

“西光所建所六十周年暨《光子学报》创刊五十周年”专辑

引用格式: CHEN Xueli, WANG Xinyu, YAN Tianyu, et al. Harnessing the Power of Bessel Beam for Biomedical Microscopy (Invited)[J]. Acta Photonica Sinica, 2022, 51(8):0851508

陈雪利,王鑫宇,闫天宇,等. 贝塞尔光束在生物医学显微成像技术中的应用(特邀)[J]. 光子学报, 2022, 51(8):0851508

贝塞尔光束在生物医学显微成像技术中的应用 (特邀)

陈雪利,王鑫宇,闫天宇,曾琦,徐欣怡,谢晖

(西安电子科技大学 生命科学技术学院 西安市跨尺度生命信息智能感知与调控重点实验室, 西安 710126)

摘要:作为一种典型的无衍射光束,贝塞尔光束具有无衍射和自重构特性,能够提供更长的聚焦长度和一定程度的抗散射能力,在生物医学光学显微成像技术领域获得了越来越多的应用。本文重点关注了贝塞尔光束在生物医学光学显微成像技术中的应用,包括利用其扩展景深能力实现体积样本快速三维成像、利用其抗散射粒子干扰能力实现散射样本的大深度成像以及利用更细聚焦光束能力实现更高分辨率的光学显微成像。首先,概述了贝塞尔光束及其实验室常用的产生方法;然后,总结了近些年贝塞尔光束在生物医学光学显微成像技术中的应用,包括但不限于多光子荧光显微成像、光片荧光显微成像、拉曼显微成像等,既总结了贝塞尔光束在其中发挥的优势,也分析了贝塞尔光束旁瓣带来的干扰问题的消除方案。最后分析和探讨了贝塞尔光束在生物医学光学显微成像技术应用中遇到的问题以及发展前景。

关键词:贝塞尔光束;生物医学;多光子显微成像;光片显微成像;拉曼显微成像

中图分类号:O657.319

文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20225108.0851508

0 引言

自从DURNIN J于1987年将“无衍射光束”引入光学领域以来,无衍射光束在理论和实验上都得到了深入的研究^[1-2]。无衍射光束包括一系列光束,其中最常见的为贝塞尔光束和艾里光束。无衍射光束在传输过程中不发生衍射和扩散,可以在较长的距离上保持其紧密聚焦特性。除此之外,无衍射光束还具有自重构特性^[3-6],这是指遇到散射粒子等障碍物后可在其后重新形成无衍射光束。无衍射光束在成像、微操控、非线性光学等领域都有着广泛的应用,本文将重点关注无衍射光束中的贝塞尔光束。

WEN W等比较了贝塞尔-高斯光束与艾里光束在相同条件下的相似性演化,发现贝塞尔-高斯光束具有更强的自重构能力,比艾里光束更稳定^[7]。贝塞尔光束的这两个特性能够提供高斯光束无法比拟的优势,无衍射特性能够为成像获取更大的景深,这在高速多光子荧光显微成像、多光子三维显微成像、三维区域的二维投影成像、大尺度光片荧光显微成像等方面取得了广泛的应用;而自重构特性则满足了各种成像手段在结构复杂的散射介质中增大成像深度的需求。本文将介绍几种实验室常用的贝塞尔光束的产生方法,并按照成像方式总结贝塞尔光束的应用。

1 贝塞尔光束简介

贝塞尔函数是亥姆霍兹方程的精确解,而贝塞尔光束数学上可用贝塞尔函数来表示。经典贝塞尔光束是一种无衍射光束,具有特殊的景深、自恢复和相对于散射极限的波束宽度等显著特征。理想的贝塞尔光

基金项目:中央高校基本科研业务费(Nos. QTZX2185, QTZX2105),国家自然科学基金(No. 81871397),陕西省杰出青年科学基金(No. 2020JC-27),国家级青年人才项目,陕西省青年拔尖人才项目,国家重点研发计划(No. 2018YFC0910600)

第一作者:陈雪利(1984—),男,教授,博士,主要研究方向为生物医学光子学与分子影像技术。Email: xlchen@xidian.edu.cn

通讯作者:谢晖(1986—),男,副教授,博士,主要研究方向为生物医学光子学与脑认知。Email: hxie@xidian.edu.cn

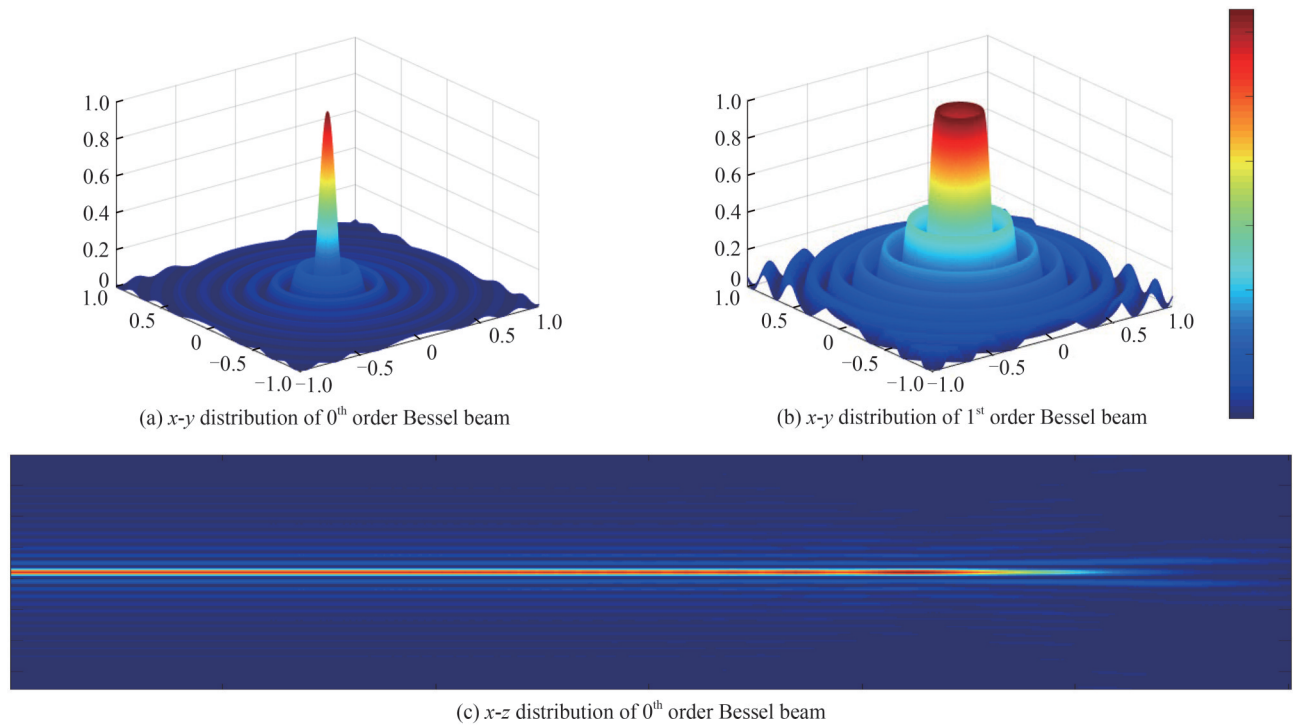
收稿日期:2022-05-31; **录用日期:**2022-07-11

<http://www.photon.ac.cn>

束可以认为是无限多个等振幅的平面子波,沿传播方向 z 相干迭加而成,在柱坐标下电场可以表示为

$$E(r, \varphi, z) = A_0 J_n(k_r r) \exp(ik_z z) \exp(in\varphi) \quad (1)$$

式中, $J_n(\cdot)$ 表示 n 阶贝塞尔函数, k_r 和 k_z 分别表示径向和轴向波矢, A_0 为常数, r, φ, z 分别为径向、方位角和轴向坐标分量。贝塞尔光束的横向电场分布由贝塞尔函数描述,与传播方向 z 无关。在实验室很难构建一个真正的贝塞尔光束,一个完美的贝塞尔光束是由一个无界的聚焦锥形波前产生,它在横向上有无限多的旁瓣,并且具有无限的能量^[2]。0阶和1阶贝塞尔光束的光场如图1(a)、1(b)所示,图1(c)是在自由空间传输的0阶贝塞尔光束轴向能量分布。通过实验的方法可以生成非常好的近似贝塞尔光束,它至少在某些区域具有理想贝塞尔光束的所有特性。对于有限能量的光束生成的贝塞尔光束每个环的能量会随着环数量的增加而降低,随着环数的增加,中心光斑的能量也会降低。实验室常用的无衍射光束生成方法包括以下几种。



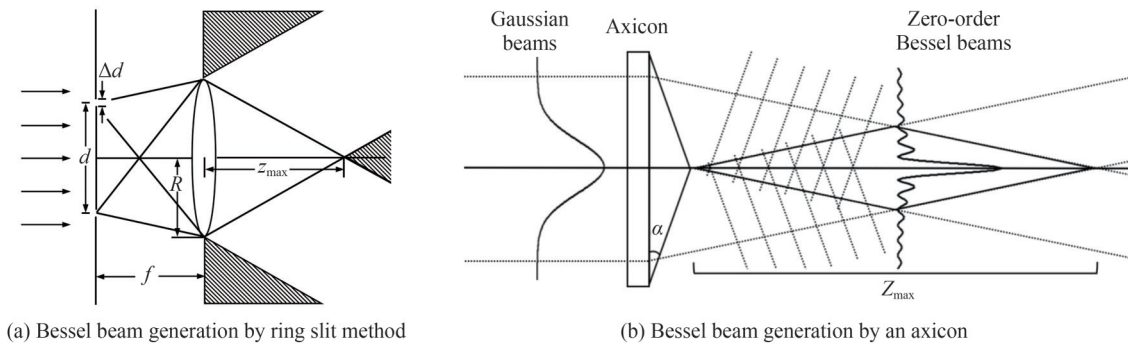
(c) x-z distribution of 0th order Bessel beam

图1 贝塞尔光束强度分布

Fig. 1 Schematic diagram of Bessel beam generation method

1.1 环缝法

环缝法是贝塞尔光束的第一个实验室实现方法,它利用贝塞尔光束的数学形式,即圆环的傅里叶变换产生^[2],如图2(a)所示,在焦距为 f 的透镜焦平面上放置圆形环缝,当光束垂直入射时,就能在透镜后方锥形区域内形成零阶贝塞尔光束。这种方法虽然可以成功的生成贝塞尔光束,但是环形掩模的存在挡掉了大部



(a) Bessel beam generation by ring slit method

(b) Bessel beam generation by an axicon

图2 贝塞尔光束生成方法示意图

Fig. 2 Schematic diagram of Bessel beam generation method

分的入射光,导致这一方法转化效率很低,不适用于需要高强度光束的应用。

1.2 轴棱锥法

一个轴棱锥是产生贝塞尔光束最便捷和经济的方法,轴棱锥通过折射入射光束产生干涉图案^[8-9],如图2(b)所示,当照明高斯光束的腰围尺寸远小于轴棱锥的硬孔径时,几乎整个输入都会转换为贝塞尔光束,这种方法效率远远高于环缝法。通常情况下,入射光束是高斯光束,此时在轴棱镜后产生的光束称为高斯贝塞尔光束,其强度分布为

$$I(r, z) = 2k\pi(\tan^2\alpha)(n-1)^2 z I_0 e^{-2(n-1)z \tan\alpha/\omega_0} \times J_0^2(kr(n-1)\tan\alpha) \quad (2)$$

式中, r 和 z 是径向和纵向坐标, I_0 和 ω_0 是入射高斯光束的强度和束腰直径, k 是波矢, n 是轴棱锥材料的折射率, α 是楔角。中心波瓣的宽度由贝塞尔函数的第一个零点来确定

$$d_f = \frac{2.4a}{k(n-1)\tan\alpha} \quad (3)$$

式中, a 是常数。贝塞尔光束的近似瑞利距离可以表示为

$$z_{\text{Bessel}} \approx \frac{\pi D d_f}{4\lambda} \quad (4)$$

式中, D 是孔径, d_f 是中心波瓣的直径, λ 是激光波长。在此将式(3)获得的 d_f 代入式(4),可以得到瑞利距离

$$z_{\text{Bessel}} \approx \frac{D}{2(n-1)\tan\alpha} \quad (5)$$

因此,轴棱锥的楔角最终决定了贝塞尔光束中心波瓣的束腰宽度和传输长度,较小的角度对应于较宽的波瓣和较长的“无衍射”传播距离。轴棱锥使用时需要入射光与轴棱锥之间精确对准,否则会导致光束不均匀。使用轴棱锥型计算全息图,例如衍射螺旋轴棱锥,可以从照明高斯光束直接生成高阶贝塞尔光束。除此之外还有组合轴棱锥生成贝塞尔光束的方法^[10],使用轴棱锥加透镜组成光束转化模块也是目前实验室常用的光束转化方法。

1.3 基于空间光调制器的方法

空间光调制器(Spatial Light Modulator, SLM)是一种可以改变输入光束相位和强度的数字设备。因为能够生成任意光束特征和全息图,所以在加工和成像应用广泛而且很受欢迎。人们可以很容易地在SLM中产生与衍射轴锥相对应的相位图案,因此,SLM能够生成具有用户定义的楔角的贝塞尔光束^[11]。尽管提供了最广泛的强度分布,但这些设备往往具有相对较低的损伤阈值。

1.4 基于光纤的方法

光纤是产生贝塞尔光束或环形光束的有效替代物。利用光纤产生贝塞尔光束有很多方法,包括化学蚀刻或者适当的抛光在光纤尖端制造轴棱锥等方法^[12],其主要优势在于不使用自由空间元件,有利于集成在小型系统中。

1.5 基于超表面的方法

超表面是一种厚度小于波长的人工层状材料,可以认为是一种低维度的超材料,其容易实现且具有超出传统平面超轻成型能力。通常由具有空间变化的几何参数和亚波长分离的平面光学谐振器阵列组成,通过与光的相互作用,空间变化的光学响应功能可以允许人们随意地构造光学波前^[13]。

总结上述方法,基于光纤、基于超表面和轴棱锥法产生贝塞尔光束都有高精度的加工需求,基于环缝的方法对入射光能量利用率低,空间光调制器存在损伤阈值。相比之下轴棱锥结构简单,产生的贝塞尔光束稳定性好,是目前用来产生贝塞尔光束最普遍的方法。除此之外生成贝塞尔光束的方法还有计算机全息图法^[14]、球差透镜法^[15]、谐振腔法^[16]等。

在自由空间中,贝塞尔光束的平面波分量在传播方向 z 上不会明显失相,因此强度分布不会改变,而在散射介质中传输时散射体将光场相位改变或能量吸收之后,光束依然能够在之后恢复其初始的强度分布,这一现象称为光束的自重构特性。如图3所示光束在传输过程中被散射介质(图中阴影位置)阻挡,光束经过一段传输后恢复到了初始的相位分布。2010年,FAHRBACH F O等在三种折射介质(包括玻璃球和人体皮肤)中验证了光束的自重构特性,展示了具有自重构光束(Microscopy with Self-Reconstructing Beams, MISERB)的显微镜原型,并表明全息形状的扫描贝塞尔光束不仅减少了散射伪影,同时提高了混沌介质中

的图像质量和穿透深度^[17]。在此研究基础上 FAHRBACH F O 采用空间光调制器结合线扫描光片显微镜, 构建了可用于标准倒置显微镜的附加模块, 通过对比不同光束照射的相同样品区域的图像, 精确评估光束形状和图像质量之间的相互关系。通过对各种散射介质的测量, 证明了贝塞尔光束通过非均匀介质的优越传输能力^[18]。之后的文献大量报道了贝塞尔光束在生物医学显微成像中的应用。在此我们将对相关工作进行综述。

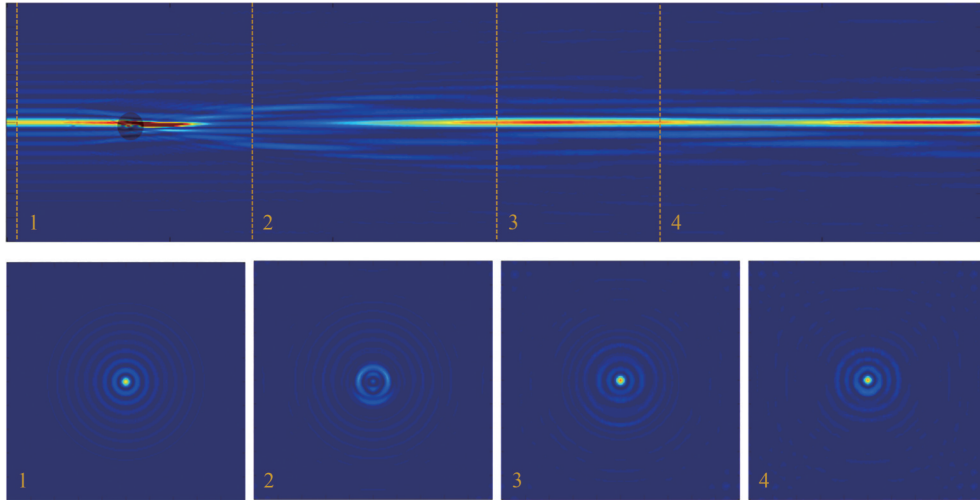


图3 贝塞尔光束的自重构特性

Fig. 3 Self-reconstructing properties of Bessel beams

2 在多光子荧光显微成像技术中的应用

多光子荧光显微成像技术是生物医学显微成像领域重要的、进行体积成像常用的成像方式, 广义上包括基于单光子效应的共聚焦荧光显微成像、双光子荧光显微成像、三光子荧光显微成像。利用贝塞尔光束的无衍射特性, 可以实现扩展景深的多光子荧光显微成像, 在此基础上还可以改变探测方式实现快速成像; 利用贝塞尔光束的自重构特性, 可以激发更深层组织中的信号, 实现大深度成像; 贝塞尔光束具有更细的聚焦中心束, 基于此可提升荧光显微成像的横向分辨率。贝塞尔光束的旁瓣会造成非成像区域的照明和激发, 这会降低图像信噪比, 但是多光子荧光显微成像技术在光子数大于1时主要利用非线性光学效应, 对单位面积的激发光强度有一定的需求, 这就能够在一定的程度上避免在基于贝塞尔光束的多光子显微镜中旁瓣效应的影响^[19-20], 除此之外, 本文还将讨论其他解决贝塞尔旁瓣问题的方案。

2.1 基于无衍射特性的扩展景深成像

荧光显微成像技术的景深取决于聚焦激发光束的瑞利距离。瑞利距离是通过计算聚焦激光场面积加倍的距离来表征高斯激光束的扩展和发散, 表示为

$$z = \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda} \quad (6)$$

式中, λ 为激光波长, ω_0 为光束束腰直径。当使用高数值孔径显微镜物镜时, 光束的束腰直径很小, 聚焦光束的瑞利距离范围只有几个微米, 而无衍射贝塞尔光束则可以保持光场横向尺寸不变的情况下有较长的聚焦距离。

将贝塞尔光束与多光子显微成像技术相结合, 可以拓展激发光束的聚焦体积, 实现基于多光子荧光效应的快速体积成像, 如图4所示。例如, YANG Y L 等报道了一种双光子激光扫描立体显微镜^[21], 将贝塞尔光束集成于传统双光子荧光显微镜, 利用贝塞尔光束拓展景深实现快速体积成像。系统通过获取具有视差的两个视角的图像实现深度的感知, 因此只需要从不同角度扫描两幅图像, 体积成像速度大大提高。系统获取的体积图像能够在三维监视器上实时立体显示, 对于稀疏且特征丰富的样本能够利用立体匹配算法恢复深度信息。LU R 等基于轴锥实现了贝塞尔光束模块, 并轻松集成到现有的双光子荧光显微镜中^[22], 简单地沿光轴平移其中一个中继透镜, 即可连续调整贝塞尔聚焦的轴向长度, 使用该模块可同时监测斑马鱼幼体

中延伸超过 $60\ \mu\text{m}$ 深度的脊髓投射神经元的活动,体积率为 $50\ \text{Hz}$,且成像体积的轴向范围可调。CHEN W 等报道了使用自适应光学像差矫正的贝塞尔光束聚焦双光子荧光显微镜^[23],通过开发的自适应光学方法,在物镜焦平面上矫正贝塞尔光束聚焦的畸变波前,使系统恢复到衍射极限的成像性能,在深度成像上实现高时间分辨率和高空间分辨率。系统应用于 $500\ \mu\text{m}$ 深度的斑马鱼幼体和小鼠大脑体积成像,在体突触结构和功能测量的灵敏度和分辨率有了显著提高。RODRIGUEZ C 等将贝塞尔光束的焦深轴向扩展能力应用到三光子荧光显微成像技术中^[20],使用基于轴棱锥的模块生成不同数值孔径和轴向长度的贝塞尔光束,并将此体积成像工具应用于小鼠脑切片成像和活体小鼠脑成像。利用贝塞尔光束的无衍射特性实现扩展景深的多光子荧光显微成像的典型结果如图 4(a)所示。

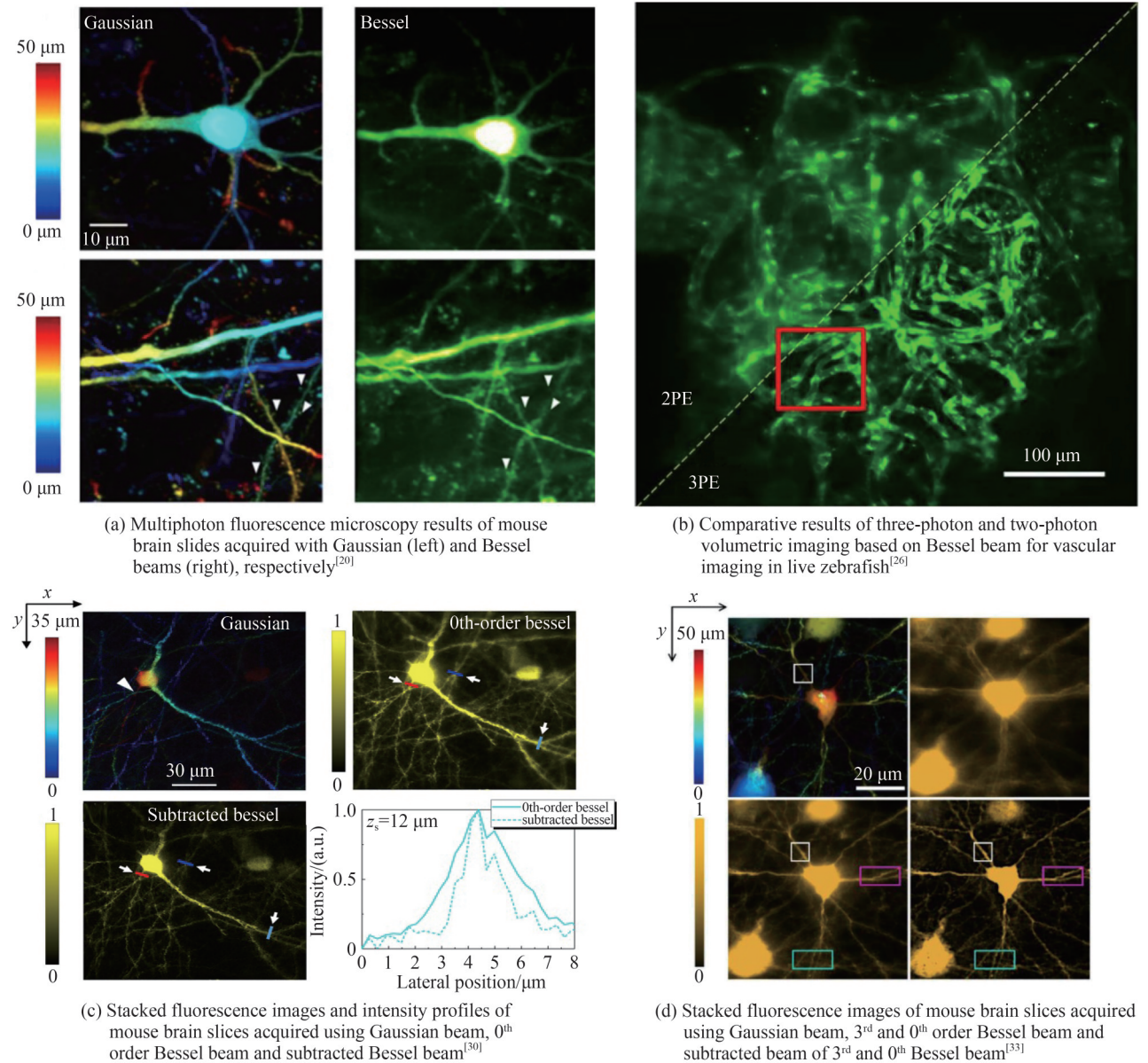


图 4 贝塞尔光束在多光子荧光显微成像技术中的典型应用结果

Fig. 4 Representative results of applying Bessel beam to multiphoton fluorescence microscopy

2.2 基于自重构特性的大深度成像

贝塞尔光束的另一个重要特点是遇到障碍物后的自重构特性,基于该特性能够保障聚焦光束在散射介质深处的传输和激发有效信号。ZHENG J J 等在角谱法框架下通过分块衍射传输模型模拟了双光子激发荧光体积成像过程,验证了贝塞尔光束的自重构特性能够穿透散射介质,同时可以在单个光栅扫描中成像感兴趣的体积,同时双光子的非线性效应能够有效消除贝塞尔光束旁瓣产生的伪信号^[19]。利用贝塞尔光束

的自重构特性,研究者们实现了大深度的多光子荧光显微成像。例如,PURNAPATRA S B等使用特殊设计的物镜,生成了具有大穿透深度的类贝塞尔无衍射光束,在单光子荧光显微成像中系统穿透深度达到了 $650\ \mu\text{m}$ ^[24]。双轴共焦(Dual-Axis Confocal, DAC)显微镜通过离轴和低数值孔径的照明和收集方式获取更好空间滤波和光学切片性能,要求光束在焦点处精确相交。当用于具有折射不均匀性的生物组织时,由于光束折射和畸变会导致空间分辨率下降,而CHEN Y等报道了基于贝塞尔光束的DAC显微镜相比高斯光束DAC显微镜在微观组织异质性方面成像的分辨率退化更小^[25],成像系统如图5所示。

CHEN B Y等报道了结合贝塞尔光的三光子荧光显微镜将小鼠大脑的高分辨率无创功能成像深度扩展到 $1.0\ \text{mm}$ 以上^[26]。ANTONACCIG等证明了贝塞尔光束在混沌介质中的三维成像能力^[27]。在该研究中,无衍射自愈三维单色光斑能够深入样品体积,抵抗混浊环境中的偏转,并提供与高斯光束相当的轴向分辨率;与衍射受限光束相比,由贝塞尔光束相干混合形成的光场,即使在混浊的牛奶溶液中,其无畸变穿透能力也增加了十倍以上;在荧光成像方案中,与衍射受限光束相比,图像对比度增加了十倍,即使经过四个瑞利长度,空间分辨率也保持不变^[27]。利用贝塞尔光束的自重构特性实现大深度的多光子荧光显微成像的典型结果如图4(b)所示。

2.3 基于更细聚焦光束的高分辨率成像

在相同的聚焦条件下,贝塞尔光束的中心瓣直径要比高斯光束细,这就为提升系统空间分辨率带来了机会。2013年,SNOEYINK C等首先报道了基于贝塞尔光束的显微镜(Bessel Beam Microscopy, BBM),贝塞尔光束由置于光路中的轴棱锥产生,BBM系统产生的点扩散函数(Point Spread Function, PSF)峰值可以变窄,从而将基础显微镜的分辨率提高 38% ^[28]。此外,通过结合三维定位,光束整形,共焦检测等方法可进一步提升分辨率。CHAKRABORTY C等使用贝塞尔光束显微镜在应用相关光子计数下实现了低于 $10\ \text{nm}$ 的定位精度^[29]。HE H等报道了通过使用多阶贝塞尔光束增强了体积双光子荧光显微镜在扩展景深上的分辨率^[30]。在该研究中,双光子荧光显微镜中的等效扫描光束为细针状光束,由针状0阶光束与稻草状1阶贝塞尔光束相减而产生;与0阶贝塞尔光束相比,其横向分辨率提高了 28.6% ,并能够在 $56\ \mu\text{m}$ 的轴向深度上保持^[30]。

SHEPPARD C等将贝塞尔光束应用到图像扫描显微镜,用于提升该显微镜的空间分辨率^[31]。图像扫描显微镜基于共焦显微技术,利用探测器阵列代替共焦针孔,图像通过像素重新分配重建。阵列探测器能够获取大部分的荧光,在提升图像信噪比的同时会使图像分辨率变差。使用贝塞尔光束照明和小阵列探测器的图像扫描显微镜,与传统荧光显微镜相比,横向分辨率(点扩散函数的宽度)可以提高 1.78 倍。该研究还探讨了贝塞尔光束在双光子或三光子荧光图像扫描显微镜中的作用,图像扫描显微镜的光学切片效应与多光子显微镜的结合减少了样品表面的背景,从而增加了穿透深度。在贝塞尔光束的加持下,双光子图像扫描显微镜的分辨率比非聚焦双光子荧光显微镜的分辨率高 1.85 倍,点扩散函数的峰值提高 2.84 倍;三光子图像扫描显微镜的分辨率提高了 2.10 倍,点扩散函数的峰值是非聚焦三光子荧光的 3.77 倍;基于贝塞尔光束的双光子图像扫描显微镜的分辨率比标准双光子荧光显微镜的分辨率提高了 2.13 倍。结合图像扫描模式和贝塞尔光束,双光子或三光子荧光显微成像的轴向分辨率和光学切片能力也得到了改善^[31]。利用贝塞尔光束的更细中心瓣直径特性实现高分辨率的多光子荧光显微成像的典型结果如图4(c)所示。

2.4 贝塞尔光束旁瓣影响的消除

将贝塞尔光束应用于多光子荧光显微镜时,主要依靠光束整形实现贝塞尔光束旁瓣的抑制,包括滴水法^[32]和基于高阶贝塞尔函数相减的方法^[33]。HUA X等采用滴水法可有效地抑制贝塞尔光束旁瓣,与传统宽场显微镜相比,主瓣的分辨率提高了四到五倍,成像景深提高了四到五倍^[32]。HE H等通过强度和形状匹配,

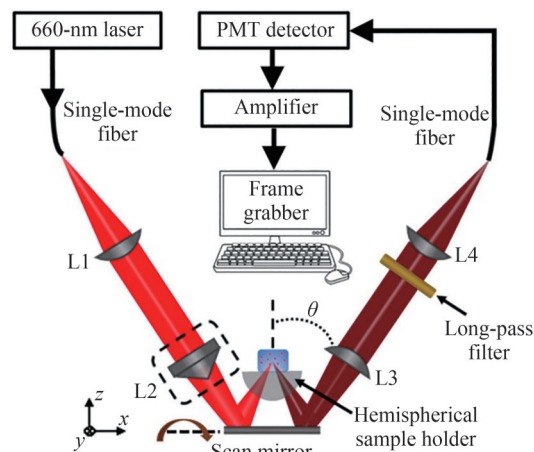


图5 基于贝塞尔光束的双轴共焦显微镜示意图^[25]

Fig. 5 Schematic of Bessel beams based dual-axis confocal microscope^[25]

以高阶贝塞尔光束作为0阶的背景,在模拟和实验中研究了不同聚焦条件下贝塞尔光束旁瓣引入的成像背景强度,通过相减的方式在50 μm 厚的小鼠脑切片上展示了旁瓣消除的性能,神经元的对比度提高了2.7 dB。这种背景消除技术为提高双光子荧光体积成像对比度提供了一种简单而通用的工具,在追求更好横向分辨率的高数值孔径情况下尤其重要^[33]。利用高阶贝塞尔函数相减的方法消除旁瓣影响的典型结果如图4(d)所示。

3 在光片荧光显微成像技术中的应用

点扫描来获取样本三维高分辨率信息的成像方式会限制成像速度,同时成像过程中照明光束穿过样本的整个厚度,会对样本造成严重的光毒性,对荧光团造成光漂白,这使得多光子荧光显微成像技术不适用于大样本的高速成像。光片荧光显微镜将照明和探测光路垂直方向设置,是具有低光毒性的有效切片成像方式,成像时使用线扫描和面扫描也使其具备高速成像的条件。目前光片显微成像技术已经广泛应用于活细胞成像、脑成像、发育生物学成像。

光片荧光显微成像中,激发光片在检测目标光轴方向需要足够薄以确保消除离焦激发,而在横向尺寸上又要求它能足够长,可以提供更大的成像视野。这对于传统基于高斯光束的光片荧光显微镜来说是相互矛盾的,较薄的高斯光束传播的距离较短;对于厚度接近波长衍射极限的二维高斯光束光片,其传播长度小于几个波长。贝塞尔光束作为具有自重构特性的无衍射光束,在光片荧光显微成像中发挥出了巨大的优势。两种光片的应用对比如图6所示,图像显示了用于大视场成像的高斯光片和贝塞尔光片^[34]。基于贝塞尔光束的光片荧光显微成像技术在生物显微成像领域发挥出巨大的优势,但是贝塞尔光束具有很强的旁瓣效应,旁瓣照明会从相邻组织产生不利的生物荧光。通过抑制旁瓣的激发能够提升图像信噪比,有些情况下还能提升轴向分辨率。

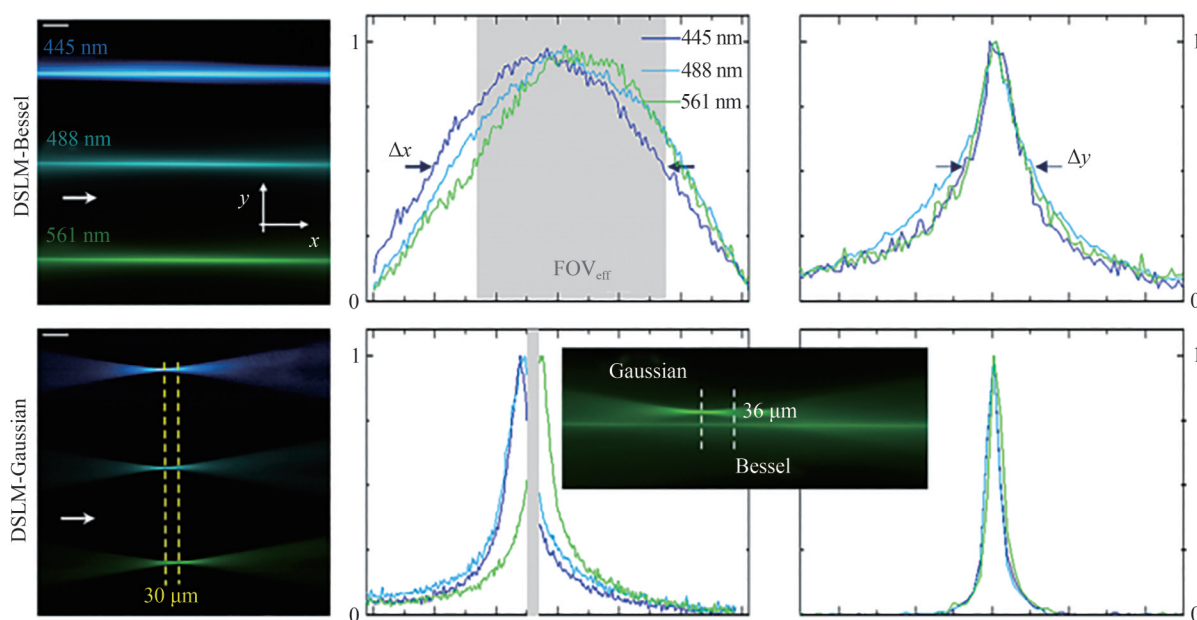


图6 贝塞尔光片与高斯光片的对比^[34]

Fig. 6 Comparison of Bessel beam and Gaussian beam-based light-sheet^[34]

3.1 具有更大视场的贝塞尔光片

许多应用领域迫切需要具有大视场的光片。在发育生物学领域,LUNA-PALACIOS Y Y等介绍了贝塞尔光束用于大视场成像的优点和高斯光束用于多色成像的缺点^[34]。多重贝塞尔激励可以最大限度地减小由于光束色度散焦而导致的景深失配效应,并减轻由多重高斯光束产生的模糊干扰,它还提供了一个具有各向均匀的轴向分辨率和更大有效视场上的光学切片。对大孢链霉菌的内部结构和细胞动力学研究证明了这种优势^[34],典型成像结果如图7(a)所示,图中对比基于高斯光束的数字扫描光片显微镜,基于贝塞尔光束的数字扫描光片显微镜能够覆盖更大的视野并且在整个成像视野内保持了与高斯光束相当的光学轴

向分辨率;在使用高倍物镜情况下(图7(a)第二行),高斯光束衍射会导致光片扭曲而贝塞尔光束则弱化了这一问题。LIU Chi等报道了基于贝塞尔光束的病理切片全切片成像系统,使用贝塞尔光束激发,扩展的焦深不仅可以一次成像获取全轴向信息,而且还可以缓解样品对准的要求^[35]。在双光子激发的光片显微镜中,TAKANESAWA S等设计了一个轴棱锥和两个透镜组成的照明光学系统,能够修改光束形状从而拉伸贝塞尔光束的传输长度^[36]。在10×物镜下,该方法能够获得束腰小于4 μm,长度在600~1 000 μm的光片,该方法不影响检测物镜聚焦深度内的激发限制。基于此系统对青鳉鱼胚胎高速、长期的成像观测展示了该双光子光片系统在多细胞生物大视野、快速和长期方面广泛的应用前景。

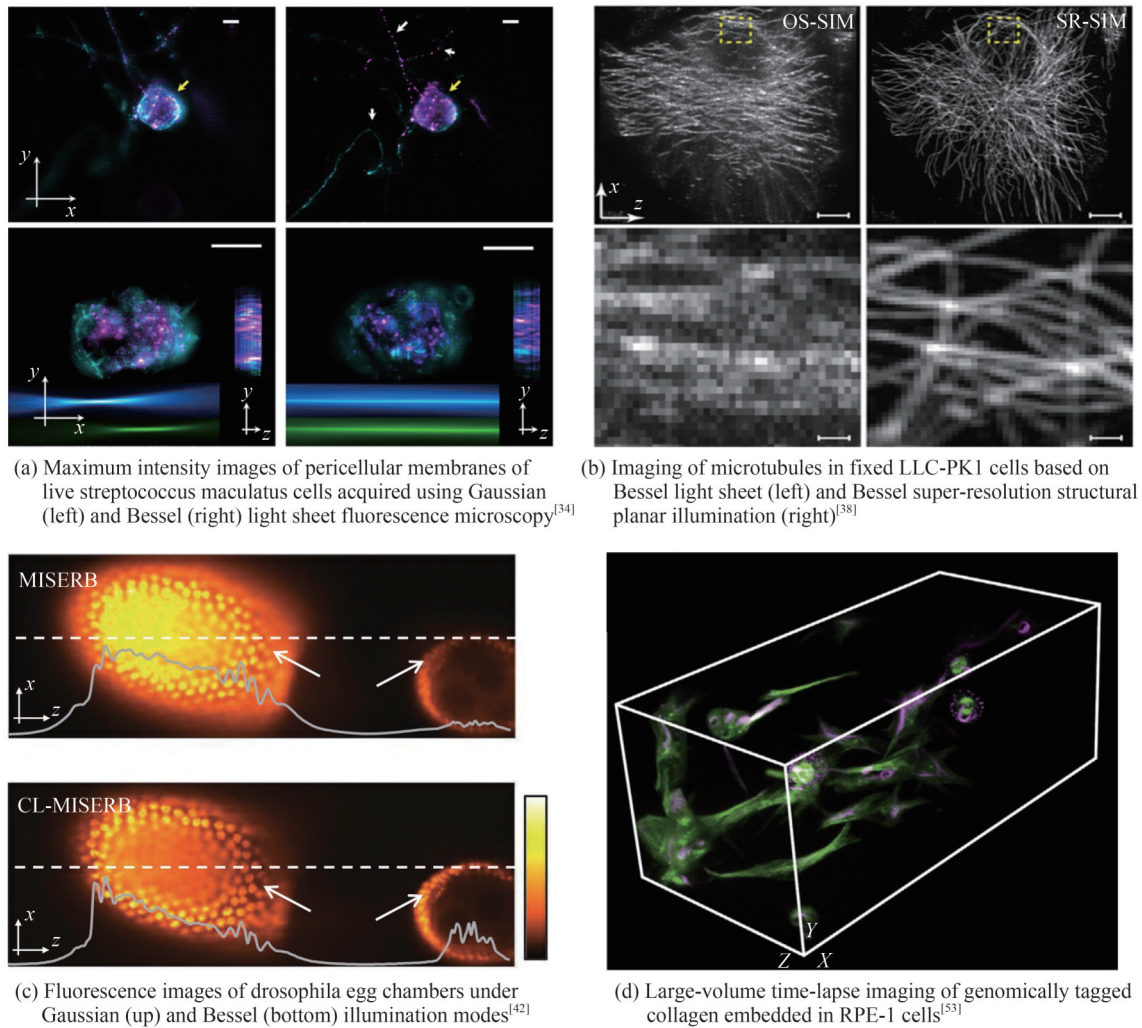


图7 贝塞尔光束在光片荧光显微成像技术中的典型应用结果
Fig. 7 Representative results of applying Bessel beam to light-sheet fluorescence microscopy

3.2 具有更高分辨率的贝塞尔光片

想要获得更高分辨率,则需要更薄的光片。已有研究将贝塞尔光束与选择性照明、结构光照明等方法相结合,用于光片荧光显微镜的分辨率提升。2011年,PLANCHON T A等报道了用于活细胞成像的三维各向同性选择性照明显微镜,其将贝塞尔光束与结构光照明和双光子激发相结合,创建出了厚度小于0.5 μm的光片,能够以0.3 μm的三维各向同性分辨率、200帧每秒的速度进行亚细胞成像^[37]。GAO L等报道了通过将扫描贝塞尔光束产生的超薄平面光与结构光照明超分辨率显微镜相结合,使其超越衍射极限,实现了在多个时间点对厚或密集荧光活体样品进行快速三维动力学研究;以此为基础证明了有丝分裂期间染色体的活体核型分析,并确定了成纤维细胞背侧和腹侧表面肌动蛋白细胞骨架的不同动力学特性。与共聚焦荧光显微镜相比,该方法能够实现快速成像,降低了光损伤,提高了深度对比度和分辨率^[38-39]。图7(b)对比了贝塞尔光束光片显微成像(7(b)左图)与贝塞尔光束3D超分辨结构光照明显微成像(7(b)右图)对固

定 LLC-PK1 细胞中微管的成像结果,贝塞尔光束 3D 超分辨结构光照明显微成像具有更好的信噪比,同时得到的图像中微管的厚度和强度也更加均匀^[38]。ZHAO T 等展示了一种使用线形光束和环形滤波器生成任意颜色的超薄贝塞尔光片的方法,利用这项稳健且经济高效的技术,获得了横向分辨率 250 nm 和轴向分辨率 400 nm 的生物样品双色三维图像,以及 1 Hz 时间分辨率下 20 μm 大小活体样品的高速三维体积成像^[40]。KOBEL L 等报道了通过结合相位整形、荧光团切换和荧光动态阻断三个物理概念,使有效光片变薄,从而提高光片荧光显微镜的分辨率和对比度的方法^[41]。

3.3 用于更大穿透深度的贝塞尔光片

2012 年,FAHRBACH F O 等报道了在厚介质(如细胞团、胚胎、皮肤、脑组织和植物)中,具有自重构特性的贝塞尔光片在深层组织的成像能力:基于共焦线检测原理,相比于高斯光片,贝塞尔光片不仅具有穿透深度,在轴向分辨率上也有一倍的提升^[42]。图 7(c)是在共焦线检测模式下,分别使用高斯光片和贝塞尔光片照明获得的果蝇卵室的荧光图像,使用贝塞尔光片获得了更好的对比度,在高穿透深度下,能够显示出更多的细节。2013 年,研究人员报道了一种分段贝塞尔光片,通过阻挡相反的部分来产生光束的角谱。结合共焦线检测,光片的光学切片性能可与照明光束的景深分离。实验结果证明分段贝塞尔光片表现出良好的自重建能力和穿透深度,在肿瘤多细胞球体成像中提升了对比度,这对于在光片荧光显微镜中研究大型强散射样品非常有利^[43]。除此之外,还有在单物镜倾斜光片双光子扫描显微镜中使用贝塞尔光束改善光片受散射的限制^[44]以及流式细胞仪中通过贝塞尔光片增强光子密度和横截面积^[45]的报道。

3.4 贝塞尔光片旁瓣干扰的消除

在贝塞尔光片荧光显微镜中,也有很多学者研究贝塞尔光束的旁瓣干扰消除问题。目前的解决方法可以分为从照明光束改进和从探测方式改进两个方面,具体包含以下几种方式。

在照明光束改进方面,通过使用激发光束整形方法^[46],在强散射介质中使用受激发射损耗抑制来自环形系统的荧光^[47],使用互补光束重复扫描法^[48-50],以及结合深度学习提升图像质量的互补光束相减法^[51]。BAI Chen 等报道了互补光束相减(Complementary Beam Subtraction, CBS)方法,通过对贝塞尔光束和互补光束进行双扫描后相减,减少失焦背景,提高光片荧光显微镜的轴向分辨率^[50-51]。在双重扫描和减法操作期间,为了解决系统不稳定导致的模糊和噪声导致的图像质量显著降低问题,研究人员提出了一种压缩盲反卷积和去噪方法,基于微球和模式生物的实验验证了该方法的有效性,与 CBS 光片法相比,该方法的轴向和横向分辨率分别提高了约 1.81 倍和 2.22 倍,平均信噪比提高了约 3 dB^[50]。同一时期,一种基于深度学习的光片荧光显微成像方法被提出,该方法通过单次扫描可以直接从传统的贝塞尔光片重建高质量图像,在确保图像质量的同时图像重建速度提升了约 100 倍。因此,该方法通过减少扫描行为和重建时间,可以显著提高系统的实用性^[51]。

在探测方式改进方面,主要有共焦探测方法^[52],以及扫描同步探测方法^[53]。DEAN K M 等报道了使用二维活性像素阵列与扫描光片同步,以有效抑制失焦荧光。由于其光束扫描几何形状,该技术被称为轴向扫描光学薄片显微镜(Axially Swept Light Sheet Microscopy, ASLM),能够在 $216 \mu\text{m} \times 216 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ 的体积实现 390 nm 的各向同性分辨率^[53]。图 7(d)是该系统对胶原嵌入的 RPE-1 细胞群的微管和波形蛋白长期同步双激发双发射体积成像的结果,证明了该系统在复杂三维微环境中对迁移细胞的同时双色、高对比度和高动态范围延时成像能力。

此外,还有结合多个策略进行贝塞尔光片旁瓣干扰的消除,例如结合受激辐射耗尽^[54]、双光子激发^[55]、人工智能生成超透镜等方法也能取得良好的效果^[56]。DENG S H 等利用贝塞尔光束将受激辐射损耗与数字扫描光片显微镜集成,可实现快速、高分辨率和大视场成像。由于空心高斯耗尽光束在焦平面周围轴向分布受限的优点,贝塞尔激发模式外围的荧光信号被受激辐射耗尽,实现了具有抑制旁瓣的超分辨光片,结果表明使用贝塞尔光束作为激发光和空心高斯光束作为耗尽光可以提高系统的轴向分辨率和图像对比度^[54]。

4 在相干拉曼显微成像技术中的应用

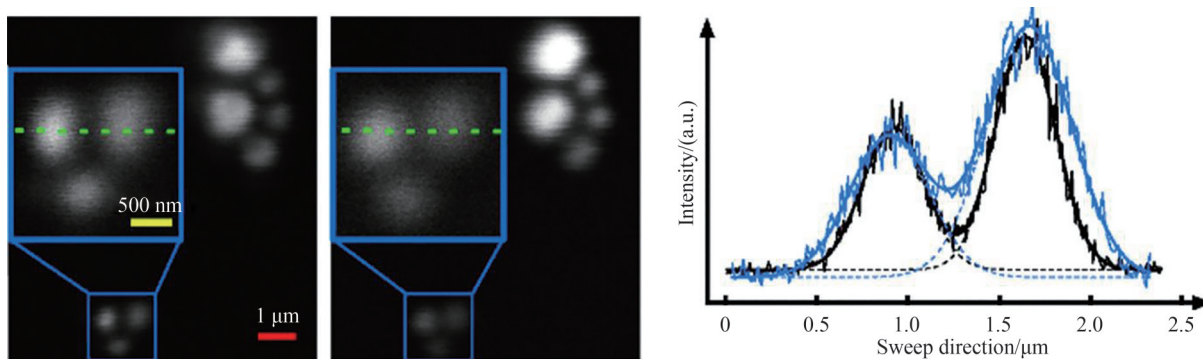
拉曼光谱技术以光子的非弹性散射为基础,具有非侵入、非标记、指纹谱等优点,作为一种分析工具被广泛应用于各个研究领域。基于自发拉曼效应的拉曼显微成像技术,由于自发拉曼散射效应的微弱性,受

限于成像速度而在生物医学成像应用中的进展缓慢。近年来基于非线性光学效应的相干反斯托克斯拉曼散射(Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, CARS)与受激拉曼散射(Stimulated Raman Scattering, SRS)显微成像技术已带来重要的突破,显著提升了拉曼信号的强度以及无标记成像的速度。然而,高斯光束有限的焦深限制了其在这一方面的发展,而贝塞尔光束应用在这些领域也已经取得了不错的成果

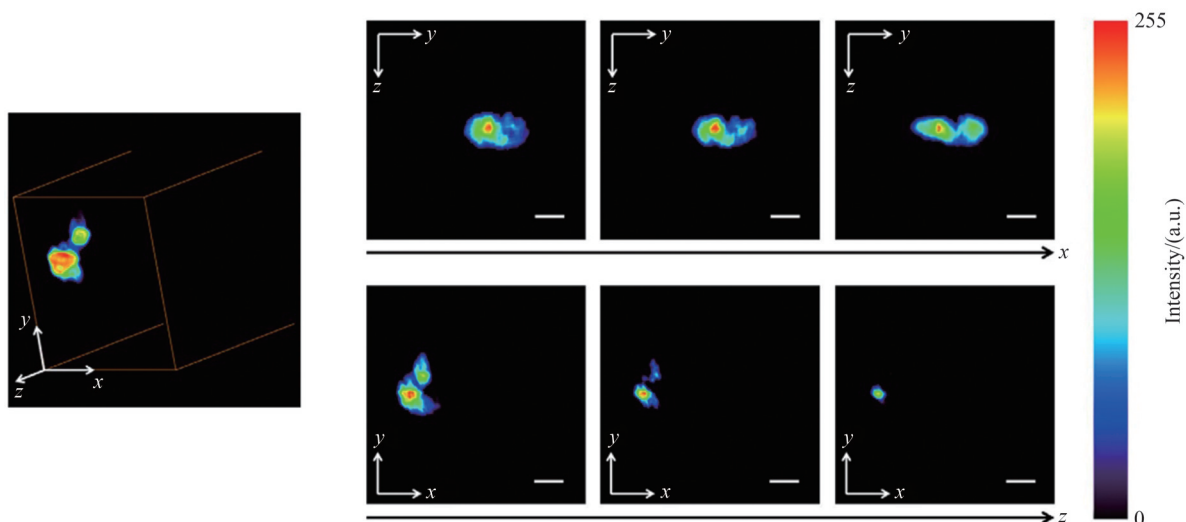
4.1 基于贝塞尔光束的相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术

相干反斯托克斯拉曼散射显微镜是一种基于非线性光学效应增强微弱拉曼信号的无标记显微成像技术,相比于信号微弱的自发拉曼散射,当泵浦光和斯托克斯光间的能量差恰好等于分子振动能级时其信号强度可增强3~5个数量级,从而实现活细胞和组织的无标记快速成像。目前实验室的CARS成像系统多采用高斯光束作为泵浦和斯托克斯激发源,受限于具有紧聚焦特性的高斯光束,其成像轴向分辨率和成像焦深具有一定的限制。

2015年,HEUKE S等报道了基于贝塞尔光束的相干反斯托克斯拉曼散射显微镜,使用贝塞尔光束可提升CARS显微镜的横向分辨率,数值模拟结果显示横向分辨率提升了1.33倍;在传统的高斯光束CARS显微镜中增加轴棱锥和透镜组,实现了贝塞尔光束的转化,证明了分辨率改进效果^[57]。利用贝塞尔光束提升CARS显微镜横向分辨率的典型结果如图8(a)所示。此外,该团队还报道了用于多层轴向样本成像的贝塞尔光束CARS显微成像系统。在该项研究中,研究人员提出了一种仅使用无源光学元件产生贝塞尔光束来激发产生CARS信号的实验实现方案,结果表明结合CARS过程非线性与折叠式照明几何结构,实现了从均匀样品到两倍于泵浦电场波的空间采样频率的连续相位匹配,最后根据数值模拟的反斯托克斯远场辐射



(a) Bessel (left) and Gaussian (middle) illuminated CARS images of PE beads, as well as their plots (right) comparing the lateral intensity profiles in a laser scanner sweep direction indicated by dashed green lines, respectively^[57]



(b) Volumetric imaging of a single adipose cell by stimulated Raman projection tomography (Bessel beams excited SRS imaging)^[60]

图8 贝塞尔光束在相干拉曼显微成像技术中的典型应用结果
Fig. 8 Representative results of applying Bessel beam to coherent Raman microscopy

模式的模量和相位,证明了重建轴向分层样品的目标^[58]。2018年,MASIA F等报道了一种融合稀疏采样和贝塞尔光束的高光谱CARS显微镜,能够实现高内涵、高通量、无标记的定量化学成像。在这项工作中,将化学特异性高光谱相干反斯托克斯拉曼散射显微镜与稀疏采样、贝塞尔光束照明相结合,展示了一个具有巨大应用潜力的无标记成像平台^[59]。

4.2 基于贝塞尔光束的受激拉曼散射显微成像技术

受激拉曼散射显微成像技术具有对特定化学键的无创成像能力,近年来越来越多地应用于生物与医学领域。相较CARS,SRS无非共振背景影响、不需要相位匹配条件,逐渐发展成为实时检测生物样品研究代谢小分子的重要工具。传统的SRS显微镜使用两个脉冲高斯光束,可提供高横向和轴向空间分辨率。由于高斯光束的紧密聚焦特性,导致SRS显微镜很难用于散射组织中深层目标的检测成像。基于贝塞尔光束的SRS显微镜可以在一定程度上解决这一问题。

2017年,CHEN Xueli等报道了可用于三维样本无标记容积化学成像的基于贝塞尔光束的受激拉曼投影(Stimulated Raman Projection, SRP)显微镜,能够实现对三维体积样本的容积化学成像,从而全面了解三维复杂分子组分信息。SRP显微镜通过二维横向扫描快速定量三维体积中的化学组分。此外,结合SRP和样品旋转断层策略,建立了SRP断层扫描显微镜,它可以以光学分辨的空间分辨率、比基于高斯光束的切片扫描成像技术更高的速度获取体积样本化学组分的三维空间分布^[60]。随后该课题组基于稀疏采样策略对投影断层成像的重建算法进行了加速,提出了基于稀疏采样原理的迭代重建方法和基于深度学习网络的稀疏重建算法,可将投影断层重建所需的投影图像数量分别从180降低到30和10个以内,从而SRP断层扫描成像的速度提升1个数量级以上^[61-62]。利用贝塞尔光束实现SRP断层扫描成像的典型结果如图8(b)所示。

贝塞尔光束的自重构特性使其在生物医学光学显微成像中具有抗散射的能力和潜力。为了探讨贝塞尔光束的自重构特性应用于散射介质中组分的受激拉曼散射显微成像的情况,CHEN Xueli等分别在2020、2021年仿真验证了基于自重构贝塞尔光束的受激拉曼散射显微成像在散射介质中信号产生和传输的优势^[63-64]。在该项研究中,使用光束传输方法结合SRS信号激发模型模拟了贝塞尔光束的传输以及受激拉曼散射信号的产生和自重构能力,设计系列仿真实验研究添加散射粒子的大小、位置、数量和分布对SRS信号产生的影响。此外,搭建的基于贝塞尔光束的SRS显微镜进行了初步的实验探索,结果表明SRS信号可以在散射介质中的一定深度内产生或恢复,并且这种信号受散射参数的影响很大^[63]。在此基础上,又通过折射率湍流的分形模型生成散射组织,模拟含有复杂结构的生物组织;通过在不同建模参数组织中传输和激发SRS信号对比,显示尽管建模参数对SRS信号的产生影响很大,但基于贝塞尔光束的SRS显微成像技术可以在更深的散射组织中产生信号^[64]。2022年,CHEN Xueli等还将贝塞尔光束的自重构特性应用于散射介质中组分的拉曼光谱检测,利用贝塞尔光束的自重构特性搭建了贝塞尔光束拉曼光谱仪,能够提供比传统高斯光束更大的检测深度和更好的线性定量能力,在在体药物评估方面取得重大进展^[65]。

除了上述研究之外,GONG L等在2021年提出了一种新的无需 z 轴扫描的受激拉曼散射断层扫描成像技术(Stimulated Raman Scattering Tomography, SRST),它通过使用与贝塞尔光束相关的光学拍频技术(Optical Beating Technique, OBT)来实现具有亚细胞分辨率、更深穿透能力的无标记容积化学成像。与传统的SRS显微镜相比,使用具有自重构特性的贝塞尔光束的SRST在高散射聚合物珠体模型中的成像深度至少提高了两倍。该研究还证明了SRST对各种成像目标(例如拉曼活性晶体、植物细胞和生物组织)进行更深层的无标记容积成像的能力,并且贝塞尔光束-OBT融合技术在SRST中的光学切片能力可很容易地扩展到几乎任何其他非线性光学成像模式,用于生物与医学系统中的深层组织的三维显微成像^[66]。

5 其他方面应用

除了以上报道,贝塞尔光束在其他成像方式中也有着广泛的探索和应用,包括光学相干显微成像^[67-70]、光学相干弹性成像^[71]、光声成像^[72-73]、二次谐波成像^[74]、三次谐波成像^[75]、傅里叶复用荧光寿命层析成像^[76-77]等技术领域。

光学相干显微成像(Optical Coherence Microscopy, OCM)具有无创三维成像的独特优势,无需外源性标记即可用于生物样品的研究。然而,在传统基于高斯光束的成像系统中,这种技术的成像深度受到聚焦

深度和高横向分辨率之间权衡的限制,并且组织散射的光会随着深度的增加逐渐降低光学相干断层扫描图像的对比度。多焦贝塞尔光束光学相干层析成像(Multifocal Bessel Beam Optical Coherence Tomography, MBOCT)结合了贝塞尔光束OCT和多焦OCT的优点,提高了成像深度^[67]。CHEN Y等报道了在OCM中使用准贝塞尔光束将聚焦深度拓展到100 μm ,达到了标准OCM的三倍,同时对球面像差的不敏感性增强了该OCM系统在三维生物成像中的应用能力^[70]。在光学相干弹性成像方面,FANG Q等引入贝塞尔光束,将微内窥镜下的超高分辨率光学相干弹性成像系统的成像景深拓展了4倍^[71]。

在光声成像方面,SHI J等报道了光学分辨光声显微镜(Optical Resolution Photoacoustic Microscopy, OR-PAM)在体积成像方面被高斯光束的短焦深限制^[72],而无衍射贝塞尔光束可以提供长焦深,虽然存在旁瓣伪影问题,但使用基于松弛效应的非线性方法可以抑制光声成像中的旁瓣。因此将贝塞尔光束引入到OR-PAM中实现的贝塞尔光束OR-PAM拓展了焦深,加快了体积成像的速度,在实验中实现了1 mm的焦深和7 μm 的横向分辨率,并对碳纤维和红细胞样品进行了体积成像^[72]。JIANG Bowen等研制了一种反射模式贝塞尔光束光声显微镜(Bessel-Beam Photoacoustic Microscope, BB-PAM),提供扩展景深,用于脑毛细管的活体成像^[73]。与高斯光束相比,贝塞尔光束的无衍射特性意味着PAM的自由度更大。在该BB-PAM系统中,采用轴棱锥和环形掩模产生贝塞尔光束,获得的系统横向分辨率为1.6 μm ,自由度测量为483 μm ,并通过碳纤维网络的成像验证了这一点;该BB-PAM的自由度约为传统高斯光束PAM的7倍。基于该BB-PAM对开颅小鼠的脑血管进行了成像,证明了其体内成像能力优于高斯光束PAM^[73]。

6 结论

伴随着激光技术的发展,贝塞尔光束在生物医学显微成像技术领域的应用不断取得新的进展。贝塞尔光束的无衍射特性满足了在三维生物样本成像中看的范围更广、看的更清楚、看的更快的需求,贝塞尔光束的自重构特性满足了在散射样本中看的更深需求。虽然贝塞尔光束的应用无法满足所有的成像需求,但是单一维度的进步也会为生物医学显微成像技术领域打开一扇新的大门。

本文重点关注了贝塞尔光束在生物医学光学显微成像技术领域的应用,众多的研究表明,利用贝塞尔光束的无衍射特性和自重构特性,一定程度上解决了生物医学光学显微成像技术的三维显微成像扩展景深问题以及散射粒子对光学显微成像的影响,证明了贝塞尔光束在生物医学光学显微成像技术领域有较大的应用潜力。然而,贝塞尔光束的应用也有一定的局限性。例如,贝塞尔光束的应用会带来旁瓣干扰问题,尤其是在线性成像技术中更为明显;但是随着各种旁瓣消除手段的实现,又带来了更高的分辨率和信噪比。贝塞尔光束由于其光束分布特性,即激光能量将平均分布于中心瓣和旁瓣,造成与相同总能量的高斯光束相比,其中心瓣聚焦能量偏低,这可能会限制其部分应用;但是这个问题可以通过提高激光能量来解决,而激光能量的提升由于旁瓣对能量的分配并不会造成光损伤。此外,贝塞尔光束自加速特性的应用也是一个值得研究的课题,已经有关于不衰减自加速贝塞尔光束的报道^[77]。随着技术的成熟,贝塞尔光束的应用一定能够让显微镜看的更快、看的更清楚、看的更长久,基于贝塞尔光束的光学显微镜将带领科研工作者探索生物微观世界的无尽奥秘。

参考文献

- [1] DURNIN J. Exact solutions for nondiffracting beams. I. The scalar theory[J]. Optical Society of America, 1987, 4(4): 651-654.
- [2] DURNIN J, JR M J, EBERLY J H. Diffraction-free beams[J]. Physical Review Letters, 1987, 58(15):1499-1501.
- [3] XIE Jiajun, XU Hangshi, YU Wenhui, et al. Numerical simulation and experimental confirmation on reconstruction of Bessel beam[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(6): 0617021.
谢家俊, 许杭史, 余文慧, 等. 贝塞尔光束自重建的理论模拟与实验验证[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(6): 0617021.
- [4] XIE Jiajun, TANG Shiyao, CHEN Yongqiang, et al. Self-reconstruction characteristics of Bessel beam in biological tissue [J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(5): 0507302.
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.
- [5] HU Hanqing, WU Fengtie, HU Run, et al. Propagation characteristics and self-reconstruction of radially polarized spiral Bessel beam[J]. Acta Photonica Sinica, 2019, 48(3):0326001.
胡汉青, 吴逢铁, 胡润, 等. 径向偏振螺旋贝塞尔光束的传输特性及其自重建[J]. 光子学报, 2019, 48(3):0326001.

- [6] SUN Ridong, GUO Lixin, CHENG Mingjian, et al. Propagation characteristics of Bessel-Gaussian beam in anisotropic atmosphere[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2018, 47(12):1201002.
孙日东, 郭立新, 程明建, 等. 贝塞尔高斯光束在各向异性湍流中的传输特性[J]. *光子学报*, 2018, 47(12):1201002.
- [7] WEN Wen, CHU Xiuxiang. Quantitative comparison of self-healing ability between Bessel-Gaussian beam and Airy beam [J]. *Annals of Physics*, 2015, 360:549-555.
- [8] LEI Ming, YAO Baoli. The explanation of Bessel-like beam from axicon with three-beam interference model[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, 35(1):146-148.
雷铭, 姚保利. 用三光束干涉模型解释锥镜产生类贝塞尔光束[J]. *光子学报*, 2006, 35(1):146-148.
- [9] YANG Guiyang, MA Guolu, ZENG Guoying. Influence of the surface deviation axicon on the propagation characteristics of non-diffracting beam[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2019, 48(1):0126002.
杨贵洋, 马国鹭, 曾国英. 轴棱锥透镜面形偏差对无衍射光束传播特性的影响[J]. *光子学报*, 2019, 48(1):0126002.
- [10] LIU Liang, HUANG Xiujun, XU Hongyan, et al. Generating long-distance nondiffracting Bessel beams with liquid-immersion composite-axicon[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2017, 46(11):1114001.
刘亮, 黄秀军, 徐红艳, 等. 浸液式组合轴棱锥产生长距离无衍射贝塞尔光束[J]. *光子学报*, 2017, 46(11):1114001.
- [11] MOSTAFA A, AKHLAGHI E A, REPORTS H. SSPIM: a beam shaping toolbox for structured selective plane illumination microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):10067.
- [12] KIM J K, KIM J, HA W, et al. Compact all-fiber Bessel beam generator based on hollow optical fiber combined with a hybrid polymer fiber lens[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(19):2973-2975.
- [13] CHEN W T, KHORASANINEJAD M, ZHU A Y, et al. Generation of wavelength-independent subwavelength Bessel beams using metasurfaces[J]. *Light Science & Applications*, 2016, 6(5):e16259.
- [14] VASARA A, TURUNEN J, FRIBERG A, et al. Realization of general nondiffracting beams with computer-generated holograms[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1989, 6(11):1748-1754.
- [15] HERMAN R M, WIGGINS T. Production and uses of diffractionless beams[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1991, 8(8):932-942.
- [16] COX A J, DIBBLE D C. Nondiffracting beam from a spatially filtered Fabry-Perot resonator[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1992, 9(2):282-286.
- [17] FAHRBACH F O, SIMON P, ROHRBACH A. Microscopy with self-reconstructing beams [J]. *Nature Photonics*, 2010, 4(11):780-785.
- [18] FAHRBACH F O, ROHRBACH A. A line scanned light-sheet microscope with phase shaped self-reconstructing beams [J]. *Optics Express*, 2010, 18(23):24229-24244.
- [19] ZHENG Juanjuan, YANG Yanlong, MING Lei, et al. Fluorescence volume imaging with an axicon: Simulation study based on scalar diffraction method[J]. *Applied Optics*, 2012, 51(30):7236-7245.
- [20] RODRIGUEZ C, LIANG Y, LU R, et al. Three-photon fluorescence microscopy with an axially elongated Bessel focus [J]. *Optics Letters*, 2018, 43(8):1914-1917.
- [21] YANG Yanlong, YAO Baoli, LEI Ming, et al. Two-photon laser scanning stereomicroscopy for fast volumetric imaging [J]. *PLOS ONE*, 2016, 11(12):e0168885.
- [22] LU R, TANIMOTO M, KOYAMA M, et al. 50 Hz volumetric functional imaging with continuously adjustable depth of focus[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(4):1964-1976.
- [23] CHEN W, NATAN R G, YANG Y, et al. In vivo volumetric imaging of calcium and glutamate activity at synapses with high spatiotemporal resolution[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6630.
- [24] PURNAPATRA S B, BERA S, MONDAL P P. Spatial filter based Bessel-like beam for improved penetration depth imaging in fluorescence microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2012, 2(1):692.
- [25] CHEN Y, GLASER A, LIU J. Bessel-beam illumination in dual-axis confocal microscopy mitigates resolution degradation caused by refractive heterogeneities[J]. *Journal of Biophotonics*, 2016, 10(1):68-74.
- [26] CHEN Bingying, HUANG Xiaoshuai, GOU Dongzhou, et al. Rapid volumetric imaging with Bessel-Beam three-photon microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(4):1992-2000.
- [27] ANTONACCI G, DOMENICO G D, SILVESTRI S, et al. Diffraction-free light droplets for axially-resolved volume imaging[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):17.
- [28] SNOEYINK C. Imaging performance of Bessel beam microscopy[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(14):2550-2553.
- [29] CHAKRABORTY C, ISLAM M A, SNOEYINK C, et al. 10nm three-dimensional localization using Bessel beam microscopy[J]. *Measurement Science and Technology*, 2020, 31(4):045701-045708.
- [30] HE H, KONG C, CHAN K Y, et al. Resolution enhancement in extended depth of field for volumetric two-photon microscopy[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(11):3054-3057.
- [31] SHEPPARD C, CASTELLO M, TORTAROLO G, et al. Image scanning microscopy with multiphoton excitation or Bessel beam illumination[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2020, 37(10):1639-1649.

- [32] HUA X, GUO C, JIAN W, et al. Depth-extended, high-resolution fluorescence microscopy: Whole-cell imaging with double-ring phase (DRIP) modulation[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(1):204-214.
- [33] HE H S, REN Y X, CHAN R, et al. Background-free volumetric two-photon microscopy by side-lobes-cancelled Bessel beam[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2021, 27(4):6801307.
- [34] LUNA-PALACIOS Y Y, LICEA-RODRIGUEZ J, CAMACHO-LOPEZ M D, et al. Multicolor light-sheet microscopy for a large field of view imaging: A comparative study between Bessel and Gaussian light-sheets configurations [J]. *Journal of Biophotonics*, 2022, 15(6):e202100359.
- [35] LIU Chi, ZHAO Zhifeng, JIN Cheng, et al. High-speed, multi-modal, label-free imaging of pathological slices with Bessel beam[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(5):2694-2704.
- [36] TAKANEZAWA S, SAITOU T, IMAMURA T. Wide field light-sheet microscopy with lens-axicon controlled two-photon Bessel beam illumination[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2979.
- [37] PLANCHON T A, GAO L, 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.
- [38] 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.
- [39] GAO L, LIN S, CHEN B C, et al. 3D live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(5):1083-1101.
- [40] ZHAO T, LAU S C, WANG Y, et al. Multicolor 4D Fluorescence Microscopy using Ultrathin Bessel Light Sheets[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26159.
- [41] KOBELE L, ROHRBACH A. A shape-switch-block method for confocal light-sheet microscopy with sectioned Bessel beams and stimulated emission depletion[J]. *Communications Physics*, 2020, 3(201): s42005.
- [42] FAHRBACH F O, ROHRBACH A J. Propagation stability of self-reconstructing Bessel beams enables contrast-enhanced imaging in thick media[J]. *Nature Communications*, 2012, 3(1):632.
- [43] FAHRBACH F O, GURCHENKOV V, ALESSANDRI K, et al. Self-reconstructing sectioned Bessel beams offer submicron optical sectioning for large fields of view in light-sheet microscopy[J]. *Optics Express*, 2013, 21(9):11425-11440.
- [44] SHIN Y, KIM D, KWON H. Oblique scanning 2-photon light-sheet fluorescence microscopy for rapid volumetric imaging [J]. *Journal of Biophotonics*, 2018, 11(5):e201700270.
- [45] COLLIER B B, AWASTHI S, LIEU D K, et al. Non-linear optical flow cytometry using a scanned, Bessel beam light-sheet[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:10751.
- [46] DOMENICO G D, RUOCCO G, COLOSI C, et al. Cancellation of Bessel beam side lobes for high-contrast light sheet microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8:17178.
- [47] GOHN-KREUZ C, ROHRBACH A. Light-sheet generation in inhomogeneous media using self-reconstructing beams and the STED-principle[J]. *Optics Express*, 2016, 24(6):5855-5865.
- [48] DENG Suhui, XIAO Yiping, HU Jie, et al. Sidelobe suppression in light-sheet fluorescence microscopy with Bessel beam plane illumination using subtractive imaging[J]. *Chinese Optics Letters*, 2018, 16(11): 111801.
- [49] DENG Suhui, WANG Peng, ZHANG Yulong, et al. Subtraction method via phase mask enables contrast enhancement in scanned Bessel light-sheet microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2020, 37(1):84-88.
- [50] BAI Chen, LIU Chao, JIA Hao, et al. Compressed blind deconvolution and denoising for complementary beam subtraction light-sheet fluorescence microscopy[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2019, 66(10):2979-2989.
- [51] BAI Chen, LIU Chao, YU Xianghua, et al. Imaging enhancement of light-sheet fluorescence microscopy via deep learning [J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 2019, 31(22):1803-1806.
- [52] KASHEKODI A B, MEINERT T, MICHELS R, et al. Miniature scanning light-sheet illumination implemented in a conventional microscope[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(9):4263-4274.
- [53] DEAN K M, ROUDOT P, WELF E S, et al. Deconvolution-free subcellular imaging with axially swept light sheet microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2015, 108:2807-2815.
- [54] DENG Suhui, LI Xianhong, DING Zijun, et al. Axial resolution and contrast enhancement in digital scanned light-sheet microscopy via stimulated emission depletion[J]. *Journal of Optics*, 2020, 22(10):105301.
- [55] FAHRBACH F O, GURCHENKOV V, ALESSANDRI K, et al. Light-sheet microscopy in thick media using scanned Bessel beams and two-photon fluorescence excitation[J]. *Optics Express*, 2013, 21(11):13824-13839.
- [56] FAN Y, CHEN M K, QIU M, et al. Experimental demonstration of genetic algorithm based metalens design for generating side-lobe-suppressed, large depth-of-focus light sheet[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2021, 16:2100425.
- [57] HEUKE S, LEGESSE F B, AKIMOV D, et al. Bessel beam coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy [J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2015, 32(9):1773-1779.
- [58] HEUKE S, ZHENG J, AKIMOV D, et al. Bessel beam CARS of axially structured samples [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:10991.

- [59] MASIA F, POPE I, WATSON P, et al. Bessel-beam hyperspectral CARS microscopy with sparse sampling: enabling high-content high-throughput label-free quantitative chemical imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90: 3775-3785.
- [60] CHEN Xueli, ZHANG Ci, LIN Peng, et al. Volumetric chemical imaging by stimulated Raman projection microscopy and tomography[J]. *Nature Communications*, 2017, 8:15117.
- [61] CHEN Xueli, ZHU Shouping, WANG Huiyuan, et al. Accelerated stimulated Raman projection tomography by sparse reconstruction from sparse-view data[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2020, 67(5):1293-1302.
- [62] WANG Huiyuan, WANG Nan, XIE Hui, et al. Two-stage deep learning network-based few-view image reconstruction for parallel-beam projection tomography[J]. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2022, 12(4):2535-2551.
- [63] CHEN Xueli, WANG Xinyu, WANG Lin, et al. Stimulated Raman scattering signal generation in a scattering medium using self-reconstructing Bessel beams[J]. *Photonics Research*, 2020, 8(6):929-939.
- [64] WANG Xinyu, WANG Lin, LIN Peng, et al. Simulation of stimulated Raman scattering signal generation in scattering tissues excited by Bessel beams[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2021, 14(3):2150008.
- [65] WANG Nang, REN Fen, LI Li, et al. Quantitative chemical sensing of drugs in scattering media with Bessel beam Raman spectroscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(4):2488-2502.
- [66] GONG L, LIN S, HUANG Z J L, et al. Stimulated Raman scattering tomography enables label-free volumetric deep tissue imaging[J]. *Laser & Photonics Review*, 2021, 15:2100069.
- [67] YI Luming, SUN Liqun, MING Xianshun. Simulation of penetration depth of Bessel beams for multifocal optical coherence tomography[J]. *Applied Optics*, 2018, 57(17):4809-4814.
- [68] CURATOLO A, MUNRO P, LORENSER D, et al. Quantifying the influence of Bessel beams on image quality in optical coherence tomography[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:23483.
- [69] YANG Q, MIAO Y, HUO T, et al. Deep imaging in highly scattering media by combining reflection matrix measurement with Bessel-like beam based optical coherence tomography[J]. *Applied Physics Letters*, 2018, 113(1):011106.
- [70] CHEN Y, TRINH L A, FINGLER J, et al. 3D in vivo imaging with extended-focus optical coherence microscopy [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(11): 1411-1420.
- [71] FANG Q, CURATOLO A, WIJESINGHE P, et al. Ultrahigh-resolution optical coherence elastography through a micro-endoscope: towards in vivo imaging of cellular-scale mechanics[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(11):5127-5138.
- [72] SHI J, WANG L, NOORDAM C, et al. Bessel-beam Grueneisen relaxation photoacoustic microscopy with extended depth of field. [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(11): 116002.
- [73] JIANG Bowen, YANG Xiaoquan, LUO Qingming. Reflection-mode Bessel-beam photoacoustic microscopy for in vivo imaging of cerebral capillaries[J]. *Optics Express*, 2016, 24(18): 24167-20176.
- [74] VUILLEMIN N, MAHOU P, DÉBARRE D, et al. Efficient second-harmonic imaging of collagen in histological slides using Bessel beam excitation[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 29863.
- [75] OLIVIER N, DÉBARRE D, MAHOU P, et al. Third-harmonic generation microscopy with Bessel beams: a numerical study[J]. *Optics Express*, 2012, 20(22): 24886-24902.
- [76] XU D, ZHOU W, PENG L J B O E. Cellular resolution multiplexed FLIM tomography with dual-color Bessel beam[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(2): 570-578.
- [77] FONTAINE Q, HU H, PIGEON S, et al. Attenuation-free non-diffracting Bessel beams[J]. *Optics Express*, 2019, 27(21): 30067-30080.

Harnessing the Power of Bessel Beam for Biomedical Microscopy (Invited)

CHEN Xueli, WANG Xinyu, YAN Tianyu, ZENG Qi, XU Xinyi, XIE Hui
(*Xi'an Key Laboratory of Intelligent Sensing and Regulation of Trans-Scale Life Information, School of Life Science and Technology, Xidian University, Xi'an 710126, China*)

Abstract: Since Durnin introduced “diffraction-free beams” into the field of optics in 1987, diffraction-free beams have been studied in depth both theoretically and experimentally. Diffraction-free beams include a series of special beams, the most common of which are the Bessel and Airy beams. Diffraction-free beams do not diffract or diffuse during transmission and can maintain their tight focus characteristics over long distances. In addition, the diffraction-free beam has the self-reconstructing property, which means that it can re-form the diffraction-free beam after encountering the obstacles such as scattered particles.

Diffraction-free beams have a wide range of applications in imaging, micromanipulation, and nonlinear optics.

As a typical non-diffractive beam, Bessel beam has non-diffractive and self-reconstructing properties that provide longer focal length and a certain degree of anti-scattering capability, which are gaining more and more applications in the field of biomedical optical microscopy technology. These two properties of Bessel beams provide advantages that Gaussian beams cannot match. The non-diffraction property can obtain a larger depth of field for imaging, which is widely used in high-speed multiphoton fluorescence microscopy, three-dimensional (3D) multiphoton microscopy, two-dimensional projection imaging of 3D volumetric samples, and large-scale light sheet fluorescence microscopy. The self-reconstructing property meets the needs of various imaging tools to increase the imaging depth in complex scattering media. This paper focuses on the application of Bessel beams in biomedical optical microscopy, including the use of its extended depth-of-field capability for fast 3D imaging of volumetric samples, the use of its anti-scattering particle interference capability for large depth imaging of scattered samples, and the use of finer focused beam capability for higher resolution optical microscopy.

This paper firstly outlines the concept and characteristics of Bessel beams, as well as the commonly used laboratory generation methods, including the generation using a ring slit, using an axicon, and using a spatial light modulator, etc. The authors then summarize the applications of the Bessel beams in biomedical optical microscopy techniques in recent years, focusing on their applications in the fields of multiphoton fluorescence microscopy, light-sheet fluorescence microimaging, Raman microimaging, and other techniques. The authors summarize the advantages of Bessel beams, including extended depth-of-field imaging based on diffraction-free properties, large-depth imaging based on self-reconfiguration properties, and high-resolution imaging based on finer-focused beams, and also analyze the solutions to eliminate the interference problems caused by side rings of the Bessel beam. In addition, the authors also briefly describe the exploration and application of Bessel beams in other imaging modalities, including the technical areas of optical coherent tomography, optical coherent elastography, photoacoustic imaging, second harmonic imaging, third harmonic imaging, and Fourier multiplexed fluorescence lifetime tomographic imaging. The article concludes with an analysis and discussion of the problems encountered in the application of Bessel beams in biomedical optical microscopy and the prospects for development.

Key words: Bessel beam; Biomedicine; Multiphoton fluorescence microscopy; Light-sheet fluorescence microscopy; Raman microscopy

OCIS Codes: 120.3890; 140.3300; 170.2945