

多尺度近红外二区荧光活体成像方法与验证

叶成磊^{1,2}, 何志平¹, 王雪涵^{1,2}, 靳爱军^{1*}

(1. 中国科学院上海技术物理研究所, 上海 200083;
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 荧光成像仪器是观测生物组织与细胞的重要手段。近红外二区 (NIR-II, 900~1880 nm) 较近红外一区 (NIR-I, 760~900 nm) 和可见光 (360~760 nm) 具有更深的组织穿透深度, 因此近红外二区荧光成像更适合对活体动物进行观测。目前近红外二区荧光活体成像主要局限于宏观或微观单一尺度, 难以快速地对观测目标进行全面表征。提出了一种新型的基于荧光蛋白标记的多尺度近红外二区荧光活体成像方法, 宏观尺度对活体动物进行整体成像, 微观尺度实现活体动物的小视场高空间分辨率成像。该方法的思路为: 首先借助荧光蛋白对活体动物进行荧光标记, 然后通过宏观成像功能模块对荧光活体动物进行整体观测以确定感兴趣的目标区域, 再切换至微观成像功能模块对该区域进行小视场高空间分辨率的清晰成像, 从而实现对活体动物的多层次信息获取。搭建了相关实验装置对该方法进行验证, 该装置宏观成像视场为 192 mm×154 mm, 分辨率 300 μm ; 微观成像视场为 3.2 mm×2.56 mm (5×显微物镜)/0.8 mm×0.64 mm (20×显微物镜), 分辨率 5 μm (5×显微物镜)/1.25 μm (20×显微物镜)。结果表明, 提出的多尺度观测方法可在对活体动物进行整体观测的基础上, 进一步进行目标微区的微观观测, 获取更为丰富的信息, 为活体动物实验提供有力的观测手段和工具。

关键词: 荧光活体成像; 近红外二区; 多尺度; 荧光蛋白

中图分类号: O657.3; R318 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA20250136

引用格式: YE Chenglei, HE Zhiping, WANG Xuehan, et al. Method and validation in second near-infrared window for multi-scale fluorescence intravital imaging[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2025, 54(8): 20250136.

叶成磊, 何志平, 王雪涵, 等. 多尺度近红外二区荧光活体成像方法与验证[J]. 红外与激光工程, 2025, 54(8): 20250136.

0 引言

在生物成像领域, 光学成像因成像质量高、成本低和无辐射等优势被广泛关注, 其中荧光成像为目前应用最广泛的生物光学成像手段。与荧光成像相比, 其他的成像手段存在缺点, 如核素成像有辐射、核磁共振成像和计算机层析成像设备昂贵、操作复杂。超声成像虽然没有放射性但存在穿透力有限、影像分辨率较差、骨性结构显示不佳等缺点。荧光成像是基于荧光技术对细胞内或体液中的特定分子进行标记后, 荧光信号远强于生物自身发光的原理, 实现对目标组

织的观察与测量^[1-6]。

基于近红外二区 (NIR-II, 900~1880 nm) 的活体荧光成像技术是目前前沿的生物活体成像技术。相比传统的近红外一区 (NIR-I, 760~900 nm) 成像和可见光 (360~760 nm) 成像, 近红外二区 (NIR-II, 900~1880 nm) 具有更低的光子散射值、更长的荧光波长和更低的生物组织自发荧光背景, 因此具有更深的组织穿透深度, 更适用于对生物深部组织进行活体观测^[7-8]。

近年来, 随着对近红外二区活体荧光成像研究的不断深入, 多个研究团队进行了应用型设计, 研发了相应的仪器。如斯坦福大学戴宏杰团队研制的近红

收稿日期: 2025-03-04; 修订日期: 2025-05-06

作者简介: 叶成磊, 男, 硕士生, 主要从事多尺度近红外二区荧光活体成像方面的研究。

导师简介: 何志平, 男, 研究员, 博士, 主要从事空间光电技术与系统, 空间被动复合光电系统设计、集成与检测, 光电技术前沿与交叉应用等方面的研究。

通讯作者: 靳爱军, 男, 博士后, 主要从事红外成像及光谱技术与仪器研制方面的研究。

外二区活体成像系统,使用铟镓砷光探测器,以碳纳米管为近红外二区荧光染料,采用 808 nm 激光器作为激发光源,用于在实验室开展活体生物样本的成像研究。戴宏杰团队还在宏观成像系统的基础上引入具有放大功能的镜头,借助碳纳米管实现了近红外二区的小鼠血管成像^[9-10]。清华大学戴琼海院士团队基于荧光显微镜的成像不清晰等缺陷,提出了一系列自监督去噪模型,并将模型预测过程融合到成像过程中,在双光子荧光显微镜上实现了即使没有任何高信噪比或者清晰的图像,仅从原始的低信噪比图像中就能学习出真实信号的功能,解决了活体成像中由于样本成像模糊而导致的真值缺失问题。他们还研发了新一代介观活体显微仪器 RUSH3D 系统用于微观尺度的生物组织观测^[11-16]。浙江大学钱骏教授团队与舜宇光学公司合作开发了一种正置 NIR-II 荧光显微成像系统,将短波红外探测器与传统的荧光显微成像系统结合,可实现对深层组织的高倍探测^[2,6,17]。复旦大学张凡教授课题组研制的荧光寿命工程化的近红外二区纳米颗粒解锁活体多重成像系统,利用在 NIR-II 下发出荧光寿命信号的稀土纳米探针来完成活体多重成像^[18-20]。

当前已有的近红外二区荧光活体成像系统,主要基于单一的成像尺度进行观测:仅大尺度观测的仪器,缺点是成像分辨率低,对细微结构的观测能力不足;仅显微观测的仪器,成像分辨率高,但缺点是观测范围太小。这些局限性限制了对活体动物从宏观到微观的多尺度信息获取能力。文中提出了一种多尺度近红外二区生物荧光活体成像方法,可实现多种尺度视场下活体的清晰成像。通过大视场荧光成像对活体动物进行整体观测,确定感兴趣的目标区域;进一步在显微尺度下对目标区域进行小视场高空间分辨率的清晰成像,实现对活体动物的多层次信息获取。文中搭建了相关实验装置,通过活体动物宏观成像和活体动物肝脏组织微观成像与拼接系列实验,验证了该方法的可行性。

1 原理实验分析

1.1 荧光标记物的选择

荧光标记物是荧光成像实现的重要因素。目前近红外二区荧光标记物大多以小分子荧光染料、有机

荧光染料探针、量子点光致发光纳米探针、稀土离子掺杂光致发光纳米探针等为主^[2],这些探针往往处于可见波段,并会随着细胞的繁殖而能量逐步削弱,导致实验的周期很短,观测效率受到影响。另外,在活体生物的荧光实验中,进入组织或细胞的荧光探针不具备解离的能力,其毒性会对活体生物产生不良的健康影响。文中使用一种新型的荧光标记物——iRFP713 荧光蛋白^[3]。与传统标记分子相比,荧光蛋白在近红外二区的特异性更强、示踪背景更弱、激发光谱连续且范围广、荧光较强、稳定性好,用于荧光成像时在活体动物中穿透能力强、检测灵敏度高、操作简便,更重要的是,荧光蛋白无毒性,其发光强度还会随着细胞的增殖愈来愈强,因此更加适合活体生物的长期成像^[21-23]。

1.2 多尺度近红外二区荧光活体成像方法

多尺度近红外二区荧光活体成像的方法流程如图 1 所示。首先,将活体小鼠通过 iRFP713 荧光蛋白遗传的方式诱导为荧光活体小鼠。借助近红外二区谱段可见的 iRFP713 荧光蛋白对活体动物进行荧光标记,得到了体内病变区域含有荧光的活体动物。具体方法为:基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术,将 iRFP713 基因敲入小鼠的内源性 Rosa26 位点(iRFP713^{lox/lox})。具体来说,就是在 iRFP713 前插入一个 lox-stop-lox (LSL),该 LSL 位于 CAG 启动子之后。另外,将 iRFP713^{lox/lox} 小鼠与不同的组织特异性 Cre 系小鼠进行杂交,通过 Cre 介导的重组,可以删除或反转由两个 lox 位点包围的 Stop,从而仅在 Cre 表达的组织中激活 iRFP713。利用这一技术流程,成功建立了表达 iRFP713 的组织特异性转基因小鼠^[3]。整只实验鼠、肝脏器官、肝脏表面微观组织和肝细胞具有四个不同层次的尺寸大小,整只实验鼠包括四肢在内约为 50 mm×120 mm,肝脏器官的大小为 20 mm×20 mm,肝脏表面微观组织约为 200 μm×200 μm,实验鼠肝脏细胞的尺寸约为 20 μm×30 μm。为了找到病变的器官,可将小鼠放置于宏观成像功能模块下进行观测,该模块成像范围为 200×200 mm,分辨率为 0.3 mm,满足整只实验鼠和肝脏器官的观测需求;分析后找出感兴趣的目标区域,将活体动物推进至微观成像功能模块,对目标区域进行微观观测,通过扫描及图像拼接,获得全域显微图像。若有对于宏观成像

系统难以观测的微小荧光点,也可以直接使用微观成像系统进行观测,从而实现目标区域的准确定位。该微观成像功能的成像范围为 $3.2\text{ mm} \times 2.56\text{ mm}$ ($5\times$ 显微物镜)/ $0.8\text{ mm} \times 0.64\text{ mm}$ ($20\times$ 显微物镜)、分辨率为 $5\text{ }\mu\text{m}$ ($5\times$ 显微物镜)/ $1.25\text{ }\mu\text{m}$ ($20\times$ 显微物镜),满足实验鼠肝脏细胞的观测需求。通过对实验动物目标区域的扫描成像,运用图像拼接技术实现全域微观观测。该系统采用计算机控制实现较高的自动化,宏观

成像时,根据荧光标记与人为干预确定好待观察的位置,系统会将宏观图像中的目标位置坐标映射至微观载物台步进电机,载物台会在计算机的控制下直接定位到对应的区域进行微观成像,从而大大降低了成像的操作复杂度。结合多尺度荧光活体成像,通过宏观观测进行快速定位,微观观测获得目标精确信息,实现对活体动物的无创快速检测。

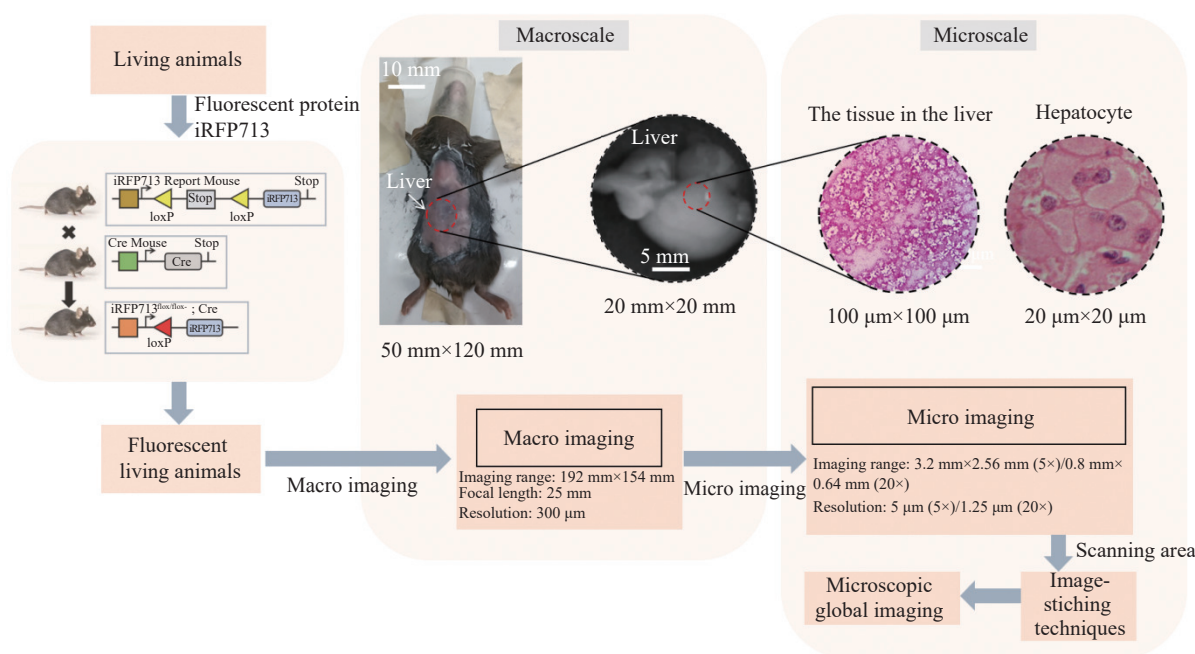


图1 多尺度近红外二区荧光活体成像方法

Fig.1 The method of multi-scale NIR-II fluorescence intravital imaging

1.3 实验装置

1.3.1 宏观成像功能模块的设计

图2(a)为多尺度近红外二区荧光活体成像装置示意图,由宏观成像功能模块和微观成像功能模块组成。如图2(a)右侧所示,宏观成像功能模块中激光器发射激光,经过扩束镜扩束后,产生均匀的大直径激光,满足小鼠成像的尺寸,激光的入射角度可通过激光扩束镜固定架调整,放置实验鼠的载物台可以通过电动位移台进行调控。激发光源采用 690 nm 、功率在 $0\sim 900\text{ mW}$ 之间可调的半导体激光器。通过调控激光源入射角度和实验动物在载物台上的位置,使得激光均匀地照射在实验鼠身上,激光激发实验鼠体内的荧光蛋白,发射荧光光子,这些荧光光子逸出后

进入红外相机,对曝光时间、激光强度以及相机焦面位置进行调节,获取图像数据。滤光片 F3 为 750 nm 的窄带通滤光片,滤光片 F4 为 900 nm 高性能长波通滤光片,所用镜头为 25 mm 焦距短波红外镜头。探测器为 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 深度制冷短波红外探测器,光谱响应范围 $0.9\sim 1.7\text{ }\mu\text{m}$,像素为 640×512 ,像元尺寸为 $25\text{ }\mu\text{m}$ 。

宏观成像视场为 $192\text{ mm} \times 154\text{ mm}$,分辨率为 $300\text{ }\mu\text{m}$ 。该模块可以对小鼠进行整体成像并获得具体器官的轮廓,但对细节观测不够,无法对细微组织或细胞进行测量,所以需要微观成像功能模块。

1.3.2 微观成像功能模块的设计

如图2(a)左侧所示,对于微观成像功能模块,激发光源依然采用 690 nm 的功率在 $0\sim 900\text{ mW}$ 之间可

调的半导体激光器。滤光片 F1 为 750 nm 窄带通滤光片和滤光片 F2 使用 900 nm 长波通滤光片。经窄带通滤光片 F1 过滤后的激光通过二向色镜反射进入物镜。经过物镜聚焦的激光照射在标本表面激发产生荧光,发出的长波荧光经二向色镜透射。然后,经过一个长波通滤光片 F2 进一步滤除激光能量。最后二区荧光通过一个管透镜 Tube lens 进入深度制冷短波红外探测器成像。

生物细胞的尺寸为 5~200 μm , 原核细胞的直径通常在 1~10 μm 之间, 真核细胞的直径则在 3~30 μm 之间, 生物的一些特殊细胞, 如卵细胞, 直径可达 100 μm 甚至更大^[24-25]。肝细胞的大小约为 20~30 μm 。微观成像功能模块的分辨率为 1.25 μm , 可满足细胞观测需求。

多尺度近红外二区荧光活体成像系统整体的模型图如图 2(b) 所示, 图 2(c)、(d) 分别为宏观成像与微观成像的工作图。载物台与电动位移台固连在一宏观观切换滑台上, 运行转换电机可使载物台移动。当载物台移至右边时可以进行宏观成像, 移至左边时可

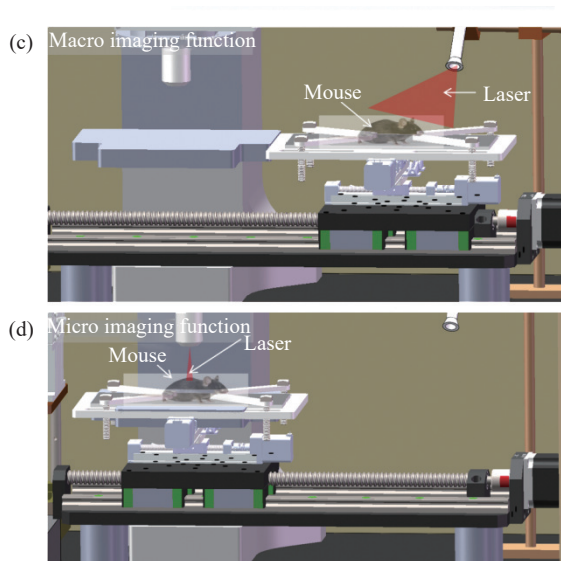
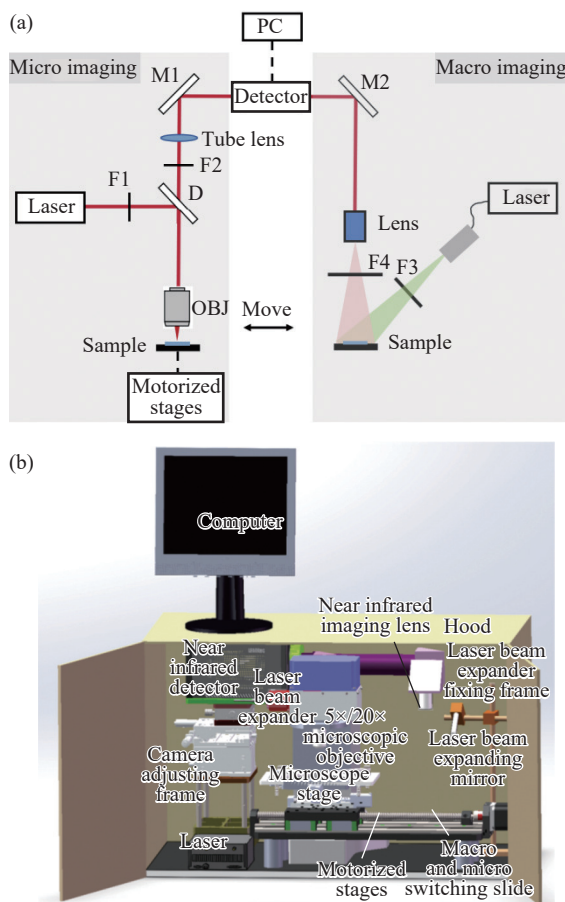


图 2 多尺度近红外二区荧光活体成像装置。(a) 多尺度近红外二区荧光活体成像装置示意图, 分为宏观成像功能模块和微观成像功能模块; (b) 多尺度近红外二区荧光活体成像系统模型图; (c)~(d) 宏观成像与微观成像的工作图

Fig.2 Multi-scale NIR-II fluorescence intravital imaging device. (a) Diagram of the multi-scale NIR-II fluorescence imaging intravital device, which is divided into macro imaging modules and micro imaging modules; (b) Diagram of the multi-scale NIR-II fluorescence intravital imaging system model; (c)-(d) Working diagrams of macroscopic and microscopic imaging, respectively

进行微观成像, 切换更加方便快速。进行观测时, 需将外部遮光罩的箱门关闭阻挡外部光线进入干扰实验。

1.4 活体实验

1.4.1 实验对象及制备过程

实验所用的小鼠由中国科学院上海生命科学研究院独立培养完成, 均为 C57BL/6 背景, 并饲养在无特定病原体 (SPF) 的环境中, 均为 6~8 周的雄性小鼠, 相对湿度 45%~55%, 恒定温度 (22±2)°C, 12 h/12 h 明暗交替循环, 能够自由进食与饮水。实验过程中, 对小鼠进行注射式麻醉 (1.25% 阿弗丁溶液, 0.2 mL/10 g), 并通过载物台上的小鼠四肢固定装置对其进行固定, 避免实验过程中出现不必要的移动, 从而获得更好的成像数据。

在相同功率的激光激发下, 肝脏由于血供丰富, 荧光发光效率更高, 穿透效果更好。同时, 肝脏位于实验鼠腹部浅层处, 也更易观测。其他器官 (如脑或

肾脏)可能因血红蛋白吸收或运动伪影导致信噪比下降,在活体状态下更难观察,因此选用实验鼠肝脏作为观测对象。由于文中验证的多尺度近红外二区荧光活体成像方法具有普适性,其对于各种病理模型(如肿瘤、炎症)都是适用的。

鉴于激光产品对活体生物的安全标准:GB 7247.1—2012 所规定的最大允许照射量 330 mW/cm^2 ,该仪器的激发光功率将控制在该范围以内,以免对小鼠造成损伤。实验过程中的操作均符合《实验动物管理条例》的相关要求及动物伦理学。

1.4.2 活体小鼠宏观成像

选取肝脏无荧光标记活体小鼠和肝脏有荧光标记活体小鼠作为实验对象,图 3(a)为肝脏无荧光标记活体小鼠(相机曝光时间为 250 ms,激光器的功率为 150 mW);图 3(b)为肝脏有荧光标记活体小鼠(相机曝光时间为 90 ms,激光器的功率为 150 mW)。小鼠肝脏中存在荧光蛋白,可在体外观察到荧光在肝脏中的分布情况。由图可知,活体观测时肝脏呈现出较为完整的结构特征,特别是肝脏中间的分叶结构,说明在宏观成像尺度下,肝脏的整体结构轮廓可以被观

测到。

1.4.3 活体小鼠微观成像

为验证微观成像功能模块观测活体小鼠体内肝脏荧光信号的性能,取一只肝脏载有荧光蛋白的小鼠进行实验。如图 3(c)所示,使用 $5\times$ 的物镜进行观察。小鼠经麻醉后被固定于载物台上,四肢用固定装置得以固定,借助胶带将腹部肝脏位置伸展保持平直易于显微物镜观测。此时,相机曝光时间 150 ms,激光能量为 120 mW。

图 4 所示为文中所用的基于灰度信息的块匹配图像拼接流程。具体流程为:1)图像预处理——图像灰度化和去噪;2)特征块的选择;3)使用归一化互相关(NCC)的方法进行相似性评价;4)穷举法搜索;5)位移估计;6)图像融合。文中的图像拼接使用了基于灰度信息的块匹配图像拼接方法,通过完整的流程输出拼接图像。另外,拼接过程中可能产生图像失真或接缝问题。块匹配在纹理重复或低纹理区域容易误配,导致局部扭曲,从而产生失真。另外,两图曝光不一致,融合后出现明暗边界,匹配不精确导致重叠区域未对齐,也会产生接缝问题。该装置通过提升精

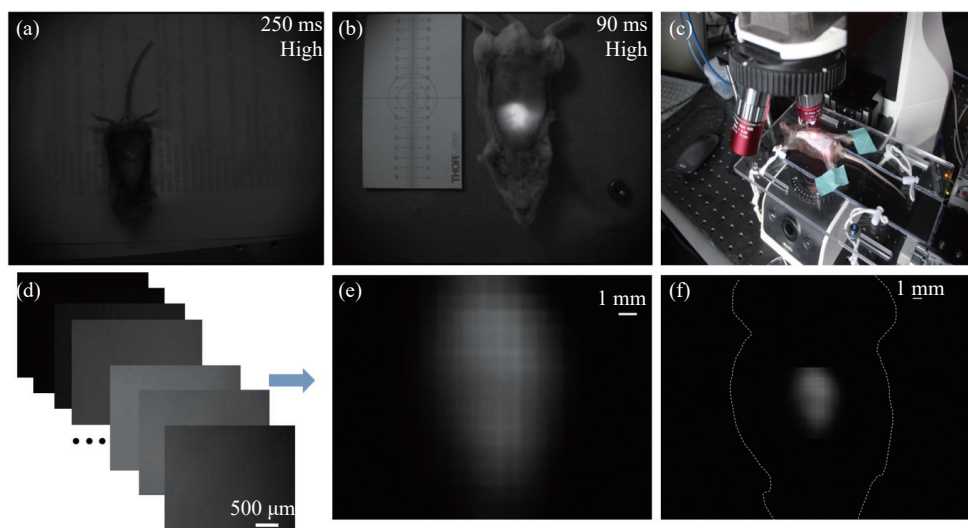


图 3 多尺度近红外二区荧光活体成像方法验证实验结果。(a) 对肝脏无荧光标记的对照实验鼠进行宏观观测的图像;(b) 对肝脏有荧光标记的实验鼠进行宏观观测的图像;(c) 荧光标记活体小鼠肝脏组织微观成像实验;(d) 对活体实验鼠肝脏处进行 12 行 $\times$ 15 列遍历扫描所得图像进行拼接;(e) 拼接所得肝脏显微全域图像;(f) 肝脏显微图像与实验鼠的关系

Fig.3 The experiment results of Multi-Scale NIR-II fluorescence intravital imaging in vivo. (a) Images of macroscopic observations of control laboratory rat with non-fluorescent livers; (b) Images of macroscopic observations of laboratory rat with fluorescently labeled livers; (c) Microscopic imaging of fluorescently labeled liver tissue in living laboratory rat; (d) The images obtained from the 12-row $\times$ 15-column traversal scan of the liver of living laboratory rat were spliced; (e) The microscopic global image of the liver; (f) Relationship between microscopic images of liver and laboratory rat

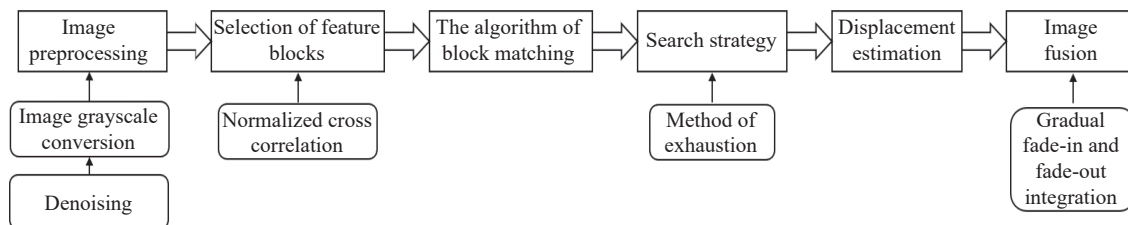


图 4 基于灰度信息的块匹配图像拼接方法

Fig.4 Block matching image stitching method based on gray-level information

密载物台的精度来降低该问题对实验结果的影响。

该显微系统可以透过皮肤看到小鼠肝脏所发出的荧光,且随镜头逐级呈“Z”字形扫描并拍照,得到 180 张图像。如图 3(d)、(e) 所示,将 180 张图像进行拼接得到肝脏显微全域图像。肝脏在小鼠体内的位置如图 3(f) 所示。从图中可看到了肝脏表面的亮暗分布,进一步完整地展现出了荧光肝脏的形貌特征与具体细节,与宏观成像结果图 3(b) 所示的肝脏形态特征相对照,为进一步看清体内脏器的仪器设计提供参考。

2 结 论

针对现有的近红外二区荧光成像仪器观测尺度较为单一的问题,提出了一种多尺度的近红外二区荧光活体成像方法,并研发了一套实验验证装置,集成了宏观与微观两种尺度的活体动物成像功能,验证了联用的技术可行性。以实验鼠肝脏为观测对象,先对活体小鼠进行宏观观测,得到大视场的图像,找到发生病变的器官;为获得进一步的病灶信息,随后对器官进行显微活体成像,进而获得活体实验鼠病变器官的显微图像,再对图像进行拼接,就可以获得一副视场大且较宏观活体成像更高空间分辨率的图像,方便后续对具体病灶信息进行分析。与单一尺度的仪器相比,仅宏观观测无法获得病变区域细节的特征信息,直接微观观测又难以在大范围中实现病变区域的定位。通过多尺度成像方法可快速对病变区域进行定位,并进行细节特征的读取。搭建的多尺度成像系统具有较大的成像视场和较高的成像分辨率,宏观成像视场为 $192\text{ mm}\times 154\text{ mm}$,分辨率 $300\text{ }\mu\text{m}$;微观成像视场为 $3.2\text{ mm}\times 2.56\text{ mm}$ ($5\times$ 显微物镜) $0.8\text{ mm}\times 0.64\text{ mm}$ ($20\times$ 显微物镜),分辨率 $5\text{ }\mu\text{m}$ ($5\times$ 显微物镜) $1.25\text{ }\mu\text{m}$ ($20\times$ 显微物镜)。穿透深度大于 6 mm ,信噪比大于

10 dB ,成像波段为 $900\sim 1700\text{ nm}$,荧光探针使用荧光蛋白,观测不局限于单一尺度,可多尺度联用。实验图像显示,在宏观成像功能下,可对活体小鼠的荧光肝脏进行清晰成像,分辨出肝脏的宏观轮廓;在微观成像功能下,可对肝脏细节进行观测,并利用图像拼接技术实现显微全域成像。该研究可以为活体动物成像观测提供新的方法与装置。

文中所述方法依旧存在一些局限性:

1) 相较于当前同类型产品,该装置在穿透深度、多尺度联用和微观分辨率上具有优势,但宏观分辨率和信噪比略低于同类设备,因此更适用于先导性筛查而非细胞器级的研究。未来可通过自适应光学校正组织散射,进一步提升 NIR-II 的分辨率与信噪比。

2) 文中仅采用健康 C57BL/6 小鼠肝脏作为样本,将来为进一步验证该方法的有效性,可以采用门控技术来实现同步激光激发与呼吸周期(如通过腹压传感器触发采集)和动态降噪算法来对血流动态的问题,从而对其他器官也进行实验验证。

3) 如宏观成像下 $300\text{ }\mu\text{m}$ 的分辨率可能漏检早期微小病灶。后续将改进方案:① 多模态引导——先通过 NIR-II 宏观成像定位大致区域,再结合超声或 OCT(光学相干断层扫描)提高局部分辨率;② 算法增强——采用超分辨率重建方法来提升宏观图像的等效分辨率。

参考文献:

- [1] JUNG J C, MEHTA A D, AKSAY E, et al. In vivo mammalian brain imaging using one-and two-photon fluorescence microendoscopy [J]. *Journal of Neurophysiology*, 2004, 92(5): 3121-3133.
- [2] FENG Zhe, QIAN Jun. Advances on in vivo fluorescence bioimaging in the second near-infrared window [J]. *Laser and Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617001. (in Chinese)

- [3] CHEN Muxiong, FENG Zhe, FAN Xiaoxiao, et al. Long-term monitoring of intravital biological processes using fluorescent protein-assisted NIR-II imaging [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6643-6643.
- [4] ZHANG Ze, HOU Guozhong, DENG Yanyan, et al. Two-photon fluorescence 3D microscopic imaging of mouse brain based on femtosecond pulses [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2023, 52(8): 20230201. (in Chinese)
- [5] MAO Heng, TAO Louis, CHEN Liangyi. Application and development of adaptive optics to three-dimensional in vivo deep tissue fluorescent microscopy [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2016, 45(6): 0602001. (in Chinese)
- [6] FENG Zhe, TANG Tao, WU Tianxiang, et al. Perfecting and extending the near-infrared imaging window [J]. *Light: Science and Applications*, 2021, 10(1): 197.
- [7] CHEN Mo, CHEN Jun, CHEN Shiyi. Advances in second near-infrared fluorescent nanoprobe-based in vivo imaging for biomedical applications [J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science)*, 2020, 40(4): 530-533. (in Chinese)
- [8] LI Yifei, HE Mubin, WU Tianxiang, et al. Progress and application of near-infrared II confocal microscopy (invited) [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2022, 51(11): 20220494. (in Chinese)
- [9] WELSHER K, LIU Z, SHERLOCK S P, et al. A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in laboratory rat [J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(11): 773-780.
- [10] HONG Guosong, DAI Hongjie. In vivo fluorescence imaging in the second near-infrared window using carbon nanotubes [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1444: 167-181.
- [11] LI Xinyang, ZHANG Yuanlong, WU Jiamin, et al. Challenges and opportunities in bioimage analysis [J]. *Nature Methods*, 2023, 20(7): 958-961.
- [12] LI Xinyang, LI Yixin, ZHOU Yiliang, et al. Real-time denoising enables high-sensitivity fluorescence time-lapse imaging beyond the shot-noise limit [J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(2): 282-292.
- [13] LI Xinyang, HU Xiaowan, CHEN Xingye, et al. Spatial redundancy transformer for self-supervised fluorescence image denoising [J]. *Nature Computational Science*, 2023, 3(12): 1067-1080.
- [14] ZHANG Guoxun, LI Xiaopeng, ZHANG Yuanlong, et al. Bio-friendly long-term subcellular dynamic recording by self-supervised image enhancement microscopy [J]. *Nature Methods*, 2023, 20(12): 1957-1970.
- [15] CAI Chengtao, FAN Bing, ZHU Qidan. Real-time stitching method for infrared image [J]. *Optical Engineering*, 2018, 57(11): 113103.
- [16] WANG Zhaobin, YANG Zekun. Review on image-stitching techniques [J]. *Multimedia Systems*, 2020, 26: 413-430.
- [17] ZHOU Jing, WU Tianxiang, CHEN Runze, et al. Self-confocal NIR-II fluorescence microscopy for multifunctional in vivo imaging [J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2023, 17(1): 2350025.
- [18] CHEN Ying, YANG Yiwei, ZHANG Fan. Noninvasive in vivo microscopy of single neutrophils in the laboratory rat brain via NIR-II fluorescent nanomaterials [J]. *Nature Protocols*, 2024, 19(8): 2386-2407.
- [19] LI Benhao, ZHAO Mengyao, FENG Lishuai, et al. Organic NIR-II molecule with long blood half-life for in vivo dynamic vascular imaging [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3102.
- [20] FAN Yong, WANG Peiyuan, LU Yiqing, et al. Lifetime-engineered NIR-II nanoparticles unlock multiplexed in vivo imaging [J]. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13(10): 941-946.
- [21] FILONOV G S, PIATKEVICH K D, TING L-M, et al. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(8): 757-761.
- [22] YU D, BAIRD M A, ALLEN J R, et al. A naturally monomeric infrared fluorescent protein for protein labeling in vivo [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(8): 763-765.
- [23] PIATKEVICH K D, SUK H-J, KODANDARAMAIAH S B, et al. Near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes in neuroimaging [J]. *Biophysical Journal*, 2017, 113(10): 2299-2309.
- [24] WAGSTAFF J, LÖWE J. Prokaryotic cytoskeletons: protein filaments organizing small cells [J]. *Nature Reviews, Microbiology*, 2018, 16(4): 187-201.
- [25] MARTYN J E, GOMEZVALERO L, BUCHRIESER C. The evolution and role of eukaryotic-like domains in environmental intracellular bacteria: the battle with a eukaryotic cell [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(4): 17433-17447.

Method and validation in second near-infrared window for multi-scale fluorescence intravital imaging

YE Chenglei^{1,2}, HE Zhiping¹, WANG Xuehan^{1,2}, JIN Aijun^{1*}

(1. Shanghai Institute of Technical Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200083, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract:

Objective With the rapid development of life sciences and biotechnology, the demand for observing the structure and function of living organisms has been increasing. Common imaging methods such as nuclear imaging, magnetic resonance imaging, and computed tomography have been unable to accurately and continuously monitor living organisms due to issues such as radiation and expensive equipment. Although slice detection is highly accurate, it cannot directly observe living organisms. Fluorescence imaging works by marking specific molecules within cells or body fluids with fluorescent probes, making the fluorescence signal much stronger than the organism's own luminescence, thereby enabling the observation and measurement of target tissues. However, current fluorescence in vivo imaging instruments mainly focus on single-scale detection. If multi-scale in vivo detection that combines macroscopic and microscopic scales can be achieved, it will have significant implications for the rapid detection of human diseases.

Methods Near-infrared II (NIR-II, 900-1 880 nm) based in vivo fluorescence imaging technology is currently a cutting-edge in vivo biological imaging technique, which offers a deeper tissue penetration depth. This method first genetically induces live laboratory rat to become fluorescent live laboratory rat through the iRFP713 fluorescent protein. To locate the diseased organs, the laboratory rat can be placed under the macroscopic imaging function module for observation. After analyzing and identifying the target area of interest, the live animal is pushed into the microscopic imaging function module for microscopic observation. Through scanning and image stitching, a full-field microscopic image is obtained. Additionally, by traversing and photographing the microscopic images and then using image stitching, a full-field microscopic image can be synthesized, thereby achieving non-invasive and rapid detection of live animals.

Results and Discussions The experiments of macroscopical imaging and microscopical imaging in living laboratory rat were carried out by using multi-scale NIR-II fluorescence imaging method. Macroscopic: Figure 3(a) shows live laboratory rat without fluorescent liver. At this time, the camera exposure time is 250 ms, and the laser power is 150 mW. Figure 3(b) shows live laboratory rat with fluorescent liver. At this time, the camera exposure time is 90 ms and the laser power is 150 mW. It can be seen that the liver in vivo showed a relatively complete state under the observation of this system, especially the concave flap structure in the middle of the liver. Microscopic: Scanning and photographing in Z-shape step by step with the lens, 180 images were obtained. As shown in Figure 3(d), 180 images were spliced and the microscopic global image of the liver was shown in Figure 3(e). The approximate location of the liver in the laboratory rat is shown in Figure 3(f). Objects of different scales can be clearly identified, and the function of the system meets the needs of multi-scale imaging.

Conclusions To address the scale limitation of existing NIR-II fluorescence imaging instruments to a single scale, this paper proposes a multi-scale NIR-II fluorescence in vivo imaging method and develops an

experimental verification device to verify the feasibility of the method. The method is as follows: We take the liver of an experimental laboratory rat as the observation object. First, we conduct macroscopic observation of the live laboratory rat to obtain a large field-of-view image and identify the organ with lesions. To obtain further information about the lesion, we then perform microscopic in vivo imaging of the organ to obtain microscopic images of the lesion organ in the live experimental laboratory rat. By stitching the images, we can obtain an image data set with higher information density than macroscopic in vivo imaging, facilitating the subsequent collection of specific lesion information. The multi-scale imaging system we built has a large imaging field-of-view and high imaging resolution. The macroscopic imaging field-of-view can reach $192\text{ mm} \times 154\text{ mm}$, with a resolution of $300\text{ }\mu\text{m}$; the microscopic imaging range can reach $3.2\text{ mm} \times 2.56\text{ mm}$ ($5\times$ objective lens), $0.8\text{ mm} \times 0.64\text{ mm}$ ($20\times$ objective lens), with a resolution of $5\text{ }\mu\text{m}$ ($5\times$ objective lens)/ $1.25\text{ }\mu\text{m}$ ($20\times$ objective lens). The final experimental image data show that under the macroscopic imaging function, the fluorescent liver of the live laboratory rat can be clearly imaged, and the macroscopic contour of the liver can be distinguished; under the microscopic imaging function, the details inside the liver can be observed, and microscopic whole-field imaging can be achieved by using image stitching technology.

Key words: fluorescence intravital imaging; second near-infrared window; multi-scale; fluorescent protein