

引用格式: LAN Kaiqiu, YANG Xibin, XU Baoteng, et al. In Vivo, Dual-color Fluorescent Imaging Miniature Microscope[J]. Acta Photonica Sinica, 2022, 51(6):0618001
蓝凯秋,杨西斌,徐宝腾,等. 双色荧光成像在体微型显微镜[J]. 光子学报, 2022, 51(6):0618001

双色荧光成像在体微型显微镜

蓝凯秋^{1,2}, 杨西斌², 徐宝腾², 刘家林², 周伟², 熊大曦²

(1 中国科学技术大学 生物医学工程学院(苏州), 生命科学与医学部, 江苏 苏州 215163)

(2 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 光与健康研究中心, 江苏 苏州 215163)

摘 要: 目前微型显微镜光学系统大都采用梯度折射率透镜作为物镜, 受其色差限制, 双色荧光成像效果较差。首先设计了微型消色差镜头代替梯度折射率透镜, 分别以大脑皮层和深层成像为应用方向设计了两套光学系统, 视场为 1.10 mm×1.10 mm 和 0.77 mm×0.77 mm, 分辨率都达到 3.47 μm; 其次, 设计了数据采集电路, 实现 10 帧/s 的双色荧光同时成像, 并将视频数据存储于内置存储卡中, 去除了线缆对动物行动的限制; 最后, 通过优化结构设计形成了双色荧光成像微型显微镜样机, 整体重量为 6.2 g, 方便动物随身佩戴。通过双色荧光微球仿体成像实验验证了该设备的技术指标及可靠性, 预期在脑科学研究中具有较好应用价值。

关键词: 双色荧光成像; 微型显微镜; 消色差; 光学设计; 电路设计

中图分类号: TH742; R318.51

文献标识码: A

doi: 10.3788/gzxb20225106.0618001

0 引言

微型显微镜具有在体微型化、大视场快速成像等优点, 近年来被广泛应用于脑科学研究中。基于基因编码类钙指示剂(Genetically Encoded Calcium Indicator, GECI)的发展^[1], 当实验小鼠脑部产生神经冲动时, 神经细胞钙离子内流, 而这种钙离子荧光指示剂会随着钙离子浓度变化而发生荧光强度变化, 结合微型显微镜可以实现自由行为动物大脑神经活动的可视化。目前应用最为广泛的绿色荧光钙离子指示剂为 Gcamp 家族^[2]。

2011年 GHOSH K K 等开发了头戴式微型显微镜, 可以在不影响实验动物自由运动的前提下佩戴在动物头上, 帮助神经学家能够以单细胞分辨率记录和监测自由行为啮齿动物的大规模钙动力学^[3]。之后微型显微镜也发展出了具有不同功能的形态。STAMATAKIS A M 等开发了将钙离子荧光成像与光遗传学^[4]相结合的微型显微镜, 可以对实验小鼠脑部神经元钙离子荧光成像的同时用光刺激小鼠大脑其他部位神经元实现光遗传控制^[5]。SRINIVASAN S 等通过集成了光学连接器, 开发了能方便拆卸更改光源的微型显微镜, 可以进行光遗传学实验与钙离子荧光成像^[6]。DE GROOT A 等进行了微型显微镜的小型化设计, 设计了重量仅为 1.6 g 的 NINscope。可以同时在小鼠头上戴上两台 NINscope, 分别对两个独立的大脑区域进行成像, 具有同时探索脑部不同部位神经的功能^[7]。YANNY K 等将微型显微镜与光场显微成像技术^[8]相结合, 实现了小鼠脑部 3D 荧光成像的功能^[9]。BAGRAMYAN A 等在微型显微镜中加入了可调谐液晶透镜来实现可控深度扫描成像^[10]。SCOTT B B 等重新设计了光学系统并对大鼠脑部皮层成像, 虽然设备重量达到了 35 g, 但视场达到了 7.8 mm×4 mm, 并通过交替闪烁的光信号矫正了血液动力学响应对钙离子荧光信号的影响^[11]。RYNES M L 等为了在不增加微型显微镜体积和重量的前提下进一步提高成像视场, 采用了

基金项目: 国家重点研发计划(Nos.2018YFC0114800, 2017YFC0109900), 江苏省重点研发计划(No.BE2018666), 中科院青年创新促进会项目(No.2018359), 苏州市学科重点实验室项目(No.SZS2020308), 苏州重点产业技术创新前瞻性应用研究项目(No.SYG202035)

第一作者: 蓝凯秋(1997—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为显微内窥成像。Email: jylankaiqiu@163.com

导 师: 杨西斌(1984—), 男, 研究员, 主要研究方向为显微内窥成像、LED 医学、光学医疗器械等。Email: yangxb@sibet.ac.cn

收稿日期: 2021-12-16; **录用日期:** 2022-01-20

[http:// www.photon.ac.cn](http://www.photon.ac.cn)

多光源斜入射照明方式,对实验小鼠大脑皮层成像,视场可达 $8\text{ mm}\times 10\text{ mm}$ ^[12]。SHUMAN T等改变了微型显微镜数据传输方式,将数据存储于Micro SD卡中,去除了线的限制,并发现小鼠大脑海马区CA1和齿状回的神经元之间的放电具有一定的同步性,然而,癫痫小鼠神经元间的同步遭到了破坏,因此认为癫痫小鼠空间记忆能力衰退的原因可能为海马区的这种去同步性^[13]。除探索小鼠脑科学之外,微型显微镜也被运用于其他地方,SEKIGUCHI K J等将微型显微镜固定于小鼠脊髓之上,进一步加深对正常脊髓背后的神经编码以及由脊髓疾病引起的病理变化的理解^[14]。BOLLIMUNTA A等将微型显微镜应用于猕猴头部实现显微内窥钙离子荧光成像,虽然由于微型显微镜线缆的限制,只能对猕猴做简单的生物实验,但证明了微型显微镜用于研究非人灵长类动物脑科学的可行性^[15]。

随着脑科学研究进一步发展,逐渐产生了多色荧光成像的应用需求,如双色荧光成像可以同时获取脑部不同神经细胞群体出现活动时产生的荧光信息,探索脑部神经的功能与它们之间的联系^[16],或者矫正实验小鼠自由移动带来的成像伪影^[17]。但微型显微镜在双色荧光成像领域研究较少,主要原因在于目前微型显微镜采用的成像元件梯度折射率透镜(Gradient Index lens, GRIN lens)色差较大,难以实现对同一焦面的多色荧光成像。虽然也有通过使用介电超材料对GRIN透镜进行色差矫正的研究,但相关元件都需要计算定制,具有较高的门槛与成本^[18]。另一种消除色差的方法是为每个颜色通道增加专门的图像传感器,这极大地增加了设备的体积和重量。除此之外,还有双色成像带来的荧光串扰问题,大多数荧光指示剂激发光谱较宽,会有一定的重叠区域,同一激发光可能会导致两种不同的荧光指示剂都发射荧光,造成串扰,需要通过图像处理进行矫正。

本文提出了双色荧光成像微型显微镜(Dual-color Fluorescence Imaging Miniature Microscope, DCFIMM)。首先,利用灰度图像传感器通过时分复用获取不同波段的荧光信息;设计了微型消色差镜头代替GRIN透镜,实现了对光学成像系统色差的矫正;为了尽可能减小微型显微镜的体积,DCFIMM采用了与Gcamp6s和近红外钙离子荧光指示剂^[19-20]相对应的双波段滤光片组,此荧光激发波段重叠区域较小,减小了荧光串扰,并通过图像处理将荧光串扰矫正,实现双色荧光同时成像;最终通过仿体实验验证了该设备的技术指标及可靠性,具备较好的双色荧光成像能力,预期在脑科学研究中具有较好的应用价值。

1 DCFIMM设计

1.1 DCFIMM结构设计

DCFIMM包括3D打印的外壳、主电路板(包含灰度图像传感器CMOS和微控制单元MCU)、micro SD卡、两块装有LED的电路板、光学系统、实验底座以及可充电锂电池(90MAH),总重量为6.2 g,可对图像进行30 min左右的连续记录。

由于对实验动物大脑皮层以下部位荧光成像往往需要直径小于1.5 mm的GRIN透镜作为物镜或直径更细的中继GRIN透镜通过手术植入到实验动物脑部^[21],因此以自由行为啮齿动物大脑皮层荧光成像和大脑深层荧光成像为应用方向^[22],分别设计了用于大脑表层成像的光学系统组成的DCFIMM-SBI(superficial brain imaging)和大脑深层成像的光学系统组成的DCFIMM-DBI(deep brain imaging)。其结构如图1,区别在于物镜设计和结构的改变,在DCFIMM-DBI中采用了直径仅为1 mm的微型双胶合透镜作为物镜,并使用了金属套管用于固定透镜和在生物实验时植入到实验动物脑部增加探测深度,材质为生物相容性较好的不锈钢304。

图1标明了各元件在DCFIMM中的位置以及照明光路和成像光路。DCFIMM的光学系统主要包括滤光片组和光学成像系统两部分,DCFIMM主要元件型号与尺寸如表1所示。其中,结合绿色钙离子荧光指示剂Gcamp6s以及近红外钙离子荧光指示剂的荧光光谱,对双波段滤光片组进行了选型,尽可能减小荧光激发光谱的重叠区域,有效减小了DCFIMM的体积和荧光串扰。

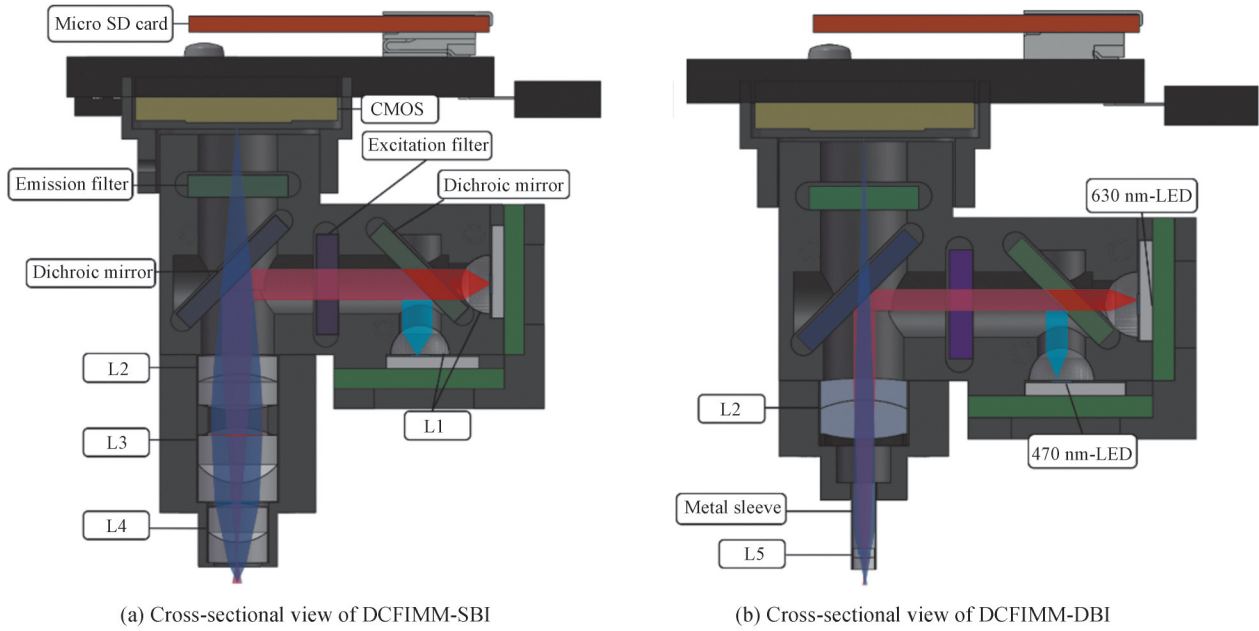


图1 DCFIMM-SBI及DCFIMM-DBI剖面图
Fig.1 The cross-sectional view of DCFIMM-SBI and DCFIMM-DBI

表1 DCFIMM主要元件
Table 1 The main component of DCFIMM

Component	Dimension/mm	Model
Outer casing	22×17×14	3D printing (Wenext)
470 nm-LED	3×4.5×2	LXML-PB01-0030 (Lumileds)
630 nm-LED	3×4.5×2	LXM2-PD01-0060 (Lumileds)
Dichroic mirror for combining excitation light	5×6×1	T495lpxr (Chroma)
Excitation filter	5×5×1	ET-Fitc/Cy5x (Chroma)
Dichroic mirror	5×7×1	TFITC/Cy5rpc (Chroma)
Emission filter	5×5×1	ET-Fitc/Cy5m (Chroma)
Collimator lens(L1)	Diameter 3	47-269 (Edmund)
Imaging system	See Table 2 for details	
PCB (including micro SD Card)	17×23×4	Custom design
Battery	14×10×6	601215 (Yuhuida)
Metal sleeve	1.2×4 (thickness 0.1)	Custom design

1.2 DCFIMM 光学设计

GRIN 透镜是目前微型显微镜普遍采用的光学元件,凭借其较为简单的加工工艺,具有直径小、经济、受空间距离限制小等优点而被广泛采用为微型显微镜的物镜。特别是在生物实验中,GRIN 透镜可以在造成较小损伤的条件下植入实验动物脑部,实现成像大脑深层部位神经的功能。但 GRIN 透镜也有视场较小,像差难补偿等缺点,尤其对于双色荧光成像来说,有着难以矫正的色散焦移,如图 2(a)所示,由于色差影响,GRIN 透镜无法对同一焦面的脑部神经进行双色荧光成像。

相较于 GRIN 透镜,光学透镜组具备更为优异的色差矫正能力,光学系统是否消色差取决于初级位置色

差系数 $\sum_{m=1}^M C_1$ 是否为零,对于薄透镜系统有

$$\sum_{m=1}^M C_1 = \sum_{m=1}^M h^2 \frac{\varphi}{v} \quad (1)$$

式中, φ 为透镜的光焦度; v 为透镜玻璃的阿贝数; M 为透镜数; h 为透镜的半通光口径。可以看出单透镜不

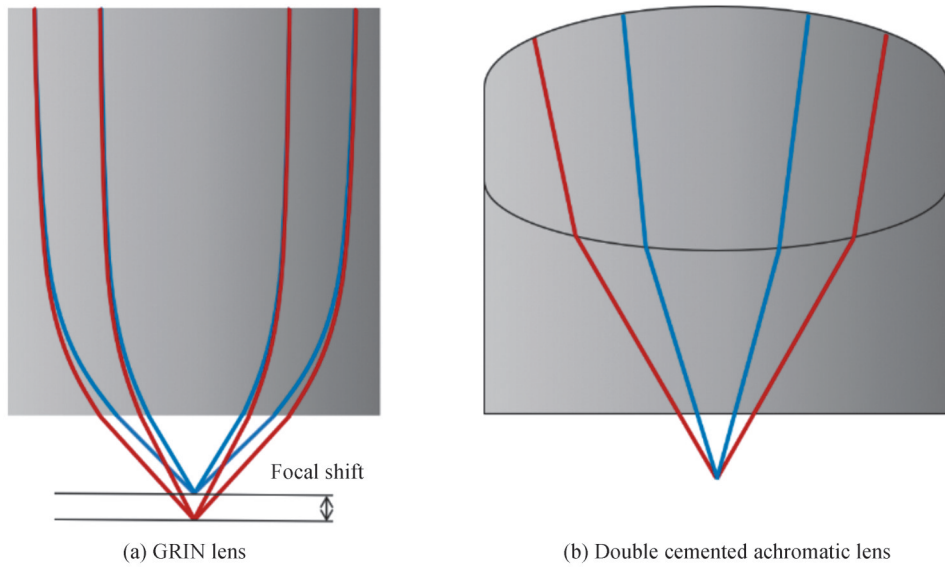


图2 透镜聚焦不同波长光示意图

Fig.2 Schematic diagram of the lens focusing light of different wavelengths

能矫正色差,但单正透镜具有负色差,单负透镜具有正色差。因此,消色差的光学系统需要由正、负透镜组成,如图2(b)所示,满足消色差的条件是

$$\begin{cases} \varphi_1 = \frac{\nu_1}{\nu_1 - \nu_2} \Phi \\ \varphi_2 = \frac{-\nu_2}{\nu_1 - \nu_2} \Phi \end{cases} \quad (2)$$

式中, Φ 为光学系统的光焦度。本文采用了微型双胶合透镜组成的消色差镜头代替 GRIN 透镜。设计的 DCFIMM-SBI 和 DCFIMM-DBI 成像光学系统分别如图3(b)、(c)。

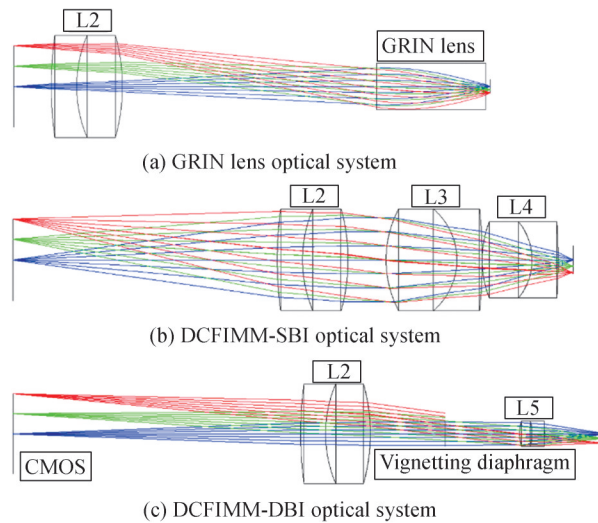


图3 光学系统光路

Fig.3 Optical path of optical system

图3(a)为由 GRIN 透镜(64-519, Edmund)和成像透镜(63-692, Edmund)构成的单色荧光成像微型显微镜光学系统光路图,用于实验对比。为了增大 GRIN 透镜光学系统的工作距离使其可以对覆有盖玻片的样品成像,适当调整了 GRIN 透镜和成像透镜在微型显微镜中的位置,减小了成像透镜与 CMOS 之间的间距。图3(c)中 DCFIMM-DBI 光学系统的渐晕光阑由固定微型双胶合透镜的金属套管所致,在增加脑部探测深度的同时导致了边缘视场亮度减弱。

DCFIMM-SBI和DCFIMM-DBI成像光学系统的具体元件型号如表2。

表2 DCFIMM 成像光学系统元件
Table 2 The components of DCFIMM imaging optical systems

Imaging optical system	Component	Diameter /mm	Focal length /mm	Model
L2	Imaging lens	4	12	63-692 (Edmund)
L3	Objective lens	4	6	63-690 (Edmund)
L4		3	6	45-089 (Edmund)
L2	Objective lens	4	12	63-692 (Edmund)
L5		1	3	65-566 (Edmund)

DCFIMM的成像光学系统是由物镜和成像透镜组成的无限远矫正光学系统,改变物镜与成像透镜间的间隔不会对光学系统造成影响,DCFIMM外壳由3D打印而成,无限远矫正光学系统降低了3D打印精度不高造成的影响。其次,可以在物镜和成像透镜间插入滤光片,在不影响光学系统的条件下进一步减小微型显微镜的体积。最后,根据不同的实验需求,可以通过更换不同焦距的物镜构建合适放大倍率与工作距离的光学系统,无限远矫正光学系统放大倍数的计算表达式为

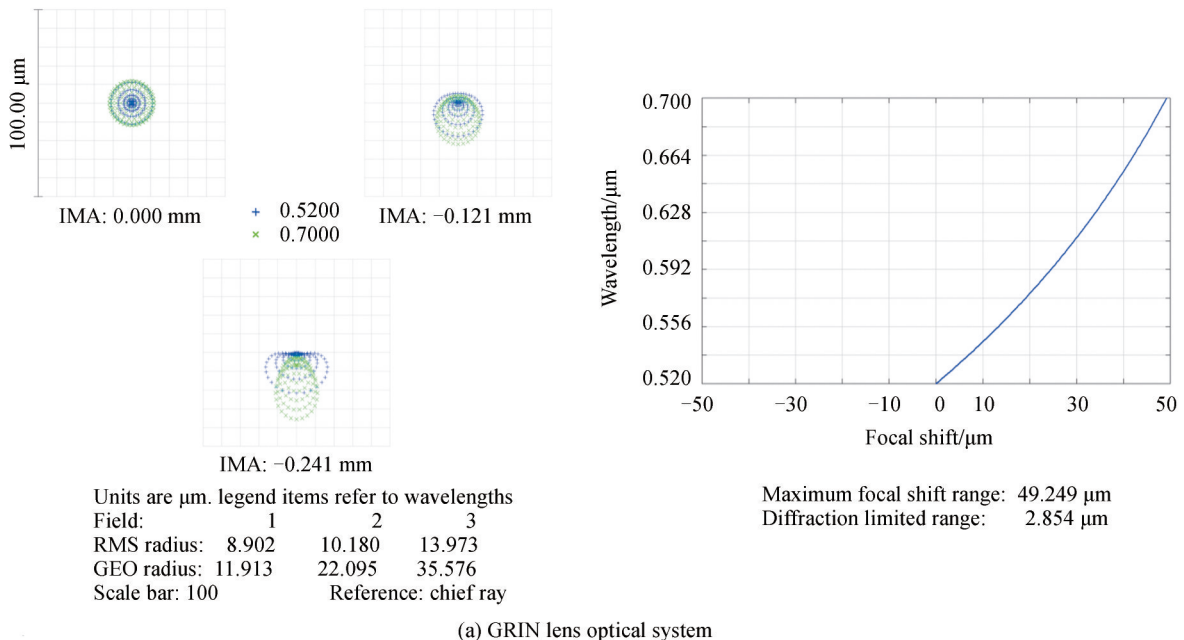
$$M = f_{\text{image}} / f_{\text{object}} \quad (3)$$

式中, M 为光学系统放大倍率, f_{image} 为成像透镜焦距, f_{object} 为物镜焦距。结合实验需求,DCFIMM的成像光学系统设计目标定为以下4点:首先,要比GRIN透镜光学系统有更大的工作距离,可以结合微棱镜对垂直大脑皮层平面成像^[23],在生物实验时有更大的操作空间;其次,DCFIMM的光学系统需要更大的视场,能获取更多荧光信息;然后,DCFIMM的光学系统需要与GRIN透镜光学系统相当的成像分辨能力,可以对神经元细胞体成像;最后,DCFIMM的光学系统色差需要矫正,以免影响双色荧光成像效果。通过软件仿真得到DCFIMM光学设计参数,如表3。

表3 DCFIMM 成像光学系统主要参数
Table 3 The main parameters of DCFIMM imaging optical systems

Optical system	Magnification	Numerical aperture/(N.A.)	Field of view/mm ²	Work distance/mm
GRIN lens	6.6	0.40	0.55×0.55	0.17
DCFIMM-SBI	3.2	0.41	1.10×1.10	0.60
DCFIMM-DBI	4.2	0.15	0.77×0.77	2.40

由表3可知,DCFIMM光学系统的视场和工作距离相较于GRIN透镜光学系统都有了较大提升。DCFIMM光学系统与GRIN透镜光学系统点列图和色散焦移对比如图4。



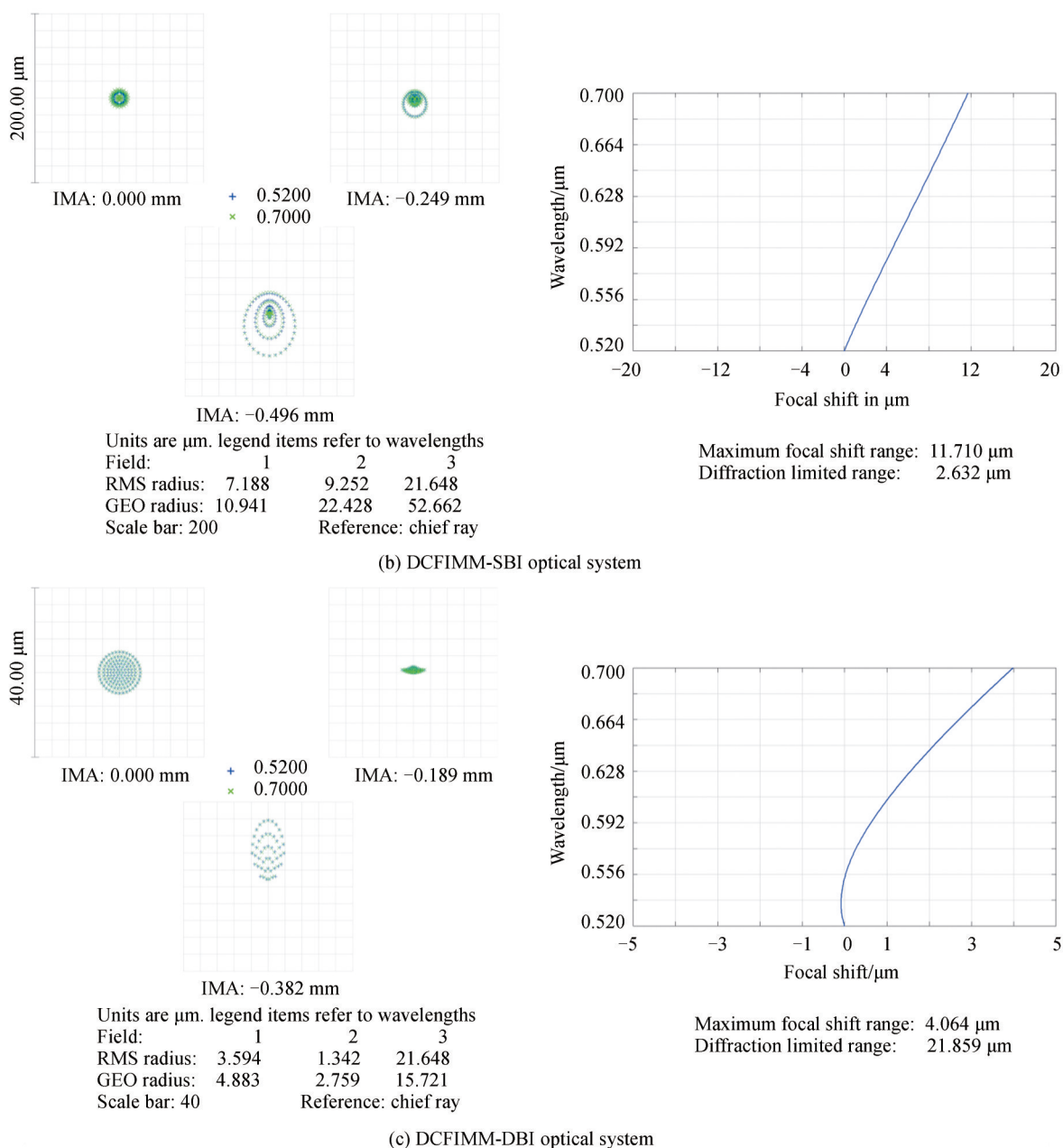


图4 光学系统的点列图和色散焦移

Fig.4 Point diagram and chromatic focal shift of the optical systems

如光学系统的点列图可知,DCFIMM-SBI像点半径RMS值与GRIN透镜光学系统接近,分辨能力与GRIN透镜光学系统相当,DCFIMM-DBI像点半径RMS值均小于10 μm ,像点集中度高。图4(a) GRIN透镜光学系统点列图中520 nm和700 nm的荧光激发波长所成的像斑有了较大分离,而DCFIMM光学系统点列图中两波长光所成的像斑大小接近一致,表明DCFIMM光学系统的色差有了良好的控制。其次,从光学系统的色散焦移图可以看出DCFIMM-SBI和DCFIMM-DBI的最大焦移变化分别为11.7 μm 和4.1 μm ,相较于GRIN透镜光学系统49.2 μm 的最大焦移变化也有了较大的改善。

1.3 数据采集与分析

DCFIMM电路示意如图5(a)。采用可充电锂电池为电路板供电,CMOS(EV76C454,E2V)以20 fps采集视频图像。如图5(b),当CMOS工作在奇数帧时,触发MCU(ATSAME70N21A,Atmel)控制中心波长470 nm的LED光源发光,当CMOS工作在偶数帧时,触发中心波长630 nm的LED光源发光,从而使DCFIMM以10帧/s获取双色荧光图像。图像数据保存在Micro SD卡中,实验结束后取出Micro SD卡进行

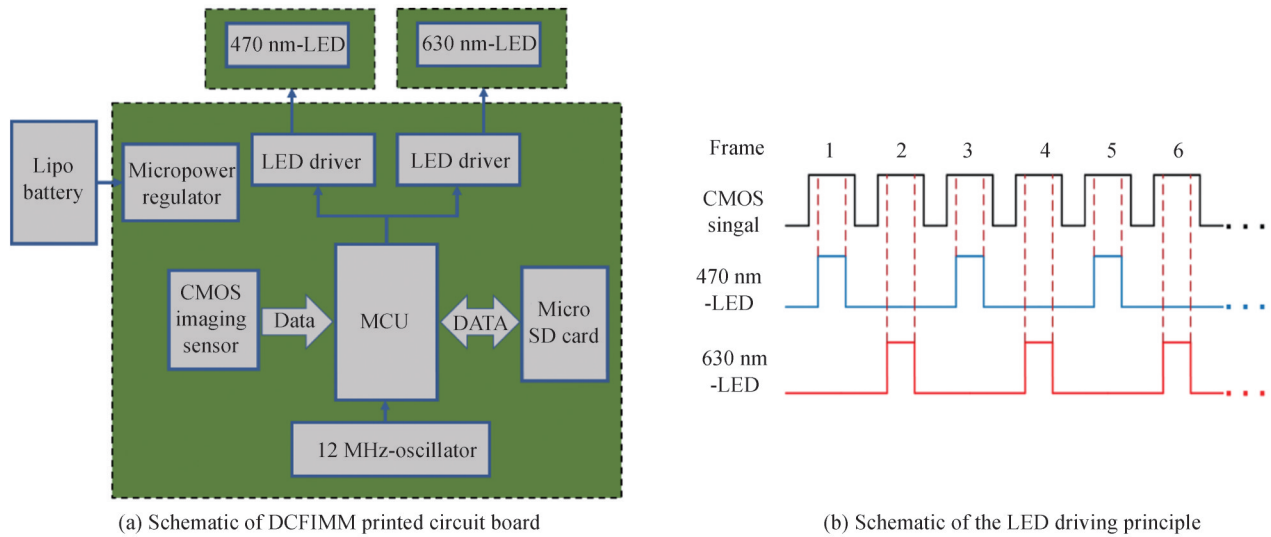


图5 DCFIMM 电路原理
Fig.5 DCFIMM circuit principle

数据读取和转存。根据不同实验条件,可以对DCFIMM的工作时间、LED亮度、CMOS增益等进行设置。

得到视频图像数据后进行分析和图像处理,根据时分复用原理将视频隔一帧抽取,凭借相应激发波长的LED照射荧光样品的激发亮度更大,将相邻两帧每个像素点的灰度值进行比较,若偶数帧像素点的灰度值大于奇数帧对应位置像素点的灰度值,则将偶数帧此点的灰度值保留,奇数帧此点的灰度值作为荧光串扰导致的噪声去除。去除荧光串扰后为了区分不同波段的荧光添加相应伪彩,将偶数帧图像添加红色伪彩,奇数帧图像添加绿色伪彩。最后,将两个荧光通道信息图像融合在一起,复制每一帧扩充至与现实时间对应即可得到样品的双色荧光图像视频。

1.4 实验装置

使用USAF 1951分辨率靶对光学系统的分辨率进行了测试,采用直径13 μm的绿色荧光微球(FL-PS-G-13, tjdae technology)和红色荧光微球(FL-PS-R-13, tjdae technology),将其配置成荧光微球溶液滴于载玻片上,盖上盖玻片制成荧光微球样品用于验证DCFIMM的双色荧光成像能力。此外通过对多尺寸荧光微球套件(T14792, TetraSpeck)成像,测试了DCFIMM的荧光分辨能力,T14792中每个微球都使用四种不同波长的荧光染料(365/430 nm、505/515 nm、560/580 nm和660/680 nm)染色。

DCFIMM 成像实验装置如图6,将DCFIMM实验底座固定在笼板上,实验样品固定于升降台(GCM-1601M,大恒光电)上,实现DCFIMM与样品之间的相对位移。

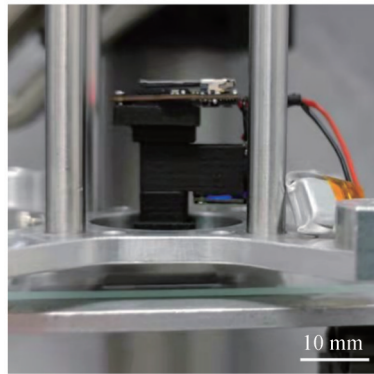


图6 DCFIMM 成像实验装置实物
Fig.6 Photograph of the DCFIMM imaging experiment

2 实验与结果

2.1 分辨率测试

为了验证DCFIMM光学系统的成像能力是否可以达到实验要求即分辨率不低于GRIN透镜光学系统,采用USAF 1951分辨率靶开展了成像测试,与GRIN透镜光学系统进行实验对比,结果如图7。

图7中三个光学系统对分辨率靶所成图像的对比度图G7E2组条纹都有较为明显的波峰,根据瑞利准则,当对比度图波谷的值小于或等于波峰的 $8/\pi^2$ (~0.81)时表明该条纹可以被分辨^[24]。通过计算测得GRIN

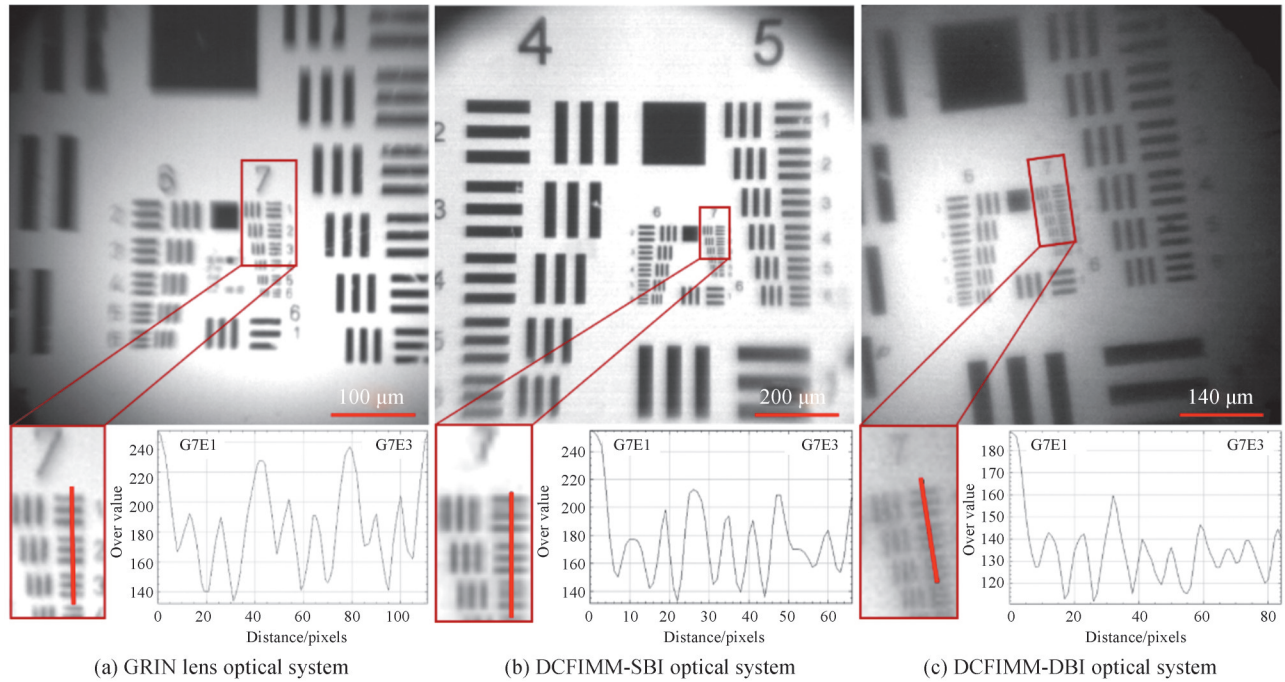


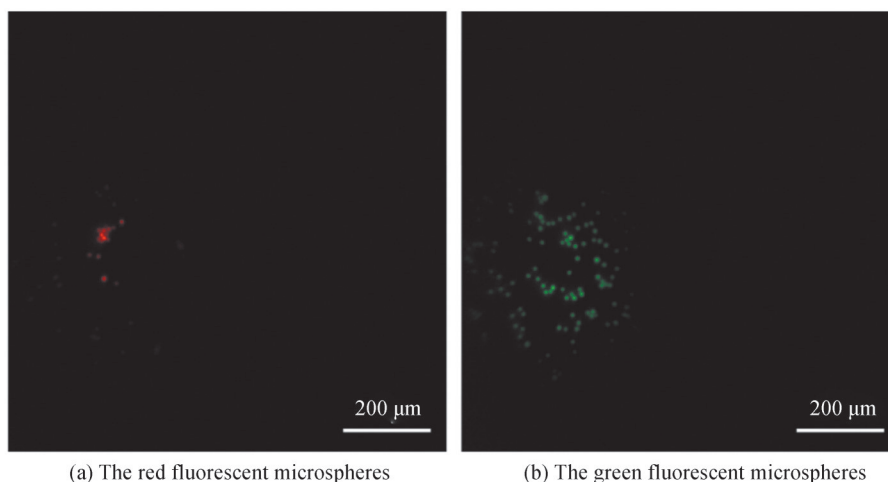
图7 USAF 1951分辨率靶成像结果

Fig.7 Results of the USAF resolution target imaging experiment

透镜、DCFIMM-SBI、DCFIMM-DBI光学系统的G7E2组条纹平均波谷波峰对比度值分别为0.71、0.70、0.79,均小于 $8/\pi^2$,表明DCFIMM光学系统可以分辨分辨率靶的G7E2组条纹,达到 $3.47\ \mu\text{m}$ 的分辨率,与GRIN透镜光学系统的分辨能力相当,达到了设计要求。除分辨能力外,DCFIMM-SBI光学系统的成像视场达到了 $1.10\ \text{mm}\times 1.10\ \text{mm}$,DCFIMM-DBI光学系统的成像视场达到了 $0.77\ \text{mm}\times 0.77\ \text{mm}$,均大于GRIN透镜光学系统 $0.55\ \text{mm}\times 0.55\ \text{mm}$ 的视场,在实验时可以获取更多荧光信息。

2.2 激发光功率标定

在双色荧光成像实验中,影响荧光样品发射荧光亮度的因素不仅与激发光强度有关,与滤光片组滤光光谱、CMOS响应光谱、光学系统透射率以及荧光指示剂的荧光光谱都有关联。当设备与样品确定时,LED的强度决定了荧光微球的发射荧光亮度,且不同荧光样品的荧光激发波段会有重叠区域,会有一些的荧光串扰,当 $470\ \text{nm}$ -LED亮度过大时,激发红色荧光微球的亮度会大于 $630\ \text{nm}$ -LED激发红色荧光微球的亮度,在图像识别时会出现将红色荧光微球错误识别为绿色荧光微球的情况。所以在对混合荧光微球成像



(a) The red fluorescent microspheres

(b) The green fluorescent microspheres

图8 荧光微球成像实验结果

Fig.8 Results of the fluorescent microsphere imaging experiment

前,需调整LED的功率对红色荧光微球以及绿色荧光微球成像,确保能正确识别样品。经过LED功率标定后,当630 nm-LED功率为3.8 mW,470 nm-LED功率超过3 mW时会错误识别红色荧光微球。最终,将470 nm-LED的功率设置为1.8 mW,630 nm-LED功率设置为3.8 mW,分别对10 mg/mL的红色荧光微球和绿色荧光微球样品成像,如图8所示,图像处理后可以看到都正确识别荧光微球的颜色,表明该LED功率设置可以正确分辨荧光微球样品。

2.3 双色荧光成像测试

配置1 mg/mL混合荧光微球样品,用DCFIMM-SBI对样品成像,得到的图像如图9(a)~(c)。

图9(a)是获取的混合荧光微球样品视频的偶数帧截图,由630 nm-LED光激发样品,图9(b)是奇数帧截图,由470 nm-LED光激发样品。通过亮度的对比正确识别了混合荧光微球颜色,经过图像处理后如图9

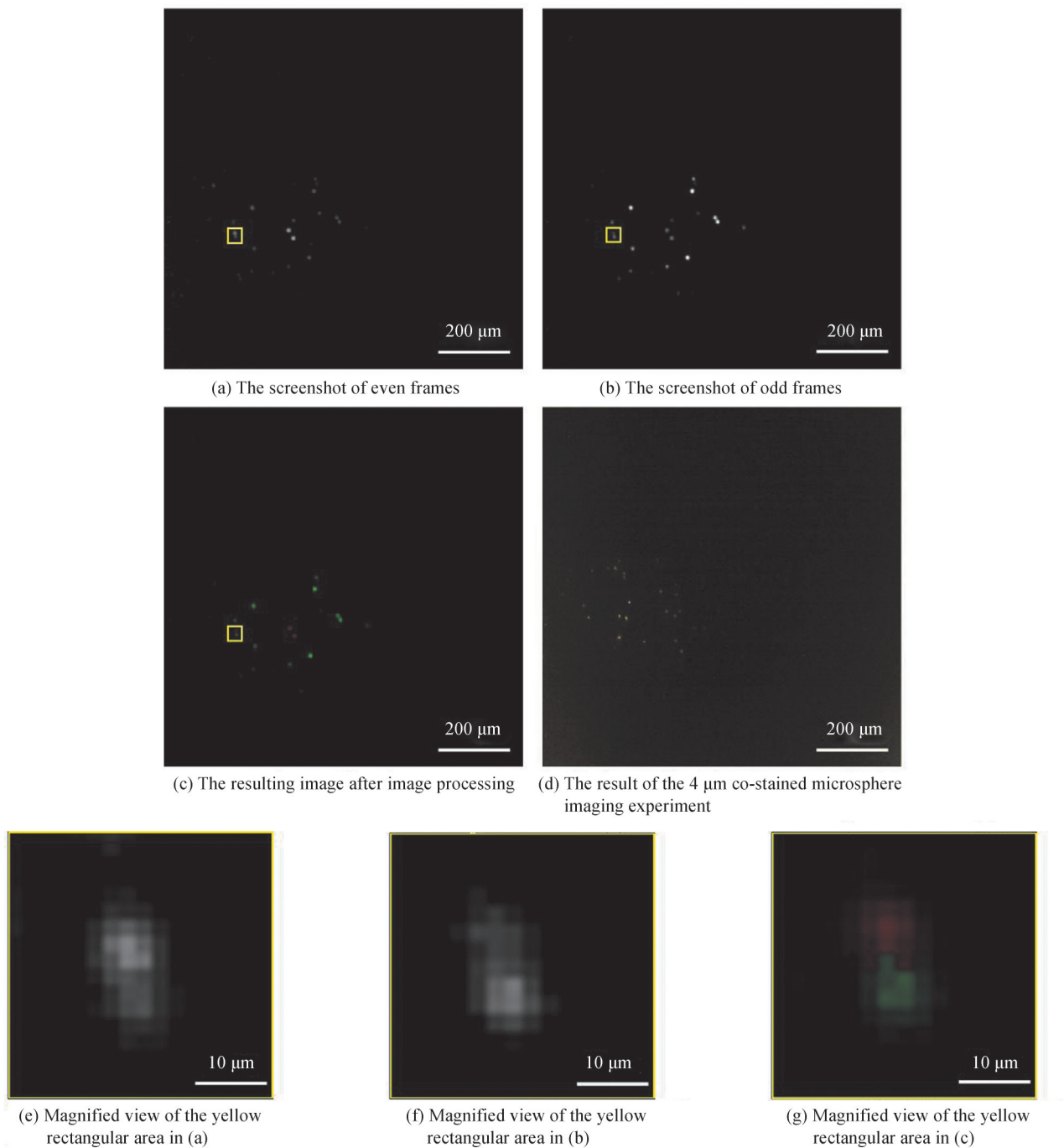


图9 混合荧光微球成像实验结果

Fig.9 Results of the hybrid fluorescent microsphere imaging experiment

(c),且相邻位置不同颜色的荧光微球仍被清晰分辨,如图9(e)~(g),证明DCFIMM-SBI具有双色荧光成像的能力。此外还对4 μm 直径的共染色微球(T14792, TetraSpeck)成像,经过图像处理后的图9(d),微球的红色荧光与绿色荧光几乎成同样大小的像斑,证明色差得到了良好矫正。

为了验证DCFIMM-DBI光学系统的色差是否得到矫正,通过对混合荧光微球样品调焦成像进行验证,并与GRIN透镜光学系统对比。GRIN透镜光学系统成像实验结果如图10(a),图中上方数字表示样品调焦距离。如图10(a)左图所示,由于GRIN透镜色差的影响,当绿色荧光微球对焦时,红色荧光离焦,470 nm-LED激发白色箭头所指处微球的荧光强度大于630 nm-LED激发的荧光强度,箭头处微球被识别为绿色荧光微球。当红色荧光微球对焦时,绿色荧光微球离焦,630 nm-LED激发白色箭头所指处微球的荧光强度大于470 nm-LED激发的荧光强度,箭头处微球被识别为红色荧光微球,如图10(a)。实验证明成像过程中GRIN透镜的色差会导致离焦荧光样品成像模糊且亮度降低,最终导致双色成像效果差以及对混合荧光微球识别错误。

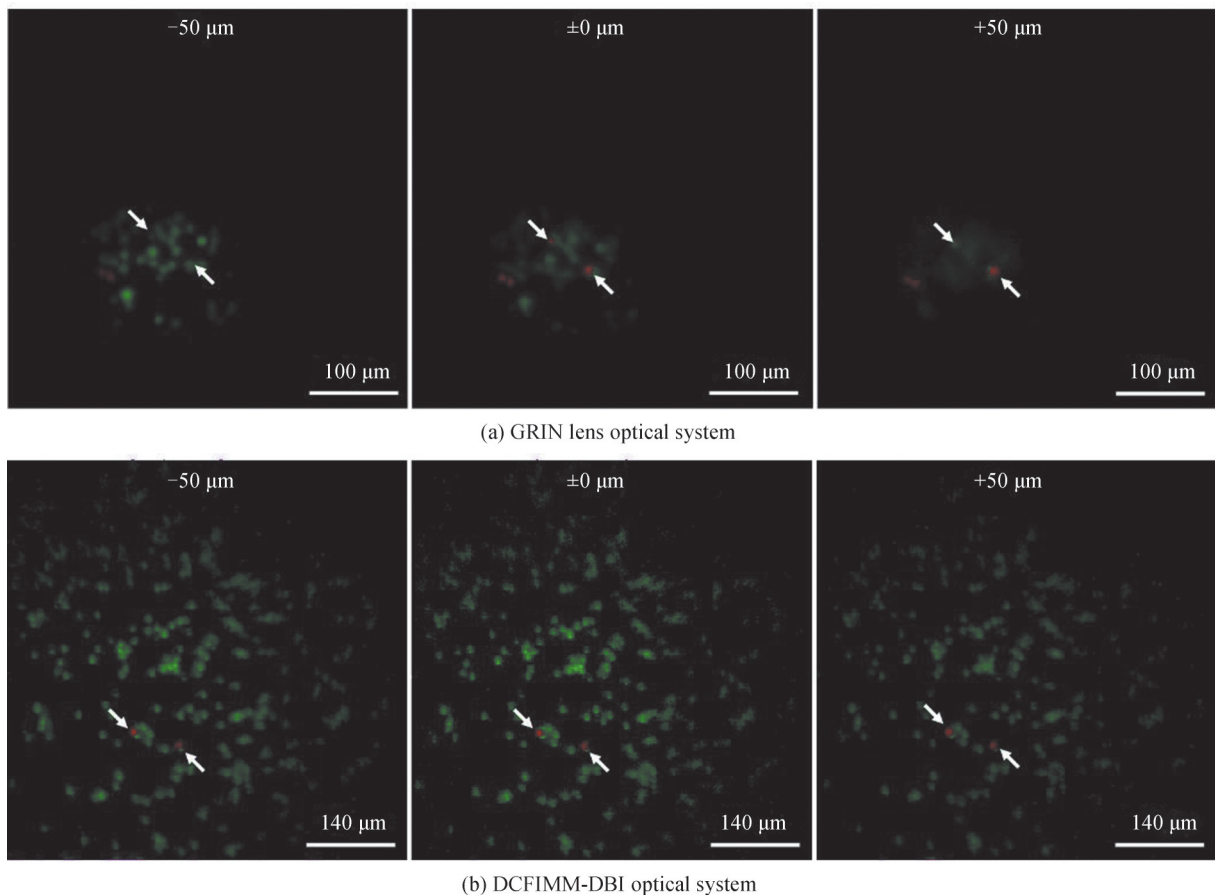


图10 混合荧光微球调焦对比成像实验结果

Fig.10 Results of the hybrid fluorescent microsphere focusing and contrast imaging experiment

用DCFIMM-DBI对混合荧光微球调焦成像,结果如图10(b)。由于DCFIMM-DBI更大的成像视场,可以对更多数目的荧光微球成像,并且成功在绿色荧光微球中识别了红色荧光微球,两种波长的荧光微球几乎同时对焦清晰成像,调焦后仍能正确识别混合荧光微球,表明DCFIMM-DBI的色散焦移得到了良好的矫正,证明了此设备具有双色荧光成像的能力。

3 结论

本文提出了双色荧光成像微型显微镜DCFIMM,通过双LED随CMOS信号交替触发获取两种不同波长的荧光信息,并通过双波段滤光片组滤除多余杂光,中心波长为470 nm和630 nm的激发光滤光波段也使荧光串扰得到了良好的控制。其次,根据不同的实验需求设计了两套光学系统与结构,为了矫正微型显微镜光学系统的色差,设计了由双胶合透镜组成的消色差镜头作为DCFIMM物镜,在DCFIMM-DBI中为了

增加可探测脑部的深度,用金属套管将微型双胶合透镜固定。通过DCFIMM对USAF 1951分辨率靶成像,测得此设备的分辨率为 $3.47\ \mu\text{m}$,DCFIMM-SBI和DCFIMM-DBI视场分别为 $1.10\ \text{mm}\times 1.10\ \text{mm}$ 和 $0.77\ \text{mm}\times 0.77\ \text{mm}$,相较于单色荧光成像微型显微镜,有着相当的分辨能力和更大的视场。双色荧光混合微球成像实验证明了DCFIMM的色差得到了良好的矫正,具有双波段荧光成像的能力,展示了所设计的DCFIMM应用于脑科学研究的潜力。下一步,本设备将用于小动物在体成像实验,测试该设备在实验动物脑部成像时组织散射对成像效果的影响。未来期望能改进DCFIMM,能在矫正色差的同时,增大照明面积与均匀性并减小DCFIMM-DBI的渐晕效应,应用于生物实验。

参考文献

- [1] TIAN L, HIRES S A, MAO T, et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators[J]. *Nature methods*, 2009, 6(12): 875-881.
- [2] CHEN T W, WARDILL T J, SUN Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity[J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 295-300.
- [3] GHOSH K K, BURNS L D, COCKER E D, et al. Miniaturized integration of a fluorescence microscope[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 871-878.
- [4] FENNO L, YIZHAR O, DEISSEROTH K. The development and application of optogenetics[J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2011, 34: 389-412.
- [5] STAMATAKIS A M, SCHACHTER M J, GULATI S, et al. Simultaneous optogenetics and cellular resolution calcium imaging during active behavior using a miniaturized microscope[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2018, 12: 496.
- [6] SRINIVASAN S, HOSOKAWA T, VERGARA P, et al. Miniaturized microscope with flexible light source input for neuronal imaging and manipulation in freely behaving animals[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 517(3): 520-524.
- [7] DE GROOT A, VAN DEN BOOM B J G, VAN GENDEREN R M, et al. NINscope, a versatile miniscope for multi-region circuit investigations[J]. *Elife*, 2020, 9: e49987.
- [8] PREVEDEL R, YOON Y G, HOFFMANN M, et al. Simultaneous whole-animal 3D imaging of neuronal activity using light-field microscopy[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(7): 727-730.
- [9] YANNY K, ANTIPA N, LIBERTI W, et al. Miniscope3D: optimized single-shot miniature 3D fluorescence microscopy[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9(1): 1-13.
- [10] BAGRAMYAN A, TABOURIN L, RASTQAR A, et al. Focus-tunable microscope for imaging small neuronal processes in freely moving animals[J]. *Photonics Research*, 2021, 9(7): 1300-1309.
- [11] SCOTT B B, THIBERGE S Y, GUO C, et al. Imaging cortical dynamics in GCaMP transgenic rats with a head-mounted widefield macroscope[J]. *Neuron*, 2018, 100(5): 1045-1058. e5.
- [12] RYNES M L, SURINACH D A, LINN S, et al. Miniaturized head-mounted microscope for whole-cortex mesoscale imaging in freely behaving mice[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(4): 417-425.
- [13] SHUMAN T, AHARONI D, CAI D J, et al. Breakdown of spatial coding and interneuron synchronization in epileptic mice[J]. *Nature neuroscience*, 2020, 23(2): 229-238.
- [14] SEKIGUCHI K J, SHEKHTMEYSTER P, MERTEN K, et al. Imaging large-scale cellular activity in spinal cord of freely behaving mice[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 1-13.
- [15] BOLLIMUNTA A, SANTACRUZ S R, EATON R W, et al. Head-mounted microendoscopic calcium imaging in dorsal premotor cortex of behaving rhesus macaque[J]. *Cell Reports*, 2021, 35(11): 109239.
- [16] 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.
- [17] MALVAUT S, CONSTANTINESCU V S, DEHEZ H, et al. Deciphering brain function by miniaturized fluorescence microscopy in freely behaving animals[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020: 819.
- [18] CHEN J, CHU H, LAI Y, et al. Highly efficient achromatic subdiffraction focusing lens in the near field with large numerical aperture[J]. *Photonics Research*, 2021, 9(10): 2088-2094.
- [19] QIAN Y, PIATKEVICH K D, LARNEY BMC, et al. A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(2): 171-174.
- [20] SHEMETOV A A, MONAKHOV M V, ZHANG Q, et al. A near-infrared genetically encoded calcium indicator for in vivo imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(3): 368-377.
- [21] BAGRAMYAN A. Lightweight 1-photon miniscope for imaging in freely behaving animals at subcellular resolution[J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 2020, 32(15): 909-912.
- [22] AHARONI D, HOOGLAND T M. Circuit investigations with open-source miniaturized microscopes: past, present and future[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, 13: 141.
- [23] CHIA T H, LEVENE M J. Microprisms for in vivo multilayer cortical imaging[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2009, 102(2): 1310-1314.

- [24] LEVENSON E, LERCH P, MARTIN M C. Infrared imaging: Synchrotrons vs. arrays, resolution vs. speed [J]. *Infrared Physics & Technology*, 2006, 49(1-2): 45-52.

In Vivo, Dual-color Fluorescent Imaging Miniature Microscope

LAN Kaiqiu^{1,2}, YANG Xibin², XU Baoteng², LIU Jialin², ZHOU Wei², XIONG Daxi²
(1 *School of Biomedical Engineering (Suzhou), Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Suzhou, Jiangsu 215163, China*)
(2 *Center of Light and Health, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China*)

Abstract: In recent years, neuroscientists have become more and more interested in brain imaging of conscious and free-behaving animals, hoping to obtain nerve impulse signals in the brains of free-behaving experimental animals, especially certain types of cellular activity may be inhibited by anesthesia. Combined with the Genetically Encoded Calcium Indicator (GECI), the miniature microscope has the ability to image the brain of free-behaving animals and obtain the signal of nerve impulse. The miniature microscope is then widely used in the study of brain science. Currently, most optical systems of miniature microscopes are limited by chromatic aberration due to the use of Gradient Index Lenses (GRIN), which does not meet the experimental requirement of the two-color fluorescent imaging effect. Dual-color fluorescence imaging miniature microscopes have a number of advantages, such as the ability to compare the activities of two different cell populations in the same brain region of a free-behaving animal combined with GECIs which have distinguishable color spectrums, or it can be used for the motion correction. Therefore, a Dual-color Fluorescent Imaging Miniature Microscope (DCFIMM) is developed. Firstly, in order to enhance the dual-color fluorescent imaging capability of the miniature microscope, a micro achromatic lens is designed to replace the gradient index lens. The miniature achromatic lens is composed of double cemented lenses, which forms an infinity correction optical system with the imaging lens. And according to the application direction of cerebral cortex imaging and deep brain imaging, DCFIMM-SBI (superficial brain imaging) and DCFIMM-DBI (deep brain imaging) are designed, both have a larger imaging field of view than the monochromatic fluorescence imaging miniature microscope with grin lens, which are $1.10\text{ mm} \times 1.10\text{ mm}$ and $0.77\text{ mm} \times 0.77\text{ mm}$ respectively. Meanwhile, the dual-band filter for green and near-infrared is used to reduce fluorescent crosstalk. Secondly, a data acquisition circuit is designed to alternately trigger two LEDs with different wavelengths with the frame rate of the CMOS camera. Therefore, the green fluorescent information and near-infrared fluorescent information can be obtained in odd-numbered frames and even-numbered frames, respectively. Our system can realize the imaging speed of 10 fps with the ability of dual-color fluorescence imaging. Thirdly, the video data is stored in a micro SD card. DCFIMM is not limited by the wire transmission. Finally, the structure design of our DCFIMM is optimized. The whole weight of our DCFIMM is 4.8 g (6.2 g with a battery). The experimental results of the USAF 1951 high-resolution target show that the achievable resolution of our DCFIMM is $3.47\text{ }\mu\text{m}$, which is comparable with monochromatic fluorescent imaging using a miniature microscope with GRIN lens. In the dual-color fluorescent imaging experiment for the hybrid microsphere, DCFIMM can distinguish the fluorescent microspheres of different colors. Compared with the experimental results of monochromatic fluorescence imaging miniature microscope with grin lens, it is found that the chromatic aberration of the DCFIMM optical system has also been well corrected, which demonstrates that our DCFIMM has the ability to distinguish fluorescence of different wavelengths. The proposed DCFIMM in this paper shows promising and wide applications for brain science research.

Key words: Dual-color fluorescence imaging; Miniaturized microscopy; Achromatic; Optical design; Circuit design

OCIS Codes: 180.2520; 170.0180; 170.2520; 300.6280

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (Nos.2018YFC0114800,2017YFC0109900), Key Research and Development Program of Jiangsu Province (No. BE2018666), the Youth Innovation Promotion Association Program of Chinese Academy of Sciences (No. 2018359), the Discipline Key Laboratory Program of Jiangsu Province (No. SZS2020308), the Key Industry Technology Innovation Perspective Application Research Program of Jiangsu Province (No. SYG202035)