

光电工程

Opto-Electronic Engineering

中文核心期刊 中国科技核心期刊
Scopus CSCD

光片荧光显微镜研究进展

张子建, 徐欣, 王吉祥, 叶虹, 张欣, 史国华

引用本文:

张子建, 徐欣, 王吉祥, 等. 光片荧光显微镜研究进展[J]. *光电工程*, 2023, **50**(5): 220045.

Zhang Z J, Xu X, Wang J X, et al. Review of the development of light sheet fluorescence microscopy[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, **50**(5): 220045.

<https://doi.org/10.12086/oe.2023.220045>

收稿日期: 2022-04-11; 修改日期: 2022-09-23; 录用日期: 2022-10-13

相关论文

光学相干层析技术在眼科手术导航方面的研究进展

李云耀, 樊金宇, 蒋天亮, 唐宁, 史国华

光电工程 2023, **50**(1): 220027 doi: [10.12086/oe.2023.220027](https://doi.org/10.12086/oe.2023.220027)

SS-OCTA对黑色素瘤皮肤结构和血管的成像实验

刘敬璇, 樊金宇, 汪权, 史国华

光电工程 2020, **47**(2): 190239 doi: [10.12086/oe.2020.190239](https://doi.org/10.12086/oe.2020.190239)

基于自适应融合和显微成像的乳腺肿瘤分级网络

黄盼, 何鹏, 杨兴, 罗家洋, 肖华亮, 田素坤, 冯鹏

光电工程 2023, **50**(1): 220158 doi: [10.12086/oe.2023.220158](https://doi.org/10.12086/oe.2023.220158)

采用注意力机制的显微图像智能检测方法

郝如茜, 王祥舟, 张静, 刘娟秀, 杜晓辉, 刘霖

光电工程 2022, **49**(3): 210361 doi: [10.12086/oe.2022.210361](https://doi.org/10.12086/oe.2022.210361)

更多相关论文见光电期刊集群网站 

 | 光电工程
Opto-Electronic Engineering

<http://cn.ojournal.org/oe>



 OE_Journal



Website

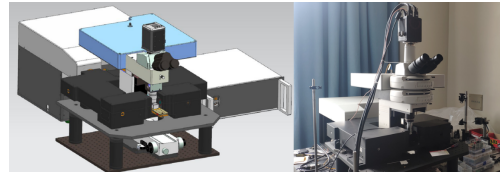
DOI: 10.12086/oe.2023.220045

光片荧光显微镜研究进展

张子建^{1,2}, 徐欣^{1,2}, 王吉祥^{1,2},
叶虹², 张欣², 史国华^{2*}

¹中国科学技术大学生物医学工程学院, 安徽合肥 230026;

²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: 传统落射式荧光显微镜的探测光路和照明光路处于同轴位置, 成像质量会受到非焦平面荧光的影响。光片荧光显微镜 (Light sheet fluorescence microscopy, LSFM) 区别于传统的荧光显微镜, 它的探测光路和照明光路呈直角排布, 照明光为一个薄片, 成像时只有光片区域的样本被照亮, 这种照明方式能够有效降低非焦平面荧光激发。同时, 激光每次只照亮一个平面, 能够有效降低样本的照射时间, 由此降低光毒性和光漂白性的影响。本文首先介绍了光片荧光显微镜的基本光路组成结构, 以及在这些结构基础上进行的优化创新; 之后介绍了针对离体样本和活体样本发展出的多种解决方案。得益于这些创新, 光片荧光显微镜能够在较长时间范围内对荧光标记的生物样本进行 3D 成像。最后提出了光片荧光显微镜发展的潜在方向以及局限性, 希望能给研究人员提供更为系统的光片荧光显微镜方面的知识以及一些有益的参考。

关键词: 光片荧光显微镜; 层切能力; 光路结构; 样品处理

中图分类号: TN247

文献标志码: A

张子建, 徐欣, 王吉祥, 等. 光片荧光显微镜研究进展 [J]. 光电工程, 2023, 50(5): 220045

Zhang Z J, Xu X, Wang J X, et al. Review of the development of light sheet fluorescence microscopy[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, 50(5): 220045

Review of the development of light sheet fluorescence microscopy

Zhang Zijian^{1,2}, Xu Xin^{1,2}, Wang Jixiang^{1,2}, Ye Hong², Zhang Xin², Shi Guohua^{2*}

¹Department of Biomedical Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

²Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract: In a traditional epi-illumination fluorescence microscope, the detection path is coaxial with the illumination path, which induces the non-focal plane fluorescence and deteriorates the imaging quality. Light sheet fluorescence microscopy (LSFM), differing from the traditional fluorescence microscopes, adopts an orthogonal configuration of detection and illumination paths. A thin sheet is formed from the excitation beam, which only excites a single layer of the sample. This methodology prevents the excited fluorescence from the non-focal plane during imaging. Besides, the utilization of the laminar illumination light can significantly reduce the exposure time of the fluorescence imaging. As a result, the effects of photobleaching and phototoxicity are decreased. In this review, we

收稿日期: 2022-04-11; 修回日期: 2022-09-23; 录用日期: 2022-10-13

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB32030205); 中国科学院科研仪器设备研制项目 (YJKYYQ20210029)

*通信作者: 史国华, ghshi_lab@sibet.ac.cn。

版权所有©2023 中国科学院光电技术研究所

first introduce the basic light path structure compositions of a LSFM system as well as the optimization and innovation based on these structures. Next, we discuss enormous processing methods developed for samples both in vitro and in vivo. Benefiting from all these innovations, LSFM outstands in performing the 3D imaging of the fluorescence-labeled biological samples and can function steadily for a long recording time. Finally, we propose potential researching directions in the future, and discuss the technical limitations of current LSFM. This review aims to provide researchers in the relevant scientific research fields with a comprehensive understanding and inspiring reference of LSFM techniques.

Keywords: light sheet fluorescence microscopy; sectioning ability; optical structures; sample processing

1 引言

最早的显微镜发明要追溯到十七世纪晚期, 荷兰商人列文虎克用自己磨制的镜片观察微生物, 打开了人们观察微观生物世界的大门。从此, 人类开始在显微镜研究的路上越走越远。目前常采用荧光显微成像技术观察生物样本, 该技术可以对特定的核糖体、蛋白质以及细胞进行荧光标记, 观察它们在生物组织中的位置和作用。荧光显微镜有两个巨大的优势: 其一, 荧光的激发波长和发射波长在不同波段上, 能够利用滤光片将两个波段的光分开, 从而显著提高图像对比度。其二, 能够特异性标记目标基因或蛋白, 使得追踪单个分子成为可能, 并使之能够应用于活体成像。

光片荧光显微镜的探测端和照明端不共用一个物镜, 照明端物镜负责将光束汇聚成薄片光束, 光片覆盖区域的荧光分子会被照明并发射荧光。探测端物镜负责收集样品发出的荧光信号, 最终由相机记录下来上传电脑。

传统的落射式荧光显微镜^[1]探测光路和照明光路处于同轴位置, 成像质量会受到非焦平面荧光的影响。与之相比, 光片这种照明方式能够有效降低非焦平面的荧光激发, 降低荧光分子的曝光时间, 从而降低光毒性和光漂白性的影响。共聚焦荧光显微镜^[1]和双光子荧光显微镜^[2]都具有层切能力, 它们基于传统落射式光路进行设计, 每次照明一个点。共聚焦荧光显微镜在点探测器前有一个与样本焦平面共轭的小孔, 可以阻挡焦平面外激发的荧光信号。双光子荧光显微镜只有在焦平面处才会由于光能量密度大而发生光学非线性效应, 从而激发荧光。而光片荧光显微镜的照明物镜可以在与深度垂直的方向进行照明, 每次照明一个面, 是从横向进行照明并具备层切能力的荧光显微镜。同时, 面探测在成像速度上比点探测更快, 更适用于观察活动的样本。

光片荧光显微镜的特征之一是照明光路和探测光路分开进行, 这种光路设计最早起源于 1902 年。Siedentopf 等人^[3]将两个物镜呈直角摆放, 以阳光作为照明光横向照明溶液中的胶体颗粒, 用眼睛配合垂直物镜进行观察。这种照明方式能够优化目视效果, 增强图像对比度。但是该方法只适合观察透明的生物组织样本, 受限于当时的技术条件, 长时间没有实质性进展, 直到 1993 年 Voie 等人^[4]研制了一种垂直平面荧光光学层切 (orthogonal plane fluorescence optical sectioning, OPFOS) 成像技术应用光学系统。该系统以激光器为光源, 用柱透镜产生光片照明豚鼠耳蜗, 用垂直于照明光方向的物镜收集荧光信号, 得到了视场 1.5 mm, 横向分辨率 10 μm , 纵向分辨率 26 μm 的光学图像。此时样本透明化的工作已经开始发展, 豚鼠耳蜗经过特殊处理, 通过加入多种有机物来匹配折射率, 达到样本透明的效果, 这是首次将光片光路应用于荧光成像。

之后随着科学技术不断进步, 光片荧光成像技术飞速发展, 并且在各个研究领域中大展身手。基于此, 本文从光片荧光显微镜技术路线角度入手, 着重介绍光片荧光显微镜的经典光路结构, 以及在提高分辨率、提升视场均匀性和提升通量方面做出的技术革新。同时, 还介绍了光片荧光显微镜常用的染色方式、样品处理手段革新以及区别于普通显微镜的样品台设计, 旨在帮助研究人员快速了解光片荧光显微镜的基本结构组成并能够在此基础上有所创新。

2 光片荧光显微镜的基本结构与创新

光片荧光显微镜最典型特点是探测光路与照明光路分两路进行。照明光路负责用激光产生光片, 照亮样品。探测光路负责收集样品产生的荧光信号。如图 1(c) 所示, 照明光沿 x 轴进入样品, x 轴与 y 轴组成的平面即为光片平面, 该平面的分辨率为横向分辨

率。横向分辨率公式^[5]为

$$\Delta r = \frac{\lambda_{em}}{2 \times NA_{det}}, \quad (1)$$

其中: NA_{det} 为探测物镜的数值孔径, λ_{em} 为荧光信号波长。横向分辨率只与探测物镜的数值孔径和激发的荧光波长有关。 z 轴为深度方向, 该方向的分辨率为轴向分辨率。轴向分辨率则和光片的厚度有直接关系, 通常所用的光束类型为高斯光束, 因此高斯光束的光腰半径直接影响光片的轴向分辨率, 光腰半径公式^[5]为

$$\omega_0 \cong 0.85 \cdot \frac{\lambda_{exc}}{2 \times NA_{ill}}, \quad (2)$$

其中: λ_{exc} 为激发光波长, NA_{ill} 为照明物镜的数值孔径。远离光腰处, 光束半径增加, 光片的层切能力变差, 光束半径公式^[5]为

$$\omega(x) = \omega_0 \cdot \sqrt{1 + \left(\frac{x}{x_R}\right)^2}, \quad (3)$$

其中: x_R 为瑞利长度, 公式^[5]为

$$x_R = \frac{n \times \pi \times \omega_0^2}{\lambda_{exc}}, \quad (4)$$

其中: λ_{exc} 为激发光波长, n 为介质折射率。

照明光路负责产生光片照亮样品, 主要有两种产生方式。一种是用柱透镜将圆形高斯光束变为矩形高斯光片^[6], 再经过照明物镜将矩形光束汇聚在焦平面上, 这种方式结构更简单, 但是分辨率仍然会被限制。另一种是用振镜将光束扫描成片状光束^[7], 这种方式

本质上是线状光束的多次扫描, 可以对光束进行相位调整, 变换出无衍射光如艾里光^[8]、贝塞尔光^[9]以及晶格光片^[10]等。

探测光路由探测物镜、滤光片和相机构成。探测物镜通常选择数值孔径大的干镜或者浸水物镜, 用于收集样品照明后产生的荧光信号。滤光片负责滤除照明光, 只让荧光信号通过。相机负责将荧光信号变为图像并上传电脑。光片显微镜每次产生一个切面的图像信息, 接着样品或光片沿着 z 轴移动, 获得一组二维平面图像, 记录不同深度位置的图像。最后还需要对图像进行后期处理, 使图片还原成 3D 信息。

至此, 基本的光片荧光显微镜公式和组成介绍完毕, 后文将着重介绍其光束优化整形及光路结构方面的技术革新。

2.1 经典光片光路

2004 年 Huisken 等人^[6]报道了层状光选择照明显微镜 (selective plane illumination microscopy, SPIM), 如图 1(a) 所示。该显微镜的光片由柱透镜产生, 生物样品包埋在琼脂糖凝胶中, 被固定在四轴位移台上 (xyz 三维位移和一个旋转位移), 能够从多个角度记录样品信息, 最后再通过算法将每个角度成像效果好的部分组合在一起, 组成一个切面的图像。该文章明确提出了光片显微镜在生物发育学领域的优势, 即具有光漂白性和光毒性低的特点, 能够对生物样本进行长时间观察, 并使用活体生物样本做出了完整论证。同时, 该光片显微镜也是第一个达到衍射极限的光片

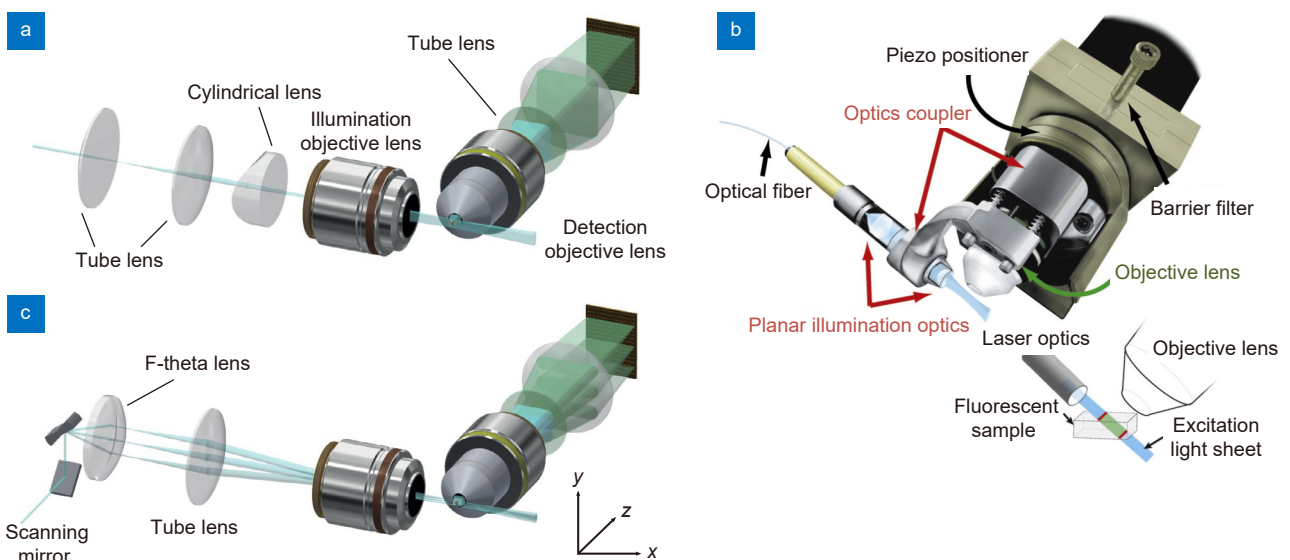


图 1 经典光片光路。(a) SPIM 装置^[6]; (b) OCPI 示意图^[11]; (c) DSLM 装置^[5]

Fig. 1 Classical LSFM path. (a) SPIM implementation^[6]; (b) OCPI microscope schematic^[11]; (c) DSLM implementation^[5]

显微镜, 掀起了光片显微镜研究的热潮。

2008年 Holekamp 等人^[11]提出了物镜耦合平面照明显微镜 (objective-coupled planar illumination microscopy, OCPI Microscopy), 如图 1(b) 所示。在该光学系统中, 样品保持静止, 而探测光路和照明光路固定在一起, 这使得物镜焦平面始终与照明面对齐。扫描时使用压电定位器 (piezoelectric positioner) 移动整个光路系统, 导致整个移动部位承重大, 成像速度慢, 该系统在 2 s 只能获得 40~50 帧图像。

OCPI 与 SPIM 原理上类似, 不同之处在于 OCPI 使用单模光纤接入光源, 通过小型柱透镜产生光片, 用定制器件将照明部分与探测物镜耦合在一起, 平移整个光学器件进行扫描。探测物镜与样本之间有 $30^\circ\sim 45^\circ$ 倾斜, 方便观察水平样本, 能够在高速扫描下不接触样本。SPIM 使用物镜生成光片, 通过平移旋转样品进行扫描, 对样品的体积要求更小, 适合观察垂直放置的样品, 高速扫描时受样品惯性限制。样品的放置规则本质上都是减少照明光和探测光在样品中的传播距离, 从而最大化减少在生物样品内部的散射光。

2008年 Keller 等人^[7]提出了数字激光扫描光片显微镜 (digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy, DSLM), 如图 1(c) 所示。其创造性使用振镜扫描高斯光束, 用 $f-\theta$ 透镜作为扫描透镜的方式产生光片。当平行光入射常规透镜时, 焦点像高 $y=\tan\theta$, 理想像高和扫描角度不是线性关系, 振镜以等角度扫描时在焦平面上产生的位移不是等距的。 $f-\theta$ 透镜的像高与扫描角度呈线性关系, 适用于扫描系统。文章对斑马鱼胚胎进行了 24 h 的持续观察, 得到了横向分辨率 300 nm, 纵向分辨率 1000 nm 的光学图像。与 SPIM 相比, DSLM 能够以相同的光强照明整个样本, 成像质量更好。同时, 由于 DSLM 使用一束激光进行扫描照明, 光能利用率更高, 并且允许进行强度调制和光束整形。

2.2 光束优化整形

前文提及, 轴向分辨率的提升与光片厚度有直接关系。由式 (4) 可知, 高斯光束腰斑半径越小, 轴向分辨率越好, 但是瑞利长度 x_R 会随之变短, 有效照明距离变短, 有效照明大小和视场之间相互制衡。同时, 由于高斯光束是一种衍射光, 在聚焦时由于衍射特性, 瑞利长度 x_R 会缩短。因此, 更换照明光束类型, 采用无衍射光照明就成了减少光片厚度的主要方式

之一。

贝塞尔光 (Bessel beam) 是一种非衍射光, 传播时理论上光强分布保持不变, 适合用在光片荧光显微镜中^[12]。Planchon 等人^[9]使用环形掩膜版 (annular apodization mask, AM) 在样品焦平面的共轭面处产生贝塞尔光束进行扫描成像, 光路如图 2 所示, 得到了厚度小于 $0.5\ \mu\text{m}$ 的光片。系统用压电圈 (piezoelectric collar) 移动物镜, 收集焦平面上的光。

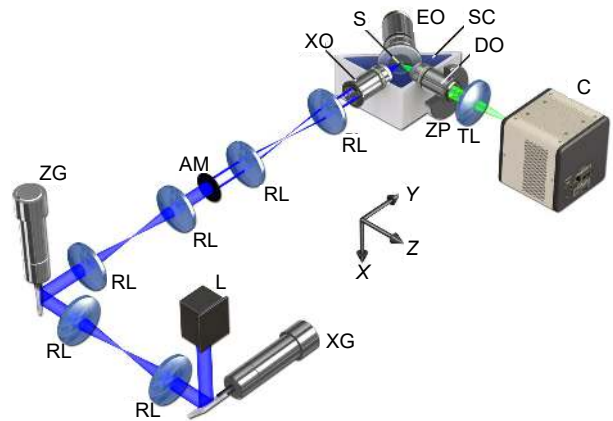


图 2 贝塞尔光束平面照明显微镜的简图^[9]

Fig. 2 Simplified schematic of the Bessel beam plane illumination microscope^[9]

但是贝塞尔光的旁瓣会产生背景噪声导致成像对比度下降, 同时也会产生更高的光毒性和光漂白性, 使用艾里光束和晶格光片都能一定程度上改善这种情况。艾里光束^[8] (airy beam) 具有特征性不对称模式 (characteristic asymmetric excitation pattern), 光学轨迹呈现弯曲形态, 拥有相对较弱的旁瓣, 使用反卷积处理后能够得到高分辨图像, 相比于贝塞尔光束, 它能提供更宽的视场和更清晰的图像对比度。Vettenburg 等人^[8] 用空间光调制器 (spatial light modulator, SLM) 生成艾里光束, 得到了在视场中心 $100\ \mu\text{m}$ 距离内保持厚度小于 $1.5\ \mu\text{m}$ 的光片。晶格光片 (lattice light sheet) 由多束贝塞尔光干涉产生, 能够有效降低旁瓣效应, 得到光毒性和光漂白性更低的光片。Chen 等人^[10] 使用空间光调制器输入二元相位图案, 经过环形掩膜版后, 使多束贝塞尔光干涉, 得到晶格光片, 光路如图 3 所示。该光片系统能够从每个样本中获得数十万个原始 2D 图像, 这比单使用线性贝塞尔光获得的原始图像多一个数量级。

实验中想要更换光束类型往往需要重新调整光路。Chang 等人使用场合合成^[13] (field synthesis) 的方式可以

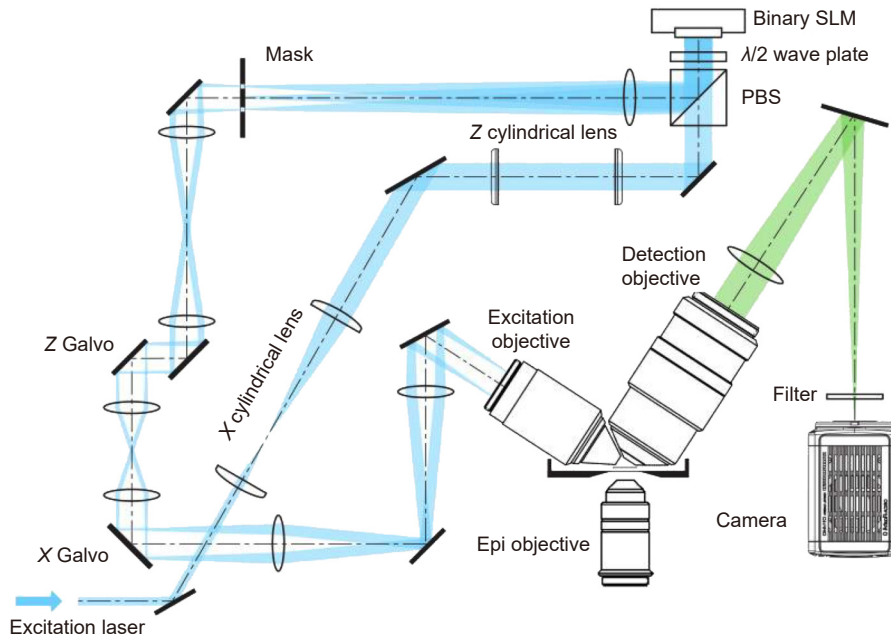


图 3 晶格光片显微镜光路示意图^[10]

Fig. 3 Schematic of the lattice light sheet microscopy optical path^[10]

产生任何扫描类型的光片, 光路如图 4 所示。其本质上是在不同类型光片的傅里叶域内进行平均线扫描, 能够极大简化光路设计结构, 且拥有不输于传统方式生成光片的照明效果。但是光片由一系列原点处为最大值的余弦组成, 整个视场将会被一次性照亮, 因此无法与虚拟共焦线检测^[14](virtual confocal line detection) 方式相结合。

除了改变光束类型, 还可以在光波段上进行创新。Truong 等人^[2] 提出双光子扫描光片显微镜, 利用近红外光的非线性特性实现高穿透深度的样本扫描成像。由于只有在光束密集的地方才能激发荧光, 变相减少了光片厚度, 在提升轴向分辨率的同时, 大大减少了散射光的影响, 提升了成像对比度。并且这种技术手段可以与上述光束类型进行一起使用, 如双光子艾里

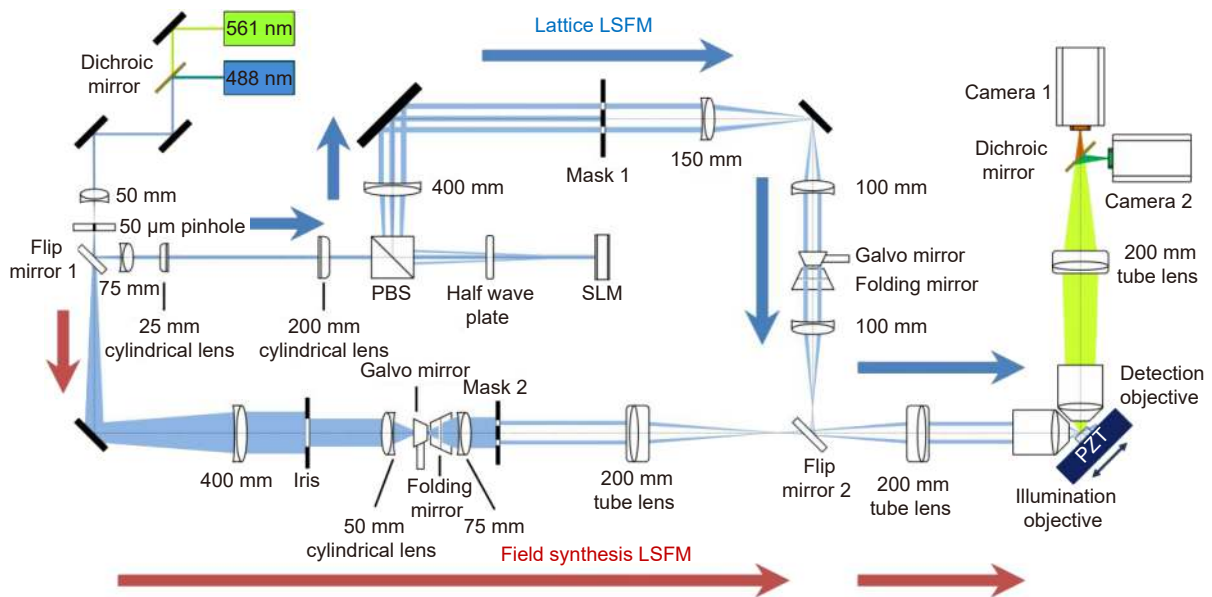


图 4 场合成光片激发光路示意图^[13]

Fig. 4 Schematic drawing of light-sheet generation optical path with field synthesis^[13]

光显微镜^[15]等。

2.3 光路设计创新

实验中为了达到一些特殊的目的, 通常需要对光路结构进行创新, 例如得到更均匀照明效果, 看到更大的成像面积, 在一定程度上解除对样本的限制, 增加相机端的成像速度等。本节将对近年来一些在光路设计上的创新进行归纳总结, 需要注意的是, 上一节的光束类型同样可以运用到这些新的结构中。

光片进入样品后会发生的散射和吸收现象, 照明会出现不均匀性, 影响成像质量。Huisken 等人^[6]通过样品平移台将样品进行水平旋转, 从多个角度照射样品, 之后用算法将多个图像照明效果好的部分拼接在一起重建图像信息, 得到了视场均匀性较好的图像。但是这种一侧照明的方式会产生伪影, 使图像合成变得困难, 同时影响成像速度。Huisken 等人^[6]用分光镜 (flip mirror, FM) 将一束光分为两束, 从相对的方向照射样品, 无需旋转样品, 得到了更好的成像效果和更快的成像速率。Krzic^[17] 和 Tomer^[18] 等人用两个物镜生成两束照明光, 同时用两个物镜探测样品荧光, 能够在不旋转样品的情况下得到样本图像, 加快了图像获取速度。

各种光束产生的光片都有其工作距离, 当样本体积变大时, 就无法一次照亮一个平面, 即照明视场不够, 视野和照明光穿透深度不够。平铺光片层状光照明显微镜^[19-20] (Tiling light-sheet selective plane illumination microscopy, TLS-SPIM) 每次只照亮一小块位置, 通过 SLM 改变聚焦点的位置将小光片平铺到图像平面多个位置, 并在每个位置拍摄一张图像, 之后将所有图像拼接为一整张图像, 原理如图 5 所示。

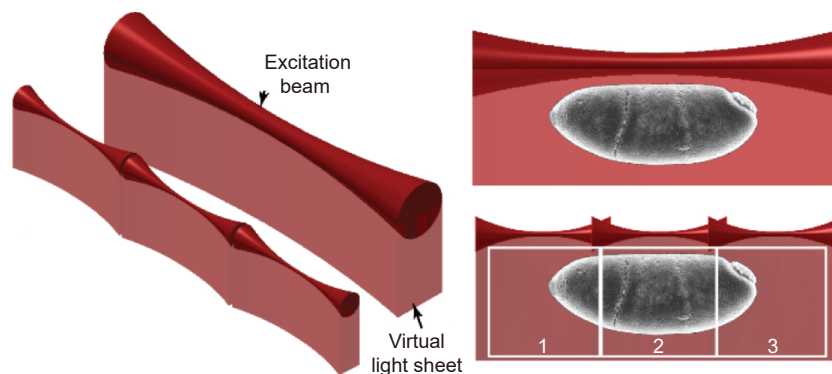


图 5 TLS-SPIM 工作原理^[20]

Fig. 5 Working principle of the TLS-SPIM^[20]

Wang 等人^[21]使用 SLM 产生需要的激发光束, 在一张 SLM 中叠加四张相位图, 能够调制出含有四段同轴小光片的照明光, 大大缩短平铺整个平面需要的时间。Zong 等人^[22]在光路中加入了声梯度折射率镜 (tunable acoustic gradient, TAG), 能够通过持续变焦实现快速扫描效果。但是这种方法产生的光片照度并不均匀, 需要通过其他手段实时调整照明功率。Dean 等人^[23]提出了轴向扫描光片显微镜 (axially swept light sheet microscopy, ASLM), 在光路中多加入一个物镜和压电反射镜片改变照明光光程, 以实现变焦效果, 这种照明方案能在 x 与 y 方向提供高度均匀的照明。本质上说, 这些方案都是通过改变光片焦点的方式拓展轴向穿透深度, 在实现方式上有所不同。

光片显微镜优势在于能够观察体块形样本, 一些需要高横向分辨率的场景, 会使用数值孔径更高的探测物镜, 但是这类物镜工作距离短, 同时镜片结构更复杂, 体积更大。一些场景同时需要高的轴向分辨率, 则照明物镜也需要高数值孔径, 传统的两物镜对角设计会对样本产生限制。Bouchard 等人^[24]提出了一种扫描共聚焦平面激发 (swept confocally-aligned planar excitation, SCAPE) 显微镜进行活体成像。该系统用同一个物镜激发和收集荧光信号, 使用多边形扫描仪缓慢旋转, 同时对照明光和荧光信号进行扫描, 光路如图 6 所示。其单透镜结构设计能够解除样本空间限制, 同时扫描光片与相机共轭, 解决探测焦平面与光片位置同步问题。但是正置显微镜不方便进行样本更换, Strnad 等人^[25]研制了一种倒置光片显微镜, 照明端和探测端物镜都浸没在水中。样品通过重力作用放置在特制的样品台上, 样品台下方是折射率与水接近的塑料。这种设计结构能够将样品完全与浸没介质隔

离, 可以将多个胚胎连续放置进行成像, 适用于生物发育学研究。

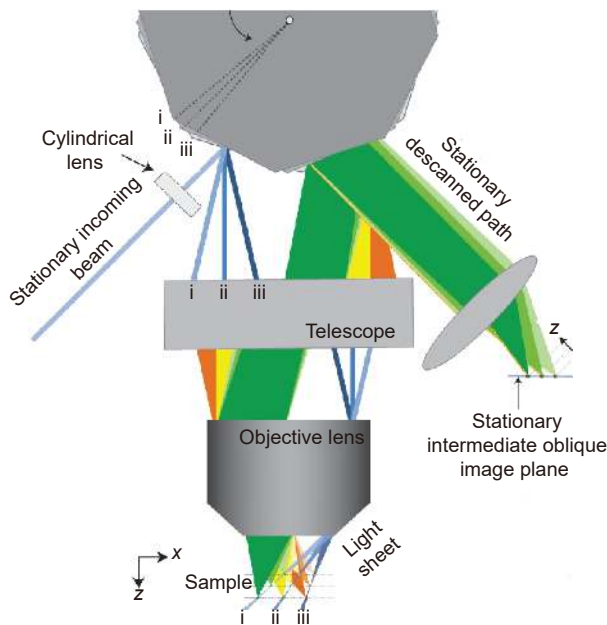


图 6 扫描共聚焦平面激发显微镜^[24]

Fig. 6 Schematic of the swept confocally-aligned planar excitation microscopy^[24]

随着成像速度变快, 样品体积的变大, 相机成像速度成为制约图像获取的瓶颈, 单一的科研相机不能满足数成像需求。Greer 等人^[26]提出分布式平面成像 (distributed planar imaging, DPI) 技术, 在 OCPI 显微镜架构基础上在成像端做出改进, 使用刀锋直角反射镜 (knife-edged mirror, KEM) 将图像信息用两个相机进行接收, 最后将图像合成为完整的图片, 能够显著提升成像速度。Fan 等人^[27]提出平面-弯曲-平面 (flat-curved-flat) 成像策略, 首先将样本平面放大到一个球形表面上, 接着用 5×7 个 sCOMS 相机无缝结

合, 35 个相机同时工作, 配合高速算法实时拼接图像, 能够实现每秒 51 亿像素的输出。

3 光片荧光显微镜特殊的样本处理

光片荧光显微镜由于其特殊的成像方式和构造, 能够对体块类型的样本进行三维成像。这类样本通常需要进行荧光染色, 如对生物体进行基因编辑或者对样本块进行染料染色处理。处理后的样本在特定波长光束照射时会产生荧光。自绿色荧光蛋白^[28]被发现后, 经过多年的发展, 荧光蛋白和荧光染料的波长遍布紫外光、可见光和近红外光, 可以根据实际情况进行选择。除了荧光标记以外, 对离体样本通常要进行透明化处理, 以获得更好的成像效果, 对活体样本则要注意样品室的构建, 以延长其存活时间。

3.1 染色方式

光片荧光显微镜能够探测样本体内荧光团的分布, 目前已经有数百种不同种类的荧光团和不同光谱特性的染料可供选择。传统的荧光产生方式主要有荧光染料和免疫染色技术。

荧光染料主要有荧光素 (fluorescein) 和罗丹明 (rhodamine) 等, 主要用于离体样本或生物组织切片的成像。这类化学基团可以被苯甲基鸟嘌呤 (benzylguanine, BG) 携带, 而后与标签蛋白如 SNAP-tags^[29]、HaloTags^[30] 等通过共价键进行连接, 从而特异性标记样本, HaloTag 模型如图 7 所示。这种荧光标记方式的优势在于体内外部都可以进行标记。

对于活体成像, 一般选用免疫染色技术, 几乎不会对活体样本产生影响, 通常对生物样本进行转基因或基因注射 mRNA 表达荧光蛋白。

实验要求荧光蛋白明亮且稳定^[31], 而蛋白质亮度

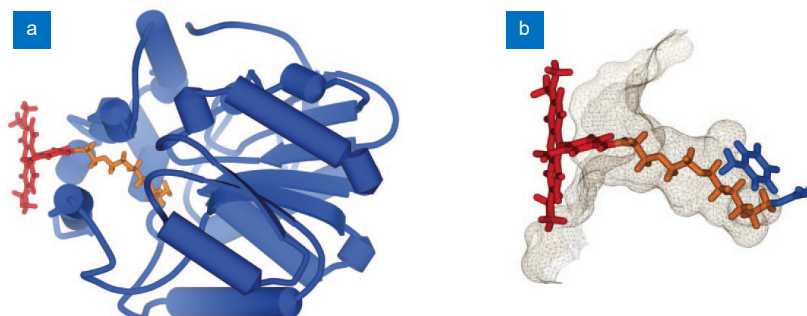


图 7 蛋白模型^[30]。(a) HaloTag 蛋白模型; (b) 配体隧道

Fig. 7 Protein model^[30]. (a) The HaloTag protein; (b) The ligand tunnel

由蛋白质本身的特性如成熟速度、量子效率等, 光学系统设置如照明滤光片、探测滤光片的选择以及相机或人眼对发光谱的敏感性三个方面共同决定。对哺乳动物活体成像来说, 需要蛋白质在 37 °C 的温度下进行折叠表达, 常见的如水母衍生荧光蛋白 (aequorea-derived fluorescent proteins, AFPs) 以及珊瑚虫类蛋白^[32], 对于一些不适合在该温度下表达的蛋白也可以对蛋白进行改造^[33], 使其适合于活体成像。此外还有其他基因编辑的指示剂, 如钙离子荧光指示剂^[34] (fluorescent calcium sensors), 其亮度与钙离子浓度有关, 能够提供与生物活动成比例的荧光信号, 从而实现功能性成像。

蛋白质染色也可以用于离体样本, 但是通常依赖于缓慢扩散, 需要较长时间。Kim 等人^[35]提出随机电传输方式 (stochastic electrotransport), 使用旋转电场将高电迁移性分子随机地分散在多孔样品中, 而不影响低电迁移性分子, 是一种主动的免疫标记方式, 能够大大缩短染色需要的时间。

3.2 生物样本及样品台要求

光片荧光显微镜为了提高分辨率, 探测物镜多采用高数值孔径的浸水物镜。由于具备层切能力, 能够观察具有一定大小的体块的生物样本, 但是这类样本需要对生物样本和样品台进行特殊设计, 针对离体样本和活体样本有不同的处理方法。

对于离体样本, 能够允许多种操作手段使生物样品本身变得透明, 从而更好地进行成像^[36]。生物样本中的蛋白质会局部改变样本的折射率, 引起散射; 脂质会吸收照明光, 这两种效应都严重降低了有效穿透深度^[37]。光学透明技术使得荧光显微镜能够对厘米级别的样本成像^[38-39]。Dodt 等人^[40]提出超显微镜 (ultramicroscopy), 他们首先对小鼠进行灌注, 去除体液和组织液, 接着取出大脑进行脱水处理, 最后放入苯甲醇与苯甲酸配比 1:2 的溶液中进行折射率匹配。

目的是将样品放入与蛋白质具有相同折射率的介质中, 使细胞之间折射率相等, 光不再被散射, 从而增强光片穿透深度。之后又发展出多种组织透明化的方法, 如 ScaleA2^[41]、3DISCO^[42] 以及 CLARITY^[43] 等, CLARITY 呈现效果如图 8(a) 所示。这些方法都是通过某种方式保持生物样本结构和体内蛋白质的同时去除细胞的脂质, 用折射率匹配的方式得到透明样本, 这样处理下来的细胞可以进行荧光成像。

通常可选用折射率为 1.33 的水基溶液、1.44 的甘油混合物以及 1.55 的苯甲醇等作为溶剂。Park 等人^[44]在 CLARITY 技术基础上进行了改进, 提出了 SHIELD (stabilization under harsh conditions via intramolecular epoxide linkages to prevent degradation), 使用 P3PE 进行样本固定, 无需包埋步骤, 大大简化了样品处理流程, 样本处理前后如图 8(b) 和 8(c) 所示。某些组织清除技术可以使标本收缩或膨胀, Pan 等人^[45]使用 uDISCO 技术对生物样本进行收缩成像, 可以观察常规光片显微镜无法观察的大样本。Chen 等人^[46]提出了膨胀显微镜, 在得到透明组织的同时能够使生物样本的体积膨胀 4~5 倍, 这种膨胀同时能够提升分辨率, 应用到 RNA 纳米级成像^[47]、膨胀原位测序^[48]等多种研究中。

活体样本的观察则更有益于生物学研究。卵生生物的胚胎被壳膜所保护, 不需要额外给养的情况下能够维持正常的生命活动, 这类生物有斑马鱼以及绝大多数昆虫。方法是将生物样品包埋在低浓度琼脂糖凝胶中, 能够在不影响成像精度的情况下用位移台进行平移和旋转。最新的方式是在氟化乙烯丙烯 (FEP) 管中加入低浓度琼脂糖凝胶或甲基纤维素^[49], 使用浓度为 0.1% 琼脂糖和浓度为 3% 甲基纤维素固定样品。由于其强度不能支撑样品直接裸露在水或空气中, 因此使用 FEP 管充当非刚性介质的外壳, 其能够进行空气交换, 但不能进行液体交换, 如图 9 所示。另外, 使用这种方式不会对胚胎的生长发育造成影响。

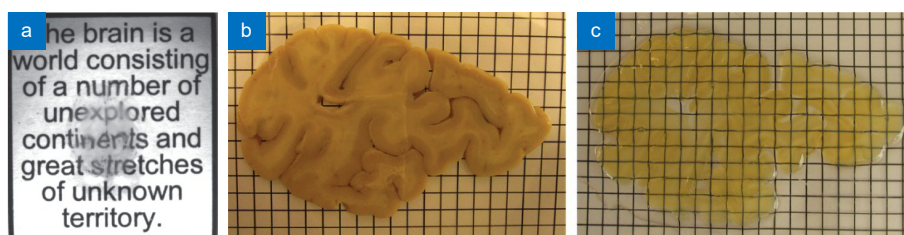


图 8 组织透明化。(a) 小鼠脑透明化后^[43]; 人脑冠状半球 SHIELD^[44] 处理前 (b) 和处理后 (c)

Fig. 8 Tissue transparency. (a) Cleared mouse brain^[43]; Human brain coronal hemisphere before (b) and after (c) SHIELD processing^[44]

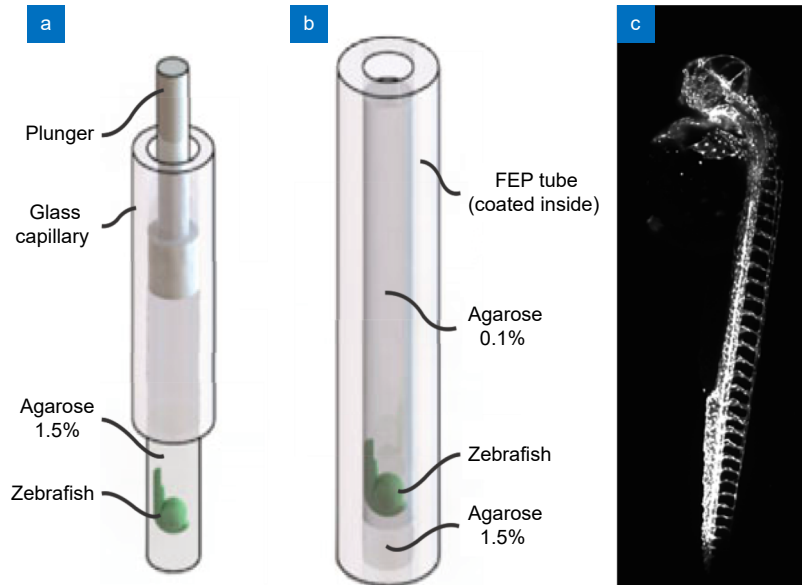


图9 斑马鱼发育观察^[49]。(a) 浓度 1.5% 琼脂包裹; (b) FEP 管内浓度 0.1% 琼脂糖包裹; (c) 发育中的斑马鱼胚胎
 Fig. 9 Observation on the development of zebrafish^[49]. (a) Schematic of the mounting in 1.5% agarose; (b) Schematic of the multilayer mounting in 0.1% agarose in coated FEP tubes; (c) Developing zebrafish embryo

胎生生物由于胚胎不能进入子宫, 情况则更为复杂。这类生物样品多是鼠类胚胎, 需要在无菌环境下进行培养, 同时对温湿度也有严格的要求。通常将这类胚胎分为植入子宫前 (pre-implantation) 和植入子宫后 (post-implantation)。植入子宫前的小鼠胚胎成像条件最为苛刻, 对光敏感性高^[50]。植入子宫后, 小鼠胚胎开始发育并产生分化, 需要样品室能够有胚胎发育的空间。Ichikawa 等人^[51]将胚胎通过外胎盘粘性附着在亚克力棒 (acrylic rod) 的孔中, 再放入样品室中特制的胚胎支架上, 该样品室同时能够控制温度和气体, 成像可达 3 h。Udan 等人^[52]用尺寸适配的空心琼脂糖圆柱容纳胚胎生长, 该圆柱体内放置胚胎所需的培养基, 同时最大限度限制组织漂移, 能够进行 24 h 成像观察。McDole 等人^[53]将样品室变为孵化室, 使用自适应光片显微镜观察了植入后小鼠胚胎从原肠胚到早期器官发育的过程。

4 总结与展望

光片荧光显微镜作为一种具有一百多年历史的显微镜, 在生物样本透明化技术出现后受到越来越多科研工作者的关注。由于其特殊的照明和探测结构, 允许对样品进行一层一层成像, 避免了单次照明时曝光整个样本, 具有更低的光毒性以及光漂白性。研究人员创造出多种无衍射光, 提升其轴向分辨率, 提出了多种光路方案使照明更加均匀, 使样本受到的限制越

来越少, 并且能够以更快的速度成像。得益于以上这些特性, 光片荧光显微镜目前已经广泛应用在神经学^[54]、生物发育学^[55]、病理组织学^[56]等多种生物学领域当中。同时得益于荧光染料和生物组织处理技术的发展, 研究人员能够在活体状态下观察生物的发育和结构, 能够在离体条件下以更好的清晰度观察内部结构。

但是, 光片荧光显微镜也存在局限性, 其轴向分辨率不能达到与横向分辨率一样的水平。对于不透明的活体生物样本, 依旧需要面临样本高散射性高吸收性带来的影响。样本中能被激活的荧光团数目是恒定的, 能够承受的扫描次数是有限的, 不能永久性地观察样本, 因此必须要在空间分辨率和时间上进行取舍。同时, 人们希望能对更大尺寸的生物样本进行成像, 这往往伴随着庞大的数据信息需要处理。

因此, 未来光片荧光显微镜突破的发展方向主要在提升时空分辨率和生物学应用方面。在分辨率提升方面, 横向分辨率已经达到理论分辨率极限, 需要与 SIM^[57] 和 SMLM^[58] 等超分辨技术相结合。轴向分辨率依旧可以在光束类型上进行挖掘, 如新的光片生成方式, 与超分辨技术 STED^[59] 相结合等。在生物学应用方面, 未来将从解决实际生物问题角度入手, 与其他技术一起联合使用, 如与原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM)^[60] 结合进行机械生物学方面研究, 与自适应技术^[61] 结合进行生物发育学方面的

研究等, 同时带动自身技术升级。相信光片荧光显微镜能够在接下来的几十年中继续为生物学研究发光发热。

参考文献

- [1] Stephens D J, Allan V J. Light microscopy techniques for live cell imaging[J]. *Science*, 2003, **300**(5616): 82–86.
- [2] Truong T V, Supatto W, Koos D S, et al. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy[J]. *Nat Methods*, 2011, **8**(9): 757–760.
- [3] Siedentopf H, Zsigmondy R. Über sichtbarmachung und größenbestimmung ultramikroskopischer teilchen, mit besonderer anwendung auf goldrubingläser[J]. *Ann Phys*, 1902, **315**(1): 1–39.
- [4] Voie A H, Burns D H, Spelman F A. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens[J]. *J Microsc*, 1993, **170**(3): 229–236.
- [5] Stelzer E H K, Strobl F, Chang B J, et al. Light sheet fluorescence microscopy[J]. *Nat Rev Methods Primers*, 2021, **1**(1): 73.
- [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] Vettenburg T, Dalgarno H I C, Nylk J, et al. Light-sheet microscopy using an Airy beam[J]. *Nat Methods*, 2014, **11**(5): 541–544.
- [9] Planchon T A, Gao L, Milkie D E, et al. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination[J]. *Nat Methods*, 2011, **8**(5): 417–423.
- [10] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. *Science*, 2014, **346**(6208): 1257998.
- [11] Holekamp T F, Turaga D, Holy T E. Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy[J]. *Neuron*, 2008, **57**(5): 661–672.
- [12] Gao L, Shao L, Chen B C, et al. 3D live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy[J]. *Nat Protoc*, 2014, **9**(5): 1083–1101.
- [13] Chang B J, Kittisopikul M, Dean K M, et al. Universal light-sheet generation with field synthesis[J]. *Nat Methods*, 2019, **16**(3): 235–238.
- [14] Fiolka R, Stemmer A, Belyaev Y. Virtual slit scanning microscopy[J]. *Histochem Cell Biol*, 2007, **128**(6): 499–505.
- [15] Hosny N A, Seyforth J A, Spickermann G, et al. Planar Airy beam light-sheet for two-photon microscopy[J]. *Biomed Opt Express*, 2020, **11**(7): 3927–3935.
- [16] Huisken J, Stainier D Y R. Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM)[J]. *Opt Lett*, 2007, **32**(17): 2608–2610.
- [17] Krzic U, Gunther S, Saunders T E, et al. Multiview light-sheet microscope for rapid *in toto* imaging[J]. *Nat Methods*, 2012, **9**(7): 730–733.
- [18] Tomer R, Khairy K, Amat F, et al. Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy[J]. *Nat Methods*, 2012, **9**(7): 755–763.
- [19] Fu Q Y, Martin B L, Matus D Q, et al. Imaging multicellular specimens with real-time optimized tiling light-sheet selective plane illumination microscopy[J]. *Nat Commun*, 2016, **7**(1): 11088.
- [20] Gao L. Extend the field of view of selective plan illumination microscopy by tiling the excitation light sheet[J]. *Opt Express*, 2015, **23**(5): 6102–6111.
- [21] Wang D Y, Jin Y X, Feng R L, et al. Tiling light sheet selective plane illumination microscopy using discontinuous light sheets[J]. *Opt Express*, 2019, **27**(23): 34472–34483.
- [22] Zong W J, Zhao J, Chen X Y, et al. Large-field high-resolution two-photon digital scanned light-sheet microscopy[J]. *Cell Res*, 2015, **25**(2): 254–257.
- [23] Dean K M, Roudot P, Welf E S, et al. Deconvolution-free subcellular imaging with axially swept light sheet microscopy[J]. *Biophys J*, 2015, **108**(12): 2807–2815.
- [24] Bouchard M B, Voleti V, Mendes C S, et al. Swept confocally-aligned planar excitation (SCAPE) microscopy for high-speed volumetric imaging of behaving organisms[J]. *Nat Photonics*, 2015, **9**(2): 113–119.
- [25] Strnad P, Gunther S, Reichmann J, et al. Inverted light-sheet microscope for imaging mouse pre-implantation development[J]. *Nat Methods*, 2016, **13**(2): 139–142.
- [26] Greer C J, Holy T E. Fast objective coupled planar illumination microscopy[J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 4483.
- [27] Fan J T, Suo J L, Wu J M, et al. Video-rate imaging of biological dynamics at centimetre scale and micrometre resolution[J]. *Nat Photonics*, 2019, **13**(11): 809–816.
- [28] Tsien R Y. The green fluorescent protein[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 509–544.
- [29] Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, et al. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(1): 86–89.
- [30] Los G V, Encell L P, McDougall M G, et al. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis[J]. *ACS Chem Biol*, 2008, **3**(6): 373–382.
- [31] Shaner N C, Steinbach P A, Tsien R Y. A guide to choosing fluorescent proteins[J]. *Nat Methods*, 2005, **2**(12): 905–909.
- [32] Matz M V, Fradkov A F, Labas Y A, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**(10): 969–973.
- [33] Ai H W, Baird M A, Shen Y, et al. Engineering and characterizing monomeric fluorescent proteins for live-cell imaging applications[J]. *Nat Protoc*, 2014, **9**(4): 910–928.
- [34] Chen T W, Wardill T J, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity[J]. *Nature*, 2013, **499**(7458): 295–300.
- [35] Kim S Y, Cho J H, Murray E, et al. Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electromobile molecules[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(46): E6274–E6283.
- [36] Costantini I, Cicchi R, Silvestri L, et al. In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: review[J]. *Biomed Opt Express*, 2019, **10**(10): 5251–5267.
- [37] Richardson D S, Lichtman J W. Clarifying tissue clearing[J]. *Cell*, 2015, **162**(2): 246–257.
- [38] Chakraborty T, Driscoll M K, Jeffery E, et al. Light-sheet

- microscopy of cleared tissues with isotropic, subcellular resolution[J]. *Nat Methods*, 2019, **16**(11): 1109–1113.
- [39] Glaser A K, Reder N P, Chen Y, et al. Multi-immersion open-top light-sheet microscope for high-throughput imaging of cleared tissues[J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 2781.
- [40] Dodt H U, Leischner U, Schierloh A, et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain[J]. *Nat Methods*, 2007, **4**(4): 331–336.
- [41] Hama H, Kurokawa H, Kawano H, et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain[J]. *Nat Neurosci*, 2011, **14**(11): 1481–1488.
- [42] Ertürk A, Becker K, Jährling N, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO[J]. *Nat Protoc*, 2012, **7**(11): 1983–1995.
- [43] Chung K, Wallace J, Kim S Y, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems[J]. *Nature*, 2013, **497**(7449): 332–337.
- [44] Park Y G, Sohn C H, Chen R, et al. Protection of tissue physicochemical properties using polyfunctional crosslinkers[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(1): 73–83.
- [45] Pan C C, Cai R Y, Quacquarelli F P, et al. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO[J]. *Nat Methods*, 2016, **13**(10): 859–867.
- [46] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy[J]. *Science*, 2015, **347**(6221): 543–548.
- [47] Chen F, Wassie A T, Cote A J, et al. Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy[J]. *Nat Methods*, 2016, **13**(8): 679–684.
- [48] Alon S, Goodwin D R, Sinha A, et al. Expansion sequencing: spatially precise in situ transcriptomics in intact biological systems[J]. *Science*, 2021, **371**(6528): eaax2656.
- [49] Kaufmann A, Mickoleit M, Weber M, et al. Multilayer mounting enables long-term imaging of zebrafish development in a light sheet microscope[J]. *Development*, 2012, **139**(17): 3242–3247.
- [50] De Medeiros G, Balázs B, Hufnagel L. Light-sheet imaging of mammalian development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, **55**: 148–155.
- [51] Ichikawa T, Nakazato K, Keller P J, et al. Live imaging of whole mouse embryos during gastrulation: migration analyses of epiblast and mesodermal cells[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(7): e64506.
- [52] Udan R S, Piazza V G, Hsu C W, et al. Quantitative imaging of cell dynamics in mouse embryos using light-sheet microscopy[J]. *Development*, 2014, **141**(22): 4406–4414.
- [53] McDole K, Guignard L, Amat F, et al. *In toto* imaging and reconstruction of post-implantation mouse development at the single-cell level[J]. *Cell*, 2018, **175**(3): 859–876.e33.
- [54] Hillman E M C, Voleti V, Li W Z, et al. Light-sheet microscopy in neuroscience[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2019, **42**: 295–313.
- [55] Wan Y N, McDole K, Keller P J. Light-sheet microscopy and its potential for understanding developmental processes[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2019, **35**: 655–681.
- [56] Poola P K, Afzal M I, Yoo Y, et al. Light sheet microscopy for histopathology applications[J]. *Biomed Eng Lett*, 2019, **9**(3): 279–291.
- [57] Chang B J, Meza V D P, Stelzer E H K. csiLSFM combines light-sheet fluorescence microscopy and coherent structured illumination for a lateral resolution below 100 nm[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(19): 4869–4874.
- [58] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642–1645.
- [59] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Opt Lett*, 1994, **19**(11): 780–782.
- [60] Nelsen E, Hobson C M, Kern M E, et al. Combined atomic force microscope and volumetric light sheet system for correlative force and fluorescence mechanobiology studies[J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 8133.

作者简介



张子建(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为光片显微成像。

E-mail: 1046827954@qq.com



【通信作者】史国华(1981-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为光学成像。中科院青年创新促进会优秀会员。

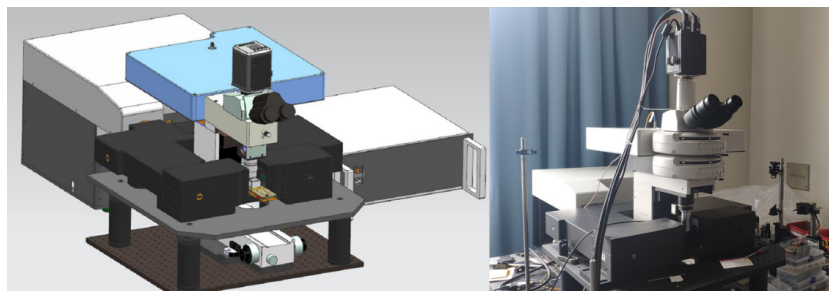
E-mail: ghshi_lab@sibet.ac.cn



扫描二维码, 获取PDF全文

Review of the development of light sheet fluorescence microscopy

Zhang Zijian^{1,2}, Xu Xin^{1,2}, Wang Jixiang^{1,2}, Ye Hong², Zhang Xin², Shi Guohua^{2*}



light-sheet microscopy prototype

Overview: Light sheet fluorescence microscopy (LSFM), as a type of fluorescence microscope, can image fluorescence-labelled specific ribosomes, proteins, and cells, and observe their positions and functions in biological tissues. Different from traditional fluorescence microscopes, LSFM's detection path and illumination path are arranged at orthogonal orientation. The excitation beam is a thin sheet, only a slice region of the sample is illuminated, thus reducing the fluorescence generation in the non-focal plane. Besides only a single plane is illuminated by the laser at a time, which significantly reduces the exposure time of the fluorescent molecules, thereby minimizing the effects of photobleaching and phototoxicity. Due to these properties, LSFM can perform 3D imaging of fluorescence-labeled biological samples for a long recording time. Nowadays, it has been widely used in many biological fields such as neuroscience, developmental biology, and histopathology.

In the first part, the LSFM with classical optical path configurations, such as SPIM, OCPI, and DSLM are described from the perspective of optical path construction. The work made by researchers to promote the resolution and imaging throughput based on those work are introduced. These methods include changing the beam structure, shortening the optical path distance, and increasing the imaging speed, many of which are still beneficial to us today. In the second part, fluorescent dyes and immuno-fluorescence staining techniques for biological samples used in LSFM are described, including tissue transparency and sample fixing of living animals. These sample processing methods have greatly promoted the development of fluorescence microscopes, and representative studies are listed.

Finally, the review summarizes both the advantages and disadvantages of LSFM as well as the potential development direction and limitations. The orthogonal optical path configuration limits the lateral size of the sample, and the imaging performance is poor for the opaque or high-scattering samples. LSFM has higher requirements for both the size and transparency of the sample. It is considered that the breakthrough of the LSFM in future breakthroughs mainly lies in two aspects: improving the imaging parameters and adapting to more biological applications. It should be done from a biological point of view, in conjunction with other technologies, to advance the development of LSFM. Finally, this review is expected to provide researchers with a more systematic knowledge of light-sheet fluorescence microscopy and some useful references.

Zhang Z J, Xu X, Wang J X, et al. Review of the development of light sheet fluorescence microscopy[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, 50(5): 220045; DOI: [10.12086/oe.2023.220045](https://doi.org/10.12086/oe.2023.220045)

Foundation item: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences Fund (XDB32030205), and Scientific Instrument Developing Project of the Chinese Academy of Sciences Fund(YJKYYQ20210029)

¹Department of Biomedical Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China; ²Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

* E-mail: ghshi_lab@sibet.ac.cn