

## 基于线扫描成像的光片荧光显微镜

吴越前<sup>1</sup>, 徐欣<sup>2</sup>, 王吉祥<sup>2</sup>, 张欣<sup>2\* \* \*</sup>, 史国华<sup>2\* \*</sup><sup>1</sup>复旦大学工程与应用技术研究院, 上海 200433;<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** 设计了一种基于线扫描成像(LSI)的光片荧光显微镜(LSFM),旨在通过抑制样本散射达到提高成像质量的目的。该显微镜将数字扫描光片荧光显微镜(DSLM)与 LSI 两种方法结合,以前者为基础,在探测光路上增加了一个用于解扫描的扫描振镜。在控制过程中,将照明光路的扫描振镜与解扫描振镜同步,使得均匀运动的图像在相机前固定于同一位置,从而实现了 LSI。在系统中,为了便于与传统方法对比,线阵探测器通过面阵相机模拟实现。另外,与常规的 LSFM 相比,改进后的系统,在高散射荧光微球样品和斑马鱼心脏样品的成像实验中,更有效地抑制了样本散射。因此,验证该方法具有可行性。

**关键词** 显微; 光片荧光显微镜; 样本散射; 线扫描成像; 斑马鱼

中图分类号 TH742

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202141.2018001

## Light Sheet Fluorescence Microscope Based on Line-Scanning Imaging

Wu Yueqian<sup>1</sup>, Xu Xin<sup>2</sup>, Wang Jixiang<sup>2</sup>, Zhang Xin<sup>2\* \* \*</sup>, Shi Guohua<sup>2\* \*</sup><sup>1</sup>Academy for Engineering and Technology, Fudan University, Shanghai 200433, China;<sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

**Abstract** An updated light sheet fluorescence microscope (LSFM), combining the digital scanning light sheet fluorescence microscope (DSLIM) and the line-scanning imaging (LSI) method, is designed to improve the imaging quality by decreasing sample scattering. Based on DSLIM, a scanning galvanometer for descanning is added in the detection light path. Moreover, the scanning galvanometer in the illumination light path is synchronized with the descanning galvanometer to fix the evenly moving images at the same position in front of the camera during the control process, thereby realizing LSI. The linear array detector is simulated by the area array camera in the system for conveniently comparing with the traditional method. In addition, compared with the conventional LSFM, the improved system is more effective in suppressing the sample scattering problem in the imaging experiments of high-scattering fluorescent microsphere samples and zebrafish heart samples. Hence, the feasibility of LSFM based on LSI method can be verified.

**Key words** microscopy; light sheet fluorescence microscope; sample scattering; line-scanning imaging; zebrafish

**OCIS codes** 180.2520; 110.0180; 170.2520

## 1 引言

光片荧光显微镜(LSFM)与传统的落射式荧光显微镜和共聚焦荧光显微镜不同,采用一薄层的光

片从侧面照明样品,因此仅仅激发样品的一个薄层切片,就能显著减少非焦平面的荧光产生从而提高对比度<sup>[1]</sup>。同时,每次只有单个平面被激光照射,显著减少了荧光分子被照射的时间,从而降低光漂白

收稿日期: 2021-03-01; 修回日期: 2021-04-07; 录用日期: 2021-05-06

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDB32030200)

通信作者: \* ghshi\_lab@126.com; \* \* zhangx@sibet.ac.cn

和光毒性的影响<sup>[2]</sup>,在长时间生物成像的相关研究中有明显优势<sup>[3-5]</sup>。

LSFM 由照明光路和探测光路两个部分组成。在照明光路中形成光片的方式主要有两种:1)通过柱面透镜聚焦高斯光束实现覆盖整个平面的光片,这种显微镜被称之为层状光选择照明显微镜(SPIM)<sup>[6]</sup>;2)将聚焦的高斯、贝塞尔或艾里光束通过振镜进行扫描从而形成一个虚拟的光片,称之为数字扫描光片荧光显微镜(DSLM)<sup>[7]</sup>。在探测光路中,目前的 LSFM 通常使用面阵相机进行成像<sup>[8]</sup>,使用面阵相机成像在成像帧率上有很大的优势。但是与线阵相机相比,在同等面积、同等分辨率的情况下面阵相机的成本很高。并且,由于目前相机技术的制约面阵相机的视场难以扩大,在探测端使用面阵相机会给 LSFM 视场扩展方面的研究带来很大的限制。

另一方面生物样品具有较强的散射<sup>[9]</sup>,散射的光子进入探测光路后会导致图像质量下降。目前主要的解决方法有光学清除技术<sup>[10]</sup>、结构光照明<sup>[11-12]</sup>和共焦线检测<sup>[13-15]</sup>三种。光学清除通过生物化学的方法对样本进行清洗以提高样本的透明度,从而减小样本散射。结构光照明的方法需要用多帧图像进行处理,实时性较差。共焦线检测的方式相对这两种方法更加的简单与常用。线阵相机自身就相当于空间滤波器,可以拒绝其他位置散射的荧光,从而减小样品散射的影响。因此线扫描成像(LSI)的方式天然就符合共焦线检测的原理,可以提升图像信噪比。

本文针对传统 LSFM 在探测光路上探索的不足以及样品带来的散射等问题,将 DSLM 与 LSI 进行结合,设计了基于 LSI 的 LSFM。照明光路的扫描振镜匀速运动扫描整个视场,在探测光路中通过解扫描振镜进行同步扫描,使得图像固定在同一位置,从而实现 LSI。本文系统使用面阵相机模拟线阵相机,实现 LSI,这样就可以在相同条件下与传统方法进行对比。整个系统保持了较大探测视场,对  $832\ \mu\text{m} \times 832\ \mu\text{m}$  的样品区域进行二维成像,得到  $2048\ \text{pixel} \times 2048\ \text{pixel}$ 、16 bit 的灰度图像,并通过荧光微球和斑马鱼心脏的成像实验证明了系统的性能。

## 2 基本原理

### 2.1 实验装置与原理

成像系统原理图如图 1 所示,488 nm 的半导体

激光器作为光源,经透镜( $f_1=30\ \text{mm}$ )准直之后通过 X 高速扫描振镜(S-9320M, Sunny Technology, 北京)。通过 X 振镜的光经由扫描透镜( $f_2=70\ \text{mm}$ )和筒镜( $f_3=100\ \text{mm}$ )组成的 4- $f$  系统后再通过轴向扫描振镜即 Z 振镜,对照明的深度方向进行调节。经过 Z 振镜的光通过扫描透镜( $f_4=39\ \text{mm}$ )和筒镜( $f_5=150\ \text{mm}$ )组成的扩束系统,使得光束直径和照明物镜(Mituyoto, MPlanApoNIR10 $\times$  NA=0.26,  $f_{E0}=20\ \text{mm}$ )的人瞳相匹配。经照明物镜聚焦光束激发样品的荧光的同时,探测物镜(CFI75LWD16XW, Nikon, 日本, NA=0.8,  $f_{D0}=25\ \text{mm}$ )从与照明物镜正交的方向上探测荧光,探测物镜连接的压电位移台用于调节物镜对焦或者配合 Z 振镜调节成像平面。探测物镜后为两个透镜组成的透镜组( $f_6=200\ \text{mm}$ ,  $f_7=100\ \text{mm}$ )。然后是一个解扫描振镜(S-9320M, Sunny Technology, 北京)将光斑进行回扫,使得光斑在透镜 8 处从同一位置入射。最终,荧光经过透镜 8 ( $f_8=100\ \text{mm}$ )聚焦到探测相机(ORCA-Flash4.0 V3, Hamamatsu, 日本)的成像单元上。整个系统的二维成像视场为  $832\ \mu\text{m} \times 832\ \mu\text{m}$ , 实际横向分辨率为  $0.4\ \mu\text{m}$ 。

DSLM 将高速扫描得到的虚拟光片作为一个整体当作成像单元,而本文系统将高斯光束中心最亮处当作成像单元。如图 2 所示,左边为一个三角形的样本被 X 扫描振镜偏移 to 上方的高斯光束照亮,右边为解扫描振镜将光束激发的荧光图像重新偏移 to 相机中心后的效果。在成像的过程,将高斯光束中心亮度最强处的单行像素拼接,得到完整的图像。

生物样本在成像过程中,由于组织中不同类型细胞的大小与折射率不一<sup>[16]</sup>,会导致光学散射现象的发生。如图 2 所示,光束照射到样品后,产生了大于光束宽度的荧光,这部分荧光包含与位置信息无关的噪声,会降低图像对比度<sup>[8]</sup>。在面阵成像过程中,由于所有像素同时曝光,收集到的额外散射光会降低图像的信噪比。但是在 LSI 过程中,只有中心有效光处的像素曝光,因此不会收集到额外的散射光,相当于通过狭缝进行了滤光,从而提升了图像信噪比。

这里相机选用的是滨松公司的 sCMOS 面阵相机,在解扫描振镜静止的情况下,系统等效为常规的 DSLM。相机设置曝光区域为 4 行像素(相机特性最小曝光行数为 4 行)后等效为线阵相机,让 X 扫描振镜和解扫描振镜同步扫描就可以实现 LSI。

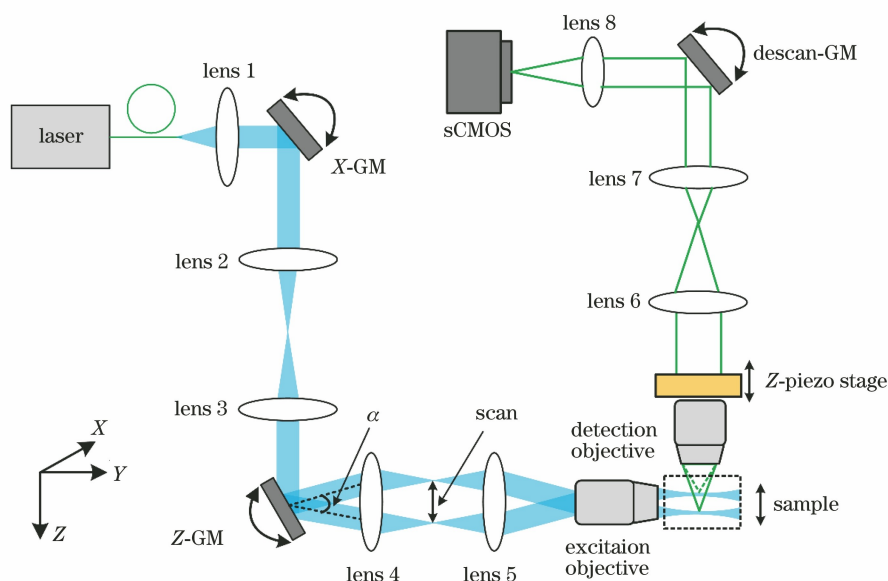


图 1 基于 LSI 的 LSFM 装置图

Fig. 1 Schematic of LSFM based on LSI

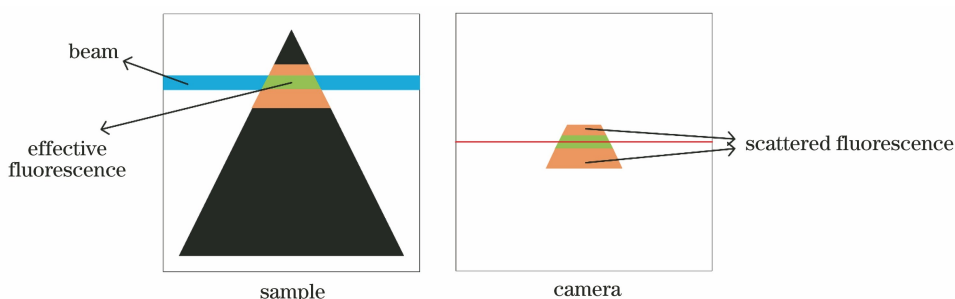


图 2 系统成像过程示意图

Fig. 2 Schematic diagram of system imaging process

使用面阵相机模拟线阵相机用于成像,有两个优点:1)常规的 DSLM 只能通过面阵相机成像,这样与 DSLM 进行比较时,排除了不同相机性能差异造成的结果误差;2)在同一实验中如果替换相机,则重新对准需要较长的时间,用于实验的活体生物样本生命状态可能发生变化,降低了对比结果的可信性。

## 2.2 同步控制系统

由于需要确保 X 扫描振镜、解扫描振镜以及相机的同步,才能实现 LSI。因此整个系统除了上述的光学结构之外,还需要同步控制系统用于控制系统中器件的运动。整个同步控制系统的结构以及信号传递流程如图 3 所示,控制模块通过控制信号使整个光学模块中的器件同步运动,它由上位机和下位机两个部分组成。

上位机为用户接口,用来进行控制参数的设置(成像帧率和视场大小)以及对采集得到的图像进行显示。下位机由模拟输出设备(PCIE-6738,

National Instruments, 美国)和图像采集卡(AS-FBD-1XCLD-2PE4-F, Active Silicon, 英国)组成,模拟输出设备产生三个通道的控制信号,并且保证控制信号的同步。前两个通道的控制信号驱动两个扫描振镜进行同步的运动,第三个通道给 sCMOS 相机一个起始触发信号控制图像采集卡对样品图像的采集。

图 4 为同步控制系统控制信号的时序图。模拟输出设备根据使用者设定的成像帧率、视场大小以 2 kS/s 的采样率输出对应的三角波来控制两个扫描振镜的运动。并且在扫描振镜运动到视场边界的位置时,给 sCMOS 相机一个起始触发信号从而开始图像的采集。虽然相机在起始触发模式下只需要一个上升沿信号就开始连续的图像采集,但是由于模拟输出设备的特性,会周期性地出现触发信号,额外的触发信号不会对设备产生不良影响。还有一点需要注意,同步扫描信号并不是标准的三角波而是

以零点为中心的分段线性函数,这是因为系统有难以通过手动调节的不对称,因此调整扫描的波形抵

消系统由于几何位置的不对称导致的误差,从而确保 LSI 过程中成像位置始终在相机靶面的中心。

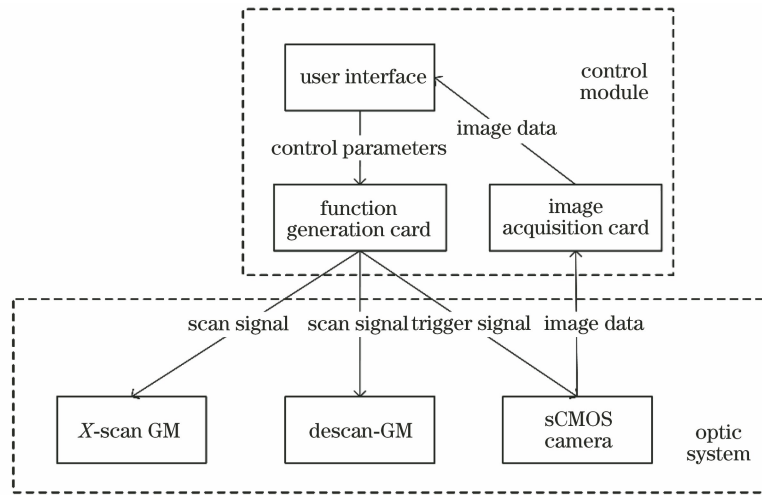


图 3 基于 LSI 的 LSFM 控制原理图

Fig. 3 Control principle of LSFM based on LSI

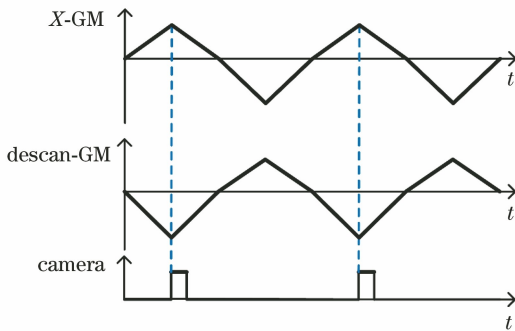


图 4 同步系统控制信号时序图

Fig. 4 Sequence chart of synchronization system control signal

相机在接收到起始触发信号之后便会连续不断地采集图像,为了提高系统的时间分辨率,所使用的扫描信号在上升与下降过程的占空比为 1:1,在来回两个方向的扫描过程中都进行图像的采集,因此在一个扫描周期内采集得到两帧图像,系统的成像帧频是扫描频率的两倍。

系统的帧率不完全取决于两个振镜的扫描频率,还由相机特性和图像行数决定。本实验中使用的探测相机(ORCA-Flash4.0 V3, Hamamatsu, 日本)是一款常用的科学相机,下文将根据相机特性对一些参数进行推导,这些公式在需要运用到局部区域曝光的情形下,对相机成像帧频的把握很有参考价值。相机的曝光时间设定与选定的曝光行数相关,在最小同时曝光 4 行的情况下曝光时间是  $38.96 \mu\text{s} \sim 10 \text{ s}$ ,因此系统的帧率表示为

$$f_{\text{image}} = 2f_{\text{scan}} \leq 25577.12/l, \quad (1)$$

式中:  $f_{\text{image}}$  是成像帧率;  $f_{\text{scan}}$  是扫描速度;  $l$  为图像行数。

另外相机帧频与扫描频率必须相匹配,否则得到的图像会出现拉伸或者压缩的现象。因此要注意对相机曝光时间的设定,相机曝光时间的特性表示为

$$t_{\text{exp}} = H \times \text{Ceiling}(t_{\text{in}} \div H), \quad (2)$$

式中:  $t_{\text{exp}}$  是实际曝光时间;  $t_{\text{in}}$  是输入的曝光时间;  $H$  是相机读出脉冲间隔,其值为  $9.74436 \mu\text{s}$ 。

在(2)式基础上,根据目标帧率推算应该输入的曝光时间,以及对应的实际帧率,表示为

$$t_{\text{in}} = \text{Ceiling} \left\{ \left[ \text{round} \left( \frac{1 \times 10^6}{H \times f_{\text{target}} \times l} \right) - 0.5 \right] \times H \right\}, \quad (3)$$

$$f_{\text{real}} = \frac{1 \times 10^6}{l \times H \times \text{Ceiling}(t_{\text{in}} \div H)}, \quad (4)$$

式中:  $f_{\text{target}}$  为目标帧率;  $\text{round}$  函数表示四舍五入。其中(3)式求解应该输入的曝光时间。在计算出实际输入的曝光时间后,根据(4)式计算相机的实际帧率  $f_{\text{real}}$ 。在成像大小  $2048 \text{ pixel} \times 2048 \text{ pixel}$ 、目标帧率  $10 \text{ Hz}$  下,通过计算得到输入的曝光时间应该为  $44 \mu\text{s}$ ,此时相机的实际曝光时间和系统的实际帧率分别为  $48.7218 \mu\text{s}$ 、 $10.0218 \text{ Hz}$ 。

系统中使用的面阵相机像素逐行读出,并且每行至少需要  $9.74436 \mu\text{s}$  的读出时间,因此用于曝光的像素行越少,曝光时间下限越短,成像速度上限越高。由于相机的特性最少同时曝光 4 行像素,为了得到最快的成像速度只选取了中心位置的 4 行像素

用于曝光。本文中成像大小  $2048 \text{ pixel} \times 2048 \text{ pixel}$ , 根据(1)式计算得到系统最快成像帧率为  $12.488 \text{ Hz}$ 。

### 3 实验与结果

#### 3.1 系统稳定性测试

溶有荧光染料的琼脂糖凝胶用于成像时, 可以看到清晰的高斯光束, 通过成像得到高斯光束图片, 寻找光束峰值位置, 并以此作为光束中心位置。在 LSI 过程中连续采集光束图像, 根据光束中心位置的偏移来判断整个系统同步扫描的过程是否稳定。

实验中将荧光染料(Rhodamine 123)以 1:1000 的比例溶解到质量浓度为 1% 的琼脂糖溶液中, 然后将琼脂糖溶液灌注到样品槽, 等待其凝固成凝胶后作为实验样本。由于探测物镜为水镜, 待琼脂糖凝固后向样品池中注入水, 并调节样品台的位置, 使探测物镜浸没于水中。设置相机曝光行数为中心处的 200 行, 曝光时间为  $1 \text{ ms}$ , 此时成像帧率为  $1 \text{ kHz}$ , 图像大小为  $2048 \text{ pixel} \times 200 \text{ pixel}$ 。启动控制系统让 X 扫描振镜与解扫描振镜以  $5 \text{ Hz}$  的速度(对应 LSI 帧率为  $10 \text{ Hz}$ )开始同步扫描, 然后使用相机采集 1000 帧光束图像, 结果如图 5 所示。

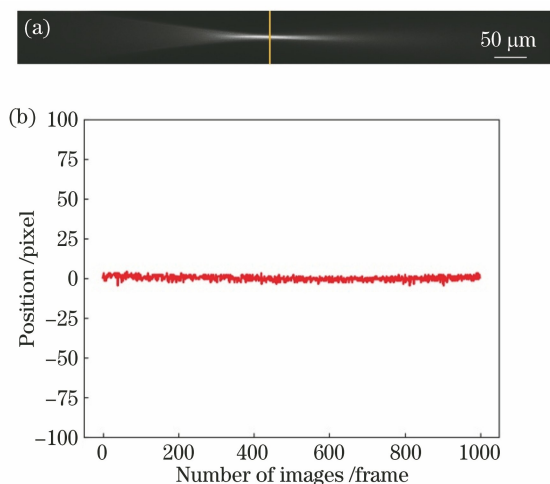


图 5 基于 LSI 的 LSFM 稳定性测试。(a)单帧高斯光束示意图;(b) LSI 过程中高斯光束的峰值位置统计图

Fig. 5 Stability test of LSFM based on LSI. (a) Schematic of a single frame Gaussian beam; (b) statistic diagram of peak position of Gaussian beam in LSI process

图 5(a)为连续采集到的高斯光束的一帧。在连续采集得到的 1000 帧图像中, 处理如图 5(a)所示的标记线处的图像强度, 获得每帧图像在标记线处的光强峰值位置。然后对这 1000 个光强峰值位

置进行了统计, 得到图 5(b)的结果。可以看出, 光强峰值位置基本稳定在图像中心, 并且计算得到光强峰值位置数据的平均差为  $1.181 \text{ pixel}$ , 对应到样本上偏差为  $0.48 \mu\text{m}$ 。考虑到在视场边界由于像差等因素导致高斯光束的形状不再标准等误差, 可以证实整个 LSI 过程均匀稳定。

#### 3.2 荧光微球成像

本实验的样品为直径  $0.2 \mu\text{m}$  的荧光微球 (Invitrogen, F8811) 以 1:50 的比例溶解到 1% 的琼脂糖溶液中, 然后注入样品槽中, 等待降温凝固后形成高散射的样本。此样本用于测试在高散射情形下系统的成像效果。整个实验进行了两次成像, 第一次成像保持解扫描振镜不动, X 振镜以三角波高速地扫描整个视场, 得到 DSLM 的图像, 成像帧率为  $10 \text{ Hz}$ 。第二次, 使用 LSI 模式进行成像, 设置相机曝光时间为  $44 \mu\text{s}$ , 相机曝光宽度为 4 行, 将得到的 2048 帧图像, 每帧选取中心处的 1 行图像进行拼接, 得到完整的图像, 整体的成像帧率也是  $10 \text{ Hz}$ 。两种方法均得到  $2048 \text{ pixel} \times 2048 \text{ pixel}$ , 16 bit 的灰度图像, 将两种方法下相机采集到的原始图像进行对比, 结果如图 6 所示。

由于面阵相机曝光过程中, 相机所有像素都可以接收荧光分子, 因此大量散射的荧光光子被相机接收, 因此在高散射的样品中得到的图像有很强的背景噪声, 如图 6(a)所示。而本系统所获取的图像, 荧光微球主要集中在高斯光束聚焦的部分, 并且背景噪声更弱, 如图 6(b)所示。为了量化图像质量改进的效果, 在图 6(a)和(b)选取相同区域得到图 6(c)和(d), 对图 6(c)和(d)中标记线处的归一化强度进行了分析。结果如图 6(e)所示, 证明了基于 LSI 的 LSFM 的信噪比相对 DSLM 有很大的提升。

#### 3.3 斑马鱼成像

实验采用孵化两周的增强型绿色荧光蛋白 (flk1:EGFP) 标记血管的转基因斑马鱼, 用 1% 琼脂糖将其固定在样品槽中。琼脂糖凝固后, 向其中注入水使探测物镜浸没于水中。

对 DSLM 和线扫描成像两种方法都以  $10 \text{ Hz}$  的速度进行成像, 两种方法均得到  $2048 \text{ pixel} \times 2048 \text{ pixel}$ , 16 bit 的灰度图像。将两种方法下相机采集到的原始图像进行对比, 结果如图 7 所示, 图中箭头指示的是斑马鱼的心脏所在位置。图 7(a)和(b)分别是 DSLM 和基于 LSI 的 LSFM 的结果。在图 7(a)和(b)中选择血管较为密集的地方得到图 7(c)和(d), 对图 7(c)和(d)中标记线处的归一化强

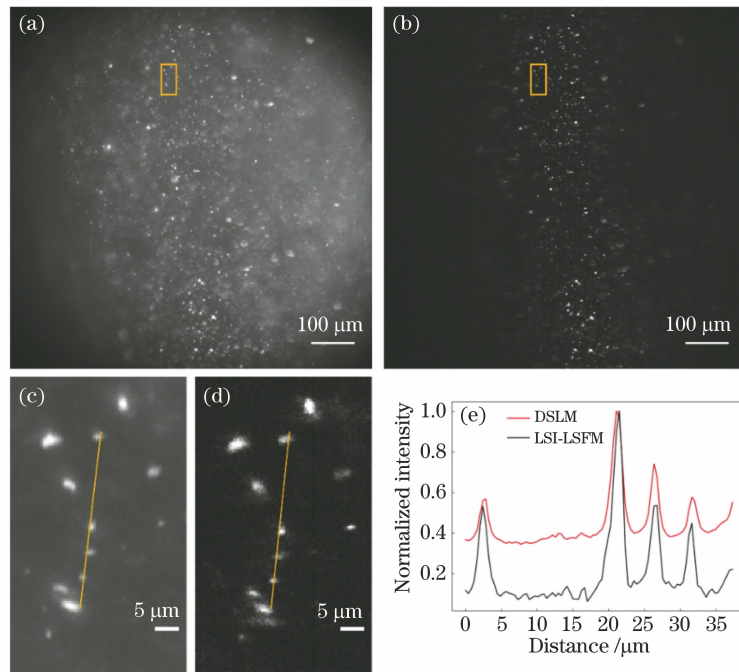


图 6 高散射情形下数字扫描 LSFM 和基于 LSI 的 LSFM 的对比图。(a) DSLM 采集的图像;(b)基于 LSI 的 LSFM 采集的图像;(c)(d)对应(a)(b)框选区域的高倍率放大图;(e)对应(c)(d)中划线处归一化后的强度曲线图  
 Fig. 6 Comparison of DSLM and LSFM based on LSI images in the high scattering situation. (a) Image acquired by DSLM; (b) image acquired by LSFM based on LSI; (c)(d) higher magnification of the region indicated in Fig. (a) and (b); (e) normalized intensity values along the lines in Fig. (c) and (d)

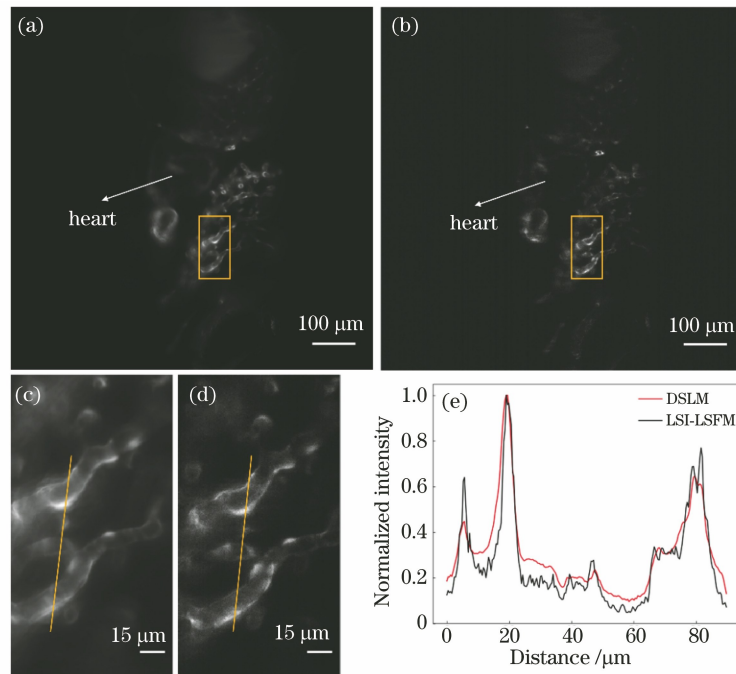


图 7 高散射情形下数字扫描 DSLM 和基于 LSI 的 LSFM 对比图。(a) DSLM 采集的图像;(b)基于 LSI 的 LSFM 采集的图像;(c)(d)对应(a)(b)框选区域的高倍率放大图;(e)对应(c)(d)划线处归一化后的强度曲线图  
 Fig. 7 Comparison of DSLM and LSFM based on LSI in the high scattering situation. (a) Image acquired by DSLM; (b) image acquired by LSFM based on LSI; (c)(d) higher magnification of the region indicated in Fig. (a) and (b); (e) normalized intensity values along the lines in Fig. (c) and (d)

度进行了分析,结果如图 7(e)所示。可以看出,基 于 LSI 的 LSFM 系统相对于 DSLM,在对斑马鱼心

脏成像的实验中信噪比略有提升,细节更加明显。与荧光微球的实验相比提升较弱,这是由于信噪比提升效果与样本散射的强弱有关,在高散射的样本中提升更为明显。

## 4 结 论

本文对光片显微镜的探测光路进行了改进,设计了一种基于 LSI 的 LSFM 系统。系统中选用面阵探测器进行初步的研究,以方便与传统的 LSFM 进行对比。实验中以 1 kHz 的速度连续成像得到高斯光束图像,证明了整个线扫描过程的稳定性。在对高散射的荧光微球样本成像以及斑马鱼心脏成像的实验中,对图像进行了量化分析,证实了 LSI 对样本散射的抑制能力。之后会用专门的线阵相机对生物样本进行成像来检验系统的成像能力。LSI 方案的研究非常有意义,整个方案是大视场 LSFM 设计的一个新的切入点,为 LSFM 在探测光路上的设计提供了新的思路。在未来,该方法可以与自适应光学<sup>[17]</sup>、光场调控等技术结合,具有很大的应用潜力。

## 参 考 文 献

- [1] 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.  
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.
- [2] Zhang Q, Liang D, Bai L H, et al. Long-time stabilization imaging by light sheet fluorescent microscope[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(4): 0407001.  
张球, 梁东, 白丽华, 等. 光片荧光显微镜长时间的稳定成像[J]. *中国激光*, 2019, 46(4): 0407001.
- [3] 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.
- [4] Weber M, Huisken J. Light sheet microscopy for real-time developmental biology[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011, 21(5): 566-572.
- [5] Tomer R, Khairy K, Keller P J. Shedding light on the system: studying embryonic development with light sheet microscopy [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011, 21(5): 558-565.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Jacques S L. Optical properties of biological tissues: a review [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2013, 58(11): R37-R61.
- [10] Corsetti S, Gunn-Moore F, Dholakia K. Light sheet fluorescence microscopy for neuroscience [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2019, 319: 16-27.
- [11] 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.
- [12] Breuninger T, Greger K, Stelzer E H K. Lateral modulation boosts image quality in single plane illumination fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 2007, 32(13): 1938-1940.
- [13] Baumgart E, Kubitscheck U. Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection [J]. *Optics Express*, 2012, 20(19): 21805-21814.
- [14] Silvestri L, Bria A, Sacconi L, et al. Confocal light sheet microscopy: micron-scale neuroanatomy of the entire mouse brain [J]. *Optics Express*, 2012, 20(18): 20582-20598.
- [15] Fahrbach F O, Rohrbach A. Propagation stability of self-reconstructing Bessel beams enables contrast-enhanced imaging in thick media [J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 632.
- [16] Boustany N N, Boppart S A, Backman V. Microscopic imaging and spectroscopy with scattered light [J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2010, 12: 285-314.
- [17] Liu L X, Zhang M L, Wu Z Q, et al. Application of adaptive optics in fluorescence microscope [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(12): 120001.  
刘立新, 张美玲, 吴兆青, 等. 自适应光学在荧光显微镜中的应用 [J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(12): 120001.