

文章编号 2097-1842(2023)05-1010-12

微型头戴式单光子荧光显微成像技术研究进展

付强^{1*}, 张智淼^{1,2}, 赵尚男^{1,2}, 刘洋^{1,2}, 董洋¹

(1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033;
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 微型头戴式单光子荧光显微成像技术是近些年出现的用于神经科学研究的一种突破性方法, 可以对自由移动活体动物的神经活动进行实时成像, 提供了一种前所未有的方式来访问神经信号, 增强了对大脑如何工作的理解。在脑科学研究需求的推动下, 目前已经出现了许多种类型的微型头戴式单光子荧光显微镜, 如高分辨率成像、无线记录、三维成像、双区域成像和双色成像等。为了更加全面地了解 and 认识这种新兴的光学神经成像技术, 本文按成像视场进行分类, 对目前报道的不同类型微型头戴式单光子荧光显微镜所具有的特点进行了介绍, 重点讨论了其所采用的光学系统方案和光学性能参数, 分析对比了不同方案的优缺点, 以及未来的改进方向, 以便为脑科学研究人员的实际应用提供参考。

关键词: 微型单光子荧光显微镜; 神经信号; 脑科学; 光学系统

中图分类号: TH742; R318.51 文献标志码: A doi: 10.37188/CO.2023-0007

Research progress of miniature head-mounted single photon fluorescence microscopic imaging technique

FU Qiang^{1*}, ZHANG Zhi-miao^{1,2}, ZHAO Shang-nan^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, DONG Yang¹

(1. *Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;*
2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)
* *Corresponding author, E-mail: fuqianghit@163.com*

Abstract: Miniature head-mounted single-photon fluorescence microscopy is a breakthrough approach for neuroscience research that has emerged in recent years. It can image the neural activity of freely moving vivo animals in real time, providing an unprecedented way to access neural signals and rapidly enhancing the understanding of how the brain works. Driven by the needs of brain science research, there have been many types of miniature head-mounted single-photon fluorescence microscopes, such as high-resolution imaging, wireless recording, 3D imaging, two-region imaging and two-color imaging. In order to have a more compre-

收稿日期: 2023-01-10; 修订日期: 2023-02-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 62005271); 中国科学院青年创新促进会资助(No. 2021221); 吉林省科技发展计划青年成长科技计划项目(No. 20210508054RQ)

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 62005271); Youth Innovation Promotion Association, CAS (No. 2021221); Youth growth technology program of Jilin province science and technology development plan (No. 20210508054RQ).

hensive understanding of this new optical neuroimaging technology, we classify its technologies according to the imaging field of view, introduce the characteristics of different types of micro-head-mounted single-photon fluorescence microscopes reported so far, and focus on the optical system scheme and optical performance parameters used. The advantages and disadvantages of different schemes are analyzed and compared and the future direction of development is described to provide reference for the practical application of brain science researchers.

Key words: miniature single-photon fluorescence microscope; neural signals; brain science; optical system

1 引言

在过去的几十年,神经科学得到了巨大发展,其研究方式也发生了巨大转变,脑科学研究进入了新时代^[1]。随着钙荧光指示剂的出现和不断发展,研究人员能够使用光学显微镜来直接观察生物体内的神经活动^[2-5]。脑成像技术为人类了解大脑的功能以及研究各种神经疾病对大脑功能的影响及破坏提供了前所未有的帮助。但是,过去光学神经成像通常使用笨重的台式光学显微镜,这种显微镜体积庞大,需要对动物进行麻醉或固定头部,限制了能够进行的实验类型。近年来随着微型光学元件和电子设备的发展,光学神经成像设备逐渐从台式平台向“头戴式”平台转变^[6]。

微型头戴式荧光显微镜能够以较高的分辨率对自由移动的动物大脑中的神经活动进行观测^[7],既可以通过颅骨开窗对大脑皮层的神经活动进行成像,也可以通过结合梯度折射率(Gradient Index, GRIN)透镜(将光学图像从一端中继到另一端)对大脑深部的神经活动进行成像,迅速增强了对大脑如何工作的理解。目前,微型头戴式荧光显微镜的主流方案是基于单光子荧光成像的微型显微镜和基于双光子荧光成像的微型显微镜。对于单光子荧光成像,荧光染料中的电子吸收激发光中的一个光子被激发到高能级,然后当电子从高能级向低能级跃迁时会发出一个比激发光波长更长的光子。单光子荧光效应比较容易发生,使用LED作为激发光源提供宽场照明就能够得到生物成像所需的荧光信号,系统构建更加容易。但是宽场照明产生的离焦荧光会对成像质量造成影响,并且由于激发光的波长相对较短,光束散射效应也比较明显。所以微型单光子荧光显微镜的优点是成像视场更大、帧频更高、成本更低、

更易于组装和维护,且允许动物有更加自由的运动行为。其缺点是穿透深度小,轴向分辨率低,图像的对比如也比较低。

对于双光子荧光成像,荧光染料中的电子需要吸收激发光中的两个光子被激发到高能级,然后当电子从高能级向低能级跃迁时会发出一个比激发光波长短的光子。因此,与单光子荧光成像相比,双光子荧光成像可以使用约二倍波长的光来提供激发光,光束的散射程度更低。但是双光子荧光效应发生的概率极低,需要使用峰值功率极高的飞秒激光作为光源,并且仅在激光束焦点处才能得到生物成像所需的荧光信号,因此需要进行逐点扫描成像,这无疑会增加系统构建的成本,但是这也避免了离焦荧光的影响,成像质量更高。所以微型双光子荧光显微镜的优点是穿透深度更大,轴向和横向分辨率更高,例如北京大学陈良怡、宗伟健等人^[8]在2017年报道的微型双光子荧光显微镜的横向分辨率为 $0.65\ \mu\text{m}$,轴向分辨率为 $3.3\ \mu\text{m}$ 。其缺点是系统构建更加复杂,需要昂贵的近红外飞秒激光器来提供激发光,并且还需要使用较粗的光纤束进行图像传输,对动物的行为会造成一定的影响。

从目前的期刊文献和商业报道上看,由于微型单光子荧光显微镜更容易实现和性价比更高的特点,使其成为主流。近年来,微型单光子荧光显微镜技术日趋成熟,不仅有一些开源项目推动该领域的发展,还有Inscopix、Doric等商业公司提供完整的解决方案。因此使用微型单光子荧光显微镜对活体动物的神经活动进行成像已经成为了一种新兴的趋势,越来越受到脑科学工作者的欢迎,已经被应用到了神经科学研究的各个研究领域。

本文简要回顾了光学神经成像的发展历史,然后将目前报道的微型头戴式单光子荧光显微镜

分为小视场系统(Field of View, FOV<1mm)和大视场系统(FOV>7mm),对他们使用的光学系统方案进行介绍,并分析其优缺点。最后,对微型头戴式单光子荧光显微镜目前的发展现状进行总结,对未来的发展趋势进行展望。

2 小视场微型单光子荧光显微镜

小视场微型单光子荧光显微镜(FOV<1mm)在近些年得到了巨大发展,技术日趋成熟,研究人员在设计满足荧光成像的基本功能之上,还加入了很多其他功能,例如:加入无线功能以解除电线对动物行为的限制;利用三维成像解决单光子荧光成像穿透深度小的问题;开发双区域成像功能实现同时对两个脑区进行成像;加入双色/多色成

像功能解决对不同神经细胞群同时进行成像的问题。

2.1 具有基本荧光成像功能的微型荧光显微镜

2011年, Ghosh 等人对微型荧光显微镜的发展做出了里程碑式的工作^[9],开发出了第一个完全集成的微型头戴式荧光显微镜,总重量仅为 1.9 g, 体积为 2.4 cm³, 如图 1(a)所示。该显微镜由光学系统、照明 LED、CMOS 探测器、结构外壳和电子线路组成。光学系统极为简单,物镜仅是一片 GRIN 透镜,管镜为一片消色差双胶合透镜。照明光由 LED 发出,经过收集透镜、激发滤光片、二向色镜和物镜后,照明神经细胞;激发的荧光经物镜、二向色镜、发射滤光片和管镜成像在 CMOS 上。该系统的成像质量完全能与台式显微镜相媲美,光学性能数据见表 1^[11-14]。

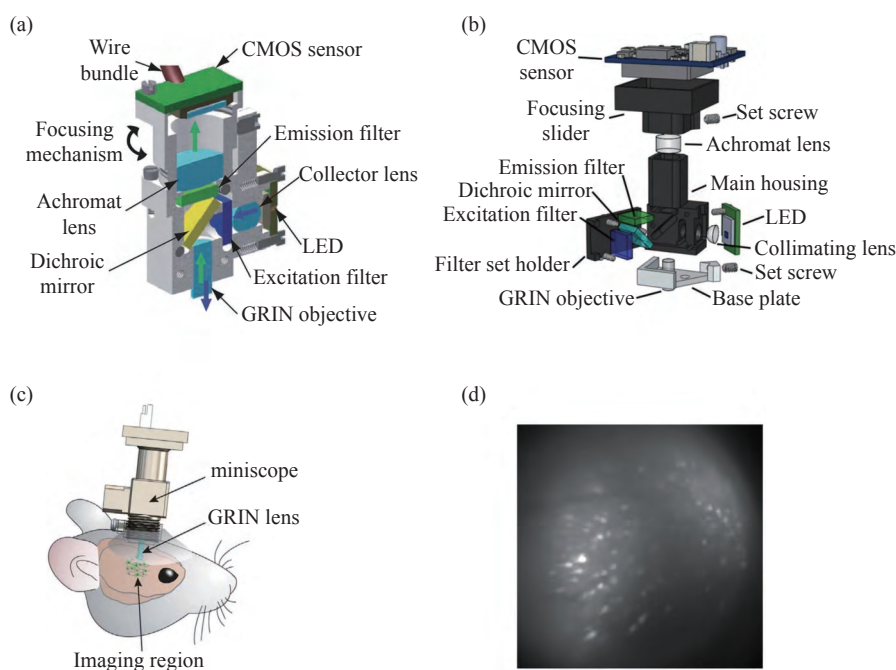


图 1 具有基本成像功能的系统。(a) Ghosh 等人的集成显微镜的横截面图^[9]; (b) MiniScope V3 的分解图; (c) 戴着微型显微镜的小鼠示意图^[14]; (d) 小鼠大脑中神经元活动的荧光图像^[14]

Fig. 1 A system with a basic imaging function. (a) Cross sectional view of integrated microscope proposed by Ghosh *et al*; (b) exploded view of the MiniScope V3; (c) a schematic of a mouse wearing a miniature microscope; (d) fluorescent images of neural activity in a mouse brain

2016年, Cai 等人在 Ghosh 等人^[9]工作的基础上,设计了一款名为 MiniScope V3^[10]的微型显微镜,重约 3 g, 如图 1(b)所示。光学系统采用和 Ghosh 等人相同的方案,具体数据见表 1。MiniScope V3 是非常有代表性的微型荧光显微镜,其

特点在于所有设计资料全部开源,并提供详细的设计文档、零件采购教程、组装和实验应用指南等,极大地方便了研究人员的使用,目前已经被全世界几百家实验室使用并应用到神经科学的研究中^[11]。

表1 具有基本成像功能的微型荧光显微镜的光学系统和光学性能参数

Tab. 1 Optical system and optical performance parameters of the miniature fluorescence microscope with basic imaging functionality

系统参数	Ghosh 等人	MiniScope V3	miniscope	CHEndoscope	Bagramyan 等人
物镜	梯度折射率透镜	梯度折射率透镜	非球面透镜	梯度折射率透镜	梯度折射率透镜
管镜	双胶合透镜	双胶合透镜	双胶合透镜	双胶合透镜	平凸透镜
视场	600 μm ×800 μm	750 μm ×450 μm	1 100 μm ×1 100 μm	~500 μm	~105 μm
分辨率	2.5 μm	1.0 $\mu\text{m}/\text{pix}$	单细胞分辨率	单细胞分辨率	1.0 μm
图像传感器	MT9V021(5.6 $\mu\text{m}/\text{pix}$)	MT9V032(6.0 $\mu\text{m}/\text{pix}$)	MT9V022(6.0 $\mu\text{m}/\text{pix}$)	MT9P031(2.2 $\mu\text{m}/\text{pix}$)	OV7251(3.0 $\mu\text{m}/\text{pix}$)
成像速度	36 Hz	60 Hz	10 Hz	20 Hz	50 Hz

2016年, Barbera 等人设计了一款微型显微镜 miniscope^[12], 重约 2.4 g, 图 1(c)所示为戴着微型显微镜的小鼠示意图。在光学系统部分, 物镜仅使用了一片直径为 4 mm 的非球面透镜, 并与中继 GRIN 透镜结合来对小鼠的深脑区成像, CMOS 图像传感器拍摄到的小鼠大脑中神经活动的图片如图 1(d)所示。miniscope 的特点在于获得同等单细胞分辨率的情况下视场比上述系统大 1 倍, 光学系统具体数据见表 1。2018年, 他们详细介绍了 miniscope 的设计和组装过程、GRIN 透镜植入小鼠脑中的手术过程、微型显微镜安装在小鼠头部的过程以及数据的采集和分析方法^[13-14]。

2018年, Jacob 等人设计并开源了一款微型显微镜 CHEndoscope^[15], 重约 4.5g。光学系统采用和 Ghosh 等人相同的方案, 具体数据见表 1。其特点在于: 使用了 3D 打印的显微镜外壳和集成相机模块, 方便显微镜的组装与调试, 非常适合

喜欢使用现成组件的研究人员。

2020年, Bagramyan 等人设计了一款重量仅为 1.3 g 的微型显微镜^[16], 是目前正式见刊的重量最轻的系统。物镜由直径仅为 0.5 mm 的 GRIN 透镜和中继 GRIN 透镜组成; 管镜为一片平凸透镜。这款显微镜的优点在于重量轻, 且使用小直径的 GRIN 透镜在植入动物大脑时对组织的损伤更小, 缺点在于成像视场很小(仅为 105 μm), 明显低于现有的其他系统, 光学性能数据见表 1。

2.2 具有无线功能的微型荧光显微镜

2017年, Liberti 等人设计并开源了一款无线微型显微镜 FinchScope^[17-19], 重约 1.8 g, 如图 2(a)所示。其特点是无线功能可选, 选择无线功能仅需要增加一块重约 0.6 g 的无线发射机和锂聚合物电池。成像光路设计基于 Ghosh 等人先前描述的光路, 具体数据见表 2。FinchScope 是一款专门用于监测斑马雀在唱求偶歌时神经活动的系统^[20], 可以在进行神经成像时同步记录声音。

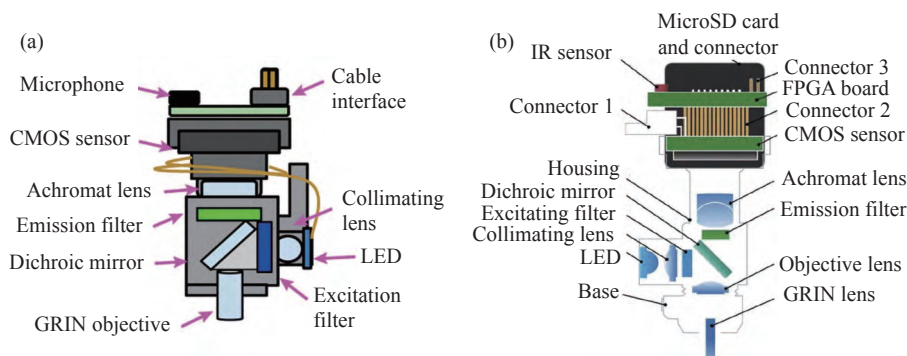
图2 具有无线功能的系统。(a)FinchScope 的横截面图^[19]; (b)无线 miniscope 的内部光学元件布局图^[22]

Fig. 2 A system with wireless function. (a) Cross sectional view of FinchScope; (b) internal optics element layout of wireless miniscope

表 2 具有无线功能的微型荧光显微镜的光学系统和光学性能参数

Tab. 2 Optical system and optical performance parameters of a miniature fluorescence microscope with wireless function

系统参数	FinchScope	Wire-free MiniScope	miniscope	wScope
物镜	梯度折射率透镜	梯度折射率透镜	非球面透镜	梯度折射率透镜
管镜	双胶合透镜	双胶合透镜	双胶合透镜	双胶合透镜
视场	800 μm ×600 μm	—	500 μm ×500 μm	700 μm ×450 μm
分辨率	单细胞分辨率	1 $\mu\text{m}/\text{pix}$	单细胞分辨率	1.8 μm
图像传感器	OV7960(6.00 $\mu\text{m}/\text{pix}$)	EV76C454(5.80 $\mu\text{m}/\text{pix}$)	MT9V022(6.00 $\mu\text{m}/\text{pix}$)	OV7690 (1.75 $\mu\text{m}/\text{pix}$)
成像速度	30 Hz	10 Hz	10 Hz	25 Hz

2019年, Shuman 等人设计并开源了一款无线微型显微镜 Wire-free MiniScope^[21], 重量为 4~5 g。显微镜设计基于 MiniScope V3^[10], 二者的光学系统完全相同, 具体数据见表 2。但为了实现无线记录, 对电路部分进行了重新设计, 更换了一个重量更轻、功耗更低的 CMOS 图像传感器, 并加入了 SD 卡 (Secure Digital Memory Card) 存储 CMOS 图像传感器输出的数据。

2019年, Barbera 等人在他们先前设计的有线版本基础上^[12]为系统加入了无线功能^[22], 重约 3.9 g, 如图 2(b)所示。无线 miniscope 与之前的有线版本相比, 光学系统完全相同, 具体数据见表 2。为了实现无线记录, 无线 miniscope 中加入了 SD 卡用以记录 CMOS 图像传感器输出的数据, 并使用电池背包为系统供电。通过这些改进解除了电线对动物行为的影响, 可以同时多个动物进行记录, 研究动物在群居条件下的更复杂行为。

2023年, Wang 等人设计了一款具有无线图像传输功能的微型显微镜 wScope^[23], 重 2.7 g。光学系统设计基于 MiniScope V3, 具体数据见表 2。wScope 与之前报道的使用 SD 卡实现无线记录的系统相比有巨大优势, 不仅可以在记录的过程中实时查看和记录图像, 而且还能在实验过程中修改显微镜的参数。

2.3 具有三维成像功能的微型荧光显微镜

2018年, Skocek 等人设计了一款具有三维成像功能的微型显微镜 MiniLFM^[24], 重量为 4.7g, 如图 3(a)所示。光学系统设计基于 MiniScope V3, 具体数据见表 3。为了实现三维成像, 他们在原本的像平面处放置了一个微透镜阵列 (Micro-lens Array, MLA), 将头戴式显微镜技术与光场显微镜^[25] (Light Field Microscope, LFM) 技术和

约束矩阵分解技术 (Seeded Iterative Demixing, SID)^[26] 结合使用, 从而使二维图像传感器在单次曝光中能捕获到三维体积信息。

2020年, Yanny 等人设计了一款具有三维成像功能的微型显微镜 Miniscope3D^[27], 重约 2.5g。显微镜设计基于 MiniScope V3, 具体数据见表 3。为了实现三维成像, 在物镜光阑处放置了一个相位掩模板, 可以将三维样本中的每个点在传感器上生成独特的高频模式, 从而可以在单次二维成像中编码体积信息, 如图 3(b)所示。相比于 MiniLFM^[24], Miniscope3D 使用了新的硬件方案和图像重建算法, 在更大的成像视场上实现了高一倍的分辨率。

2021年, Bagramyan 等人在他们先前报道的系统基础上^[16], 又设计了一款具有三维成像功能的系统^[28], 重量仅为 1.4g, 如图 3(c)所示。光学系统与先前的设计基本相同, 具体数据见表 3。为了实现三维成像, 他们在物镜后面放置了一片可调谐液晶透镜 (Tunable Liquid Crystal Lens, TLCL) 进行轴向扫描成像。TLCL 是由他们自己设计定制的, 重量仅为 0.1g, 直径仅为 0.5mm, 可实现 98 μm 的深度调节。

2022年, Supekar 等人设计了一款使用结构光照明的具有三维成像功能的微型显微镜 SIMscope3D^[29], 重 6.7g, 如图 3(d)所示。为了实现高分辨率三维成像, 他们首次将结构光照明引入到了微型显微镜的设计中, 消除了离焦荧光和散射光对成像的影响, 然后结合电湿润透镜 (Electrowetting Lens, EWL) 进行轴向扫描来实现三维成像。但是结构光照明的范围比较小, 导致系统成像视场比较小 (仅为 207 μm), 明显低于现有的其他系统, 具体数据见表 3。

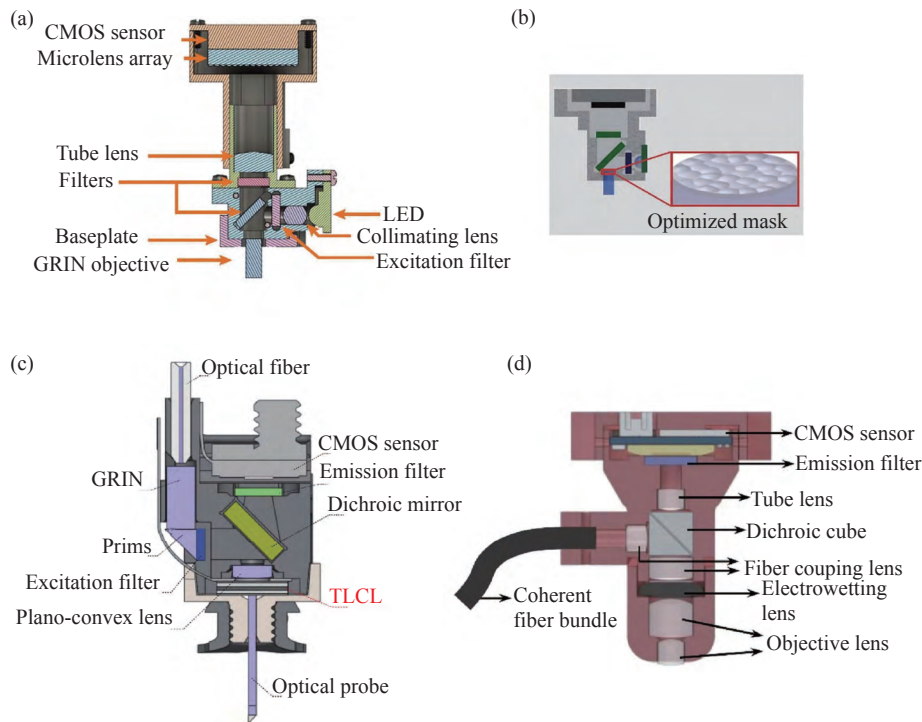


图 3 具有三维成像功能的系统。(a)MiniLFM 的横截面图^[24]; (b)Miniscope3D 的横截面图^[27]; (c)Bagramyan 等人的显微镜横截面图^[28]; (d)SIMscope3D 的横截面图^[29]

Fig. 3 A system with 3D imaging functionality. (a) Cross sectional view of MiniLFM; (b) cross sectional view of Miniscope3D; (c) microscope cross section by Bagramyan *et al.*; (d) cross sectional view of SIMscope3D

表 3 具有三维成像功能的微型荧光显微镜的光学系统和光学性能参数

Tab. 3 Optical system and optical performance parameters of the miniature fluorescence microscope with 3D imaging functionality

系统参数	MiniLFM	Miniscope3D	Bagramyan等人	OMKAR 等人
物镜	梯度折射率透镜	梯度折射率透镜	梯度折射率透镜	两片双胶合透镜
管镜	双胶合透镜	相位掩模板	平凸透镜	双胶合透镜
视场	700 μm×600 μm×360 μm	900 μm×700 μm×390 μm	横向 150 μm 轴向 98 μm	横向207 μm 轴向220 μm
三维成像元件	微透镜阵列	相位掩模板	可调谐液晶透镜	电湿润透镜
横向分辨率	6.0 μm	2.8 μm	1.4 μm	1.0 μm/pix
轴向分辨率	30.0 μm	15.0 μm	15.0 μm	18.0 μm
图像传感器	MT9V032 (6.0 μm/pix)	MT9V032 (6.0 μm/pix)	OV7251 (3.0 μm/pix)	MT9P031 (2.2 μm/pix)
成像速度	16 Hz	40 Hz	50 Hz	—

2.4 具有双区域成像功能的微型荧光显微镜

2019 年, Gonzalez 等人设计了一款能够对小鼠大脑进行双区域成像的微型显微镜^[30]。光学系统设计基于 Ghosh^[9] 等人的工作, 具体数据见表 4。

外壳部分设计基于 MiniScope V3^[10], 电路部分设计基于 FinchScope^[17-19], 但是他们进行了优化设计, 最终使显微镜的重量足够轻且体积足够小, 可以在一只小鼠头上同时安装两个进行双区域成像。

表 4 具有双区域成像功能的微型荧光显微镜的光学系统和光学性能参数

Tab. 4 Optical system and optical performance parameters of a miniature fluorescence microscope with dual region imaging functionality

系统参数	Gonzalez 等人	NINscope
物镜	梯度折射率透镜	梯度折射率透镜
管镜	双胶合透镜	平凸透镜
视场	600 μm × 479 μm	786 μm × 502 μm
分辨率	0.83 $\mu\text{m}/\text{pix}$	单细胞分辨率
图像传感器	OV7690 (6 $\mu\text{m}/\text{pix}$)	PYTHON480 (4.8 $\mu\text{m}/\text{pix}$)
成像速度	—	30 Hz

2020 年, de Groot 等人设计开源了一款微型显微镜 NINscope^[31], 重 1.6 g, 如图 4(a) 所示。光学性能数据见表 4。与其他系统相比, NINscope 重量轻、体积小, 允许在一只小鼠的头上安装两个, 对不同大脑区域同时进行成像, 如图 4(b) 所示。

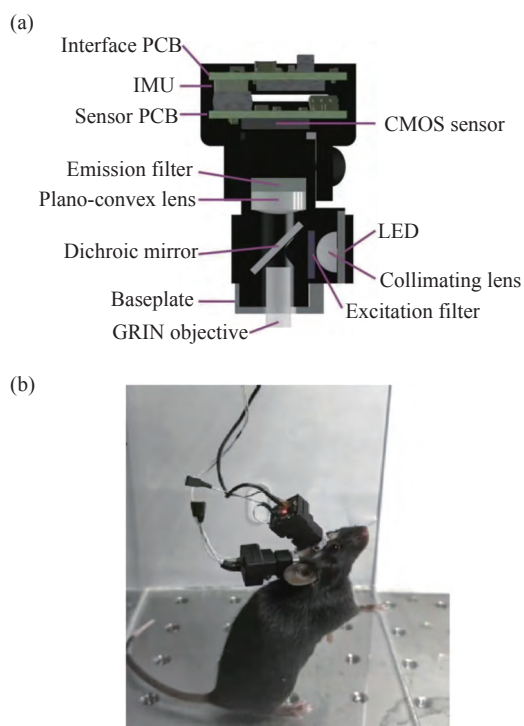


图 4 具有双区域成像功能的系统。(a) NINscope 的主体和内部光学元件布局图^[31]; (b) 一只安装了两个 NINscope 的小鼠^[31]

Fig. 4 A system with dual region imaging functionality. (a) NINscope body and internal optics element layout; (b) a mouse with two NINscopes mounted

2.5 具有双色成像功能的微型荧光显微镜

2020 年, 加州大学洛杉矶分校发布了新一代

开源的微型显微镜 MiniScope V4^[32-33], 重量仅为 2.6 g, 如图 5(a) 所示。光学系统的物镜模块使用了两片消色差双胶合透镜, 管镜使用了一片消色差双胶合透镜, 消除了色差引起的焦点偏移, 可以进行双色荧光成像^[34], 具体数据见表 5。与上一代 MiniScope V3^[10] 相比, 重量更轻、视场更大, 还加入了电湿润透镜, 可以实现 200 μm 焦距的电动调节。

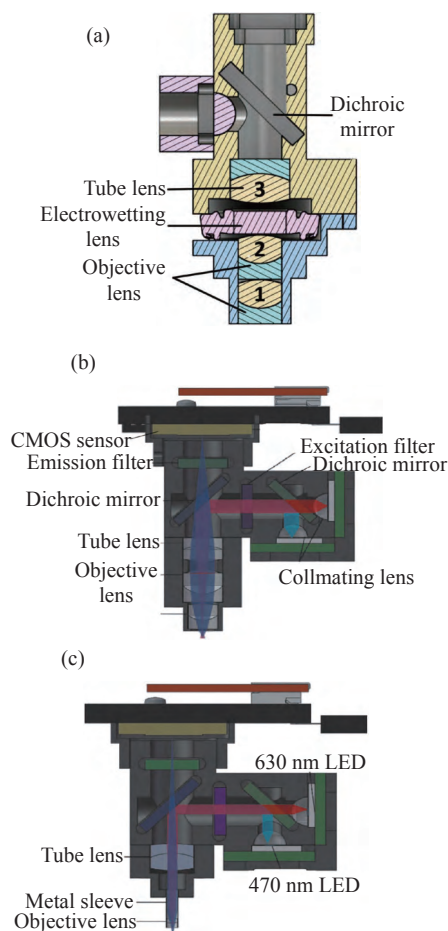


图 5 具有双色成像功能的系统。(a) MiniScope V4 的横截面图; (b) DCFIMM-SBI 的横截面图^[35]; (c) DCFIMM-DBI 的横截面图^[35]

Fig. 5 A system with two-color imaging functionality. (a) Cross sectional view of MiniScope V4; (b) cross sectional view of DCFIMM-SBI; (c) cross sectional view of DCFIMM-DBI

2022 年, 蓝凯秋等人设计了一款具有双色成像功能的微型显微镜^[35], 重量为 6.2 g。为了实现双色成像, 必须要校正色差引起的焦移, 因此在光学系统设计上采用了全消色差光学元件。同时, 为了对不同的的大脑区域进行成像, 分别设计了如图 5(b) 所示的用于大脑表层成像的光学系统

DCFIMM-SBI(Superficial Brain Imaging, SBI),和如图5(c)所示的用于大脑深层成像的光学系统 DCFIMM-DBI(Deep Brain Imaging, DBI),具体数据见表5。

表5 具有双色成功能的微型荧光显微镜的光学系统和光学性能参数

Tab.5 Optical system and optical performance parameters of a miniature fluorescence microscope with two-color imaging functionality

系统参数	MiniScope V4	DCFIMM-SBI	DCFIMM-DBI
物镜	两片双胶合透镜	两片双胶合透镜	双胶合透镜
管镜	双胶合透镜	双胶合透镜	双胶合透镜
视场	~1.00 mm ²	1.10 mm×1.10 mm	0.77 mm×0.77 mm
分辨率	单细胞分辨率	3.47 μm	3.47 μm
图像传感器	PYTHON480 (4.8 μm/pix)	EV76C454 (5.8 μm/pix)	EV76C454 (5.8 μm/pix)
成像速度	120 Hz	20 Hz	20 Hz

2.6 小结

本节对目前报道的小视场微型单光子荧光显微镜进行了详细介绍,现将其光学系统和光学性能归纳到下表6。

表6 小视场微型单光子荧光显微镜的光学系统组成和光学性能参数

Tab.6 Optical system composition and optical performance parameters of miniature single photon fluorescence microscope with a small field

系统参数	小视场系统(FOV<1mm)
物镜	梯度折射率透镜 ^[9-10,15-17,21,23-24,27-28,30-31] 、双胶合透镜 ^[29,32,35] 、非球面透镜 ^[12,22]
管镜	双胶合透镜 ^[9-10,12,15,17,21-24,29-30,32,35] 、平凸透镜 ^[16,28,31] 、相位掩模板 ^[27]
分辨率范围	最小:1 μm ^[16] ,最大:6 μm ^[24]
重量范围	最小:1.3 g ^[16] ,最大:6.7 g ^[29]

从表6可以看到,小视场微型单光子荧光显微镜的光学系统设计方案基本统一。

对于物镜基本都使用GRIN透镜,使用GRIN透镜作为物镜的优势如下:

(1)GRIN透镜具有比球面透镜更轻的质量和更高的光学性能,仅用一片GRIN透镜就能在较高的数值孔径(NA=0.5)下获得很好的成像质量。

(2)圆柱状的GRIN透镜外形小巧,底部平

坦,可以在较小损伤的条件下植入实验动物的大脑,更有利于实验动物的健康。

使用GRIN透镜作为物镜的主要缺点为:

(1)GRIN透镜无法校正色差,只能应用在单色荧光成像系统中。对于双色荧光成像系统,需要使用消色差光学透镜组进行系统设计^[35]。

(2)GRIN透镜的成像视场比较小,只能对光轴附近的光线良好成像。对轴外物点成像时像差很大且难以校正,所以用GRIN透镜作为物镜的系统视场通常小于1 mm。

当视场需求进一步增加时,有些系统使用了非球透镜作为物镜,但是仍需要与GRIN透镜结合使用。当需要双色成像时,双胶合透镜得到应用。

对于管镜,基本都使用消色差双胶合透镜,消除了色差对成像质量的影响。但是也有几个对重量控制比较严格的系统,没有校正色差,仅使用一片平凸透镜。

3 大视场微型单光子荧光显微镜

大视场微型单光子荧光显微镜(FOV>7mm)可以对小鼠的整个大脑皮层的神经活动进行观测,能进一步了解各脑区间的相互作用关系,这对“打破神经密码”,即破译神经系统编码、存储、处理信息的方式有很大的帮助。但要想实现大视场,需要复杂的光学设计和光学装调技术,目前研究的还很少,只有少数的几篇文章报道了他们的设计,下面将分别进行介绍。

3.1 现有的大视场系统

2018年,Scott等人设计开源了一款微型显微镜cScope^[36],重量为33 g。光学系统布局如图6(a)所示,光学性能数据见表7。cScope提供了超大的视场,可以同时实验动物多个大脑区域进行观测,但是由于光学系统使用了现成的商用透镜,导致系统设计比较复杂,整体重量比较大。

2020年,Xue等人^[37]利用计算成像技术设计了一款微型显微镜CM²,重19 g。光学系统如图6(b)所示,仅使用一片微透镜阵列(MLA)作为成像元件,摆脱了传统微型显微镜的物镜或GRIN透镜对视场的限制,具体数据见表7。CM²成像

方法结合了集成成像^[38-39]、光场显微镜^[40-42]、复眼成像^[43]、阵列显微镜^[44]和孔径编码成像^[45]的思想。其工作原理是首先使用 MLA 收集单个二维测量值,然后基于点扩散函数(PSF)计算重建图像。

2021 年, Rynes 等人设计了一款具有超大视

场的微型显微镜 mScope^[46],如图 6(c)所示,重量仅为 3.8g。mScope 的光学系统极为简单,仅使用一片双凸透镜进行成像,具体数据见表 7。mScope 以很轻的重量实现了超大的视场,但是牺牲了系统的分辨率,最终系统分辨率只有几十微米。

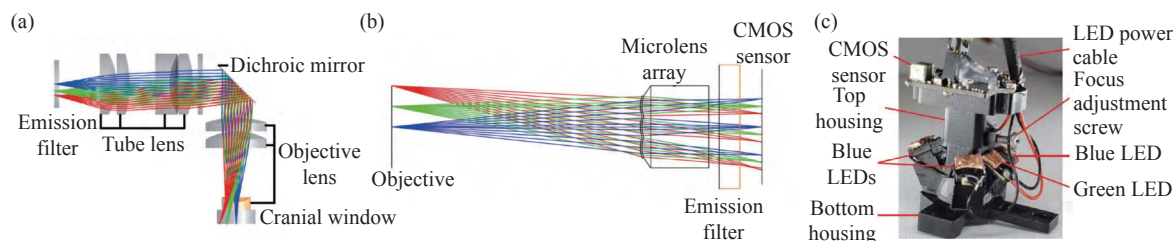


图 6 现有的大视场系统。(a)cScope 的成像路径光路图^[36]; (b)CM² 的成像路径光路图^[37]; (c)完全组装的 mScope^[46]

Fig. 6 Existing large filed of view system. (a) Imaging optical path of cScope; (b) imaging optical path of CM²; (c) fully assembled mScope

表 7 大视场微型荧光显微镜的光学系统和光学性能参数

Tab. 7 Optical system and optical performance parameters of a large field miniature fluorescence microscope

	cScope	CM ²	mScope
物镜	多片球面透镜	微透镜阵列	双凸透镜
管镜	多片球面透镜		
视场	7.8 mm×4.0 mm	7.3 mm×8.1 mm×2.5 mm	8.0 mm×10.0 mm
横向分辨率	14.0 μm	7 μm	39.4~55.7 μm
图像传感器	MT9V032 (6 μm/pix)	MT9P031 (2.2 μm/pix)	MT9V032 (6 μm/pix)
成像速度	60Hz	—	—

3.2 小结

本节对目前报道的大视场系统进行了详细介绍,从中可以看到,目前对大视场微型单光子荧光显微镜的研究还很少,技术还不是很成熟。成像质量相对较差,无法分辨单个神经元,且系统的重量比较大,对动物的自由活动造成了一定的限制。虽然计算成像技术可以在获得较高分辨率的同时保持比较轻的重量,但是计算成像对于活体动物体内这种密集、低对比度的场景进行图像重建难度很大,事实上目前还没实验证明这种技术在活体动物体内有效。所以目前大视场微型单光子荧光显微镜的研究还处于起始阶段,在未来还有很大的发展空间。

4 总结与展望

本文对目前报道的微型单光子荧光显微镜的光学系统和光学性能进行了详细介绍,可以看到, Ghosh 等人^[9]做出的开创性工作为微型单光子荧光显微镜的发展奠定了重要基础,后面有许多研究人员都根据 Ghosh 等人的工作,做出了自己的设计。最为著名的是 MiniScope V3^[10],因为 MiniScope V3 是开源的,提供了详细的设计文件和参考指南。除此之外还有 miniscope^[12-14]、CHEndoscope^[15]和 Finchscope^[17-19]等开源项目,它们的出现为微型单光子荧光显微镜的发展起到了巨大的推动作用。不仅成像视场从几百微米发展到几毫米,而且还加入了如无线记录、三维成像、双区域成像和双色成像等功能。然而,面向未来的发展与应用,微型单光子显微镜还有需要改进的地方,下面介绍几个发展方向:

(1)大视场高分辨率成像。以单细胞分辨率对半脑区或全脑区进行高分辨率成像有助于进一步了解大脑产生行为或心理状态的原因。但是由于视场的增加,离轴像差对像质影响严重。光学系统采用简单的双胶合和单片非球面透镜已不能很好地校正像差,需要增加元件的数量和非球面的数量。但此时又会导致体积和重量的增加。为解决上述情况,类似手机镜头里的塑料镜片方案提供了可行性。

(2)基于超构透镜的超轻微型荧光显微镜。超构透镜(Metalens)是一种二维平面透镜结构,是由超构表面(具有亚波长厚度的平面二维超材料)制成的光学元件,利用纳米结构对入射光进行聚焦成像。与传统光学透镜相比,超构透镜拥有体积更小、重量更轻、成本更低、成像更好、更易集成等优点,为紧凑集成的光学系统提供了潜在的解决方案。将超构透镜应用到荧光显微镜上,可以在NA更大的条件下实现较大视场成像,物镜仅为1片,整机重量有望更轻。

(3)结合自适应光学技术的荧光显微镜。由于单光子的激发信号不仅仅激发了聚焦的位置,同时也激发了其他深度的荧光信号,离焦的荧光信号作为背景噪声会对聚焦的目标荧光信号造成干扰。另外,脑区组织对荧光信号产生的散射效果大大削弱了成像信号的分辨率和信噪比。为解决上述问题,利用数字自适应技术有望在测量波前的同时进行荧光成像^[47],再结合基于机器学习的图像处理方法可提升图像的信噪比和分辨率。

参考文献:

- [1] CHEN SH Y, WANG Z CH, ZHANG D, *et al.*. Miniature fluorescence microscopy for imaging brain activity in freely-behaving animals[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2020, 36(10): 1182-1190.
- [2] GRIENBERGER C, KONNERTH A. Imaging calcium in neurons[J]. *Neuron*, 2012, 73(5): 862-885.
- [3] 王义强,林方睿,胡睿,等.大视场光学显微成像技术[J].中国光学(中英文),2022,15(6):1194-1210.
WANG Y Q, LIN F R, HU R, *et al.*. Large field-of-view optical microscopic imaging technology[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(6): 1194-1210. (in Chinese)
- [4] 陈帅,任林,周镇乔,等.在体跨尺度双光子显微成像技术[J].中国光学(中英文),2022,15(6):1167-1181.
CHEN SH, REN L, ZHOU ZH Q, *et al.*. In-vivo across-scales two-photon microscopic imaging technique[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(6): 1167-1181. (in Chinese)
- [5] 王鹏,周瑶,赵宇轩,等.用于多尺度高分辨率三维成像的双环光片荧光显微技术[J].中国光学(中英文),2022,15(6):1321-1331.
WANG P, ZHOU Y, ZHAO Y X, *et al.*. Double-ring-modulated light sheet fluorescence microscopic technique for multi-scale high-resolution 3D imaging[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(6): 1321-1331. (in Chinese)
- [6] YU H, SENARATHNA J, TYLER B M, *et al.*. Miniaturized optical neuroimaging in unrestrained animals[J]. *NeuroImage*, 2015, 113: 397-406.
- [7] AHARONI D, KHAKH B S, SILVA A J, *et al.*. All the light that we can see: a new era in miniaturized microscopy[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(1): 11-13.
- [8] ZONG W J, WU R L, LI M L, *et al.*. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(7): 713-719.
- [9] 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.
- [10] CAI D J, AHARONI D, SHUMAN T, *et al.*. A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time[J]. *Nature*, 2016, 534(7605): 115-118.
- [11] CAMPOS P, WALKER J J, MOLLARD P. Diving into the brain: deep-brain imaging techniques in conscious animals[J]. *Journal of Endocrinology*, 2020, 246(2): R33-R50.
- [12] BARBERA G, LIANG B, ZHANG L F, *et al.*. Spatially compact neural clusters in the dorsal striatum encode locomotion relevant information[J]. *Neuron*, 2016, 92(1): 202-213.
- [13] ZHANG L F, LIANG B, BARBERA G, *et al.*. Miniscope GRIN lens system for calcium imaging of neuronal activity from deep brain structures in behaving animals[J]. *Current Protocols in Neuroscience*, 2019, 86(1): e56.
- [14] LIANG B, ZHANG L F, BARBERA G, *et al.*. Distinct and dynamic ON and OFF neural ensembles in the prefrontal cortex code social exploration[J]. *Neuron*, 2018, 100(3): 700-714.e9.
- [15] JACOB A D, RAMSARAN A I, MOCLE A J, *et al.*. A compact head-mounted endoscope for in vivo calcium imaging in freely behaving mice[J]. *Current Protocols in Neuroscience*, 2018, 84(1): e51.
- [16] 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.

- [17] LIBERTI III W A, MARKOWITZ J E, PERKINS L N, *et al.*. Unstable neurons underlie a stable learned behavior[J]. *Nature Neuroscience*, 2016, 19(12): 1665-1671.
- [18] COHEN Y, SHEN J, SEMU D, *et al.*. Hidden neural states underlie canary song syntax[J]. *Nature*, 2020, 582(7813): 539-544.
- [19] LIBERTI III W A, PERKINS L N, LEMAN D P, *et al.*. An open source, wireless capable miniature microscope system[J]. *Journal of Neural Engineering*, 2017, 14(4): 045001.
- [20] Alvarado J S, Goffinet J, Michael V, *et al.*. Neural dynamics underlying birdsong practice and performance[J]. *Nature*, 2021, 599(7886): 635-639.
- [21] 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.
- [22] BARBERA G, LIANG B, ZHANG L F, *et al.*. A wireless miniScope for deep brain imaging in freely moving mice[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2019, 323: 56-60.
- [23] WANG Y ZH, MA ZH T, LI W ZH, *et al.*. Cable-free brain imaging with miniature wireless microscopes[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2023, 28(2): 026503.
- [24] SKOCEK O, NÖBAUER T, WEILGUNY L, *et al.*. High-speed volumetric imaging of neuronal activity in freely moving rodents[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(6): 429-432.
- [25] 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.
- [26] NÖBAUER T, SKOCEK O, PERNÍA-ANDRADE A J, *et al.*. Video rate volumetric Ca²⁺ imaging across cortex using seeded iterative demixing (SID) microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(8): 811-818.
- [27] YANNY K, ANTIPA N, LIBERTI W, *et al.*. Miniscope3D: optimized single-shot miniature 3D fluorescence microscopy[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 171.
- [28] 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.
- [29] SUPEKAR O D, SIAS A, HANSEN S R, *et al.*. Miniature structured illumination microscope for *in vivo* 3D imaging of brain structures with optical sectioning[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(4): 2530-2541.
- [30] GONZALEZ W G, ZHANG H W, HARUTYUNYAN A, *et al.*. Persistence of neuronal representations through time and damage in the hippocampus[J]. *Science*, 2019, 365(6455): 821-825.
- [31] 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.
- [32] Silva A J. Miniaturized two-photon microscope: seeing clearer and deeper into the brain[J]. *Light, science & applications*, 2017, 6(8): e17104.
- [33] WIRTSHAFTER H S, DISTERHOFT J F. *In vivo* multi-day calcium imaging of CA1 hippocampus in freely moving rats reveals a high preponderance of place cells with consistent place fields[J]. *Journal of Neuroscience*, 2022, 42(22): 4538-4554.
- [34] AHARONI D, HOOGLAND T M. Circuit investigations with open-source miniaturized microscopes: past, present and future[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, 13: 141.
- [35] 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.
LAN K Q, YANG X B, XU B T, *et al.*. *In vivo*, dual-color fluorescent imaging miniature microscope[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2022, 51(6): 0618001. (in Chinese)
- [36] SCOTT B B, THIBERGE S Y, GUO C Y, *et al.*. Imaging cortical dynamics in GCaMP transgenic rats with a head-mounted widefield macroscope[J]. *Neuron*, 2018, 100(5): 1045-1058.e5.
- [37] XUE Y J, DAVISON I G, BOAS D A, *et al.*. Single-shot 3D wide-field fluorescence imaging with a Computational Miniature Mesoscope[J]. *Science Advances*, 2020, 6(43): eabb7508.
- [38] STERN A, JAVIDI B. Three-dimensional image sensing, visualization, and processing using integral imaging[J]. *Proceedings of the IEEE*, 2006, 94(3): 591-607.
- [39] 邓慧, 吕国皎, 杨梅, 等. 基于掩膜板阵列的消串扰集成成像3D显示方法[J]. *液晶与显示*, 2022, 37(5): 592-597.
DENG H, LYU G J, YANG M, *et al.*. Crosstalk-free integral imaging 3D display method based on a mask array[J]. *Chinese Journal of Liquid Crystals and Displays*, 2022, 37(5): 592-597. (in Chinese)

- [40] CONG L, WANG Z G, CHAI Y M, *et al.*. Rapid whole brain imaging of neural activity in freely behaving larval zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *eLife*, 2017, 6: e28158.
- [41] 徐斌, 于迅博, 高鑫, 等. 一种视点均匀分布的桌面式光场显示系统[J]. *液晶与显示*, 2022, 37(5): 573-580.
XU B, YU X B, GAO X, *et al.*. Tabletop light field display system with uniform distribution of viewpoints[J]. *Chinese Journal of Liquid Crystals and Displays*, 2022, 37(5): 573-580. (in Chinese)
- [42] 于迅博, 李涵宇, 高鑫, 等. 基于预处理卷积神经网络提升3D光场显示视觉分辨率的方法[J]. *液晶与显示*, 2022, 37(5): 549-554.
YU X B, LI H Y, GAO X, *et al.*. 3D light field display with improved visual resolution based on pre-processing convolutional neural network[J]. *Chinese Journal of Liquid Crystals and Displays*, 2022, 37(5): 549-554. (in Chinese)
- [43] TANIDA J, KUMAGAI T, YAMADA K, *et al.*. Thin observation module by bound optics (TOMBO): concept and experimental verification[J]. *Applied Optics*, 2001, 40(11): 1806-1813.
- [44] MCCALL B, OLSEN R J, NELLES N J, *et al.*. Evaluation of a miniature microscope objective designed for fluorescence array microscopy detection of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2014, 138(3): 379-389.
- [45] ANTIPA N, KUO G, HECKEL R, *et al.*. DiffuserCam: lensless single-exposure 3D imaging[J]. *Optica*, 2018, 5(1): 1-9.
- [46] 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.
- [47] WU J M, GUO Y D, DENG CH, *et al.*. An integrated imaging sensor for aberration-corrected 3D photography[J]. *Nature*, 2022, 612(7938): 62-71.

作者简介:



付强(1985—),男,黑龙江佳木斯人,博士,副研究员,2008年、2010年于哈尔滨工业大学分别获得学士、硕士学位,2020年于中国科学院大学获得博士学位,主要从事光学系统设计、红外探测设备总体论证等方面的研究。E-mail: fuqianghit@163.com



张智森(1999—),男,吉林长春人,硕士研究生,2021年于长春理工大学获得学士学位,主要从事光学系统设计方面的研究。E-mail: zhimiao Zhang@qq.com



赵尚男(1993—),女,吉林长春人,博士研究生,助理研究员,2015年、2018年于北京理工大学分别获得学士、硕士学位,主要从事计算成像、机器视觉、光学设计方面的研究。E-mail: 1109949193@qq.com



刘洋(1989—),男,吉林长春人,硕士,助理研究员,2012年、2015年于北京航空航天大学分别获得学士、硕士学位,主要从事光学系统设计、杂散光抑制设计等方面的研究。E-mail: liu9527aaa@163.com



董洋(1987—),男,吉林长春人,硕士,助理研究员,2012年、2013年于白俄罗斯国立大学分别获得学士、硕士学位,主要从事光学系统设计方面的研究。E-mail: 283841835@qq.com