

光片荧光显微成像技术的发展及应用(特邀)

周瑶^{1,2}, 费鹏^{1,2*}¹华中科技大学光学与电子信息学院, 湖北 武汉 430074;²湖北省高端生物医学成像重大科技基础设施, 湖北 武汉 430074

摘要 近几十年来,光片荧光显微镜作为荧光显微技术的一种革新,显著提升了生命科学研究中对组织与细胞结构和功能的高时空分辨率成像能力。相较于传统的落射荧光显微技术,光片显微镜通过选择性逐层照明生物样本,大大提高了光子利用效率,降低了光毒性,并显著提升了成像速度。光片显微镜问世以来,其在生命科学研究中的应用范围逐渐拓宽,从胚胎学、神经科学到肿瘤研究等多个领域均有所涉及,不仅可用于观察细胞和组织的基本结构,还可用于实时监测生物过程中的动态变化。同时,其跨尺度的特点使其适用于从宏观到微观的多个尺度上的观察。本文综述了光片显微镜在高通量成像、超分辨成像以及易用性方面的应用及发展,旨在为生命科学研究人员提供全面的了解和参考,推动光片显微镜在更多领域的应用和发展。

关键词 荧光显微成像; 光片荧光显微镜; 高通量成像; 超分辨成像

中图分类号 TG115.21 文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP240855

Development and Application of Light Sheet Fluorescence Microscopy Technology (Invited)

Zhou Yao^{1,2}, Fei Peng^{1,2*}¹School of Optical and Electronic Information, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China;²Advanced Biomedical Imaging Facility, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China

Abstract In recent decades, the advent of light sheet fluorescence microscopy as an innovative technique in fluorescence microscopy has significantly enhanced the high spatiotemporal resolution imaging capabilities of tissue and cellular structures and functions in life science research. Compared to traditional epi-fluorescence microscopy techniques, light sheet microscopy illuminates biological samples selectively, greatly improving photon utilization efficiency, reducing phototoxicity, and significantly increasing imaging speed. Since its introduction, light sheet microscopy has gradually expanded its application field in life science research, ranging from embryology and neuroscience to tumor studies, among others. It can not only be used to observe the basic structures of cells and tissues but also for real-time monitoring of dynamic changes in biological processes. Furthermore, its multiscale characteristics make it suitable for observations across multiple scales from macro to micro. This article reviews the applications and developments of light sheet microscopy in high-throughput imaging, high-precision imaging, and usability, aiming to provide life science researchers with comprehensive understanding and reference, and to promote its application and development in more fields.

Key words fluorescence microscopy; light sheet fluorescence microscopy; high-throughput imaging; super-resolution imaging

1 引言

近几十年来,荧光显微技术(例如,宽场荧光显微镜和共聚焦扫描显微镜)已成为生命科学研究不可或

缺的工具。荧光显微成像的核心任务是准确(高空间分辨率)、快速(高时间分辨率)地观察组织和细胞的结构与功能。但传统的基于落射照明的显微成像向上照明了整个样本的三维体积,导致光子利用效率低、光毒

收稿日期: 2024-01-04; 修回日期: 2024-01-29; 录用日期: 2024-01-30; 网络首发日期: 2024-02-05

通信作者: *feipeng@hust.edu.cn

性高,难以对活体生物样本进行快速、高分辨率的观察。近年来,光片荧光显微镜(LSFM,以下简称“光片显微镜”)的出现变革了这一局面。它通过额外的照明光路产生极薄的光片,只照亮荧光样品的一个薄层,并垂直观察这一平面的发射荧光。这种激发方法使得探测光路不会收集到除了焦平面以外的荧光,通过选择性地逐层照明生物样本里的一个个平面,最终构建出完整的三维结构。相较于传统的落射荧光显微技术,光片显微镜在成像速度(通量)和光子利用率上都有数量级的提升。

自 2004 年德国 Stelzer 课题组^[1]首次发明光片显微镜以来,这项技术已迅速发展成为生命科学领域近 20 年来备受关注的重要工具。与传统的共聚焦显微镜相比,光片显微镜的照射量少了 3~5 个数量级,从而大大降低了光漂白和光毒性,同时成像速度提升了 1 个数量级。在近年的发展,光片显微镜凭借其可以保留介观离体样本的荧光并进行高通量成像,同时允许在高时间分辨率下对活体标本进行多色长时程成像而声名远扬,其颠覆性的特点也使其获选 2014 年 Nature Methods 杂志的年度方法学^[2]。

而在此之后的近十年,光片显微镜得到飞速发展,在观察脊椎动物和无脊椎动物胚胎发育、大脑和心脏功能、三维细胞培养模型、单细胞、组织切片、细胞器间相互作用和透明化全器官等方面得到广泛应用。此外,光片显微镜与其他成像方法的结合,可以实现超分辨率或增加穿透深度,并使用时空复合调制方式实现多信息维度的观测,除此之外,为提高研究效率、降低技术门槛、促进跨学科合作,光片显微镜在用户友好性及可操作性方面也有明显改善。本文着重综述了光片显微镜在高通量、超分辨、易用性方面的发展及应用,并展望了光片显微镜更加广阔的发展空间和更加光明的前景。

2 光片显微镜在高通量成像中的应用及发展

在脑科学研究和肿瘤病理学诊断中,对介观尺度的组织结构以及整个器官的大型样本进行三维显微成像至关重要,它能够展现生物体内部的复杂构造和细胞排布,为深入洞察生物过程提供独特的视角^[3-4]。传统的基于点扫描的共聚焦显微镜在处理大型样本时,常因其通量有限而使得观测变得冗长繁琐,动辄需要数天甚至数周的时间才能完成图像采集,而且其轴向分辨率往往不尽如人意。尤其在为了提升分辨率而缩小共聚焦显微镜的共轭针孔时,会显著降低到达探测器的信号光强度,进而影响图像的信噪比。相比之下,基于面探测的光片显微成像技术则能够提高成像通量,为大型样本的三维显微成像提供了一种更为迅捷有效的解决方案。

高斯光片显微镜诞生以来,凭借其优异的光学切

片能力,研究人员将其用于厘米级大组织三维成像。Dodt 等^[5-6]利用了 uDISCO 方法对整只小鼠进行了透明化处理,并利用商业化的高斯光片显微镜 LaVision Ultramicroscope II 进行成像,取得了优异的高通量成像结果,如图 1(a)所示。然而,尽管高斯光片显微镜在光学切片能力方面表现出色,但它仍然面临视野大小与光片厚度之间的矛盾,难以在大视野照明和探测以及微米级三维分辨率之间找到平衡。因此,对于大型样本的三维显微成像仍然是一个挑战,需要进一步的技术创新和改进。

2015 年,Dean 等^[7]提出使用音圈电机、电动可调谐透镜(ETL)等电动部件沿传播方向扫描高斯光片,同时配合科研级 CMOS 相机的电子卷帘狭缝扫描,通过同步控制扫描激发光束和电子狭缝,相机电子狭缝可以随着光束的扫描而同步运动。此轴向扫描的方法不仅可以扩大瑞利范围所覆盖的区域,也可以使得整个扫描过程中都只有束腰激发的荧光信号被探测。以 mesoSPIM^[8]和 ctASLM^[9]为代表,将此技术应用在大组织成像中并展示出来了出色的成像通量,成像结果如图 1(b)所示。同年,Gao 等^[10-11]开发了平铺拼接光片荧光显微技术,如图 1(c)所示,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。通过轴向扫描技术得到的三维图像分辨率明显优于静态光片,但同步扫描的方式一方面对激发光的功率有较高要求,另一方面会对样本造成额外的光漂白。

与此同时,贝塞尔光片也成为实现大样本三维高通量成像的利器。贝塞尔光束是无衍射光束,具有较强的自愈性^[12],抗散射能力优于高斯光,并且在相同光片厚度的情况下,贝塞尔光片的干涉可用范围明显优于高斯光片瑞利范围^[13],例如厚度为 3 μm 左右的高斯光片的视野范围约为 30 μm ,而相同厚度的贝塞尔光片的干涉可用范围可达 500 μm ,可大幅提升成像通量。

2010 年,德国科学家 Fahrback 等^[14]提出了将无衍射的贝塞尔光束与光片技术结合的思想,基于贝塞尔光束的自愈特性发明了自愈光束显微技术(MISERB),将高斯光束垂直入射到锥透镜或者同心圆环上,由于干涉现象产生贝塞尔光束。贝塞尔光束的自愈特性对于穿透尺度较大的生物样本来说是其重要优势,由于其是由于干涉原理产生的,经过组织散射后在传播过程中会再次发生干涉,恢复波前形状,因此在散射介质中能够传播较长的距离。然而,贝塞尔光片周围的同心圆环状旁瓣分布在焦平面上,这些旁瓣激发的焦外荧光信号同样会进入探测光路被收集,从而影响最终成像的轴向分辨率。因此,对贝塞尔光旁瓣的抑制成为决定贝塞尔光片成像效果的关键因素。

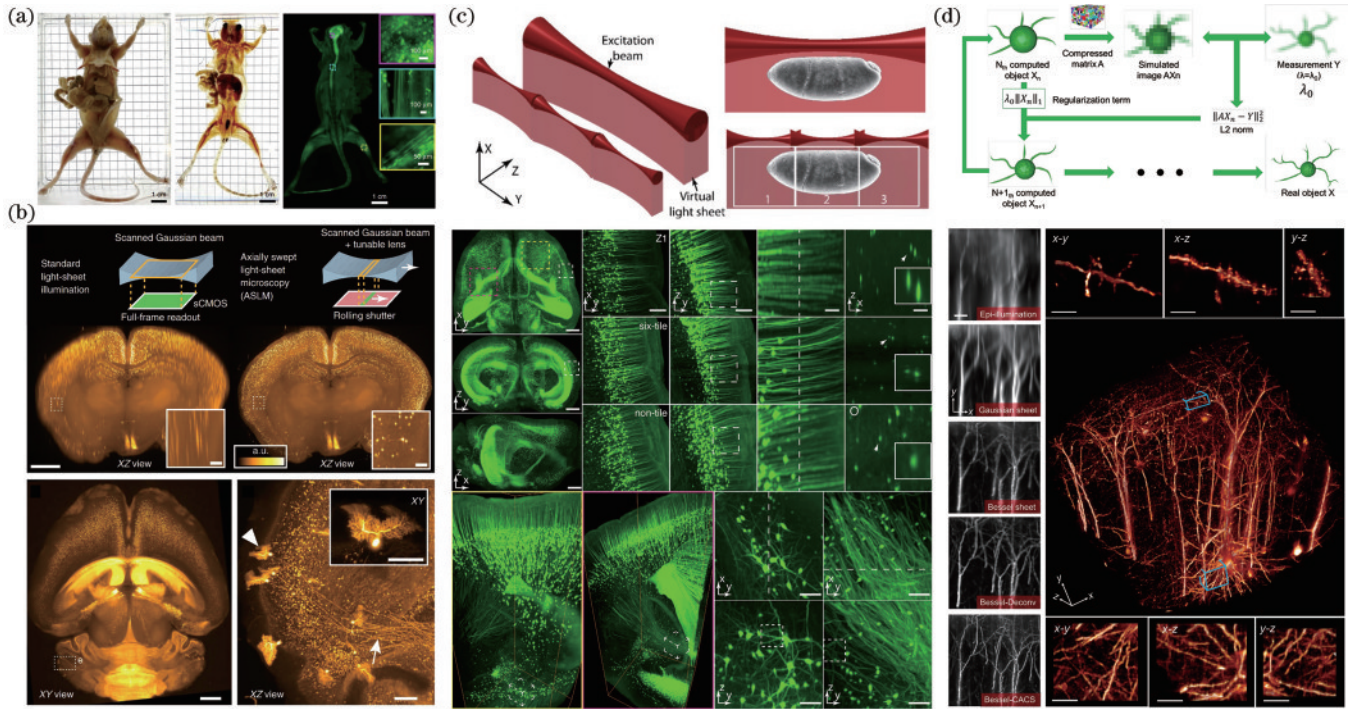


图 1 光片显微镜在高通量成像中的发展。(a)成年 GFP-M 小鼠经心灌注,用 uDISCO 方法透明化后,采用荧光显微镜以单细胞分辨率成像^[5]; (b)传统光片照明(左)和轴向扫描光片模式(右)的原理示意图及对于 CLARITY 透明化的 VIP-tdTomato 小鼠大脑成像图像的横向及轴向分辨率的比较^[7]; (c)平铺光片显微镜的原理示意图,通过沿光片长度方向平铺瑞利范围更短但更薄的光片的方式扩展视场(Zeiss 光片显微镜、六次平铺模式和无平铺模式的横向和轴向分辨率对比图)^[10]; (d)图像内容感知自适应压缩感知恢复流程及 CACS 贝塞尔光片照明显微镜与其他成像模式成像质量的对比^[18]

Fig. 1 Development of light sheet microscopy in high-throughput imaging. (a) Adult GFP-M mouse was transcardially perfused, cleared with uDISCO and imaged by fluorescence stereomicroscope at cellular resolution^[5]; (b) working principle and comparison of axial image quality achieved in a CLARITY-cleared VIP-tdTomato mouse brain for standard light sheet illumination (left) and for the axially swept light sheet mode (right)^[7]; (c) working principle of the proposed method, tiling a smaller but thinner light sheet along the light sheet length direction and extending the field of view (lateral and axial maximum intensity projections of a cleared Thy1-YFP mouse brain imaged with a Zeiss light sheet microscope, a six-tile mode, and a non-tile mode of the presented tiling light sheet microscope)^[10]; (d) CACS procedure and the comparison of CACS Bessel plane illumination microscopy and other imaging modes^[18]

中国科学院西安光学精密机械研究所的姚保利研究员团队^[15]选择通过掩模生成一束不包含主极强的贝塞尔互补光束,对样品使用贝塞尔光束和互补光束两次成像后将所获图像相减,即可获得消除旁瓣影响的贝塞尔光片成像结果。华中科技大学的费鹏教授团队^[16]选择利用双环掩模以产生旁瓣更低、瑞利范围更长的贝塞尔光片,实现整个小鼠大脑的 5 min 高通量三维成像以及对全脑范围内密集标记细胞的计数。

为进一步提高成像通量,2020 年,Zhao 等^[17]将深度神经网络(DNN)与光片显微镜结合,在大尺寸的生物样本成像中实现整体分辨率的 15 倍提升,至单细胞水平 $3\ \mu\text{m}$ 各向同性分辨率。2021 年,Fang 等^[18]将扫描贝塞尔光片显微镜与内容感知压缩传感(CACS)计算方法结合,对图像内容进行自适应感知的压缩感知增强,如图 1(d)所示,无需配对训练,实现图像每个维度 4 倍的分辨率提升,总光学通量 64 倍提升。

3 光片显微镜在超分辨成像中的应用及发展

光学显微镜是一种受到衍射极限限制的成像系统,其成像受到系统带宽的影响,这会导致超过一定频率范围的信号频谱丢失。而由于光学衍射极限的限制,光学显微镜无法实现超越这一极限的空间分辨率。为了克服这一限制并进一步提高光学显微成像技术的空间分辨率,研究人员开发了一系列超分辨显微成像技术。这些技术从根本上改善了光学显微成像的时空性能,提供了更加精确和详细的生物结构观察手段。而超分辨率显微镜虽然在空间分辨率上取得了突破,但在时间分辨率及光毒性方面存在一定的限制,难以进行长时间的观察。因此,生物学家对生物结构进行更加精细的三维长时程观察能力受到了严重限制。

根据不同的成像原理,超分辨荧光显微镜可以分为以下几种类型:1)基于频谱调制的结构光照明显微镜(SIM)^[19];2)基于光激活的单分子定位显微镜,包括

光活化定位显微镜(PALM)^[20]、随机光学重建显微镜(STORM)^[21]; 3) 基于抑制点扩散函数(PSF)边缘的受激辐射损耗显微镜(STED)^[22]; 4) 基于荧光涨落原理的计算超分辨成像, 如超分辨光学波动成像显微镜(SOFI)^[23]和超分辨率径向波动显微镜(SRRF)^[24]等。

1) 选择性照明结合结构光照明显微镜

2014年, Chen等^[25]提出了一项全新的晶格光片荧光显微(LLSFM)技术。晶格光是通过多个波矢位于

一个圆锥面上的平面波相干叠加而形成的具有二维或三维周期性结构的准无衍射光场, 可将其类比为三维结构光照明中的明暗条纹, 如图 2(a)所示。这项技术将结构光照明技术与光片显微成像技术相结合, 使用探测物镜(CFI Apo LWD 25XW, Nikon, 日本)和照明物镜(NA 0.65, Special Optics, 美国)组合的光片显微系统实现了 150 nm 的超分辨率成像。然而, 由于光晶格无法多角度旋转, 因此只能在横平面的一个方向上实现超分辨成像。

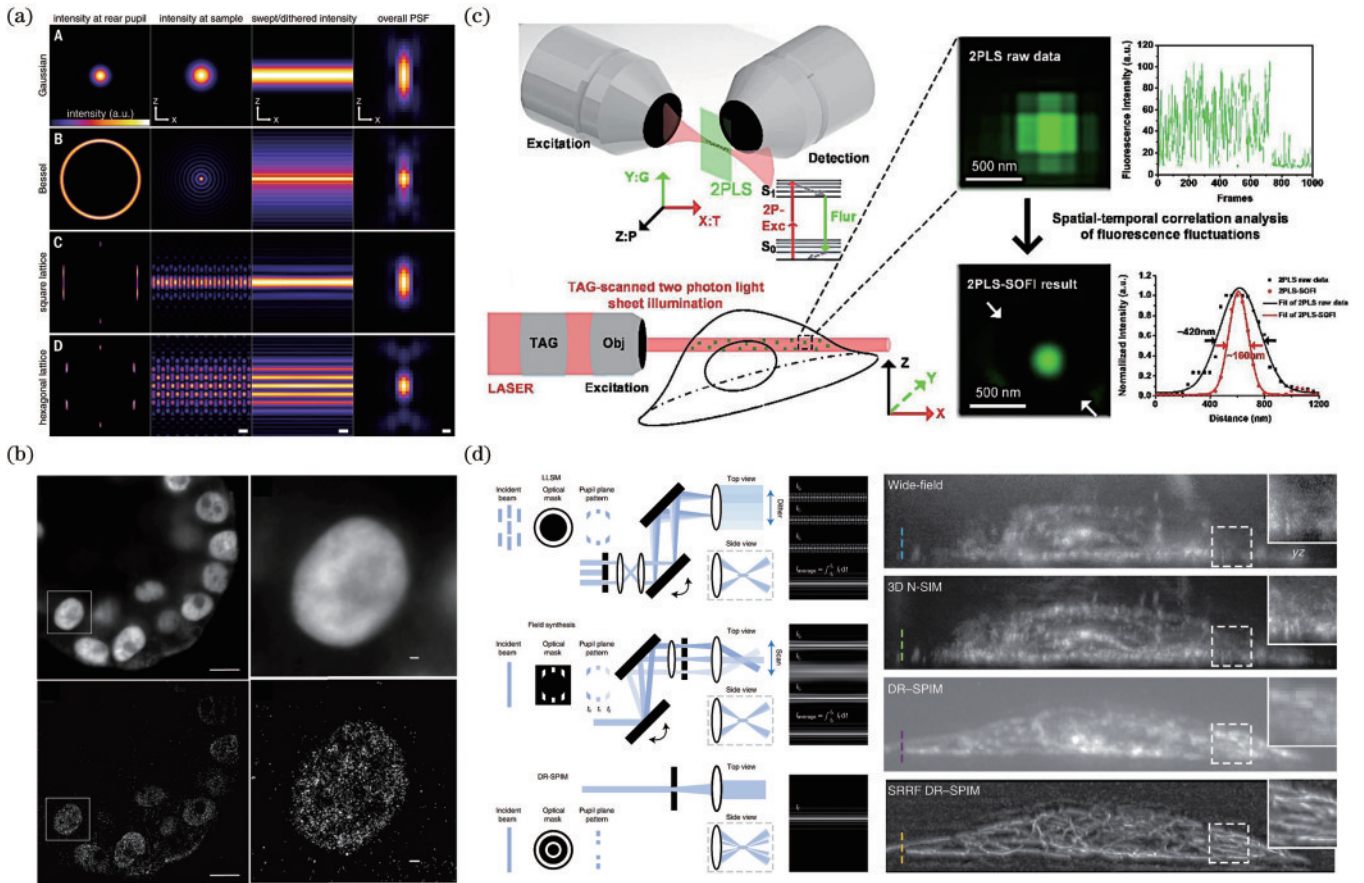


图 2 光片显微镜在超分辨成像中的应用。(a)传统高斯光片、扫描贝塞尔光片、方形晶格光片、六边形晶格优化光片的激发物镜后瞳孔平面的强度模式、激发物镜焦点处 xz 平面中图案的横截面强度、沿 x 轴抖动焦距图案而产生的光片的横截面强度以及显微镜整体 PSF 的 xz 横截面仿真对比图^[25]; (b)表达 H2B-PAmCherry 的人乳腺 MCF10A 细胞球状体的传统光片成像结果及 IML-SPIM 超分辨率成像结果^[27]; (c)双光子光片显微镜原理及 2P3A-DSLMS 光路设置, 基于 TAG 的双光子光片激发原理, 利用振镜沿 y 轴垂直扫描 TAG 沿光轴 (x 轴) 快速扫描激光焦点, 以及用 P2T 实现快速三维成像^[30]; (d)DRSPIM、晶格光片和场合成光片的产生原理区别示意图及在宽场模式、3D N-SIM 模式、DR-SPIM 和 SRRF DR-SPIM 对 U2OS 活细胞中的微管 (用 Tubulin-Atto 488 标记) 成像的 yz 面图像^[32]

Fig. 2 Application of light sheet microscope in super-resolution imaging. (a) Simulation results of the intensity pattern at the rear pupil plane of the excitation objective, the cross-sectional intensity of the pattern in the xz plane at the focus of the excitation objective, the cross-sectional intensity of the light sheet created by dithering the focal pattern along the x axis, and the xz cross section of the overall PSF of the microscope of the traditional Gaussian light sheet, Bessel swept sheet, the square lattice and the hexagonal lattice^[25]; (b) conventional SPIM image and IML-SPIM image of human mammary MCF10A cell spheroids expressing H2B-PAmCherry^[27]; (c) principle of two-photon light sheet nanoscopy and setup of 2P3A-DSLMS, the principle of TAG-based two photon light sheet excitation, generated by rapid scanning of laser focus along the optics axis (x axis) using a TAG and vertical scanning along the y -axis by a galvanometer, fast 3D imaging is achieved with a P2T^[30]; (d) schematic illustrating the generation of DRSPIM and its difference from a lattice light sheet and field synthesis. The yz slices of the microtubules (labeled with Tubulin-Atto 488) in a live U2OS cell imaged via N-SIM under the wide-field mode and 3D N-SIM mode DR-SPIM and SRRF DR-SPIM^[32]

2017年,Chang等^[26]提出了相干结构照明光片荧光显微技术(csiLSFM)。研究者利用两束相向传播的激光束干涉形成条纹结构光光场,然后通过改变光束传播方向来旋转条纹结构光光场,从而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 nm。然而,由于结构光照明通过均匀拓展频域的方式提高系统分辨率,空间分辨率只能提高2倍。

2) 选择性照明结合单分子定位显微镜

2011年,Zanacchi等^[27]将单分子定位超分辨技术首次引入到光片荧光显微成像中,通过结合远场单个分子定位和选择性平面照明显微镜,排除焦外光的激发,提高了图像的信噪比。这种方法可以在厚散射样本(50~150 μm)中实现对单分子的纳米级定位和三维活细胞的超分辨成像,进一步将空间分辨率提高到了60 nm。

2019年,Kim等^[28]提出单分子斜平面超分辨显微镜(obSTORM),研究者直接对样品的斜平面进行成像,扩大了单分子定位系统的轴向范围,提供了一个有一定深度的单分子定位平面,方便对标准组织样品和小型完整动物进行成像。同时,研究人员也展示了细胞、秀丽隐杆线虫性腺、果蝇幼虫大脑、小鼠视网膜和大脑切片以及整条刺鱼的深度达66 μm 的超分辨率成像。

3) 选择性照明结合STED显微镜

2011年,Friedrich等^[29]首次将选择平面显微技术与STED相结合充分发挥了STED成像速度快以及光片显微成像深度深、光强低等优点,使得轴向分辨率提高60%,实现对大于100 μm 厚的活体生物快速高分辨成像,打破了STED只能用于组织表面成像的限制。

4) 选择性照明结合计算超分辨成像

2016年,Chen等^[30]提出了通过随机光学涨落成像的双光子超分辨率光片成像(2PLS-SOFI),基于波动/闪烁探针的非线性激励开发了快速双光子三轴数

字扫描光片显微镜(2P3A-DSLM),可实现深度穿透和薄光片模式的切换。与传统的双光子光片显微镜(2PLS)相比,2PLS-SOFI的空间分辨率提高了3倍,与单个分子定位选择性平面照明显微镜(IML-SPIM)相比,时间分辨率提高了约40倍,如图2(c)所示。

2020年,Chen等^[31]改进了贝叶斯超分辨显微技术,将3B算法拓展到三维,继而将超分辨径向涨落算法与3B超分辨算法结合,开创超分辨径向引导的三维贝叶斯算法(SRTB),加速3B算法的收敛,提高其数据处理的速度近百倍。

2022年,Zhao等^[32]提出了渐进式深度学习超分辨率策略与双环调制选择性平面照明显微镜设计的结合,能够以大约100 nm的各向同性空间分辨率可视化活细胞内结构的动态数小时,如图2(d)所示。并揭示了整个活细胞中内质网和线粒体之间复杂的空间关系和相互作用,为内质网介导的线粒体分裂提供了新的见解。同时观测了参与线粒体裂变的Drp1寡聚物的运动,并揭示了Drp1和线粒体之间三维动态相互作用。

4 光片显微镜在易用性方面的发展

在早期的光片成像系统结构中,照明光路与探测光路相互垂直,如图3(a)^[1]所示,通过两个物镜成功地将激发光照明和荧光探测解耦合。激发端利用片状光束对样本的一个层面进行侧向照明激发,从而实现了选择性的平面照明。荧光的接收方式与宽场探测模式相同,探测物镜的焦面与光片平面重合。通过移动样本或光片,这种片状激光可以对样本在不同层面上进行选择性照明。通常情况下,样品被竖直固定在照明焦点或探测焦点的位置,通过在光片平面垂直方向上移动样本或光片实现三维扫描。然而,激发物镜和探测物镜的大小和方向限制了可以安装在它们之间的样本类型。

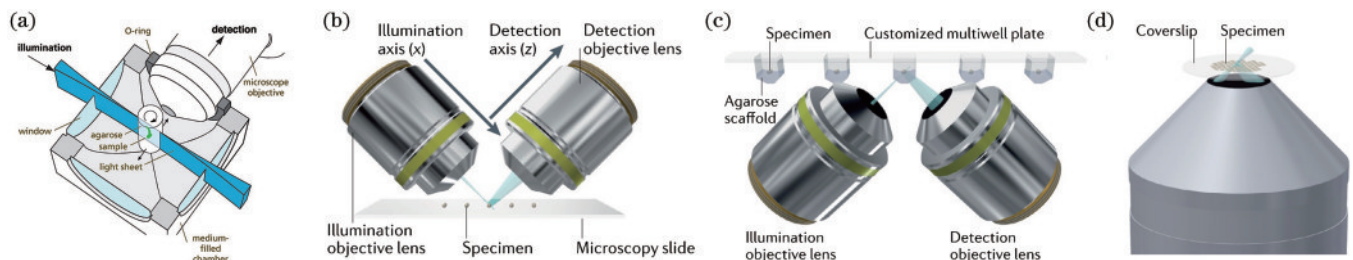


图3 光片显微镜的典型模式。(a)倒T形双物镜^[1]; (b)正置V形双物镜; (c)开顶型双物镜; (d)单物镜光片显微镜^[33]

Fig. 3 Typical modality of light sheet microscope. (a) Inverted T-shaped mode^[1]; (b) V-shaped double objective; (c) open-top double objective; (d) single objective light sheet microscope^[33]

在许多应用中,由于特定的样本夹持方式或生物体本身的结构遮挡,无法从两个正交方向对样本进行光学成像。对于生物医学相关背景人员而言,大规模高通量三维成像尤为重要,而传统的躺式或立式光片系统限制了在微流控芯片、玻片以及96孔板中样本进

行大规模成像的应用。因此,斜置开顶式光片技术的发展成为一种解决方案^[33]。

2015年,Huang等^[34]使用探测物镜(CFI Plan Fluor DL 10XF, Nikon, 日本)和照明物镜(M Plan Apo 20 \times , Mitutoyo, 日本)组合,与水平面成45°角度

倾斜的玻片构成一个样品腔,且补偿部分像差,完成了对微流控通道中的果蝇胚胎和 96 孔板中的斑马鱼胚胎高通量成像,实现对玻片上的线虫和果蝇幼虫进行成像。Jonathan 课题组^[35-37]发表了一系列关于倒置开顶式光片系统的技术改进工作,如图 3(c)所示。为了减小像差,2017 年,设计了 SIL 拓展了开顶式光片技术在高通量快速病理学的应用^[35]。随后改进的 SIMlens 代替 SIL 进行像差校正,可以对多种透明化方法处理的样品成像^[36]。2020 年,该课题组还提出了一款紧凑型可变分辨率的倒置开顶式显微镜,该系统可以在低分辨率(5×)和高分辨率(20×)三维成像的空气物镜之间快速转换,并通过展示诊断病理学应用的高效三维分析工作流程证明了该系统的实用性^[37]。

而对于高倍率成像,物镜工作距离通常非常短,留给样品的可操作空间也极其有限。用传统的载玻片或者培养皿承载的生物样品在这种光路中难以实现成像,且在样品数量规模上也难以提升,这要求研究者需要对光片显微镜的双物镜模态进行演进。因此发展了单物镜光片显微成像技术^[38]。

这一类技术发展由 Dunsby^[39]于 2008 年提出的斜平面显微镜(OPM)拉开帷幕,通过采用离轴激发和远程聚焦技术实现对样本的光片激发和荧光信号采集均由同一枚物镜负责,如图 3(d)所示。单物镜光片显微镜不仅绕开了传统光片显微镜对样本装载空间的限制,也可以通过仅扫描光片轻松实现对样本的高速三维成像。2015 年, Bouchard 等^[40]提出扫描、共焦对齐平面激发(SCAPE)显微镜,首次在多类样本上演示了快速、温和、高分辨率的三维活体成像,样品类型从在多孔板中生长的贴壁细胞到自由移动的生物体。然而,远程成像模块会导致难以收集大角度荧光、数值孔径的损失,虽然系统更加简单易用、兼容性更强,但成像性能损失得比较多,分辨率和荧光效率不够最优,而高数值孔径对于实现亚细胞成像的分辨率和单分子检测的光收集效率至关重要。

最近几年以来,研究人员一直在 OPM 的基础上开发越来越多性能更好、适用于不同场景的单物镜光片显微镜。2019 年, Yang 等^[41]将远程聚焦物镜换成水镜,大大提升了系统的收光能力,对多孔板中细胞的平行体积实时成像。2022 年, Yang 等^[42]又提出一种可用于大规模样本,包括组织、活体胚胎高通量三维单物镜光片成像技术——DaXi,并且使用定制的高质量高数值孔径的远程聚焦物镜,实现几乎不损失分辨率的三维高速成像。

而针对上述的生命科学领域中的研究和应用,亟待开发一种可以实现高通量高分辨率和高易用性兼具的具有广泛兼容性的多功能光学显微镜。我们认为单物镜光片显微镜将对生物学的发现至关重要,它有望进一步推动光片显微镜成为主流光学成像技术。

5 结束语

由于单物镜光片显微镜需要采用远程聚焦技术,对系统的数值孔径有较高的要求,而高数值孔径常对应着较小的视场,因此将单物镜光片显微技术应用于大视野成像是一个挑战。虽然单物镜光片显微镜在前端使用同一物镜进行光片照明和探测,这种设计极大地拓展了光片显微镜的兼容性,但单物镜光片由于照明光路和探测光路斜交,一方面使单物镜光片需要选择数值孔径高的物镜,另一方面会引入像差。为了校正像差,实现完美成像,目前采用三枚物镜进行远程聚焦,系统复杂且应用性低。受到以上限制,目前的单物镜光片更适用于单一的高倍率系统,在中低倍情况下通常分辨率较差,无法满足研究需求。同时,远程聚焦的方法还使得系统的探测光路复杂,对三枚物镜的光学参数限制严格,无法实现原位倍率切换。

我们期待出现一种新型的直接探测光片显微成像系统,无需使用校正像差的两枚远程成像物镜,提升探测分辨率,提高荧光收集效率;解决目前单物镜光片工作在较单一倍率下的问题,允许原位的探测倍率自由切换,例如,像共聚焦显微镜一样能够在同一系统上实现 10×~100×的变倍,但有比共聚焦显微镜更优越的轴向层析能力和更低的光毒性;能够多能性地对从单细胞到大规模类器官,到活体胚胎,再到透明化整体大组织进行高通量、高分辨、智能化的三维成像和分析。如果做到这一点,光片显微镜将有望兼顾高性能、高通用性和高易用性的优势,替代目前的 3D 荧光显微镜,成为下一代荧光显微成像技术中的中流砥柱。

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] Stelzer E H K. Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 23-26.
- [3] Ueda H R, Ertürk A, Chung K, et al. Tissue clearing and its applications in neuroscience[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2020, 21(2): 61-79.
- [4] Liu J T C, Glaser A K, Bera K, et al. Harnessing non-destructive 3D pathology[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5(3): 203-218.
- [5] 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.
- [6] Pan C C, Cai R Y, Quacquarelli F P, et al. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(10): 859-867.
- [7] Dean K M, Roudot P, Welf E S, et al. Deconvolution-free subcellular imaging with axially swept light sheet

- microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2015, 108(12): 2807-2815.
- [8] Voigt F F, Kirschenbaum D, Platonova E, et al. The mesoSPIM initiative: open-source light-sheet microscopes for imaging cleared tissue[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1105-1108.
- [9] Chakraborty T, Driscoll M K, Jeffery E, et al. Light-sheet microscopy of cleared tissues with isotropic, subcellular resolution[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1109-1113.
- [10] 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.
- [11] Chen Y L, Li X L, Zhang D D, et al. A versatile tiling light sheet microscope for imaging of cleared tissues[J]. *Cell Reports*, 2020, 33(5): 108349.
- [12] 谢家俊, 唐诗瑶, 陈永强, 等. 贝塞尔光束在生物组织中的自重建特性研究 [J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507302.
- Xie J J, Tang S Y, Chen Y Q, et al. Self-reconstruction characteristics of Bessel beam in biological tissue[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507302.
- [13] Wu P H, Sui C H, Huang W H. Theoretical analysis of a quasi-Bessel beam for laser ablation[J]. *Photonics Research*, 2014, 2(3): 82-86.
- [14] Fahrbach F O, Simon P, Rohrbach A. Microscopy with self-reconstructing beams[J]. *Nature Photonics*, 2010, 4: 780-785.
- [15] 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.
- [16] Guo X Y, Zhao F, Zhu J T, et al. Rapid 3D isotropic imaging of whole organ with double-ring light-sheet microscopy and self-learning side-lobe elimination[J]. *Biomedical Optics Express*, 2023, 14(12): 6206-6221.
- [17] Zhao F, Zhu L X, Fang C Y, et al. Deep-learning super-resolution light-sheet add-on microscopy (Deep-SLAM) for easy isotropic volumetric imaging of large biological specimens[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(12): 7273-7285.
- [18] Fang C Y, Yu T T, Chu T T, et al. Minutes-timescale 3D isotropic imaging of entire organs at subcellular resolution by content-aware compressed-sensing light-sheet microscopy[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 107.
- [19] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [20] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [21] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3: 793-796.
- [22] 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.
- [23] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [24] Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, et al. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12471.
- [25] 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.
- [26] Chang B J, Perez Meza V D, Stelzer E H K. csLSFM 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.
- [27] 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.
- [28] 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(9): 853-857.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Chen R, Zhao Y X, Li M N, et al. Efficient super-resolution volumetric imaging by radial fluctuation Bayesian analysis light-sheet microscopy[J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13(8): e201960242.
- [32] Zhao Y X, Zhang M, Zhang W T, et al. Isotropic super-resolution light-sheet microscopy of dynamic intracellular structures at subsecond timescales[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(3): 359-369.
- [33] Stelzer E H K, Strobl F, Chang B J, et al. Light sheet fluorescence microscopy[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1: 73.
- [34] McGorty R, Liu H, Kamiyama D, et al. Open-top selective plane illumination microscope for conventionally mounted specimens[J]. *Optics Express*, 2015, 23(12): 16142-16153.
- [35] Glaser A K, Reder N P, Chen Y, et al. Light-sheet microscopy for slide-free non-destructive pathology of large clinical specimens[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1(7): 84.
- [36] Barner L A, Glaser A K, True L D, et al. Solid immersion meniscus lens (SIMlens) for open-top light-sheet microscopy[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(18): 4451-4454.

- [37] Barner L A, Glaser A K, Huang H Y, et al. Multi-resolution open-top light-sheet microscopy to enable efficient 3D pathology workflows[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(11): 6605-6619.
- [38] Strack R. Single-objective light sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(1): 28.
- [39] Dunsby C. Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy[J]. *Optics Express*, 2008, 16(25): 20306-20316.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.