自适应光学在生物荧光显微成像技术中的应用

张财华^{1,2}, 赵志伟^{1,2}, 陈良怡³, 曹召良^{1*}, 毛珩^{4*}

1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 应用光学国家重点实验室, 长春 130033;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 北京大学分子医学研究所, 北京 100871;

4. 北京大学数学科学学院, 数学及其应用教育部重点实验室, 北京 100871

*联系人, 曹召良, E-mail: caozlok@ciomp.ac.cn; 毛珩, E-mail: heng.mao@pku.edu.cn

收稿日期: 2016-12-05; 接受日期: 2016-12-30; 网络出版日期: 2017-07-04

国家自然科学基金(编号: 61101156, 91232715, 61421062, 61520106004, 61375022)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2011CB809105)资助

摘要 显微成像是开展微观生命科学研究的重要手段, 其中荧光显微成像以其可特异性标记、暗场对比度高、动态示踪性能出色等优势在生物成像领域占据重要地位. 由于活体生物组织通常是非透明、非均匀、各向异性的复杂三维结构, 激发光和发射荧光在生物组织内传播时均会由于折射、散射、吸收等作用使得光波前发生明显畸变, 造成激发光点扩散函数以及荧光成像点扩散函数的性能显著降低. 借助自适应光学技术可对上述经由生物组织传播产生的波前畸变进行实时探测和精确校正, 从而提升激发光照明和发射荧光成像的空间分辨率和深度. 本文归纳了生物荧光显微成像中的不同像差来源, 介绍了自适应光学波前传感和校正的方法, 概括了不同成像方式下波前校正的要求, 重点讨论了自适应光学技术在不同类型荧光显微成像中的运用和实现方法, 并对其今后的应用目标和发展方向提出展望.

关键词 生物活体成像, 荧光显微成像, 自适应光学, 波前像差, 波前校正

PACS: 87.85.Pq, 87.64.M-, 87.64.mk, 87.64.mn, 87.64.kv, 95.75.Qr

1 引言

显微成像技术是进行生物医学研究必不可少的工具, 从17世纪Leeuwenhoek发明第一台显微镜以来, 各种显微成像技术得以发展并应用于生物成像当中. 根据成像原理, 显微镜可以分为光学显微镜和电子显微镜. 相比于光学显微镜, 电子显微镜在放大倍数和成像分辨率上有非常大的优势, 但是其对工作环境要求苛刻, 更重要的是对生物样品具有破坏性, 无法成像活

体生物组织, 严重限制了其在生物显微成像中的应用.

光学显微镜因其非接触、无创伤的优势而被广泛应用于生物组织精细结构的观察中. 随着现代生命科学的发展, 生物医学领域对显微技术的发展提出了更高的要求, 对深层生物组织的四维高时空分辨率活体成像成为了研究人员共同追求的目标. 为了对更小尺度的生物组织进行高空间分辨率成像, 研究者使用荧光报告基因和荧光染料标记生物样品中的特定对象, 再使用特定波长的激发光照射所标记的荧光物质,

引用格式: 张财华, 赵志伟, 陈良怡, 等. 自适应光学在生物荧光显微成像技术中的应用. 中国科学: 物理学 力学 天文学, 2017, 47: 084204
Zhang C H, Zhao Z W, Chen L Y, et al. Application of adaptive optics in biological fluorescent microscopy (in Chinese). Sci Sin-Phys Mech Astron, 2017, 47: 084204, doi: 10.1360/SSPMA2016-00506

使其发射荧光,从而获得活体组织、细胞、细胞核、蛋白、小分子等的定位、结构和变化情况,这种光学显微技术称作荧光显微成像技术. 生物荧光显微成像技术已经成为生命科学领域的重要科研工具.

目前,用于生物成像的荧光显微镜主要包括以下几种:普通宽场显微镜(Wide-Field Microscopy)、共聚焦显微镜(Confocal Microscopy)、多光子显微镜(Multi-Photon Microscopy)、光片照明显微镜(Light-Sheet Microscopy)、超分辨率显微镜(Super-Resolution Microscopy),其中,超分辨率显微镜又包括结构光照明显微镜(Structure Illumination Microscopy, SIM)、受激发射损耗显微镜(Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)、单分子光开关显微镜(Single-Molecule Switching Microscopy, SMS, 包括PALM和STORM)等多种模式.

随着各种类型的荧光显微成像技术的提出,显微镜成像分辨率、对比度以及信号强度等都得到了有效提高,但是在进行活体深层体成像时还面临很大困难. 由于生物组织通常是非透明、非均匀的三维立体复杂结构,当光经过生物组织时,光在组织中反射、折射过程产生的像差以及散射、吸收对光传播的影响会使得光波波前发生明显畸变,光聚焦点的分辨率、信号强度明显下降. 尤其是进行深层组织成像时,随着穿透深度的增加,像差越来越大,散射效应越来越明显,对光波的影响也越来越显著,成像分辨率、对比度及光信号强度也随之下降. 因此,荧光显微镜的高分辨率、高对比度成像效果仅局限在生物组织表层几百微米的深度范围内. 此后,多光子显微镜的出现使得激发光波长向更长波方向发展,从而大大减小了激发光的散射效应,同时其垂轴向和轴向分辨率相对于普通宽场显微镜(如公式(1)和(2)所示)得到了明显提升,以双光子显微镜为例,其垂轴向及轴向分辨率如公式(3)和(4)所示^[1].

$$r_{x/y} = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA}, \quad (1)$$

$$r_z = \frac{2n\lambda}{NA^2}, \quad (2)$$

$$r_{x/y} = \begin{cases} \frac{0.32 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot NA}, & NA \leq 0.7, \\ \frac{0.325 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot NA^{0.91}}, & NA > 0.7, \end{cases} \quad (3)$$

$$r_z = \frac{0.532 \cdot \lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right], \quad (4)$$

其中, λ 为激发波长, n 为物镜浸没介质折射率, NA 为显微物镜数值孔径. 因此,多光子显微镜的激发光穿透深度以及高分辨率成像深度在荧光显微镜中是最大的. 尽管如此,由于像差的存在和吸收、散射效应的影响,即使是三光子荧光显微镜,其最大成像深度也只有1–2 mm.

自适应光学的概念在20世纪中期被提出并成功应用于天文观测领域,获得了分辨率显著提升的成像效果. 2000年,自适应光学技术第一次被应用到生物荧光显微镜上^[2],校正因为生物样品折射率不均匀引起的像差,由此开启了自适应光学应用在生物显微成像领域的大门. 从此之后,不同的自适应光学方法和手段在不同种类的显微镜上得以应用和实现,使得深层生物组织的四维高时空分辨率活体成像成为可能.

本文总结了生物荧光显微成像中的像差来源及不同来源像差的处理方法,梳理了自适应光学在生物显微成像应用中的技术特点,归纳了自适应光学技术在不同类型生物荧光显微成像中的运用和实现方法,并对自适应光学在今后生物荧光显微成像中的研究目标和发展方向提出展望.

2 生物荧光显微镜中的像差

自适应光学的目的是校正光学系统的像差,像差即波前的相位畸变. 为了分析各种像差的特点,首先要对像差进行描述. 目前普遍使用Zernike多项式^[3]作为基函数对像差进行描述. Zernike多项式是在单位圆上正交的多项式序列,由于各项分布之间相互独立,使得其可以把复杂的波面进行模式分解,得到模式系数唯一的波前分布降维描述形式. 更重要的是,前几项模式分布正好对应于光学系统的初级像差,使得光学工作者可以容易地进行像差分析和系统评价.

显微镜中的像差来源主要有三类:显微镜光路系统像差、浸没介质折射率与样品折射率不匹配引起的像差(折射率失配像差)、样品折射率不均匀导致的像差.

其中,第一种显微镜光路系统像差是由于光学系统装调和光学器件不理想引入的低阶像差,是系统中产生的固有波前畸变,这类像差可以通过光学优化设

计进行抑制, 并可以预先进行测量、标定和扣除; 第二种是由于显微物镜浸没介质(空气、水、油等)的折射率、样品固定装置(盖玻片、琼脂糖等)的折射率与样品本身的折射率不相同而引起的, 如图1(a)所示, 这类像差主要表现为与成像深度成正比的离焦和球差^[4,5], 而且此类像差为固定像差, 不随时间而变化, 因此可以通过对显微物镜及整个光学系统的优化设计来进行抑制, 或者引入自适应系统进行预校正; 第三种是由于生物组织折射率分布不均匀导致的光波经过生物组织内部而产生的波前畸变, 这类像差是光学显微系统中最主要、最难消除的像差, 也是自适应光学主要负责校正的像差, 如图1(b)和(c)所示. 此类像差具有以下特点: (1) 随时间产生相对缓慢的变化, 其时间带宽多在0.01–0.1 Hz; (2) 造成成像质量下降的像差主要为其中的中低频分量(前21项Zernike分量)^[6]; (3) 由于生物组织的结构复杂, 此类像差在空间上也变化明显, 导致成像视场中不同区域对应的波前畸变各不相同, 给宽场成像下的自适应探测和校正带来一定困难.

3 自适应光学技术

1953年, Babcock^[7]首次提出自适应光学的概念, 他提出用波前传感器探测波前畸变信息, 再用主动光学元件如变形镜产生校正信号, 补偿波前畸变. 自适应光学概念首先被应用到了地基望远镜的对天观测上, 自适应光学系统主要由波前探测器、波前控制器和波前校正器组成. 无限远处星体发出的光经过大气湍流的扰动后被望远镜接收, 之后光被分为两束, 其中一束进入波前探测器, 探测器探测大气湍流产生的

波前畸变, 并把畸变信息发送给控制计算机; 控制计算机计算出控制信号并发送给波前校正器; 另一束光经过波前校正器, 校正器根据控制信号进行畸变校正, 校正之后的光进入CCD成像. 畸变波前的准确探测和精确校正自适应光学系统的工作核心.

2010以来, 自适应光学在生物显微成像技术中得到了广泛的应用, 针对生物组织中像差特点的各种波前探测和波前校正方法也被相继提出.

3.1 波前探测方法

自适应光学波前探测方法主要分为基于波前探测器的直接探测方法和基于迭代算法的无波前探测器方法两种. 由于生物组织的复杂性, 对生物样本中畸变波前的直接探测一直是一大难点. 首先, 自适应光学系统中普遍使用的是夏克-哈特曼波前探测器(SHWFS), 这种波前探测器要求被探测目标是近乎标准的点目标或者是形状较为规则的扩展目标, 然而生物组织是非常复杂的三维结构, 其中既没有规则的点目标供波前探测使用, 也没有类似人视网膜的分层结构^[8], 光来自被照明的生物样本的各个位置, 是多点、多层光叠加的结果, 导致不管是探测还是成像都受到离焦面杂光的干扰而难以完成; 其次, 生物荧光显微镜中的成像及探测光源为受激辐射荧光, 然而, 由于荧光光子数有限, 再加上有限的光子数要完成波前探测和组织成像两项工作, 就算是光强较强的多光子激发荧光显微镜也难以保证有足够多的荧光光子进入波前探测器完成波前的准确探测. 由于以上两点的限制, 在自适应光学生物显微镜的研究初期, 直接波前探测方法没有得到有效的应用.

图1 (网络版彩图)(a) 折射率失配像差; (b) 样品折射率不均匀引起的像差; (c) 照明光路的像差校正原理

Figure 1 (Color online) (a) The refractive index mismatch aberrations; (b) the refractive index variations introduced aberrations; (c) the principle of aberration correction in illumination path.

基于迭代算法的无波前探测器方法首先被应用于生物显微成像技术中. 其中迭代算法主要分为随机搜索算法和基于图像的搜索算法两种^[9], 表1列举了常用的迭代算法及其分类情况. 与直接波前探测方法相比, 此种方法不需要波前探测器, 光路结构及生物样本处理方法更为简单, 但是此方法需要一系列迭代过程才能最终得到满足评价标准的像差信息, 即为最终的畸变波前探测结果, 其搜索过程耗时长且探测结果不唯一.

随着生物显微成像技术以及自适应光学的发展, 生物显微镜中直接波前探测的两种限制逐渐被突破, 各种形式的波前直接探测方法被相继提出并实现. 为了在生物样品中产生点状探测目标, 天文观测领域的人工导星自适应波前探测技术被应用于生物显微镜中. 生物体自发荧光、注射荧光微珠、荧光蛋白标记分别被用作人工导星, 在生物样本内产生点状荧光发光体, 作为夏克-哈特曼波前探测器的探测目标光源完成样品中特定位置的波前畸变探测. 另外, 双光子激发荧光显微镜出现后, 由于双光子效应, 被激发的荧光被局限在焦点附近的很小区域内, 为畸变波前的直接探测提供了理想的点光源, 因此, 双光子激发荧光焦点也是常见的导星之一. 其次, 为了解决荧光发射光子数有限、光强度不足以完成波前探测的问题, 基于扫描系统的Descanning技术^[10]被应用于对导星的探测过程中, 该技术是基于等晕区的概念提出的, 在自适应光学中, 认为同一等晕区内所有点发出的光在传播过程中产生的波前畸变均相同, 对不同的样品, 其等晕区大小也不相同. Descanning技术通过对同一等晕区内所有导星信号的叠加增强了波前探测器上的光信号, 提高了直接波前探测质量和探测效率^[11,12]. 除人工导星以外, 基于相干门的直接波前探测方法^[13]也被应用于生物显微镜中. 该方法利用参考光和样品臂的后向散射光的干涉波来提取焦点处相干区域的像差信息, 通过该方法, 离焦的杂散光被成功滤除, 保证

了波前探测结果为焦点处特定区域的像差信息.

3.2 波前校正方法

由于波前畸变本质上是有效光程(OP)的差异, 有效光程可以表示为光在介质中通过的路程 d 与该媒质折射率 n 的乘积: $OP=d \times n$. 因此, 畸变波前可以通过改变通过传输介质的路程 d 或者改变传输介质的折射率 n 两种途径进行补偿.

变形镜(DM)是自适应光学系统中的传统校正器件, 它是通过改变路程 d 来实现波前校正的. 通过压电陶瓷驱动器的伸缩作用来改变反射镜的表面面形, 从而改变经由变形镜反射出来的光束各点的光程. 变形镜的校正速度快、校正波段宽、无偏振依赖性, 但同时变形镜空间分辨率有限、驱动电压高、加工周期长、价格昂贵.

液晶空间光调制器(SLM)作为波前校正器已经在大气湍流校正方面得到了成功应用^[14], 它是通过改变传输介质折射率 n 来实现波前校正的. 液晶空间光调制器空间分辨率高、校正量大、加工周期短、价格低廉, 但是由于液晶空间光调制器校正波段窄, 同时具有偏振依赖性, 只对线偏振光具有位相调制作用, 因此其能量利用率低, 这种缺陷严重影响了其作为波前校正器在生物显微镜中的应用, 使得其在自适应光学系统中的应用具有很大的局限性. 但是, 液晶空间光调制器在生物显微镜中有很多其他的应用, 尤其是在激光照明光路的光束控制以及产生特定结构光的显微光路中应用广泛.

4 显微镜的成像方式

显微镜的成像方式分为宽场成像和点扫描成像两类, 目前常见的生物荧光显微镜根据成像方式的不同也可以分为两类: 普通宽场显微镜、光片照明显微镜、结构光照明显微镜及单分子光开关显微镜属于宽场成像显微镜, 共聚焦显微镜、多光子显微镜及受激发射损耗显微镜属于点扫描成像显微镜.

4.1 宽场成像显微镜

此类显微镜通常采用柯勒照明方式产生大视场范围的均匀照明, 随着光学显微技术的发展, 逐渐产生了光片照明及结构光照明等照明方式, 但是不管采

表1 基于迭代算法的无波前探测器方法
Table 1 The wavefront sensorless methods based on iterative algorithm

分类	举例
随机搜索算法	遗传算法、爬山法、模拟退火算法、蚂蚁群算法
基于图像的搜索算法	模式法、光瞳分割算法

用何种照明方式, 宽场成像显微镜都会对整个照明视场进行一次性成像, 而由于生物组织异质性使得波前扰动只在很小的等晕区内具有空间不变性, 且这种空间不变性通常被局限在几十微米左右, 这样一来, 成像视场中就包含了生物样本的多个等晕区. 然而, 传统的自适应光学只能针对一个等晕区进行准确的波前探测和校正, 因此, 自适应校正会使高分辨率成像视场严重减小. 如何克服这一局限也成为自适应显微技术的研究方向之一.

4.2 点扫描成像显微镜

此类显微镜在照明方式上由面激发改为了逐点扫描激发, 成像方式也变为了点扫描成像. 与普通宽场显微镜相比, 点扫描成像显微镜具有更高的空间分辨率, 同时可以对大视场范围内的生物样本进行三维逐点扫描, 进而获得样本的三维立体图像. 同时, 在自适应光学应用方面, 点扫描的成像方式使得系统可以进行逐层、逐等晕区的逐点波前直接探测及校正, 避免了生物组织异质性对大视场校正产生的不利影响. 但是, 其高空间分辨率是通过牺牲时间分辨率获得的, 在进行活体校正及成像时, 长时间的扫描会增加光毒性及光漂白作用对样本产生的影响.

为了提高显微系统的空间分辨率, 宽场显微镜逐渐发展成为了点扫描显微镜. 然而, 双光子光片照明显微镜、结构光照明显微镜及单分子光开关显微镜等高分辨及超高分辨率宽场显微镜的出现使得高时空分辨率与大成像视场可以兼得, 而更高时空分辨率、更大视场的活体成像也成为生物显微成像研究人员共同追求的目标.

4.3 不同成像方式对波前校正的影响

生物荧光显微镜在光路结构上至少需要两部分组成: 一部分为照明光路(去程), 负责将激发光汇聚于生物样本的指定位置, 对荧光物质进行激发; 另一部分为成像光路(回程), 负责收集样本中荧光物质发出的荧光, 并将其汇聚于光电探测器件(CCD/sCMOS/PMT/APD), 进行成像. 不管是照明光路还是成像光路, 光束都要穿过生物组织样本, 因而都会受到生物组织像差对光波前产生的扰动影响. 对于不同类型的显微镜, 像差作用的特点和产生的影响不尽相同, 所以对其如何校正和校正与否的判断也不尽相同.

对于宽场成像显微镜而言, 由于采用CCD或sCMOS相机进行面探测, 在回程中样本的荧光图像会直接呈现在相机上, 而像差的影响也会直接体现在宽场成像效果中, 因此, 回程的自适应校正宽场成像显微镜中是必须的. 而宽场显微镜去程光路是否需要校正由显微镜激发原理和去程光路的特点来决定. 例如, 光片照明显微镜去程光路决定了产生光片的质量(厚度、视场等), 结构光照明显微镜去程光路决定了产生结构光的质量, 因此, 这两种显微镜的去程校正对于提高显微镜的性能有很大的作用; 而普通宽场显微镜和单分子光开关显微镜一般采用柯勒照明方式, 去程光路像差不会对最终成像质量产生影响, 因此其去程无需进行自适应校正.

对于点扫描成像显微镜而言, 去程光路将激发光聚焦在生物样本中的一点, 通过这一聚焦点来激发荧光物质发出荧光. 而样本像差会对该聚焦点产生影响, 使焦点弥散, 进而在离焦面产生不必要的背景光(共聚焦显微镜), 甚至使荧光激发现象无法正常产生(双光子显微镜、受激发射损耗显微镜). 因此, 去程的自适应校正点扫描成像显微镜中是必须的(如图1(c)所示). 回程光路大多采用PMT/APD进行点探测成像, 对于共聚焦和受激发射损耗显微镜, 由于共聚焦小孔的存在, 像差会使荧光信号减弱、荧光收集效率下降, 因此其回程光路的自适应校正对提高成像质量有非常重要的作用; 而多光子显微镜由于其天然的层切能力, 在光路中不需要共聚焦小孔, 因此焦点发出的光均能到达探测器, 其回程像差对成像效果影响基本可以忽略, 也无需进行自适应校正.

5 自适应光学技术在显微镜中的应用

目前为止, 上述提到的各类生物显微镜与自适应光学的结合都有相应的报道, 针对显微镜的不同照明方式和不同成像方式, 自适应波前探测方法、校正器类型以及校正器位置等自适应光学技术的选择也各不相同. 本节将针对各种自适应光学技术在上述不同生物显微镜上的应用方法, 对国内外已报道的自适应光学生物显微成像系统进行总结.

5.1 普通宽场显微镜

普通宽场显微镜在照明方式和成像方式上都属

于宽场形式,且其照明方式为柯勒照明.据此,照明光路像差对最终成像质量没有影响,只需要对其成像光路进行自适应校正即可.

2005年, Potsaid研究组^[15]第一次将自适应光学技术应用到宽场显微镜上,利用ZEMAX软件进行了模拟,说明了自适应校正可以使得成像斯特列尔比达到0.8以上,并利用变形镜(Boston Micromachines)作为校正器,通过对不同位置像差进行预测,在实验上验证了自适应校正宽场显微镜上的可行性,通过对样本不同位置的像差分别校正扩大了成像视场. 2009年, Kner研究组^[16]沿用了Potsaid研究组的像差预测方法,通过理论计算得到特定深度的像差信息并利用变形镜(Image Optic)对像差进行校正,使得成像信号强度提高两倍,成像清晰度也有了一定提升. 2010年, Warber研究组^[17]应用基于随机搜索的无波前探测优化算法得到波前的畸变信息,利用空间光调制器(Holoeye)作为波前校正器,实现了成像光路的自适应校正,并将基于场景的优化算法与随机搜索算法结合,从而将波前畸变信息的计算时间从几分钟减小到30 s以下.

另外,基于SHWFS的直接波前探测方法也被应用到宽场显微镜中. 2011年, Vermeulen研究组^[18]使用荧光微珠作为人工导星,利用SHWFS (Imagine Optic)对蛋白细胞样品产生的像差进行直接探测,并使用变形镜(Image Optic)作为校正器对畸变波前进行闭环校正,如图2所示. 该研究工作还论述了基于人工导星的直接波前探测及校正方法会使得自适应校正后

的清晰成像视场减小为原宽场显微镜视场的10%,提出多层共轭自适应光学在扩大校正视场方面的应用前景. 2011年, Kubby研究组^[19]同样使用荧光微珠作为人工导星,利用SHWFS (AOA)对果蝇胚胎20 μm 深处组织产生的像差进行直接探测,并用变形镜(Boston Micromachines)进行校正,得到了微米量级组织的清晰成像效果. 同时,该研究工作证明了利用647 nm荧光导星进行波前探测及校正可以对510 nm的成像产生有效的校正效果,说明SHWFS探测的波前像差在一定得光谱范围内均适用,这使得荧光导星的波长选择范围更灵活,可以使用更长波长荧光来增加穿透深度,从而在一定程度上提高成像深度.

2013年, Girkin研究组^[20]对比了直接探测方法和无探测器的优化方法在宽场显微镜中的应用效果,直接探测方法是利用生物组织的后向散射光作为导星,使用SHWFS (Thorlabs)进行波前直接探测,无探测器的优化方法是以图像清晰度作为指标对图像进行最优优化搜索,实现波前畸变信息的间接探测,探测结束后,使用变形镜(Image Optic)进行波前校正. 研究对比发现,基于SHWFS的直接波前探测方法的探测速度更快,而基于优化算法的无探测器方法的最终校正效果要优于前者. 进一步分析,该研究工作的对比结果证实了在宽场显微镜中,基于SHWFS的直接波前探测方法虽然能够实现波前的快速、准确探测,但是校正视场很小,只局限在以探测点为中心的等晕区范围内,在全视场范围内的校正效果并不理想. 因此,宽场显

图2 使用SHWFS和DM在宽场显微镜中探测并校正波前畸变^[18]

Figure 2 By using SHWFS and DM to compensate the wavefront aberrations in wide-field microscopy [18].

显微镜中的自适应光学大视场探测和校正是今后发展的趋势.

5.2 共聚焦显微镜

共聚焦显微镜在照明方式和成像方式上都是点扫描形式, 去程像差会使聚焦点弥散, 产生背景杂光, 降低分辨率, 回程像差会使荧光信号减弱、荧光收集效率下降, 进而使图像对比度降低, 因此共聚焦显微镜的照明光路及成像光路都需要自适应像差校正.

2002年, Booth研究组^[21]第一次将自适应光学技术应用到共聚焦显微镜上, 同时也是第一次将模式法这一无波前探测器的优化算法应用到共聚焦显微镜的波前探测中. 系统采用变形镜(OKO Technologies)作为波前校正器, 并将荧光强度作为评价指标, 对小鼠组织进行了波前探测及校正成像实验, 证明了模式法在波前探测方面的有效性, 通过自适应校正, 荧光强度和成像质量都得到有效提升. 另外, Delon研究组^[22,23]分别在2011年和2013年在共聚焦显微镜上实现了基于模式法波前探测的自适应校正, 并将此系统应用于荧光相关光谱学的研究中.

自适应光学在共聚焦显微镜上的应用过程中, 直接波前探测方法也得到了广泛的应用, 代表性研究工作中集中在Kubby研究组^[24-26]. 该研究组在2011年及2012年分别采用注射的荧光微珠及标记的荧光蛋白作为人工导星, 利用SHWFS(AOA)作为波前探测器进行畸变波前的直接探测, 并使用变形镜(Boston Micromachines)进行波前校正, 其校正原理光路图如图3所示. 利用自适应共聚焦显微系统分别对小鼠组织及果蝇胚胎进行了校正成像, 在成像斯特列尔比、信号强度等方面验证了该系统的自适应校正效果. 2016年, 该研究组针对直接波前探测方法在宽场显微镜和共聚焦显微镜中的应用, 对本组的研究工作进行了总结, 指出了直接波前探测方法相对于无波前探测的优化方法而言, 其像差探测精度更高, 探测速度更快, 从而使得光毒性和光漂白作用减弱^[27]. 但同时我们也应该注意到, 这种逐点、逐层的波前直接传感和校正的方式虽然能够显著提高自适应校正精度, 但是会导致共聚焦成像的时间分辨率降低; 另外, 由于荧光发射强度很弱, 无法满足SHWFS对探测光子数的要求, 使得在探测器上图像信噪比过低. 以上局限性为直接波前探测方法的进一步发展提供了方向.

图3 (网络版彩图)使用SHWFS和DM在共聚焦显微镜中逐点探测并校正波前畸变^[26]

Figure 3 (Color online) By using SHWFS and DM to compensate the wavefront aberrations point by point in confocal microscopy ^[26].

5.3 多光子显微镜

多光子显微镜结合了共聚焦显微技术和多光子激发技术, 在传统共聚焦显微镜的基础上采用长波长飞秒脉冲激光器作为激发光源, 只在物镜焦点处很小区域内产生多光子激发, 无需共聚焦针孔, 提高了荧光检测效率和穿透深度. 由于多光子激发只发生在物镜焦点处光子密度最高的区域, 而照明光路的像差会引起焦点处光斑能量的弥散, 导致焦点分辨率下降、光子密度下降、成像深度减小, 因此, 其照明光路的自适应校正是非常必要的. 与共聚焦显微镜相比, 其成像光路无需使用共聚焦针孔, 可以使用大面板的PMT/APD探测器进行逐点探测, 此路像差对最终成像质量没有决定性的影响.

2000年, Albert研究组^[2]首次将自适应光学引入光学显微系统, 并在双光子显微镜上进行实验, 采用遗传算法进行畸变波前的计算, 利用变形镜进行校正, 验证了自适应光学的有效性. 此后自适应光学双光子显微系统得到了快速发展. 2009年, Booth研究组^[28]采用基于模式法的无波前探测方法, 利用变形镜(Boston Micromachines)对活体老鼠胚胎组织中的去程像差进行有效校正. 2010年, Betzig研究组^[29]提出了基于光瞳分割思想的无波前探测优化算法, 将光瞳分割为若干子区域, 通过计算各子区域成像时图像的偏移估计子区域内波前的斜率, 从而重建波前畸变信息. 如图4所示, 采用液晶空间光调制器作为波前校正器, 对小鼠大

图4 (网络版彩图)使用SLM在双光子显微镜中校正激发光波前畸变^[28]
Figure 4 (Color online) By using SLM to compensate the excitation path aberrations in two-photon microscopy [28].

脑皮层组织进行像差校正,大大提高了系统的成像深度、信号强度和三维分辨率^[28-30]. 2012年以来, Cui研究组^[31]运用无波前探测的二分式迭代方法(IMPACT),使用变形镜(Boston Micromachines)实现轴上点复杂波前畸变的自适应校正,先后实现了小鼠大脑570及650 μm 深度组织的自适应校正成像.

此外,基于波前探测器的直接波前探测方法也得到了有效应用. 2010年, Cha研究组^[32]使用SHWFS (Imagine Optic),利用双光子焦点的反射光进行逐点的直接波前探测,并使用变形镜(Imagine Optic)对离体小鼠舌头、大脑的深层组织实现有效校正,提高了成像深度和成像分辨率. 2013-2016年, Kubby研究组^[33-35]分别利用生物组织自发荧光以及注射荧光微珠作为人工导星,采用SHWFS(AOA)进行波前探测,使用变形镜(Boston Micromachines)作为校正器,在果蝇胚胎和小鼠大脑组织中实现了双光子去程像差校正,提高了成像清晰度和斯特列尔比,其校正原理光路图如图5所示.

近几年来,从事双光子显微镜成像的研究人员逐渐达成共识,由于大视场深层生物组织异质性的影响复杂,且会使波前扰动不具有空间不变性,因此,采用逐层、逐等晕区的直接波前探测和校正方法最为有效. 2014年, Betzig研究组^[11]提出了基于SHWFS和Descanning技术的直接波前探测方法,实现逐层、逐等晕区的波前传感和校正成像,同时解决了弱荧光信号强度不能满足探测器要求的问题,使用荧光微珠作为导星,应用空间光调制器分别对单光子激发的去程和回程以及双光子激发的去程像差实施

图5 (网络版彩图)使用SHWFS和DM在双光子显微镜中校正激发光波前畸变^[33]
Figure 5 (Color online) By using SHWFS and DM to compensate the excitation path aberrations in two-photon microscopy [33].

校正. 2015年, Betzig研究组^[12]改用穿透力更强的近红外荧光蛋白作为导星,减弱了深层组织散射效应产生的影响,在小鼠大脑700 μm 的深度范围内实现了高分辨率的自适应双光子活体形态学成像和功能成像.

除双光子显微镜以外,自适应光学也在三光子和四光子显微镜中得到了验证. 2015年, Xu研究组^[36]在同一套系统对比了自适应光学对双光子、三光子及四光子显微镜的校正效果. 结果表明,像差对信号强度的影响随非线性阶次成指数形式增长,因此,非线性阶次越高,自适应校正效果越明显. 此验证实验为自适应光学在三光子甚至四光子中的应用开辟了道路,也为更大深度的高空间分辨率生物成像提供了方向.

5.4 光片照明显微镜

光片照明显微镜为宽场成像显微镜,与普通宽场显微镜相比,光片照明显微镜使用一层光束薄片从样品侧面激发荧光,在垂直于光片的方向上通过显微物镜与CCD或sCMOS来获取照明层面的荧光图像,从而实现了生物样品的三维层析成像. 与宽场显微镜、共聚焦显微镜和双光子显微镜相比,光片照明显微镜具有更高的成像速率、更高的信噪比及更低的光毒性和光漂白效应,因此适用于生物组织的长时间的活体成像. 对于光片照明显微镜而言,其照明光路像差会使得照明光片发生弥散,厚度显著增加,使得光片有效视场减小,进而使得最终成像的视场减小;其成像方式为普通宽场成像,因此成像光路像差会对最终成

像效果产生直接影响,使得成像深度减小、成像分辨率降低.因此,光片照明显微镜的去程和回程光路都需要自适应像差校正.

在成像光路的自适应校正方面,2012年,Love研究组^[37]将无波前探测的自适应光学技术应用到了光片照明显微镜的成像光路中,应用模式法进行间接波前探测,使用变形镜(Imagine Optic)作为校正器对斑马鱼样本进行了自适应校正和成像.同样是2012年,Lorenzo研究组^[38]将基于探测器的直接波前探测自适应光学技术应用到成像光路中,如图6所示,在培养的肿瘤细胞球体中注射荧光微珠作为人工导星,利用SHWFS (Imagine Optic)进行畸变波前的直接探测,并利用变形镜(Imagine Optic)进行校正,在信号强度、成像对比度和分辨率上都得到了有效提升.

在照明光路的自适应校正方面,2013年Rohrbach研究组^[39]通过模拟说明了可以通过动态器件对照明光片进行控制,从而使光片质量得到提升,但是照明光路的自适应校正目前还未见实验报道.由于光片的产生方法各不相同,照明光路的自适应校正也应该各有特点,由于照明光路无需考虑光能利用率和偏振损耗问题,因此,液晶空间光调制器可以得到很好的应用.实现光片照明光路的自适应校正能够扩大高分辨率成像视场,这符合显微成像技术的发展方向.另外,随着光片照明方式的发展,像双光子光片照明^[40,41]等新型照明方式的产生也对自适应光学在光片照明显微镜中的应用提出了更高的要求.

5.5 超分辨显微镜

超分辨显微镜能够实现超衍射极限的空间分辨率,根据其超衍射极限的实现原理及系统成像方式不同,自适应光学技术的应用方法也各不相同.

5.5.1 结构光照明显微镜(SIM)

此类显微镜在成像方式上属于宽场成像,且通常采用衍射光栅的正负一级光在生物样品中产生的干涉条纹进行照明,像差的存在会使得照明结构光的质量下降.随着显微技术的发展,SIM结合了全内反射荧光显微镜(TIRFM)的原理,进一步提高了系统性能,同时也使得照明光路对像差更加敏感.因此其照明光路和成像光路都需要进行自适应光学校正.

2008年,Booth研究组^[42]采用无波前探测器的优化

算法,将变形镜(Boston Micromachines)置于去/回程的共同光路中,实现了对小鼠肠样品的自适应光学校正,如图7所示.同时,该研究工作同时也讨论了像差对结构光显微镜的影响,说明了不同像差对结构光的产生有着不同的作用,系统只需要校正影响结构光的产生的像差即可.

5.5.2 受激发射损耗显微镜(STED)

此类显微镜主要由3部分光路组成:照明光路(Illumination Path)、成像光路(Detection Path)、损耗光路(Depletion Path).其中照明光路和成像光路组成了传统的共聚焦扫描秒显微系统,其受像差的影响也与共聚焦显微镜类似;损耗光路的质量决定了系统超分辨的能力,其对像差最为敏感,该路像差的存在会

图6 (网络版彩图)使用SHWFS和DM在光片照明显微镜中校正成像光波前畸变^[38]

Figure 6 (Color online) By using SHWFS and DM to compensate the imaging path aberrations in lightsheet microscopy ^[38].

图7 (网络版彩图)使用DM在结构光照明显微镜中校正波前畸变^[42]

Figure 7 (Color online) By using DM to compensate the aberrations in SIM ^[42].

使得超分辨能力严重下降甚至失去超分辨能力. 因此, 受激发射损耗显微镜的3部分光路均需要自适应光学校正. 其自适应光学应用研究集中在Booth研究组^[43-45]. 液晶空间光调制器被应用在损耗光路中, 使其引入相位掩膜构造损耗光的环状分布, 同时用于校正损耗光经由组织时产生的波前畸变. 另外, 由于照明光路无需考虑能量利用率和偏振损耗问题, 空间光调制器同样可以作为校正器用于此光路的波前校正. 两光路的波前探测均采用基于模式法的无波前探测优化算法^[43,44]. 在成像光路的自适应校正方面, 由于发射荧光强度的限制, 变形镜是最佳的校正器件. 2016年, Booth研究组^[45]将变形镜置于3个光路的共光路部分, 作为校正器对3部分光路像差进行同时校正. 同时, 在损耗光路中加入空间光调制器, 作为相位掩膜构造环状损耗光, 同时在损耗光路中与变形镜组成双校正器结构, 用以校正变形镜校正后残留的波前像差, 从而满足损耗光路对像差校正的苛刻要求, 其双校正器光路如图8所示.

5.5.3 单分子光开关显微镜(SMS)

单分子光开关显微镜以传统宽场显微镜为基础, 只需要在成像光路进行自适应校正. 2012年, Dahan研究组^[46]提出使用自适应光学系统一方面校正像差, 另一方面主动引入可调节的像散波前分布模拟柱面镜的轴向检测作用, 从而获得单个荧光团的精确轴向定位, 如图9所示. 该研究使用变形镜(Imagine Optic)作为波前校正器, 同时使用SHWFS (Imagine Optic)直接波前探测方法及基于遗传算法的无波前探测方法. 该显微镜在约800 nm深度对荧光蛋白获得40 nm的轴向定位精度, 对荧光染料获得20 nm的轴向定位精度. 2015年, Booth研究组^[47]采用无波前探测器的优化算法, 使用变形镜(Boston Micromachines)作为校正器实现了STORM显微镜的回程自适应校正, 得到了优化的点扩散函数和成像质量.

6 总结与展望

大视场、大深度的高分辨率活体显微成像将为生物学及医学研究提供更丰富、更准确的影像信息, 随着现代生命科学的发展, 各种类型的显微系统相继出现, 并向着成像更大视场、更深、更清晰、更快的

方向迈进, 而自适应光学技术势必会在其中发挥极其重要的作用. 表2根据前文论述, 对目前自适应光学技术在生物显微成像领域的应用情况进行了概括. 自适应光学校正在生物显微镜中的一系列成功应用验证了其在像差校正方面的重要作用, 为显微系统成像性能的进一步突破提供了技术支持和发展方向.

当然, 随着技术发展, 生物组织的深层动态荧光显微成像对自适应光学技术的应用提出了更多要求^[48]. 为了使自适应光学技术能在生物显微系统中得到更为普遍的应用, 需要对该项技术的基本原理进行更为深入的理解, 对其发展要求和方向进行更为深入的研究.

从自适应光学在显微系统中的应用效果来看, 不同的探测方法可以决定最终的校正效果和成像质量, 而探测方法的选择也需要根据需求来具体考量. 基于迭代算法的无波前探测方法能够节省波前探测器, 使得系统结构大大简化, 同时也提高了成像光路的能量

图8 (网络版彩图)使用DM和SLM在受激发射损耗显微镜中校正3部分光路的波前畸变^[45]

Figure 8 (Color online) By using DM and SLM to compensate all of the three path aberrations in STED microscopy ^[45].

图9 (网络版彩图)使用SHWFS和DM在单分子光开关显微镜中校正成像光波前畸变^[46]

Figure 9 (Color online) By using SHWFS and DM to compensate the imaging path aberrations in SMS microscopy ^[46].

表 2 自适应生物显微成像系统总结^{a)}
Table 2 The summary of adaptive optics biological microscopic imaging system

Microscopy type	Imaging mode	Correction path	WFS	WFC
Wide-field	WF	Em	+/-	DM/SLM
Confocal	PS	Ex, Em	+/-	DM
Two-photon	PS	Ex	+/-	DM/SLM
Three-photon	PS	Ex	-	SLM
Lightsheet	WF	Em	+/-	DM
SIM	WF	Ex, Em	-	DM
STED	PS	Ex, Em, De	-	DM/SLM
SMS	WF	Em	+/-	DM

a) WFS: wavefront sensor; WFC: wavefront corrector; WF: wide-field; PS: point scanning; +: wavefront sensor; -: wavefront sensorless; Ex: excitation path; Em: emission path; De: depletion path; DM: deformable mirror; SLM: spatial light modulator

利用率. 但是, 该方法也有两大弊端需要考虑: 一是该方法的反复迭代过程会消耗大量时间, 使得探测无法实时开展; 二是该方法的最终结果只是迭代算法的一个最优化解, 采用的迭代算法不同, 最终的解(即畸变波前的探测结果)也不同, 即使采用同一种算法, 评价标准不同最终的结果也不相同. 因此, 迭代算法虽然能够得到相对优化的成像效果, 但是无法准确测量显微系统的实际像差. 而基于波前探测器的直接探测方法虽然增加了光路复杂性, 但是能够对像差进行直接测量和客观描述, 也使得对像差的直接优化和实时处理成为可能. 因此, 随着自适应光学技术的进一步发展, 直接波前探测方法将被更多的研究者所选择, 夏克-哈特曼波前探测器也将成为自适应显微系统的重要组成部分.

在显微成像方式上, 一次性的全视场成像是研究者一直追求的效果, 也是生物显微系统发展的趋势. 然而, 自适应校正会导致高分辨率成像视场局限在一个等晕区范围内, 如何实现生物样本的一次性大视场自适应探测和校正成像成为目前自适应光学技术在生物显微系统中应用的主要困难. 为了扩大自适应校正视场, 多层共轭自适应光学方法被提出, 该方法在天文领域中的成功应用为自适应显微镜的进一步发

展提供了思路. 2015年, Mertz研究组^[49]将传统的瞳面共轭改为非瞳面共轭, 验证了非瞳面共轭在校正效果上的优越性; 同一年, Cui研究组^[50]对显微镜中多层共轭自适应光学技术进行了模拟, 同样利用非瞳面共轭使视场中不同区域、不同深度的畸变波前在探测和校正平面上近似空间可分, 从而具有分视场波前探测和校正的能力. 通过数值模拟说明了该方法能够显著提升自适应校正视场, 为该方法在大视场显微成像中的进一步应用奠定了基础.

本文所述的自适应光学技术主要针对生物组织产生的中低阶像差的校正, 没有考虑生物组织中存在的强散射效应. 生物组织的强散射会使得像差探测和组织成像对比度严重下降, 而且, 这种散射效应会随成像深度的增大而急剧增强. 为了抑制强散射效应带来的影响, 有多种聚焦技术可以实现对波前的调制, 从而将光聚焦到生物组织深处^[51]. 定量评估生物组织中强散射效应对像差探测的影响对提高自适应探测精度, 从而提高校正效果具有重要的意义^[52]. 当然, 随着自适应光学技术的不断发展, 各种新型的探测、校正和控制技术将逐渐被应用到针对活体生物组织的光学显微成像领域, 为现代生命科学研究提供更多、更有价值的生物影像资料.

参考文献

- 1 Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1369-1377
- 2 Albert O, Sherman L, Mourou G, et al. Smart microscope: An adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy. *Opt Lett*, 2000, 25: 52-54

- 3 Noll R J. Zernike polynomials and atmospheric turbulence. *J Opt Soc Am*, 1976, 66: 207–211
- 4 Török P, Varga P, Németh G. Analytical solution of the diffraction integrals and interpretation of wave-front distortion when light is focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices. *J Opt Soc Am A*, 1995, 12: 2660–2671
- 5 Booth M J, Neil M A A, Wilson T. Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media. *J Microsc*, 1998, 192: 90–98
- 6 Schwertner M, Booth M J, Neil M A A, et al. Measurement of specimen-induced aberrations of biological samples using phase stepping interferometry. *J Microsc*, 2004, 213: 11–19
- 7 Babcock H W. The possibility of astronomical seeing. *Publ Astron Soc PAC*, 1953, 65: 229–236
- 8 Cheng S Y, Cao Z L, Hu L F, et al. Measurement of wavefront aberrations of human eyes with Shack-Hartmann wavefront sensor (in Chinese). *Opt Precis Eng*, 2010, 18: 1060–1067 [程少园, 曹召良, 胡立发, 等. 用夏克-哈特曼探测器测量人眼波前像差. *光学精密工程*, 2010, 18: 1060–1067]
- 9 Tyson R K. *Adaptive Optics Progress*. InTech, Chapters published, 2012. 43–45
- 10 Hofer H, Artal P, Singer B, et al. Dynamics of the eye's wave aberration. *J Opt Soc Am A*, 2001, 18: 497–506
- 11 Wang K, Milkie D E, Saxena A, et al. Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes. *Nat Meth*, 2014, 11: 625–628
- 12 Wang K, Sun W, Richie C T, et al. Direct wavefront sensing for high-resolution in vivo imaging in scattering tissue. *Nat Commun*, 2015, 6: 7276
- 13 Rueckel M, Mack-Bucher J A, Denk W. Adaptive wavefront correction in two-photon microscopy using coherence-gated wavefront sensing. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103: 17137–17142
- 14 Jiang B G, Mu Q Q, Cao Z L, et al. Correction of turbulence in horizontal direction using a liquid crystal wave-front corrector (in Chinese). *Chin J Liq Crys Disp*, 2009, 24: 396–398 [姜宝光, 穆全全, 曹召良, 等. 液晶波前校正器校正水平方向上的大气湍流. *液晶与显示*, 2009, 24: 396–398]
- 15 Potsaid B, Bellouard Y, Wen J T. Adaptive Scanning Optical Microscope (ASOM): A multidisciplinary optical microscope design for large field of view and high resolution imaging. *Opt Express*, 2005, 13: 6504–6518
- 16 Kner P, Sedat J W, Agard D A, et al. High-resolution wide-field microscopy with adaptive optics for spherical aberration correction and motionless focusing. *J Microscopy*, 2010, 237: 136–147
- 17 Warber M, Maier S, Haist T, et al. Combination of scene-based and stochastic measurement for wide-field aberration correction in microscopic imaging. *Appl Opt*, 2010, 49: 5474–5479
- 18 Vermeulen P, Muro E, Pons T, et al. Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers. *J Biomed Opt*, 2011, 16: 076019–076019
- 19 Azucena O, Crest J, Kotadia S, et al. Adaptive optics wide-field microscopy using direct wavefront sensing. *Opt Lett*, 2011, 36: 825–827
- 20 Bourgenot C, Saunter C D, Love G D, et al. Comparison of closed loop and sensorless adaptive optics in widefield optical microscopy. *J Eur Opt Soc-Rapid*, 2013, 8: 13027
- 21 Booth M J, Neil M A A, Juskaitis R, et al. Adaptive aberration correction in a confocal microscope. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 5788–5792
- 22 Delon A, Leroux C E, Wang I, et al. Adaptive optics for fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, 2012, 102: 420A
- 23 Leroux C E, Grichine A, Wang I, et al. Correction of cell-induced optical aberrations in a fluorescence fluctuation microscope. *Opt Lett*, 2013, 38: 2401–2403
- 24 Tao X, Azucena O, Fu M, et al. Adaptive optics microscopy with direct wavefront sensing using fluorescent protein guide stars. *Opt Lett*, 2011, 36: 3389–3391
- 25 Tao X, Fernandez B, Azucena O, et al. Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing. *Opt Lett*, 2011, 36: 1062–1064
- 26 Tao X, Crest J, Kotadia S, et al. Live imaging using adaptive optics with fluorescent protein guide-stars. *Opt Express*, 2012, 20: 15969–15982
- 27 Tao X, Azucena O, Kubby J. Non-iterative adaptive optical microscopy using wavefront sensing. In: *Proceedings of Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers*. San Francisco, 2016. 971805
- 28 Débarre D, Botcherby E J, Watanabe T, et al. Image-based adaptive optics for two-photon microscopy. *Opt Lett*, 2009, 34: 2495–2497
- 29 Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues. *Nat Meth*, 2010, 7: 141–147
- 30 Ji N, Sato T R, Betzig E. Characterization and adaptive optical correction of aberrations during in vivo imaging in the mouse cortex. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109: 22–27
- 31 Tang J, Germain R N, Cui M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109: 8434–8439
- 32 Cha J W, Ballesta J, So P T C. Shack-Hartmann wavefront-sensor-based adaptive optics system for multiphoton microscopy. *J Biomed Opt*, 2010, 15: 046022

- 33 Tao X, Norton A, Kissel M, et al. Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars. [Opt Lett](#), 2013, 38: 5075–5078
- 34 Tao X D, Norton A, Kissel M, et al. Adaptive optics two photon microscopy with direct wavefront sensing using autofluorescent guide-stars. In: Proceedings of Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers. San Francisco, 2014. 89780D
- 35 Reinig M R, Novack S W, Tao X D, et al. Adaptive optics microscopy enhances image quality in deep layers of CLARITY processed brains of YFP-H mice. In: Proceedings of Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers. San Francisco, 2016. 969008
- 36 Sinefeld D, Paudel H P, Ouzounov D G, et al. Adaptive optics in multiphoton microscopy: Comparison of two, three and four photon fluorescence. [Opt Express](#), 2015, 23: 31472–31483
- 37 Bourgenot C, Saunter C D, Taylor J M, et al. 3D adaptive optics in a light sheet microscope. [Opt Express](#), 2012, 20: 13252–13261
- 38 Jorand R, Le Corre G, Andilla J, et al. Deep and clear optical imaging of thick inhomogeneous samples. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e35795
- 39 Hoda Moosavi S, Gohn-Kreuz C, Rohrbach A. Feedback phase correction of Bessel beams in confocal line light-sheet microscopy: A simulation study. [Appl Opt](#), 2013, 52: 5835–5842
- 40 Truong T V, Supatto W, Koos D S, et al. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. [Nat Meth](#), 2011, 8: 757–760
- 41 Zong W, Zhao J, Chen X, et al. Large-field high-resolution two-photon digital scanned light-sheet microscopy. [Cell Res](#), 2015, 25: 254–257
- 42 Débarre D, Botcherby E J, Booth M J, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy. [Opt Express](#), 2008, 16: 9290–9305
- 43 Gould T J, Burke D, Bewersdorf J, et al. Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens. [Opt Express](#), 2012, 20: 20998–21009
- 44 Gould T J, Kromann E B, Burke D, et al. Auto-aligning stimulated emission depletion microscope using adaptive optics. [Opt Lett](#), 2013, 38: 1860–1862
- 45 Patton B R, Burke D, Oswald D, et al. Three-dimensional STED microscopy of aberrating tissue using dual adaptive optics. [Opt Express](#), 2016, 24: 8862–8876
- 46 Izeddin I, El Beheiry M, Andilla J, et al. PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking. [Opt Express](#), 2012, 20: 4957–4967
- 47 Burke D, Patton B, Huang F, et al. Adaptive optics correction of specimen-induced aberrations in single-molecule switching microscopy. [Optica](#), 2015, 2: 177–185
- 48 Mao H, Tao L, Chen L Y. Application and development of adaptive optics to three-dimensional in vivo deep tissue fluorescent microscopy (in Chinese). [Infrared Laser Eng](#), 2016, 45: 0602001 [毛珩, Tao Louis, 陈良怡. 自适应光学技术在深层动态荧光显微成像中的应用和发展. 红外与激光工程, 2016, 45: 0602001]
- 49 Mertz J, Paudel H, Bifano T G. Field of view advantage of conjugate adaptive optics in microscopy applications. [Appl Opt](#), 2015, 54: 3498, arXiv: [1501.02685](#)
- 50 Wu T, Cui M. Numerical study of multi-conjugate large area wavefront correction for deep tissue microscopy. [Opt Express](#), 2015, 23: 7463–7470
- 51 Yang Q, Cao L C, Jin G P. Progress in optical focusing techniques aiming to suppress scattering effect in biomedical tissues (in Chinese). [Chin J Laser](#), 2015, 42: 0901001 [杨强, 曹良才, 金国藩. 可抑制生物组织散射效应的光学聚焦技术研究进展. 中国激光, 2015, 42: 0901001]
- 52 Booth M J. Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image. [Light Sci Appl](#), 2014, 3: e165

Application of adaptive optics in biological fluorescent microscopy

ZHANG CaiHua^{1,2}, ZHAO ZhiWei^{1,2}, CHEN LiangYi³, CAO ZhaoLiang^{1*} & MAO Heng^{4*}

¹ State Key Lab of Applied Optics, Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China;

⁴ Key Lab of Mathematics and Applied Mathematics, School of Mathematical Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

Microscopy is an essential means for the Life Sciences research under the sub-micron scale. Because of the advantage in specific marking, dynamic indication, high contrast and non-destructive style, the biological fluorescence microscopy plays an important role in *in-vivo* imaging. When propagating in the non-transparent, non-homogeneous, anisotropic biological tissue, the excitation and emission light both will be distorted by refraction, scattering, absorption and other unknown effects and the point spread function (PSF) in each path will be consequently degraded. In order to improve the spatial resolution of fluorescence microscopy and increase the imaging depth, the adaptive optical technology has been employed in the microscope system to detect and correct the above aberrations in real-time. In this paper, aberrations in fluorescence microscope have been specified in different sources, both aberration sensing and correction methods have been introduced, and the characteristics of aberration correction in different imaging modes of fluorescence microscopy have been summarized. Then the latest applications of adaptive optics in different types of fluorescence microscopy have been discussed here and the further development trend is concluded.

***in-vivo* imaging, fluorescence microscopy, adaptive optics, wavefront aberration, wavefront correction**

PACS: 87.85.Pq, 87.64.M-, 87.64.mk, 87.64.mn, 87.64.kv, 95.75.Qr

doi: [10.1360/SSPMA2016-00506](https://doi.org/10.1360/SSPMA2016-00506)