



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102827768 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 19

(21) 申请号 201210290630. 8

(22) 申请日 2012. 08. 15

(71) 申请人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路
1037 号

(72) 发明人 曾绍群 刘亚丰 吕晓华

(74) 专利代理机构 北京市德权律师事务所
11302

代理人 周发军

(51) Int. Cl.

C12M 1/42(2006. 01)

C12M 1/36(2006. 01)

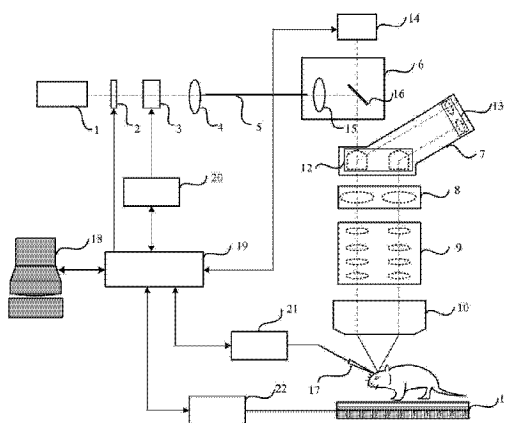
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统

(57) 摘要

本发明涉及生物、医学、神经科学等领域,它公开了一种用于研究神经环路和调控动物行为的系统,发明实现了大视野下的细胞可视化和感兴趣细胞的选取,同时动态对放置于快速高精度二维电控平移台上的动物样品细胞进行不同模式的快速光刺激,根据记录的电生理信号或行为特征、以及使用的刺激模式,用于分析所选取的特定神经元投射关系,研究神经元运算、整合过程,进而揭示大的特定神经环路功能作用,调控动物行为活动。



1. 一种研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统,其特征在于,包括依次摆放的第一激光器、快门、圆形可调衰减器、耦合透镜、单模光纤、成像透镜、第一二色镜、棱镜、筒镜、变倍系统、物镜、二维电控平移台;以及成像设备 CCD、计算机、接口电路、快门控制器、电生理记录系统和平移台控制器;

所述第一激光器、快门、耦合透镜、单模光纤、成像透镜的光轴重合,单模光纤入射端面位于耦合透镜后焦平面处,单模光纤输出端面位于成像透镜的一倍焦距之外;第一二色镜分别与成像透镜光轴、筒镜光轴成 45 度夹角放置,所述棱镜位于筒镜与第一二色镜之间,所述变倍系统安装在所述筒镜与物镜之间,所述物镜安装于所述二维电控平移台上方;所述成像设备 CCD 安装于第一二色镜上方,所述成像设备 CCD 的光路与第一二色镜成 45 度角,成像设备 CCD 与被测样品满足成像共轭关系;

所述计算机连接接口电路,所述接口电路分别连接所述快门控制器、电生理记录系统和平移台控制器;所述快门控制器连接快门,所述平移台控制器连接所述二维电控平移台,所述电生理记录系统连接电极。

2. 根据权利要求 1 所述的研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统,其刺激光斑满足以下关系:

$$\omega^* = \frac{\alpha}{M \cdot \beta} \cdot \omega_0$$

其中 α 为成像透镜的垂轴放大率, M 为变倍系统的放大倍数, β 为物镜的放大倍数, ω_0 为单模光纤出射端面激光光斑直径。

3. 根据权利要求 1 所述的研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统,还包括目镜,所述目镜位于所述棱镜组的斜上方,所述棱镜的位置能够平移,用于样品反射光在目镜与成像设备 CCD 之间的切换。

4. 根据权利要求 1-3 之一所述的研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统,其特征在于,所述圆形可调衰减器采用电光晶体或声光调制器代替,所述电光晶体、声光调制器分别通过电光晶体控制器、声光调制器控制器连接计算机。

5. 根据权利要求 4 所述的研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统,其特征在于,所述二维电控平移台包括光栅尺、伺服电机以及反馈回路。

6. 一种研究神经环路和调控动物行为活动的系统,其特征在于:包括依次摆放的第一激光器、声光可调谐滤波器、耦合透镜、单模光纤、成像透镜、第一二色镜、筒镜、变倍系统、物镜、二维电控平移台;以及成像设备 CCD、计算机、接口电路、声光可调谐滤波器控制器、电生理记录系统和平移台控制器;

所述第一激光器、耦合透镜、单模光纤、成像透镜的光轴重合,单模光纤入射端面位于耦合透镜后焦平面处,单模光纤输出端面位于成像透镜的一倍焦距之外;第一二色镜分别与成像透镜光轴、筒镜光轴成 45 度夹角放置,所述棱镜位于筒镜与第一二色镜之间,所述变倍系统安装在所述筒镜与物镜之间,所述物镜安装于所述二维电控平移台上方;所述成像设备 CCD 安装于第一二色镜上方,所述成像设备 CCD 的光路与第一二色镜成 45 度角,成像设备 CCD 与被测样品满足成像共轭关系;

所述计算机连接接口电路,所述接口电路分别连接所述声光可调谐滤波器控制器、电生理记录系统和平移台控制器;所述声光可调谐滤波器控制器连接所述声光可调谐滤波

器,所述平移台控制器连接所述二维电控平移台,所述电生理记录系统连接电极;

所述第一激光器与声光可调谐滤波器之间,还依次放置第二激光器、第三激光器、……第 N 个激光器以及与之分别对应的第二个二色镜、第三个二色镜、…。第 N 个二色镜,所述第二二色镜分别与第一激光器光轴、第二激光器光轴成 45 度夹角放置,第三二色镜分别与第一激光器光轴、第三激光器光轴成 45 度夹角放置,……第 N 个二色镜分别与第一激光器光轴、第 N 个激光器光轴成 45 度夹角放置,声光可调谐滤波器通光孔中心与第一激光器光轴重合。

所述计算机通过接口电路、声光可调谐滤光器控制器选取需要的激光波长,并通过耦合透镜耦合到单模光纤中,进而耦合到物镜中进行光刺激。

7. 根据权利要求 6 所述的研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统,其特征在于,采用滤光片旋转轮代替所述声光可调谐滤光器及声光可调谐滤波器控制器,所述滤光片旋转轮连接所述计算机,在计算机的控制下实现激光波长切换。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统,其特征在于,所述二维电控平移台包括光栅尺、伺服电机以及反馈回路。

一种研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学、神经科学、医学等领域,尤其涉及光遗传学技术应用领域。

背景技术

[0002] 人类大脑由近千亿个神经细胞组成,神经元之间通过突触形成网络,彼此联络,传递信息,形成感觉、运动等系统,每个系统又可分为若干子系统,如感觉中的视觉、嗅觉、听觉、味觉及体表触觉等,其功能的实施依赖于不同类型、处于神经系统不同部位细胞之间精准联系而形成的神经环路。神经环路是联系分子细胞功能与整体行为功能之间的桥梁,特定功能神经环路的研究有利于理解神经环路的形成与修饰,信息编码、加工与处理,以及其与行为间关系,从而可更深层次了解脑的工作原理。

[0003] 神经调控是研究神经环路的一种有效手段,药物干扰是一种常规的神经调控技术,但存在药物起效时间慢、副作用大的问题;电极刺激是一种常用的神经调控技术,但刺激区域大、缺乏特异性和空间选择性,限制了它们在神经环路研究中的应用。光遗传学技术是一种新颖的神经调控技术,能够无损、高时空分辨率、双向操纵神经元,非常适合研究神经环路功能、揭示动物行为活动与神经环路的联系和机理。

[0004] 光遗传学技术是遗传学技术与光刺激技术结合的产物。从遗传学技术上来看,已开发出多种光敏感通道,可方便表达达到培养细胞上或活体动物中;从光刺激技术来看,当前的光刺激方法存在局限性,如采用宽场刺激模式,虽可激活或抑制神经元,但它会把整个动物样品或整个神经环路激活,无法实现特定细胞或一群细胞选择性光刺激激活;如采用基于扫描镜、声光偏转器、发光二极管阵列、空间光调制器、液晶或微反射镜技术,虽可实现高时空分辨率的刺激激活细胞,但通常必须结合倒置或正置荧光显微镜上,只适用于培养细胞、脑切片的光刺激激活,存在光刺激范围小,不适合研究大的神经网络和调控活体动物的行为活动。这些限制了光遗传学技术在神经环路研究中的应用。

发明内容

[0005] 基于此,本发明所要解决的技术问题是提供一种研究神经环路和调控活体动物行为活动的系统,用于研究大的特定功能神经网络和调控活体动物的行为活动。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提出了一种研究神经环路和调控活体动物行为活动的系统,其特征在于,包括依次摆放的第一激光器、快门、圆形可调衰减器、耦合透镜、单模光纤、成像透镜、第一二色镜、棱镜、筒镜、变倍系统、物镜、二维电控平移台;以及成像设备 CCD、计算机、接口电路、快门控制器、电生理记录系统和平移台控制器;

[0007] 所述第一激光器、快门、耦合透镜、单模光纤、成像透镜的光轴重合,单模光纤入射端面位于耦合透镜后焦平面处,单模光纤输出端面位于成像透镜的一倍焦距之外;第一二色镜分别与成像透镜光轴、筒镜光轴成 45 度夹角放置,所述棱镜位于筒镜与第一二色镜之间,所述变倍系统安装在所述筒镜与物镜之间,所述物镜安装于所述二维电控平移台上方;所述成像设备 CCD 安装于第一二色镜上方,所述成像设备 CCD 的光路与第一二色镜成 45 度

角,成像设备 CCD 与被测样品满足成像共轭关系,用于细胞可视化和感兴趣细胞或区域的选取。

[0008] 所述计算机连接接口电路,所述接口电路分别连接所述快门控制器、电生理记录系统和平移台控制器;所述快门控制器连接快门,所述平移台控制器连接所述二维电控平移台;所述电生理记录系统连接电极。

[0009] 单模光纤出射端面处激光光斑通过成像透镜所成实像位于筒镜前焦平面处,经过筒镜、变倍系统、物镜,在物镜前焦平面处获得一个与体视显微镜放大倍数相关的激光光斑 ω' ,其尺寸满足以下关系:

$$[0010] \quad \omega' = \frac{\alpha}{M \cdot \beta} \cdot \omega_0$$

[0011] 其中 α 为成像透镜的垂轴放大率, M 为变倍系统的放大倍数, β 为物镜的放大倍数, ω_0 为单模光纤出射端面处激光光斑直径。

[0012] 进一步的,本发明还包括目镜,所述目镜位于所述棱镜组的斜上方,所述棱镜的位置能够平移,用于样品反射光在目镜与成像设备 CCD 之间的切换。

[0013] 优选的,所述圆形可调衰减器采用电光晶体或声光调制器代替,所述电光晶体或声光调制器通过相应的电光晶体控制器和声光调制器控制器连接计算机。

[0014] 所述二维电控平移台包括光栅尺、伺服电机以及反馈回路,以提高绝对定位精度和重复定位精度。

[0015] 基于相同的总体技术构思,为提供多种波长激光进行光刺激,本发明还提出了一种用于研究神经环路和调控动物行为活动的系统,其特征在于:包括依次摆放的第一激光器、声光可调谐滤波器、耦合透镜、单模光纤、成像透镜、第一二色镜、筒镜、变倍系统、物镜、二维电控平移台;以及成像设备 CCD、计算机、接口电路、声光可调谐滤波器控制器、电生理记录系统和平移台控制器;

[0016] 所述第一激光器、耦合透镜、单模光纤、成像透镜的光轴重合,单模光纤入射端面位于耦合透镜后焦平面处,单模光纤输出端面位于成像透镜的一倍焦距之外;第一二色镜分别与成像透镜光轴、筒镜光轴成 45 度夹角放置,所述棱镜位于筒镜与第一二色镜之间,所述变倍系统安装在所述筒镜与物镜之间,所述物镜安装于所述二维电控平移台上方;所述成像设备 CCD 安装于第一二色镜上方,所述成像设备 CCD 的光路与第一二色镜成 45 度角,成像设备 CCD 与被测样品满足成像共轭关系。

[0017] 所述第一激光器与声光可调谐滤波器之间,还依次放置第二激光器、第三激光器、……第 N 个激光器以及与之分别对应的第二个二色镜、第三个二色镜、……第 N 个二色镜,所述第二二色镜分别与第一激光器光轴、第二激光器光轴成 45 度夹角放置,第三二色镜分别与第一激光器光轴、第三激光器光轴成 45 度夹角放置,……第 N 个二色镜分别与第一激光器光轴、第 N 个激光器光轴成 45 度夹角放置,声光可调谐滤波器通光孔中心与第一激光器光轴重合。

[0018] 所述计算机连接接口电路,所述接口电路分别连接所述声光可调谐滤波器控制器、电生理记录系统和平移台控制器;所述声光可调谐滤波器控制器连接所述声光可调谐滤波器,所述平移台控制器连接所述二维电控平移台;所述电生理记录系统连接电极。所述计算机通过接口电路、声光可调谐滤波器控制器选取需要的激光波长,并通过耦合透镜耦

合到单模光纤中,进而通过物镜照射到样品上,可在几个微秒速度切换激光波长和调节刺激激光功率。

[0019] 为降低系统成本可以采用滤光片旋转轮代替声光可调谐滤光器,实现激光波长切换。滤光片旋转轮是安装了不同滤光片的、由电机控制的圆形轮子,在计算机控制下,某种波长滤光片进入第一激光器所在光轴,从而与滤光片对应波长激光透射,而其它波长激光被反射或吸收而无法通过。

[0020] 本发明实现了大视野下的细胞可视化和感兴趣细胞或区域的选取,同时动态对放置于快速高精度二维电控平移台上的动物样品细胞进行不同模式的快速光刺激,根据记录的电生理信号或行为特征、以及使用的刺激模式,用于分析所选取的特定神经元投射关系,研究神经元运算、整合过程,进而揭示大的特定功能神经环路功能作用,调控动物行为活动。

附图说明

[0021] 图 1 是用于研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统的第一实施方式的结构示意图。

[0022] 图 2 是用于研究神经环路功能和调控动物行为活动的系统的第二实施方式的结构示意图。

具体实施方式

[0023] 下面通过借助实例更加详细地说明本发明,但以下实施例仅是说明性的,本发明的保护范围并不受这些实施例的限制。

[0024] 通过遗传学技术将兴奋性光敏感蛋白(如 ChR2)或抑制性光敏感蛋白(如 NpHR),表达动物大脑皮层中的细胞上。这样在蓝光照射下,兴奋性光敏感蛋白(如 ChR2)使细胞膜上的阳离子通道开放,胞外钠、钙等阳离子进入细胞,细胞产生去极化而兴奋;在黄光照射下,抑制性光敏感蛋白(如 NpHR)使膜上氯离子通道开放,胞外氯离子进入细胞产生超极化,细胞活性受到抑制。不同细胞可以标记不同类型的光敏感通道,或者同一细胞表达两种不同类型的光敏感通道,随后用光刺激方法就可激活这些细胞,进而调控具有特定功能的神经环路或者整体动物行为。

[0025] 要激活这些光敏感通道表达的细胞,首先要实现细胞可视化,再根据其光谱特性选取合适波长的光源以相应的光刺激模式刺激,同时结合电生理技术或行为学记录系统来分析神经环路功能,进而揭示大的特定功能神经环路与和动物行为的关联,为实现以上目标,需要建立一套独立的系统及相应的操作方法,具体技术方案如下。

[0026] 如图 1 所示,是系统的第一实施方式的结构示意图,它包括第一激光器 1、快门 2、圆形可调衰减器 3、耦合透镜 4、单模光纤 5、双端口模块 6、棱镜 12、三目筒 7、筒镜 8、变倍系统 9、物镜 10 以及二维电控平移台 11,它们按照先后顺序放置。筒镜 8、变倍系统 9、物镜 10 构成体视显微镜的光路主体,其中棱镜 12 和目镜 13 位于三目筒 7 中,棱镜 12 可以拉出、推进,用于样品反射光在目镜与成像设备 CCD 之间的切换。

[0027] 第一激光器 1、快门 2、耦合透镜 4 光轴中心重合,第一激光器 1 的波长应根据细胞上所表达光敏感通道的光谱曲线来选取,快门 2 通过电路自动控制开或关,开启则第一激

光器 1 输出的准直激光进入圆形可调衰减器 3, 圆形可调衰减器 3 镀有宽带减光膜, 工作在可见光和近红外光区, 轴向旋转圆形可调衰减器 3 可连续调节激光输出功率。可用电光晶体或声光调制器代替圆形可调衰减器, 激光功率调节可通过计算机自动控制。准直激光经过圆形可调衰减器 3 后, 被耦合透镜 4 会聚到单模光纤 5 中。单模光纤 5 入射端面位于耦合透镜 4 的后焦点处, 且单模光纤 5 入射端面中心与耦合透镜 4 光轴重合。激光在单模光纤 5 中以单纵模传输, 在其输出端面出射到自由空间。在可见光波段, 单模光纤 5 的模场直径很小, 通常 $3-9\ \mu\text{m}$, 设单模光纤 5 在输出端面处的激光光斑直径为 ω_0 。

[0028] 双端口模块 6 底部加工有标准的燕尾槽, 可以直接固定在三目筒 7 上, 目镜 13 用于人眼观察样品。在双端口模块 6 上部加工有标准 C 口, 安装相应的成像设备 CCD14; 在双端口模块 6 侧面加工有接口, 固定单模光纤 5 及成像透镜 15, 成像透镜 15 将单模光纤输出的激光引入到双端口模块 6 中; 在其内部固定有第一二色镜 16, 第一二色镜 16 分别与成像透镜 15 光轴、筒镜 8 光轴呈 45° 放置, 它使第一激光器 1 发射的激光被反射到筒镜 8、变倍系统 9、物镜 10 所在光路中, 而其它波段的光透射。

[0029] 单模光纤 5 输出端面存在一个激光光斑, 使它位于成像透镜 15 一倍焦距之外, 根据透镜成像理论, 则单模光纤 5 输出端面的激光光斑将在成像透镜 15 的像空间呈一实像, 像的大小取决于激光光斑到成像透镜 15 的距离和成像透镜的焦距。移动单模光纤 5 出射端面 and 与成像透镜 15 的位置, 使得激光光斑通过成像透镜 15 的像刚好位于筒镜 8 的后焦平面处。根据光学原理, 第一二色镜反射的激光经过筒镜 8 之后变成平行光, 再经过变倍系统 9 仍为平行光, 物镜 10 把入射的平行光汇聚到其焦平面处, 如固定在二维电控平移台 11 上动物的大脑皮层处。

[0030] 设成像透镜 15 的垂轴放大率为 α , 变倍系统 9 的放大倍数为 M , 物镜 10 的放大倍数为 β , 则大脑皮层处激光光斑尺寸 ω' 为

$$[0031] \quad \omega' = \frac{\alpha}{M \cdot \beta} \cdot \omega_0$$

[0032] 调节变倍系统 9, 或者更换不同倍数的物镜 10, 可得到不同尺寸的激光光斑, 其尺寸与体视显微镜放大倍数成反比关系。这样可根据细胞尺寸、光敏感蛋白在细胞上的表达量, 合理的选取刺激光斑, 得到高空间分辨率的光刺激激活。

[0033] 系统第一具体实施方式在工作时, 打开第一激光器 1, 将表达光敏感通道的动物放置在二维电控平移台 11 上, 通过目镜 13 观察动物大脑皮层, 待视野中样品清晰, 将电极 17 封装到目标细胞上或把行为学记录装置固定动物身上。然后把棱镜 12 拉出, 则左侧目镜无光通过, 只能通过右侧目镜。大脑皮层即样品发出的光, 通过物镜 10、变倍系统 9、筒镜 8 后, 一路通过棱镜 12 进入右侧目镜, 另一路经过第一二色镜 16 进入成像设备 CCD14 中。CCD14 位于筒镜 8 的后焦平面处, 因此物镜 10 焦平面与 CCD14 感光面满足共轭关系, 通过 CCD14 不仅可以观察样品, 也可实时记录样品。

[0034] 计算机 18 通过接口电路 19 控制 CCD14 获得大脑皮层图像, 选取感兴趣的细胞或区域并将其位置信息转换为二维电控平移台 11 的位置信息。随后计算机 18 通过接口电路 19、快门控制器 20 控制快门 2 开启, 激光通过快门 2、圆形可调衰减器 3、耦合透镜 4、单模光纤 5、第一二色镜 16、筒镜 8、变倍系统 9、物镜 10, 在感兴趣细胞或区域上形成一个直径为 ω' 的激光光斑, 刺激的时间由快门 2 开放的时间决定, 调节圆形可调衰减器 3 获得需

要的激光功率,当超过光敏感通道激活所需功率密度将快速激活该感兴趣细胞;同时开启电生理记录系统 21 记录目标细胞相应的电信号或利用行为学记录系统记录动物的行为表现。第一感兴趣细胞刺激后,快门 2 关闭,计算机 18 通过接口电路 19、平移台控制器 22 控制二维电控平移台 11 快速移动到下一个感兴趣细胞,而后快门 2 再开放调节激光功率激活细胞,依次类推实现视野中多个细胞的快速刺激激活。刺激的范围取决于二维电控平移台 11 的行程,刺激速度主要取决于二维电控平移台 11 的运动速度,刺激的精度取决于 CCD14 成像精度、二维电控平移台绝对定位精度及其重复定位精度。二维电控平移台可添加光栅尺、伺服电机以及反馈回路以提高绝对定位精度和重复定位精度。

[0035] 根据计算机 18 通过接口电路 19 采集到的细胞电信号或行为学信号及二维电控平移台的运动信息,进行分析、研究大脑皮层神经环路的功能和调控动物的行为活动,进而揭示与特定神经环路相关的动物行为的关联。

[0036] 目前已开发出多种不同激发波长的光敏感蛋白,系统第一实施方案即使采用一台多波长激光器,受制造工艺的限制,很多波长的激光是无法获得的。另外,第一实施方案采用快门 2 控制光刺激,其工作方式属于机械运动,最快速度仅能达到几毫秒,因此光刺激速度慢,无法胜任快速光刺激的需要,为此系统中需要添加其它波长激光器,并采用其它结构控制光刺激,如图 2 所示为第二具体实施方式结构图。

[0037] 系统中增加第二激光器 22、第三激光器、……第 N 个激光器 23,第二二色镜 24、第三二色镜、……、第 N 个二色镜 25,以及声光可调谐滤波器 26,它们依次放置。第二二色镜 24 分别与第一激光器 1 光轴、第二激光器 2 光轴成 45 度夹角放置,第三二色镜也分别与第一激光器 1 光轴、第三激光器光轴成 45 度夹角放置,……第 N 个二色镜 25 分别与第一激光器 1、第 N 个激光器 23 光轴成 45 度夹角放置。声光可调谐滤波器 26 通光孔中心与第一激光器 1 光轴重合。

[0038] 系统工作时,打开所有激光器,计算机 18 通过接口电路、声光可调谐滤波器控制器 27,给声光可调谐滤波器 26 施加一定频率、一定幅度的电信号,则声光可调谐滤波器 26 将与信号频率对应的波长选取出来,并与耦合透镜 4 光轴重合,经过耦合透镜 4 会聚到单模光纤 5 中,进而经过物镜实现感兴趣细胞或区域的光刺激。改变声光可调谐滤波器的信号幅值,则可调节光的衍射效率,从而实现样品处不同光功率的刺激。在第二实施方案中,激光波长的切换及功率的调节仅仅取决于施加在声光可调谐滤波器 26 上的电信号,通常只需要几个微秒,因此相对第一实施方案中机械快门,光刺激速度可以提高到 3 个数量级,因此第二实施方案可以满足多种光敏感蛋白表达细胞的快速光刺激激活。

[0039] 为降低系统成本可以采用滤光片旋转轮代替声光可调谐滤光器 26,实现激光波长切换。滤光片旋转轮是安装了不同滤光片的、由电机控制的圆形轮子,在计算机控制下,某种波长滤光片进入第一激光器所在光轴,从而与所装载滤光片相应波长激光透射出去,而其它波长激光被反射或吸收而无法通过。这种方案只能用于波长切换,而无法调节激光功率。

[0040] 最后所应说明的是,以上具体实施方式仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

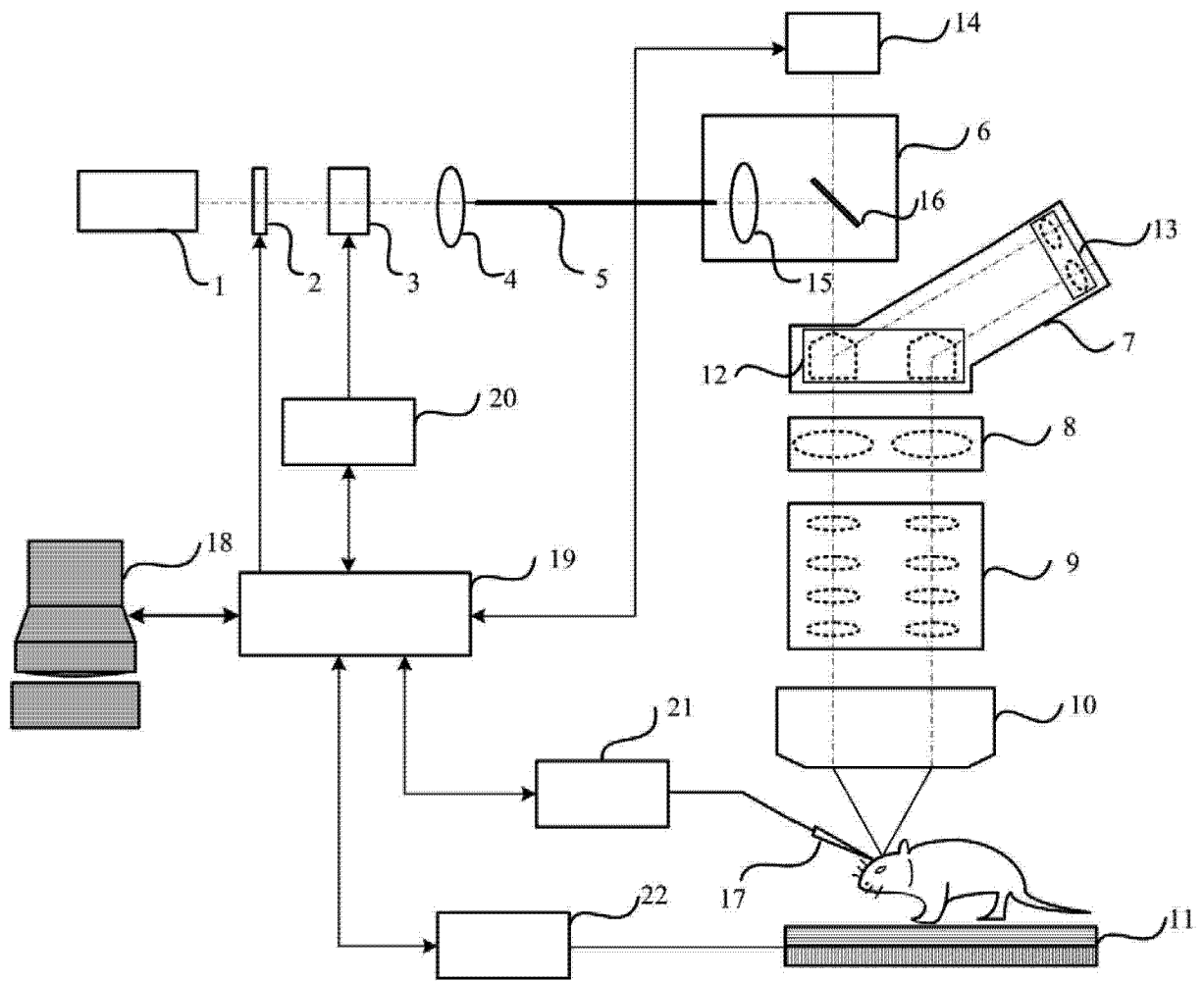


图 1

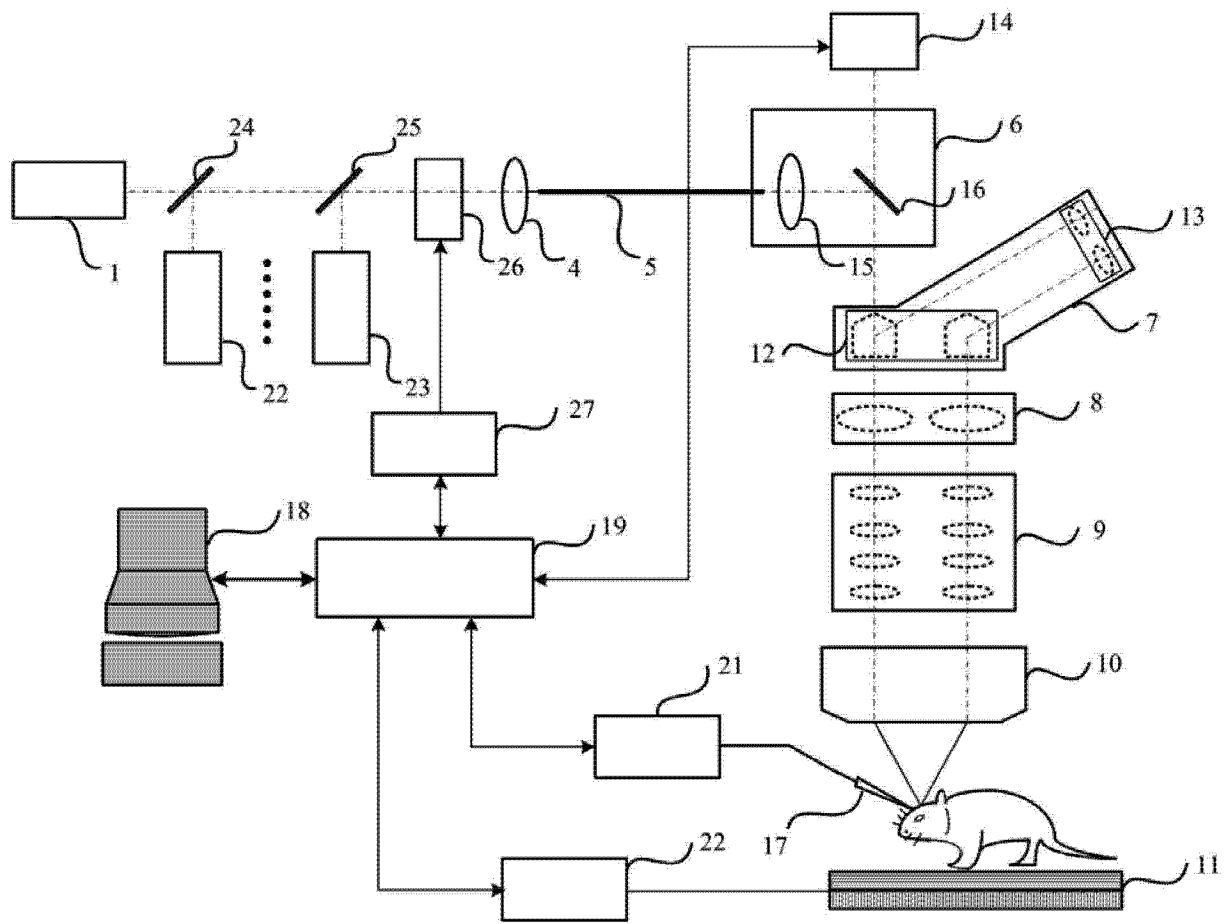


图 2