



# 高时空分辨微型化双光子 荧光显微成像系统



李西睿

2023.6.14

北京超维景生物科技有限公司

# 双光子成像技术的历史

## Theory (1931)



Maria Goeppert-Mayer  
1906-1972

## Experiment (1961)

VOLUME 7, NUMBER 6

PHYSICAL REVIEW LETTERS

SEPTEMBER 15, 1961

TWO-PHOTON EXCITATION IN  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$

W. Kaiser and C. G. B. Garrett

Bell Telephone Laboratories, Murray Hill, New Jersey

(Received August 28, 1961)

## The first two photon microscope (1990) , Science Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

WINFRIED DENK,\* JAMES H. STRICKLER, WATT W. WEBB

Two photon microscopy won 2015 brain prize !



KAREL SVOBODA

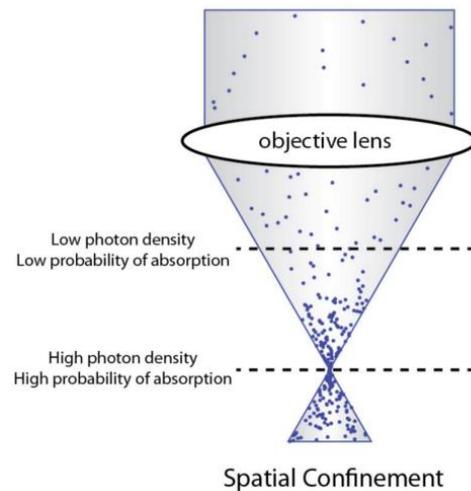
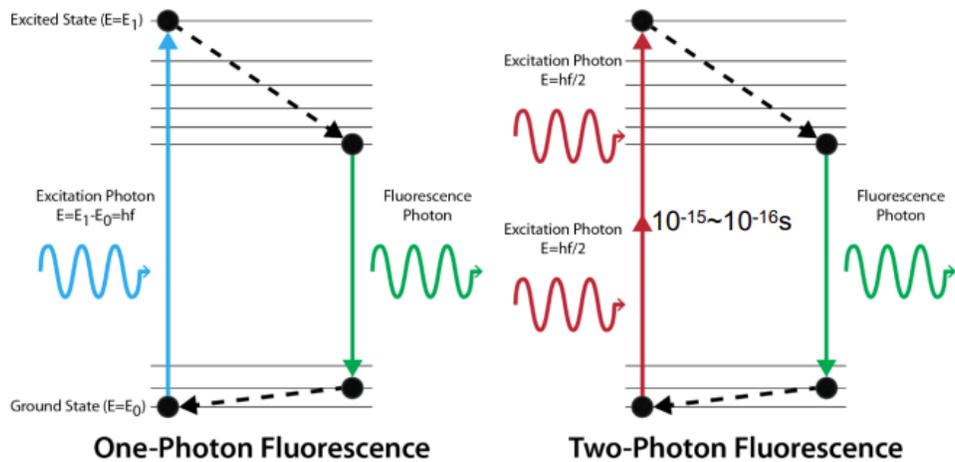
DAVID W. TANK

WINFRIED DENK

ARTHUR KONNERTH

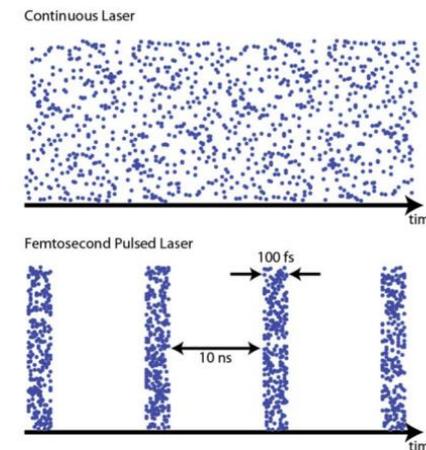
表彰其发明、改进和使用双光子成像技术对神经细胞、轴突、神经元的活动进行精细的动态成像

# 双光子显微成像技术



Spatial Confinement

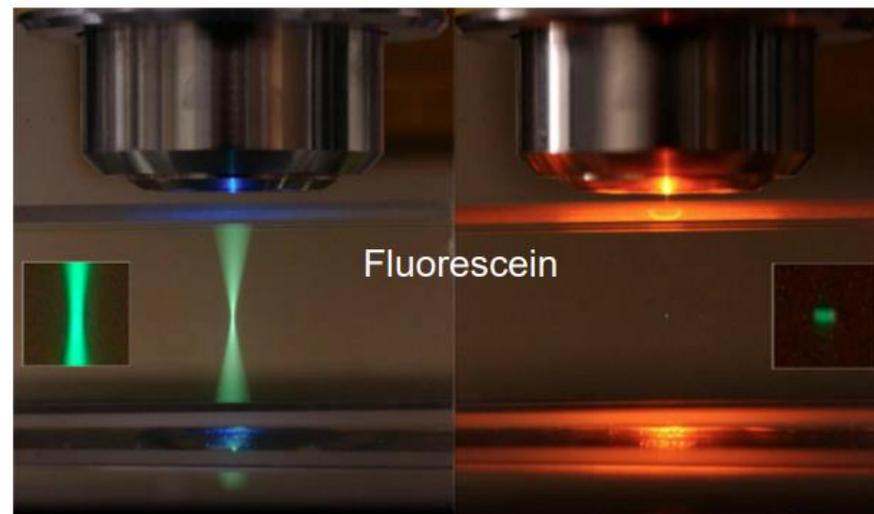
488 nm



Temporal Confinement

920 nm

- 飞秒脉冲激光提高双光子激发概率
- 天然光学切片特性
- 无焦外光漂白和光毒性



# 双光子显微成像——活体成像利器

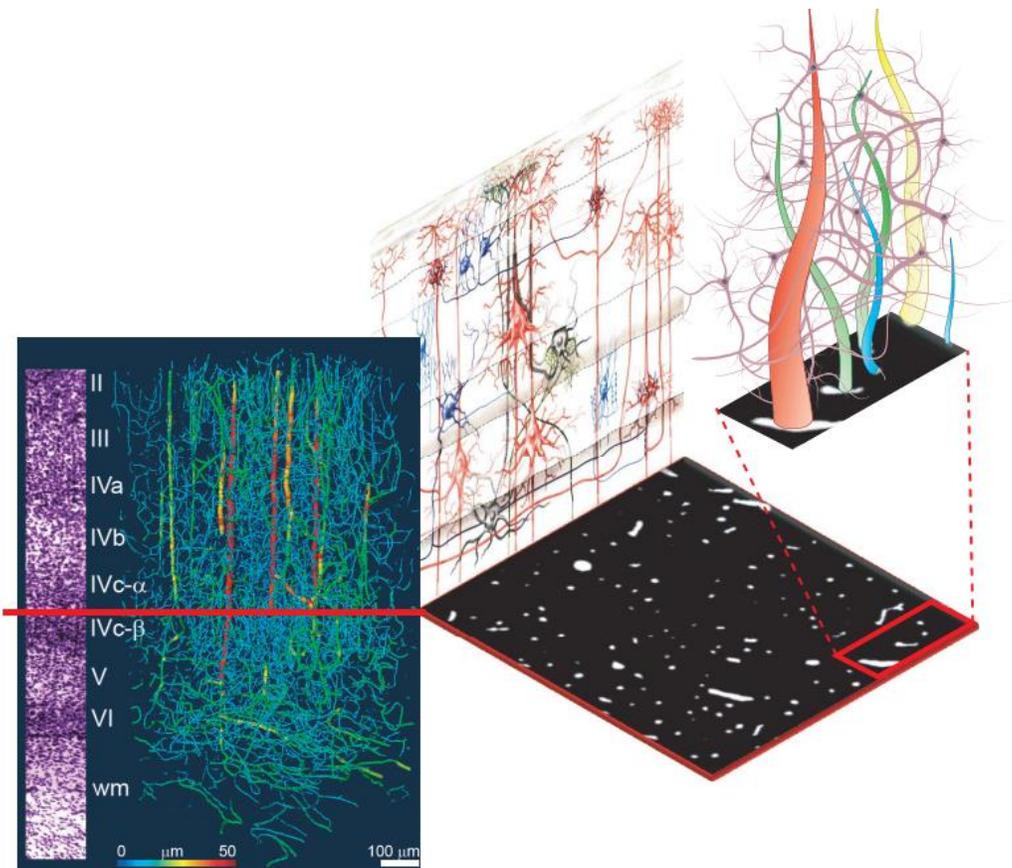
天然共焦小孔效应 → 信号利用率高，轴向层析能力高

激发波长更长 → 深部组织观察，厚组织3D成像

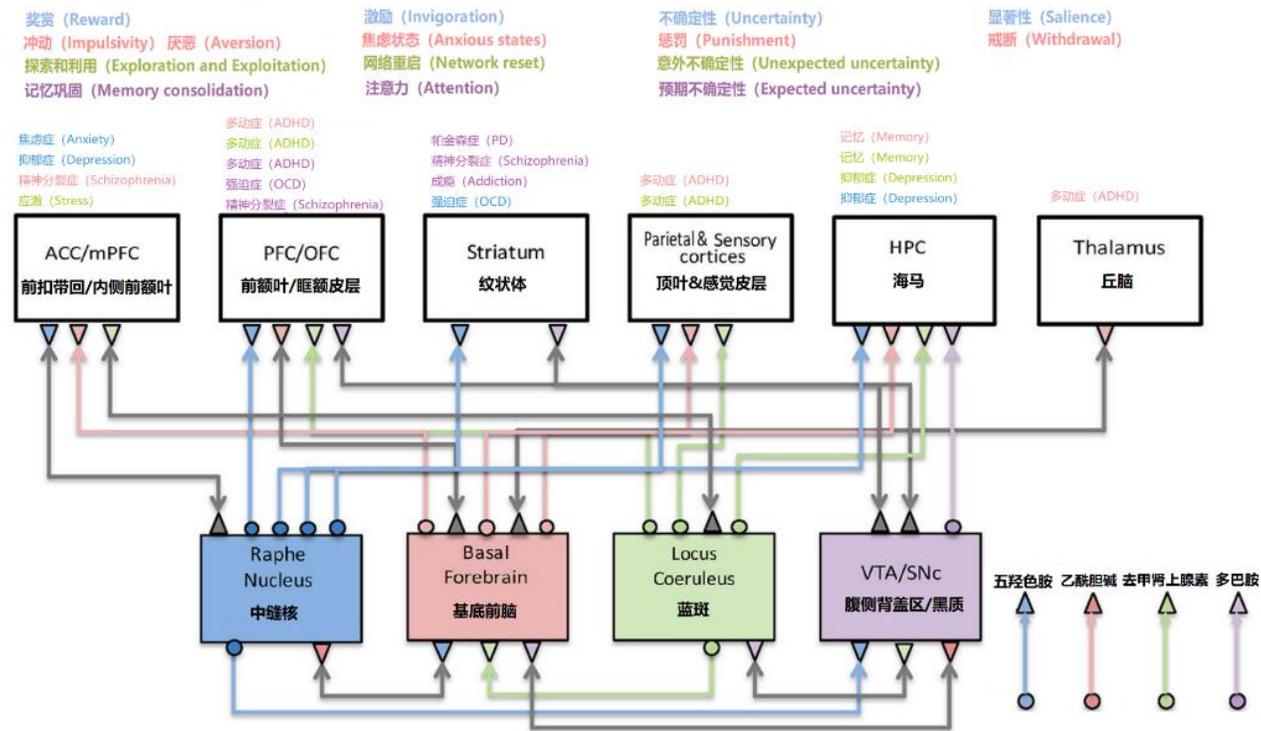
单个光子的能量小 → 光漂白、光损伤小，适合长时程及活体成像

- 
- 神经科学研究，肿瘤研究，心脑血管相关研究，病毒学、炎症及免疫性疾病，神经退行性疾病，精神疾病，糖尿病等。

# 神经科学研究：结构研究和功能研究

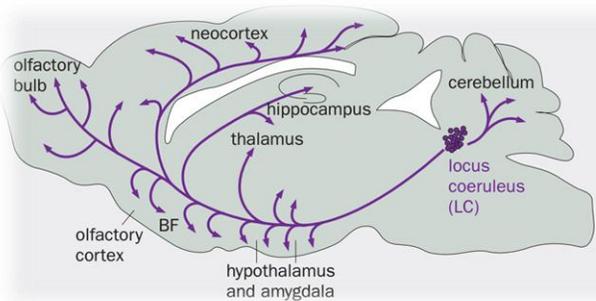


结构

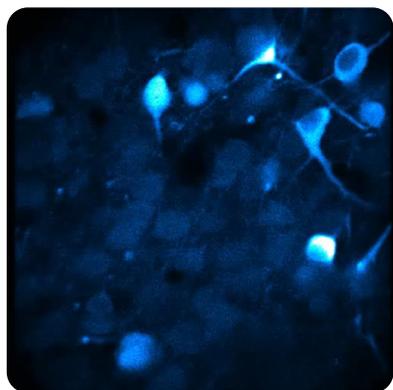


功能

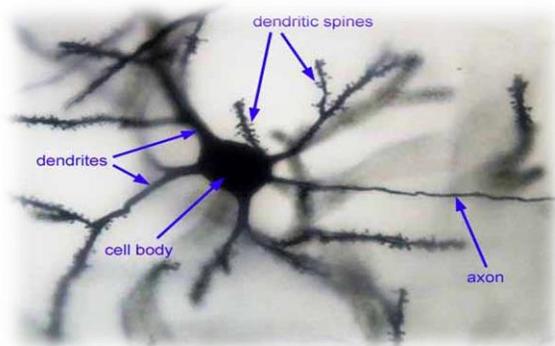
# 需求关注点：空间分辨率和时间分辨率



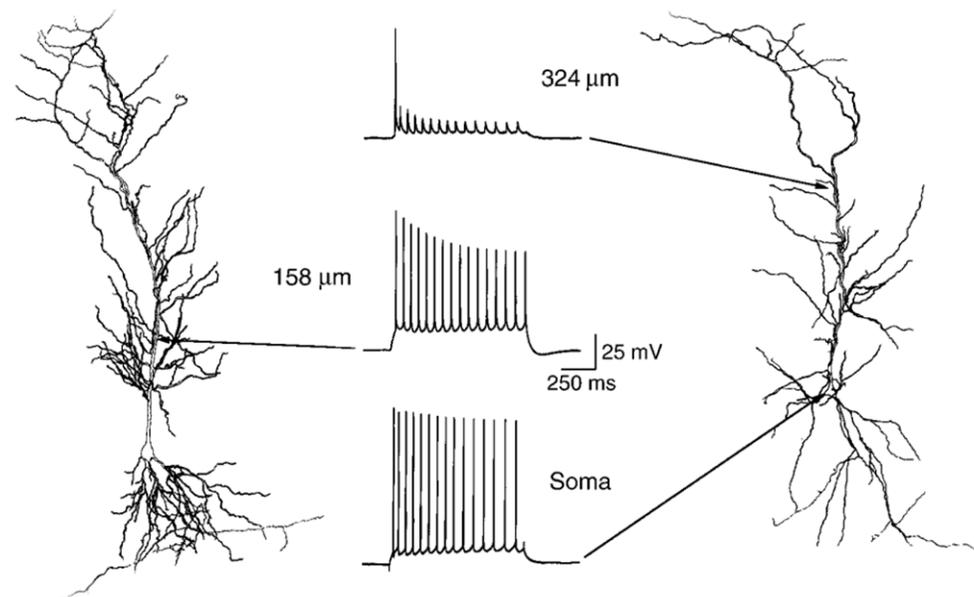
介观水平：几厘米以上



单细胞：几微米以上

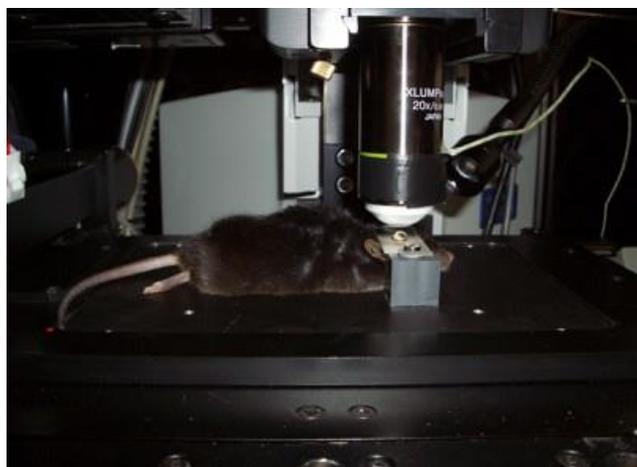


树突棘: 0.2 ~ 1 μm



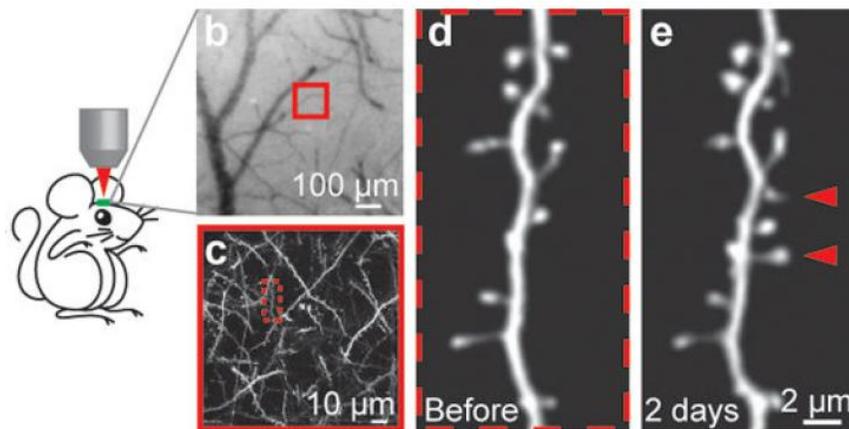
神经动作电位发放频率：100ms左右甚至更低

## 双光子显微成像技术—活体成像利器

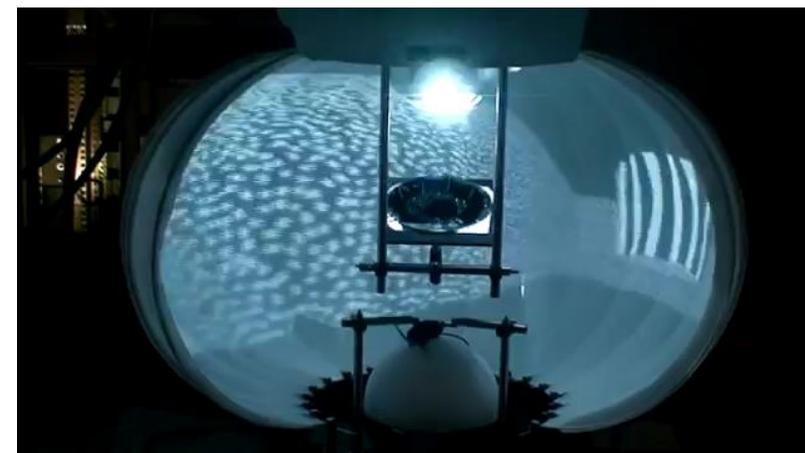


台式双光子显微镜

学习记忆对树突棘的影响



G. Yang, F. Pan, W.-B. Gan Nature (2009)



加装VR系统和悬浮球的台式双光子显微镜

**需要一款可以“戴着跑”的显微镜！**

**高空间分辨率**

**高时间分辨率**

**自由生理状态**

**三大核心需求难以兼容或同步突破**



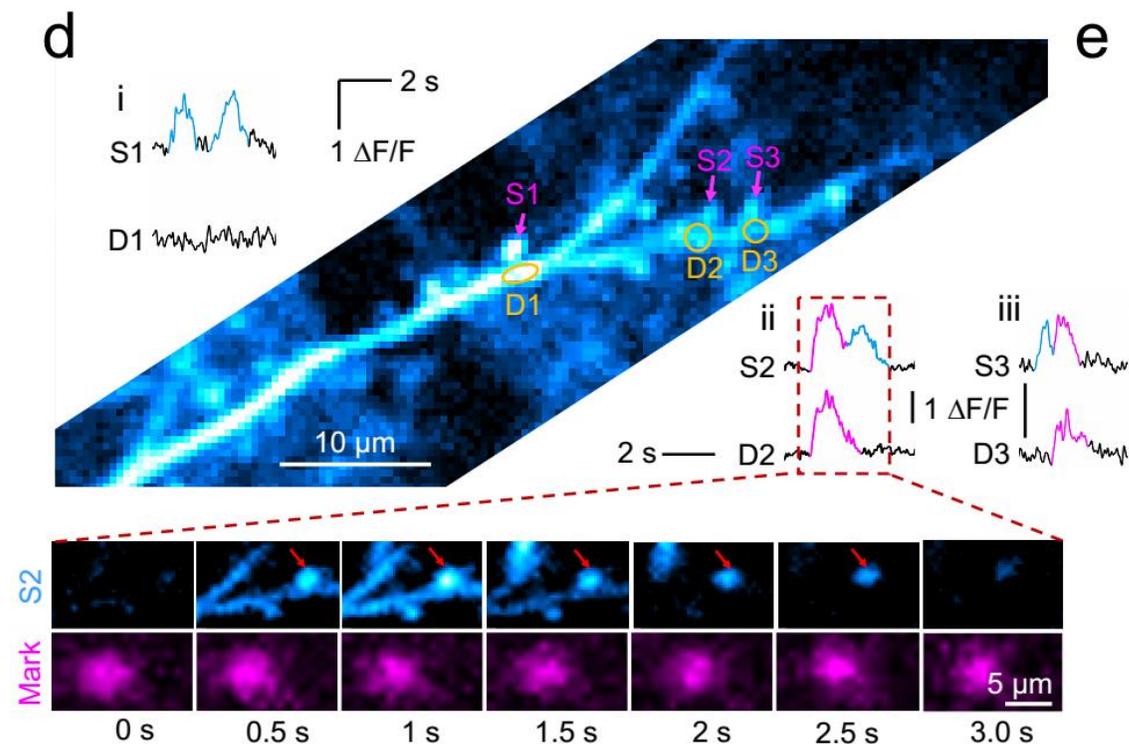
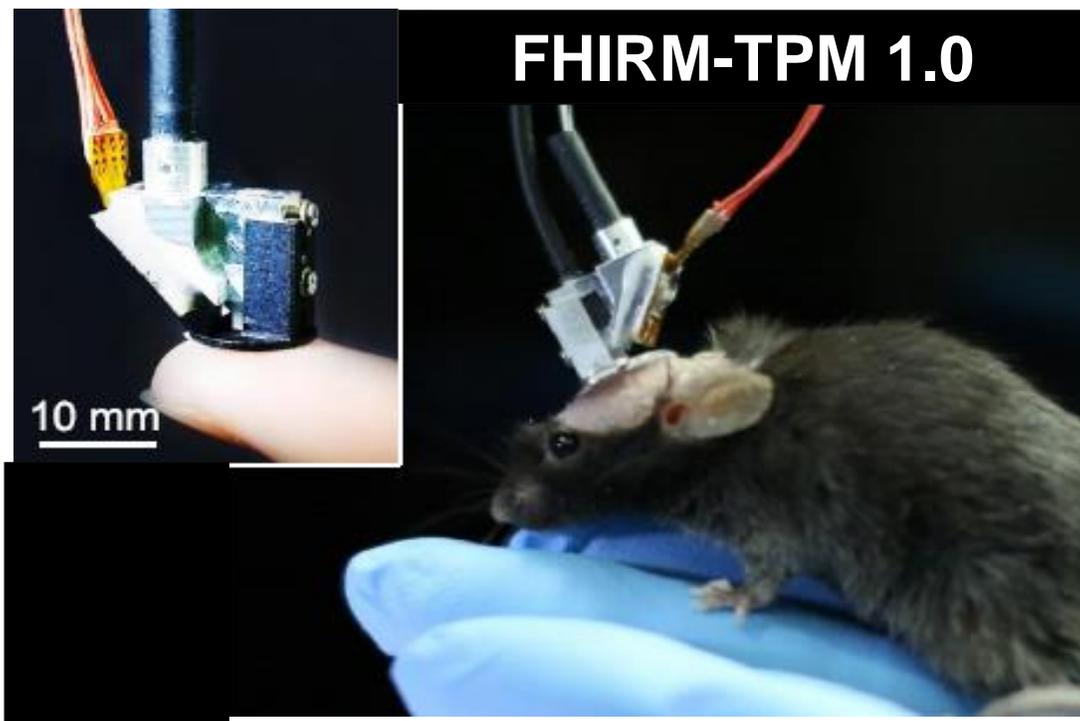
超维景  
TRANSCEND VIVOSCOPE

# 新一代高时空分辨微型化双光子荧光显微镜

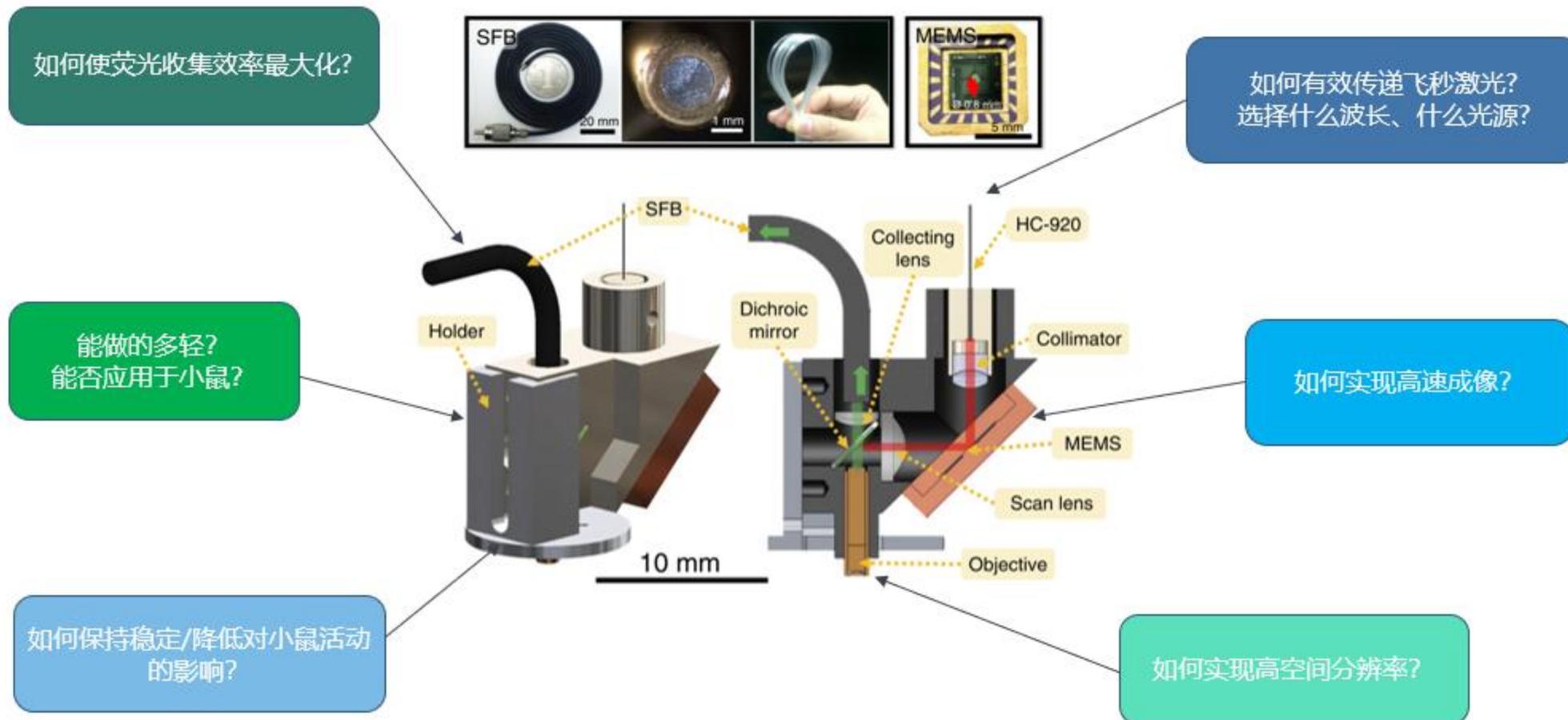
## **FHIRM-TPM**

# 新一代微型化双光子显微镜——2.2g “戴着跑” 的显微镜

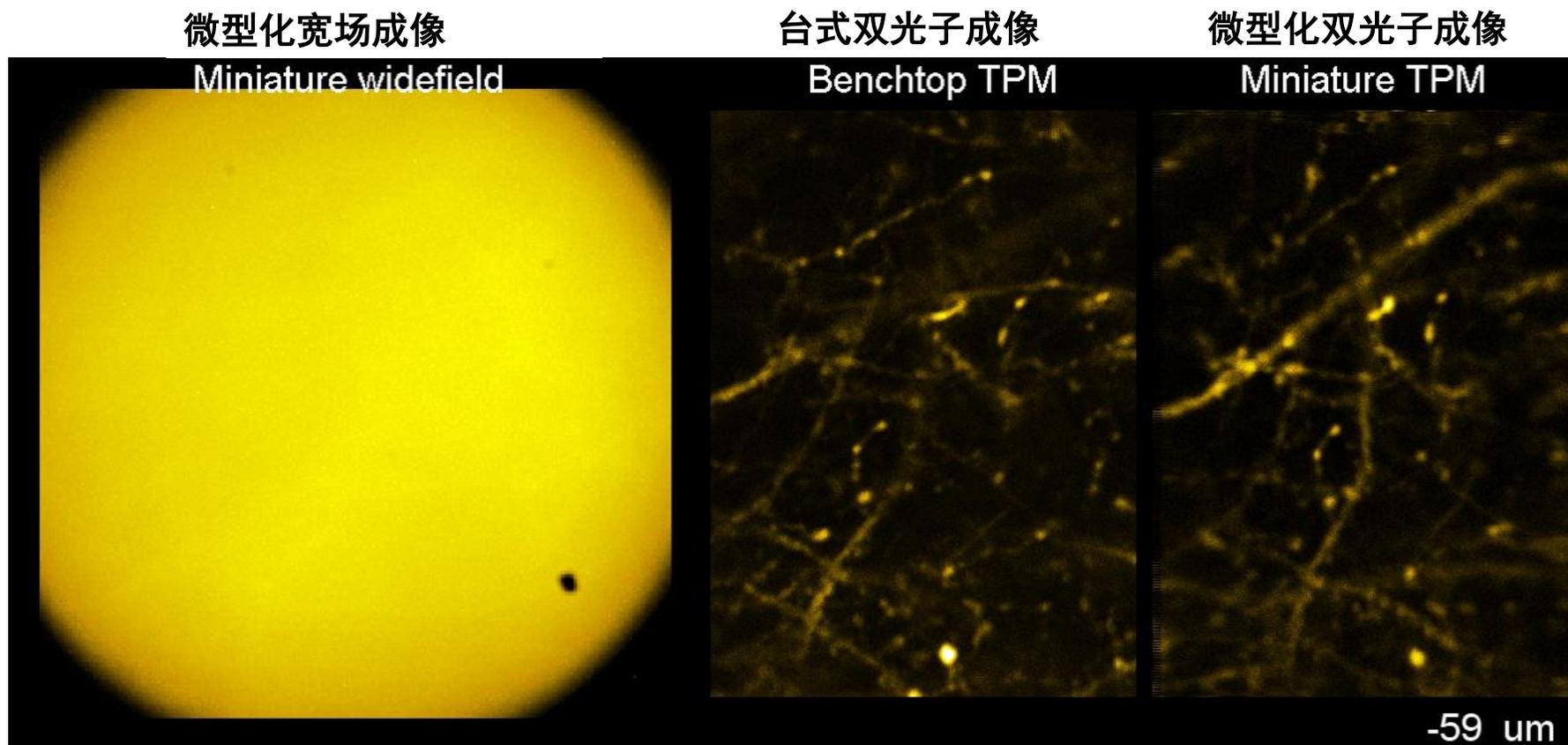
- 国际首次实现自由运动小鼠大脑神经元和神经突触活动清晰稳定的图像



研究成果于2017年7月发表于Nature Methods (IF 25.3)，其相关技术文档同步发表于Protocol Exchange (DIO: 10.1038/protex.2017.048)，并申请了6项国家发明专利和1项国际专利。

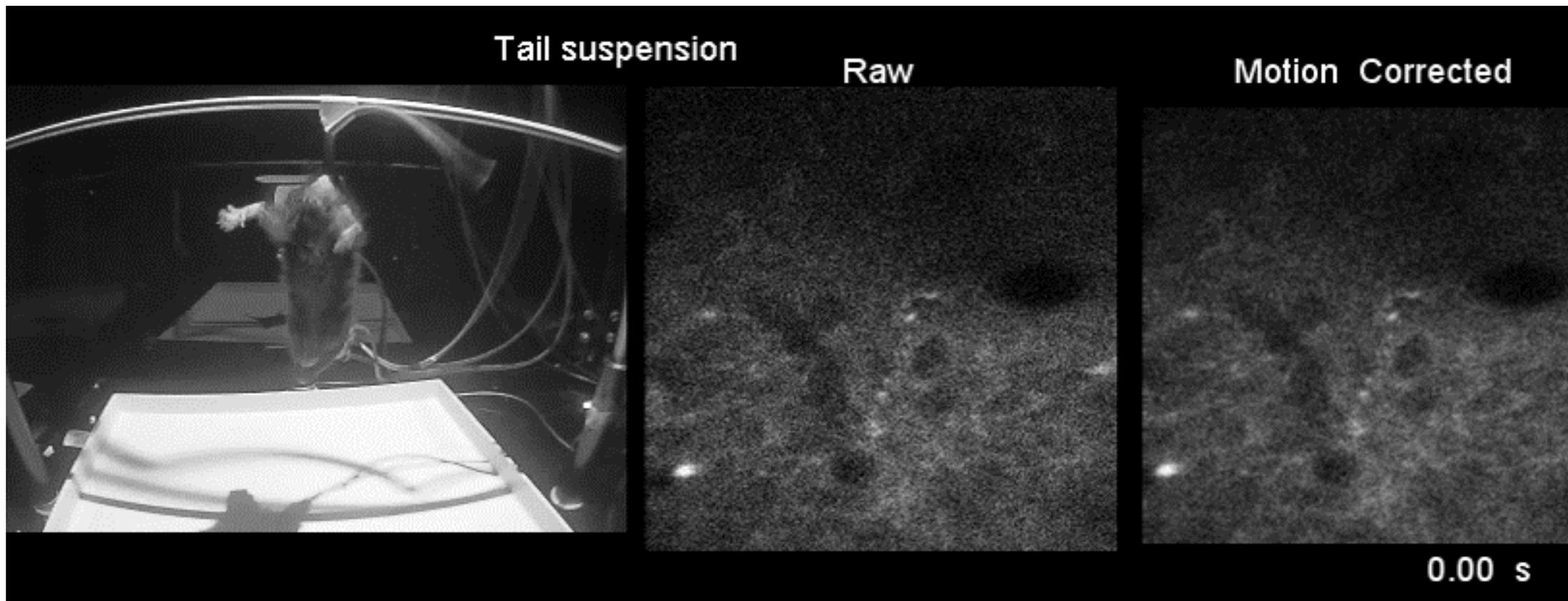


# 对比宽场显微镜、台式双光子和微型双光子



**FHIRM-TMP，分辨率与大型双光子可相比拟，  
远高于商业的微型化单光子显微镜**

# 新的研究范式—小鼠行为学成像



“从任何一个标准来看，**这款显微镜都代表了一项重大技术发明**，必将改变我们在自由活动动物中观察细胞和亚细胞结构的方式。”冷泉港亚洲神经科学会议主席Alcino Silva教授在*Light: Science & Applications* 评述

- 2017年中国科学十大进展
- 2017年中国十大医学科技新闻
- 2017年中国生命科学十大进展
- **2018 *Nature Methods*年度方法“自由行为动物成像技术”，为中国本土科学成果的首次入选**

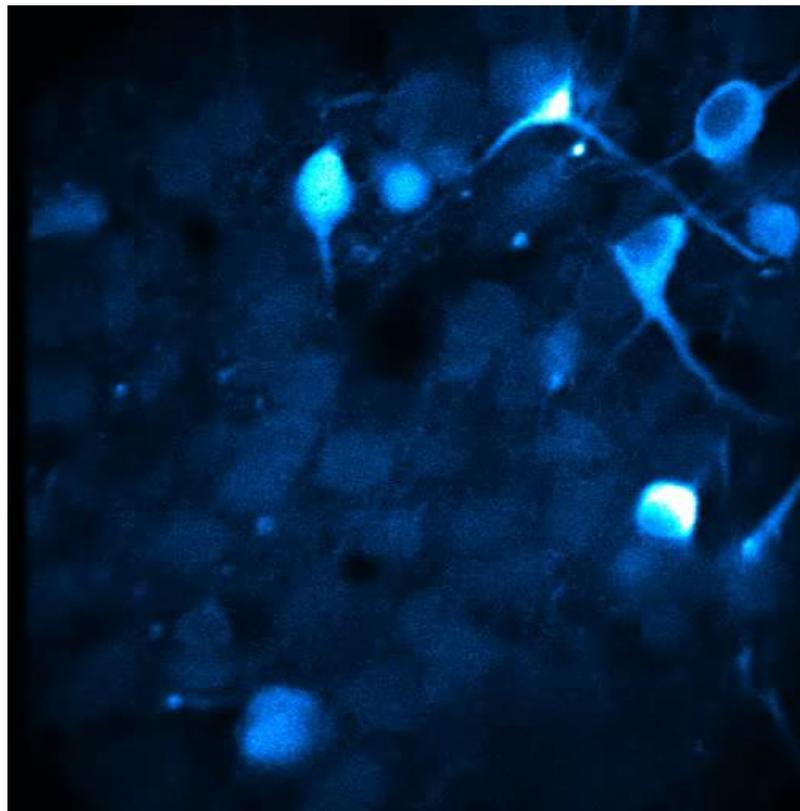




2017年10月，**2014年诺贝尔生物学或医学奖获得者Edvard I. Moser教授**专程访问北大微型化双光子显微镜跨学科联合实验室，他对微型化双光子显微镜给予了很高赞誉，称其将为神经科学研究，特别是他研究的大脑空间定位神经系统提供一个**革命性的新工具**。Moser教授已与北大分子医学研究所签署合作协议，开始深度合作。



Thy-1小鼠神经元细胞树突棘成像



自由运动小鼠前额叶皮层神经元细胞成像  
(hSyn-GCaMP6s病毒注射)

微型成像模块重量:

~2.2g

成像视野:

200 x 200  $\mu\text{m}^2$

**分辨率:**

**$\leq 800 \text{ nm}$**

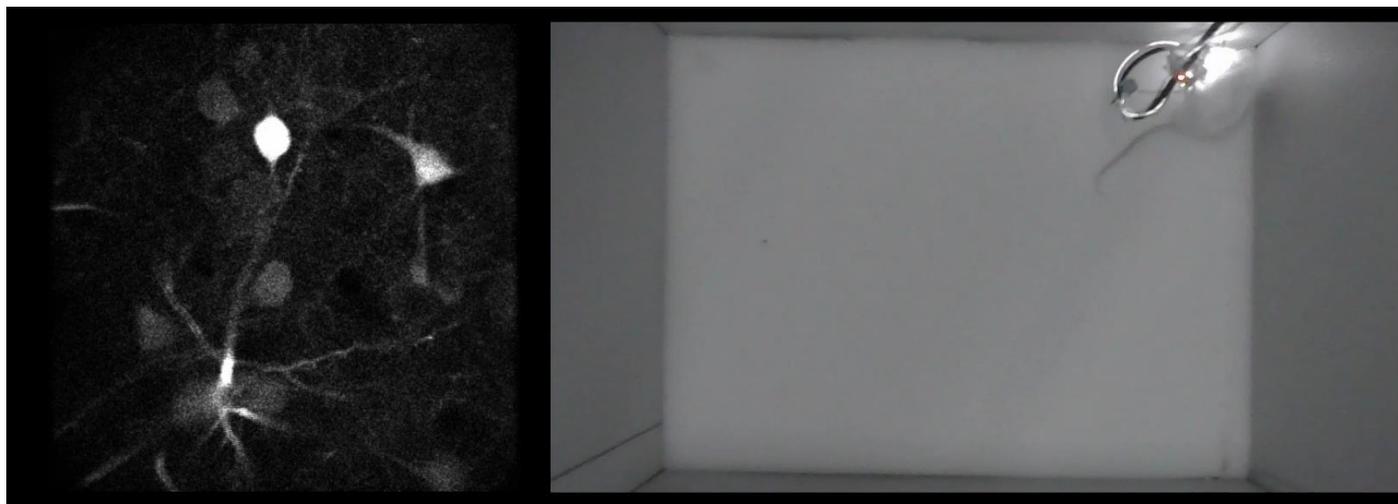
工作距离:

~400 $\mu\text{m}$

成像速度:

20Hz @ 256\* 256

# 小鼠跳跃与社交行为

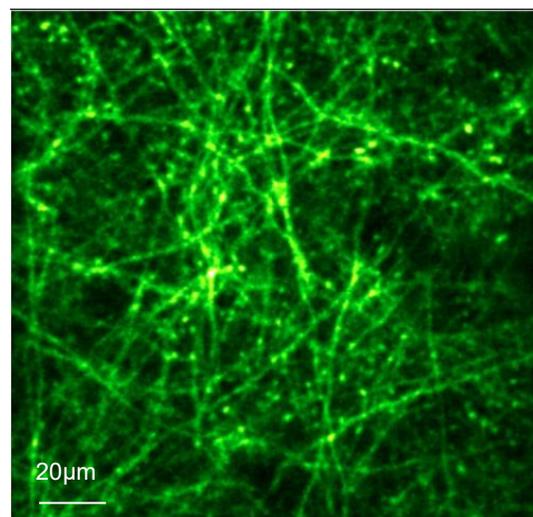
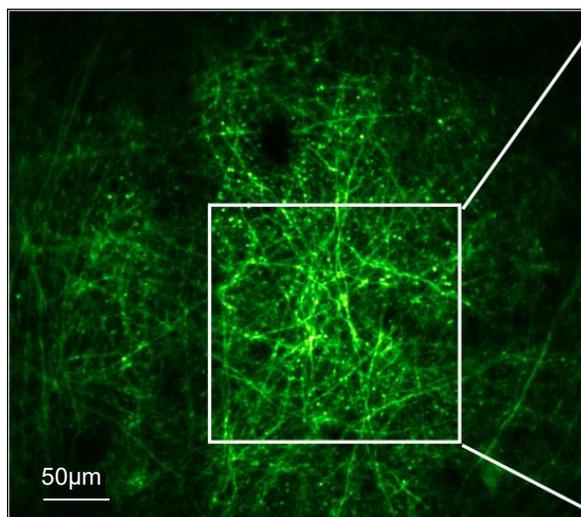




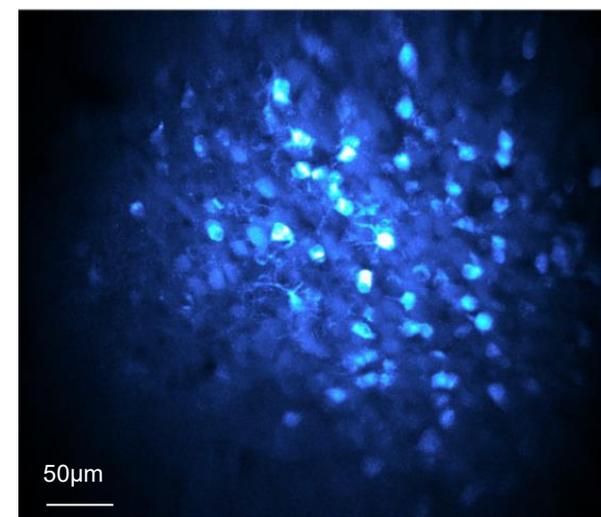
## 多种成像模式

- 配合GRIN lens中继成像
- 不间断连续成像
- 长时程成像
- 多色成像
- 三维成像
- 多通量成像

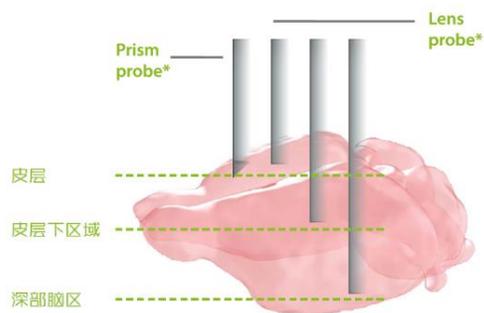
FHIRM-U 成像探头的GRIN lens优化设计，可实现对深部脑区神经细胞的树突棘进行成像



Thy1-YFPH转基因小鼠大脑皮层, 通过GRIN Lens成像



对hSyn-GCaMP6s 病毒注射的小鼠大脑海马神经元成像

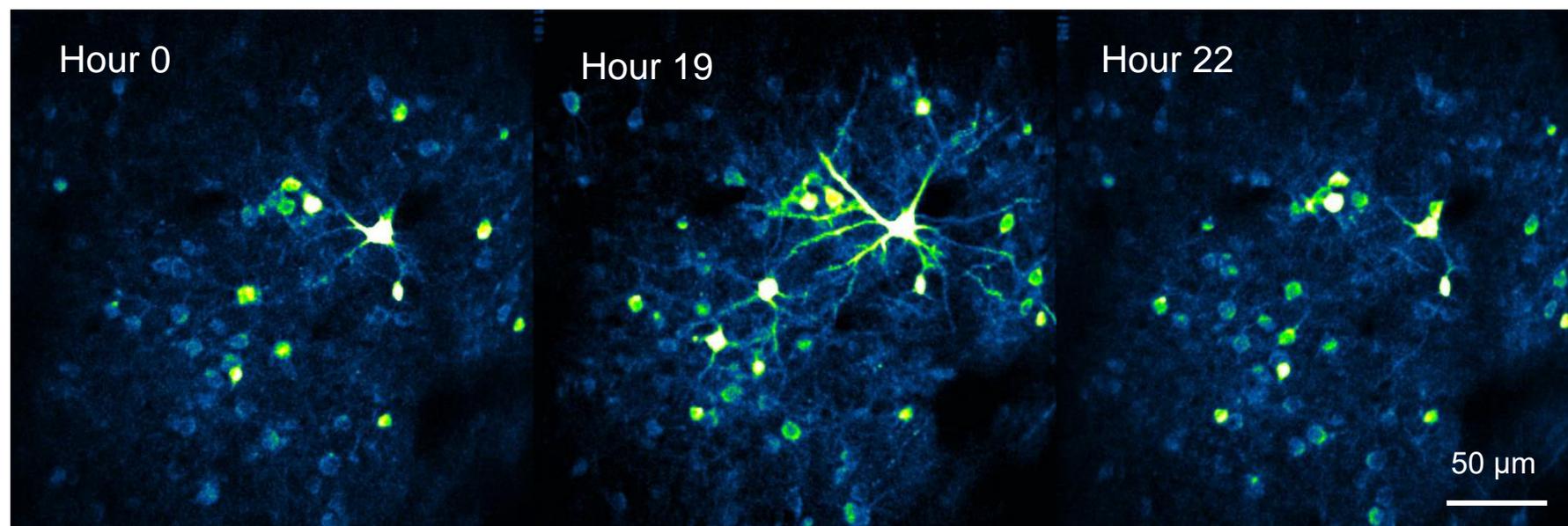




## 多种成像模式

- 配合GRIN lens中继成像
- 不间断连续成像**
- 长时程成像
- 多色成像
- 三维成像
- 多通道成像

以5Hz的拍摄频率进行24小时不间断连续成像



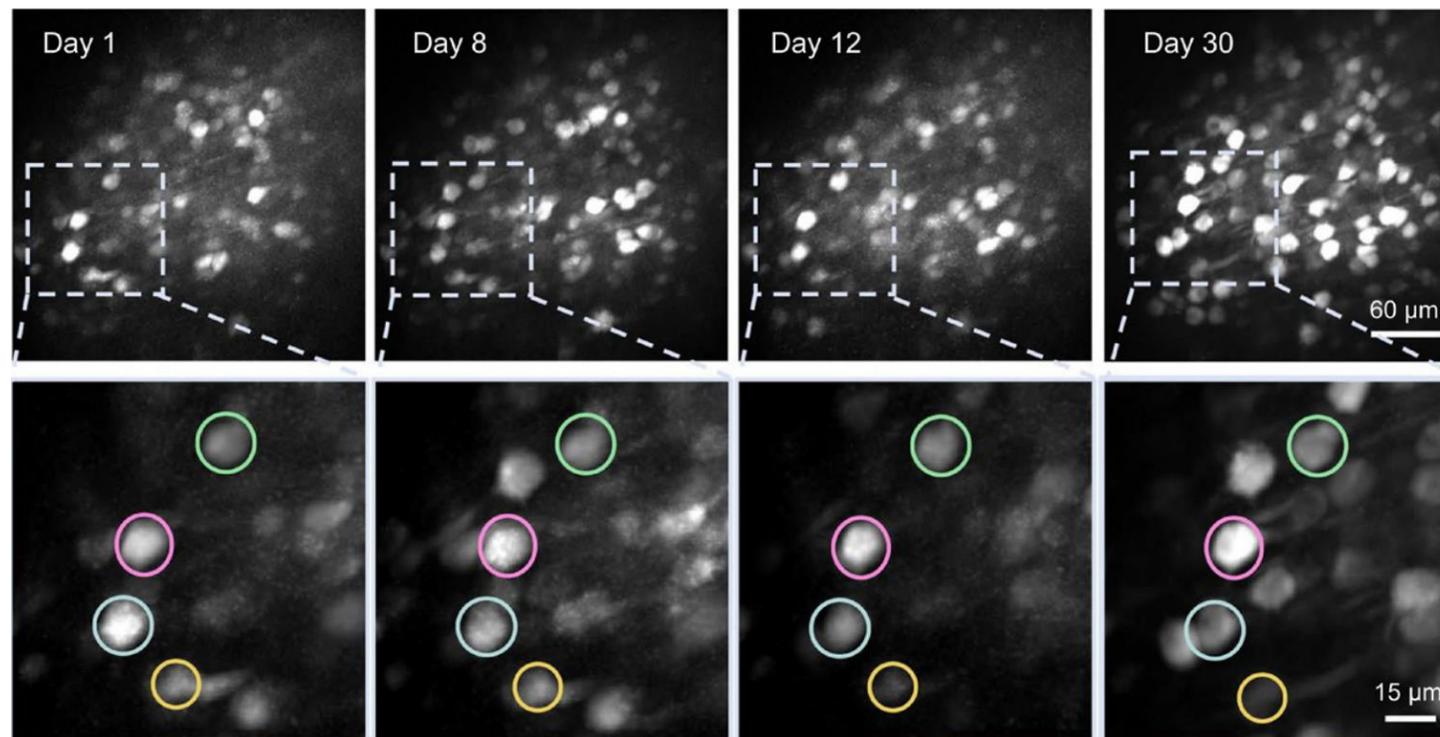
自由运动小鼠前额叶皮层神经元细胞成像 (hSyn-GCaMP6s病毒注射)



## 多种成像模式

- 配合GRIN lens中继成像
- 不间断连续成像
- 长时程成像
- 多色成像
- 三维成像
- 多通量成像

可对同一个神经细胞群体进行长达30天的持续追踪



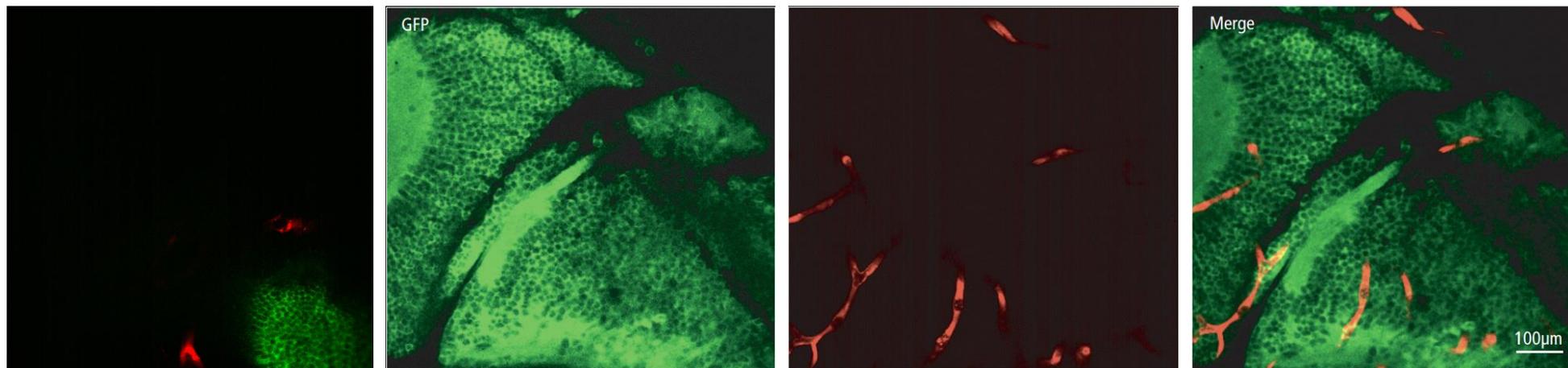
自由运动小鼠皮层神经元细胞成像 (hSyn-GCaMP6s病毒注射)



## 多种成像模式

- 配合GRIN lens中继成像
- 不间断连读成像
- 长时程成像
- 多色成像
- 三维成像
- 多通量成像

使用配备920nm激光器的FHIRM-U实现双通道激发及成像



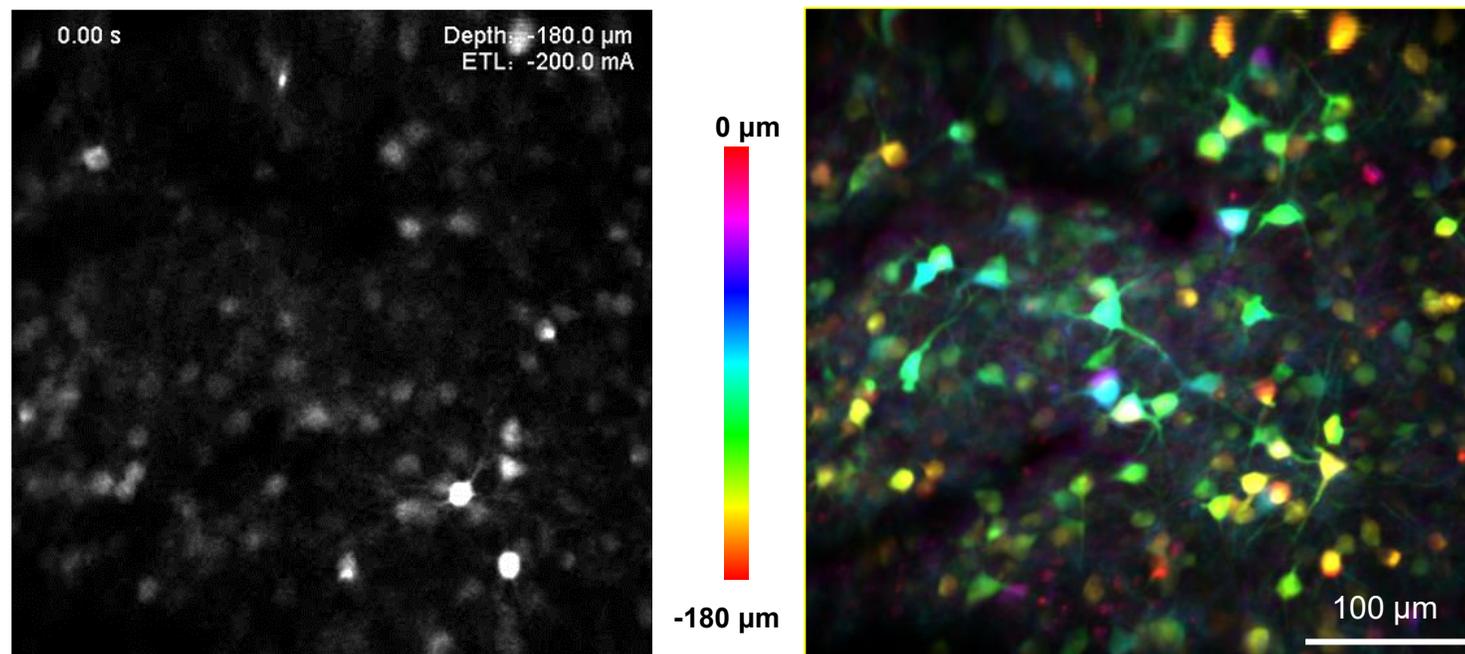
斑马鱼中用GFP标记的神经细胞和用mCherry标记的血管



## 多种成像模式

- 配合GRIN lens中继成像
- 不间断连读成像
- 长时程成像
- 多色成像
- 三维成像**
- 多通量成像

采集不同焦平面的图像



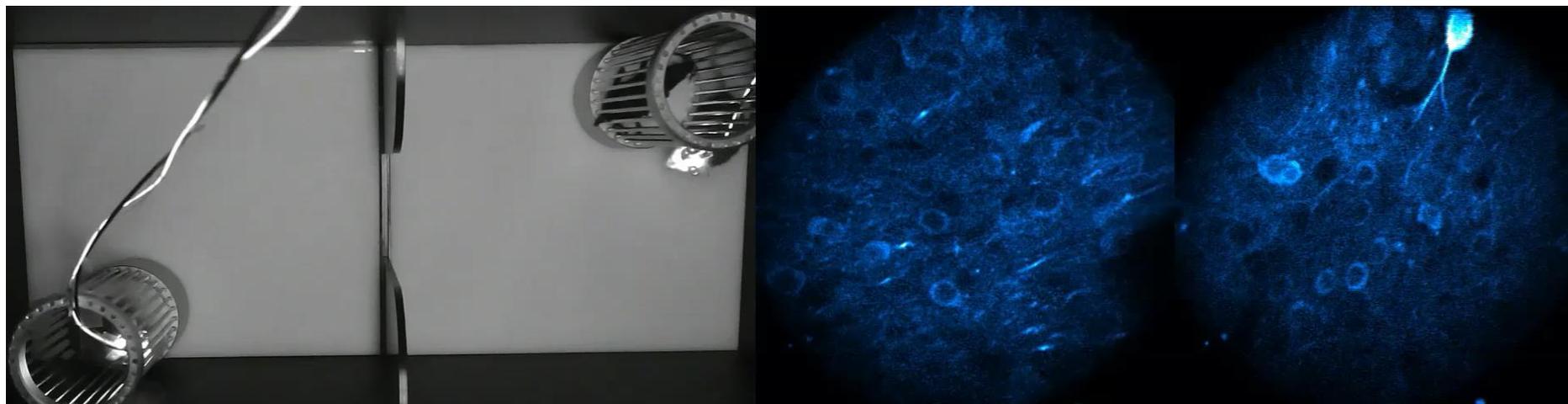
# 动物自由行为下的卓越成像功能



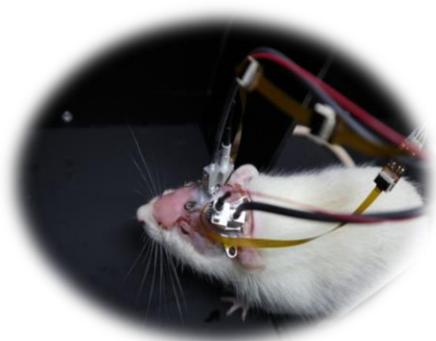
## 多种成像模式

- 配合GRIN lens中继成像
- 不间断连续成像
- 长时程成像
- 多色成像
- 三维成像
- 多通量成像

两个或多个显微成像模块同步实时记录，实现多个动物或同一动物多脑区同时成像



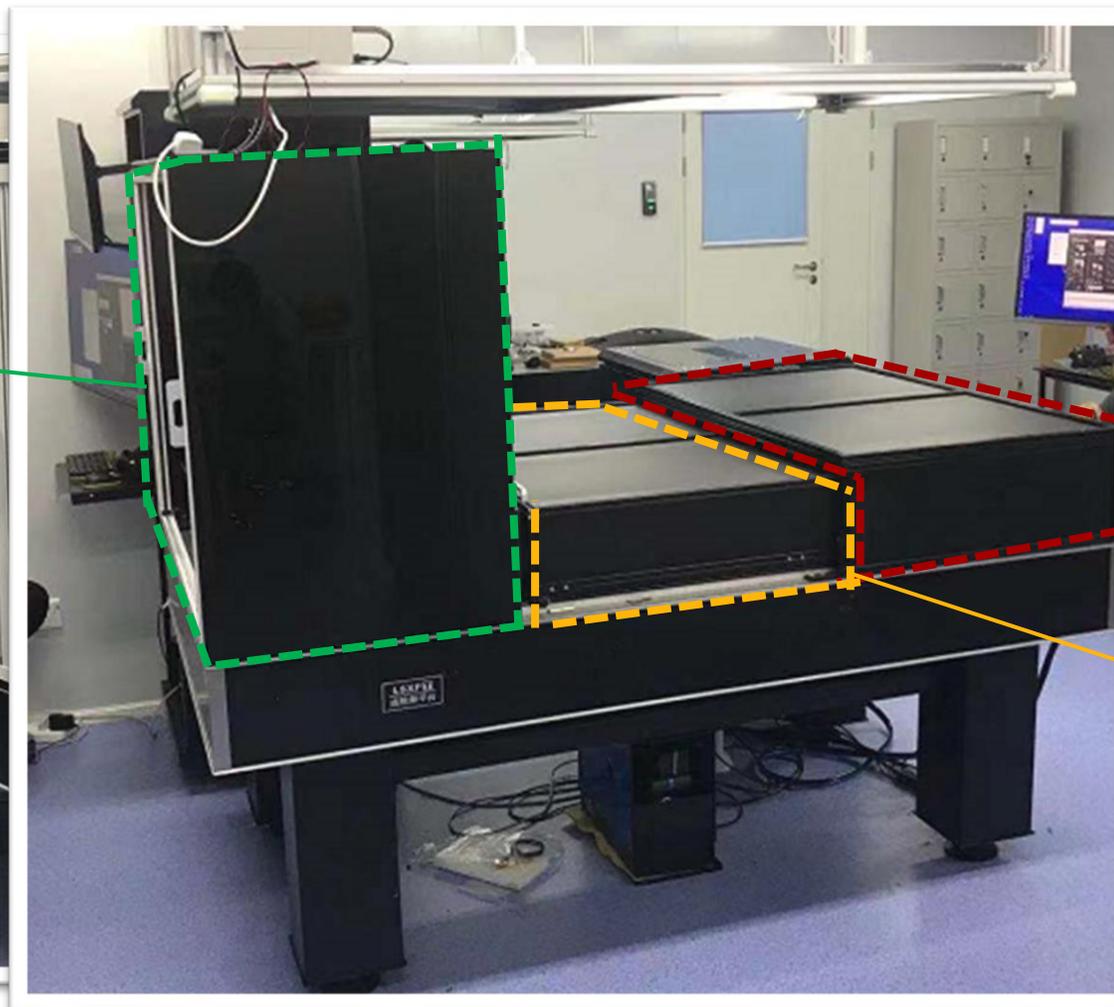
hSyn-GCaMP6s病毒注射自闭症模型小鼠,记录前额叶prl区神经元活动



# 高时空分辨双光子荧光显微镜（台式+微型化双系统）



微型化及  
台式显微镜



光源模块

合束及  
分束模块

# 成像系统激发光源

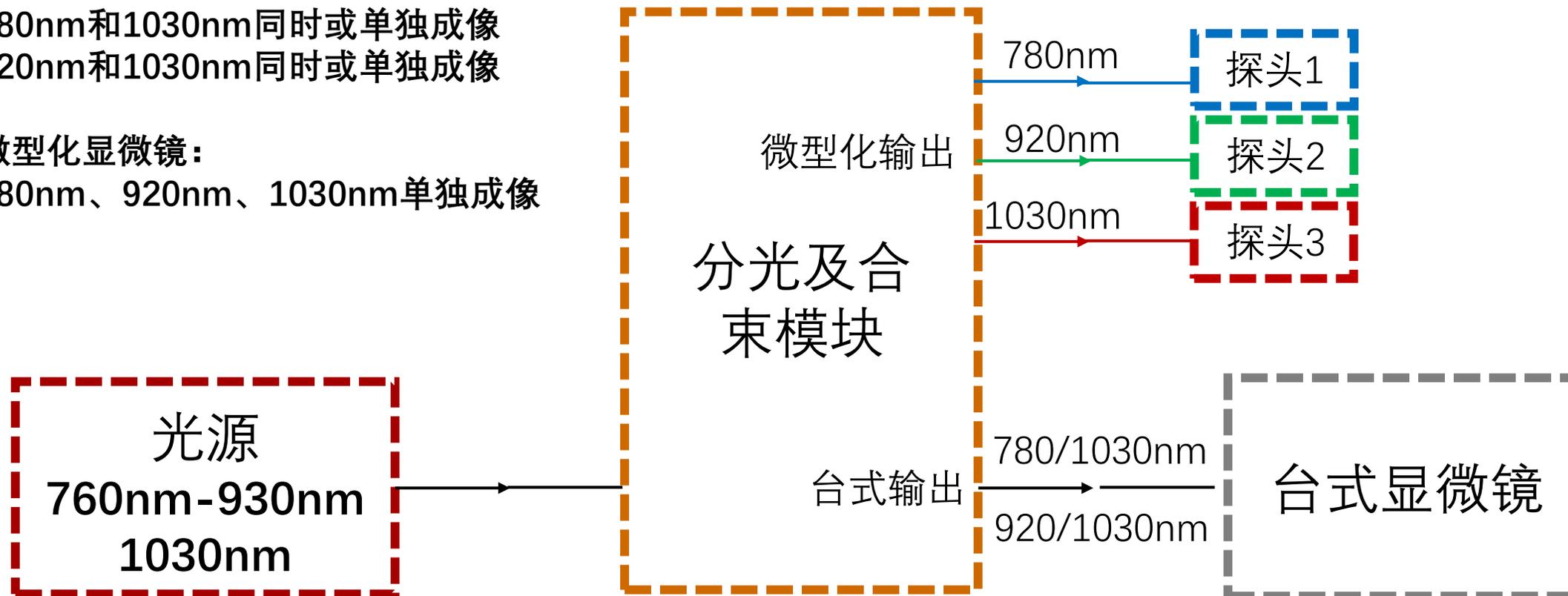
台式双光子显微镜:

780nm和1030nm同时或单独成像

920nm和1030nm同时或单独成像

微型化显微镜:

780nm、920nm、1030nm单独成像



# 台式双光子荧光显微镜

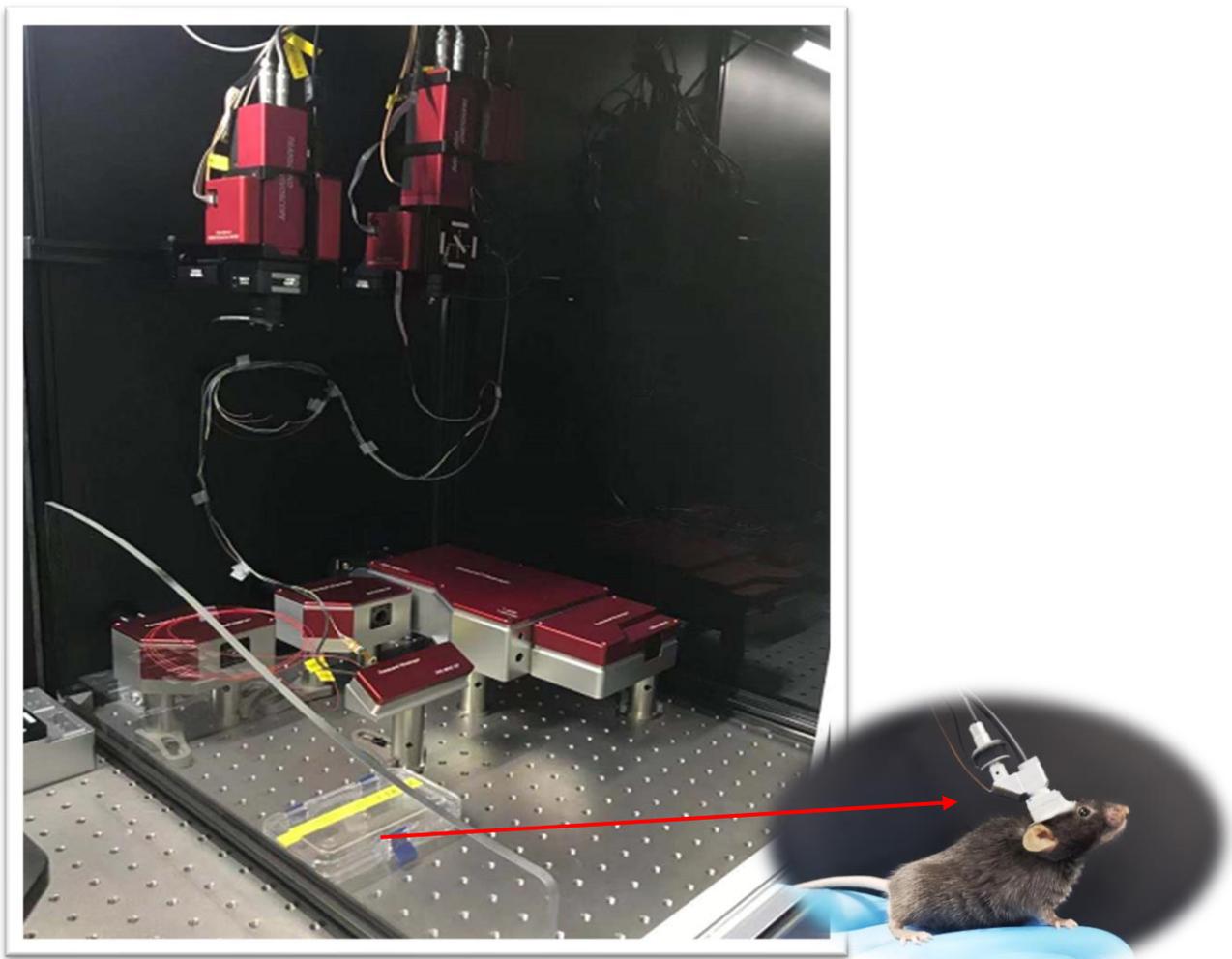


台式双光子成像系统

## 核心参数

分辨率	550nm
视场	800 $\mu$ m*800 $\mu$ m
扫描速度	1.5 Hz @ 512 $\times$ 512像素
工作距离	2mm
物镜数值孔径 (NA)	1.0
物镜放大倍数	20x
激发光	780nm和1030nm同时或单独成像 920nm和1030nm同时或单独成像
成像模式	固定成像

# 微型化双光子荧光显微镜



微型化双光子成像系统

## 核心参数

重量	2.2g
体积	9mm*15mm*17mm
分辨率	800nm
视场	200 $\mu$ m*200 $\mu$ m
扫描速度	10 Hz @ 512 $\times$ 512像素, 20 Hz @ 256 $\times$ 256像素
工作距离	~400 $\mu$ m
激发光	780nm、920nm、 1030nm单独成像
成像模式	固定及自由运动成像



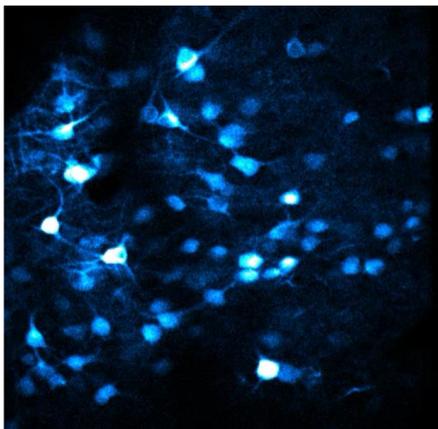
超维景  
TRANSCEND VIVOSCOPE

# 基于微型化双光子的技术体系和应用

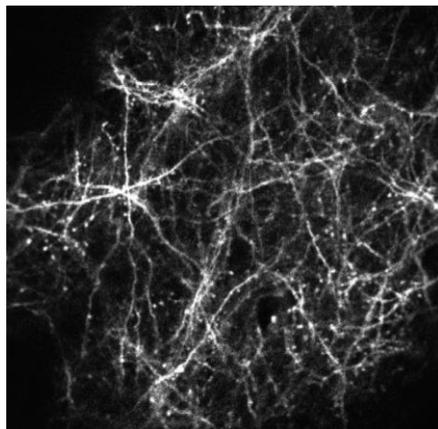
中枢神经系统

1. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice. *Nat Methods*. **2017** Jul;14(7):713-719. **(IF=47.99)**
2. An optimized acetylcholine sensor for monitoring in vivo cholinergic activity. *Nat Methods*. **2020** Nov;17(11):1139-1146. **(IF=47.99)**
3. Miniature Fluorescence Microscopy for Imaging Brain Activity in Freely Behaving Animals. *Neurosci Bull*. **2020** Oct;36(10):1182-1190. **(IF=5.203)**
4. Miniature two-photon microscopy for enlarged field-of-view, multi-plane and long-term brain imaging. *Nat Methods*. **2021** Jan;18(1):46-49. **(IF=47.99)**
5. Dynamics of a disinhibitory prefrontal microcircuit in controlling social competition. *Neuron*. **2021** Nov 17;S0896-6273(21)00864-3. **(IF=18.687)**
6. Itch perception is reflected by neuronal ignition in the primary somatosensory cortex. *National Science Review*, **2021**, nwab218. **(IF=23.178)**
7. Functional network topography of the medial entorhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2022** Feb 15;119(7):e2121655119. **(IF=12.778)**
8. Encoding of social novelty by sparse GABAergic neural ensembles in the prelimbic cortex. *Sci Advances*. **2022** Aug 31; DOI: 10.1126/sciadv.abo4884. **(IF=14.979)**
9. Long-term two-photon imaging of spinal cord in freely behaving mice. *BioRxiv*. **2022** Jan 11. DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.01.09.475306>.
10. Visualizing Seizure Propagation in Freely-moving Mice via Miniature Two-photon Microscopy. *Neurosci Bull*. **2022** Sep 38:1593-1597. **(IF=5.203)**
11. In situ multimodal transparent electrophysiological hydrogel for in vivo miniature two-photon neuroimaging and electrocorticogram analysis. *Acta Biomater*. **2022** Oct 152: 86-99. **(IF=10.634)**
12. A nociceptive neuronal ensemble in the dorsomedial prefrontal cortex underlies pain chronicity. *Cell Rep*. **2022** Dec 13;41(11):111833. **(IF=9.995)**

# 中枢神经系统成像对象



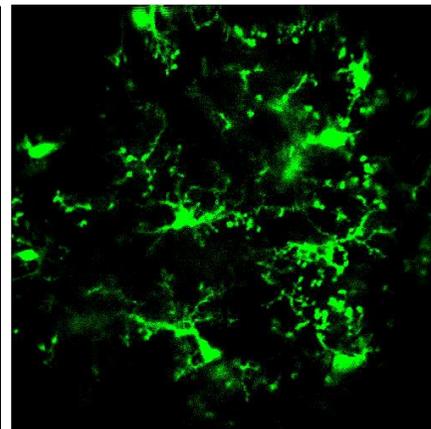
神经元



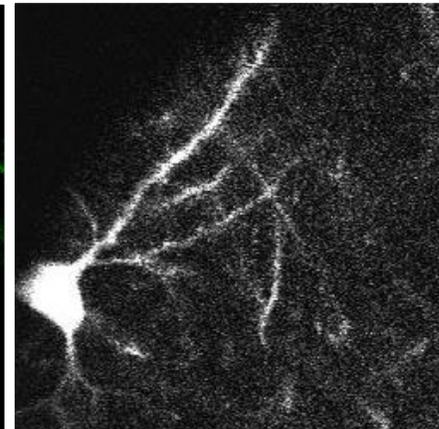
树突及树突棘成像



星形胶质细胞



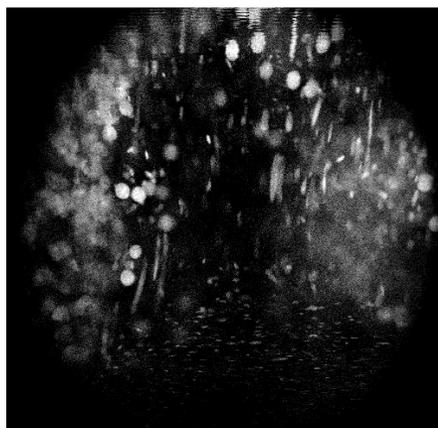
小胶质细胞



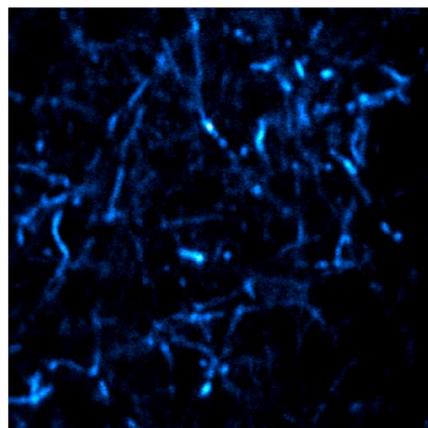
神经调质  
(图示谷氨酸探针)



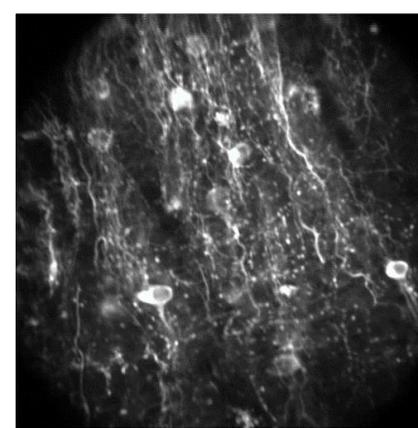
血管血流



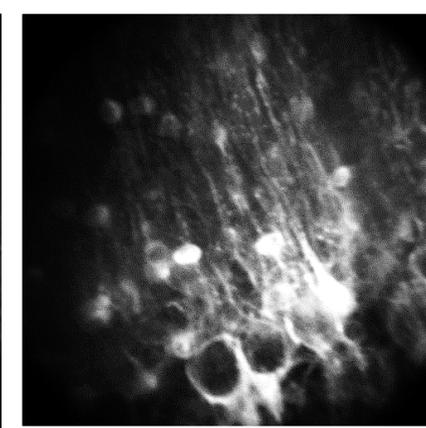
血液细胞



线粒体



小鼠小脑不同深度细胞成像  
(图示浦肯野神经元)



## 模态多样性



EEG/EMG与双光子同步记录



光遗传与双光子同步记录

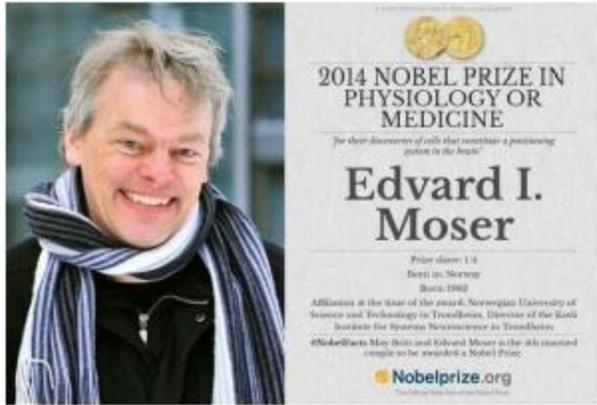


浅层导管给药与双光子同步记录

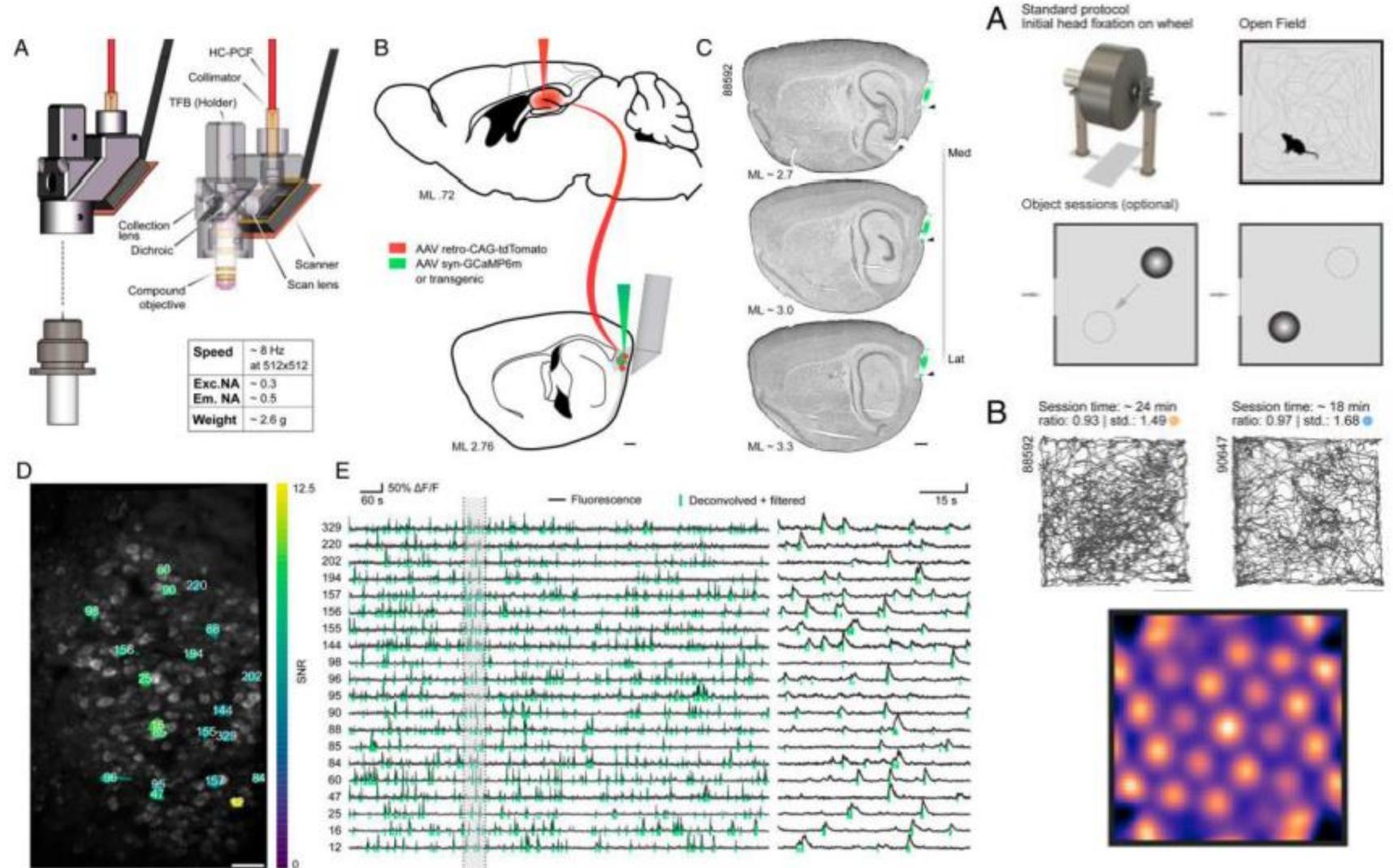


深层套管针给药与双光子同步记录

# 解析网格神经元的三维结构

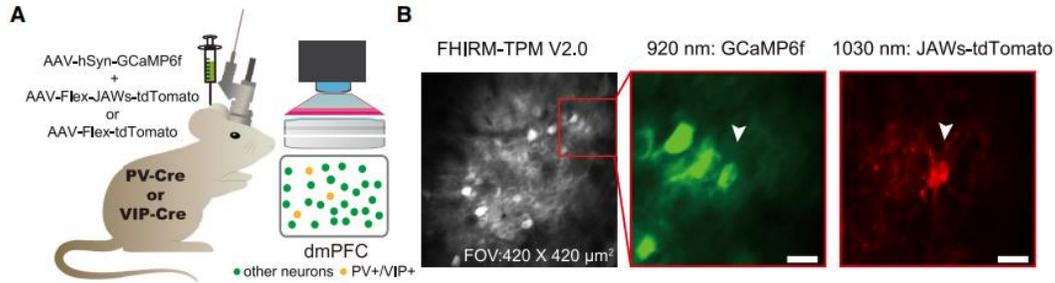


Moser因为发现了大脑的定位系统，即“内部的GPS”，获得2014年诺贝尔生理学或医学奖。

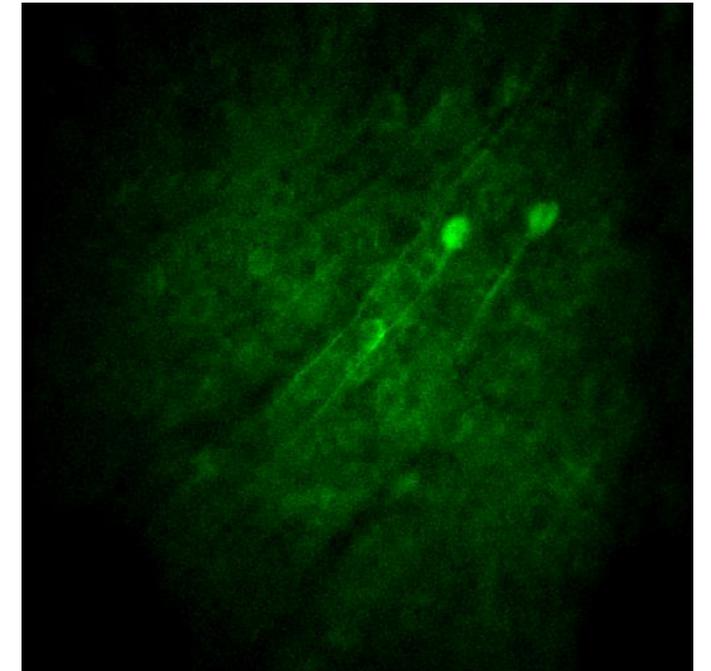
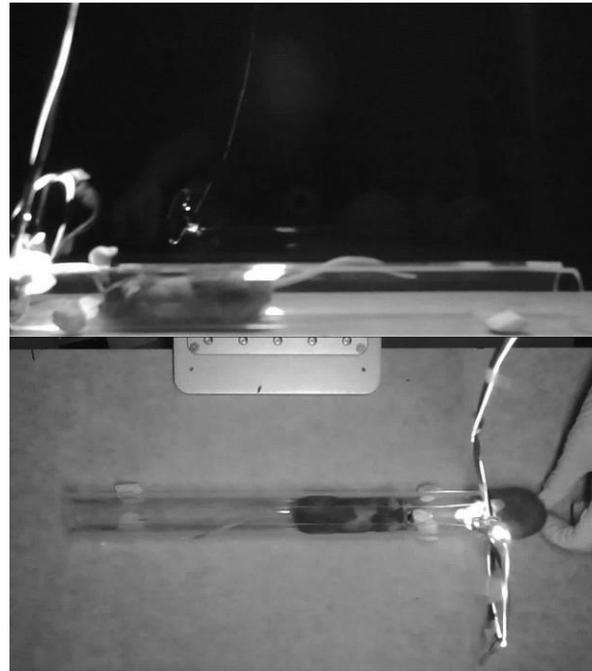
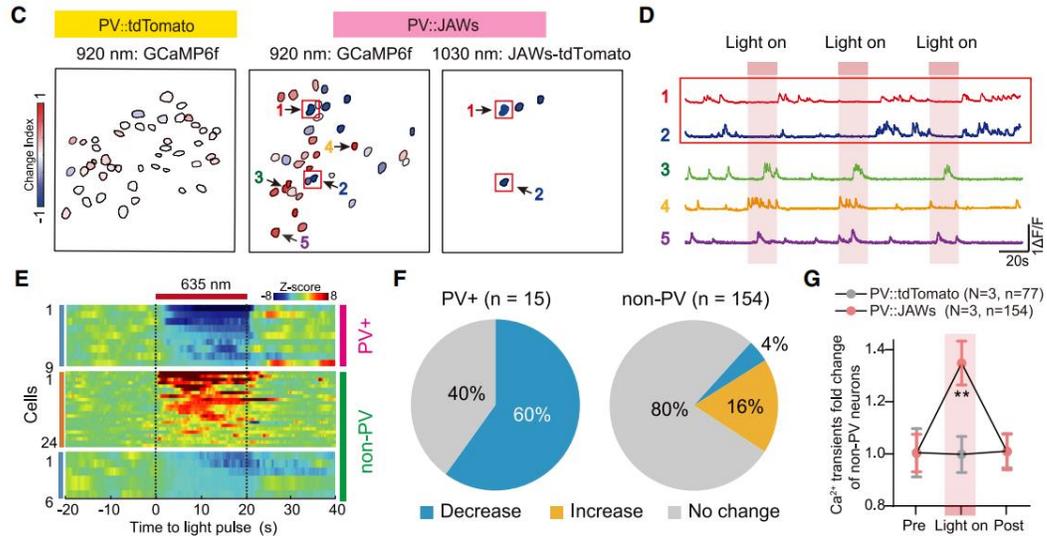


# 结合光遗传学研究竞争行为的神经微环路解构—浙大胡海岚教授

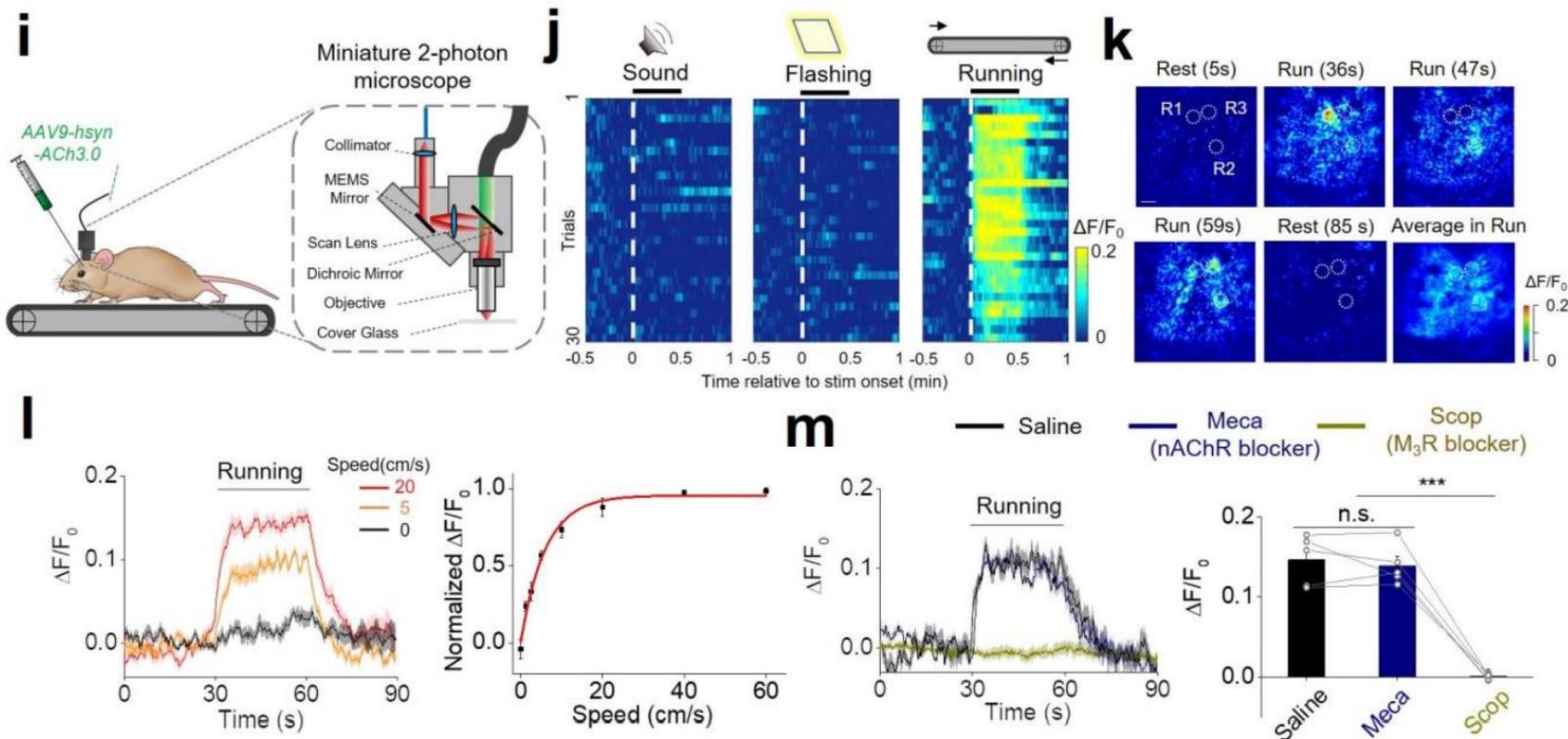
- 结合双色成像与光遗传操纵模块，微型双光子显微镜能够对特定类群神经元进行操纵的同时，还能记录不同类群神经元的活动变化。



## dmPFC activity upon optogenetic inhibition of PV neurons

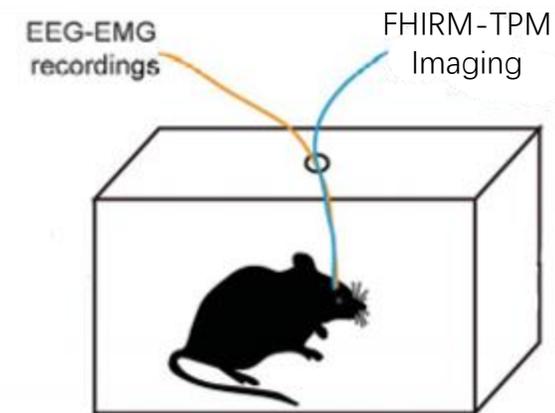
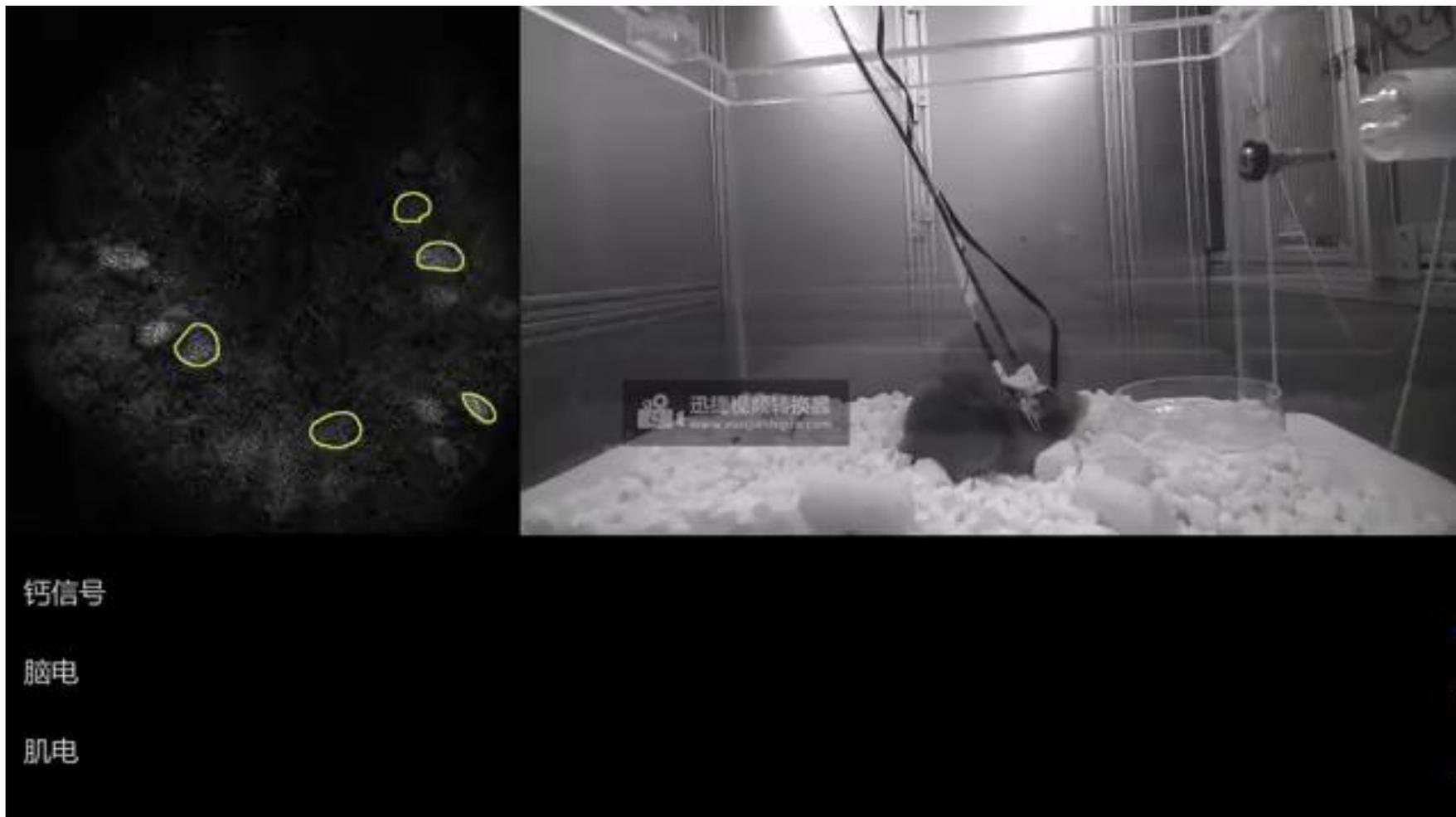


# 新型乙酰胆碱探针在体应用——北大李毓龙教授



采用多种模态的神经信号记录方式证实了ACh探针更好的细胞类型特异性

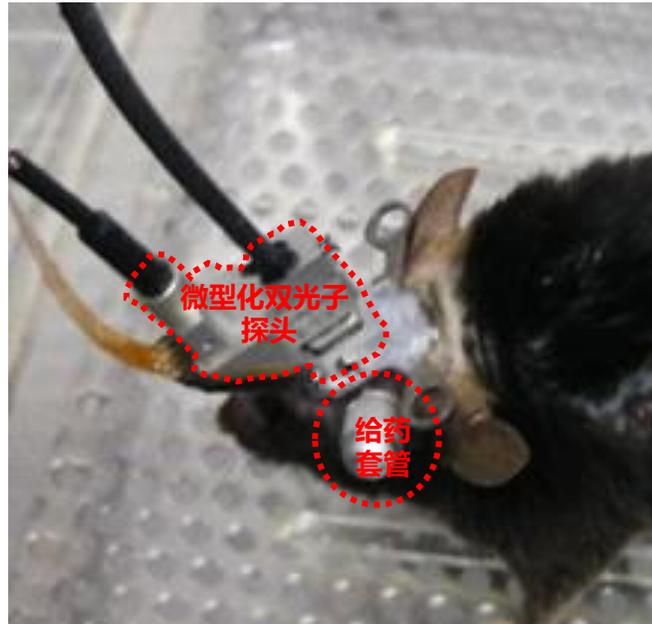
# 基础科研：睡眠-觉醒状态转化神经元钙信号和脑电信号研究



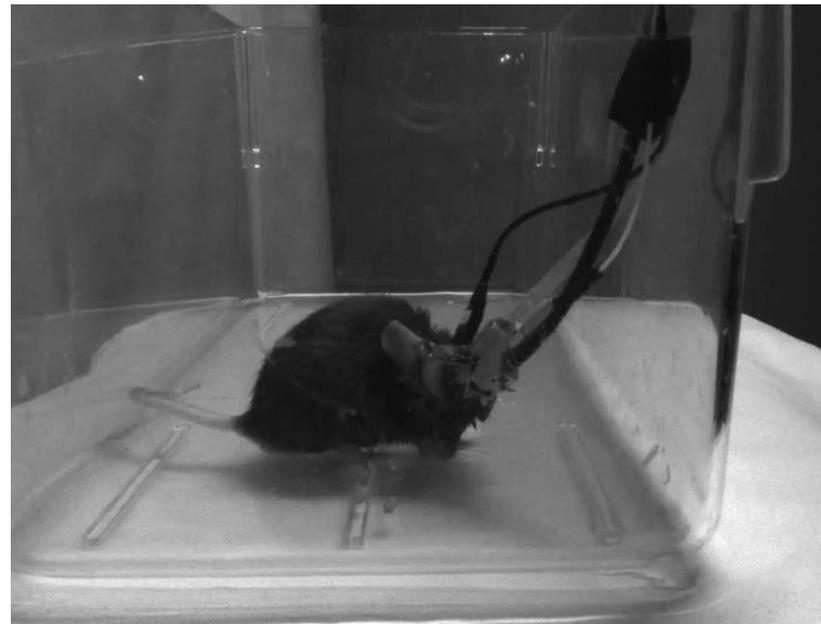
鼠睡眠觉醒过程中 钙信号，脑电信号和肌电信号联合记录

# 疾病研究：药物诱导癫痫发作模型的神经元活动研究

- 建立颅内给药结合双光子同步记录方法，药物诱导的癫痫发作模型中，利用FHIRM-TPM同时监测神经元钙活动情况和动物的癫痫发作等级
- 更加精细化的区分不同癫痫发作等级时海马区的神经元钙活动，重新定义癫痫疾病中神经元活动范式

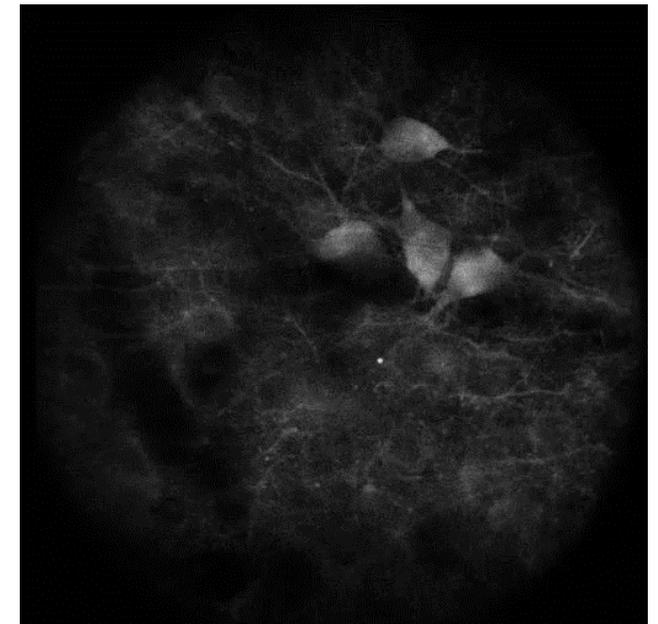


实时给药套管与双光子同步记录



癫痫发作

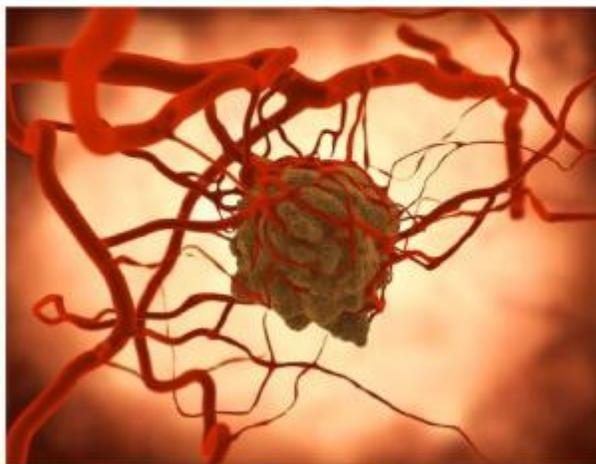
FHIRM-TPM: Visualized Video



KA注射后的癫痫发作

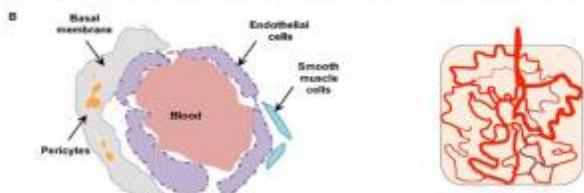
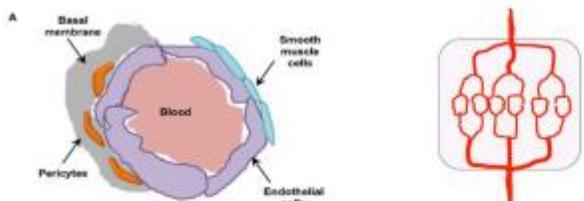
Cell video is Unpublish data

# 脑肿瘤增殖过程中内部血管系统的生成

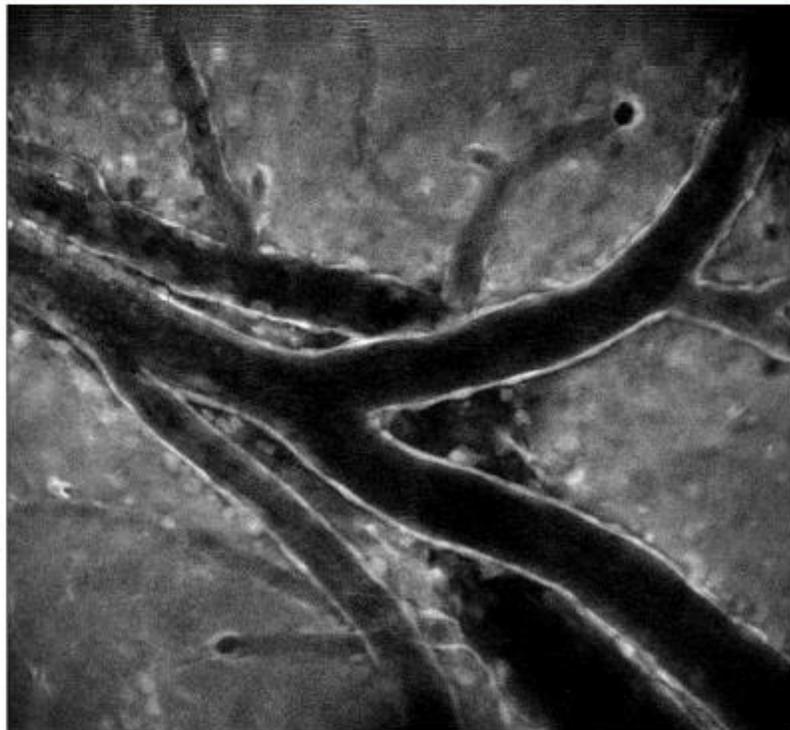


(Copyright: Juan Gaertner via 123rf)

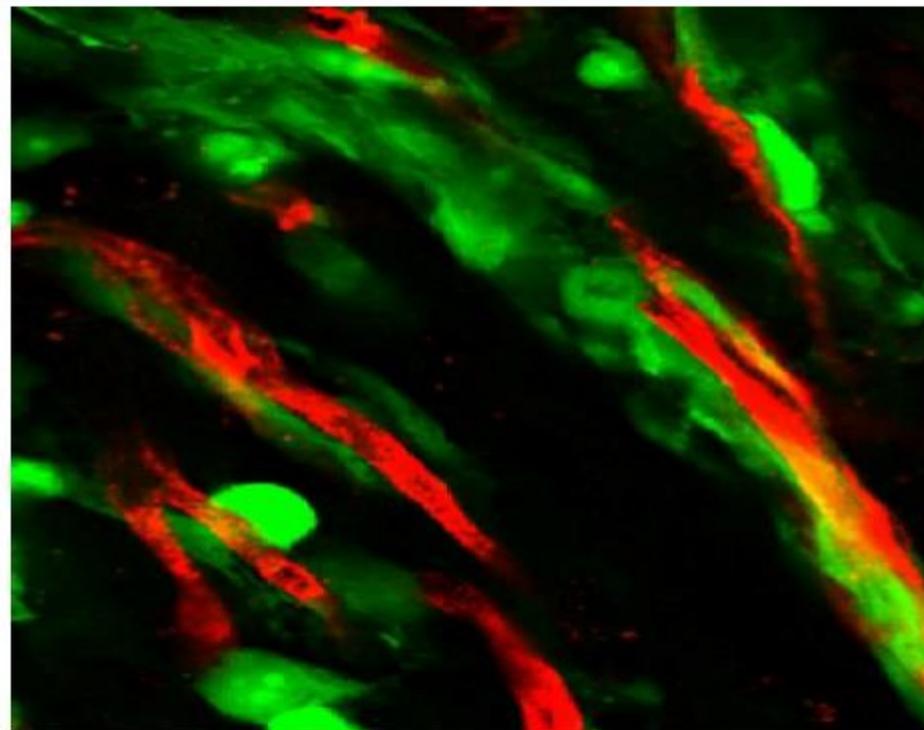
肿瘤细胞借助宿主的物质来合成自己的血管系统，为形成的肿瘤实体提供养分



肿瘤微血管系统和正常的微血管系统在形态结构上具有显著不同

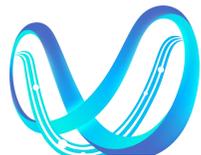


借助微型化双光子显微镜可以实现活体实时血管成像



血管（红色）和沿血管迁移的肿瘤细胞（绿色）

**最终应用预期：形成一套可以用于活体肿瘤药物有效性评估的技术体系**



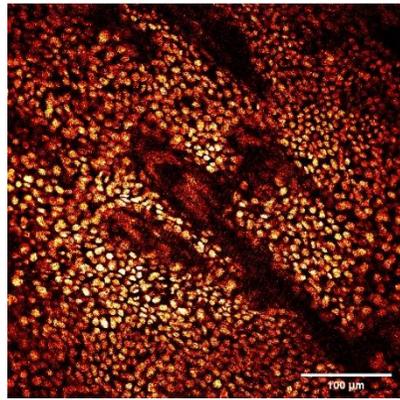
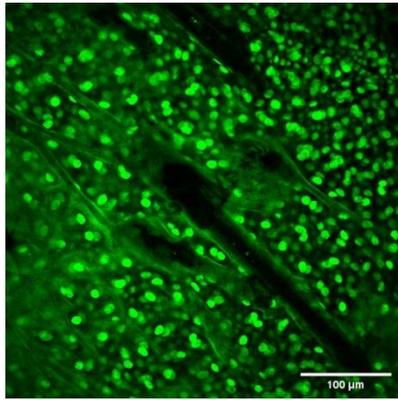
超维景  
TRANSCEND VIVOSCOPE

# 基于微型化双光子的技术体系和应用

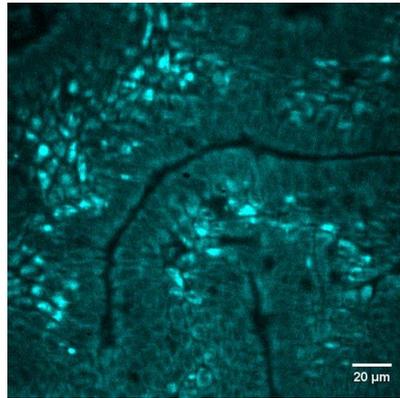
外周活体应用

# 外周脏器的多领域应用

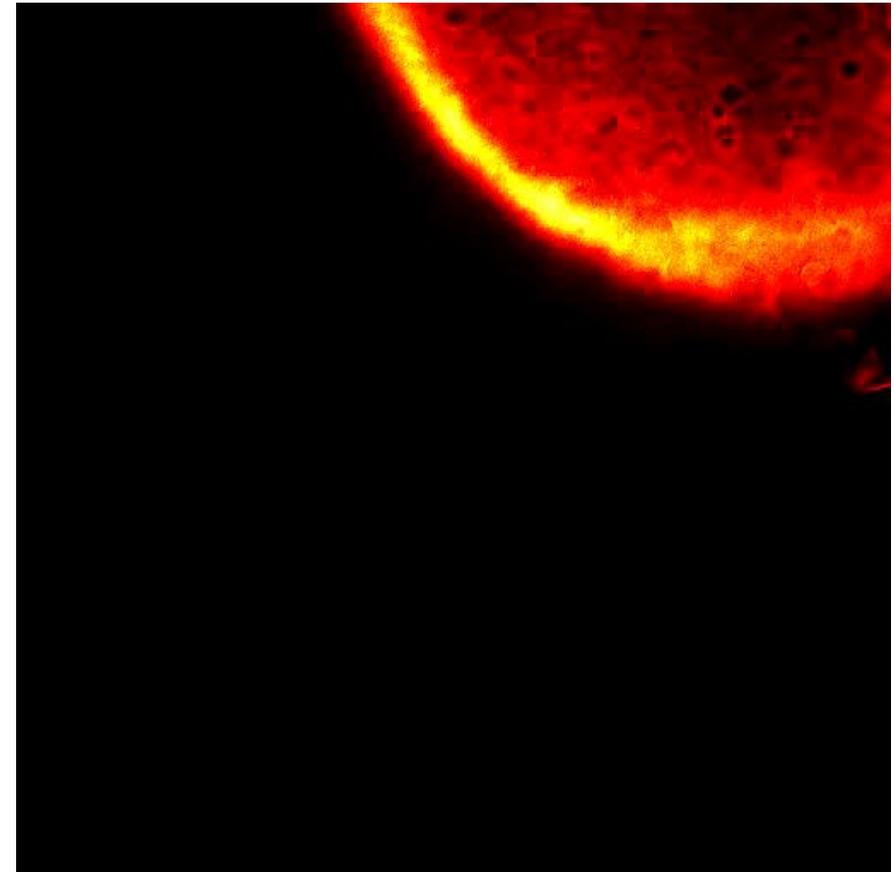
小鼠背部皮肤毛囊结构：采用GFP和RFP进行标记



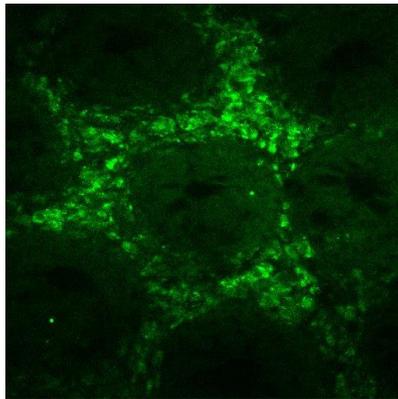
离体兔肠道  
内壁细胞成像



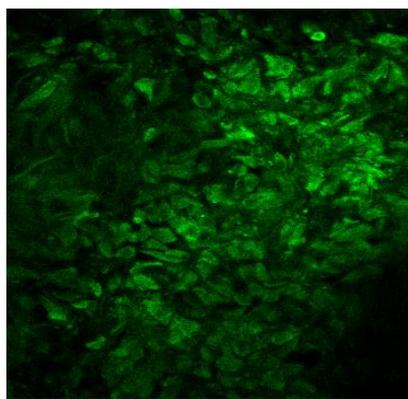
小鼠罗丹明染色眼球结构成像



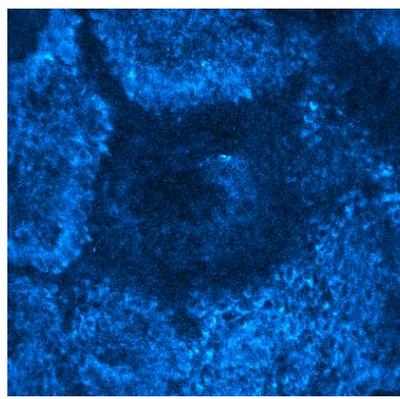
小肠外壁绒毛细胞成像



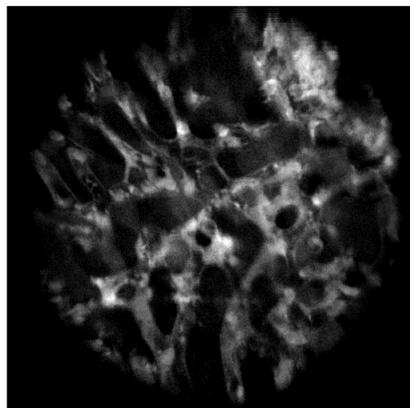
裸鼠胃部上皮细胞成像



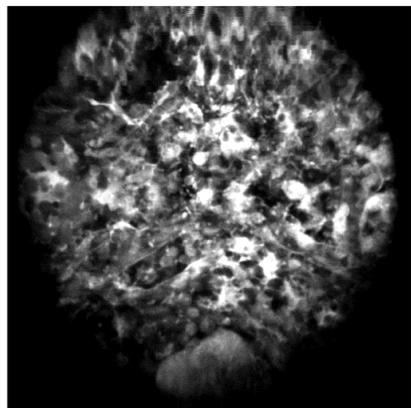
在体人体皮肤成像



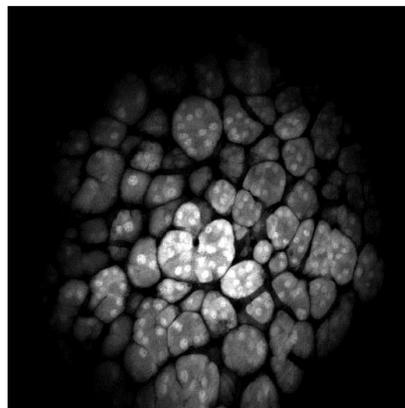
## $\beta$ -actin-GFP转基因小鼠



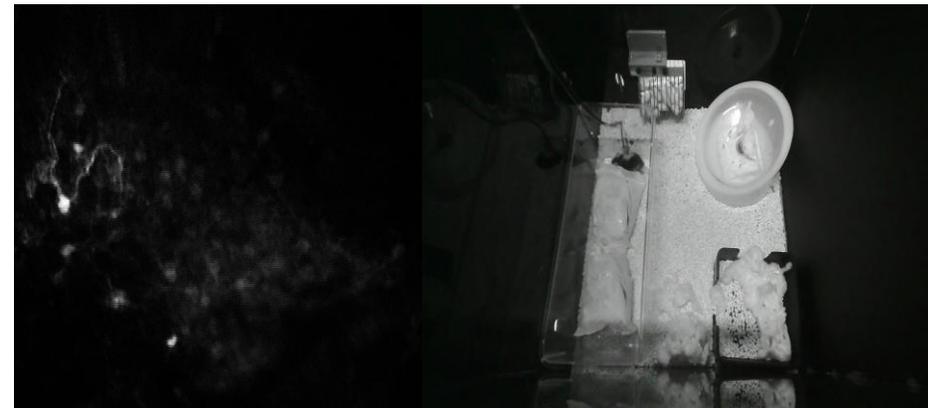
肝脏



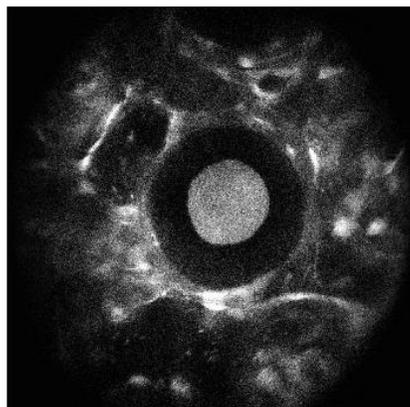
脾脏



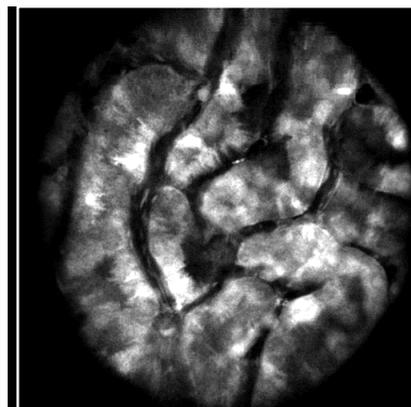
胰腺



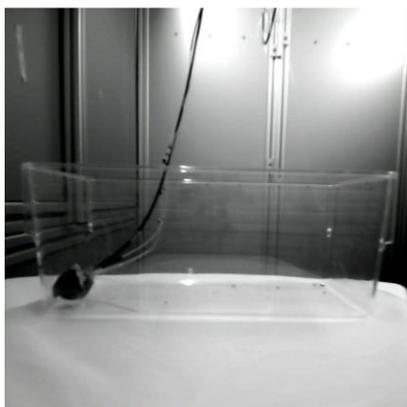
脊髓



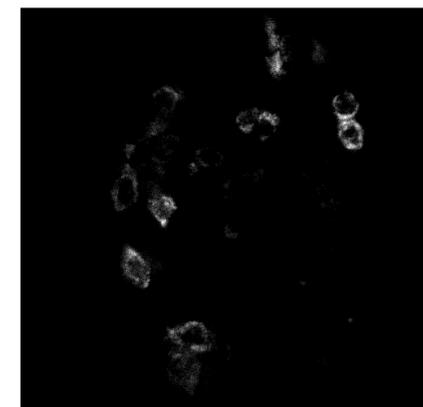
卵巢



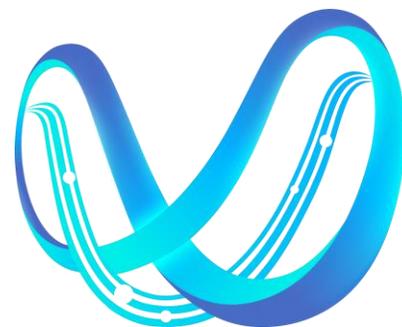
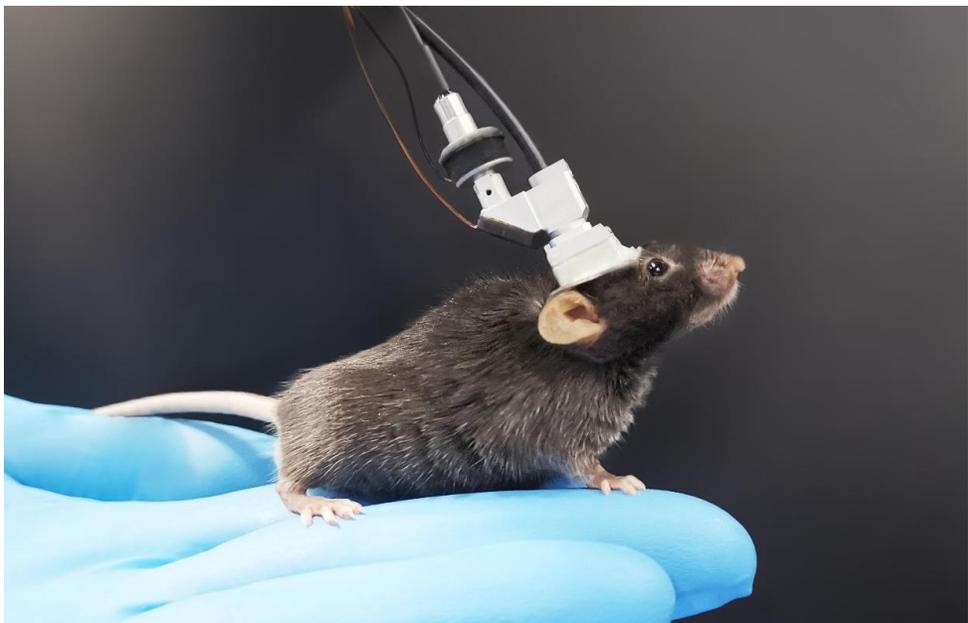
肾脏



皮下肿瘤



脑部肿瘤



**超维景**  
TRANSCEND VIVOSCOPE

**李西睿**

电话：15810456939 、 微信 xzrx369

邮箱：lixirui@tvscope.cn

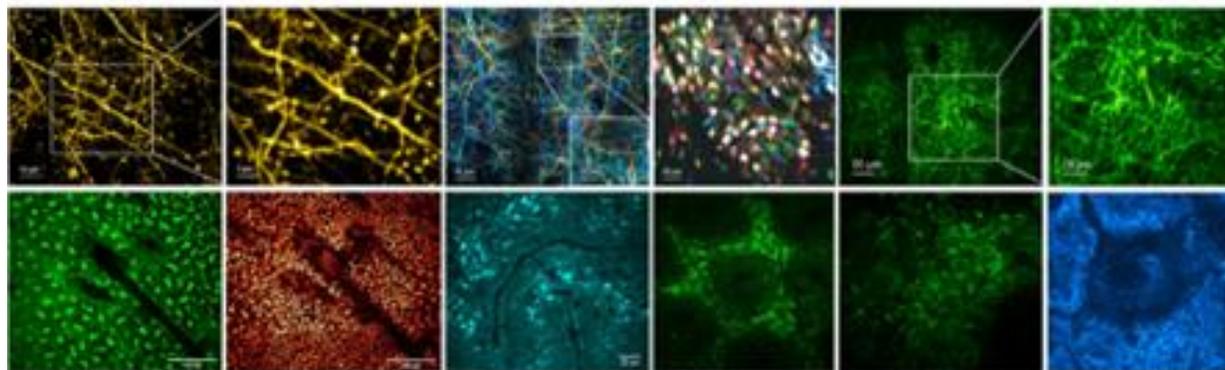
**谢 谢 ！**

## 自由行为下的卓越显微成像

——微型化超高时空分辨双光子荧光显微镜

### ▶ 培训安排

日期	时间	地点	培训内容
2023年6月14日	10:00-11:30	实验楼 202 会议室	成像原理及应用
2023年6月15日	09:00-12:00	公共平台103-2室	上机培训
2023年6月16日	14:00-18:00		





超维景  
TRANSCEND VIVOSCOPE

# 微型化双光子一体化服务—南京脑观象台

## ► 北京大学分子医学南京转化研究院



设有部门：

高通量脑平台

神经环路平台

超分辨SIM平台

新药研发平台

病理平台

院士工作站

数据中心

动物中心

运营中心

## ➤ 转化研究院汇聚尖端技术



➤ 微型化双光子显微镜 (FHIRM-TPM)

➤ 超高分辨率结构光成像显微镜 (Hi-SIM)

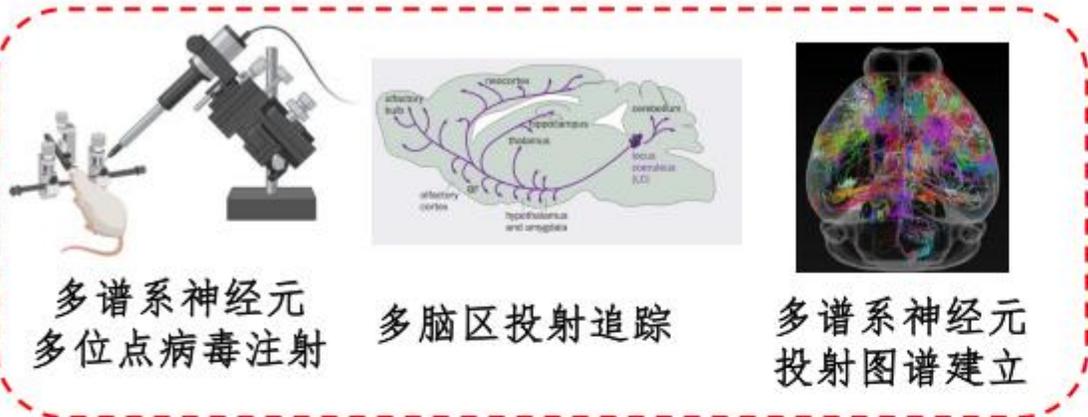
➤ 全脑三维高速成像系统 (VISoR)

➤ 持续研发的新型脑成像装备

➤ 数据处理与分析中心—数据工厂

# 微型化双光子标准技术服务：从手术到数据采集

学术



多谱系神经元  
多位点病毒注射

多脑区投射追踪

多谱系神经元  
投射图谱建立

精准大脑坐标的确定

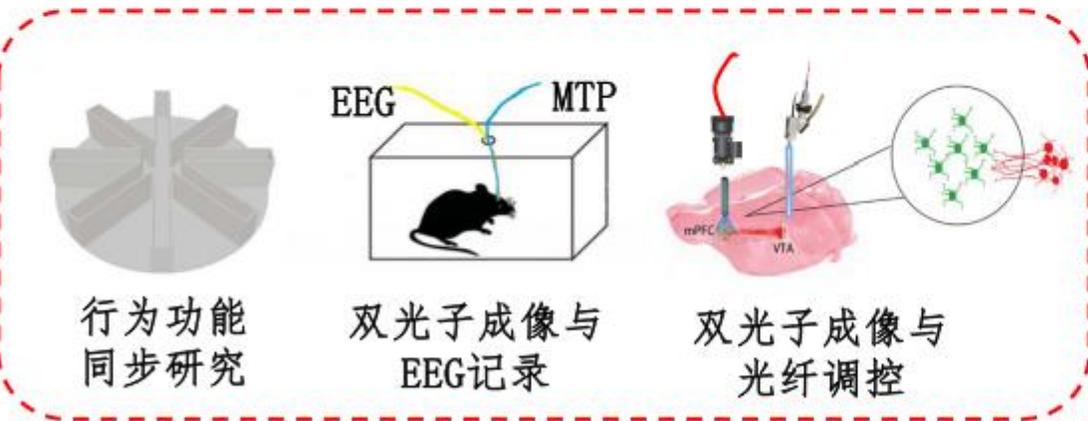


微型化探头植入

微型化双光子与多模态结合  
手术方案

多模态与微型化双光子结合的手术方法学开发

商业

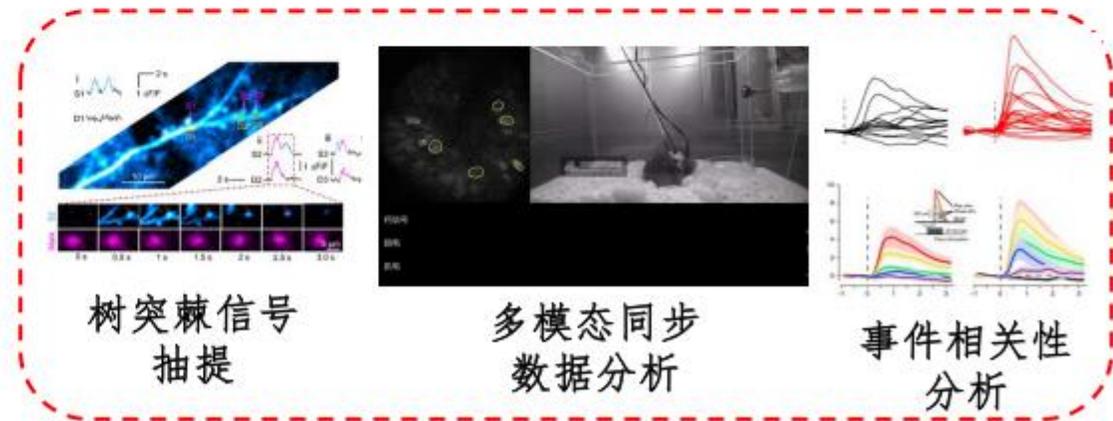


行为功能  
同步研究

双光子成像与  
EEG记录

双光子成像与  
光纤调控

自由行为动物多标记成像与多模态记录、调控结合



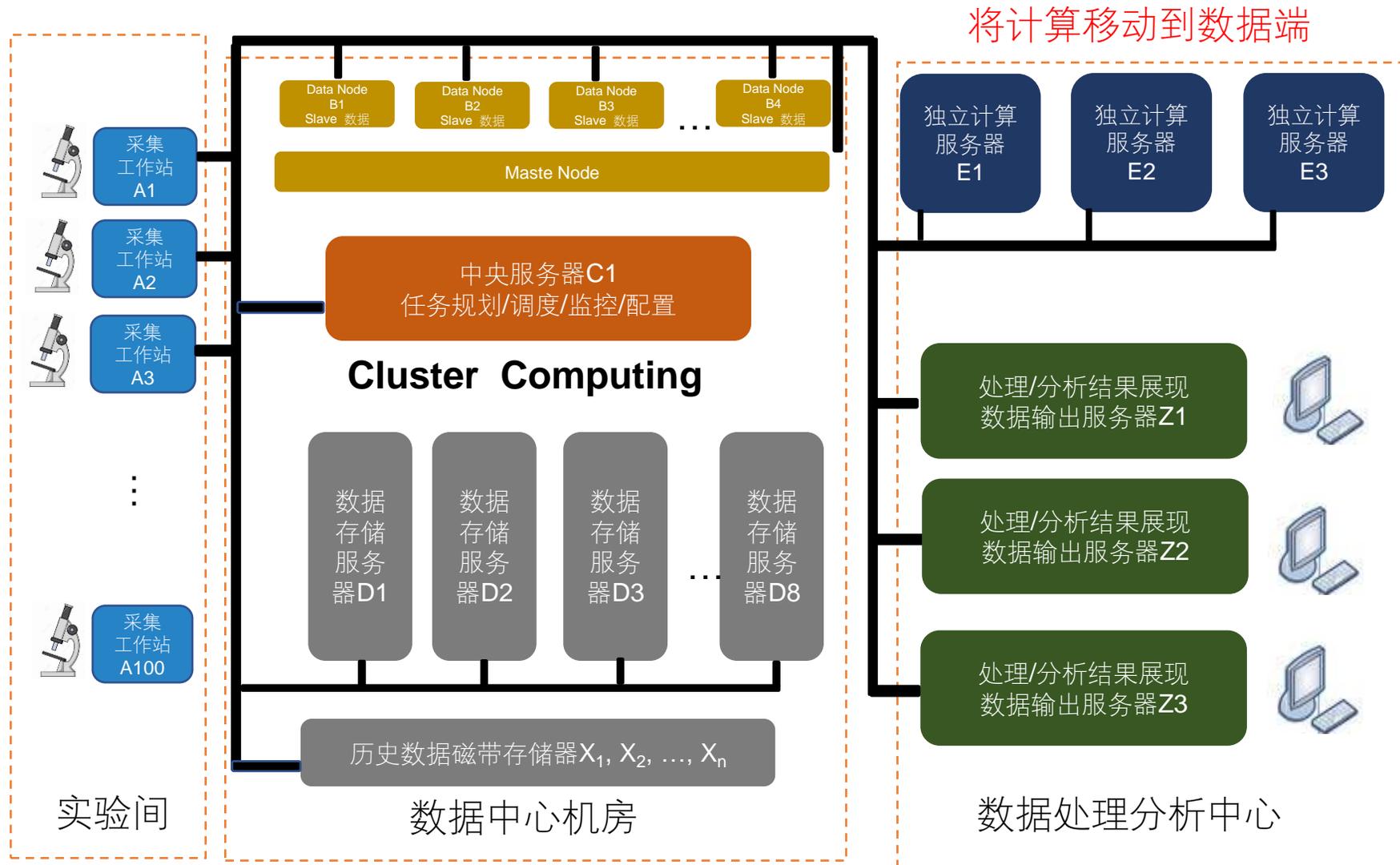
树突棘信号  
抽提

多模态同步  
数据分析

事件相关性  
分析

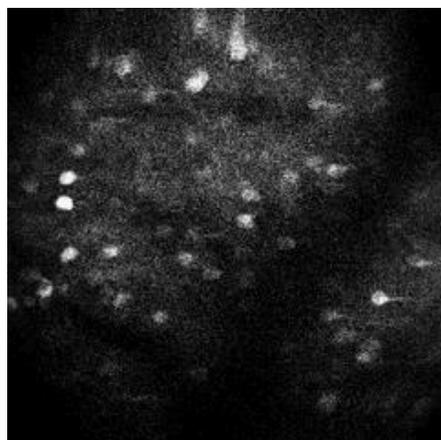
高通量、流水线化数据工厂实现标准可视化需求

# 数据处理与分析服务：分布式存储和并行计算框架

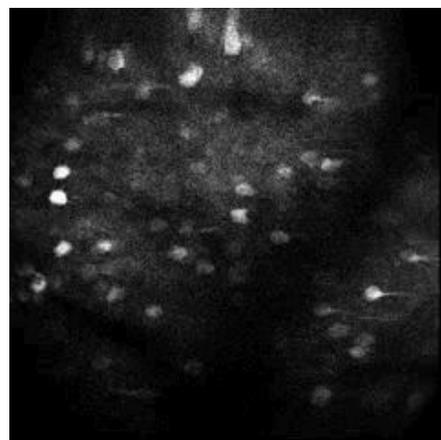


支持PB级存储，并行自动处理10-100个采集工作站数据，可水平扩展

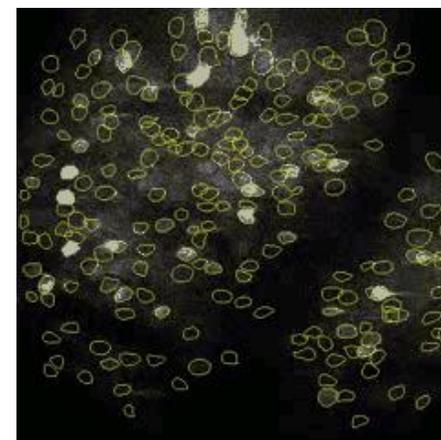
# 图像数据处理服务：流程演示



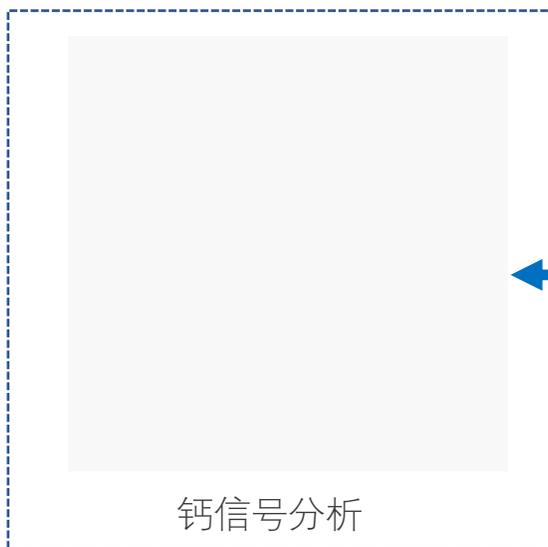
采集的荧光视频



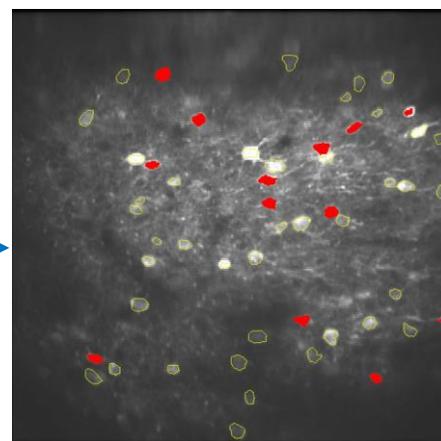
荧光视频预处理



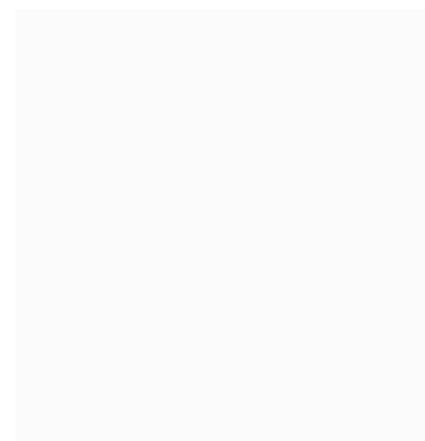
胞体自动甄别，识别准确率85%-95%



钙信号分析



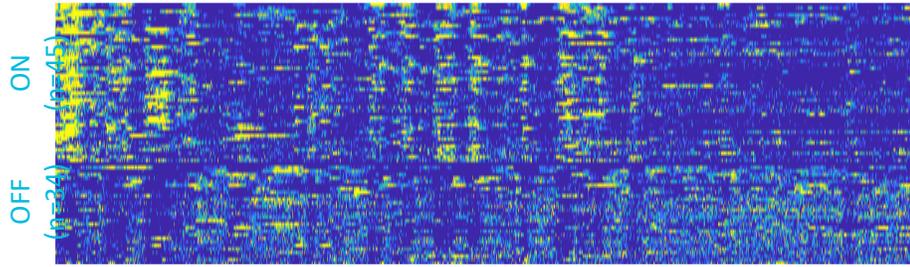
胞体识别及社群划分



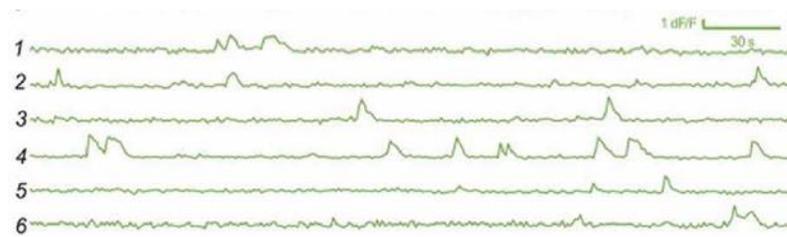
微社群联络动态展示



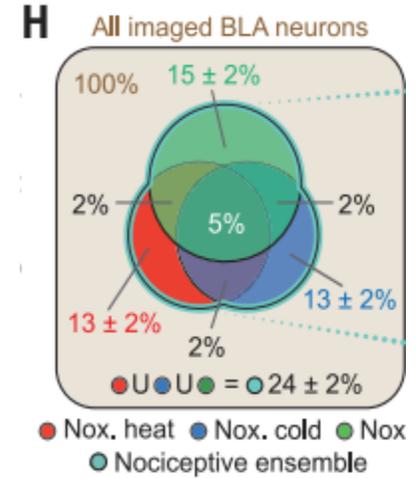
# 建设中的标准化数据处理服务（定制服务）



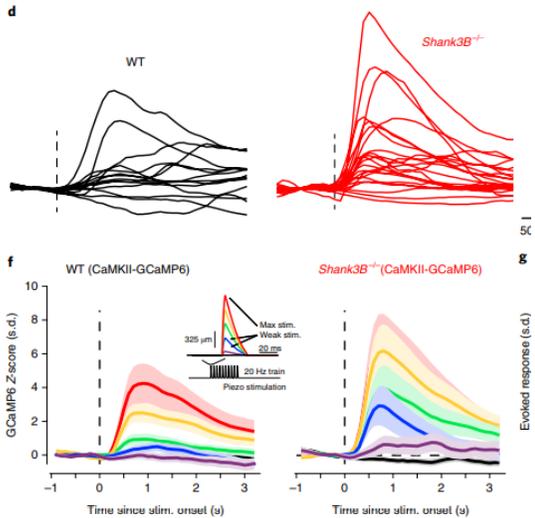
热图（全局）



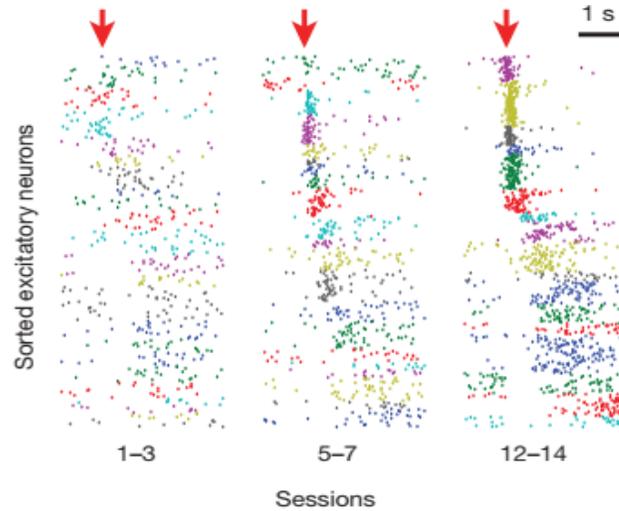
单个神经元活动展示



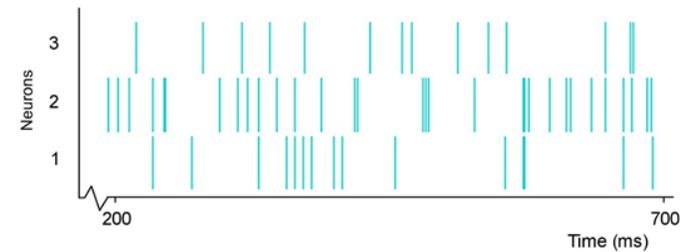
多功能相关神经元  
Overlap



事件相关的有界曲线



事件相关的神经元  
激活时序排列



基于反卷积算法的spike计算

# 视频资料——双光子钙成像数据处理和分析



超维景科研解决方案

← 关注公众号

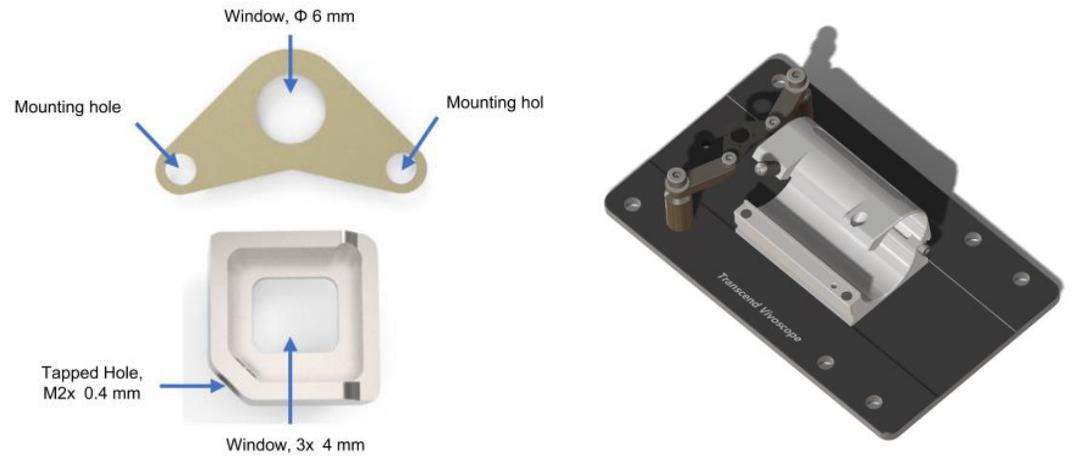
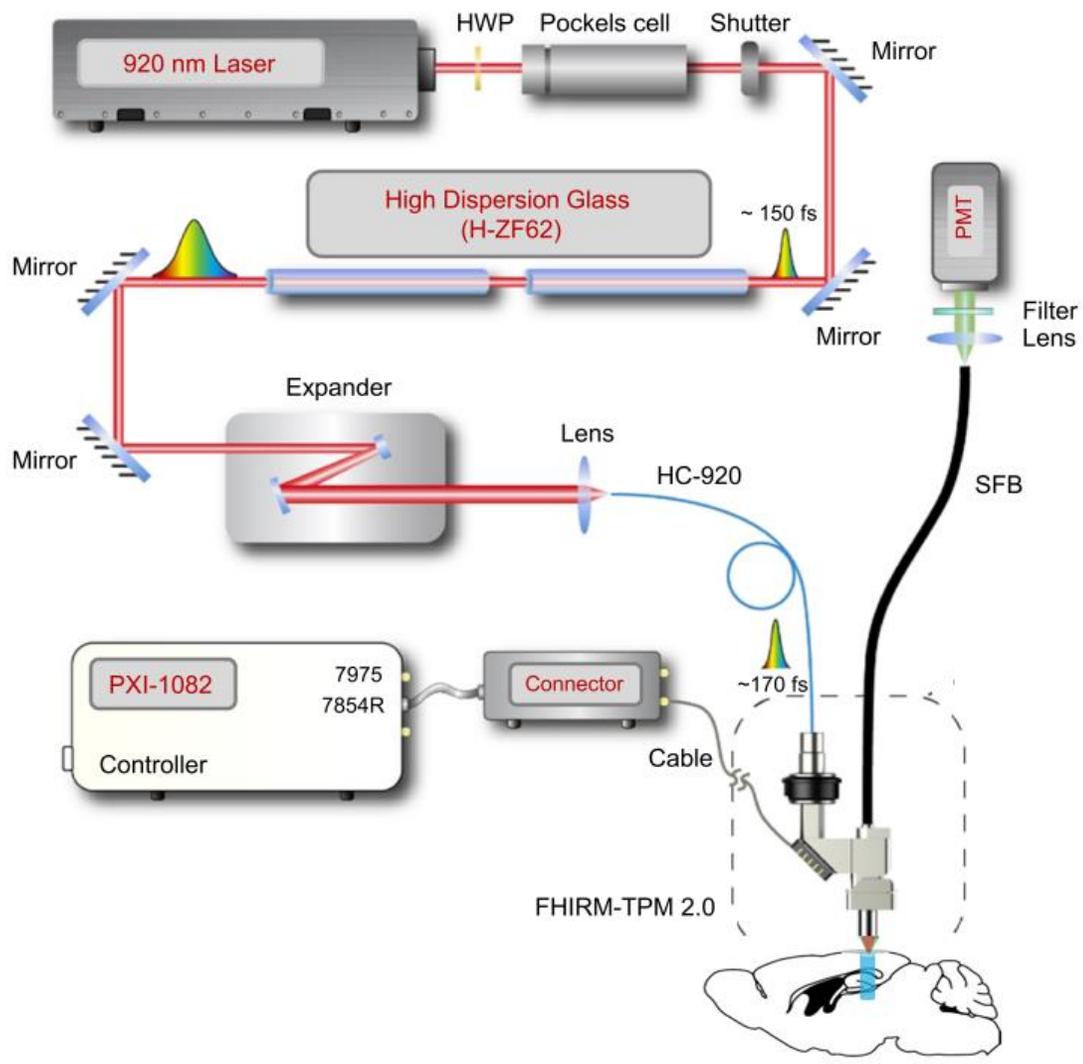
智汇学苑



洋桥学院神经专题系列讲...



洋桥学院神经系列讲座【...



b

