

## 单物镜光片三维荧光成像技术研究进展(特邀)

张一凡<sup>1,2</sup>, 李辉<sup>1,2</sup>, 杨光<sup>2\*</sup><sup>1</sup>中国科学技术大学生物医学工程学院, 江苏 苏州 215163;<sup>2</sup>中国科学院苏州生物医学工程技术研究所江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163

**摘要** 光片显微镜由于具有强大的光学层切能力、较快的成像速度和较低的光损伤,成为三维成像的重要工具。光片显微镜通常利用两个垂直放置的物镜分别进行照明和成像,这带来了对样品的空间限制并禁用了高数值孔径的成像物镜。以倾斜平面照明和微镜微器件反射技术为代表的单物镜光片显微技术突破上述限制,展示出在高分辨率和体积高速成像方面的优势,并且可与超分辨显微术等多种技术结合,在近年来取得了巨大发展。介绍单物镜光片显微成像技术的原理、关键性能的提升和其在生物医学的应用。

**关键词** 生物光学成像; 光片显微镜; 三维成像; 荧光显微镜

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232562

## Advances in Single-Objective Light Sheet Three-Dimensional Fluorescence Imaging (Invited)

Zhang Yifan<sup>1,2</sup>, Li Hui<sup>1,2</sup>, Yang Guang<sup>2\*</sup><sup>1</sup>School of Biomedical Engineering, University of Science and Technology of China, Suzhou 215163, Jiangsu, China;<sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China

**Abstract** Light sheet microscope is an important tool for three-dimensional imaging owing to its powerful optical section capability, fast imaging speed, and low phototoxicity. This microscope typically uses two objectives that are placed perpendicular to each other for illumination and imaging; however, this structure imposes spatial constraints and prohibits the use of an imaging objective with high numerical aperture. These limitations were resolved using single-objective light sheet microscopy techniques, such as oblique plane illumination and micromirror microdevice reflection, demonstrating potential for high-resolution and volumetrically high-speed imaging. Furthermore, these techniques can be combined with various other techniques, such as super-resolution microscopy, which has made great progress in recent years. This review article introduces the principles, key performance enhancements, and biomedical applications of single-objective light sheet microscopy.

**Key words** bio-optics imaging; light sheet microscope; three-dimensional imaging; fluorescence microscope

## 1 引言

光学显微镜的出现使人们对生命科学研究达到细胞尺度,成为生命科学研究中不可或缺的工具。20世纪80年代,共聚焦显微镜和双光子显微镜的出现赋予了显微镜三维解析的能力,通过三维成像可以获得生物样品的完整结构,时至今日已成为生物学发

展的重要工具。但共聚焦显微镜和双光子显微镜需要高强度的光源照射样品,会带来光毒性和光漂白,不适合进行长时间成像。2004年相关研究人员提出了一种新型的三维成像技术,即光片显微镜(LSM),也选择平面照明显微镜。激发光经柱透镜在样品上形成一层薄薄的“光片”,这样限制了激发光照明的范围,减少了光损伤和光漂白<sup>[1]</sup>。2008年数字激光扫描显微镜

收稿日期: 2023-11-24; 修回日期: 2023-12-11; 录用日期: 2023-12-26; 网络首发日期: 2024-01-10

基金项目: 国家自然科学基金(62205368)

通信作者: \*yangg@sibet.ac.cn

(DLSM)利用振镜使聚焦的高斯光束快速扫描过样品,是另一种形成光片的方法<sup>[2]</sup>。光片显微镜可以做到快速三维成像,同时其光毒性相较于共聚焦或多光子成像降低了3个数量级,使针对活体的长时间成像成为可能。光片显微镜可以根据不同的应用场景进行定制,迅速在生物学研究中普及,用于胚胎发育学、神经生物学、肿瘤学等多领域,是活体长时间三维成像的巨大进步<sup>[3]</sup>。

传统光片显微镜的构造可分为两个部分,照明光路和探测光路。光片显微镜通常需要两个正交的物镜,如图1(a)所示。但双物镜的使用给系统带来了一系列的问题,例如光片显微镜的样品装载手段五花八门,有的方法十分复杂,不能使用常用的载玻片,限制了样品种类和安装。同时正交光片显微镜需要物镜有较长的工作距离,而商用高数值孔径(NA)的物镜工

作距离很短,双物镜在成像过程中直接限制了高分辨率图像的获得。此外,光片显微镜的两个光路间还需要精确对焦。上述问题降低了光片显微镜的适用性,阻碍了其进一步的推广<sup>[4]</sup>。

为了解决上述问题,研究人员于2008年提出了倾斜照明光片显微成像技术(OPM),基于这种技术的光片显微镜利用反射镜将照明光路引入原先成像物镜所在光路,使用同一物镜进行照明和收集荧光<sup>[5]</sup>。如图1(b)所示,该方法可以使用大数值孔径的物镜,并突破了样品端的几何限制,可以使用载玻片等常用的样品装置。目前,大多数的单物镜光片显微镜都是基于OPM开发的。除OPM外,另一种方法是将45°倾斜的显微镜设计在一个微器件上,如图1(c)所示,使通过物镜形成的光片可以直接与焦平面对准,不需要引入额外的远程聚焦系统,直接成像在相机上<sup>[6]</sup>。

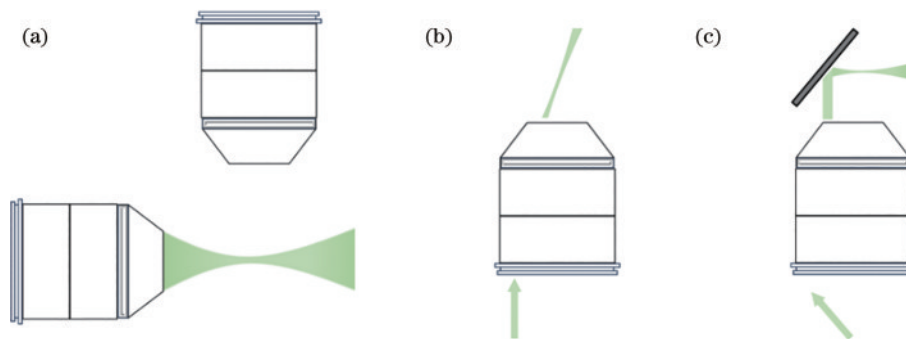


图1 两种单物镜光片照明方式与传统光片的照明方式。(a)传统的光片显微镜,两个物镜正交放置,一个用于照明,一个用于成像;(b)倾斜平面照明显微镜,直接将照明光引入物镜,在样品表面形成倾斜的光片,适配于载玻片装载的常规样品;(c)应用于微器件通道的单物镜光片,将倾斜45°反射镜设计在微器件上,形成的光片直接垂直于光轴

Fig. 1 Two single-objective light sheet illumination methods and the conventional light sheet illumination method. (a) Conventional light sheet microscope consisting of two objective lenses placed orthogonally, one for illumination and another for imaging; (b) tilted planar illumination microscope in which illuminating light is introduced directly into the objective lenses to form a tilted sheet of light on the sample surface, adapted to conventional samples loaded on slides; (c) single-objective light sheet applied to a microdevice channel in which 45°-tilt reflective micromirrors are designed to be placed in the micro device, and the formed sheet of light is directly perpendicular to the optical axis

早期的单物镜光片显微镜也受到了诸如时空分辨率、成像体积、方便易用性等问题的限制。为了提升单物镜光片显微镜的性能,使光片显微镜更有力地推动生命科学的进步和发展,研究人员提出了多种基于单物镜的光片显微成像方法。这些新型单物镜光片显微镜的出现很大程度上解决了上述问题,拓宽了光片显微镜的应用场景。同时,单物镜光片显微镜有潜力将多种尺度的成像需求用一台显微镜来完成,并可以和商用的倒置显微镜兼容,这有利于光片显微镜的商业化推广。

本文介绍了不同类型的单物镜光片显微镜的光学设置、工作原理及三维图像获取,介绍了单物镜光片显微镜的性能提升,增扩应用场景。并介绍了单物镜和超分辨显微术的结合,分析了超分辨显微术在单物镜光片显微镜中的优势。

## 2 倾斜平面照明显微镜

传统的选择平面照明显微镜由两个正交的物镜构成,双物镜的放置占用了几何空间,不适用于盖玻片样品的成像。使用一物镜引入光片的同时使用另一个相同物镜进行成像则可以解决上述问题。Konopka等<sup>[7]</sup>设计了可变角度的落射光荧光显微镜,使用与成像同一个高NA的物镜输出可变角度的倾斜照明光,减少了荧光背景,提高了信噪比。Tokunaga等<sup>[8]</sup>利用高度倾斜和层压光学片显微镜,使用细的倾斜光束对细胞中的单个分子进行成像。这样斜入射的照明光可以增加图像的对比度,降低了光漂白程度,但这种显微镜照明光束从物镜光瞳边缘入射,照明方向与焦平面成一定倾斜角度,由于倾斜面像差的存在,真正能用于成像的只有焦平面与照明光束所相交的那条“线”,

而不是面。

### 2.1 倾斜平面照明显微镜的实现

为了解决倾斜照明平面与焦平面不重合的问题,2008年 Dunsby<sup>[5]</sup>发明了倾斜光片照明显微镜。如图 2 所示,将柱透镜生成的片状照明光引入原先探测物镜

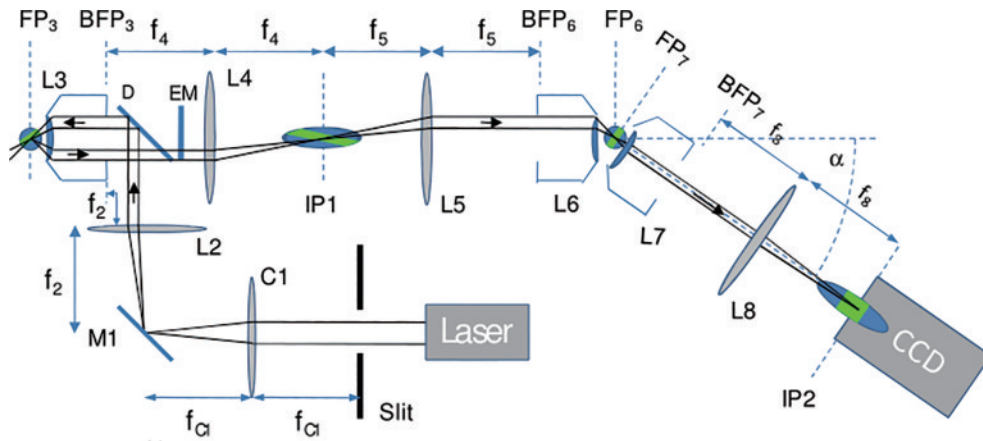


图 2 倾斜平面照明显微镜光路,用同一物镜生成光片并成像,引入远程聚焦系统修正照明角度倾斜<sup>[5]</sup>

Fig. 2 Optical path diagram of an oblique plane illumination microscope, with an objective lens used to generate the light sheet and imaging, and the introduction of a remote focusing system to correct the aberration<sup>[5]</sup>

光片显微镜由于出色的光学切片能力,可以在长时间内对活体样品进行三维成像。其获得三维图像的方法也十分简单,只需要把采集的单个二维光片图像配准堆栈,即可获得高分辨率的三维图像。光片显微镜的体积成像速度远优于共聚焦、多光子等显微镜。倾斜平面照明显微镜保留了光片显微镜的三维成像优点的同时,单物镜光片显微镜的一级物镜焦平面不需要配准,在保持中间像面位置固定的情况下,移动光片的位置也可以做到三维成像。

在传统光片显微镜中,光片生成的方法有两种,一种是利用柱透镜直接生成实体光片,另一种则是利用检流计振镜快速扫描实现虚拟的光片。这两种设计各有优点。利用柱透镜生成光片的方法成本低,适用性高。而扫描光片的生成方式则具有照明均匀、能量利用效率高的优点,并且可以使用贝塞尔光束、艾里光束等无衍射光束增大光片显微镜的视场和穿透深度<sup>[11]</sup>。在正交光片的构型中,扫描光片的生成方式占主要地位。而在现有的 OPM 中,为了简单方便,柱透镜生成光片的方式占据主要地位。同时,扫描光片的生成方式也在 OPM 中有所应用。Shin 等<sup>[12]</sup>将双光子贝塞尔光束使用在倾斜照明光片显微镜中,增大了穿透深度。值得注意的是,在单物镜中实现倾斜光片的扫描需要将振镜放置于傅里叶面处。倾斜光片显微镜的堆栈获得的三维图像的结果是倾斜的,最近 Lamb 等<sup>[13]</sup>开发的开源软件可用于三维图像的可视化和去倾斜,增加了用户处理图像的便利性。

### 2.2 倾斜光片三维成像扫描方式

在光片显微镜中,获得三维图像的方法通常是移

动载物台使光片扫过样品的各部分。这种策略在单物镜中依然适用,2008年 Dunsby 的倾斜照明光片显微镜中位移台以  $0.5 \mu\text{m}$  的步长步进移动样品,获得了成像体积为  $190 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  的三维图像。通过移动样品获得三维图像是有缺陷的,首先这种方法受限于样品的体积且运动的不稳定性会耗时严重,其次会引入运动伪影,造成图像质量下降。Kumar 等<sup>[14]</sup>于 2011 年对初代倾斜平面照明显微镜进行了改进,将物镜压电移动平台安装在二级物镜处,通过移动二级物镜改变光片的位置实现三维扫描。该方案以物镜压电运动代替了样品移动,减少了运动模糊,提高了体积成像速度。

在获得大体积三维图像的方法中,除了移动硬件,另一个更高速的方法是利用检流计振镜。检流计振镜可以使照明光片快速扫过样本,该方法具有更快的成像速度并且比机械运动更稳定。这样扫描方式的关键是要使用扫描光片的振镜对返回的荧光进行扫描,这样就可以保持中间像面的稳定。2015 年, Bouchard 等<sup>[15]</sup>率先利用定制六边形振镜开发的平面扫面共焦 (SCAPE) 显微镜,对聚焦在样品上的单个物镜发射的倾斜光片平面利用振镜进行横向扫描,同时该六边形振镜还可以对返回的成像的光路进行去扫描,保持第二、三物镜间原有像面位置的稳定。该方法大大提高了三维成像速度,可以  $20 \text{ volume/s}$  的速度成像。SCAPE 显微镜将高速三维体积成像带入了一种新时代,该类显微镜可以捕捉三维状态下的快速的生命活动,目前已广泛应用于神经活动、生物力学运动的三维观察<sup>[16]</sup>。SCAPE 的影响甚至超出了生命科学的范围,

在获得大体积三维图像的方法中,除了移动硬件,另一个更高速的方法是利用检流计振镜。检流计振镜可以使照明光片快速扫过样本,该方法具有更快的成像速度并且比机械运动更稳定。这样扫描方式的关键是要使用扫描光片的振镜对返回的荧光进行扫描,这样就可以保持中间像面的稳定。2015 年, Bouchard 等<sup>[15]</sup>率先利用定制六边形振镜开发的平面扫面共焦 (SCAPE) 显微镜,对聚焦在样品上的单个物镜发射的倾斜光片平面利用振镜进行横向扫描,同时该六边形振镜还可以对返回的成像的光路进行去扫描,保持第二、三物镜间原有像面位置的稳定。该方法大大提高了三维成像速度,可以  $20 \text{ volume/s}$  的速度成像。SCAPE 显微镜将高速三维体积成像带入了一种新时代,该类显微镜可以捕捉三维状态下的快速的生命活动,目前已广泛应用于神经活动、生物力学运动的三维观察<sup>[16]</sup>。SCAPE 的影响甚至超出了生命科学的范围,

有研究人员用 SCAPE 研究自然中的动力学现象<sup>[17]</sup>。但是该扫描方式在光片横向移动的过程中会带来光片倾斜角度的改变,如图 3(a)所示,这会造成一定的三维图像失真。

2018 年 Shin 等<sup>[12]</sup>在设计中加入一块可用于扫描的玻璃平板,使光片沿横向平行移动,如图 3(b)所示。不过这种构造会引入额外的光学像差,降低图像质量。SOPI-OPM<sup>[18]</sup>则用平面振镜代替了六边形振镜,如图 3(c)所示,去扫描的同时保持光片平行移动,解决了 SCAPE 显微镜图像失真的问题,能以 20 volume/s

的速度获得大视场图像。Bouchard 等又开发了 SCAPE 2.0<sup>[19]</sup>。SCAPE 2.0 同样使用了该轴向不变扫描方法,将图像的获取速度提高到了新的数量级,成像速度可以达 200 volume/s。值得注意的是,振镜的扫描范围相比移动样品检测范围更为有限,表 1 给出了一些典型的扫描方式的速度与视场范围的比较。DaXi-OPM 开发了名为 LS<sup>3</sup> 的扫描方式,将振镜扫描和位移台连续移动的方式结合,通过对时序的精准控制,在无模糊的情况下可以对较大范围进行快速扫描<sup>[20]</sup>。

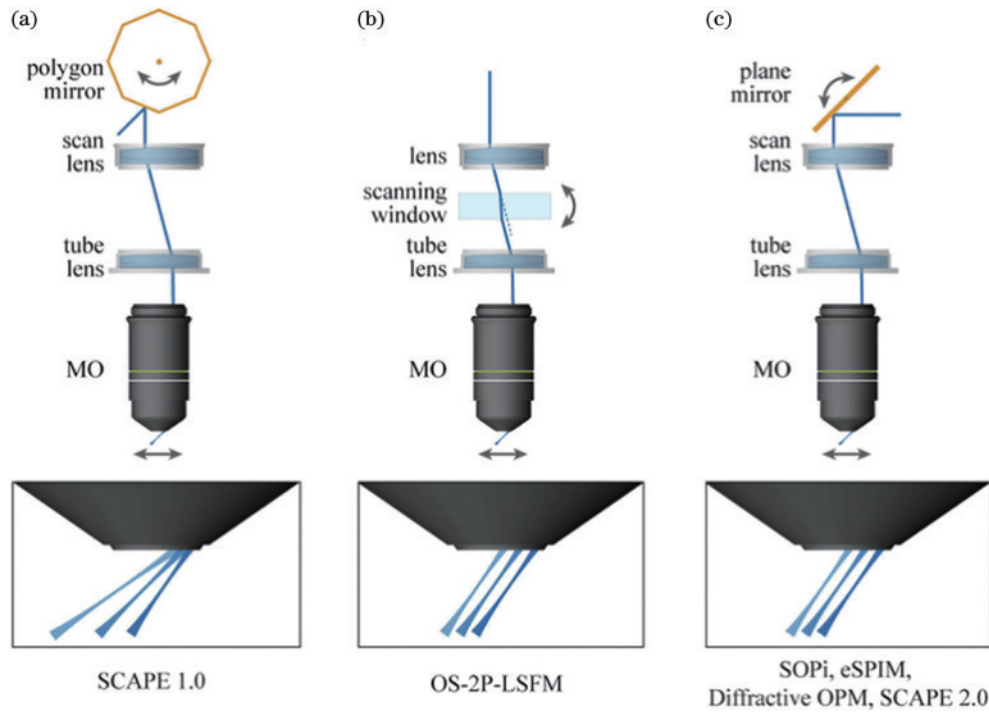


图 3 几种光片的扫描方式示意图<sup>[21]</sup>。(a)SCAPE 1.0; (b)OS-2P-LSFM; (c)SOPI、eSPIM、DOPM 和 SCAPE 2.0

Fig. 3 Schematic representation of the scanning modes of several light sheet microscopies<sup>[21]</sup>. (a) SCAPE 1.0; (b) OS-2P-LSFM; (c) SOPI, eSPIM, DOPM, and SCAPE 2.0

表 1 几种典型的倾斜平面显微镜的扫描方式和特点

Table 1 Scanning modes and characteristics of several typical oblique plane microscopes

Name	Scanning mode	Speed	Range
OPM <sup>[5]</sup>	Sample displacement stage step movement	Slow	Wide
OPM <sup>[14]</sup>	Secondary objective step movement	Relatively fast	Wide
SCAPE <sup>[15]</sup>	Hexagon galvo scanning	Fast	Narrower
OS-2P-OPM <sup>[12]</sup>	Glass windows scanning	Fast	Narrower
SOPI-OPM <sup>[21]</sup>	Galvo scanning	Fast	Narrower
DaXi-OPM <sup>[20]</sup>	Galvo scanning and stage continuous movement	Relatively fast	Relatively wide

### 2.3 多视图光片成像

实际成像过程中,光片要穿过样品,而样品不可能完全透明,散射、吸收等问题所导致的光衰减是不可避免的,尤其在脑组织等复杂的生物样品组织中散射会导致图像质量快速下降。多视图光片显微镜时至今日是一种成熟的方案,多视图方法成像时利用两个或多个不同方向的光片照明获得多个视角下的图像,通过图像融

合算法将多幅图像组合在一起,可以有效减少散射引起的伪影,并获得各向同性的分辨率的图像<sup>[22-23]</sup>。目前这些算法已经成熟,并有多个 imageJ 插件供人使用<sup>[22, 24-25]</sup>。Sparks 等<sup>[26]</sup>开发了双视图的 OPM,利用两个方向正交穿过样品的光束,通过棱镜同步扫描获得两张相对照明图像,再通过图像算法将两幅视场相同的图片融合获得高质量的图像,实现了倾斜平面照明的多视图照明。通

常光片照明的多视图方法由于照明方向的限制,需要旋转样品或者多个相机完成拍摄,而单物镜多视图方法通过简单扫描在同一相机上完成成像。

### 3 倾斜平面照明显微成像中的视场与分辨率限制因素

#### 3.1 空间分辨率

通常宽场显微镜的横向分辨率利用瑞利判据表示为

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

式中:  $\lambda$  为照明光波长;  $NA$  为数值孔径, 其大小是介质折射率与物镜孔径角的乘积。在宽场条件下光学分辨率的极限约为 200 nm。OPM 虽解决正交光片显微镜不可使用高数值孔径物镜的问题, 但在 OPM 的实际使用中, 其物镜高数值孔径并不能被完全利用。有效数值孔径减小的原因分为两部分: 首先, 由于使用同一个物镜用于照明和成像, 这意味着照明光束会分占一部分数值孔径, 如图 4(a) 所示; 其次, 在远程聚焦系统中, 第二物镜与第三物镜是倾斜放置的, 这使得经第二物镜的光并不能完全中继到第三物镜上。实际用于收集荧光的孔径角大小可表示为

$$\varphi_{em} = 2\theta - \frac{\pi}{2} - \varphi_{ex}, \quad (2)$$

式中:  $\varphi_{ex}$  为激发光所占孔径角;  $\varphi_{em}$  为实际探测所占的孔径角;  $\theta$  为物镜孔径角的一半。例如, 使用  $NA$  为 1.35 的 60 倍油浸物镜、激发光  $\varphi_{ex}$  为  $3^\circ$  时, 则可以计算出  $\varphi_{em}$  为  $33^\circ$ ,  $\varphi_{em}$  即实际用于成像的孔径角, 计算得到实际有效数值孔径为 0.83。其次二级物镜与三级物镜之间存在工作距离限制, 二级光又只有一部分可以进入三级物镜, OPM 虽然解决了不能使用高数值孔径的问题, 但有效数值孔径仍然不会超过 0.8。

利用点扩散函数 (PSF) 进行系统分辨率的表征, Kim 等<sup>[27-28]</sup>通过对矢量衍射积分的计算, 获得二维 PSF, 如图 4(b) 和图 4(c) 所示。矢量衍射积分计算中, 有效光瞳面积决定 PSF 的数值。二、三级物镜之间存在不对称的光学削波, 导致有效光瞳面积的不对称减小。Kim 等模拟了多种高数值孔径物镜、不同倾角照明下的理论 PSF, 模拟结果显示 PSF 呈椭圆形。值得注意的是: 在照明倾角角度较小时, PSF 形状变化并不明显; 在大于  $45^\circ$  后, 椭圆离心率快速增加; 倾角为  $90^\circ$  时, 该设计被称作轴向平面光学显微镜, 可以用于对轴向平面的直接观测<sup>[27]</sup>。

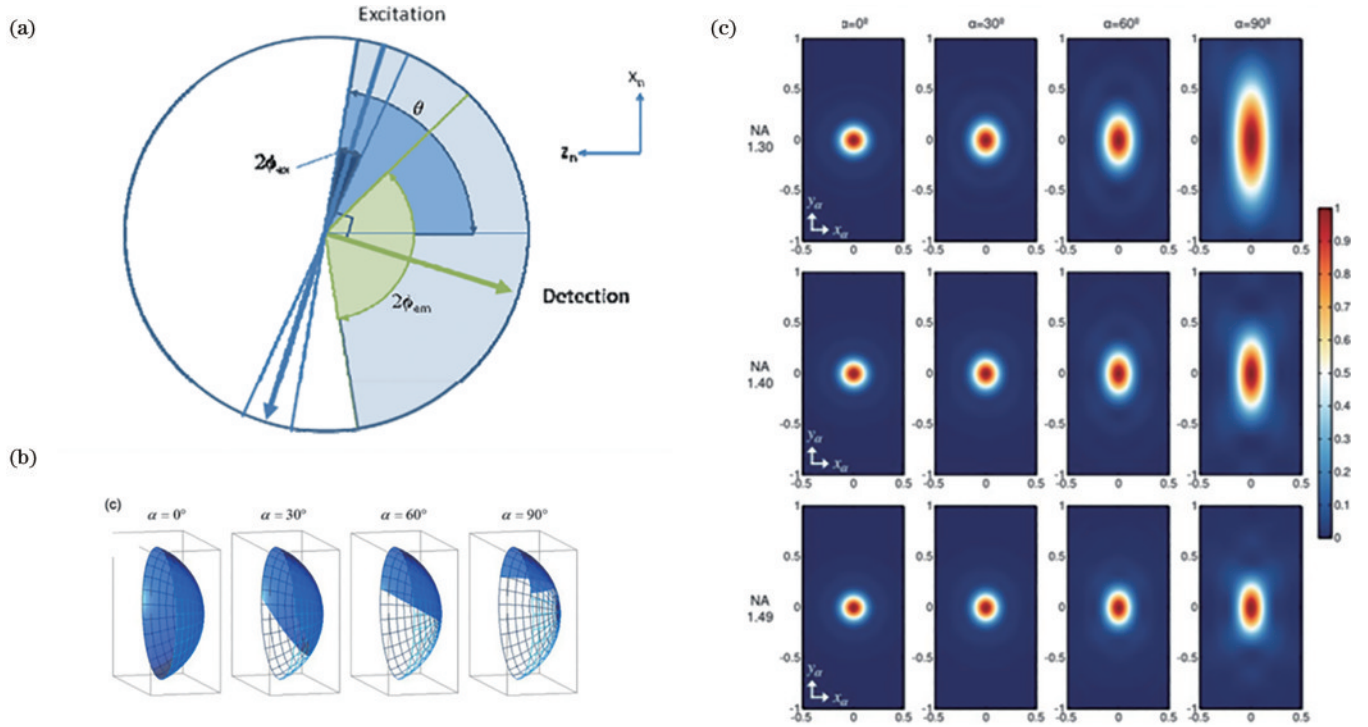


图 4 OPM 中的数值孔径减小与分辨率仿真。(a) 初级物镜的照明角度与收集的关系图解<sup>[5]</sup>; (b) 不同倾斜角度下有效光瞳面积的示意图, 其中  $NA=1.4$ , 折射率  $n=1.52$ ; (c)  $NA=1.30, 1.40, 1.49$ , 倾斜角分别为  $0^\circ, 30^\circ, 60^\circ, 90^\circ$  的情况下对 PSF 进行仿真的结果<sup>[28]</sup>

Fig. 4 Numerical aperture reduction and resolution simulation in OPM. (a) Illustration of illumination angle of the primary objective lens versus collection<sup>[5]</sup>; (b) schematic representation of the effective optical pupil area at different tilt angles at  $NA=1.4$  and  $n=1.52$ ; (c) simulation of PSF with  $NA=1.30, 1.40, 1.49$  and tilt angles of  $0^\circ, 30^\circ, 60^\circ, 90^\circ$ <sup>[28]</sup>

一个解决倾斜平面照明显微镜分辨率降低的方案是减小二、三级物镜之间的相位损失。Yang 等<sup>[29]</sup>于

2019 年提出的 E-OPM 通过在三级物镜之前增加一个类似“水箱”的设计, 利用水和空气的折射率差, 将更多来自

二级物镜的光折射进三级物镜。这提升了数值孔径的利用率,可使有效数值孔径达 1 以上,相较于之前,提高了 2~3 倍。Sapoznik 等<sup>[30]</sup>使用开发了玻璃尖端的三级物镜代替上述三级物镜的水箱和盖玻片。该类的三级物镜通常被称作“Snouty”,目前,该物镜可以工业化生产,如图 5(a)所示,使用该物镜的系统的理论分辨率可以达到 200 nm,接近光学显微镜的衍射极限。该三级物镜被用在近年的几款 OPM 上并表现了良好的性能。

照明光片的倾角很大程度上影响了 OPM 的分辨率与视场范围,随着照明倾斜角度的增大,可以选择高数值孔径的初级物镜。而过小的照明倾角可能在单物镜的照明配置中无法实现,这取决于照明物镜的数值孔径<sup>[31]</sup>。照明倾斜角度越大,则物镜的发射光片成像位置会越深,视场会越大。而如果选择较小的照明倾角,分辨率会具有更大优势,搭配 Snouty 物镜,当照明倾角小于 18°时,不会发生光学削波。此外,研究人员在使用中希望束腰位置与显微镜的景深位置重合,NA 为 1.35 的物镜的合适倾角约为 30°。在实际使用中照明倾角的选择还需要研究人员具体权衡<sup>[30]</sup>。

近几年来,还存在一些新型的减小光在二、三级物镜传输过程中的相位损失的方案。2022 年,Cai 等<sup>[32]</sup>在二、三级物镜之间加入了微镜阵列,该设备的二、三级物镜正交放置,光信息集中在某一块微镜上并传递给探测物镜,如图 5(b)所示,实验证明该系统可以达到 540 nm 分辨率。

### 3.2 成像视场

二、三级物镜远程聚焦系统不但带来了分辨率上的影响,而且影响了显微镜的视场范围。当研究人员针对比较大的样本如线虫、斑马鱼、组织研究生命活动的过程时,要求显微镜拥有一个较大的视场。

通常在显微成像方法中常常要对分辨率、视场、成像速度等关键性能做出取舍。光片显微镜的成像轴向分辨率的表达式为

$$R = 2\omega_0 = \frac{\lambda}{\pi\theta} = 2 \frac{2\lambda f}{\pi D} = 2 \frac{n\lambda}{\pi NA}, \quad (3)$$

式中: $R$ 为光片的厚度; $\omega_0$ 为束腰半径; $f$ 为物镜焦距; $D$ 为物镜孔径; $\theta$ 为激光发散角。光片显微镜的视场(FOV)大小为 $b$ ,与瑞利范围 $Z_r$ 有关,表达式为

$$b = 2Z_r = 2 \frac{\omega_0}{NA} = 2 \frac{\pi\omega_0^2}{\lambda}. \quad (4)$$

通过式(3)和式(4)可以得知,光片显微镜的轴向分辨率和视场是相互制约的。式(4)对倾斜照明光片依旧适用,也就意味着如果想要获得更大视场的图像,就要选择更小 NA 的物镜。在正交光片显微镜中,如果选用数值孔径较小的照明物镜与探测物镜,可以设计出视场范围为 5 mm 的光片显微镜。在倾斜光片显微镜中,远程聚焦系统的存在成为了视场限制的主要原因。二级物镜与三级物镜间存在一个倾角,以确保

倾斜像平面可以直接通过相机成像。为了保持主成像系统的视场,第三物镜必须具有相同或更低的数值孔径,这种重新成像的几何形状必然会有一定的损耗,部分光会在二、三级物镜传播时丢失,如图 5(d)所示。当 $NA \leq 0.5$ 时,这些光会完全丢失,这意味着无法使用大视场成像所需的低数值孔径物镜,理论上限制了 OPM 的视场不会超过 1 mm。

倾斜平面显微镜中视场依旧定义在笛卡儿直角坐标系下,其中 $x$ 方向的视场一般是扫描的方向,在这个方向主要受到光扫描条件机械的制约, $y$ 和 $z$ 方向的视场则主要受光片照明的形状限制。一种增大视场的方法是扩展平面成像。在具有双物镜的光片显微镜中,光学平铺的方法在 2014 被 Dean 等<sup>[33]</sup>用于声光可调聚焦透镜,在使用高 NA 物镜的情况下,扩展聚焦在横向范围内实现光学平铺,这样产生的光片质量非常均匀,既扩大了光片显微镜的视场,又保留了高分辨率图像。Gao<sup>[34]</sup>通过将该方法与振镜相结合,可以在轴向上实现虚拟光片的平铺,使相对较小的激光照明平面扩展到多个位置来实现大样本的成像。这种方法也应用到 OPM,用两对振镜进行双轴扫描获得初级物镜的全部视场,该设计在保持高分辨率的情况下,将原有 300  $\mu\text{m}$  视场拓展到 800  $\mu\text{m}$ 。

Hoffmann 等<sup>[35]</sup>设计了一种衍射倾斜平面照明显微镜,将具有特定闪耀角的反射闪耀光栅与光片以相同的倾斜角度插入二级与三级物镜的原像平面位置处,从而反射一衍射级次的光,可以做到被三级物镜完全收集,如图 5(d)最右图所示。Hoffmann 的装置解决了不能使用低 NA 物镜和二、三级物镜光束丢失的问题,获得了 3.3 mm( $y$ ) $\times$ 3 mm( $z$ )的大视场,与以往成果相比,提升了几个数量级。不过该光片显微镜的光利用效率有限,并且降低了分辨率。2020 年 Shao 等<sup>[36]</sup>又设计了 Meso-OPM,利用 Scheimpflug 条件通过利用高度倾斜的入射光片绕开低 NA 物镜的限制,同时对一次像面位置的图像进行缩放,获得了 5 mm $\times$ 6 mm 的视场,这是迄今为止已报道的倾斜光片照明的最大视场范围。不过,该大视场方法牺牲了轴向分辨率。Shao 等<sup>[37]</sup>又对 Meso-OPM 进行了优化,在保持了几毫米量级的视场范围的情况下,通过插入透射光栅,改进了 Meso-OPM 大视场下轴向分辨率差的缺点。

在二、三级相位损失的解决方案中,最近存在一些更新颖的解决方案,取消了远程聚焦系统。Levoy 等<sup>[38]</sup>和 Xu 等<sup>[38-39]</sup>设计的 computation single-objective scanning light sheet(cSOLS)直接在探测光路中增加了一个微透镜阵列,如图 5(c)所示,结合光场显微镜光场计算的方法,该方法可以获得 1.59  $\mu\text{m}$  $\times$ 1.92  $\mu\text{m}$  $\times$ 1.39  $\mu\text{m}$  的视场范围。Liu 等<sup>[40]</sup>的工作在二、三级物镜间插入一个椭球镜,如图 5(e)所示,增大了显微镜视场。

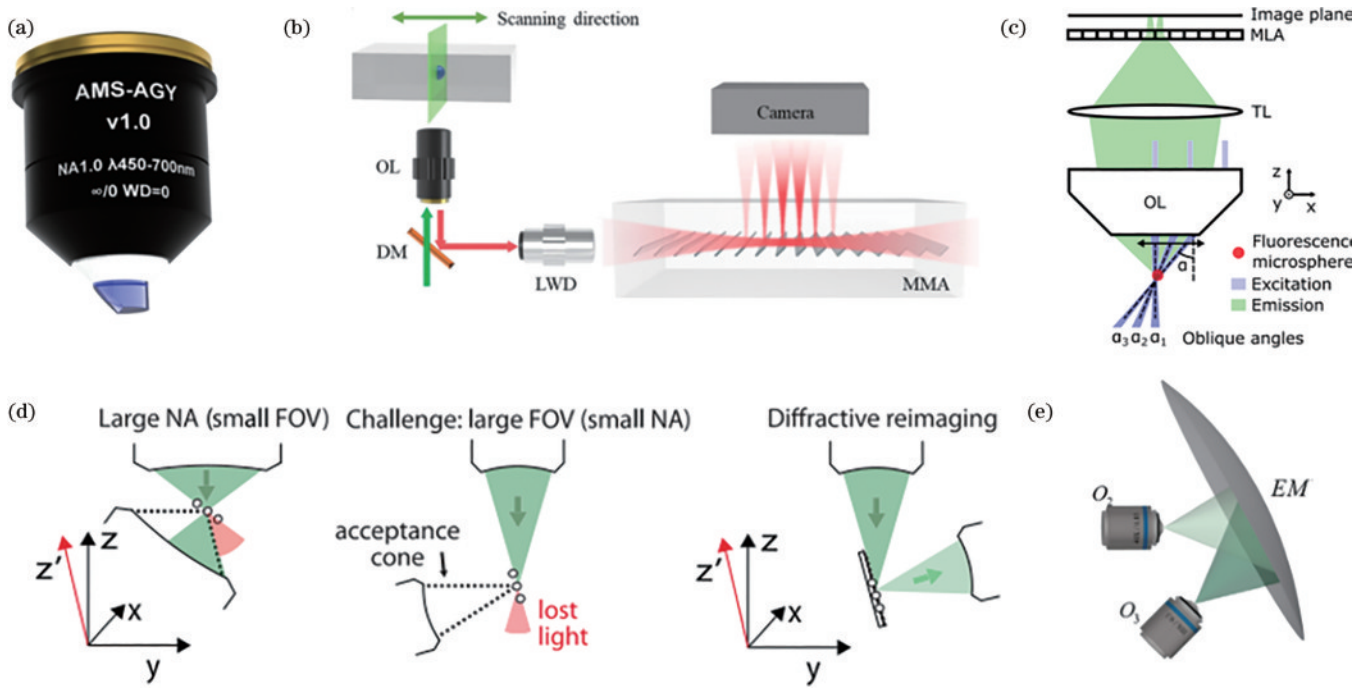


图 5 几种提升 OPM 性能的方法。(a) 玻璃尖端的三级物镜；(b) 利用微镜阵列增加分辨率<sup>[32]</sup>；(c) 加入微透镜阵列，通过计算方法直接成像<sup>[39]</sup>；(d) 二级光锥损失示意图，低数值孔径物镜光锥全部丢失，引入光栅反射对光束进行重新定向<sup>[35]</sup>；(e) 插入椭球镜改善视场<sup>[40]</sup>

Fig. 5 Several ways to improve OPM performance. (a) Commercial tertiary objective with glass tip; (b) increased resolution by using micromirror array<sup>[32]</sup>; (c) incorporation of microlens array for direct imaging by computational methods<sup>[39]</sup>; (d) schematic of secondary light cone loss. All the light cones of the low numerical aperture objective are lost. Introduction of grating reflection to redirect the beam<sup>[35]</sup>; (e) improvement of the field of view by insertion of ellipsoidal mirrors<sup>[40]</sup>

### 3.3 倾斜平面照明显微镜的生物医学应用

光片显微镜自出现以来，依靠极低的光毒性常被用于活体胚胎等大样本的长时间发育成像等。光片显微镜的成像限制也成了研究人员开发单物镜光片的初衷，单物镜光片显微镜的发展不仅增加了生命科学研究人员的使用便利性，也拓展了生命科学中多种之前不可能实现的场景中的应用，使光片显微镜在活体成像上的优势更为明显。

单物镜光片显微镜将振镜扫描的方式带入光片显微镜的三维成像，将体积成像速度带入新的量级，使体积成像可以只受相机帧速限制。这在很多高速生命活动如神经活动、心脏跳动及血流动力学等方向需要毫秒级时间分辨率的观测是充满希望的。钙火花是细胞内钙离子快速释放的微小物质，是心脏收缩活动的基础，钙火花的持续时间通常在 10~40 ms。图 6(a) 所示 Kumar 等<sup>[14]</sup>开发的设备以 21 volume/s 的体积成像速度实现了对钙火花的 3D 成像。Sapoznik 等<sup>[30]</sup>也演示了心肌细胞收缩活动中的钙波的传输，如图 6(b) 所示。随着 SCAPE 显微镜的出现，体积成像的速度迈入了新的数量级。2019 年 Voleti 等<sup>[19]</sup>开发的 SCAPE 2.0 演示了 321 volume/s 下心脏活动的血流学，如图 6(c) 下部分所示，对运动轨迹进行颜色编码，可以精确追踪红细胞由心房到心室的运动轨迹。

自 Andrew G. York 设计的带有玻璃尖端的三级物镜被 ASI 公司工业化生产以来，多款最新的 OPM 系统都使用了该三级物镜。使用该三级物镜的 OPM 系统用于成像的有效数值孔径可以达到 1.0 以上。如图 7(a) 所示，这类系统的横向分辨率可以达到 200 多纳米，可用于对亚细胞结构的高分辨率成像。

高通量光片显微镜在研究大规模样本时有着不可替代的作用，而单物镜的光片显微镜在设计之初就被认为是一种有潜力的高通量成像技术。Ugawa 等<sup>[41]</sup>结合声流控聚焦，设计了多色 3D 成像流式细胞术，如图 7(b) 所示，以超过每秒 2000 个细胞的速度检测细胞。图 7(c) 所示 DaXi-OPM 也实现了对 9 个斑马鱼胚胎的同时成像<sup>[20]</sup>。Maioli 等<sup>[42]</sup>使用商用 96 孔版对 16 个视场进行 3D 延时成像，可以 10 min 间隔完成长时间成像。这类高通量设备是接下来单物镜光片设备发展的潜力所在，可以发挥光片显微镜的快速体积成像能力。

OPM 在几何上只占一个方位，不仅在生命科学实验室中有应用，也在医学检验中有所应用。Patel 等<sup>[43]</sup>开发了一款 Medi-SCAPE，其可利用人体细胞微弱的自发荧光进行活体肿瘤监测，得益于单物镜的光学结构，可以通过手持探头在待测样本处随意游走，如图 7(d) 所示。该系统可以用于医学检查，提升了肿瘤活检的时效性。近年来 Yi 课题组<sup>[44-47]</sup>将 OPM 应用于

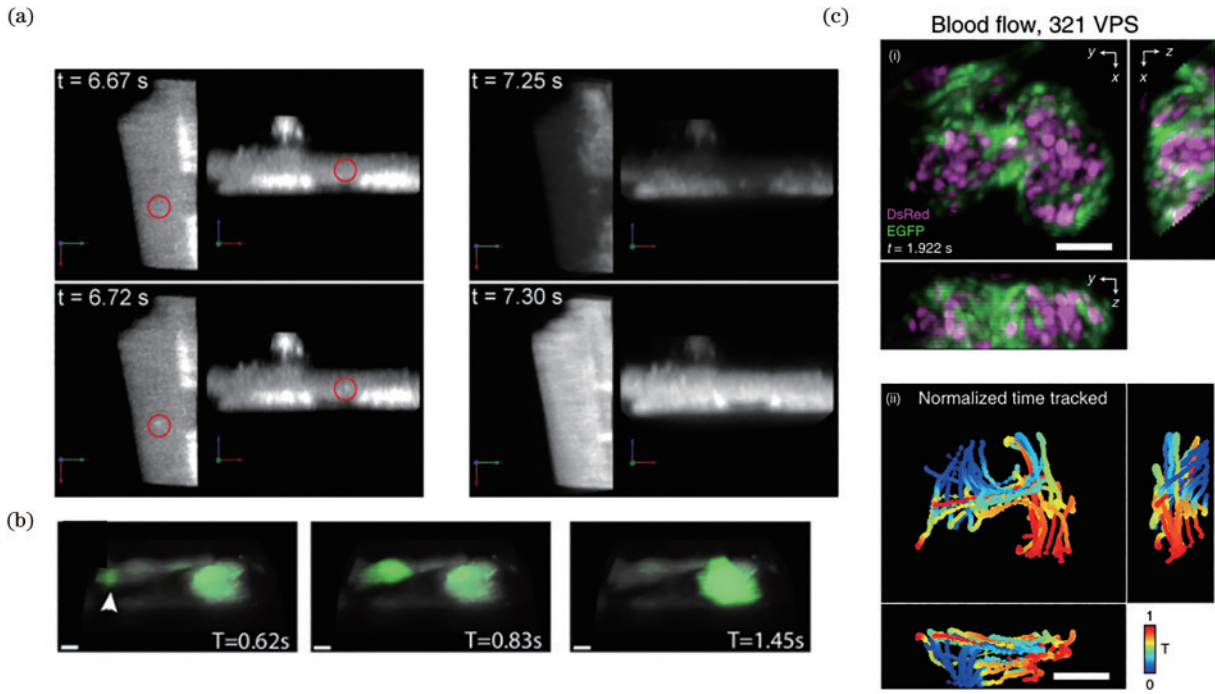


图 6 倾斜平面照明显微镜用于快速生命活动成像。(a)OPM 实现对心脏中钙火花的 3D 成像<sup>[14]</sup>；(b)OPM 实现对心肌收缩钙波传播的观测<sup>[30]</sup>；(c)SCAPE 2.0 以 321 volume/s 的体积成像速度实现对心脏与心房间的血流动力学观测<sup>[19]</sup>

Fig. 6 Oblique plane illumination microscope for fast vital activity imaging. (a) OPM enables 3D imaging of calcium sparks in the heart<sup>[14]</sup>; (b) OPM enables observation of calcium wave propagation in cardiac contractions<sup>[30]</sup>; (c) SCAPE 2.0 enables hemodynamic observation of the heart and atria at a volumetric imaging speed of 321 volume/s<sup>[19]</sup>

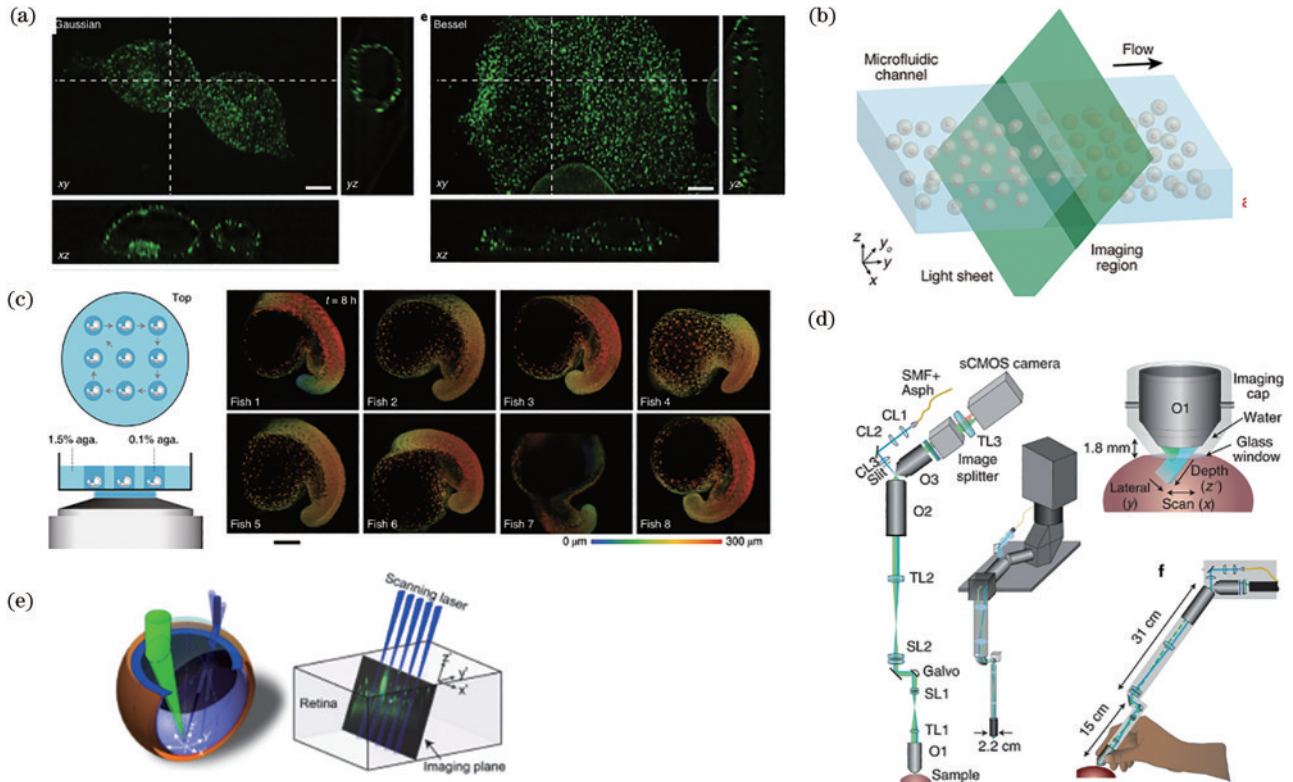


图 7 OPM 在生命科学与医学检查场景的广泛应用。(a)OPM 的高分辨率成像<sup>[29]</sup>；(b)OPM 用于流式细胞检测<sup>[41]</sup>；(c)DaXi-OPM 实现对 9 个斑马鱼胚胎的同时成像<sup>[20]</sup>；(d)Medi-SCAPE 用于活体肿瘤检测<sup>[43]</sup>；(e)利用人眼作为天然物镜,实现对眼底视网膜成像<sup>[44]</sup>

Fig. 7 Wide applications of OPM in life science and medical examination scenarios. (a) High-resolution imaging with OPM<sup>[29]</sup>; (b) OPM for flow cytometry<sup>[41]</sup>; (c) DaXi-OPM realizing simultaneous imaging of 9 zebrafish embryos<sup>[20]</sup>; (d) Medi-SCAPE for *in vivo* tumor detection<sup>[43]</sup>; (e) imaging of the fundus retinae using the human eye as a natural objective lens<sup>[44]</sup>



眼科成像,开发了倾角激光扫描检眼镜。该系统将人眼当作天然的物镜,如图 7(e)所示,对眼底视网膜进行了三维成像,发挥了 OPM 大视场和体积成像的优势。搭配高速摄像机,该技术可以实现对眼底视网膜的血流动力学检测,也被视为眼底成像检查的新一代潜力技术<sup>[48]</sup>。此外,OPM 的设计还可以与散斑成像技术结合用于对人体毛细血管血流的分析<sup>[49]</sup>。

## 4 基于微镜反射的单物镜光片显微镜

倾斜平面显微镜是最普遍的单物镜的光片显微镜,但是存在倾斜切面引入非各向同性的 PSF、需要额外的远程聚焦系统的问题,这使显微镜结构复杂化。除了倾斜照明平面显微镜,另一类的单物镜光片显微镜则借用了 45° 反射微镜,这一类光片显微镜用同一物镜发射垂直于光轴的照明光片,可以用 CMOS/CCD 直接成像,不再需要额外的远程聚焦系统。

### 4.1 针尖微悬臂反射镜

原先原子力显微镜悬臂的 45° 镜面的反射可以使光片与焦平面对准。2013 年 Gebhardt 等<sup>[50]</sup>开发了一款利用原子力显微镜 (AFM) 臂的反射型光片显微镜,

斜入射的光片在壁上反射照明样品。受到悬臂反射的启发,2018 年 Ponjavic 等<sup>[51]</sup>利用原子力显微镜的单臂开发了一种只使用一个物镜的光片显微镜,将原子力显微镜的单臂当作反射界面,也实现了单物镜光片照明。Li 等<sup>[52]</sup>将 AFM 的显微镜单物镜光片与纳米移液器结合,进行了精确单分子递送研究。这一类显微镜的优点是可以使用高 NA 物镜对多孔板进行成像,并且在移动位移台时不需要对样品进行重新聚焦。

### 4.2 微流控制备微反射镜器件

2015 年 Galland 等<sup>[6]</sup>设计了一款不需要远程聚焦系统、光片方向垂直于物镜光轴的单物镜光片显微镜,该单物镜光片显微镜的光路如图 8(a)所示。该显微镜使用了一种定制化的样品装载容器,将 45° 反射微镜结合在硅片的微孔里。照明光束从物镜后焦面上斜入射,经 45° 微镜反射后形成垂直于光轴的照明光片。该单物镜光片显微镜可以与倒置商用标准显微镜兼容,同时 10× 到 100× 物镜都可以使用,生成的光片厚度为 1.5~5.2 μm,可以方便多种尺度的研究。该系统既可以使用振镜扫描光片,如图 8(a)所示 y 方向振镜扫描,也可以使用柱透镜生成静态光片。

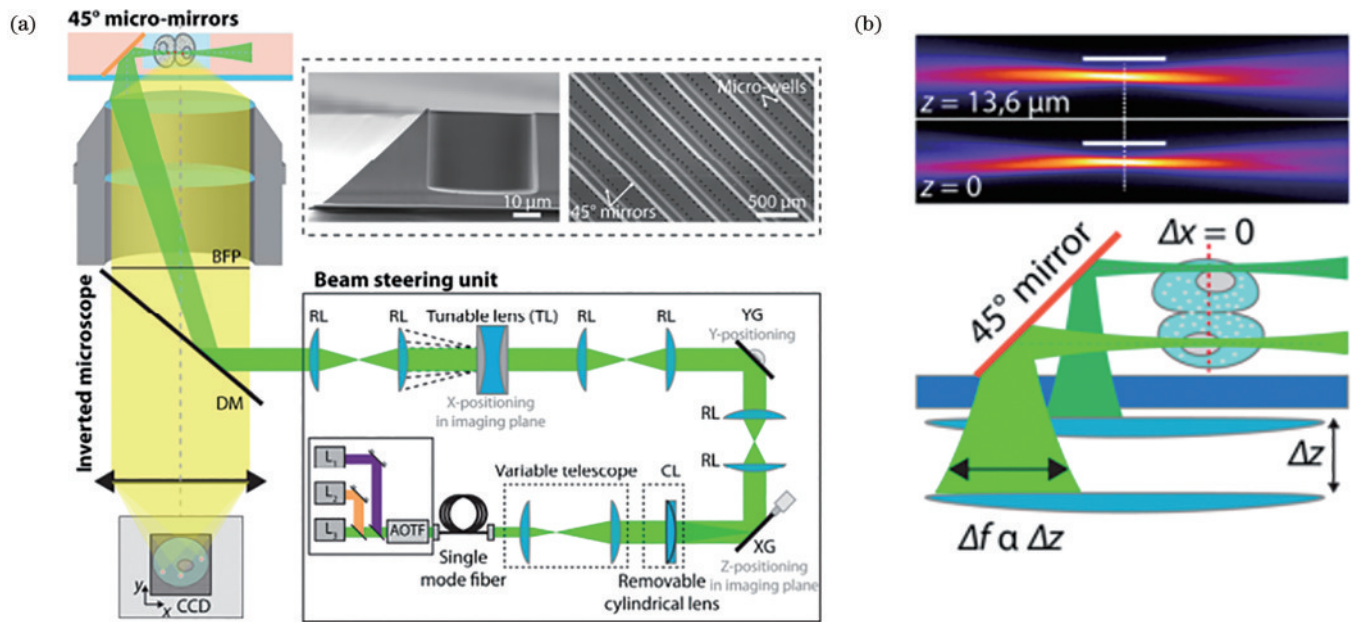


图 8 微镜反射的单物镜光片显微镜<sup>[6]</sup>。(a)基于 45° 微镜的单物镜光片显微镜的光路,右上角为扫描电子显微图像;(b)利用 ETL 进行轴向位移,使光片中心横向位置保持不变

Fig. 8 Single objective light sheet microscope with micromirror reflection<sup>[6]</sup>. (a) Optical pathway of a single objective light sheet microscope based on 45° micromirrors, top right is scanning electron micrograph; (b) axial displacement using ETL to ensure constant lateral position of the optical center

三维图像的获得过程中,物镜相对位置的改变会导致光片中心位置点的改变,需要引入一个可变焦透镜 (ETL) 进行散焦,来补偿  $x$  方向的位移,如图 8(b)所示。该单物镜光片配置支持多种应用需求,可以简单切换不同放大倍数的物镜,可以在同一显微镜上进行相位、差分干涉对比度、大视场、高分辨率和超分辨率成像。并且该单物镜光片显微镜可以使用不同尺寸的镜

室应对不同尺度的样品,并能进行长时间动态观测<sup>[48]</sup>。

生物微器件包括高通量自动化的微流体器件以及体外培养、类器官芯片,与光片显微镜可以结合在一起用于先进生物实验<sup>[53]</sup>。Galland 使用的微器件也属于上述的一种,此后,又出现了多种结合微器件与单物镜光片显微镜的研究方法。Beghin 等<sup>[54]</sup>发明了一种名为 Jewells 的芯片用于类器官培养,每个芯片上存在 96

个类器官,使用该芯片建立了一个高内涵成像平台,在高分辨率的条件下获得大量数据,并训练神经网络,进行定量分析。Meddens 等<sup>[55]</sup>使用由硅晶片微制、具有微流体通道的侧壁装载  $45^\circ$  微镜,获取了高对比度低漂白的全细胞超分辨图像。Miura 等<sup>[56]</sup>使用镜面嵌入 PDMS 微流控芯片,开发了一种单物镜光片荧光成像的流式细胞术,在与传统流式细胞仪相同速度的情况下获得显微图像。

对于带有  $45^\circ$  微镜的微器件,制作成本是技术能否得以推广的重要因素,对此 Zagato 等<sup>[57]</sup>和 Xu 等<sup>[58]</sup>设计了一种更为廉价的制作方法,使用模具生产,质量并没有降低。更多微镜制作的方法超出了本综述的讨论范围,此处不做详细描述。

利用微镜反射形成垂直光片的单物镜光片显微镜不再需要远程聚焦系统,并且可以与倒置商业显微镜联用,针对不同成像要求可以简单切换高倍低倍物镜。如果可以发展微纳加工工艺来降低成本,那可以更大面积地推广光片技术在生物学实验室中的使用。

## 5 单物镜光片显微镜的超分辨成像拓展

超分辨显微术是一种突破传统显微镜分辨率极限的技术,可以将物体结构的分辨率提高到亚细胞水平。现代的超分辨显微术包括了多种技术,如激光受激发射显微术 (STED)、包括 stochastic optical reconstruction

microscopy (STORM) 和 DNA-based point accumulation for imaging in nanoscale topography (PAINT-DNA) 等的单分子光学显微术 (SMLM)、结构照明显微术 (SIM)。依据瑞利判据可分辨的最小范围为  $200\text{ nm}$ ,而超分辨显微镜的出现突破了该极限,超分辨显微镜是近代光学显微镜中最浓墨重彩的一笔。光片的照明方式对多种超分辨方法具有潜在的增益,这十几年间二者深深地联系在一起。

### 5.1 单物镜光片显微镜的单分子定位超分辨成像

典型的单分子方法如 STORM 的原理是:利用荧光染料的发光特性,对荧光染料以少量随机分布的方式激发,然后对发光的荧光染料单个分子进行定位。通过多次成像,将每个分子的位置累加起来,就可以得到分子分布的高分辨图像<sup>[59-60]</sup>。单分子超分辨方法中,荧光信号是微弱的。图像的信噪比越高,单分子定位的精度就会越高<sup>[61]</sup>。传统照明方法具有高背景荧光,高信噪比也是光片显微镜的优势之一。一般的单分子显微镜只能将成像范围限制在表面样品,但与光片显微镜结合后,可以将厚样本纳入研究范围<sup>[62]</sup>。

单分子定位的超分辨方法在多种单物镜光片架构中都有应用,最先将单分子定位技术用于单物镜光片显微镜的是 Galland 的设计,即基于流体通道的单物镜光片。在该显微镜下测试了 photoactivated localization microscopy (PALM) 和 direct-STORM (dSTORM) 的单分子方法,展示了良好的成像效果,如图 9(a) 和图 9(b)

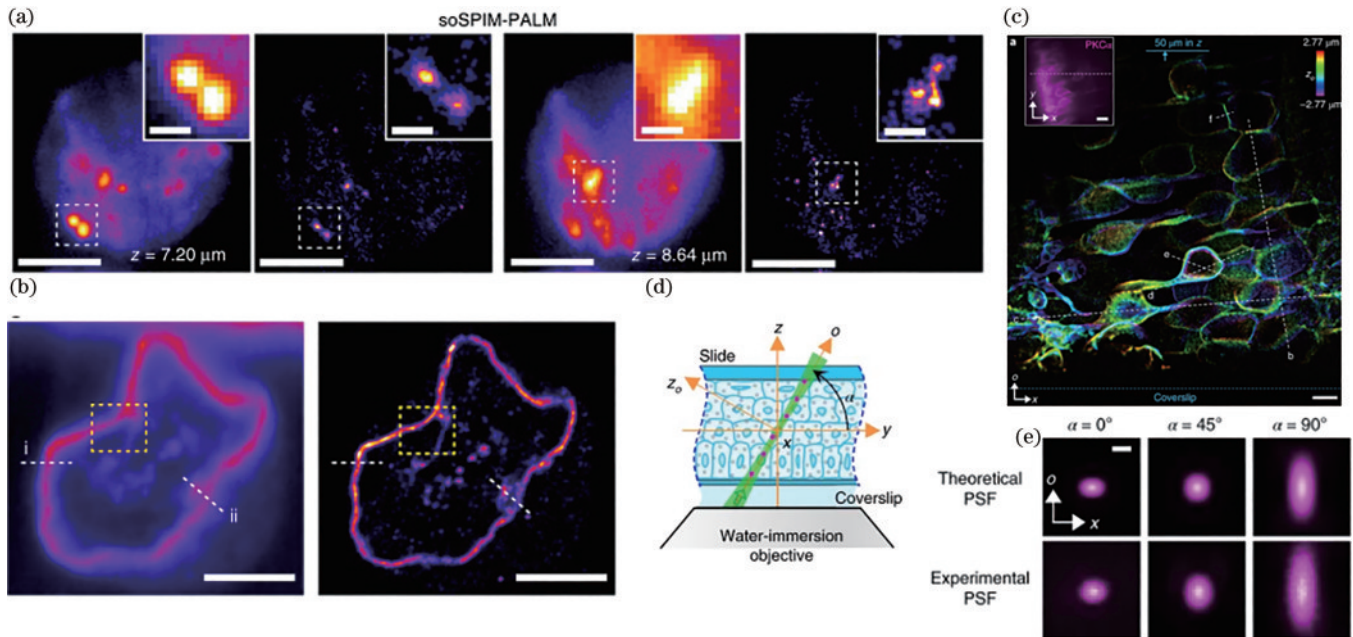


图 9 结合单分子定位方法的单物镜光片显微镜。(a)soSPIM-PLAM 成像,左边宽场,右边超分辨<sup>[6]</sup>;(b)soSPIM-dSTORM 超分辨成像,左边宽场,右边超分辨<sup>[6]</sup>;(c)组织深度为  $50\text{ }\mu\text{m}$  的代表性体积 obSTORM 图像,十张图像堆叠,深度颜色编码<sup>[64]</sup>;(d)obSTORM 高倾斜角度的光片入射<sup>[64]</sup>;(e)光片角度下理论和实验 PSF 的对比<sup>[64]</sup>

Fig. 9 Single-objective light sheet microscope with single-molecule localization methods. (a) soSPIM-PLAM imaging, left is widefield and right is super-resolution<sup>[6]</sup>; (b) soSPIM-dSTORM super-resolution imaging, left is widefield, right is super-resolution<sup>[6]</sup>; (c) representative volume obSTORM image with a tissue depth of  $50\text{ }\mu\text{m}$ , ten images stacked, depth colour coded<sup>[64]</sup>; (d) obSTORM high tilt angle of light sheet incidence<sup>[64]</sup>; (e) comparison of theoretical and experimental PSFs at different light sheet angles<sup>[64]</sup>

所示。该单物镜结构的设计可以匹配高 NA 的物镜,同时在微器件中可以装载缓冲液,基于该系统的单物镜光片可以大幅降低背景荧光,光漂白现象显著减少,提高了定位精度并提高了重建的图像质量<sup>[6, 55, 63]</sup>。

在倾斜平面照明显微镜中也实现了单分子超分辨成像。Kim 等<sup>[64]</sup>开发了一款将倾斜平面显微镜和 STORM 技术结合的超分辨显微镜,即 obSTORM。利用倾斜光片照明可以轻易地实现对样品不同厚度下的单分子成像,包括普通标准样品到整个生物体,定位精度范围为~18 nm(薄细胞)至~26 nm(组织)和~40 nm(动物),拓展了单分子超分辨成像的使用范围,如图 9(d)所示,可以在最深 66  $\mu\text{m}$  范围实现多色超分辨成像。Hung 等<sup>[65]</sup>结合可变形镜与点扩散函数工程,对 OPM 中单分子成像进行了分析,证明成像效果优于 Hilo 和 HIST。

## 5.2 单物镜光片显微镜的结构光照明超分辨成像

在上述几种超分辨成像方法中,SIM 超分辨显微技术具有相对较快的速度,与光片技术都常用于活细胞的成像场景。要想实现各向同性分辨率增益的结构光

显微成像,则需要三个方向上拍摄 3 张相位相差  $\pi/3$  的图像,利用 9 张图片重建获得超分辨图像。但如何在光片显微镜中实现频率满足周期性的条纹一直是一个难点。2012 年 Gao 等<sup>[66]</sup>使用 7 束贝塞尔光束生成了条纹投影,但分辨率的提升是有限的。同年,另一个重大的发明晶格光片显微镜利用多束贝塞尔光束的干涉生成晶格光,也可以实现类似的结构光照明,获得了最优横向为 190 nm、轴向为 280 nm 的光学分辨率。但上述照明方式对分辨率提升达不到宽场下的效果,同时需要多个物镜的复杂配置。单物镜的架构为结构光带来了新的机遇,最近 2022 年 Chen 等<sup>[67]</sup>的设计用一个带有振镜与静态镜组合的图像旋转器的单物镜光片显微镜,该显微镜可以毫秒间隔在 3 个方向上拍摄 3 张不同相位图像,最终用 9 张图片配准,在每个平面进行重建,获得 2 倍分辨率增益的 2D 结构光图片,如图 10(a)所示。该结构光倾斜光片获得了严格意义上的各向同性的超分辨图像。该显微镜也可以和新兴的投影成像技术结合,将采集速度提升 2 个数量级,不过要以分辨率的非各向同性为代价<sup>[68]</sup>。

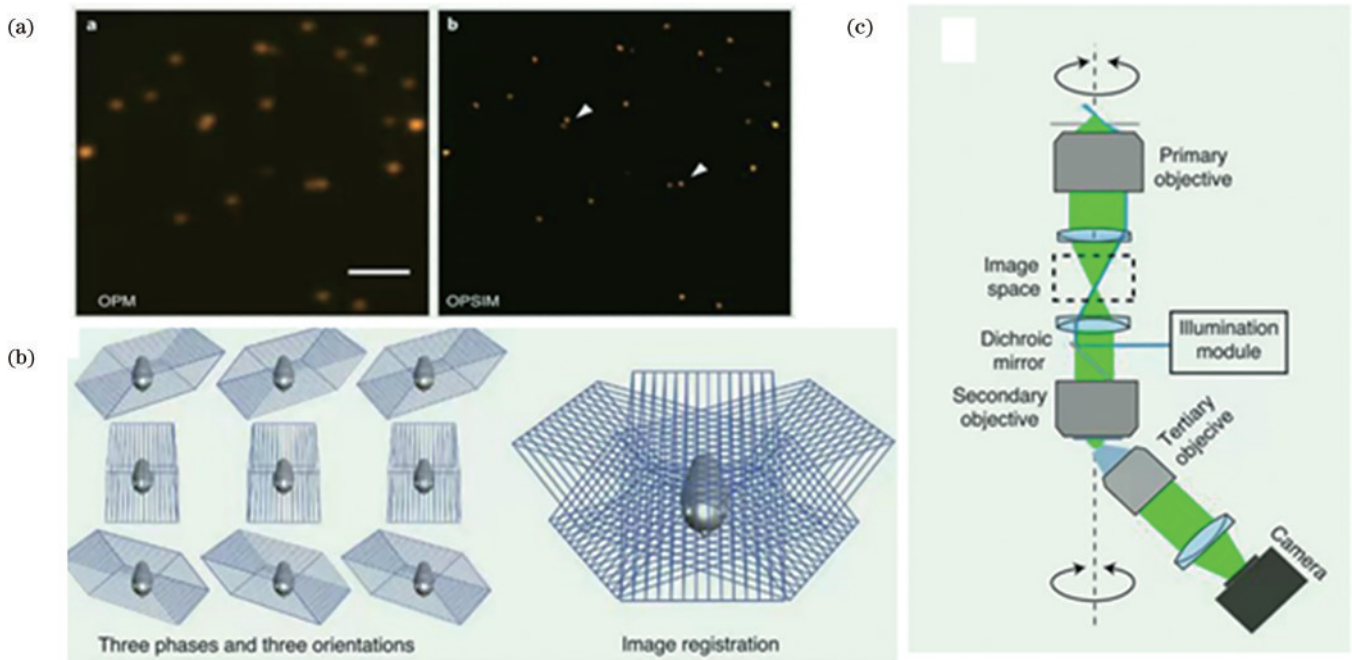


图 10 超分辨结构光的倾斜平面照明显微镜<sup>[67]</sup>。(a)同一显微镜下宽场成像和结构光超分辨成像对比;(b)三个方向,每个方向拍摄 3 张不同相位的图片进行重建获得超分辨图;(c)SIM-OPM 结构光超分辨显微镜光路简图

Fig. 10 Super resolution structure illumination oblique plane microscope<sup>[67]</sup>. (a) Comparison of wide-field imaging and super-resolution structure illumination imaging under the same microscope; (b) three orientations, each of which captured three pictures with different phase to reconstruct the obtained super-resolution image; (c) sketch of the SIM-OPM super-resolution structure illumination optical path

## 6 展 望

光片显微镜自问世以来,由于其真实物理意义上的光学切片以及与各种光学技术的适用性迅速流行起来,并在十多年间发展突飞猛进。单物镜光片显微术作为一种新兴的体积成像方法具有诸多优点。单物镜

光片显微镜解决了传统光片显微镜不可用载玻片的问题,并释放了几何空间的限制,同时解决了正交光片显微镜不能使用高 NA 物镜的问题,联合超分辨成像技术后,光片显微镜分辨水平得到进一步提升。单物镜光片显微镜推动了光片显微镜在生物学实验室的应用,单物镜光片显微镜由于具有快速成像和活细胞成

像的特点,特别适用于对一些神经信号、血流等高速生命活动的观察,并且可以用于一些在体成像场景,是一种快速体积成像利器。

当然单物镜光片显微镜很多仪器部件都需要特殊定制并且许多部件价格昂贵,这无疑增加了单物镜光片的使用成本,限制了单物镜光片的推广,在这一方面还需要研究人员继续开发低成本光片显微镜。同时,在光片显微镜发展的过程中,往往一台光片显微镜难以满足多种应用场景的需求,一些新型单物镜光片显微镜可以结合在倒置显微镜上,满足多种尺度成像需求,这有利于光片显微技术走进更多生命科学研究人员的实验室。

### 参 考 文 献

- [1] Huisken J, Swoger J, del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. *Science*, 2004, 305(5686): 1007-1009.
- [2] 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.
- [3] 于湘华, 刘超, 柏晨, 等. 光片荧光显微成像技术及应用进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(10): 100001. Yu X H, Liu C, Bai C, et al. Progress in light-sheet fluorescence microscopy and applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(10): 100001.
- [4] 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.
- [5] Dunsby C. Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy[J]. *Optics Express*, 2008, 16(25): 20306-20316.
- [6] Galland R, Greci G, Aravind A, et al. 3D high- and super-resolution imaging using single-objective SPIM[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(7): 641-644.
- [7] Konopka C A, Bednarek S Y. Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex[J]. *The Plant Journal*, 2008, 53(1): 186-196.
- [8] 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.
- [9] Botcherby E J, Juškaitis R, Booth M J, et al. An optical technique for remote focusing in microscopy[J]. *Optics Communications*, 2008, 281(4): 880-887.
- [10] Botcherby E J, Juskaitis R, Booth M J, et al. Aberration-free optical refocusing in high numerical aperture microscopy[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(14): 2007-2009.
- [11] 王璐艳, 郭宗林, 王思元, 等. 无衍射光束在生物显微成像中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2023, 60(20): 2000001. Wang L Y, Guo Z L, Wang S Y, et al. Applications of non-diffracting beams in biological microscopic imaging [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2023, 60(20): 2000001.
- [12] Shin Y, Kim D, Kwon H S. Oblique scanning 2-photon light-sheet fluorescence microscopy for rapid volumetric imaging[J]. *Journal of Biophotonics*, 2018, 11(5): e201700270.
- [13] Lamb J R, Ward E N, Kaminski C F. Open-source software package for on-the-fly deskewing and live viewing of volumetric lightsheet microscopy data[J]. *Biomedical Optics Express*, 2023, 14(2): 834-845.
- [14] Kumar S, Wilding D, Sikkil M B, et al. High-speed 2D and 3D fluorescence microscopy of cardiac myocytes[J]. *Optics Express*, 2011, 19(15): 13839-13847.
- [15] Bouchard M B, Voleti V, Mendes C S, et al. Swept confocally-aligned planar excitation (SCAPE) microscopy for high-speed volumetric imaging of behaving organisms [J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(2): 113-119.
- [16] Vaadia R D, Li W Z, Voleti V, et al. Characterization of proprioceptive system dynamics in behaving *Drosophila* larvae using high-speed volumetric microscopy[J]. *Current Biology*, 2019, 29(6): 935-944.
- [17] Oppenheimer J, Patel K, Lindoo A, et al. High-speed 3D imaging of multiphase systems: applying SCAPE microscopy to analog experiments in volcanology and earth sciences[J]. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 2021, 22(3): e2020GC009410.
- [18] Kumar M, Kozorovitskiy Y. Tilt (in) variant lateral scan in oblique plane microscopy: a geometrical optics approach[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(6): 3346-3359.
- [19] Voleti V, Patel K B, Li W Z, et al. Real-time volumetric microscopy of in vivo dynamics and large-scale samples with SCAPE 2.0[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(10): 1054-1062.
- [20] Yang B, Lange M, Millett-Sikking A, et al. DaXi: high-resolution, large imaging volume and multi-view single-objective light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(4): 461-469.
- [21] Kumar M, Kozorovitskiy Y. Tilt-invariant scanned oblique plane illumination microscopy for large-scale volumetric imaging[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(7): 1706-1709.
- [22] Swoger J, Verveer P, Greger K, et al. Multi-view image fusion improves resolution in three-dimensional microscopy [J]. *Optics Express*, 2007, 15(13): 8029-8042.
- [23] Tomer R, Khairy K, Amat F, et al. Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 755-763.
- [24] Preibisch S, Amat F, Stamatakis E, et al. Efficient bayesian-based multiview deconvolution[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(6): 645-648.
- [25] 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.
- [26] Sparks H, Dent L, Bakal C, et al. Dual-view oblique

- plane microscopy (dOPM) [J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(12): 7204-7220.
- [27] Li T C, Ota S, Kim J, et al. Axial plane optical microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7253.
- [28] Kim J, Li T C, Wang Y, et al. Vectorial point spread function and optical transfer function in oblique plane imaging[J]. *Optics Express*, 2014, 22(9): 11140-11151.
- [29] Yang B, Chen X Y, Wang Y N, et al. Epi-illumination SPIM for volumetric imaging with high spatial-temporal resolution[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(6): 501-504.
- [30] Sapoznik E, Chang B J, Huh J, et al. A versatile oblique plane microscope for large-scale and high-resolution imaging of subcellular dynamics[J]. *eLife*, 2020, 9: e57681.
- [31] Kim J. Recent advances in oblique plane microscopy[J]. *Nanophotonics*, 2023, 12(13): 2317-2334.
- [32] Cai Y H, Chen Y Z, Xia Y Q, et al. Single-lens light-sheet fluorescence microscopy based on micro-mirror array[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2022, 16(8): 2100026.
- [33] Dean K M, Fiolka R. Uniform and scalable light-sheets generated by extended focusing[J]. *Optics Express*, 2014, 22(21): 26141-26152.
- [34] 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.
- [35] Hoffmann M, Judkewitz B. Diffractive oblique plane microscopy[J]. *Optica*, 2019, 6(9): 1166-1170.
- [36] Shao W J, Kilic K, Yin W Q, et al. Wide field-of-view volumetric imaging by a mesoscopic scanning oblique plane microscopy with switchable objective lenses[J]. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2020, 11(3): 983-997.
- [37] Shao W J, Chang M Z, Emmerich K, et al. Mesoscopic oblique plane microscopy with adiffractive light-sheet for large-scale 4D cellular resolution imaging[J]. *Optica*, 2022, 9(12): 1374-1385.
- [38] Levoy M, Zhang Z, McDowall I. Recording and controlling the 4D light field in a microscope using microlens arrays[J]. *Journal of Microscopy*, 2009, 235(2): 144-162.
- [39] Xu T N, Lin H Q, Lim Y J, et al. Computational single-objective scanning light sheet (cSOLS) [J]. *APL Photonics*, 2022, 7(8): 081302.
- [40] Liu Y Z, Chen Q S, Fei Y Y, et al. Design of an ellipsoidal mirror assisted oblique plane microscopy[J]. *Frontiers in Physics*, 2022, 10: 1057002.
- [41] Ugawa M, Ota S. High-throughput parallel optofluidic 3D-imaging flow cytometry[J]. *Small Science*, 2022, 2(7): 11.
- [42] Maioli V, Chennell G, Sparks H, et al. Time-lapse 3-D measurements of a glucose biosensor in multicellular spheroids by light sheet fluorescence microscopy in commercial 96-well plates[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37777.
- [43] Patel K B, Liang W X, Casper M J, et al. High-speed light-sheet microscopy for the in situ acquisition of volumetric histological images of living tissue[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(5): 569-583.
- [44] Zhang L, Song W Y, Shao D, et al. Volumetric fluorescence retinal imaging in vivo over a 30-degree field of view by oblique scanning laser ophthalmoscopy (oSLO) [J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 9(1): 25-40.
- [45] Song W Y, Zhou L B, Yi J. Volumetric fluorescein angiography (vFA) by oblique scanning laser ophthalmoscopy in mouse retina at 200 B-scans per second[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(9): 4907-4918.
- [46] Shao W J, Song W Y, Yi J. Is oblique scanning laser ophthalmoscope applicable to human ocular optics? A feasibility study using an eye model for volumetric imaging[J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13(6): e201960174.
- [47] Shao W J, Yi J. Non-interferometric volumetric imaging in living human retina by confocal oblique scanning laser ophthalmoscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 13(6): 3576-3592.
- [48] 张鹏飞, 张廷玮, 宋维业, 等. 从小鼠视网膜多种成像方式探讨眼科光学成像技术进展[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207003.
- Zhang P F, Zhang T W, Song W Y, et al. Review of advances in ophthalmic optical imaging technologies from several mouse retinal imaging methods[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207003.
- [49] McKay G N, Niemeier R C, Castro-González C, et al. Scattering oblique plane microscopy for in-vivo blood cell imaging[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(5): 2575-2585.
- [50] Gebhardt J C, Suter D M, Roy R, et al. Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(5): 421-426.
- [51] Ponjavic A, Ye Y, Laue E, et al. Sensitive light-sheet microscopy in multiwell plates using an AFM cantilever [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(12): 5863-5880.
- [52] Li B, Ponjavic A, Chen W H, et al. Single-molecule light-sheet microscopy with local nanopipette delivery[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(8): 4092-4099.
- [53] Albert-Smet I, Marcos-Vidal A, Vaquero J J, et al. Applications of light-sheet microscopy in microdevices[J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2019, 13: 1.
- [54] Beghin A, Greci G, Sahni G, et al. Automated high-speed 3D imaging of organoid cultures with multi-scale phenotypic quantification[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(7): 881-892.
- [55] Meddens M B M, Liu S, Finnegan P S, et al. Single objective light-sheet microscopy for high-speed whole-cell 3D super-resolution[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(6): 2219-2236.
- [56] Miura T, Mikami H, Isozaki A, et al. On-chip light-sheet fluorescence imaging flow cytometry at a high flow speed of 1 m/s[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(7): 3424-3433.
- [57] Zagato E, Brans T, Verstuyft S, et al. Microfabricated

- devices for single objective single plane illumination microscopy (SoSPIM)[J]. *Optics Express*, 2017, 25(3): 1732-1745.
- [58] Xu Y W, Michael A, Kwok C Y. Formation of ultra-smooth 45° micromirror on (100) silicon with low concentration TMAH and surfactant: techniques for enlarging the truly 45° portion[J]. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2011, 166(1): 164-171.
- [59] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [60] 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.
- [61] Thompson R E, Larson D R, Webb W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82(5): 2775-2783.
- [62] Zanicchi F C, Lavagnino Z, Donnorso M P, et al. Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1047-1049.
- [63] Lee Y S, Lee Y H, Lee M C, et al. STORM imaging buffer with a refractive index matched to standard immersion oil[J]. *ACS Photonics*, 2023, 10(8): 2589-2597.
- [64] Kim J, Wojcik M, Wang Y. et al. Oblique-plane single-molecule localization microscopy for tissues and small intact animals[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(10): 853-857.
- [65] Hung S T, Cnossen J, Fan D, et al. SOLEIL: single-objective lens inclined light sheet localization microscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(6): 3275-3294.
- [66] 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.
- [67] Chen B Y, Chang B J, Roudot P, et al. Resolution doubling in light-sheet microscopy via oblique plane structured illumination[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(11): 1419-1426.
- [68] Chang B J, Manton J D, Sapoznik E, et al. Real-time multi-angle projection imaging of biological dynamics[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 829-834.