

光片荧光显微成像

杨豫龙, 宗伟建, 吴润龙, 陈良怡

北京大学分子医学研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100871

摘要 在过去的 20 年, 激光扫描共聚焦显微镜一直是在细胞水平和亚细胞水平上观察生命活动的标准工具, 但是基于针孔的共聚焦显微镜的光学层切是以牺牲焦平面以外的被激发的荧光色团和较大的光毒性为代价的。作为一种新型的荧光显微镜, 光片荧光显微镜采用侧向照明的方式, 对样品直接进行面成像。相对于点扫描的成像方式, 光片显微镜成像速度远远高于激光扫描共聚焦显微镜, 使得研究一些高速的精细生命活动过程成为了可能。光片荧光显微镜的另外一个优点是只有光片处的样品才会被激发, 处于光片以外的样品则不会被激发, 因此光毒性较小, 使得人们能够在更长的时间尺度下观察样品。正是由于光片荧光显微镜特殊的照明和成像方式, 才使其在大样本的三维高速成像中起到不可替代的作用。本文简要回顾了光片荧光显微镜发展的历史及研究现状, 旨在为该领域的科研人员对光片荧光显微镜的现状及未来发展方向提供个人理解。

关键词 显微; 荧光成像; 光片照明; 显微成像; 光毒性

中图分类号 O439 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201737.0318007

Light-Sheet Fluorescence Microscopy

Yang Yulong, Zong Weijian, Wu Runlong, Chen Liangyi

State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract In the past two decades, laser scanning confocal microscope has been the standard tool for observing the process of life at cellular and sub-cellular level. The optical sectioning capacity of pinhole-based confocal microscope comes at the price of unwanted excitation of fluorophores out of focal plane and phototoxic damage to biological samples. As a new type of fluorescent microscope, light-sheet fluorescence microscope (LSFM) uses side illumination to conduct surface imaging of the samples directly. As compared to the point-scanning imaging mode, LSFM excels at its imaging speed, which is much higher than that of laser scanning confocal microscope, thus making it possible to study some high-speed fine life activities. Another advantage of the light-sheet fluorescence microscope is that only the sample at the light-sheet is excited and the sample outside the light-sheet is not excited, so there is less phototoxic dosage and we can observe the sample in a longer time scale. The special illumination and imaging mode of the light-sheet fluorescence microscope make it play an irreplaceable role in three-dimensional high-speed imaging of big biological samples. The history and research status of light-sheet fluorescence microscope are reviewed with the purpose of providing a personal perspective of current situation and future direction of LSFM.

Key words microscopy; fluorescence imaging; light-sheet illumination; micro-imaging; phototoxicity

OCIS codes 180.2520; 110.0180; 110.3055; 120.3890

1 引 言

100 多年来, 生物医学研究者一直都应用显微成像技术来观察生物样本的精细结构。与其他的显微成像技术相比, 荧光成像技术可以选择性标记细胞内离子、基因组、信使核糖核酸(mRNA)、蛋白质等物质, 不

收稿日期: 2016-12-06; **收到修改稿日期:** 2017-01-17

基金项目: 国家重点研发计划基金(2016YFA0500400)、国家 973 计划(2013CB531200)、国家自然科学基金(31327901, 31521062, 31570839)

作者简介: 杨豫龙(1992—), 男, 博士研究生, 主要从事光学成像技术和方法方面的研究。

E-mail: yangyulong@pku.edu.cn

导师简介: 陈良怡(1975—), 男, 博士, 教授, 主要从事光学成像技术和方法、糖尿病相关的胰腺 β 细胞钙信号和胰岛素分泌机制方面的研究。E-mail: lychen@pku.edu.cn(通信联系人)

仅可以还原细胞内的精细结构,同时也可以实时监测细胞内广泛的信号通路变化过程。另一方面,由于斯托克斯频移,荧光激发和接收发生在不同的波长上,从而提供了高对比度高灵敏的探测方式,使得活细胞内检测单个荧光标记的分子成为可能。从本质上来说,荧光显微成像是一类可以用于活细胞、低侵害性的检测手段。活细胞内存在复杂而精细的调控系统,随时感受细胞内外环境的变化,通过各种信使分子的信号传递作用于靶分子来动态调控细胞功能。因此,与固定样本的显微成像相比,活细胞上的实时荧光成像能够揭示更多生命活动的本质机制。

长久以来两个因素一直限制光学显微成像技术在活细胞上的应用。一方面不论是普通的宽场显微成像还是共聚焦显微成像以及双光子显微成像等不同模式,其分辨率都受限于瑞利/阿贝衍射极限,不能突破 200 nm;另一方面,由于激发光的光漂白和光毒性作用,绝大多数的活细胞共聚焦荧光成像实验采样速度都很慢(秒级),也无法实现长达小时量级的长时间观察并记录细胞内生命活动过程。正如史蒂夫·乔布斯所预言的那样,21 世纪最大的创新将在于生命科学与现代技术的交汇。21 世纪的第一个 10 年见证了荧光成像领域的迅猛发展和深刻革命,不同领域(物理、化学、生物)的科学家努力协作,突破了两个瓶颈:一方面把显微镜的分辨率提升到纳米水平,实现了超高分辨率显微成像,并将其应用于生物学研究中,并由此获得 2014 年的诺贝尔化学奖^[1];另一方面就是发展出来的光片荧光显微镜(层状光激发显微镜)显著提高了荧光显微镜的三维成像速度,降低了光漂白以及光毒性,使得科学家们能够长时间地观察生理状况下细胞的生命活动。2014 年,《Nature Methods》杂志在评选建刊十周年生物医学领域的十大新技术时,光片荧光显微镜和超高分辨率显微镜一起名列其中,二者深刻地影响和改变了 21 世纪生物医学观察和人们理解生命活动的方式^[2]。本文总结了光片荧光显微镜的发展历史以及近年来的研究进展,以期为该领域的研究人员更好地认识和了解光片荧光显微镜提供一些帮助。

2 层状光选择照明显微镜

不论是宽场显微镜(落射式)还是共聚焦显微镜,都是通过同一个物镜来激发样本并且收集从样本上发射出来的荧光。首先,照明时整个细胞/组织样本的三维范围都被照射,而位于焦平面以外的样本发射出的荧光也会影响成像的对比度;在共聚焦显微成像时,需要用小孔来限制焦平面以外的样本发射出的荧光,从而提高成像的对比度。因此,为了得到一幅三维空间的图像,样本里所有的荧光分子实际上都受到了多次照射,一方面显著地增加了光毒性,另一方面由于光漂白的增加,降低了可以连续成像的时间。

与经典的荧光显微镜相比,光片荧光显微镜的特点在于用两个或者多个显微物镜成像,其中激发和发射的光路分开,从而保证选择性地激发需要观察的区域,减少无效曝光,从而显著降低光漂白和光毒性^[3]。光片显微镜的概念最早的起源要追溯到 1903 年,当时的科学家 Siedentopf 等^[4]提出将两个显微物镜呈直角排列在一起,让太阳光通过侧向显微物镜选择性地照明胶体溶液样本中的特定薄层,增强信号的对比度,通过正置的显微物镜观察胶体溶液中的颗粒的特性。由于这种激发光路和成像光路分开的显微镜和通常的生物显微镜观察样本的模式不兼容,很长时间以来没有得到关注。20 世纪 90 年代初,通过加入不同油的混合物来匹配生物样本的折射率,使得样本透明化的工作开始出现。为了达到较大、透明化的生物样本的快速三维荧光成像的目的,Spelman 研究小组^[5]于 1993 年研制了一套称为“垂直平面荧光光学层切(OPFOS)”的光片显微镜系统,OPFOS 显微镜具有现代光片显微镜的所有组分,包括用于产生光片的激光器、光束放大装置和柱面镜、样本室构造、样本的激发与成像成直角的模式等。但是,由于当时并没有太多透明化生物样本的需求,因此 OPFOS 光片显微镜也没有得到广泛的认同和应用。

20 世纪 90 年代初 Ernst Stelzer 和受激发射损耗(STED)超分辨率技术的发明人 Stefan Hell 合作,采用将两个显微物镜对在一起的方式来研究如何提高共聚焦显微镜的轴向分辨率这一问题^[6]。之后他们就按照各自的研究思路,奠定了超高分辨率和光片显微成像模式。2004 年,Stelzer 研究小组的 Huisken 等^[7]在《Science》杂志上报道了第一个现代意义上的光片显微镜,命名为层状光选择照明显微镜(SPIM)。SPIM 通过柱面镜和直角放置的照明物镜形成高斯光片,选择性地激发生物样本特定的平面,被激发的样品面上发射出的所有的荧光都被探测物镜和相机所收集。由于用于激发和探测的两个显微物镜正交排列,因此放置生物样本的容器也与传统显微镜的载物台不同。SPIM 的原理图如图 1 所示。

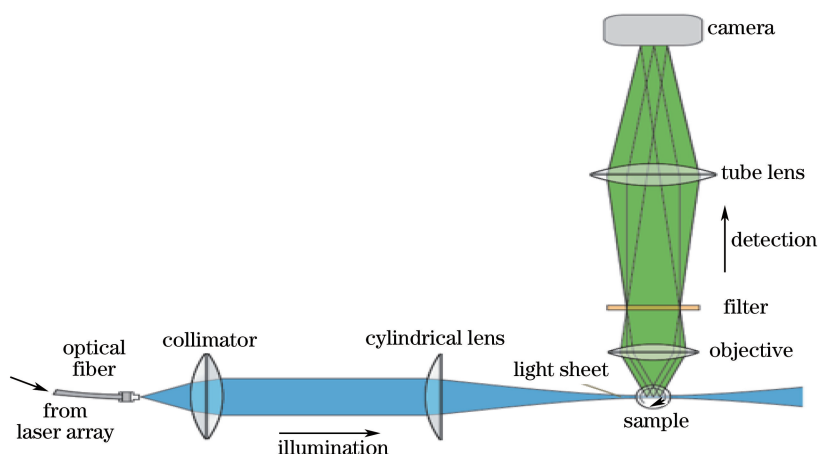


图 1 SPIM 原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of SPIM

Keller 等^[8]重新设计了样本装置,将透明、麻醉的青鲑鱼的胚胎包裹在低熔点的琼脂柱(折射率和水接近)中,然后将琼脂柱从玻璃管中推出来,放置在照明和采集光路中心进行成像。利用半峰全宽为 $6.5 \mu\text{m}$ 的光片照明,SPIM 实现了整条鱼胚胎的成像,并能够以 10 frame/s 的速度清晰记录到青鲑鱼胚胎心脏跳动时的三维收缩过程,另外还记录了果蝇卵在 20 h 内的整个发育过程,这是首次在这里快和长的时间尺度上记录发育过程,凸显了光片显微镜成像速度和低光毒性的成像优势,是活体荧光显微成像发展的转折点^[7]。

由于使用较低数值孔径(一般小于 0.1)的显微物镜来产生高斯光片,光片显微镜穿透深度一般超过传统显微镜。尽管如此,活体样品本身的折射率不均匀以及散射特性仍然会在深层成像时带来显著的图像畸变和模糊,这会降低图像的分辨率和对比度。利用光片显微镜样本台自由旋转的特性,光片可以从不同方向照明样本,得到各个方向上的清晰图像,结合在一起可以显著提高光片显微镜在对厚样本成像时分辨率和对比度上的一致性^[9-10],如图 2 所示。

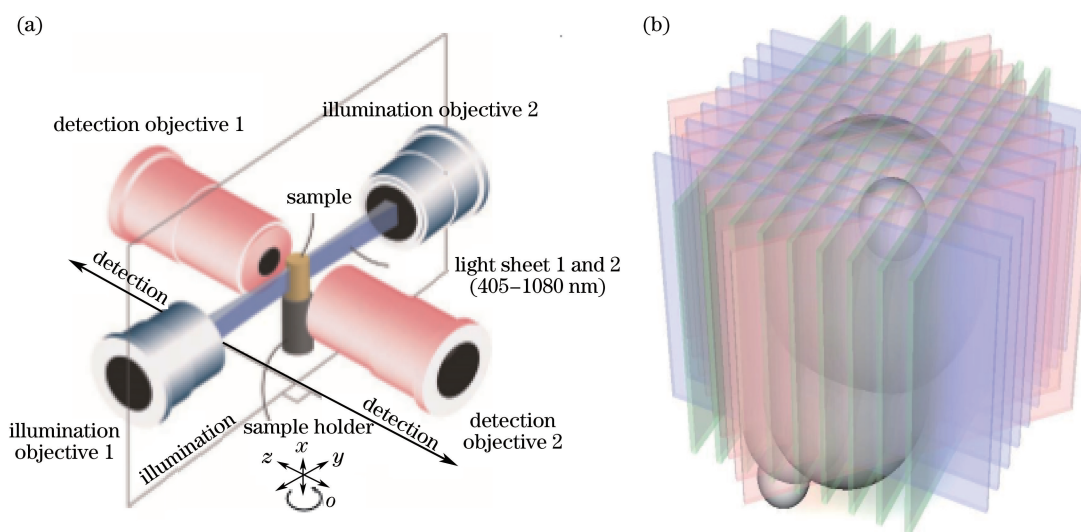


图 2 利用 SPIM 进行多角度成像^[9-10]

Fig. 2 Multiple-angle imaging with SPIM^[9-10]

多角度成像的缺点是在不同角度的图像是在不同的时间拍摄的,如果在成像过程中转动样本时发生移动,合成多角度图像时就会出现伪迹。为了解决这个问题,Dodt 和 Becker 分别在 2007 年和 2008 年将双边照明引入到光片荧光显微镜中,提高成像时的照明深度^[9]。另一方面,激发荧光物质后其发射荧光在空间内 360 度传播,光片显微镜引入了双边检测的模式,然后将得到的图像融合,从而提高检测信号的信噪比。通过多角度成像,SPIM 可以实现 XYZ 三个方向上分辨率的一致性。

早期的光片显微成像中还存在伪影问题。伪影是当光穿过组织平面时,遇到对激发光产生明显吸收的结构所产生的一些暗线。伪影问题可以通过在成像时小角度地旋转柱面镜来解决^[11],或者是成像后通过后期算法处理移除^[12]。通过这些改进,即使是单光子的光片荧光显微镜,也可以得到深层组织甚至是像果蝇、斑马鱼胚胎这样模式的动物的整体三维图像。但是,SPIM 这样的光片显微镜也有几个主要的缺陷:第一,激发光要被一套水平和垂直的狭缝裁剪来生成高斯层状光片,这个过程极大地降低了激发光的传输效率;第二,形成的高斯层状光片厚度并不均匀,因此三维成像中荧光的强度不一定可以定量反映荧光蛋白的多少;第三,柱面镜产生的光片是高斯型光束轮廓(光束波面上各点的振幅呈高斯型函数分布),高斯型光束只有在焦点处(高斯光束的束腰处)厚度最薄。束腰两侧的光束厚度会增大。在高斯型光束中,光束厚度和束腰处基本保持相同的这一距离称为共焦参数。由于柱面镜只在一个方向对光束进行了会聚,因而产生的光片相当于高斯光束在垂轴面的一个方向上扩展而形成的光片,光片的形状也是在焦平面处最薄,往两边延展变厚。在一般的光片显微镜中,其轴向分辨率等于激发物镜产生的光片与接收物镜的轴向点扩展函数的乘积^[13-14],因此,光片厚度 $[(\lambda_{exc}/2NA_{exc})]$ 越薄,轴向分辨率越高(其中, λ_{exc} 表示激发光的波长, NA_{exc} 表示用于照明的物镜的数值孔径);厚度越厚,轴向分辨率越低,同时光片厚度保持相对较薄的长度也决定了成像视场的大小,由于高斯型光束的截面半径轨迹为双曲线,厚度保持相对较薄的区域很有限,要想光片薄,那么光片的长度就较短;要想有更大的视场,则意味着更厚的光片以及轴向分辨率的下降。因此,本质上光片显微镜的分辨率和视场存在矛盾。总体来说,SPIM 大致可以达到细胞水平的分辨率,但是在类似于果蝇胚胎这样的富含脂类的高散射样本成像时,并不能够很好地分辨出每一个细胞的形状和结构。

3 数字扫描的光片显微镜

2008 年,Stelzer 研究小组的另一位博士 Phillip Keller 开创性地采用了数字扫描的方法来产生光片,改变了之前产生高斯光片的模式。通过将激光扫描装置、 f -theta 透镜和聚光镜耦合在一起进入激发透镜,实现将激发光聚焦成为光线而不是光片,用扫描振镜使激发光线在成像面上快速扫描产生虚拟光片成像,称为数字扫描的光片显微镜(DSLM)^[15],其原理如图 3 所示。

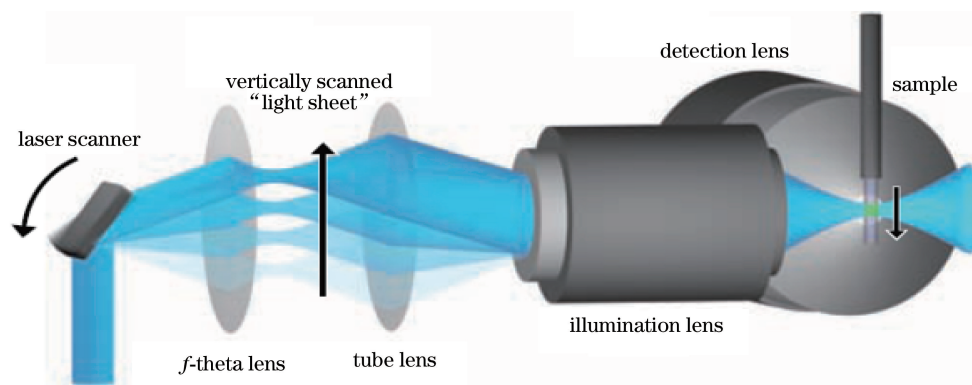


图 3 DSLM 原理示意图^[15]

Fig. 3 Schematic diagram of DSLM^[15]

与 SPIM 相比,DSLIM 利用动态扫描来产生光片的模式使得照明更加均匀,因此有更好的成像对比度。利用 DSLM 和细胞核的特定标记蛋白,Keller 等^[16]第一次观察到斑马鱼胚胎早期发育的 24 h 内每一个细胞的动态过程,包括运动和分裂过程,并建立了斑马鱼胚胎发育的数字图像档案。但是,当用荧光探针标记所有细胞的细胞膜时,DSLIM 仍然无法清楚地分辨斑马鱼胚胎每个细胞的边缘。可以通过控制扫描时激光的开关,在扫描中加入结构光的照明模式,从而提高成像的对比度和分辨率,实现同时对斑马鱼胚胎内每个细胞的细胞膜和细胞核进行双色清楚成像。

DSLIM 可以进一步延展成为双边激发和双边接收的模式。运用这种模式,Keller 独立后在霍华德·休斯医学研究所(HHMI)的研究小组于 2012 年以每 35 s 一张的成像速度观察了连续 24 h 的高散射的果蝇胚胎发育过程,并清晰地分辨出了其中每一个细胞。Keller 采集的数据达到了 10 T,以致于需要编写特定的算

法来处理这样数量庞大的数据^[17]。进一步地, Keller 研究小组^[18]利用钙离子的荧光探针 GCaMP5 来标记神经元,在大约 1.3 s 内的时间尺度上观察了斑马鱼大脑内十万个神经元活动的工作状态,并持续观察了 1 h 内所有神经元的自发活动,充分显示出 DSLM 在成像速度、分辨率和低漂白等方面的优势。尽管如此, DSLM 仍然受光片的厚度和视场大小之间成反比的影响,大多数情况下光片厚度为 3~8 μm ,成像的分辨率虽然比 SPIM 有改进,但是仍然低于高数值孔径的共聚焦或者是双光子显微镜。

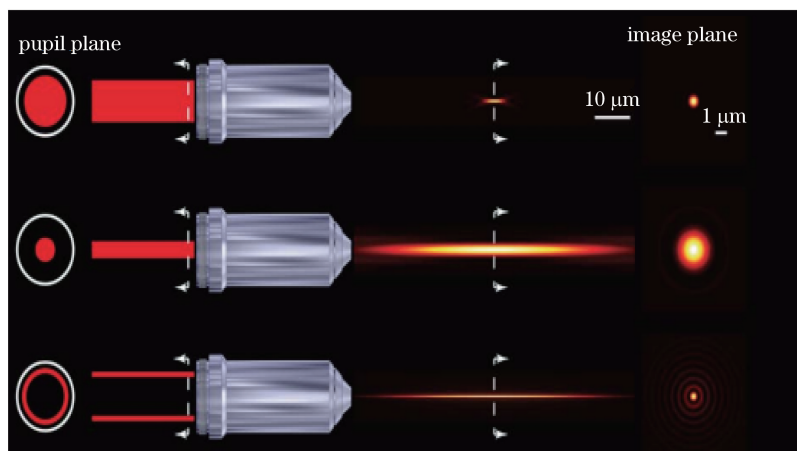
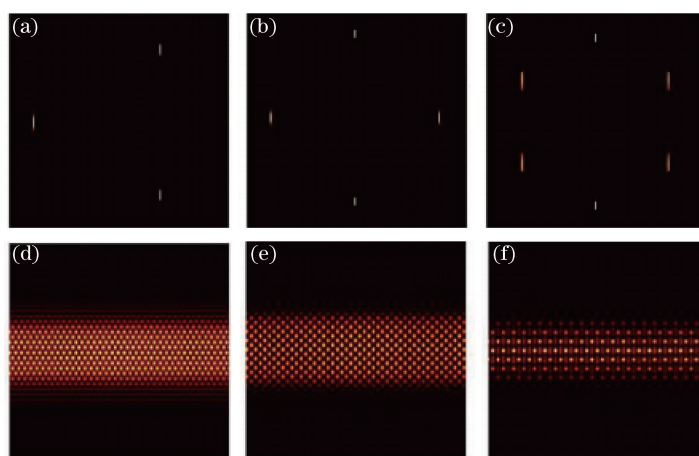
4 高分辨率的光片显微镜

理论上,为了提高光片荧光显微镜的横向分辨率,可以尽可能地提高探测物镜的数值孔径;为了提高光片显微镜的轴向分辨率,可以尽可能地降低光片的厚度。但是,由于一般的光片显微镜需要激发和探测物镜成直角排列在一起,样本也一般直接放置在水(培养基)或者先固定在琼脂上然后放在水(培养基)中,因此不能像传统的荧光显微镜那样,单纯使用高数值孔径的油镜来增加横向分辨率。另一方面,即使是使用高数值孔径的水镜,也必须考虑相应物镜的尺寸和工作距离是否可以匹配激发物镜的尺寸和工作距离(是否可以同时装配在一起)。由于上述因素的限制,高分辨率光片荧光显微镜一般会采用两种构象,一种方法是应用激发和探测物镜的数值孔径都尽可能高的组合:一个常见的方案是用数值孔径 1.0 以上的水镜作为探测物镜,这时相应的产生光片的激发物镜一般是长工作距离水镜,数值孔径值相对较小,这使得轴向分辨率降低。针对这个问题, Betzig 研究小组^[19]向美国 Special Optics 公司定制了一款长工作距离、数值孔径为 0.65 的水镜,可以配合 Nikon 公司的数值孔径为 1.1 的水浸物镜,从而实现了成像分辨率的最佳组合。另一种方式是试图找到一种方式来排列光片显微镜的激发光,从而可以使用数值孔径为 1.3 甚至更高的油镜。谢晓亮研究小组^[20]发明了一种光片显微镜,将 40 倍、数值孔径为 0.8 的水镜置于数值孔径为 1.35 的探测油镜的侧上方,将从 40 倍水镜会聚的高斯光束通过一个原子力显微镜上的悬臂反射到油镜的视野中心和聚焦层面,形成宽度大约为 1 μm 的层状光,这极大地提高了光片显微镜的对比度和分辨率。利用这种模式的光片显微镜可以记录通过细胞核中心的单个绿色荧光蛋白(GFP)分子,证明了这种显微镜的灵敏度和分辨率都很高^[20]。但是这种显微镜的缺陷是实验中每次换细胞时,光片聚焦的位置都需要精确调整,步骤非常繁琐,不适于通常的生物学实验。针对这个问题,法国的 Sibarita 研究小组^[21]发明了一种微芯片,将金属的反射镜以与培养皿底部成 45° 的方式固定到整齐排列的每一个细胞培养皿;该研究小组使用数值孔径为 1.4 的油镜实现了单个细胞三维尺度上的光片显微成像和基于单分子的超高分辨率成像。

但是,在这些高分辨率的光片显微镜中成像的分辨率和视场大小的矛盾仍然存在,而限制视场大小的关键在于产生光片的大小。Betzig 研究小组的 Planchon 等^[22]和 Gao 等^[19]分别在 2011 和 2012 年首先尝试使用贝塞尔光束替代高斯光束来产生光片。贝塞尔光束是一种非衍射光束,其截面轮廓显著小于高斯光束,向前传播时截面轮廓和光强都保持不变,理论上在无限长穿透深度上都可以保持光片的厚度一致。利用一定方法使一个无限窄的圆环光从物镜后瞳面上进入物镜时,从物镜出来的光就是贝塞尔光。然而,由于实际入射不可能得到无限窄的圆环光,因此实验中产生的光束实际上是贝塞尔-高斯光束,如图 4 所示。

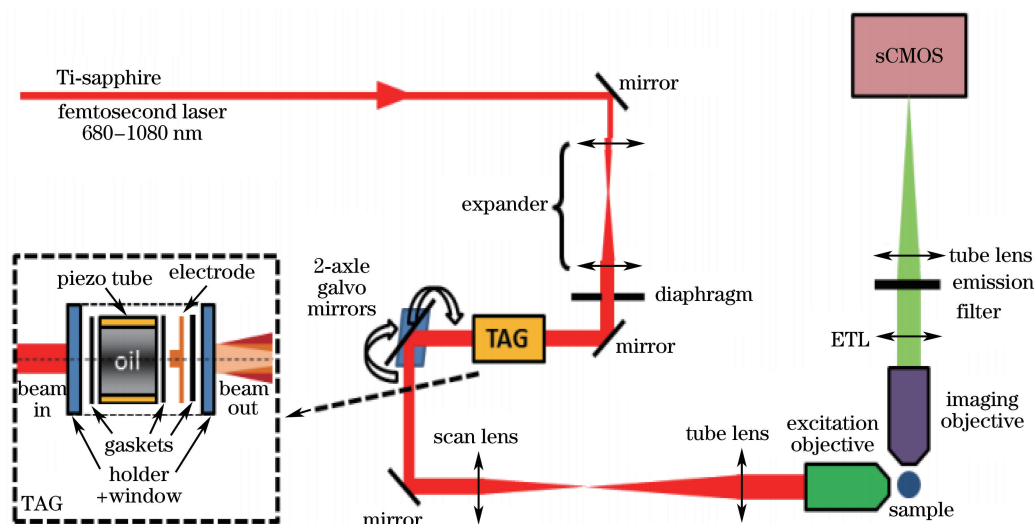
当入射圆环光的宽度越窄时,得到的光就越接近于贝塞尔光,光束的长度也会越长,旁瓣所占的能量也会越多;宽度越宽,得到的光就越接近于高斯光束,光束长度也会越短,旁瓣所占的能量也会越少。采用双光子激发,可以解决当贝塞尔-高斯光束长度增加时,由于旁瓣能量增大导致单光子入射的光毒性和光漂白增强的问题,得到厚度几百纳米、长度几十微米的双光子光束。在数值孔径为 1.1 的探测物镜下,双光子贝塞尔平面照明实现了几乎均匀的三维空间分辨率,可以观察到细胞表面的动态三维结构^[19]。但是,双光子激发的峰值功率很高,激发效率较低,而分辨率也低于单光子光片显微镜;而单光子光片应用贝塞尔-高斯光束时视场较大时光漂白会以非线性方式增加,因此限制了它的应用场景。

为了解决这个问题,2014 年 Betzig 研究小组的 Chen 等^[23]又发明了一种晶格光片显微镜,该显微镜主要的改进在于用可编程的空间光调制器(SLM)调整进入照明物镜的光束形状,使照明物镜的光形成排列整齐的多束贝塞尔干涉,从而显著减少旁瓣的激发能量同时保持很薄的光片厚度,使得单光子激发状态下可以同时实现高分辨率、相对较大的视场以及较低的光毒性。如图 5 所示,其中图 5(a)~(c)代表物镜后瞳面所给的不同的贝塞尔干涉模式,图 5(d)~(f)为(a)~(c)三种不同的贝塞尔干涉模式所产生的光片。

图 4 物镜后瞳面不同入射光对应的出射光情况^[22]Fig. 4 Status of emergent rays for different incident rays on the rear pupil plane of objective^[22]图 5 照明物镜后瞳面上不同的光束形状对应的样品面上的激发光形状^[23]. (a)~(c)不同贝塞尔干涉模式的后瞳面光强;(d)~(f)不同的贝塞尔干涉模式所产生的光片Fig. 5 Forms of the exciting rays on the sample planes corresponding to different forms of rays on the rear pupil plane of illumination of objective^[23]. (a)-(c) Intensity at rear pupil plane with different Bessel interference modes; (d)-(f) light sheet generated by different Bessel interference modes

通过产生不同的贝塞尔干涉模式,晶格光片显微镜也可以和结构光照明结合,进一步提高空间分辨率。由于光片可以同时照亮整个视场,因此在极低的峰值激发功率的情况下也可以实现每秒成像几百个平面。通过结构光照明或者抖动光栅来产生均匀的光片,实现了在亚秒间隔下(10 Hz)对细胞和胚胎样本在成百上千个时间点上的以极限分辨率或者超分辨率三维成像。Chen 等^[23]在 20 种不同的、时空上跨越了 4 个数量级的生物过程中证明了其技术的优越性。值得一提的是,针对光片显微镜成像视场与分辨率之间的矛盾,本课题组也于 2014 年发明了目前为止大视场显微成像下分辨率最高的光片显微镜模式。通过调制超声可调制梯度(TAG)透镜进行高速点扫描产生的虚拟片层光来照明样本,应用两个数值孔径为 0.8 的水镜来作为激发和探测物镜,成功发明了双光子三轴数字扫描光片显微镜(2P3A-DSL_M)^[14],其原理图如图 6 所示,图中 sCMOS 表示科研级互补金属氧化物半导体相机,ETL 表示电动可调透镜。

与其他的光片显微镜相比,2P3A-DSL_M 在保持超大视场(200 μm × 200 μm)的同时,具有最薄(700~800 nm)的光片,空间分辨率在 XY 方向上达到 440 nm、Z 方向达到 700~800 nm,使得在活体模式动物组织深处定量观察和研究亚细胞精细结构和动态过程成为可能。通过理论推导和实际实验,本课题组系统比较了 2P3A-DSL_M 与现有的双光子点扫描显微镜的分辨率、光漂白以及光毒性。结果证明新研制的 2P3A-DSL_M 具有采样速度快(100 frame/s, 2048 pixel × 2048 pixel)、光损伤小以及深层组织成像等优点。

图 6 2P3A-DSLIM 原理图^[14]Fig. 6 Schematic illustration of 2P3A-DSLIM^[14]

另外,由于视场大小由 TAG 的调制深度和扫描镜的偏转角度决定,因此光片的面积可以从 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ 到 $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ (应用不同的激发物镜),这样在一台装置上就可以实现多尺度、自适应(细胞、组织、动物)活体成像。

5 光片显微镜的应用和未来

光片显微镜正以其较低的光毒性和光漂白、高时空分辨率的特性,为三维细胞生物学、发育生物学以及神经科学等提供更好的成像方法。目前,生命科学研究领域的另一个高地是脑连接组学,其中通过连续切片或者是透明化后实现全脑神经元水平的精细成像是重要的一步,而成像速度也是限制瓶颈之一。光片显微镜兼具高时间和空间分辨率的特点,将极大地加速透明脑成像的成像通量,促进从大量的鼠脑以及其他哺乳类动物大脑神经连接组中找到规律的过程^[24]。另一方面,光片显微镜也可以向自动化、智能化高内涵显微成像的方向发展^[25],使高内涵显微镜不仅仅应用在细胞水平的筛选上,还可以应用到例如斑马鱼这类模式动物的在体筛选上,成为药物筛选平台,前景广阔。

有了更高的轴向分辨率、更大的视场、更快的成像速度之后,如何使光片显微镜在高散射生物样品中的成像深度更深,是未来光片显微镜的一个发展方向,更长的波长带来的散射效应的减弱无疑是一种最简单的办法,自适应光学作为一种波前校正技术也可以被引入光片显微镜用于解决光片显微镜的成像深度问题。另一方面,光片显微镜会产生大量的图像数据,如何对这些图像数据进行定量、自动化分析,抽取其中的生命活动信息是当前迫切需要解决的问题。最后,新的光学器件的出现也将进一步推动光片显微镜的发展,包括更大功率、更稳定的光源,更高量子效率的 sCMOS 相机,更个性化的入射以及发射显微物镜的设计等。值得一提的是,国内在这些方面发展很快,已经发展了一些独特器件,包括特制的 $920\ \text{nm}$ 的光纤飞秒双光子激光器^[26-27]、长工作距离激发物镜(东利来光电实业有限公司, IPLNAPO NIR 20x, 数值孔径为 0.7)^[28]等,这些器件在世界上处于领先的地位,将有望做出原创性的贡献,并推动光片荧光显微镜领域的发展。

参 考 文 献

- [1] Huang B, Bates M, Zhuang X. Super-resolution fluorescence microscopy[J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78(1): 993-1016.
- [2] Miller C J. Ten years of methods[J]. Nature Methods, 2014, 11(10): 1000-1001.
- [3] Huisken J, Stainier D Y. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology [J]. Development, 2009, 136(12): 1963-1975.
- [4] Siedentopf H, Zsigmondy R. Über sichtbarmachung und groessenbestimmung ultramikroskopischer teilchen, mit

- besonderer anwendung auf goldrubinglaesern[J]. *Annalen der Physik*, 1903, 10: 1-39.
- [5] Voie A H, Burns D H, Spelman F A. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens[J]. *Journal of microscopy*, 1993, 170(3): 229-236.
- [6] Hell S W, Stelzer E H, Lindek S, *et al.* Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, 19(3): 222-224.
- [7] Huisken J, Swoger J, Bene F D, *et al.* Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. *Science*, 2004, 305(5686): 1007-1009.
- [8] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, *et al.* Digital scanned laser light-sheet fluorescence microscopy (DSLM) of zebrafish and *Drosophila* embryonic development[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, 2011(10): 1235-1243.
- [9] Swoger J, Huisken J, Stelzer E H. Multiple imaging axis microscopy improves resolution for thick-sample applications [J]. *Optics Letters*, 2003, 28(18): 1654-1656.
- [10] Weber M, Huisken J. Light sheet microscopy for real-time developmental biology[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011, 21(5): 566-572.
- [11] Huisken J, Stainier D Y. Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM)[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(17): 2608-2610.
- [12] Leischner U, Schierloh A, Zieglgansberger W, *et al.* Formalin-induced fluorescence reveals cell shape and morphology in biological tissue samples[J]. *PloS One*, 2010, 5(4): e10391.
- [13] Engelbrecht C J, Stelzer E H. Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (SPIM)[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(10): 1477-1479.
- [14] Zong W J, Zhao J, Chen X Y, *et al.* Large-field high-resolution two-photon digital scanned light-sheet microscopy[J]. *Cell Research*, 2015, 25(2): 254-257.
- [15] 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.
- [16] Keller P J, Schmidt A D, Santella A, *et al.* Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(8): 637-642.
- [17] 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.
- [18] Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, *et al.* Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(5): 413-420.
- [19] Gao L, Shao L, Higgins C, *et al.* Noninvasive imaging beyond the diffraction limit of 3D dynamics in thickly fluorescent specimens[J]. *Cell*, 2012, 151(6): 1370-1385.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Planchon T A, Liang G, Milkie D E, *et al.* Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(5): 417-423.
- [23] 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): 1257-998.
- [24] Tomer, R, Lovett-Barron M, Kauvar I, *et al.* SPED Light Sheet Microscopy: Fast Mapping of Biological System Structure and Function[J]. *Cell*, 2015, 163(7): 1796-1806.
- [25] Royer L A, Lemon W C, Chhetri R K, *et al.* Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(12): 1267-1278.
- [26] Gao X, Zong W J, Chen B Y, *et al.* Core-pumped femtosecond Nd: fiber laser at 910 and 935 nm[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(15): 4404-4407.
- [27] Chen B Y, Jiang T X, Zong W J, *et al.* 910 nm femtosecond Nd-doped fiber laser for in vivo two-photon microscopic imaging[J]. *Optics Express*, 2016, 24(15): 16544-16549.
- [28] 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.