

精准光遗传学的关键技术及进展

王一帆^{1,3}, 郑瑶^{1,3}, 朱玥^{1,3}, 徐晓滨^{2,3}, 龚薇^{2,3**}, 斯科^{1,2,3*}

¹浙江大学光电科学与工程学院, 浙江 杭州 310027;

²浙江大学脑科学与脑医学学院, 浙江 杭州 310058;

³浙江大学教育部脑与脑机融合前沿科学中心, 浙江 杭州 310058

摘要 光遗传学采用光学手段对大脑神经活动进行调控, 为神经科学研究提供重要技术手段, 促进了当代神经科学里程碑式的发展。由于光在生物组织中的非侵入穿透深度极其有限, 传统光遗传学一般采用损伤性植入光纤的方式, 导致光刺激的空间精度无法保证。近年来, 随着光学技术的进步, 精准光遗传学逐渐兴起。精准光遗传学一般采用具备深穿透能力、高时空分辨率的光学系统, 具有单细胞精度的神经调控能力和亚细胞精度的神经元集群活动实时检测能力。从技术原理、光路构建和系统优化等几个方面对精准光遗传学研究进行分析和讨论, 最后讨论精准光遗传学研究中的技术局限和可能的解决方案, 并展望精准光遗传学技术的未来发展方向和应用场景。

关键词 成像系统; 光遗传学; 脑科学; 自适应光学; 机器学习; 相位共轭; 靶向调控

中图分类号 R318.51

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0800001

Key Technologies and Progress of Precision Optogenetics

Wang Yifan^{1,3}, Zheng Yao^{1,3}, Zhu Yue^{1,3}, Xu Xiaobin^{2,3}, Gong Wei^{2,3**}, Si Ke^{1,2,3*}

¹College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China;

²School of Brain Science and Brain Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China;

³MOE Frontier Science Center for Brain Science and Brain-Machine Integration, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

Abstract Optogenetics uses optical technologies to control brain neural activity, providing important techniques and developing contemporary neuroscience. Because the noninvasive penetration depth of light is restricted in biological tissue, traditional optogenetics implants an invasive optical fiber, resulting in the inability to guarantee the spatial precision of light stimulation. Recently, with the advancement of optical technology, precision optogenetics has gradually emerged. Precision optogenetics primarily uses a deep-penetration optical system with a high spatiotemporal resolution, single-cell precision neuromodulation capabilities, and real-time detection capabilities for subcellular precision neuronal cluster activity. In this study, we analyzed and discussed the technical principles, optical path construction, and system optimization of precision optogenetics. Finally, we look forward to the future developments and applications of precision optogenetics by discussing the technical limitations and possible solutions.

Key words imaging systems; optogenetics; neuroscience; adaptive optics; machine learning; phase conjugation; targeting-regulation

收稿日期: 2021-08-05; 修回日期: 2021-08-31; 录用日期: 2021-10-13

基金项目: 国家自然科学基金(61735016)

通信作者: *kesi@zju.edu.cn; **weigong@zju.edu.cn

1 引言

光遗传学的出现,为神经科学的研究开辟了新的研究方向。光遗传学是一种整合了光学和遗传学的技术,通过遗传学手段改造光敏感蛋白靶向神经元,并通过光学手段改变这些光敏感蛋白功能,进而影响神经活动。在光遗传学出现之前,电生理一直作为研究神经环路与行为或疾病关联的主要技术手段。电生理学在大脑神经环路研究中一直通过插入电极探测神经活动,在本质上是一种侵入性技术。然而,当需要细胞特异性识别或多细胞检测时,基于电极的方法非常困难^[1]。光遗传学则为研究大脑神经活动提供了新的工具,基于光可以对神经元活动进行非侵入性的读取和操控,并且可以灵活、快速、精确地定位到特定的神经元集群,选择性监测或者调控神经元^[2-4]。多种发光波长的钙指示剂^[5]或电压传感器^[6]被陆续开发出来,叠加各种时间分辨率的失活特性,为光遗传学的研究提供了强大的工具基础;同时,基于先进光学系统的神经活动光调控方法也为神经环路与神经性疾病研究乃至脑科学领域研究开辟了全新的研究范式。

光调控神经元的实现方式是照射表达光敏感蛋白的神经元^[7]。基于扩展光源^[8-12]或者光纤^[13-16]的单光子宽场光刺激装置在研究投射与特定行为相关环路^[13, 17-19]、呼吸调节^[20-21]、局部神经环路活动^[13, 22]、病理与治疗的神经元环路^[23-24]、视网膜功能^[25-26]等领域中发挥着重大作用。但是宽场照明的光激活范围大,无法选择性激活某几个神经元,在探究大脑中精细神经元集群功能时受到空间尺度上的限制,比如行为活动与哪个脑区的哪些神经元直接关联、是否存在足以影响特定行为的神经集群、神经元或神经元集群之间信息传递的时序是怎样的等,探究这些问题时需要将光调控的空间范围缩小到单个神经元。单细胞分辨水平的光遗传学被称为精准光遗传学^[27-29]。精准光遗传学能够靶向调控目标神经元且不照射到周围的邻近细胞,因此精准光遗传学需要依靠高时空分辨率光学系统实现。

高时空分辨率光学系统使用散射补偿技术或者长波光源克服组织散射,可以实现在生物组织内部近衍射极限的聚焦。在过去的几年中,出现了两类用于精准光遗传学研究的光学系统,分别为精准光聚焦单光子光遗传学系统和双光子光遗传学系统。由于短波光束受生物组织散射影响严重,因此

单光子光遗传学系统在生物组织内部精准聚焦时需要依赖散射补偿技术。常见的散射补偿技术包括传输矩阵、相位共轭技术和机器学习辅助的自适应光学等,这些方法的出现使得短波光束在生物组织中的聚焦深度和聚焦精度得到巨大的提升,并在神经元激活的实验中得到了有效验证^[30-31]。双光子光遗传学利用双光子效应实现光激活,通常使用近红外飞秒激光作为光源^[32],仅在聚焦光斑光强最集中的中心位置实现双光子效应,因此能够穿透生物组织形成近衍射极限的极小作用区域。与单光子光遗传学相比,双光子光遗传学技术天然地具有在体精准光激活的优势。两种常见的双光子光靶向策略为串行扫描和并行图案刺激,这两种双光子刺激方案均能实现活体的单细胞精度光靶向调控,在研究神经元集群功能的相关领域中发挥了重要作用。

本文对以上提出的高时空分辨率光学系统实现方法进行详细介绍,阐述它们的基本原理、实现方案和应用局限,并列举基于这些系统的精准光遗传学在神经科学领域的应用案例。最后讨论精准光遗传学研究中的技术局限和解决方案,展望精准光遗传学技术的发展方向。

2 高时空分辨率光学系统

在真空中,光可以很容易地实现近衍射极限的精准聚焦。然而,哺乳动物大脑是一个高度复杂的器官,即使是小鼠的大脑皮层也有将近 1 mm 的厚度,海马、丘脑等深脑区核团更是深达 3~5 mm^[33]。由于不透明的脑组织中存在脂肪组织、纤维组织以及其他软组织,光束在传播过程中存在米氏散射和瑞利散射^[34],散射光强度与波长为负相关关系。单光子光遗传学系统为短波光束激发,在进行大脑神经活动研究中受脑组织的散射影响严重,它的精准聚焦依赖散射补偿技术。双光子光遗传学系统普遍为近红外光激发,对散射不敏感,因此对双光子光遗传学系统的研究重点在于多种激活模式的开发。

2.1 精准光聚焦单光子光遗传学系统

生物组织是一种高散射介质,各向异性会导致光传输时发生多重散射,出射光场呈现散斑形状。当光在生物组织中传播一段距离后,传播方向和相位信息会随着生物组织微观尺度上折射率的不均匀而随机变化。其中,单光子光遗传学系统所用光源波长较短,受组织散射更为严重,导致单光子技

术在精准光遗传学中的应用受到了阻碍。因此散射补偿方法是突破上述问题的重要手段。

2.1.1 传输矩阵

传输矩阵是一种能够全面、准确地表征光学系统成像能力和成像指标的方式。如果能够计算出散射介质的传输矩阵,就可以相应地改变输入光的分布,在成像面上得到期望的输出结果。

对于稳定的散射介质,输入光场 E_{in} 和输出光场 E_{out} 可以由传输矩阵联系起来,表达式^[35]为

$$E_{in} = T * E_{out} \quad (1)$$

传输矩阵 T 能够线性地表征入射光和出射光的关系,通过测量散射介质的传输矩阵,利用传输矩阵的逆矩阵或者时间反演算法^[36]便可以实现散射光的聚焦。传输矩阵法在精准光遗传中有着不可替代的作用,对于特定的散射介质,只需对其进行一次计算,便可以根据目标聚焦点的变化调制入射光场,实现不同位点的聚焦。

散射介质的传输矩阵主要测量方式分为两种,分别为干涉测量法^[35]和倾斜测量法^[37]。干涉测量法首次由法国科学家 Popoff 等^[35]提出,该方法基于空间光调制器(SLM)和全场干涉测量,利用 SLM 调制区域使入射光分为参考光和调制光两部分,并

发生干涉,利用四步相移法计算出出射光场,进而计算出散射介质的传输矩阵。在此系统中,激光由空间光调制器调制并反射,相位调制光束聚焦于散射介质中,输出强度散斑由相机成像,传输矩阵 T 对应于散射样本和 SLM 和 CCD 相机之间的光学系统组成的系统,图 1(a)所示。干涉测量法证明了这个矩阵的统计特性与随机矩阵理论保持很好一致,并且允许光通过随机介质进行聚焦和成像,为复杂介质的介观性质提供重要的见解。倾斜测量法是 Kim 等^[37]提出的,在系统中激光首先被分光棱镜分为两束光,其中一束(样品束)通过样品继续传输,另一束(参考束)仅在自由空间中传输。两束光被另一个分光棱镜合束,在相机上形成干涉图像。对干涉图像进行处理,获得样品光束的振幅和相位图。空间光调制器用于改变样本光束波前,使之在样本中聚焦。其中双轴振镜、空间光调制器、物镜入瞳和相机都位于彼此的共轭平面上。入射光以不同角度入射形成散斑,离轴散斑相互干涉,可以测量散射介质的传输矩阵,光路如图 1(b)所示。倾斜测量法可以在高度无序介质中单个传输通道实现散射补偿,并且证明了在一定程度上散射介质能够提高成像系统的数值孔径。

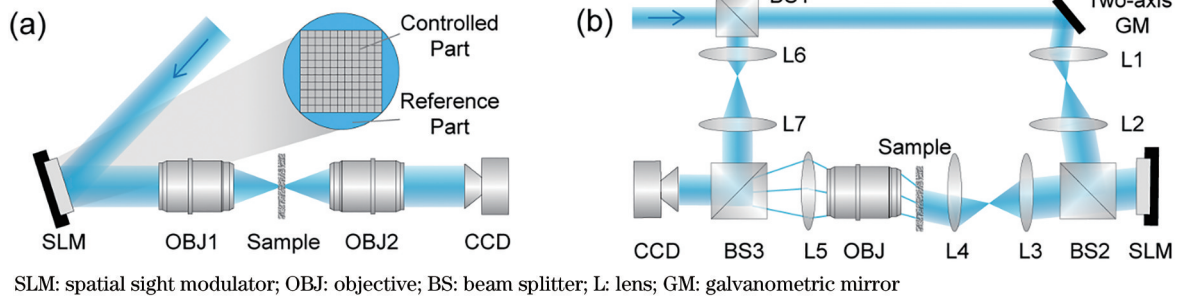


图 1 用于传输矩阵测量的光路系统图。(a)干涉测量法测量光束传输矩阵^[35];(b)倾斜测量法测量光束传输矩阵^[37]

Fig. 1 Diagrams of the optical system used for transmission matrix measurement. (a) Interferometry to measure the beam transmission matrix^[35]; (b) tilt measurement method to measure the beam transmission matrix^[37]

除了传输矩阵的计算方式以外,光路系统的优化和算法的改进可以进一步扩大传输矩阵补偿介质散射的应用范围。美国 Colorado 大学的 Conkey 等^[38]利用微电子机械技术中的数字可变形镜器件(DMD)实现计算机生成全息图,在 33.8 ms 内测量了具有 256 种输入模式和单一输出模式的传输矩阵。由于 DMD 可以在高数据速率下更新,这种方法提高了对光学传输矩阵的测量效率,对利用散射介质的传输矩阵实现聚焦和成像具有推动作用。di Leonardo 等^[39]将多模光纤当作散射介质,证明了

利用空间光调制器塑造输入光束的波前可以在多模光纤的输出端产生结构光强模式,并且只要取对应的纯相位全息图的复叠加的辐角,输出强度就可以很容易地叠加。补偿多模光纤的散射为研究光纤植入下清醒自由活动的小鼠的精准光遗传学奠定了基础。2020 年, Luo 等^[40]提出一种针对散射介质的二值化传输矩阵计算方法,该方法利用 DMD 对入射光进行二值振幅调制,可以实现透过散射介质的任意位置聚焦,扩展了基于传输矩阵的精准光遗传学的生物应用范围,能够实现穿过散射介质不

同位点的同时或序列刺激和成像。

传输矩阵法实现光穿透散射介质的精准聚焦, 不仅对散射介质特性的研究有重要意义, 也大大推动了光遗传学的进步。通过测量生物体散射介质的传输矩阵, 能够实现生物体内非侵入式单光子光聚焦, 非侵入的单细胞精度也扩展了光遗传学的应用范围。但是, 基于传输矩阵实现散射介质精准聚焦的方法还没有用于生物实验, 原因可能在于传输矩阵需要的散射介质必须是随时间不变的, 这对活体生物体的稳定性有着严苛的要求, 生物体的呼吸、心跳等微小的变化都会影响散射介质的稳定性, 从而破坏聚焦光斑的形成。但是在脑片等离子体样本上, 传输矩阵法体现了巨大的优势。

2.1.2 相位共轭技术

相位共轭技术通过记录穿过散射介质的入射光相位信息, 利用非线性光学的方法产生入射光的相位共轭光。相位共轭光与入射光相比, 振幅、相位、频率等参数均相等, 传播方向相反。因此, 相位共轭技术可以实现某一光波的波前或相位逆转, 使光“回到”入射散射介质之前的状态, 如图 2(a) 所示。Yaqoob 等^[41]利用 LiNbO_3 光折变晶体进行全息记录, 首次实现了生物组织散射光场的相位共轭(OPC)。该方案引入了参考光, 使之与被散射的

物光相干涉, 利用光折变晶体记录干涉图。使用与参考光相共轭的读出光再现全息图, 即可产生相位共轭的时间反演波前, 在组织的另一侧得到了相位恢复后的重建图像。之后, Cui 等^[42]用类似的方法实现了穿过活体组织(兔耳)的光学聚焦, 并揭示了活体组织的三个主要扰动因素: 组织的整体移动(呼吸、心跳等)、微观的分子移动、组织内流体的布朗运动等。若要实现穿过活体组织或活体组织内的光学聚焦, 波前记录和反演的周期就必须小于退相干时间。然而, 光学相位共轭技术虽然可以穿过散射介质实现光学聚焦, 但焦点的峰值强度不足以用于光遗传学。为此, Cui 等^[43]利用空间光调制器代替光折变晶体, 搭建了数字光学相位共轭(DOPC)系统。该系统中照明光通过分光棱镜(BS)分为两部分, 空间光调制器和相机(CMOS)到分光棱镜的距离一致, 保证两路光光程一致, 如图 2(b)所示。系统工作时先用 CMOS 记录物光和参考光的干涉图, 然后利用四步相移法计算物光相位, 之后再与相机像素匹配的空间光调制器对参考光进行调制, 产生物光的相位共轭光, 实现穿过散射介质的光学聚焦^[43]。相比于光学相位共轭技术, 数字光学相位共轭技术虽然信噪比有所下降, 但具有更高的聚焦能量和对比度, 满足神经元激活的需求。

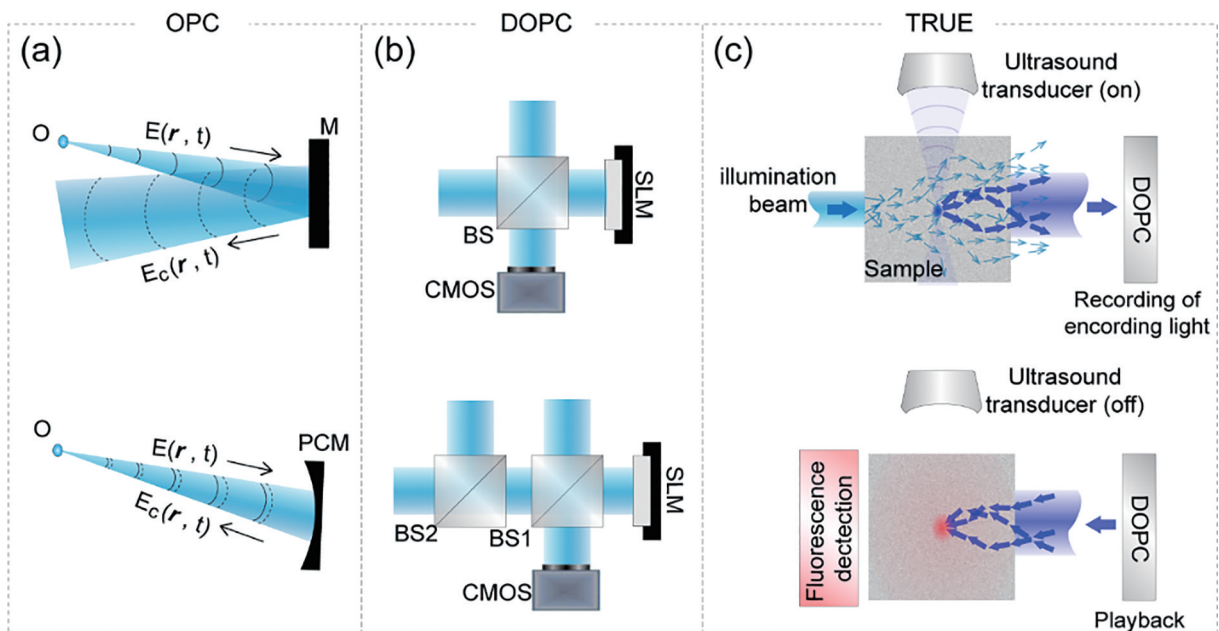


图 2 相位共轭技术原理示意图。(a) 相位共轭镜(PCM)与普通反射镜(M)的对比; (b) 数字光学相位共轭系统的两种装置^[43]; (c) TRUE 系统原理图^[44]

Fig. 2 Schematic of the phase conjugation technology principle. (a) Comparison between phase conjugate mirror (PCM) and ordinary mirror (M); (b) two equipments of the DOPC system^[43]; (c) schematic of TRUE system^[44]

但是无论是光学相位共轭系统还是数字光学相位共轭系统,都只能实现穿透组织聚焦,而无法在组织内光学聚焦。为解决这一问题,Xu等^[44]将光学相位共轭技术与声光调制技术相结合,提出了时间反演超声编码(TRUE)系统。该系统在数字光学相位共轭系统的基础上,使用聚焦超声在样本内部产生一个靶点。由于声光调制效应,该靶点区域的激光会发生与超声频率一致的相移。通过记录产生相移的物光相位,数字光学相位共轭系统进行时间反演即可实现超声靶点区的光学聚焦,如图2(c)所示。

Lai等^[45]首次利用反射模式下的TRUE系统实现了生物组织内的光学聚焦。Si等^[46]利用基于DOPC的TRUE系统实现了生物组织内部的高强度光学聚焦。互补金属氧化物半导体(CMOS)具有更高的灵敏度和更短的曝光时间,再现时也具有更高的信号增益。由于穿过整个脑组织的透射光难以采集,基于DOPC系统的反射式TRUE系统更适合用于光遗传学研究。因此,Suzuki等^[47]重新设计了光路,通过迭代聚焦的方法在反射模式下实现了组织内部的数字式TRUE光学聚焦。

基于超声调制的TRUE系统的分辨率取决于超声的焦点尺寸。为了进一步提高分辨率,Judkewitz等^[48]提出了时间反演超声变量编码(TROVE)光学聚焦技术。该技术使用一系列随机入射光场照明生物组织,使用CMOS记录这一系列入射光对应的全息图。如果记录时间足够长,就可

以用数学方法分解出超声聚焦区的中心点对应的波前。当通过DOPC对该中心点对应的波前进行反演时,就可以实现横向分辨率约为 $5\ \mu\text{m}$ 的光学聚焦。

基于TRUE系统,针对组织内部静态区域存在扰动情况,研究者们也提出了几种对运动物体进行追踪成像的系统,如基于微粒运动的光学聚焦技术(TRACK)^[49]。这一技术进一步在超声聚焦点中引入微泡,利用微泡移动前后的相位差进行相位共轭,实现微泡尺寸的光学聚焦。为了消除微泡的损伤,基于微扰的光学聚焦系统(TRAP)^[50]进一步利用组织微扰代替微泡实现高分辨率的光学聚焦和成像。

基于DOPC的TRUE技术可以实现超声引导的组织内部光学聚焦,使非侵入的光遗传学成为可能。Ruan等^[31]利用光学相位共轭技术首次实现了脑片内部的目标神经元激活,穿透深度达到 $2\ \text{mm}$,而周围的非目标神经元没有受到影响。然而,目前基于DOPC的TRUE系统仍然无法实现人脑的非侵入无损光遗传刺激,这主要是因为反射式TRUE系统的时间反演周期远超过活体脑组织的退相干时间。为此研究者们正尝试使用DMD代替SLM提高光聚焦速度。

2.1.3 机器学习辅助的自适应光学技术

使用光学显微镜进行光遗传实验时,高数值孔径(NA)物镜将穿过透镜光瞳的平面波前转换为聚焦区域中的球面波前,如图3(a)所示。光学系统中

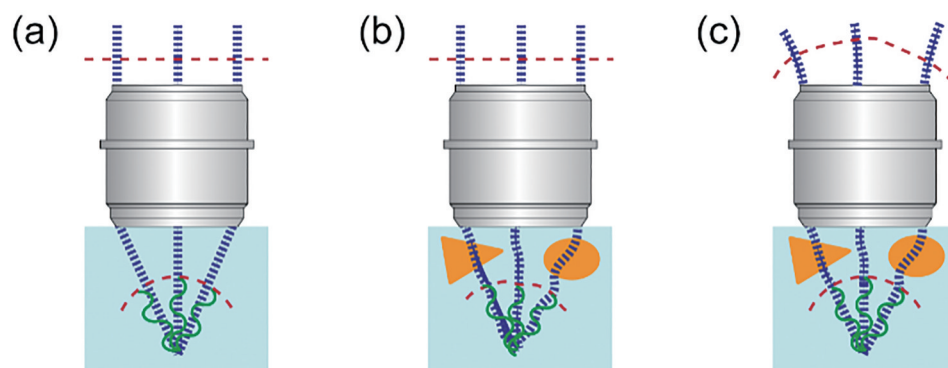


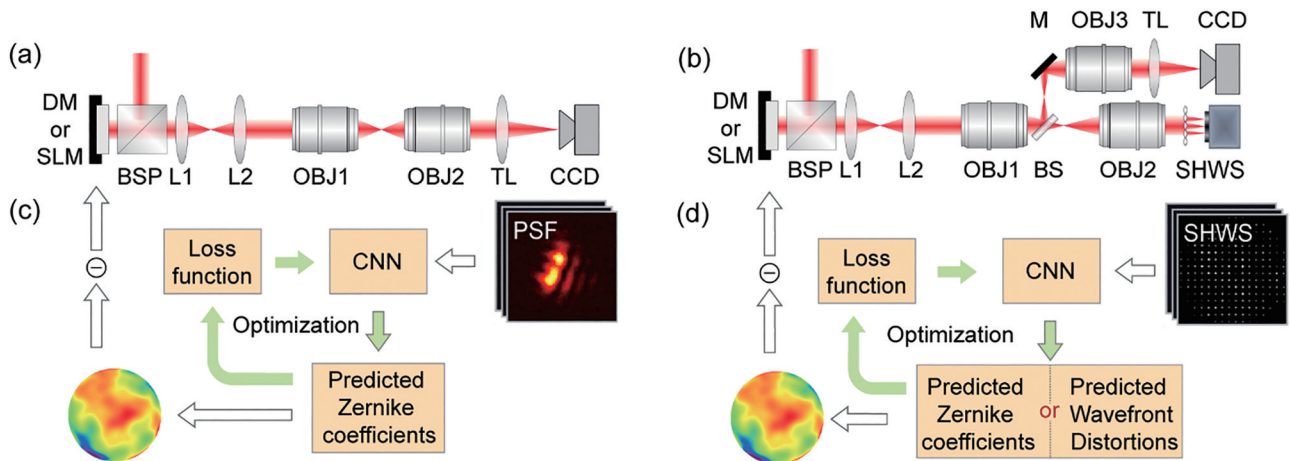
图3 自适应光学的简单模型。(a)理想的显微镜聚焦,平面波(平虚线)经物镜转换为会聚的球面波(弯虚线);(b)生物样本组织的各向异性(三角形和椭圆形)改变光线的传输方向和相位,导致波前失真和焦点体积扩大,焦点强度降低;(c)使用有源光学元件(未显示)改变输入波前相位,抵消像差,恢复衍射极限焦点

Fig. 3 Simple models of adaptive optics. (a) Ideal microscope focus, the plane wave (flat dotted line) is transformed into a convergent spherical wave (curved dotted line) through the objective; (b) anisotropy (triangle and oval) of the biological sample tissue changes the transmission direction and phase of light, resulting in wavefront distortion, focal volume enlargement, focal intensity lower; (c) an active optical element (not shown) is used to change the phase of the input wavefront to cancel the aberration and restore the diffraction-limited focus

元件的匹配误差和样品的各向异性散射引入光学像差,波前发生扭曲,如图 3(b)所示。可以在物镜光瞳面进行波前探测和相位建模,通过可变形镜(DM)或者 SLM 等有源光学器件引入共轭的相位进行波前补偿,在焦面上形成衍射极限聚焦光斑,如图 3(c)所示。

自适应光学显微镜中波前探测有无波前传感器^[51-52]和有波前传感器^[53-56]这两种探测方式。在无波前传感器的自适应光学系统中,输入光经分束棱镜正入射到 DM 或 SLM,经过 4F 系统中继后由物镜聚焦,焦面图像由物镜收集后被相机探测,如图 4(a)所示。基于波前传感器的自适应光学系统的聚焦光路与无波前传感器的波前估计系统基本

一致,在探测光路中,由微透镜阵列和相机组成的 Shack-Hartmann 波前传感器获得焦点阵列图像,物镜后的分光平片分出一部分光用于聚焦光斑的探测,如图 4(b)所示。这两种方法经过长期且持续的发展,已经逐渐可以实现生物组织内部近衍射极限的三维成像。然而传统的基于波前传感器的自适应光学显微系统需要质心定位^[53-54, 57],基于无波前传感器的自适应光学系统需要依靠爬山算法或者遗传算法等随机算法^[58-61]、光瞳分割方法^[51]等,在满足光遗传中毫秒级细胞快速动力学要求方面还有一定的挑战性。机器学习在波前估计方面的应用能够成为提高时间分辨率的一条可靠技术路径。



DM: deformable mirror; TL: tube lens; BSP: beam splitter prism

图 4 机器学习辅助自适应光学的示意图。(a)无波前传感器的波前估计系统示意图^[63]; (b)基于 Shack-Hartmann 波前传感器的波前估计系统示意图^[68]; (c)机器学习辅助的无波前传感器的波前估计的算法流程^[63]; (d)机器学习辅助的基于波前传感器的波前估计的算法流程^[68]

Fig. 4 Schematic of machine learning assisted adaptive optics. (a) Schematic of wavefront estimation system without wavefront sensor^[63]; (b) schematic of wavefront estimation system based on Shack-Hartmann wavefront sensor^[68]; (c) algorithm flow of machine learning assisted wavefront estimation without wavefront sensor^[63]; (d) algorithm flow of machine learning

机器学习辅助的无波前传感器的波前估计主要依据点扩展函数(PSF)图像进行预测。人为生成一组像差波前加载在有源光学元件上,得到一组对应的 PSF。两组数据作为训练集输入卷积神经网络(CNN)进行训练,由波前残差等作为损失函数对网络进行优化。测试网络可行性时,人为生成一组新的像差波前加载在有源光学元件上,对应的 PSF 图像输入网络后,网络输出预测的波前,通过对预测波前与人为加载的波前进行对比,测试 CNN 的精度,如图 4(c)所示。早期, Paine 等^[62]应用具有 Google's Inception V3 架构的 CNN,调整模型进行

回归分析,最终输出预测波前的初始泽尼克系数。之后, Jin 等^[63]使用基于 AlexNet 结构的 CNN 对 300 μm 厚的小鼠脑片进行波前测量,经过网络优化和损失函数选择,像差波前的校准精度可以达到 90% 以上。这些研究结果同时表明,使用的泽尼克模式越多,波前重建的结果就越接近真实的原始相位,但是校准时长也越长。比如校准精度高于 85% 时,网络运行时间为 0.2 s^[63]。近期, Saha 等^[64]构建基于 PHASENET 架构的 CNN,实现了多点 ($n=50$) 扫描的前 15 项泽尼克多项式组成的像差波前探测及近衍射极限的波前恢复,计算速度仅为

0.033 s。机器学习辅助的无波前传感器的波前校正方法虽然相比于其他非线性计算方法计算速度大幅提升,但是在探测高阶像差波前时仍然存在困难,而生物组织中往往由于强的非匀质性而存在高阶像差。因此与基于波前传感器的波前探测相比,无波前传感器的波前校正方法虽然光路配置简单、系统兼容性强,但在探测精度和计算时间上仍然存在一定差距。

机器学习辅助的基于波前传感器的波前预测应运而生,目前主要应用在基于 Shack-Hartmann 波前传感器(SHWS)的系统中。在该方法产生的早期,机器学习主要用来更快更精确地计算 Shack-Hartmann 波前传感器获得的焦点阵列质心位置,根据质心偏移进一步计算得到泽尼克系数和像差波前的预测^[65-67]。机器学习确定质心位置时可以加快图像处理时间,但是无法发挥机器学习的最大优势,会损失一部分原始图像信息,降低机器学习辅助波前传感器的波前探测精度。因此,Hu 等^[68]提出 LSHWS 方法,基于 AlexNet 架构的卷积神经网络,从 Shack-Hartmann 波前传感器获得的焦点阵列中直接获得前 120 项泽尼克系数,根据泽尼克多项式得到高阶像差波前,如图 4(d)所示。训练完成的 LSHWS 网络运行时间仅 10.9 ms,对高阶像差的探测精度高达 95.56%,与基于模态的 SHWS 相比,经过 300 μm 厚脑片的激光聚焦的峰背比提高了 30% 以上。在自适应光学显微镜实验配置中,当补偿像差的有源光学元件为可变形镜时,可用预测像差得到的泽尼克系数直接获得可变形镜的控制命令。但是当有源光学元件为空间光调制器时,需要加载与像差波前共轭的相位图进行像差补偿,因此如果能够将焦点质心阵列输入网络后对应输出像差相位图,则可以进一步缩短像差补偿的时间。Hu 等^[69]使用具有 ResUnet 架构的 CNN,从 Shack-Hartmann 波前传感器获得的焦点阵列中直接获得像差波前,而不需要计算泽尼克系数,用于测试的网络运行时间为 40.2 ms,波前残差仅为 0.0168 λ 。与无波前探测的研究结果类似,机器学习辅助的基于波前传感器的波前预测能够大幅提高波前估计的精度和预测时间,预测精度越高则花费时间也越长。

机器学习辅助的自适应光学技术是近几年新兴的一种探测像差波前的方法。在机器学习的帮助下,波前探测的精度和速度都有了明显的提升。

但是,在实际生物组织散射的像差探测和补偿中还没有得到广泛应用,这可能源于训练集与真实的生物组织散射存在差距。后续有望通过改变和扩充训练集克服这一问题。

包括传输矩阵、相位共轭技术和机器学习辅助的波前校正技术在内的多种单光子光遗传学工具经过不断优化,目前可以实现传统组织近毫米深度的衍射极限聚焦。但是单光子光刺激有两个限制:样本组织对连续光的散射和单光子光刺激焦点的低轴向分辨率。目前,克服这两种限制的主要技术手段是全息技术与单光子光遗传学系统的结合。2013 年,Shoham 小组^[70]通过基于铁电液晶空间光调制器的全息光遗传学系统,用 473 nm 的激光实现了对体外培养视网膜的单细胞光活化,证明了光遗传学和全息技术的结合能实现在体单细胞分辨能力方面的光调控。2014 年,Emiliani 研究小组^[71]开发了包含定制微型物镜和光纤的单光子全息光遗传学系统,在麻醉小鼠脑组织中生成直径为 5 μm 的激发光点,测得横向和轴向分辨率分别为 5 μm 和 14 μm ;并对清醒且自由移动的小鼠小脑中表达 ChR2(刺激光波长为 473 nm)和 GCaMP5G(激发光波长为 491 nm)的浦肯野细胞进行选择性的单细胞光激活,实现了单细胞分辨率全光学控制和自由行为啮齿动物的神经元活动监测。由于多种波前校正技术的单光子光遗传学工具在生物组织中均可达到单细胞精度的聚焦水平,因此这些技术应用于光遗传学中的性能可比拟单光子全息光激活在光遗传实验中的性能,且基于 DOPC 的 TRUE 系统已经实现了 532 nm 波长光下在 800 μm 厚急性脑片中空间分辨率提高 4 倍的神经元光激活^[31]。这些可以充分证明,基于传输矩阵、相位共轭技术或者机器学习辅助的波前校正技术有望帮助单光子光遗传学系统实现单细胞精度的神经元光调控。

2.2 双光子光遗传学系统

双光子激发(2PE)具有高轴向分辨率和对散射的强鲁棒性的固有属性,因此双光子(2P)光遗传学能够提供非侵入式的精准神经元靶向^[72-73],非常有助于探究单个或 2、3 个神经元在环路(neuron microcircuits)中的作用。在双光子光遗传学研究进程中,出现了两类针对单细胞光刺激的光靶向策略,通常被称为串行扫描激发方法^[29, 74-76]和并行图案化刺激方法^[70, 77-79],如图 5 所示。

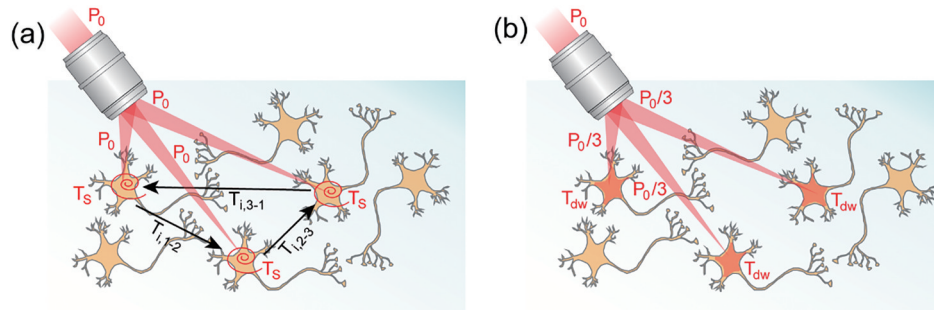


图5 神经元的双光子光刺激靶向策略。(a)基于双光子扫描显微系统的多细胞刺激示意图^[87];(b)基于并行图案照明的多细胞双光子光激活^[78]

Fig. 5 Two-photon target photostimulation for neurons. (a) Schematic of multi-cell photostimulation based on two-photon scanning microscopy system^[87]; (b) multi-cell two-photon photoactivation based on parallel pattern illumination^[78]

2.2.1 串行扫描激发方法

由于双光子非线性吸收促使荧光的三维高分辨率激发,同时红外光在组织中的散射少,双光子扫描显微镜(2PLSM)能够以前所未有的深度和分辨率对活脑进行结构和功能成像^[80-81]。双光子串行扫描系统一般由扫描单元、望远镜系统和物镜

组成,如图6(a)所示。光聚焦为一个微米尺度的高斯光斑,当扫描单元工作时,该光斑在样品面上迅速移动,从而连续刺激一系列目标位点,如图6(a)所示。通常使用的扫描元件有两类:电流计扫描器和声光偏转器(AOD),分别如图6(b)和图6(c)所示。

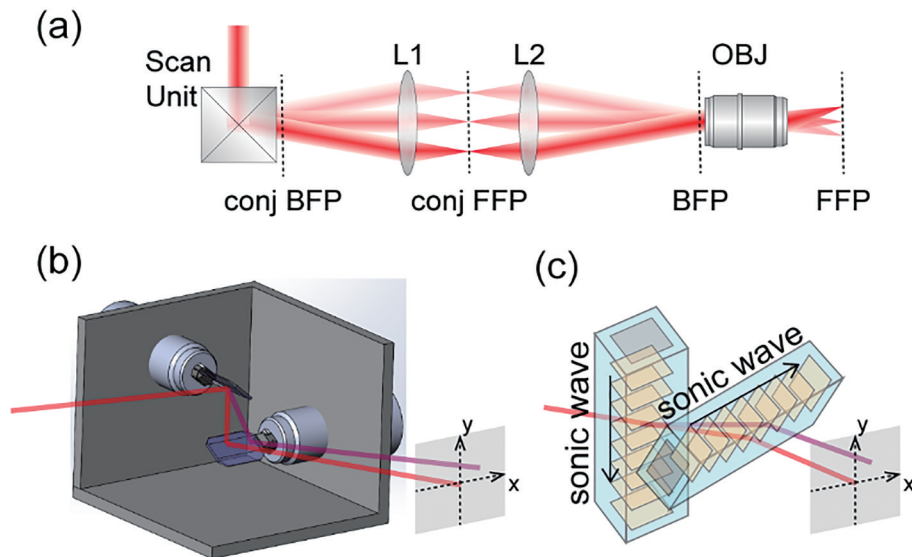


图6 双光子扫描显微系统示意图^[80]。(a)扫描光路图;(b)电流计扫描器结构示意图;(c)声光偏转器原理示意图

Fig. 6 Optical configuration of the two-photon scanning microscopy system^[80]. (a) Scanning light path; (b) structure of the galvanometer scanner; (c) principle of acousto-optic deflector

电流计扫描器一般由动磁力矩电机、反射镜和光学位置传感器构成。根据精准光遗传学应用的需求,有两类电流计扫描器被广泛使用:标准电流计扫描仪器和共振扫描振镜。标准电流计扫描器可以由任何类型的波形驱动,受频率和幅度限制,适用于慢动力学单细胞光激活。比如双光子激活光敏蛋白ChR2的首次演示是由Tank小组^[82]使用标准检流计振镜(6210 series, Cambridge Technology)完成的。

Tank等证明如果对单个神经元的扫描时间 T_s 小于光门控电流的衰减时间 τ_{off} ,则将在细胞表面不同位置引起的光电流相加,形成更大的光诱导尖峰。

共振扫描振镜只能由谐振频率的正弦波驱动,工作频率最高可达4~12 kHz。虽然共振扫描振镜的速度比标准电流计扫描仪器高出近1个数量级,但是固定线路频率降低了部分光路灵活性,迄今为止尚未发布基于共振扫描振镜的光刺激方案。但

是基于共振扫描振镜的双光子扫描显微镜可以进行三维实时在体成像,因此它常与双光子全息靶向调控结合使用,用于研究神经集群的活动和功能^[29, 79, 83]。

电流计扫描器工作时动磁力矩电机使反射镜偏转,进而改变光束偏角,但是这种机械转动不可避免地存在转动惯性,响应时间略有延长。而声光偏转器则可以克服这一问题,对光束进行无惯性扫描。在声光偏转器中,声波在晶体(例如 TeO_2)中横向传播,在晶体中形成相位光栅,然后光栅对入射激光束进行多阶衍射。对于入射光束的特定入射角(布拉格角),大多数激光被定向到衍射的一阶,如图 6(c)所示。在这种情况下,一阶衍射角可以通过改变声波的频率来调谐。对于 2D 扫描系统,可以依次使用两个方向垂直的声光偏转器。然而声光偏转器的最大偏转角仅有 $0.3^\circ \sim 3.5^\circ$,因此只适用于小体积范围扫描。由于扫描速度快、扫描范围小,至今还未出现基于 AOD 的双光子光遗传刺激,基于 AOD 的双光子扫描系统主要用于快速三维构成像^[84-85]。

基于双光子扫描的光活化为目前精准光遗传学的主要研究方法,在进行双光子激发光敏蛋白有效性验证^[82]、活体光遗传学刺激^[75-76]和神经集群功能^[86-87]等研究中都取得了重大突破。

2.2.2 并行图案化刺激方法

使用扫描光活化的方法,同步多神经元激活仍然无法实现。基于全息的双光子多点照明可以实现光刺激的并行化^[77],光束经空间光调制器进行相位调制,在像面上形成多个靶点,以用于刺激多个细胞。为了同时提供双光子成像和单细胞精度的光刺激,在并行激发的光路中集成双光子共振扫描系统。在光路系统设计中,用于刺激的飞秒光首先经过偏振分光棱镜和半波片调整偏振态,之后经过空间光调制器进行相位调制;调制之后的光束经过望远镜系统中继后聚焦于管透镜匹配的透镜,在聚焦过程中经二向色镜耦合进双光子共振扫描系统;最终在显微镜焦面上形成多靶点。两个飞秒脉冲激光束的独立操作能够以高时空分辨率对神经元进行精确控制和记录^[29, 79, 83],如图 7 所示。

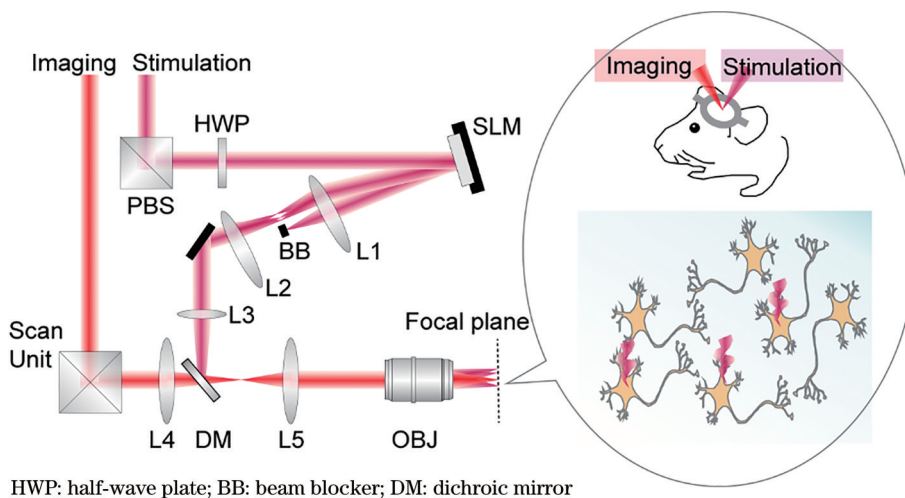
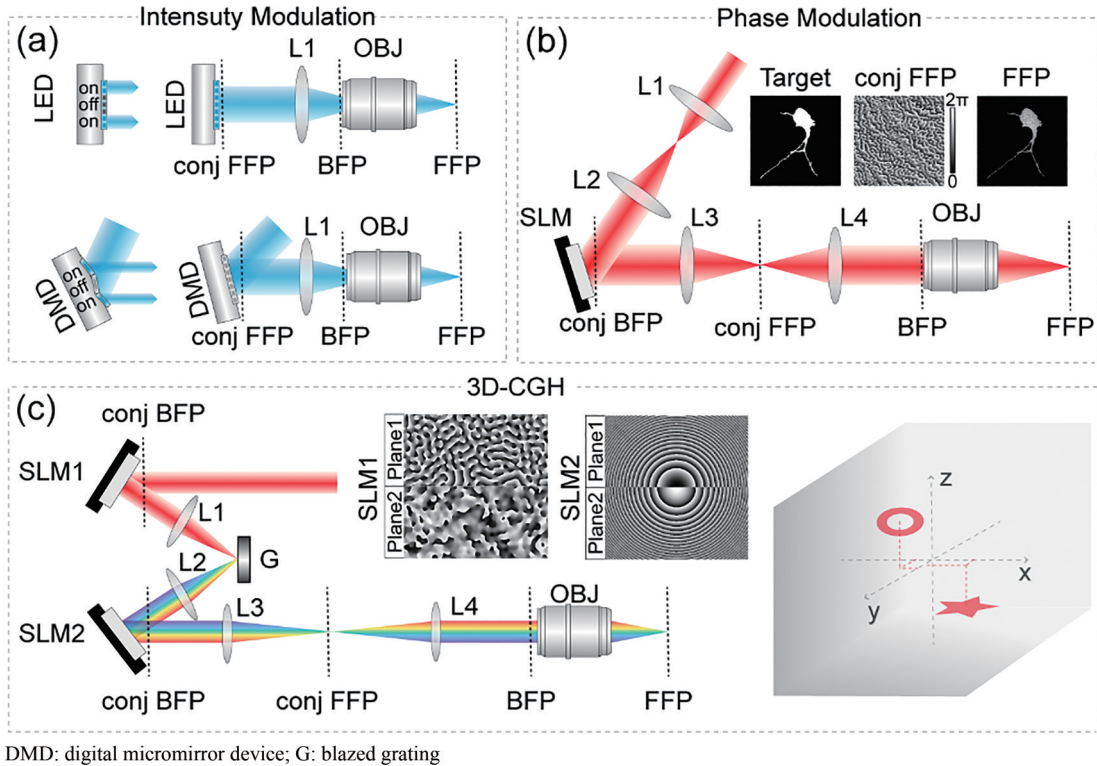


图 7 基于 SLM 的双光子扫描并行图案化光刺激系统^[74]

Fig. 7 Two-photon scanning parallel patterned photostimulation system based on SLM^[74]

并行模式照明方案扩展了空间灵活性,可以匹配不同实验的要求。然而,与基于扫描的策略相比,光刺激的多目标时空灵活性需要功率更高的激光源。事实上,同时照亮 N 个神经元意味着激光源必须提供相当于 $N \times P$ 的功率(P 为激发单个神经元的阈值功率),以激发神经元或检测到钙荧光响应。通过对光束进行强度调制或者相位调制,多可以在像面上获得任意定义的照明图案,从而能够同时进行多靶点刺激。

并行照明的强度调制一般通过微型发光二极管(LED)阵列^[88-89]或者数字微镜器件(DMD)^[88, 90]实现,如图 8(a)所示。微型发光二极管阵列通过独立打开/关闭阵列中的每个二极管进行光束整形,如图 8(a)上面板左侧所示。数字微镜器件的每个微镜单元可以在两个角度之间切换,选择性地对光部分反射进行光束整形,如图 8(a)下面板左侧所示。强度调制的优势在于:光学设置简单且具有成本效益,并且可以轻松适应商用显微镜;光源选择



DMD: digital micromirror device; G: blazed grating

图 8 并行图案化刺激的技术路径。(a)基于微型发光二极管和数字微镜阵列的强度调制光路^[89];(b)全息技术实验装置^[94],插图显示全息技术的目标图像与对应结果;(c)全息技术的三维空间定向寻址实验装置^[92],插图显示两个空间光调制器分区加载的相位掩模和最终像空间的三维结果

Fig. 8 Technical path of parallel patterned stimulation. (a) Optical system of intensity modulation based on miniature LED or DMD; (b) holographic technology experimental device, the illustration shows the target image and corresponding results of the holographic system; (c) three-dimensional directional addressing optical system, the inset shows the phase mask loaded on the two spatial light modulators and the three-dimensional imaging results

性多样,可使用激光或者其他非相干光源;照明模式刷新速率高(kHz量级)。但是强度调制的光能利用率很低,大部分光均被损失,因此基于强度调制的并行照明方式已在单光子光遗传学中应用,但是双光子激发的高阈值阻止了强度调制在双光子并行照明方面的应用。因此对于组织深处的高精度光激活实验,相位调制的双光子并行照明方式被广泛使用。

并行照明的相位调制依靠三种技术:计算机生成全息术(CGH)^[91-93]、广义相衬对比[如图8(b)所示]^[77, 94]、扩展高斯光束照明^[95-96]。在这三种技术中,计算机生成全息术是一种更为方便的方法,具有高度的时间和空间灵活性。计算机生成全息术是通过改变显微物镜前焦面的相位对光束进行整形的,相位调制一般由液晶空间光调制器完成。研究人员首先对目标细胞或结构进行成像,然后设计一个掩模或一系列掩模,光在对应位置形成图案。通过光栅和透镜对应关系^[97]或者傅里叶迭代算

法^[98-99]计算寻址到空间光调制器对应的相位掩模。虽然目前空间光调制器的刷新速率在数十到数百赫兹,但铁电液晶模拟调制等新发展可能很快就会实现千赫兹刷新速度。全息激发光斑的轴向分辨率与横向图案大小成线性关系,导致大目标靶点的全息照明的轴向分辨率损失严重,可以通过结合计算机生成全息术与时空聚焦来压缩轴向分辨率^[91]。时空聚焦一般通过反射光栅实现,光栅在空间上分散飞秒激光脉冲,光脉冲在沿焦平面传播时被压缩,在焦平面达到最小值。时空聚焦技术使得大尺寸全息照明图案的轴向分辨率也被限制在微米量级。全息技术的三维空间定向寻址相继提出^[92, 94, 96],三维空间同时生成是依靠两个空间光调制器实现的,如图8(c)所示。第一个空间光调制器分为多个子区域,加载不同靶点的相位掩模;第二个空间光调制器在对应子区加载不同平面位置的偏移相位,精准的三维定向多靶点激发为神经环路的研究和光遗传学刺激方案提供了新的方法和技

术支撑。

双光子的非线性吸收使得它具体两个基本属性:长波激发和焦域激发。由于组织散射对长波散射影响小,因此双光子光遗传学技术本身就具有穿透深度大和空间精准度高的优势。这两种固有属性是双光子技术在光遗传学中广泛应用的基本原因。串行扫描技术和并行图案化激发技术的不断发展以及两种技术的结合使用也为节点神经细胞确定、神经环路研究和神经集群功能研究提供了多种可行的技术方案,光遗传学的发展也展开了新的局面。

3 精准光遗传学的应用

高时空分辨率的光学技术不断发展,为单细胞或者多细胞的精准光激活提供了技术支撑,与电记录或者功能成像相结合,对清醒、自由活动的模式动物的神经活动进行在体检测,是解析神经集群功能的重要研究手段。光刺激与电记录的结合使用,经过长期发展已经在多方面取得了突破^[100-101]。光刺激与功能成像的结合使用被称为全光学的神经元调控,可以通过光敏蛋白和基于荧光的神经活动传感器(例如钙离子指示剂^[5]或者电压敏感染料^[6])调控和监测神经活动,这类研究为单细胞分辨率靶向调控开辟了新的方向,也对精准光遗传学技术的发展提出了新的挑战。

单光子光激活和钙成像结合的挑战在于激活光敏蛋白和激发钙指示剂荧光的光波长存在光谱重叠。光敏蛋白普遍拥有较宽的吸收光谱^[102]。而使用最广泛的绿色荧光钙指示剂(GCaMP)的激发波长为 430~510 nm,与光敏蛋白结合使用会出现光谱重叠。为了解决上述问题,一些红移的钙荧光指示剂被开发出来^[103-105],它们可以与蓝光激活的光敏蛋白结合使用。单光子光激活与钙成像的成功结合已经成功应用在线虫^[103, 106]、清醒小鼠^[71]等模式动物的神经环路功能研究中。

双光子光遗传学由于光谱分离、精准靶向等优势,已逐渐从验证活体光激活进入到神经元集群功能研究层面。Carrillo-Reid 等^[86]于 2016 年使用基于普通电流计扫描器的串行扫描光刺激方式,在清醒小鼠的视觉皮层人工生成了具有单细胞分辨率的神经元集群。该神经元集群由双光子重复激活进行构建,当集群构建完成之后可以自发地产生群体性活动或者对集群中的单个细胞进行光刺激诱发群体活动。这种人工光刺激生成的神经元集群可

以连续几天保持协同作用,并且不会破坏生物体原有的神经元集群功能。神经元集群的人工合成意味着光刺激可以对神经集群活动,甚至于神经活动对应的动物行为进行人为的光刺激干预,研究神经活动和行为的对应关系。2017 年, dal Maschio 等^[107]使用全息光刺激实现了斑马鱼摆尾活动的控制。研究人员首先通过迭代光刺激方式筛选出最少神经元的神经元集群,控制斑马鱼摆尾,之后对该神经元集群进行双光子全息光刺激激活,观察到斑马鱼的尾巴弯曲。

对于小鼠等复杂模式动物,大脑中神经环路更为复杂,因此在光遗传实验中需要提前进行奖惩训练以解析神经集群和行为之间的对应关系。2019 年, Jennings 等^[87]以双光子串行扫描刺激和共振成像为技术依托研究了清醒小鼠眶额皮质的神经元集群对社交和进食的影响。研究人员首先给小鼠喂养高热量食物,确定进食敏感神经元;之后对进食敏感神经元进行多次单细胞光刺激,发现这种刺激方式可以增强小鼠进食行为和对热量奖励有关的神经元活动;再研究小鼠社交对进食的影响,类似方式确定社交敏感神经元后,光激活社交敏感神经元并不会增强小鼠进食行为。这项研究证明了功能定义的摄食和社交的神经集群的存在,并且说明通过选择性光激活多个单一定义的神经元可以对哺乳动物行为进行特异性控制。同年, Marshal 等^[108]使用双光子全息光刺激和共振扫描结合的光学系统对小鼠视觉皮层神经元集群功能进行研究。在实验进行之前,研究人员对小鼠进行匹配的光遗传学和视觉刺激的训练。实验结果表明,小鼠视觉皮层的较小神经元集群被激活后,可以在更广泛的神经网络中观察到选择性激活,同时伴随特定行为的出现。光遗传学诱发的感知与相应的视觉感知相似,验证了视觉相关的神经元集群的功能。

精准光遗传学技术的发展为神经集群控制特定行为、高时空分辨率光控神经元环路实时调控动物行为的相关研究提供了条件,在线虫、斑马鱼、清醒小鼠等模式动物中均成功应用,揭示了神经集群的功能性和可塑性。

4 结 论

光遗传学研究的常见范例中,植入的头戴式光纤或者 GRIN 透镜在清醒模式动物中靶向光激活/抑制神经元,从而干预神经活动,进而影响动物行

为^[71, 109-111]。但是这种头戴式设备通常为宽场激发, 激发光束从端口出射后在脑组织中快速扩散^[16, 112], 无法选择性激活特定的神经元, 这阻碍了神经元集群的识别和对神经元集群功能的进一步研究。精准光遗传学将光激活的空间分辨率提高到亚细胞精度, 研究单个神经元或者多个神经元的兴奋或者抑制对群体细胞的影响, 从而打开了神经元集群研究的大门^[113]。

精准光遗传学光激活方案有单光子光刺激和双光子光刺激两种。单光子光激活只需较低的光功率就可以激活光敏蛋白。但是单光子受生物组织影响散射严重, 激发光很难在目标靶点聚焦, 因此在进行活体动物研究中, 仍需要借助植入的头戴式光纤将激发光束直接传输到目标靶区附近, 减小单光子光束在生物组织内部的传输距离^[71]。由于植入的头戴式设备可能会引发局部区域的胶质反应或者导致血脑屏障破坏^[16], 影响神经活动的调控和记录, 因此一般而言植入的位置需要距离目标靶区一定范围。传输矩阵、相位共轭技术和机器学习辅助的波前校正技术等方法相继被提出, 用于克服生物组织散射, 实现单光子焦点能够准确定向聚焦在目标靶点, 为精准的单光子光遗传学研究奠定了基础。双光子光激活由于固有的长波激发属性, 对脑组织中散射不敏感, 因此它可以从根本上消除植入设备给大脑带来的机械损伤^[114]。双光子精准光遗传学技术天然地具有微创无损、大深度、亚细胞精度的特点。在三维空间的双光子靶向策略中, 无论是基于串行扫描还是并行图案化激发, 都具有在神经集群中以单细胞精度进行多靶区精准定向的能力, 进而调控光敏蛋白, 产生对细胞神经活动激活或者抑制作用。双光子光激活与双光子扫描成像结合构成的全光学双光子光遗传学将使用光学手段监测和神经元集群操控的空间分辨率均提高至单个神经元水平, 为大脑的神经功能研究提供了更加精细的工具。

用于精准光遗传学的高时空分辨率光学系统在实际应用中还存在一些局限性。虽然本文中提出的技术能够实现单细胞或者亚细胞水平的光激活, 但是当照明点远离胞体时, 光也能驱动细胞去极化^[115]。其主要原因是光敏蛋白并不仅仅在神经元胞体中表达, 而是遍布树突和轴突。因此, 当靶细胞胞体和周围神经元的轴突或者树突在空间上重叠时, 周围细胞会表现出明显的兴奋或抑制反应。

近期有研究提出新的病毒靶向策略, 光敏蛋白仅在神经元胞体上表达, 且能够成功产生光激活的尖峰信号^[115-116]。这种胞体靶向的光敏蛋白可能有助于解决靶细胞的邻近细胞激活问题。除此之外, 光遗传学刺激方面的大脑研究中, 需要仔细评估光照引起的组织热效应, 同时对光遗传学的非侵入穿透深度进行了限制。温度是生物体的关键变量, 在神经科学领域中已经报道了温度对神经活动和血液动力学的影响^[4, 117-118]。具体到光遗传学领域, 已有研究表明高功率激光引起的热效应能够激活未表达光敏蛋白的神经元^[119]。目前已有特定探针可以用于光激活期间局部温度的监测^[120]。除了温度等环境因素对细胞活动的影响, 光照引起的细胞内分子机制改变也会影响细胞的兴奋状态。近期已有研究表明细胞内的 flavin 作为 700 nm 飞秒激光的感光基团, 控制细胞膜 SOC 钙离子通道并影响细胞兴奋性, 且在这种情况下仅需要极低的飞秒光能量^[121]。因此在光遗传学研究中, 需要在预实验中检测细胞是否存在对实验中使用的光束的内源性吸收, 以确保光遗传学研究的科学性和有效性。

精准光遗传学已经成为神经元集群功能研究最重要的技术手段, 为脑科学的探索开辟了全新的研究方向。纵观精准光遗传学的发展历程, 以下几个方面可能会在未来取得重大的突破。一是光敏蛋白和指示剂工具, 更深层脑组织神经元的读取和操控有赖于更长波长响应和激活的、更加灵敏的光敏蛋白和离子指示剂; 优化的转染方式和更低的毒性也是神经元大规模标记的前提。二是同时观测和调控的神经元数量, 目前已有研究者将钙指示剂荧光观测的神经元数量提高到了百万量级, 如果未来能够结合能力匹配的光调控量级, 将为大规模神经元集群的研究提供巨大推力。三是高级哺乳动物甚至是灵长类动物的精准光遗传学研究, 更大的脑容量不仅对光遗传学系统提出了更高的要求, 也对模式动物的行为学与神经科学的建模研究提出了更高难度的挑战。同时二、三两点也对大规模神经活动数据的分析处理提出了更高的要求。随着信号提取、分析算法的不断开发与深度学习方法的不断优化, 大规模数据处理的工作必然更加高速与高效, 有望在实验过程中实现全自动实时分析结果显示, 大大缩短实验周期。四是模式动物复杂活动场景的精准光遗传学研究, 当前的研究设备还局限在模式动物头部严格固定的精准光遗传学实验, 伴

随着微型化设备的开发和迭代,在可以预见的数年内,头戴式精准光遗传学系统设备将被开发出来并广泛应用,极大拓展模式动物的行为学研究范围。精准光遗传学是一个集合了多学科的研究方式,伴随着脑科学发展的国家需求与前沿突破,未来将有更多的学科参与其中,全面推动系统开发与工具、设备研制,为神经科学的研究开辟广阔的天地。

参 考 文 献

- [1] Scanziani M, Häusser M. Electrophysiology in the age of light[J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 930-939.
- [2] Miesenböck G, Kevrekidis I G. Optical imaging and control of genetically designated neurons in functioning circuits[J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2005, 28: 533-563.
- [3] 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.
- [4] Yizhar O, Fenno L E, Davidson T J, et al. Optogenetics in neural systems[J]. *Neuron*, 2011, 71(1): 9-34.
- [5] Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons[J]. *Neuron*, 2012, 73(5): 862-885.
- [6] Knöpfel T, Gallero-Salas Y, Song C. Genetically encoded voltage indicators for large scale cortical imaging come of age[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 27: 75-83.
- [7] 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.
- [8] Zemelman B V, Lee G A, Ng M, et al. Selective photostimulation of genetically ChARGed neurons [J]. *Neuron*, 2002, 33(1): 15-22.
- [9] 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.
- [10] Zhang F, Wang L P, Boyden E S, et al. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 785-792.
- [11] Zhang F, Wang L P, Brauner M, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry[J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 633-639.
- [12] Su L C, Chen T. A wireless stimulation system with multiple channels and independent regulation for optogenetics *in vitro*[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(19): 1917001.
苏良闯, 陈涛. 可独立调控的多通道体外无线光遗传刺激系统[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(19): 1917001.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Huber D, Petreanu L, Ghitani N, et al. Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice[J]. *Nature*, 2008, 451(7174): 61-64.
- [16] Park S, Guo Y, Jia X, et al. One-step optogenetics with multifunctional flexible polymer fibers[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20(4): 612-619.
- [17] Cioocchi S, Herry C, Grenier F, et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits [J]. *Nature*, 2010, 468(7321): 277-282.
- [18] 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.
- [19] Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K, et al. Optogenetic manipulation of cerebellar Purkinje cell activity *in vivo*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22400.
- [20] Gourine A V, Kasymov V, Marina N, et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP[J]. *Science*, 2010, 329(5991): 571-575.
- [21] Pagliardini S, Janczewski W A, Tan W, et al. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2011, 31(8): 2895-2905.
- [22] Adesnik H, Scanziani M. Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits[J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1155-1160.
- [23] Gradinaru V, Mogri M, Thompson K R, et al. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry [J]. *Science*, 2009, 324(5925): 354-359.
- [24] Tye K M, Prakash R, Kim S Y, et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety[J]. *Nature*, 2011, 471(7338): 358-362.

- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Makhijani K, To T L, Ruiz-González R, et al. Precision optogenetic tool for selective single-and multiple-cell ablation in a live animal model system [J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(1): 110-119.
- [28] Shemesh O A, Tanese D, Zampini V, et al. Temporally precise single-cell-resolution optogenetics [J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20(12): 1796-1806.
- [29] 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.
- [30] Xie C, Meyer R, Froehly L, et al. *In-situ* diagnostic of femtosecond laser probe pulses for high resolution ultrafast imaging[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 126.
- [31] Ruan H, Brake J, Robinson J E, et al. Deep tissue optical focusing and optogenetic modulation with time-reversed ultrasonically encoded light[J]. *Science Advances*, 2017, 3(12): eaao5520.
- [32] Rumi M, Perry J W. Two-photon absorption: an overview of measurements and principles[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2010, 2(4): 451.
- [33] Gewin V. A golden age of brain exploration[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(1): e24.
- [34] Jacques S L. Corrigendum: optical properties of biological tissues: a review[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2013, 58(14): 5007-5008.
- [35] Popoff S M, Lerosey G, Carminati R, et al. Measuring the transmission matrix in optics: an approach to the study and control of light propagation in disordered media[J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104(10): 100601.
- [36] Popoff S, Lerosey G, Fink M, et al. Image transmission through an opaque material[J]. *Nature Communications*, 2010, 1: 81.
- [37] Kim M, Choi Y, Yoon C, et al. Maximal energy transport through disordered media with the implementation of transmission eigenchannels[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6(9): 581-585.
- [38] Conkey D B, Caravaca-Aguirre A M, Piestun R. High-speed scattering medium characterization with application to focusing light through turbid media[J]. *Optics Express*, 2012, 20(2): 1733-1740.
- [39] di Leonardo R, Bianchi S. Hologram transmission through multi-mode optical fibers[J]. *Optics Express*, 2010, 19(1): 247-254.
- [40] Luo Y Q, Yan S X, Li H H, et al. Focusing light through scattering media by reinforced hybrid algorithms[J]. *APL Photonics*, 2020, 5(1): 016109.
- [41] Yaqoob Z, Psaltis D, Feld M S, et al. Optical phase conjugation for turbidity suppression in biological samples[J]. *Nature Photonics*, 2008, 2(2): 110-115.
- [42] Cui M, McDowell E J, Yang C. An *in vivo* study of turbidity suppression by optical phase conjugation (TSOPC) on rabbit ear[J]. *Optics Express*, 2010, 18(1): 25-30.
- [43] Cui M, Yang C. Implementation of a digital optical phase conjugation system and its application to study the robustness of turbidity suppression by phase conjugation[J]. *Optics Express*, 2010, 18(4): 3444-3455.
- [44] Xu X, Liu H, Wang L V. Time-reversed ultrasonically encoded optical focusing into scattering media[J]. *Nature Photonics*, 2011, 5(3): 154-157.
- [45] Lai P X, Xu X, Liu H L, et al. Reflection-mode time-reversed ultrasonically encoded optical focusing into turbid media[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(8): 080505.
- [46] Si K, Fiolka R, Cui M. Fluorescence imaging beyond the ballistic regime by ultrasound pulse guided digital phase conjugation[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6(10): 657-661.
- [47] Suzuki Y, Tay J W, Yang Q, et al. Continuous scanning of a time-reversed ultrasonically encoded optical focus by reflection-mode digital phase conjugation[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(12): 3441-3444.
- [48] Judkewitz B, Wang Y M, Horstmeyer R, et al. Speckle-scale focusing in the diffusive regime with time-reversal of variance-encoded light (TROVE)[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(4): 300-305.
- [49] Zhou E H, Ruan H, Yang C, et al. Focusing on moving targets through scattering samples[J]. *Optica*, 2014, 1(4): 227-232.
- [50] Ma C, Xu X, Liu Y, et al. Time-reversed adapted-perturbation (TRAP) optical focusing onto dynamic objects inside scattering media[J]. *Nature Photonics*,

- 2014, 8(12): 931-936.
- [51] Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(2): 141-147.
- [52] Yang H Z, Li X Y. Comparison of several stochastic parallel optimization algorithms for adaptive optics system without a wavefront sensor[J]. *Optics & Laser Technology*, 2011, 43(3): 630-635.
- [53] Wang K, Milkie D E, Saxena A, et al. Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(6): 625-628.
- [54] Liu R, Li Z, Marvin J S, et al. Direct wavefront sensing enables functional imaging of infragranular axons and spines[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(7): 615-618.
- [55] Tao X, Fernandez B, Azucena O, et al. Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1062-1064.
- [56] Qin Z Y, Chen C P, He S C, et al. Adaptive optics two-photon endomicroscopy enables deep brain imaging at synaptic resolution over large volumes[J]. *Science advances*, 2020, 6(40): eabc6521.
- [57] Li Z, Zhang Q, Chou S W, et al. Fast widefield imaging of neuronal structure and function with optical sectioning *in vivo*[J]. *Science Advances*, 2020, 6(19): eaaz3870.
- [58] Albert O, Sherman L, Mourou G, et al. Smart microscope: an adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy[J]. *Optics Letters*, 2000, 25(1): 52-54.
- [59] Sherman L, Ye J Y, Albert O, et al. Adaptive correction of depth-induced aberrations in multiphoton scanning microscopy using a deformable mirror[J]. *Journal of Microscopy*, 2002, 206(1): 65-71.
- [60] Marsh P, Burns D, Girkin J. Practical implementation of adaptive optics in multiphoton microscopy[J]. *Optics Express*, 2003, 11(10): 1123-1130.
- [61] Wright A J, Burns D, Patterson B A, et al. Exploration of the optimisation algorithms used in the implementation of adaptive optics in confocal and multiphoton microscopy[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2005, 67(1): 36-44.
- [62] Paine S W, Fienup J R. Machine learning for improved image-based wavefront sensing[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(6): 1235-1238.
- [63] Jin Y C, Zhang Y Y, Hu L J, et al. Machine learning guided rapid focusing with sensor-less aberration corrections[J]. *Optics Express*, 2018, 26(23): 30162-30171.
- [64] Saha D, Schmidt U, Zhang Q, et al. Practical sensorless aberration estimation for 3D microscopy with deep learning[J]. *Optics Express*, 2020, 28(20): 29044-29053.
- [65] Guo H, Korablinova N, Ren Q S, et al. Wavefront reconstruction with artificial neural networks[J]. *Optics Express*, 2006, 14(14): 6456-6462.
- [66] Barwick S. Detecting higher-order wavefront errors with an astigmatic hybrid wavefront sensor[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(11): 1690-1692.
- [67] Li Z Q, Li X Y. Centroid computation for Shack-Hartmann wavefront sensor in extreme situations based on artificial neural networks[J]. *Optics Express*, 2018, 26(24): 31675-31692.
- [68] Hu L, Hu S, Gong W, et al. Learning-based Shack-Hartmann wavefront sensor for high-order aberration detection[J]. *Optics Express*, 2019, 27(23): 33504-33517.
- [69] Hu L, Hu S, Gong W, et al. Deep learning assisted Shack-Hartmann wavefront sensor for direct wavefront detection[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(13): 3741-3744.
- [70] Reutsky-Gefen I, Golan L, Farah N, et al. Holographic optogenetic stimulation of patterned neuronal activity for vision restoration[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1509.
- [71] Szabo V, Ventalon C, de Sars V, et al. Spatially selective holographic photoactivation and functional fluorescence imaging in freely behaving mice with a fiberscope[J]. *Neuron*, 2014, 84(6): 1157-1169.
- [72] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [73] Kong L J, Jin C, Jin G F. Advances on *in vivo* high-spatial-resolution neural manipulation based on optogenetics[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(15): 1507003.
- 孔令杰, 靳程, 金国藩. 基于光遗传学的在体高空间分辨率神经调控技术[J]. *中国激光*, 2021, 48(15): 1507003.
- [74] Packer A M, Russell L E, Dalgleish H W, et al. Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution *in vivo*[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(2): 140-146.
- [75] 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.

- [76] 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.
- [77] Papagiakoumou E, Anselmi F, Bègue A, et al. Scanless two-photon excitation of channelrhodopsin-2 [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(10): 848-854.
- [78] Zahid M, Vélez-Fort M, Papagiakoumou E, et al. Holographic photolysis for multiple cell stimulation in mouse hippocampal slices[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9431.
- [79] Gill J V, Lerman G M, Zhao H, et al. Precise holographic manipulation of olfactory circuits reveals coding features determining perceptual detection[J]. *Neuron*, 2020, 108(2): 382-393.
- [80] Mainen Z F, Maletic-Savatic M, Shi S H, et al. Two-photon imaging in living brain slices[J]. *Methods*, 1999, 18(2): 231-239.
- [81] Oheim M, Beaurepaire E, Chaigneau E, et al. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2001, 111(1): 29-37.
- [82] Rickgauer J P, Tank D W. Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(35): 15025-15030.
- [83] Go M A, Mueller M, Castañares M L, et al. A compact holographic projector module for high-resolution 3D multi-site two-photon photostimulation [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210564.
- [84] Nadella K M, Roš H, Baragli C, et al. Random-access scanning microscopy for 3D imaging in awake behaving animals[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 1001-1004.
- [85] Szalay G, Judák L, Katona G, et al. Fast 3D imaging of spine, dendritic, and neuronal assemblies in behaving animals[J]. *Neuron*, 2016, 92(4): 723-738.
- [86] Carrillo-Reid L, Yang W, Bando Y, et al. Imprinting and recalling cortical ensembles[J]. *Science*, 2016, 353(6300): 691-694.
- [87] Jennings J H, Kim C K, Marshel J H, et al. Interacting neural ensembles in orbitofrontal cortex for social and feeding behaviour[J]. *Nature*, 2019, 565(7741): 645-649.
- [88] Wang S, Szobota S, Wang Y, et al. All optical interface for parallel, remote, and spatiotemporal control of neuronal activity[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(12): 3859-3863.
- [89] Grossman N, Poher V, Grubb M S, et al. Multi-site optical excitation using ChR2 and micro-LED array [J]. *Journal of Neural Engineering*, 2010, 7(1): 16004.
- [90] Münch T A, da Silveira R A, Siegert S, et al. Approach sensitivity in the retina processed by a multifunctional neural circuit[J]. *Nature Neuroscience*, 2009, 12(10): 1308-1316.
- [91] Bègue A, Papagiakoumou E, Leshem B, et al. Two-photon excitation in scattering media by spatiotemporally shaped beams and their application in optogenetic stimulation[J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(12): 2869-2879.
- [92] Hernandez O, Papagiakoumou E, Tanese D, et al. Three-dimensional spatiotemporal focusing of holographic patterns[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11928.
- [93] 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.
- [94] 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.
- [95] 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.
- [96] 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.
- [97] Liesener J, Reicherter M, Haist T, et al. Multifunctional optical tweezers using computer-generated holograms[J]. *Optics Communications*, 2000, 185(1/2/3): 77-82.
- [98] Gerchberg R W. A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures[J]. *Optik*, 1972, 35: 237-246.
- [99] di Leonardo R, Ianni F, Ruocco G. Computer generation of optimal holograms for optical trap arrays[J]. *Optics Express*, 2007, 15(4): 1913-1922.
- [100] 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.
- [101] Dufour S, de Koninck Y. Optrodes for combined optogenetics and electrophysiology in live animals[J].

- Neurophotonics, 2015, 2(3): 031205.
- [102] 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.
- [103] Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, et al. Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2[J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 64-70.
- [104] Dana H, Novak O, Guardado-Montesino M, et al. Thy1 transgenic mice expressing the red fluorescent calcium indicator jRGECO1a for neuronal population imaging *in vivo*[J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0205444.
- [105] Bethge P, Carta S, Lorenzo D A, et al. An R-CaMP1.07 reporter mouse for cell-type-specific expression of a sensitive red fluorescent calcium indicator[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179460.
- [106] Guo Z V, Hart A C, Ramanathan S. Optical interrogation of neural circuits in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature Methods, 2009, 6(12): 891-896.
- [107] dal Maschio M, Donovan J C, Helmbrecht T O, et al. Linking neurons to network function and behavior by two-photon holographic optogenetics and volumetric imaging[J]. Neuron, 2017, 94(4): 774-789.
- [108] Marshel J H, Kim Y S, Machado T A, et al. Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception[J]. Science, 2019, 365(6453): aaw5202.
- [109] Farah N, Levinsky A, Brosh I, et al. Holographic fiber bundle system for patterned optogenetic activation of large-scale neuronal networks[J]. Neurophotonics, 2015, 2(4): 045002.
- [110] Kampasi K, English D F, Seymour J, et al. Dual color optogenetic control of neural populations using low-noise, multishank optoelectrodes[J]. Microsystems & Nanoengineering, 2018, 4: 10.
- [111] Kampasi K, Stark E, Seymour J, et al. Fiberless multicolor neural optoelectrode for *in vivo* circuit analysis[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 30961.
- [112] Pisanello F, Sileo L, Oldenburg I A, et al. Multipoint-emitting optical fibers for spatially addressable *in vivo* optogenetics[J]. Neuron, 2014, 82(6): 1245-1254.
- [113] Nikolenko V, Fino E, Yuste R. Two-photon mapping of neural circuits[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2011, 2011(5): 111.
- [114] Ward M P, Rajdev P, Ellison C, et al. Toward a comparison of microelectrodes for acute and chronic recordings[J]. Brain Research, 2009, 1282: 183-200.
- [115] Baker C A, Elyada Y M, Parra A, et al. Cellular resolution circuit mapping with temporal-focused excitation of soma-targeted channelrhodopsin[J]. eLife, 2016, 5: e14193.
- [116] Trimmer J S. Subcellular localization of K⁺ channels in mammalian brain neurons: remarkable precision in the midst of extraordinary complexity[J]. Neuron, 2015, 85(2): 238-256.
- [117] Andersen P, Moser E I. Brain temperature and hippocampal function[J]. Hippocampus, 1995, 5(6): 491-498.
- [118] Desai M, Kahn I, Knoblich U, et al. Mapping brain networks in awake mice using combined optical neural control and fMRI[J]. Journal of Neurophysiology, 2011, 105(3): 1393-1405.
- [119] Picot A, Dominguez S, Liu C, et al. Temperature rise under two-photon optogenetic brain stimulation [J]. Cell Reports, 2018, 24(5): 1243-1253.
- [120] McAlinden N, Massoubre D, Richardson E, et al. Thermal and optical characterization of micro-LED probes for *in vivo* optogenetic neural stimulation[J]. Optics Letters, 2013, 38(6): 992-994.
- [121] Cheng P, Tian X, Tang W, et al. Direct control of store-operated calcium channels by ultrafast laser[J]. Cell Research, 2021, 31(7): 758-772.