



光遗传学精准光刺激技术研究进展

颜佳婧^{1,2}, 刘畅^{1,2}, 蔺宇辰^{1,2}, 王孟瑞^{1,2}, 张景翔^{1,2}, 舒曼茗^{1,2}, 赵天宇^{1,2}, 梁言生^{1,2}, 雷铭^{1,2*}

1. 西安交通大学物理学院, 西安 710049

2. 物质非平衡合成与调控教育部重点实验室, 西安 710049

*联系人, E-mail: ming.lei@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2025-10-17; 接受日期: 2025-12-01; 网络出版日期: 2026-03-12

国家重点研发计划(编号: 2023YFF0722600, 2022YFF0712500)和国家自然科学基金(编号: 62135003, 62435007, 12574329)资助项目

摘要 光刺激光遗传学调控技术通过精确调控波长、光强和时空分布, 为生命科学研究提供了非侵入性的高精度调控工具. 为满足不同应用场景的需求, 精准光刺激技术方案日趋多元化. 相较于电刺激、药物递送等传统的微观调控方法, 光刺激光遗传学调控技术不仅能实现对单细胞的靶向操控, 还可与显微成像系统结合, 在刺激的同时实时监测细胞或组织的动态响应, 因而在神经科学与细胞生物学等领域获得广泛应用. 本文系统梳理了高分辨率光刺激技术的研究进展, 介绍了扫描式与并行式两大技术路径的原理与特征, 并对单光子与双光子两种激发模式下的技术实现方法进行了详细评述. 最后, 文章展望了该领域的未来发展方向, 以期对相关研究者提供全面的技术参考.

关键词 光刺激, 光遗传学, 显微成像系统

PACS: 07.60.-j, 87.64.M-, 42.79.-e

1 引言

在神经科学研究中, 揭示神经信号传导机制的核心在于实现对神经元活动的精准调控与读取. 长期以来, 电生理学在此领域占据主导地位, 但其技术瓶颈日益凸显: 刺激过程易引入电伪影干扰记录信号, 探针的植入性对组织造成损伤, 且难以在单细胞分辨率下实现对大规模神经元群体的并行操控^[1].

在此背景下, 光遗传学技术应运而生. 早在1979

年, 剑桥大学的弗朗西斯·克里克便提出了利用光进行神经调控的构想^[2,3], 这一前瞻性观点为神经调控技术开辟了新途径. 如今, 光学方法与遗传学和分子技术相结合, 通过将光敏基因转入特定类型的细胞中表达特殊离子通道, 实现了对神经元的非侵入式精准调控. 如图1^[4-21]所示, 这项技术具有毫秒级时间精度与亚微米级空间精度两大核心优势, 为在复杂神经环路中解析特定细胞功能提供了可能. 时间精度使研究人员能够以毫秒级刺激神经元, 模仿大脑中神经元的自然放

引用格式: 颜佳婧, 刘畅, 蔺宇辰, 等. 光遗传学精准光刺激技术研究进展. 中国科学: 物理学 力学 天文学, 2026, 56: 240002

Yan J J, Liu C, Lin Y C, et al. Review of the research progress of precision photostimulation for optogenetics (in Chinese). Sci Sin-Phys Mech Astron, 2026, 56: 240002, doi: [10.1360/SSPMA-2025-0458](https://doi.org/10.1360/SSPMA-2025-0458)

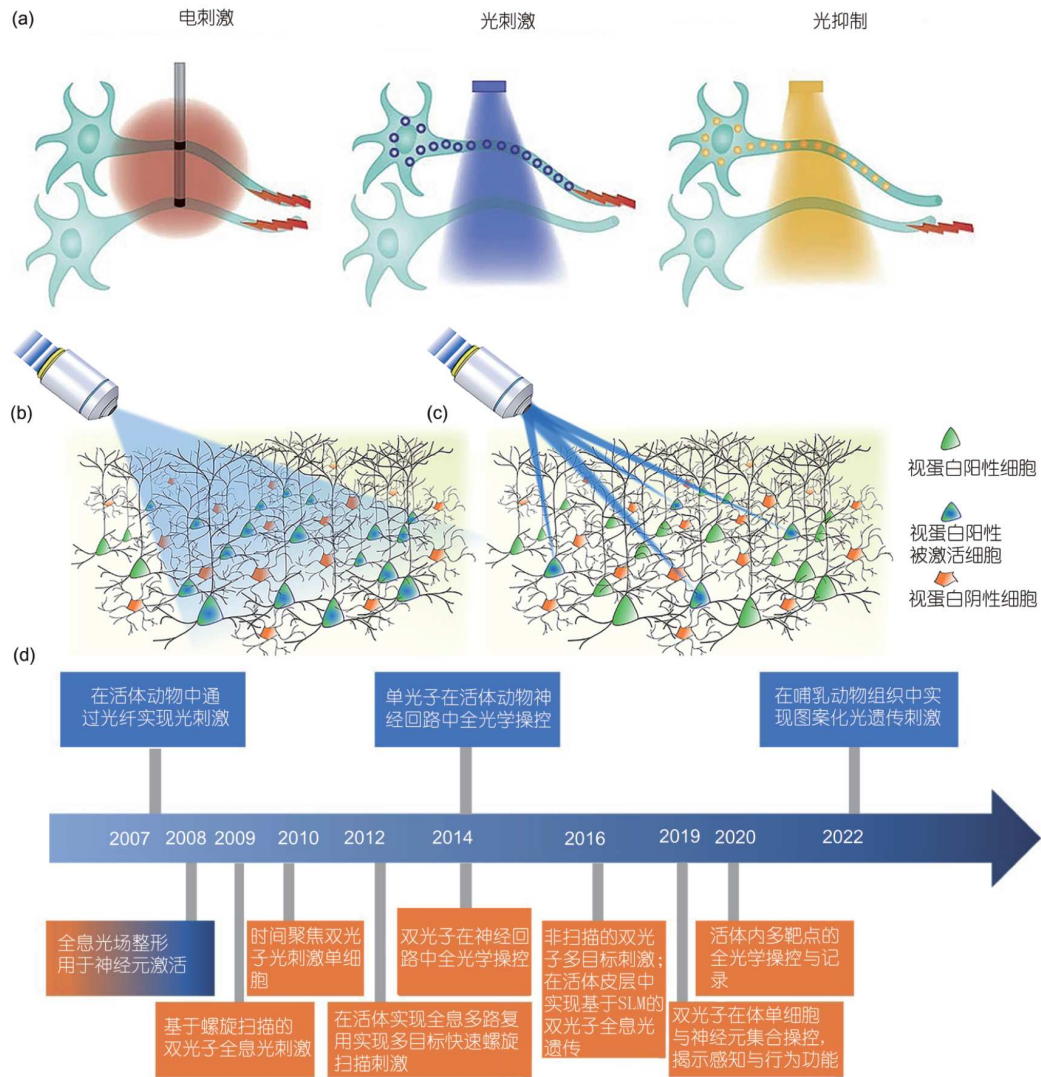


图 1 光遗传学在神经科学中的原理和实现方法. (a) 通过靶向兴奋(如蓝光激活的通道视蛋白)或抑制(如黄光激活的卤视蛋白), 实现细胞特异性刺激^[4]. (b) 通过宽场照明激活所有表达视蛋白的神经元, 进行细胞定向研究. (c) 通过光靶向策略选择性激活特定神经元, 实现有针对性的研究. (d) 近13年光遗传学发展关键节点^[5,6], 其中蓝色标注为单光子相关进展, 橙色标注为双光子相关进展, 包括2007年活体动物中通过光纤实现光刺激^[7], 2008年全息光场整形用于神经元激活^[8], 2009年基于螺旋扫描的双光子全息光刺激^[9], 2010年螺旋扫描实现双光子单细胞激活^[10], 2012年在活体实现全息多路复用实现多目标快速螺旋扫描刺激^[11], 2014年实现单光子、双光子神经回路全光学操控^[12], 2016年实现无扫描的双光子多目标刺激^[13]和在活体皮层中实现基于SLM的双光子全息光遗传^[14], 2019年双光子在体单细胞与神经元集合操控揭示感知与行为功能^[15-17], 2020年活体内多靶点的全光学操控与记录^[18-20], 以及2022年在哺乳动物组织中实现图案化光遗传刺激^[21].

Figure 1 Principles and implementation methods of optogenetics in neuroscience. (a) Targeted excitation (as with a blue light-activated channel rhodopsin) or inhibition (as with a yellow light-activated halorhodopsin), enabling cellular-specific stimulation [4]. (b) Cell-type genetically targeted investigations enabled by all opsin-expressing neuron activation via widefield illumination. (c) Targeted investigations enabled by selective activation of a specific pool of neurons via light-targeting strategies. (d) Timeline indicating critical optical developments that have enabled new optogenetic experiments throughout the past 13 year [5,6], with blue indicating single-photon-based advances and orange indicating two-photon-based advances. In 2007, *in vivo* optical stimulation was first achieved using an optical fiber [7]. In 2008, holographic light shaping was introduced for neuronal activation [8], followed in 2009 by two-photon holographic stimulation based on spiral scanning [9]. In 2010, spiral scanning enabled two-photon single-cell activation [10], and in 2012, *in vivo* holographic multiplexing allowed rapid multi-target spiral scanning stimulation [11]. By 2014, all-optical manipulation of neural circuits was realized with both single-photon and two-photon approaches [12]. In 2016, scanless two-photon multi-target stimulation was demonstrated [13]; and two-photon holographic optogenetics based on SLM enabled imprinting and recalling of cortical ensembles *in vivo* [14]. In 2019, two-photon *in vivo* single-cell and ensemble manipulation revealed functional roles in perception and behavior [15-17]. In 2020, all-optical interrogation of multiple targets *in vivo* [18-20], and in 2022, patterned optogenetic stimulation was successfully implemented in mammalian tissues [21].

电速率; 空间精度则允许在三维组织中精确操纵特定神经元群体的活动^[22,23]. 而光遗传学技术的核心价值在于提供了建立特定神经元活动与行为功能之间因果关系的手段, 科学目标直指界定神经编码的基本单位, 解析复杂认知行为背后的环路机制以及在细胞及细胞亚细胞水平上破译脑疾病的病理环路.

然而, 普通的光遗传学宽场照明技术一次性照亮整个视野^[24], 会无差别地激活所有表达光敏蛋白的神经元, 如图1(b)所示, 这严重限制了其在需要高空间选择性研究中的应用. 因此, 发展能够精准靶向单个或特定神经元集群的精准光刺激光遗传学技术, 成为推动该领域前进的关键^[1]. 为实现精确的空间控制, 研究人员开发了显微镜耦合的光遗传学平台, 这些光遗传学精准光刺激显微平台不仅提供高空间分辨率的光刺激能力, 还能实现对靶细胞的反馈控制操作^[25].

过去20年间, 光遗传学精准光刺激技术取得显著进展, 已在多种生物模型系统中实现细胞信号通路的精确光学调控^[26].

本文将详细描述这些高时空分辨率的光靶向策略, 包括它们的基本概念、光学原理以及在光遗传学中的适用性分析. 通过系统分析现有技术的优势与局限, 为相关领域的研究者提供全面的技术参考.

2 光遗传学精准光刺激技术原理

光遗传学光刺激的核心原理在于利用对光敏感的膜蛋白将外源光信号转化为细胞活动的精确调控, 从而以毫秒级的时间分辨率精确调节神经元乃至其他细胞功能^[27-30]. 光遗传学工具已发展出多种设计思路和功能模式. 一类是基于膜电位调控的离子流工具, 包括光驱动离子泵和光门控离子通道, 如视蛋白. 它们通过在细胞膜上引发跨膜离子流动, 导致膜电位去极化或超极化^[29,31]. 另一类是基于非离子流调控的光控分子工具, 例如利用BLUF (Blue-Light-Using-FAD)或LOV (Light-Oxygen-Voltage)等光敏结构域, 用于实现对基因表达、蛋白质定位等细胞内信号通路过程的精确光控^[32,33]. 其中在基于膜电位调控的分子工具中, 经典的兴奋性通道视蛋白ChR2在蓝光照射下允许钠离子等阳离子流入, 促使神经元快速去极化并触发动作电位, 而抑制性视蛋白则通过泵入氯离子或增强其通透性, 使细胞膜电位超极化, 从而降低或阻断放电概率. 不同

视蛋白的吸收光谱决定了有效激发波长及其在组织内的穿透深度, 一般而言, 红光因在组织中散射与吸收较少, 更适用于深部脑区调控; 而蓝光则多用于浅层或透明组织实验^[34]. 光敏蛋白的开关动力学使其能够精准响应脉冲式光照, 其诱导的光电流幅值则受光照强度、光斑尺寸、蛋白表达水平及膜电导等多种因素调控. 为实现细胞类型特异性操控, 研究者通常采用细胞特异性启动子、转基因技术或病毒载体, 将视蛋白的表达限定于特定神经元群体. 再结合光束整形与时间调制技术, 最终在空间与时间维度上实现对目标神经元的精准选择性刺激. 通过合理设计波长、照度、脉冲参数并优化蛋白表达与定位, 可以在减弱光毒性和热损伤的前提下, 有效驱动目标神经元兴奋或抑制, 从而以高时空分辨率调控神经环路活动^[8,35].

在实现精准光遗传学调控的技术路径中, 单光子激发与双光子激发是两种核心的物理机制. 如图2(a)所示, 二者在原理与生物效应上存在显著差异. 单光子激发通常使用波长较短(如400–550 nm的蓝绿光)、能量高于荧光分子激发阈值的光子, 使其电子从基态直接跃迁至激发态. 该方法具有光路简单、功率需求低、可同步照明较大视野等优点. 然而, 如图2(b)所示, 短波长光在生物组织中散射与吸收较强, 导致其有效穿透深度较浅, 且易在焦平面上下非特异性地激活视蛋白, 从而降低轴向分辨率并引入背景噪声^[36]. 相比之下, 双光子激发是一种非线性光学过程, 依赖于两个近红外光子(波长约800–1100 nm)几乎同时被同一分子吸收以实现能级跃迁. 由于激发概率与光强的平方成正比, 有效激发被严格限制在高光子密度的聚焦点体积内. 近红外光在组织中散射较弱, 使双光子技术兼具卓越的轴向分辨能力和深层穿透能力, 能实现接近1 mm甚至更深的组织穿透, 并能显著减少离焦背景激发与光损伤. 然而, 双光子激发依赖昂贵且复杂的脉冲激光系统, 多点并行激发亦受功率分配的限制. 因此, 单光子激发更适用于浅层、大范围、多细胞并行刺激的实验场景; 而双光子激发则在需要高轴向分辨率、深层组织成像与精确定点的研究中展现出独特优势^[37,38].

目前, 实现单细胞光刺激的靶向策略主要分为串行扫描与并行照明两类. 图3(a)与(b)分别展示了这两种模式在激活多个神经元时的基本原理: 串行扫描通过逐点移动聚焦光斑依次激活目标; 而并行照明则可

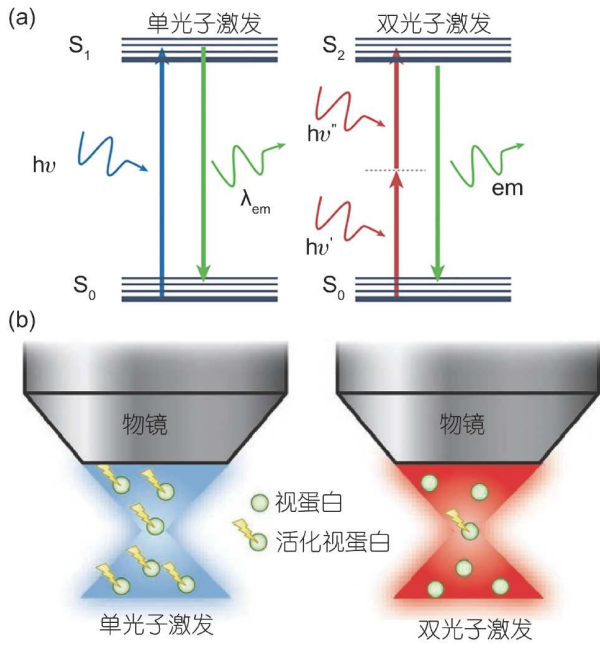


图 2 单光子与双光子激发过程示意图. (a) 单光子和双光子激发过程的能级跃迁示意图^[36]. 左: 单光子激发的雅布隆斯基图; 右: 双光子激发的雅布隆斯基图. (b) 组织内视蛋白激发空间特性: 左为单光子激发的弥散照明(蓝), 仅表层少量视蛋白激活(绿); 右为双光子局域化聚焦(红), 深层高效激发

Figure 2 (a) Schematic representation of 1P and 2P excitation processes ^[36]. Left, Jablonski diagram of 1PE; right, Jablonski diagram of 2PE. (b) Spatial opsin activation: left, diffuse 1P illumination (blue) sparsely activates superficial opsins (green); right, localized 2P focus (red) enables efficient deep-tissue activation.

在同一时间内在样品表面生成多个激发区域, 实现对多靶点的同步刺激。

在精准光遗传学中, 串行刺激作为一种广泛应用的光激活策略, 其基本原理是通过聚焦形成亚微米级光斑, 并使其沿预设轨迹逐点移动, 实现对目标神经元的逐个激活^[39–41]. 图3(b)所示, 典型的扫描式串行刺激系统在单光子光遗传学中常借助光纤或扩展光源结合扫描器件实现定向照明. 而在双光子光遗传学中, 则多采用飞秒激光配合扫描系统进行定位扫描. 由于该策略本质上是串行操作, 其刺激速度受扫描路径长度和单点驻留时间的限制, 因而难以实现大规模神经网络群体的同步激活^[42–44].

与之相比, 并行照明方法通过在样品焦面同时生成多个激发区域, 可实现多靶点的同步光刺激. 图3(c)展示了一种典型的并行图案化光刺激系统, 其基本原

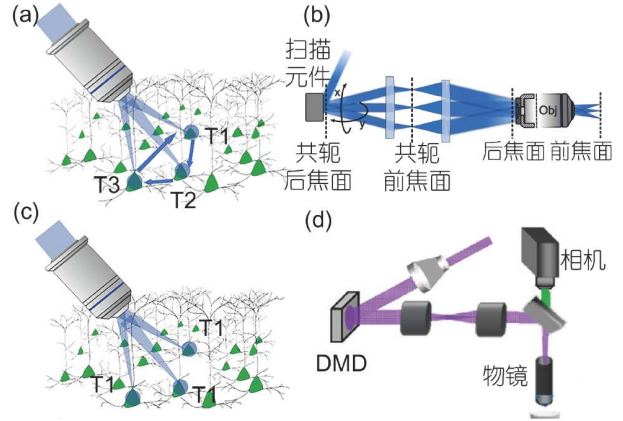


图 3 串行与并行单光子光刺激模式及其实现技术示意图. (a) 串行光刺激一系列神经元的示意图. (b) 基于串行的扫描光刺激技术^[12]. (c) 并行光刺激一系列神经元的示意图. (d) 基于投影的并行光刺激技术^[22]

Figure 3 Serial and parallel single-photon photostimulation modes and their implementation techniques. (a) Schematic representation of the serial photostimulation of a series of neurons. (b) Optical scheme of scan-based light targeting techniques ^[12]. (c) Schematic representation of the parallel photostimulation of a series of neurons. (d) Optical scheme of projection-based light-patterning techniques ^[22].

理是采用空间光调制器或者数字微镜器件等光场调控器件对光场进行强度调制, 再通过投影的方式实现高刷新率的光图案输出, 该方法适用于浅层组织的大范围刺激, 在刺激速度和覆盖范围上较串行扫描具有明显优势, 因而广泛用于神经环路功能研究及多平面同步调控. 然而, 并行照明对激光功率分配及系统稳定性有较高要求, 且在目标点数量增多时, 为维持各点的有效激发能量, 需大幅提升总激光功率。

3 高分辨率单光子光刺激显微技术进展

光遗传学为解析大脑神经环路功能及相关疾病机制提供了独特手段. 在众多技术路径中, 单光子光遗传学因光路构型简洁、功率需求低、可实现大范围并行刺激等优势, 长期在神经集合活动的操控中占据重要地位. 通过在特定波长下激活表达光敏蛋白的神经元, 单光子系统能够在毫秒级时间尺度内同时调控大量细胞, 为研究群体神经动力学提供了有力工具^[45,46]. 已有研究表明, 与多光子全息光遗传学相比, 单光子方案在相同刺激面积下所需平均功率显著更低, 并且能够在二维平面上同时激活更多神经元^[47–49]. 如图4所示, 目前已发展出多种选择性刺激策略, 目前主要包括四类

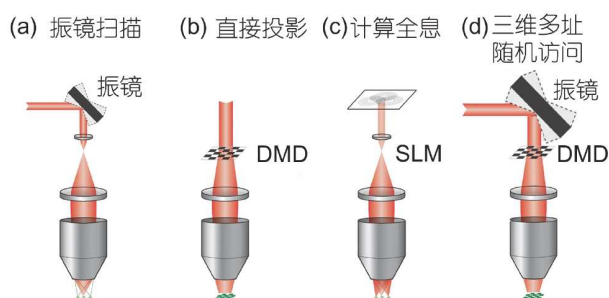


图 4 单光子图案化光刺激分类^[51]. (a) 使用振镜引导将聚焦光束投射到样品内不同位置. (b) 直接投影法产生二维图案, 通过顶部空间光调制器进行振幅调制. (c) 计算机生成全息图, 通过顶部空间光调制器进行相位调制产生多个单独光束的能量以高效的方式重定向, 创建全息图案. (d) 三维多址随机访问光刺激 3D-MAP 方法

Figure 4 Classification of single-photon patterned photostimulation [51]. (a) Using galvanometer guidance to direct a focused beam onto different locations within a sample. (b) Direct projection method generates 2D patterns, with amplitude modulation via a top spatial light modulator. (c) Computer-generated holography creates holographic patterns, where phase modulation via a top spatial light modulator redirects the energy of multiple individual beams in an efficient way. (d) 3D-MAP method.

技术路线: 基于振镜引导光束的扫描式刺激、基于投影的二维图案生成、计算生成全息(Computer Generated Holography, CGH)以及三维多址随机访问光刺激方法(Threedimensional Multi-site Random Access Photostimulation, 3D-MAP)^[50,51]. 然而, 由于单光子激发光在生物组织中易受散射影响, 其有效穿透深度和轴向分辨率均明显低于多光子方案, 这在深层组织刺激中构成了限制.

3.1 单光子扫描光刺激技术

扫描系统采用串行扫描机制, 通常搭载高功率激光光源实现光遗传学刺激. 其照明光斑呈单点高斯分布, 通过振镜或声光偏转器实现光斑的精确偏转, 可采用光栅或螺旋扫描轨迹在样本表面构建复杂刺激图案. 不同扫描模式适用于特定实验场景. 为提升在散射组织中的靶向精度, 现代扫描系统整合了传输矩阵^[52-54]、相位共轭^[55-57]或机器学习辅助的波前校正技术^[58-60]来增强单光子系统的单细胞调控能力. 该技术既适用于单个神经元精准刺激, 也可实现神经元群体的协同调控, 在光敏蛋白激活方面表现优异. 其技术优势包括光路传输损耗极小、样品面照明强度均匀稳定、抗背景干扰能力强、时空分辨率高等特点. 使用振镜的

扫描系统还具有操作友好、易于系统集成等优点, 可兼容体外培养和头部固定体内实验. 但该技术的核心局限在于时序性单点照明模式, 无法实现多区域同步刺激, 因而难以研究神经元群体对行为的瞬时协同调控机制^[1].

3.2 直接投影法二维图案化光刺激

直接投影法二维图案化光刺激采用基于数字微镜器件(Digital Micromirror Device, DMD)的光学投影系统, DMD核心功能依赖于数百万个可独立翻转的微小反射镜. 如图5(a)所示, 这些微镜可精确控制为“开”或“关”状态, 从而实现入射光场的二维空间调制与动态图案生成^[61-63]. 具体而言, DMD能够以极高的刷新率精确调节每个微镜的翻转角度, 这种控制方式有效规避了传统光栅或空间光调制器在模式切换时所需的物理移动, 显著提升了系统稳定性和图案切换速度, 保证了实验的高重复性和空间调控精度^[64]. 在典型的DMD光学投影系统中, 处于“开”态的微镜将光线反射至投影光路, 而处于“关”态的微镜则将光线反射至非成像区域, 实现高效的二值光场调制, 如图5(b)所示, 配合后续光学系统, 可将DMD生成的二值图案缩放、聚焦并精确成像至目标神经细胞或组织的特定区域, 该光路集成方式在光遗传学等研究中显著提升了光操控的精度与灵活性^[65,66].

另一方面, DMD投影法通过设计周期性条纹还可实现结构光照明显微(Structured Illumination Microscopy, SIM)中的超分辨成像和光切片功能^[67,68], 该技术利用光学传递函数的低通滤波特性, 可以将DMD产生的二值图案自动转换为接近理想状态的正弦条纹, 从而实现高质量调制的光强分布, 极大提升空间分辨率和光学切片能力^[69-71], 进一步拓展了光刺激与成像的集成功能.

近年来, DMD投影法凭借其高空间分辨率和时间分辨率已在光遗传学领域得到了广泛应用. 通过精确定位激发区域, 该方法能够对三维组织样本中实现空间选择性的光刺激, 例如, 结合光学成像及功能指示剂技术可有效支持神经活动的高分辨率观测与研究, 且成本和复杂度低于传统电刺激技术^[72,73]. 此外, 该技术具有良好的光源兼容性, 可适配激光与非相干光源例如发光二极管(Light-Emitting Diode, LED), 便于满足多波长、多色光刺激及成像的复杂需求. 然而,

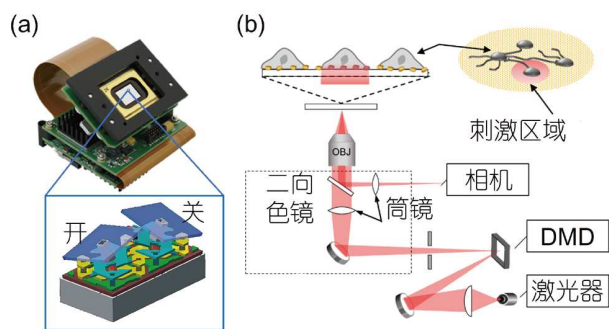


图 5 DMD功能原理以及DMD与光刺激激光路的集成. (a) 两个DMD反射镜, 一个反射镜(左)处于“关闭”位置, 另一个反射镜(右)处于“打开”位置, 每个微镜将光反射到投影光学元件上^[64]. (b) DLP光刺激系统的光路示意图, 使用激光器和DMD将光反射到切片上的刺激部位

Figure 5 Principal of DMD fuction and integration of a DMD into the photostimulation light path. (a) Two DMD mirrors with one mirror (right) in the “off” position and the other (left) in the “on” position. Each micromirror reflects the light either toward the projection optics or toward a light absorber ^[64]. (b) Schematic drawing of the light path for the DLP photostimulation system using a laser and the DMD to reflect light onto stimulation sites on the slice.

DMD投影法也存在一定局限, 由于系统仅能利用部分“开”状态的光线, 其光能利用率受限, 在高光功率需求的实验中常需提升光源亮度或优化光路以作补偿. 同时, 目前DMD投影技术主要限于二维平面照明, 实现真正的三维并行照明仍面临技术挑战. 未来随着DMD芯片分辨率、刷新速率的提升及投影光路的优化, 该方法有望实现三维投影及多通道多色同步光刺激^[72,74,75].

3.3 计算机生成全息光刺激

CGH通过空间光调制器(Spatial Light Modulator, SLM)对相干激光束的相位进行调控, 可在三维空间中并行生成多个可独立寻址的光斑, 实现对神经元集群的高时空精度刺激. 与DMD等强度调制器件相比, 相位型SLM能够更高效地利用入射光能, 显著提高系统的光能利用率. 该技术通常将单束激光在傅里叶平面分束, 并在像平面生成任意三维照明图案, 从而支持对三维样品内的并行光学操控. 2013年, Shoham团队^[11]基于铁电液晶SLM构建的全息系统, 利用473 nm激光在视网膜离体培养物中实现了单细胞光遗传激活, 为高时空精度的视觉恢复研究奠定了基础. 随后, 2014年Emiliani团队^[76]开发的微型化系统在麻醉小鼠脑组织中实现了约横向5 μm 和轴向4 μm 的刺激分辨率, 并在自由活动小鼠小脑中结合光纤内窥镜实现了

浦肯野细胞的单细胞光控与GCaMP5G荧光同步成像^[11], 显著拓展了该技术在生物活体中的应用范围. 此外, 基于衍射型SLM的光场调控可在像平面生成与神经元形态高度匹配的任意形状光斑, 支持多神经元乃至亚细胞区室的同步激发, 并可通过迭代算法重建树突等精细的光斑结构, 实现接近衍射极限的微米级光斑尺寸与纳米级的三维定位精度^[66,77]. CGH的优势在于可一次性生成多焦点光斑并灵活分配其光功率, 硬件结构相对简单、成本效益高, 且在大规模同时刺激时热效应低, 使得在完整脑组织中复现生理相关的神经活动模式成为可能^[1,11,76,78]. 然而, 该技术也受限于SLM的物理参数, 如像素数量、位深与有效孔径等, 这些因素制约了其可寻址体素的数量. 其刷新率通常在数十至数百赫兹范围, 难以同时兼顾高灰度等级与高速调制. 同时, 三维相位掩模的迭代求解计算量庞大, 且对系统像差和器件的非理想特性较为敏感. 为保障光场重建的稳定性与精度, 自适应光学等校正方案正逐渐被引入^[79]. 未来, 随着高速SLM与高效计算算法的进一步发展, CGH技术有望在实现更大规模、更高通量的三维神经环路调控方面发挥关键作用.

3.4 3D-MAP三维多址随机访问光刺激

为克服传统CGH技术在可寻址体素数量和刷新率方面的限制, 研究者开始探索能在保持大规模刺激能力的同时, 进一步提升三维空间寻址速度与灵活性的新策略. 其中, 3D-MAP便是代表性成果.

3D-MAP是一种创新的单光子全息技术, 它将高速扫描镜的角度调制与DMD的空间调制相结合, 在频率域与空间域实现高速协同控制. 该技术能在千赫兹级速率下生成三维照明图案, 并与成像系统同步运行, 以实现高精度光遗传操控. 3D-MAP能够在CGH难以有效合成的大体积内生成高分辨率3D图案, 并且其图案投影速度远快于CGH.

其工作原理如图6(a)所示, 准直激光束经扫描镜设定的自定义照明角度入射至DMD, 二者的同步驱动确保空间掩模与入射角度精确匹配, 实现三维空间中刺激焦点的灵活定位. 如图6(b)中, 与传统CGH在离焦面易产生非目标激发不同, 3D-MAP能有效阻断非目标光路, 显著提升空间选择性. 在功能验证方面, 如图6(c)和(d)所示, 通过在视蛋白表达相对稀疏的条件下进行传统电穿孔实验, 结果表明该技术既可实现单焦

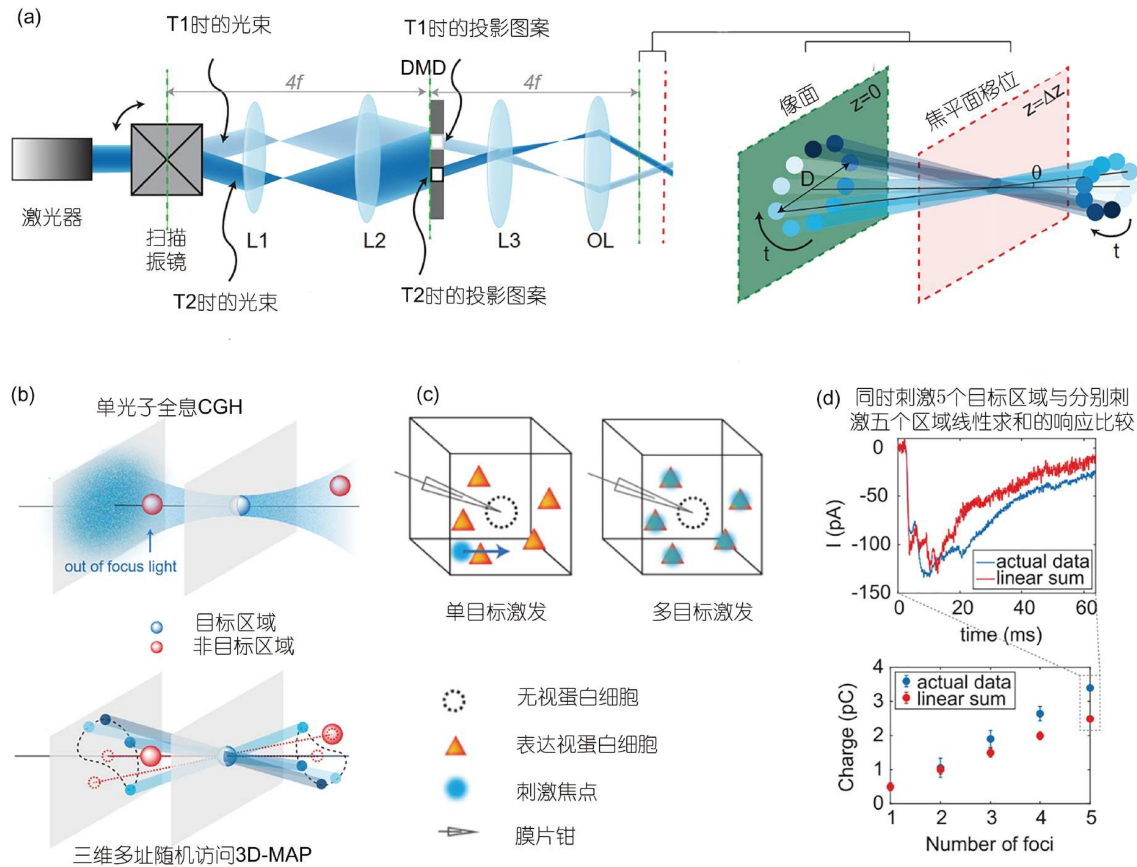


图 6 3D-MAP技术原理与功能验证^[50]. (a) 准直激光束以扫描振镜设置的自定义照明角度照射DMD的表面. DMD与扫描镜同步, 以使空间孔径的2D掩模与照明角度匹配. (b) 由计算机生成全息术产生的焦点刺激焦点中的目标区域, 但也刺激非目标区域. 3D-MAP只能刺激感兴趣区域, 并通过关闭振幅光阑沿着投射到非目标区域的传播方向来避免非目标区域. (c) 左: 通过单焦点进行3D映射. 右: 对多个病灶进行同时刺激. (d) (c)中同时刺激ROI 1–5(蓝色)的实际突触响应与单独刺激ROI 1–5(红色)时进行线性求和计算的响应的比较

Figure 6 Principle and functional validation of 3D-MAP technology [50]. (a) A collimated laser beam illuminates the surface of a DMD with a custom illumination angle set by scanning galvanometers. The DMD is synchronized with the scanning mirrors to match the 2D mask of the spatial aperture to the illumination angle. (b) A focus generated by CGH stimulates the targeted area in focus but also stimulates non-targeted areas. 3D-MAP can stimulate only the region of interest (ROI) and avoid non-targeted areas by closing the amplitude apertures along propagation directions that project to non-targeted areas. (c) Left: 3D mapping by a single focus. Right: simultaneous stimulation of multiple foci. (d) Comparison of the actual synaptic response by simultaneous stimulation of ROIs 1–5 in (c) (blue) with the response calculated by linearly summing when stimulating ROIs 1–5 individually (red).

点三维映射, 也可在已知细胞群中完成多焦点并行刺激. 突触响应比较结果显示, 多点同步激发所诱发的生理信号与单点响应线性叠加之间存在差异, 提示其可揭示更接近真实情况的生物刺激效应. 此外, 通过多路复用照明图案并每次瞄准较小神经元子集以增加图案稀疏性, 还有助于降低并行刺激过程中的光学串扰.

综上所述, 3D-MAP在刺激规模、操作速度、系统简洁性及成本控制等多个维度均展现出明显优势. 与传统单光子技术相比, 其可刺激更多神经元且光功

率需求降低2–3个数量级, 但仍需在分辨率与可寻址体积之间进行权衡. 相较于昂贵的双光子系统, 3D-MAP作为单光子技术具备更高的普及潜力, 为发展可扩展的无线高精度脑机接口奠定了基础. 该项革新性工具不仅有助于深入探索脑功能与疾病机制, 也为神经科学研究开辟了新的方向^[50].

4 高分辨率双光子光刺激显微技术进展

前文讨论的选择性照明策略主要依赖单光子激

发, 其激发过程不可避免地作用于焦平面上下的整个光锥区域, 导致在高度散射的脑组织中难以实现精确的空间定位. 相比之下, 双光子激发凭借其固有的非线性光学特性, 可将激发效应严格限制在焦点体积内, 从而提供更高的空间分辨率. 当与全息光学技术结合时, 双光子光遗传学能够实现对多个神经元的同步或准同步调控, 并在散射组织中兼具高时空分辨率与对表达视蛋白的神经元进行高密度刺激的能力^[51,80,81]. 通过在样品表面投射计算生成的全息光图案, 该技术可精确靶向并并行控制三维脑区内的多个神经元, 为实现单细胞级别的成像与光学操控提供了理想平台^[70,82].

如图7^[83]所示, 双光子激发技术大体可分为基于空间聚焦的扫描式与基于时间聚焦的非扫描式, 它们的光场形成方式不同, 前者利用高数值孔径(Numerical Aperture, NA)物镜在后焦平面(Back Focal Plane, BFP)形成精细聚焦光斑, 并通过逐点扫描实现高分辨局部激发; 后者则结合低NA光束与脉冲时宽压缩, 在大视场范围内直接构建面状或体积激发, 无需机械扫描即可实现高效激发目标区域.

4.1 基于时间聚焦的计算全息技术

在双光子光遗传学中, 理想的刺激方案需同时满

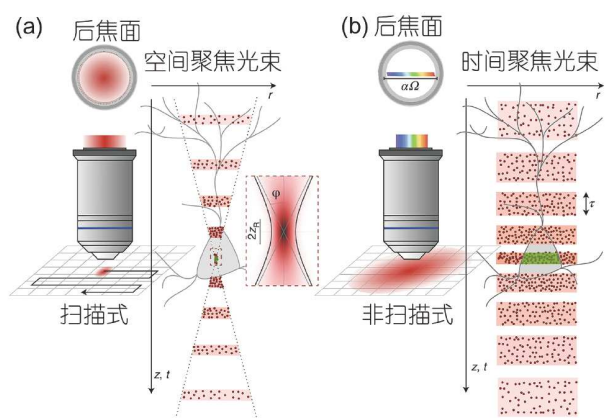


图7 空间和时间聚焦光束的轴向传播^[83]. (a) 具有空间聚焦光束和物镜后焦平面处的对应光束强度分布的扫描2PE的示意性表示和光子的时空分布. (b) 用于具有时间聚焦低NA光束的无扫描2PE示意图和光子的时空分布

Figure 7 Axial propagation of spatially and temporally focused beams ^[83]. (a) Schematic representation of scanned 2PE with a spatially focused beam and the corresponding beam intensity distribution at the objective BFP, and the spatiotemporal distribution of photons. (b) Schematic of scanless 2PE with a temporally focused low-NA beam and the spatiotemporal distribution of photons.

足低激发功率密度、大面积照明、毫秒级时间分辨率与微米级空间分辨率等关键要求. 然而, 传统的空间聚焦扫描方法在并行性和时间分辨率方面存在固有瓶颈, 尤其在需要快速激活多个神经元或进行大面积刺激时, 扫描速度成为主要限制因素. 为突破上述限制, 时间聚焦技术(Temporal Focusing, TF)应运而生. 该技术通过在焦平面实现脉冲压缩, 使光子密度在轴向上高度集中, 从而在无需紧密空间聚焦的情况下实现高效的双光子吸收. 这一机制不仅显著提升了轴向分辨率, 还有效降低了非焦平面光损伤. 时间聚焦技术最早由Oron等人^[84]在2005年提出, 用于多光子激发中通过色散补偿实现脉冲在焦平面的时间压缩. 在此基础上, Papagiakoumou团队^[36]于2010年首次将时间聚焦与计算全息技术有机结合, 发展出基于时间聚焦的计算全息技术(TF-CGH). 该方法在双光子显微系统中实现了对大面积二维区域的短时并行激发, 突破了传统点扫描在并行性上的限制, 为后续三维光遗传学调控奠定了技术基础. TF-CGH的核心思想是将时间聚焦的轴向限制能力与计算全息的空间自由度相结合, 从而在散射组织中实现大规模、精确、快速的神经元刺激. 这种组合方式能够同时满足低激发功率密度、大面积平行照明、毫秒级时间分辨率与微米级空间分辨率等苛刻要求, 为高时空分辨率的光遗传学研究提供了强有力的技术支撑.

与依赖空间聚焦的传统点扫描成像不同, TF-CGH通过在目标焦平面的共轭面引入衍射光栅或棱镜等色散元件, 使不同频率成分在焦平面重新压缩成超短脉冲, 从而在无需紧密空间聚焦的情况下实现轴向限制的多光子吸收. 计算全息部分则利用空间光调制器或数字微镜器件对入射激光波前进行相位调制, 将光能量灵活分配到任意二维或三维分布的目标区域, 实现真正意义上的无扫描并行照明^[85]. 这种组合策略不仅保留了双光子激发的高空间选择性, 还显著提高了时间分辨率, 使得在毫秒量级内同时激活数十至数百个神经元成为可能.

2017年, Pégard等人^[13]在小鼠活体实验中提出并验证了三维无扫描全息光遗传学(Three-dimensional Scanless Holographic Optogenetics with Temporal Focusing, 3D-SHOT)技术, 将TF-CGH扩展到三维空间, 实现了在任意轴向平面上对定制化神经元集群的单次光激活, 且不受可寻址平面数量的限制. 该技术在体内

表现出单神经元级别的空间分辨率和优异的定位精度,能够在复杂的神经网络中实现高维度的功能解析.实验结果表明,3D-SHOT不仅在横向分辨率上可达 $1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$,轴向分辨率也可稳定维持在 $5\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$ 范围内,同时在散射组织中具备数百微米至毫米级的穿透深度,这对于深部脑区的光遗传调控尤为关键^[19].

然而,TF-CGH在实际应用中仍面临若干挑战.首先,光学散斑效应会降低照明均匀性,影响刺激的精确性,通常需借助相位优化算法或多模式干涉抑制等方法进行改善.其次,轴向分辨率受限于色散补偿精度和光学元件质量,进一步优化光路设计和元件性能是提升成像与刺激质量的关键.此外,系统复杂度和功率需求也是制约其推广的重要因素.未来可通过开发高效低功率的光敏蛋白、引入三光子激发以增强深部靶向能力,以及结合自适应光学技术来补偿组织散射与像差,有望进一步拓展TF-CGH在神经科学研究中的应用边界.

4.2 基于双光子扫描的全息技术

多光子光遗传学刺激除采用时间聚焦技术实现无扫描并行照明外,还可通过相位调控的光束整形与高速扫描策略相结合,实现对目标神经元的高精度、可编程光刺激.其基本原理是在物镜后孔径的共轭面利用SLM对入射波前进行相位调制聚焦艾里斑并借助高速扫描器在选定的细胞轮廓或亚细胞结构上在胞体表面进行螺旋式或光栅式扫描.与基于全息和时间聚焦的技术方案相比,扫描式方法虽然能实现更快速的光刺激,但每次可处理的神经元数量相对有限.2015年,Packer研究团队^[12,86]提出通过空间光调制器实现光束分束,结合快速扫描策略来优化神经元光刺激,在保证刺激速度的同时最大化单次刺激的神经元数量.

典型双光子扫描系统由飞秒激光源、SLM、扫描单元、光束整形望远镜及高数值孔径物镜组成.当扫描单元工作时,显微系统产生的光斑在样品表面快速移动,实现对一系列目标位点的连续刺激.目前常用的扫描元件主要包括两类:电流计扫描器和声光偏转器(Acousto-Optic Deflector, AOD)^[1,87].针对精准光遗传学的应用需求,电流计扫描器又可细分为两种主要类型:标准检流计式扫描振镜和共振扫描振镜.标准电流计扫描器支持任意波形驱动,虽然受限于频率

和幅度参数,但特别适用于慢动力学单细胞光激活研究.例如,Tank研究组^[42]首次实现双光子激活光敏蛋白的突破性实验,就是采用标准检流计式光学扫描振镜完成的.而基于共振扫描振镜的双光子扫描显微镜能够实现三维实时活体成像,因此常与双光子全息靶向调控技术联用,用于神经集群活动与功能研究.

为保证全视场内的均匀成像与刺激性能,光路中常配置望远镜系统调节光束填充率,并通过色散补偿与像差校正优化脉冲时宽和焦点质量.在刺激策略上,常用的轨迹包括螺旋扫描和光栅扫描,前者适合胞体均匀照明,后者在复杂形态或密集分布的细胞中具有较高的覆盖稳定性.对于树突或轴突等细长结构,可采用线扫描或李萨如轨迹以提高覆盖效率并降低热积累.相位全息与局部微扫描的结合,可在一次刺激周期内覆盖更多目标,同时保持单细胞级的空间精度和毫秒量级的时间分辨率.

目前,基于双光子扫描的光激活技术已成为精准光遗传学的主要研究方法,在光敏蛋白的双光子激发验证、活体光遗传学刺激以及神经集群功能研究等领域均取得重要突破^[88].然而,其并行规模受限于功率预算和光敏蛋白激发阈值,高速扫描下的热积累与光毒性风险、AOD引入的色散与像差以及成像与刺激间的光谱串扰,仍是需要解决的问题.未来的发展方向包括提升激光源脉冲能量与重复率,优化波前与扫描轨迹的联合控制算法,开发高效低功率光敏蛋白,引入远程调焦实现快速三维寻址,以及与自适应光学结合以补偿组织散射和像差,从而进一步提升深部、多目标、高精度的光遗传学调控能力.

5 应用与展望

光遗传学凭借高时空分辨率与细胞类型特异性,为神经元活动的非侵入式精准调控提供了强大工具,显著拓展了神经科学的研究边界.目前,该领域在基础技术突破、应用场景拓展与系统集成创新方面均取得显著进展.

面向不同的研究需求,光遗传学技术在技术层面已形成一套互补性技术体系,为精准调控提供了关键基础.现有光刺激方法在空间分辨率、时间分辨率、组织穿透深度及并行能力等方面各具优势,形成了互补性强的技术体系.单光子光刺激方案在系统简化与

大范围刺激方面更具优势, 其中声光偏转器以微秒级响应速度适用于稀疏分布目标的高速随机访问, DMD 投影法在二维图案生成与多色光刺激中灵活高效, 而计算机生成全息技术凭借光斑形状可定制与低热效应, 在多目标同步刺激中具有独特价值^[89], 3D-MAP 技术则通过快速三维寻址实现大规模神经元群体的高通量操控. 双光子光刺激技术则在深层组织的高精度定位与光学层析能力上表现突出, 其中基于时间聚焦的计算全息(TF-CGH)技术适用于大面积、无扫描的并行照明与多平面同步激活, 兼具微米级空间分辨率与良好的组织穿透力, 而基于双光子扫描的全息技术, 适合于单细胞乃至亚细胞级别的精准刺激与快速轮廓扫描. 这些多样化技术体系的持续集成与创新, 显著推动了光遗传学在神经科学研究中的实用化进程. 特别是双光子技术与先进光场调控技术的结合, 成功应对了大深度组织选择性照明的挑战, 使得研究者能够深入活体全脑或深层皮层内部, 以单细胞精度和高效率并行调控的方式, 精准解析并因果验证特定神经环路的功能^[90-92]. 这种在单细胞水平上实现大规模、高效率、深穿透调控的能力, 是系统揭示复杂认知、情感及行为背后神经编码时空动态模式的关键支撑. 如表 1 所示, 不同方法在性能参数上的差异决定了其在具体实验场景中的适用性, 研究者可根据空间定位精度、时间控制需求、组织深度及系统复杂度等因素灵活选择或组合最优策略, 以实现神经元活动的高效、精准调控.

光遗传学选择性光刺激显微技术凭借其高时空精度的操控特性, 正通过多学科交叉融合不断拓展其应用维度. 其研究的根本意义在于提供了在活体、高精度细胞和亚细胞水平上对生物学事件进行主动精确干预的手段, 使得研究者能够对复杂生物功能和特定细胞活动之间的联系进行可控的干预与观察, 从而实现对复杂生命活动驱动机制的深入解析. 在神经科学领域, 光刺激技术与光敏蛋白工程^[93,94]、高通量电生理学、声遗传学、磁遗传学等技术的交叉融合, 持续拓展其应用边界, 在解析脑功能环路和行为神经编码方面展现出广阔前景, 包括精确界定神经元类型, 解析驱动行为效应的最小神经单元, 破译行为学效应的时空神经编码等^[95-99]. 这使得揭示大脑功能环路中神经元活动的因果关系和动态调控机制成为可能, 例如解析介导奖赏、焦虑或痛觉的关键通路中兴奋性和抑制

性神经元的精细平衡及其动态变化, 同时还可借助光遗传技术在生物神经网络中精确调控并记录神经元活动, 拓展神经机器人系统的控制能力^[100]. 在发育生物学领域, 高时空精度的光遗传学操控具有特殊价值. 该技术不仅使研究者能够在体外调控细胞活动以建立基因活动、细胞信号转导与细胞命运决定之间直接的因果关系^[101], 还可结合活体实验深入揭示基因活动与发育表型之间的关联, 并以动态方式解析控制细胞迁移、细胞命运决定与组织器官形态发生的底层原理和生物力学调控机制^[102-104]. 在临床转化方面, 光遗传学技术已开始探索运动障碍疾病中的视力恢复^[105,106]、帕金森等疾病的深层脑刺激治疗^[106]. 尤为值得关注的是, 利用光遗传学工具操控类器官及干细胞衍生的组织结构^[107-109], 并结合因果分析方法实时解析神经元活动功能, 不仅为研究人类精神类疾病的病理机制提供了更接近生理状态的体外模型, 深化了对大脑工作机制的理解, 也为未来的药物筛选和精准临床转化奠定了基础^[110]. 此外, 在脑机接口领域, 光遗传学为精准调控神经活动提供了关键手段, 有望实现对特定神经环路的毫秒级操控, 推动脑机接口从单向“读取”向“读写双向交互”升级^[111], 提升运动修复与疾病治疗的精准度, 并有潜力与人工智能融合, 发展闭环式智能神经调控系统, 为帕金森病、抑郁症等脑疾病带来新突破^[112,113].

在系统集成创新方面, 光遗传技术正朝着更高集成度、更强兼容性与更优性能的方向发展. 选择性刺激系统具有多重应用潜力, 不仅可用于神经递质光解和各类光活化分子操控, 还能精确定义荧光相关光谱的探测体积, 研究荧光漂白后恢复动力学以及调控光活化荧光蛋白^[114]. 尽管如此, 光遗传学技术仍面临多项挑战, 例如, 如何实现更快速、精确且深层的光刺激, 特别是在复杂深部组织中, 维持高分辨率刺激尤为困难. 近年来, 新兴的全光学原位层析技术为此提供了新思路^[115], 该技术通过融合多光子成像与飞秒激光微加工, 无需机械切片即可实现对异质性样本的高精度体积成像与移除, 为在深层组织中实现高保真光刺激与同步结构解析奠定了方法学基础. 与此同时, 光场调控技术的快速发展也为光遗传学研究注入了新的动力. 除了多靶点同时光刺激, 使用空间光调制器可以对光场强度与相位进行编码, 在三维空间中实现对光场分布的精确控制, 从而支持多位点靶向刺激^[82]. 这种方式不仅提高了刺激效率, 还能有效减少非靶向

表 1 多种光刺激技术的性能比较与应用适配性分析

Table 1 Comparative analysis of performance parameters and application suitability across photostimulation techniques

方法	基本原理	优势	局限	适用条件
单光子振镜扫描	利用振镜控制聚焦单点光斑在样品平面逐点移动, 按预设轨迹串行照射目标, 实现高精度单细胞或多细胞依次刺激.	光路简单、定位精度高、抗背景干扰能力强, 可实现任意轨迹扫描, 易与成像系统集成.	串行扫描速度受限, 无法多点同步; 穿透深度和轴向分辨率低.	适合浅层组织的单细胞或小规模多细胞精确刺激, 适用于需要高定位精度、轨迹灵活但对同步性要求不高的实验.
单光子声光偏转器扫描	通过声光偏转器快速改变光束偏转角度, 实现无机械惯性的高速单点扫描, 适合快速定位和复杂轨迹刺激.	无机械惯性、响应速度快(微秒级), 可随机访问多点, 适合高速多目标切换.	存在色散与像差, 需要补偿; 视场有限; 光路复杂度高.	适合需要高速扫描、快速定位的浅层实验, 适用于动态过程捕捉或复杂轨迹刺激, 对穿透深度要求不高.
单光子DMD投影	采用数字微镜器件对入射光进行二维强度调制, 将生成的光图案直接投影到样品, 实现大面积、多区域并行刺激.	图案切换速度快, 可生成任意二维光照图案, 硬件成本相对低, 兼容多波长.	光能利用率低, 轴向分辨率有限, 受散射影响大.	适合浅层、大面积、多目标并行刺激, 适用于神经环路功能研究, 结合结构光光场调控.
单光子计算生成全息	利用空间光调制器对激光波前进行相位调制, 在像平面生成任意形状、多点分布的光斑, 实现空间并行选择性刺激.	可一次生成多光斑并按需分配功率, 光斑形状可与细胞形态匹配, 热效应低.	刷新率受SLM限制, 三维相位计算量大, 对像差和系统稳定性敏感.	适合浅层组织中多点、任意形状光斑的并行刺激, 适用于需要高空间自由度和形态匹配的神经元群体调控.
单光子3D-MAP	结合扫描镜角度调制与DMD空间调制, 在空间与角度域协同控制下高速生成三维多点光图案, 实现快速、灵活的体积刺激.	结合角度扫描与空间调制, 三维寻址速度快(kHz级), 功率需求低于多光子.	仍受单光子穿透深度限制, 需权衡可寻址体积与分辨率.	适合浅层或中等深度的三维多点高速刺激, 适用于大规模神经元群体的体积寻址和快速网络功能解析.
双光子TF-CGH	将时间聚焦的轴向限制能力与计算全息的空间自由度结合, 在双光子条件下实现大面积、高分辨率、多点并行刺激.	无机械惯性, 微米级轴向分辨率, 对散射组织穿透力强, 响应速度快.	散斑效应影响均匀性, 轴向分辨率受色散补偿限制, 系统复杂度高.	适合深层组织的大面积、多点并行刺激, 适用于需要高轴向分辨率、低背景和深部靶向的精确神经调控.
双光子扫描光刺激	利用SLM光束整形结合高速扫描器, 在目标细胞或亚细胞结构上按轨迹扫描, 实现高空间精度的双光子定点刺激.	单细胞/亚细胞空间精度高, 轨迹灵活可编程.	并行规模受功率限制, 高速扫描下热积累与光毒性风险, AOD引入色散像差.	适合深层组织的高精度、可编程定点刺激, 适用于单细胞或亚细胞结构的精细调控及功能研究.

区域的干扰, 增强实验结果的特异性与可靠性, 并有机会与STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy)^[116–118], PALM (Photoactivated Localization Microscopy)^[119–121], SIM^[122–126]等超分辨成像方法结合, 其融合的意义在于, 将光刺激的分辨率从细胞水平推向细胞器水平, 从而实现对突触后密度、线粒体、内质网等关键细胞器功能的因果操控, 将有助于在细胞器尺度上实时解析光刺激引发的细胞动态过程, 推动对生命活动机制的更深入理解^[48,127,128]. 此外, 偏振作为光的重要自由度, 在光与物质相互作用中扮演关键角色. 由于生物体系普遍具有各向异性与手性特征,

偏振光能够诱发不同于非偏振光的生物效应, 为精准调控复杂生物过程提供了新的思路^[129]. 更为前沿的是, 近年来兴起的超构表面光场调控技术为光刺激的小型化与集成化提供了可能, 使得活体条件下的高精度光调控研究具备更广阔的发展前景^[123,130].

随着光学方法、光敏蛋白工程及系统集成技术的持续进步, 深层组织中的高分辨率刺激等问题有望逐步解决. 未来可以预见, 光遗传学选择性光刺激显微技术将在更高精度、更高效率和更高通量的方向上不断发展, 并在基础研究、疾病机理解析及临床应用中发挥愈加重要的作用.

参考文献

- 1 Ronzitti E, Ventalon C, Canepari M, et al. Recent advances in patterned photostimulation for optogenetics. *J Opt*, 2017, 19: 113001
- 2 Crick F H C. Thinking about the brain. *Sci Am*, 1979, 241: 219–232
- 3 Scanziani M, Häusser M. Electrophysiology in the age of light. *Nature*, 2009, 461: 930–939
- 4 Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods*, 2011, 8: 26–29
- 5 Yang W. Manipulating neuronal circuits, in concert. *Science*, 2021, 373: 635
- 6 Abdelfattah A, Allu S R, Campbell R E, et al. Neurophotonic tools for microscopic measurements and manipulation: Status report. *Neurophotonics*, 2022, 9: 013001
- 7 Adamantidis A R, Zhang F, Aravanis A M, et al. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, 2007, 450: 420–424
- 8 Nikolenko V, Watson B O, Araya R, et al. SLM microscopy: Scanless two-photon imaging and photostimulation using spatial light modulators. *Front Neural Circuits*, 2008, 2: 5
- 9 Stierschneider A, Neuditschko B, Colleselli K, et al. Comparative and temporal characterization of LPS and blue-light-induced TLR4 signal transduction and gene expression in optogenetically manipulated endothelial cells. *Cells*, 2023, 12: 697
- 10 Andrasfalvy B K, Zemelman B V, Tang J, et al. Two-photon single-cell optogenetic control of neuronal activity by sculpted light. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 11981–11986
- 11 Reutsky-Gefen I, Golan L, Farah N, et al. Holographic optogenetic stimulation of patterned neuronal activity for vision restoration. *Nat Commun*, 2013, 4: 1509
- 12 Packer A M, Russell L E, Dalgleish H W P, et al. Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution *in vivo*. *Nat Methods*, 2015, 12: 140–146
- 13 Pégard N C, Mardinly A R, Oldenburg I A, et al. Three-dimensional scanless holographic optogenetics with temporal focusing (3D-SHOT). *Nat Commun*, 2017, 8: 1228
- 14 Carrillo-Reid L, Yang W, Bando Y, et al. Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science*, 2016, 353: 691–694
- 15 Carrillo-Reid L, Han S, Yang W, et al. Controlling visually guided behavior by holographic recalling of cortical ensembles. *Cell*, 2019, 178: 447–457.e5
- 16 Chettih S N, Harvey C D. Single-neuron perturbations reveal feature-specific competition in V1. *Nature*, 2019, 567: 334–340
- 17 Marshal J H, Kim Y S, Machado T A, et al. Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception. *Science*, 2019, 365: eaaw5202
- 18 Forli A, Pisoni M, Printz Y, et al. Optogenetic strategies for high-efficiency all-optical interrogation using blue-light-sensitive opsins. *eLife*, 2021, 10: e63359
- 19 Papaioannou S, Medini P. Advantages, pitfalls, and developments of all optical interrogation strategies of microcircuits *in vivo*. *Front Neurosci*, 2022, 16: 859803
- 20 Daie K, Svoboda K, Druckmann S. Targeted photostimulation uncovers circuit motifs supporting short-term memory. *Nat Neurosci*, 2021, 24: 259–265
- 21 Zhang J, Hughes R N, Kim N, et al. A one-photon endoscope for simultaneous patterned optogenetic stimulation and calcium imaging in freely behaving mice. *Nat Biomed Eng*, 2023, 7: 499–510
- 22 Vaziri A, Emiliani V. Reshaping the optical dimension in optogenetics. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22: 128–137
- 23 Kim C K, Adhikari A, Deisseroth K. Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18: 222–235
- 24 Werley C A, Chien M P, Cohen A E. Ultrawidefield microscope for high-speed fluorescence imaging and targeted optogenetic stimulation. *Biomed Opt Express*, 2017, 8: 5794–5813
- 25 Emiliani V, Entcheva E, Hedrich R, et al. Optogenetics for light control of biological systems. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2: 55
- 26 Fan H, Barnes C, Hwang H, et al. Precise modulation of embryonic development through optogenetics. *Genesis*, 2022, 60: e23505
- 27 Ott S, Xu S, Lee N, et al. Kalium channelrhodopsins effectively inhibit neurons. *Nat Commun*, 2024, 15: 3480
- 28 Boyden E S. Optogenetics: Using light to control the brain. *Cerebrum*, 2011, 2011: 16
- 29 Camcioglu E, Mohammadrezaloo D G, Dinc B. Optogenetics and its transformative role in tissue engineering and regenerative medicine. *Nano*

- Sel, 2024, 5: e202400013
- 30 Rindner D J, Lur G. Practical considerations in an era of multicolor optogenetics. *Front Cell Neurosci*, 2023, 17: 1160245
- 31 McKee B, Liu S, Cai P X, et al. Optogenetic control of T cells for immunomodulation. *Essays Biochem*, 2025, 69: EBC20253014
- 32 Gomelsky M, Klug G. BLUF: A novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27: 497–500
- 33 Motta-Mena L B, Reade A, Mallory M J, et al. An optogenetic gene expression system with rapid activation and deactivation kinetics. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 196–202
- 34 Eldar D, Albert S, Tatyana A, et al. Optogenetic approaches for neural tissue regeneration: A review of basic optogenetic principles and target cells for therapy. *Neural Regen Res*, 2026, 21: 521–533
- 35 Vierock J, Peter E, Grimm C, et al. WiChR, a highly potassium-selective channelrhodopsin for low-light one- and two-photon inhibition of excitable cells. *Sci Adv*, 2022, 8: eadd7729
- 36 Papagiakoumou E, Anselmi F, Bègue A, et al. Scanless two-photon excitation of channelrhodopsin-2. *Nat Methods*, 2010, 7: 848–854
- 37 Sims R R, Bendifallah I, Grimm C, et al. Scanless two-photon voltage imaging. *Nat Commun*, 2024, 15: 5095
- 38 Oheim M, Beaurepaire E, Chaigneau E, et al. Two-photon microscopy in brain tissue: Parameters influencing the imaging depth. *J Neurosci Methods*, 2001, 111: 29–37
- 39 Fan G Y, Fujisaki H, Miyawaki A, et al. Video-rate scanning two-photon excitation fluorescence microscopy and ratio imaging with cameleons. *Biophys J*, 1999, 76: 2412–2420
- 40 Lutz C, Otis T S, DeSars V, et al. Holographic photolysis of caged neurotransmitters. *Nat Methods*, 2008, 5: 821–827
- 41 Rózsa B, Katona G, Vizi E S, et al. Random access three-dimensional two-photon microscopy. *Appl Opt*, 2007, 46: 1860
- 42 Rickgauer J P, Deisseroth K, Tank D W. Simultaneous cellular-resolution optical perturbation and imaging of place cell firing fields. *Nat Neurosci*, 2014, 17: 1816–1824
- 43 Papagiakoumou E, de Sars V, Oron D, et al. Patterned two-photon illumination by spatiotemporal shaping of ultrashort pulses. *Opt Express*, 2008, 16: 22039–22047
- 44 Salomé R, Kremer Y, Dieudonné S, et al. Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acousto-optic deflectors. *J Neurosci Methods*, 2006, 154: 161–174
- 45 Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 1263–1268
- 46 Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 389–412
- 47 Hira R, Isomura Y. Technical development of two-photon optogenetic stimulation and its potential application to brain-machine interfaces. *Front Neural Circuits*, 2023, 17: 1234567
- 48 Taal A J, Uguz I, Hillebrandt S, et al. Optogenetic stimulation probes with single-neuron resolution based on organic LEDs monolithically integrated on CMOS. *Nat Electron*, 2023, 6: 669–679
- 49 Berling D, Baroni L, Chaffiol A, et al. Optogenetic stimulation recruits cortical neurons in a morphology-dependent manner. *J Neurosci*, 2024, 44: e1215242024
- 50 Xue Y, Waller L, Adesnik H, et al. Three-dimensional multi-site random access photostimulation (3D-MAP). *eLife*, 2022, 11: e73266
- 51 Packer A M, Roska B, Häusser M. Targeting neurons and photons for optogenetics. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 805–815
- 52 Zhao S, Rauer B, Valzania L, et al. Single-pixel transmission matrix recovery via two-photon fluorescence. *Sci Adv*, 2024, 10: eadi3442
- 53 Popoff S M, Leroose G, Carminati R, et al. Measuring the transmission matrix in optics: An approach to the study and control of light propagation in disordered media. *Phys Rev Lett*, 2010, 104: 100601
- 54 Čižmár T, Dholakia K. Exploiting multimode waveguides for pure fibre-based imaging. *Nat Commun*, 2012, 3: 1027
- 55 Yaqoob Z, Psaltis D, Feld M S, et al. Optical phase conjugation for turbidity suppression in biological samples. *Nat Photon*, 2008, 2: 110–115
- 56 Katz O, Small E, Silberberg Y. Looking around corners and through thin turbid layers in real time with scattered incoherent light. *Nat Photon*, 2012, 6: 549–553
- 57 Papadopoulos I N, Farahi S, Moser C, et al. High-resolution, lensless endoscope based on digital scanning through a multimode optical fiber. *Biomed Opt Express*, 2013, 4: 260–270
- 58 Tehrani K F, Xu J, Kner P. Wavefront correction using machine learning methods for single molecule localization microscopy. *Proc SPIE*, 2015,

9335: 93350L

- 59 Horstmeyer R, Yang C. A phase space model of Fourier ptychographic microscopy. *Opt Express*, 2014, 22: 338–354
- 60 Li S, Deng M, Lee J, et al. Imaging through glass diffusers using densely connected convolutional networks. *Optica*, 2018, 5: 803–813
- 61 Wang S, Szobota S, Wang Y, et al. All optical interface for parallel, remote, and spatiotemporal control of neuronal activity. *Nano Lett*, 2007, 7: 3859–3863
- 62 Legnini I, Emmenegger L, Zappulo A, et al. Spatiotemporal, optogenetic control of gene expression in organoids. *Nat Methods*, 2023, 20: 1544–1552
- 63 Dhawale A K, Hagiwara A, Bhalla U S, et al. Non-redundant odor coding by sister mitral cells revealed by light addressable glomeruli in the mouse. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 1404–1412
- 64 Jerome J, Foehring R C, Armstrong W E, et al. Parallel optical control of spatiotemporal neuronal spike activity using high-speed digital light processing. *Front Syst Neurosci*, 2011, 5: 70
- 65 Rahman S, Joy M S H, Saif M T A. Optogenetic neural spheroids excite primary neural network. *J Neural Eng*, 2025, 22: 036047
- 66 Kobayashi T, Shimba K, Narumi T, et al. Revealing single-neuron and network-activity interaction by combining high-density microelectrode array and optogenetics. *Nat Commun*, 2024, 15: 9547
- 67 Dan D, Lei M, Yao B, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy. *Sci Rep*, 2013, 3: 1116
- 68 Zhao T, Zhang J, Wang M, et al. Real-time super-resolution structured illumination microscopy: Current progress in joint space and frequency reconstruction. *Rep Prog Phys*, 2025, 88: 076401
- 69 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. *Biomed Opt Express*, 2022, 13: 2530
- 70 Zhao T Y, Wang Z J, Feng K, et al. High-speed structured illumination microscopy and its applications (in Chinese). *Laser Optoelectron Prog*, 2023, 50: 0307104 [赵天宇, 汪召军, 冯坤, 等. 高速超分辨结构光照明显微的关键技术及应用. *激光与光电子学进展*, 2020, 57: 240001]
- 71 Ren J R, Fu X D, Wang M R, et al. Advances in rapid three-dimensional wide field microscopy (in Chinese). *Chin J Laser*, 2023, 50: 0307104 [任婧荣, 傅相达, 王孟瑞, 等. 快速宽场三维显微技术研究进展. *中国激光*, 2023, 50: 0307104]
- 72 Jung H, Kang H, Nam Y. Digital micromirror based near-infrared illumination system for plasmonic photothermal neuromodulation. *Biomed Opt Express*, 2017, 8: 2866–2878
- 73 Omid S, Berdichevsky Y. Pathway-like activation of 3D neuronal constructs with an optical interface. *Biosensors*, 2025, 15: 179
- 74 Burton R A B, Klimas A, Ambrosi C M, et al. Optical control of excitation waves in cardiac tissue. *Nat Photon*, 2015, 9: 813–816
- 75 Scardigli M, Müllenbroich C, Margoni E, et al. Real-time optical manipulation of cardiac conduction in intact hearts. *J Physiol*, 2018, 596: 3841–3858
- 76 Szabo V, Ventalon C, De Sars V, et al. Spatially selective holographic photoactivation and functional fluorescence imaging in freely behaving mice with a fiberscope. *Neuron*, 2014, 84: 1157–1169
- 77 Zahid M, Vélez-Fort M, Papagiakoumou E, et al. Holographic photolysis for multiple cell stimulation in mouse hippocampal slices. *PLoS One*, 2010, 5: e9431
- 78 Anselmi F, Ventalon C, Bègue A, et al. Three-dimensional imaging and photostimulation by remote-focusing and holographic light patterning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 19504–19509
- 79 Shymkiv Y, Yuste R. Aberration-free holographic microscope for simultaneous imaging and stimulation of neuronal populations. *Opt Express*, 2023, 31: 33461–33474
- 80 Adesnik H, Abdeladim L. Probing neural codes with two-photon holographic optogenetics. *Nat Neurosci*, 2021, 24: 1356–1366
- 81 Cottam J C H, Smith S L, Häusser M. Target-specific effects of somatostatin-expressing interneurons on neocortical visual processing. *J Neurosci*, 2013, 33: 19567–19578
- 82 Yang W, Yuste R. Holographic imaging and photostimulation of neural activity. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, 50: 211–221
- 83 Papagiakoumou E, Ronzitti E, Emiliani V. Scanless two-photon excitation with temporal focusing. *Nat Methods*, 2020, 17: 571–581
- 84 Oron D, Tal E, Silberberg Y. Scanningless depth-resolved microscopy. *Opt Express*, 2005, 13: 1468–1476
- 85 Chen I W, Ronzitti E, Lee B R, et al. *In vivo* sub-millisecond two-photon optogenetics with temporally focused patterned light. *J Neurosci*, 2019, 39: 3484–3497
- 86 Wang Y F, Zheng Y, Zhu Y, et al. Key technologies and progress of precision optogenetics (in Chinese). *Laser Optoelectron Prog*, 2022, 59:

- 0800001 [王一帆, 郑瑶, 朱玥, 等. 精准光遗传学的关键技术及进展. 激光与光电子学进展, 2022, 59: 0800001]
- 87 Yang W, Carrillo-Reid L, Bando Y, et al. Simultaneous two-photon imaging and two-photon optogenetics of cortical circuits in three dimensions. *eLife*, 2018, 7: e32671
- 88 Rickgauer J P, Tank D W. Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15025–15030
- 89 Telliez C, Sims R, Faini G, et al. Multiphoton neurophotonics: Recent advances in imaging and manipulating neuronal circuits. *ACS Photonics*, 2025, 12: 3296–3318
- 90 Zhang C, Yu B, Lin F, et al. Deep tissue super-resolution imaging with adaptive optical two-photon multifocal structured illumination microscopy. *PhotonIX*, 2023, 4: 38
- 91 Tsuchida C A, Brandes N, Bueno R, et al. Mitigation of chromosome loss in clinical CRISPR-Cas9-engineered T cells. *Cell*, 2023, 186: 4567–4582.e20
- 92 Wang C, Yan B, Ma S, et al. Advances in distal-scanning two-photon endomicroscopy for biomedical imaging. *Photonics*, 2025, 12: 546
- 93 Sun Y, Li M, Cao S, et al. Optogenetics for understanding and treating brain injury: Advances in the field and future prospects. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 1800
- 94 Kale M B, Wankhede N L, Bishoyi A K, et al. Emerging biophysical techniques for probing synaptic transmission in neurodegenerative disorders. *Neuroscience*, 2025, 565: 63–79
- 95 Silva P, Jacinto L. Wireless devices for optical brain stimulation: A review of current developments for optogenetic applications in freely moving mice. *Cel Mol Bioeng*, 2024, 18: 1–13
- 96 Hsu L M, Cerri D H, Carelli R M, et al. Optogenetic stimulation of cell bodies versus axonal terminals generate comparable activity and functional connectivity patterns in the brain. *Brain Stimul*, 2025, 18: 822–828
- 97 Latypova A A, Yaremenko A V, Pechnikova N A, et al. Magnetogenetics as a promising tool for controlling cellular signaling pathways. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22: 327
- 98 Miyahara Y, Shimba K, Kotani K, et al. Sensory-spinal neuron co-culture platform enables analysis of sensory-driven spinal activation. *Front Neurosci*, 2025, 19: 1619340
- 99 Schröter M, Cardes F, Bui C V H, et al. Advances in large-scale electrophysiology with high-density microelectrode arrays. *Lab Chip*, 2025, 25: 4844–4885
- 100 Deng Y, Li J, Lin Y, et al. Optogenetically enhanced physical reservoir computing with *in vitro* neural networks for obstacle avoidance. *J Biomed Opt*, 2025, 30: 105004
- 101 Andrews J P, Geng J, Voitiuk K, et al. Multimodal evaluation of network activity and optogenetic interventions in human hippocampal slices. *Nat Neurosci*, 2024, 27: 2487–2499
- 102 Gray N W, Weimer R M, Bureau I, et al. Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex *in vivo*. *PLoS Biol*, 2006, 4: e370
- 103 Wang Y, Quan Y, Zhou S, et al. Acousto-optogenetics bandpass stabilizer: A programmable platform for mapping single-cell phenotypic life trajectories. *Mater Today Bio*, 2025, 33: 102087
- 104 Carmignani A, Yamazaki T, Battaglini M, et al. Cellular activity modulation mediated by near infrared-irradiated polydopamine nanoparticles: *In vitro* and *ex vivo* investigation. *ACS Nano*, 2025, 19: 16267–16286
- 105 Bansal H, Pyari G, Roy S. Theoretical prediction of broadband ambient light optogenetic vision restoration with ChRmine and its mutants. *Sci Rep*, 2024, 14: 11642
- 106 Tao C, Zhang G W, Sun W J, et al. Excitation-inhibition imbalance in medial preoptic area circuits underlies chronic stress-induced depression-like states. *Nat Commun*, 2024, 15: 8575
- 107 Jeong D, Kim S, Park H, et al. Optogenetically activatable MLKL as a standalone functional module for necroptosis and therapeutic applications in antitumoral immunity. *Adv Sci*, 2025, 12: e2412393
- 108 Andersson M, Avaliani N, Svensson A, et al. Optogenetic control of human neurons in organotypic brain cultures. *Sci Rep*, 2016, 6: 24818
- 109 Yaron A, Zhang Z, Akita D, et al. Dissociated neuronal cultures as model systems for self-organized prediction. *Front Neural Circuits*, 2025, 19: 1568652
- 110 Martínez-Ara G, Taberner N, Takayama M, et al. Optogenetic control of apical constriction induces synthetic morphogenesis in mammalian tissues. *Nat Commun*, 2022, 13: 5400
- 111 Tang F, Yan F, Zhong Y, et al. Optogenetic brain-computer interfaces. *Bioengineering*, 2024, 11: 821

- 112 Ranjandish R, Schmid A. A review of microelectronic systems and circuit techniques for electrical neural recording aimed at closed-loop epilepsy control. [Sensors](#), 2020, 20: 5716
- 113 Xu S, Liu Y, Lee H, et al. Neural interfaces: Bridging the brain to the world beyond healthcare. [Exploration](#), 2024, 4: 20230146
- 114 Wüstner D. Dynamic mode decomposition of fluorescence loss in photobleaching microscopy data for model-free analysis of protein transport and aggregation in living cells. [Sensors](#), 2022, 22: 4731
- 115 Ji X, Huang S, Friedman B, et al. Spatiotemporal focusing enables all-optical *in situ* histology of heterogeneous tissue. [Nat Methods](#), 2025, 22: 2205–2210
- 116 Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. [Opt Lett](#), 1994, 19: 780–782
- 117 Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2000, 97: 8206–8210
- 118 Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A. STED super-resolved microscopy. [Nat Methods](#), 2018, 15: 173–182
- 119 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. [Science](#), 2006, 313: 1642–1645
- 120 Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. [Biophys J](#), 2006, 91: 4258–4272
- 121 Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, et al. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. [Nat Methods](#), 2008, 5: 417–423
- 122 Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. [J Microsc](#), 2000, 198: 82–87
- 123 Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified. [Nat Cell Biol](#), 2019, 21: 72–84
- 124 Wang Z, Zhao T, Hao H, et al. High-speed image reconstruction for optically sectioned, super-resolution structured illumination microscopy. [Adv Photon](#), 2022, 4: 78–90
- 125 Zhang J, Zhao T, Fu X, et al. High-speed image reconstruction for nonlinear structured illumination microscopy. [Photon Res](#), 2025, 13: 743–760
- 126 Wang Z, Zhao T, Cai Y, et al. Rapid, artifact-reduced, image reconstruction for super-resolution structured illumination microscopy. [Innovation](#), 2023, 4: 100425
- 127 Kumar S, Khammash M. Platforms for optogenetic stimulation and feedback control. [Front Bioeng Biotechnol](#), 2022, 10: 918917
- 128 Tong L, Han S, Xue Y, et al. Single cell *in vivo* optogenetic stimulation by two-photon excitation fluorescence transfer. [iScience](#), 2023, 26: 107857
- 129 Mason S F. Origins of biomolecular handedness. [Nature](#), 1984, 311: 19–23
- 130 Dorrah A H, Capasso F. Tunable structured light with flat optics. [Science](#), 2022, 376: eabi6860

Review of the research progress of precision photostimulation for optogenetics

YAN JiaJing^{1,2}, LIU Chang^{1,2}, LIN YuChen^{1,2}, WANG MengRui^{1,2}, ZHANG JingXiang^{1,2},
SHU ManMing^{1,2}, ZHAO TianYu^{1,2}, LIANG YanSheng^{1,2} & LEI Ming^{1,2*}

¹ School of Physics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

² MOE Key Laboratory for Nonequilibrium Synthesis and Modulation of Condensed Matter, Xi'an 710049, China

*Corresponding author (email: ming.lei@mail.xjtu.edu.cn)

Photostimulation and optogenetic manipulation, by precisely controlling wavelength, light intensity, and spatiotemporal distribution, offer a noninvasive, high-precision tool for life-science research. To meet diverse application requirements, precise photostimulation strategies have become increasingly varied. Compared with conventional microscale manipulation methods such as electrical stimulation and pharmacological delivery, optical stimulation not only enables targeted single-cell control but can also be integrated with microscopy to monitor cellular or tissue dynamics in real time during stimulation, and has thus seen widespread application in neuroscience and cell biology. This review systematically summarizes advances in high-resolution optical stimulation techniques, presents the principles and characteristics of the two major technical routes—scanning-based and parallel-based—and provides a detailed evaluation of implementation methods under both single-photon and two-photon excitation. Finally, future development directions are discussed to provide a comprehensive technical reference for researchers in related fields.

photostimulation, optogenetics, microscopy systems

PACS: 07.60.-j, 87.64.M-, 42.79.-e

doi: [10.1360/SSPMA-2025-0458](https://doi.org/10.1360/SSPMA-2025-0458)