): 545-552.
- [85] Wang P X, Zhang D, Shang A J, et al. Organizational transparency technology[J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2016, 32(1): 124-128. 王培新, 张丹, 尚爱加, 等. 组织透明技术[J]. *神经解剖学杂志*, 2016, 32(1): 124-128.
- [86] Gao R X, Asano S M, Upadhyayula S, et al. Cortical column and whole-brain imaging with molecular contrast and nanoscale resolution [J]. *Science*, 2019, 363(6424): 8302.
- [87] Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(2): 159-161.
- [88] Fadero T C, Gerbich T M, Rana K, et al. LITE microscopy: Tilted light-sheet excitation of model organisms offers high resolution and low photobleaching[J]. *Journal of Cell Biology*, 2018, 217(5): 1869-1882.
- [89] Ritter J G, Veith R, Veenendaal A, et al. Light sheet microscopy for single molecule tracking in living tissue[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11639.
- [90] Capoulade J, Wachsmuth M, Hufnagel L, et al. Quantitative fluorescence imaging of protein diffusion and interaction in living cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(9): 835-839.
- [91] Wohland T, Shi X K, Sankaran J, et al. Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments [J]. *Optics Express*, 2010, 18(10): 10627-10641.
- [92] Li D, Betzig E. Response to comment on “extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics” [J]. *Science*, 2016, 352(6285): 527.
- [93] Lorenzo C, Frongia C, Jorand R, et al. Live cell division dynamics monitoring in 3D large spheroid tumor models using light sheet microscopy[J]. *Cell Division*, 2011, 6(1): 22.
- [94] Chatterjee K, Pratiwi F W, Wu F C M, et al. Recent progress in light sheet microscopy for biological applications [J]. *Applied Spectroscopy*, 2018, 72(8): 1137-1169.
- [95] Gao L, Shao L, Higgins C D, et al. Noninvasive imaging beyond the diffraction limit of 3D dynamics in thickly fluorescent specimens[J]. *Cell*, 2012, 151(6): 1370-1385.
- [96] Ovečka M, Vaškebová L, Komis G, et al. Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy [J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(8): 1234-1247.
- [97] Wu J, Li J, Chan R K Y. A light sheet based high throughput 3D-imaging flow cytometer for phytoplankton analysis [J]. *Optics Express*, 2013, 21(12): 14474-14480.
- [97] Wu J L, Li J P, Chan R K Y. A light sheet based high throughput 3D-imaging flow cytometer for phytoplankton analysis[J]. *Optics Express*, 2013, 21(12): 14474-14480.
- [98] Maizel A, von Wangenheim D, Federici F, et al. High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy [J]. *The Plant Journal*,

- 2011, 68(2): 377-385.
- [99] Lucas M, Kenobi K, von Wangenheim D, et al. Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110 (13): 5229-5234.
- [100] Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, et al. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy [J]. Nature Methods, 2013, 10(5): 413-420.
- [101] Silvestri L, Bria A, Sacconi L, et al. Confocal light sheet microscopy: micron-scale neuroanatomy of the entire mouse brain [J]. Optics Express, 2012, 20 (18): 20582-20598.
- [102] Amat F, Lemon W, Mossing D P, et al. Fast, accurate reconstruction of cell lineages from large-scale fluorescence microscopy data [J]. Nature Methods, 2014, 11(9): 951-958.