

利用波前调制技术提升光透明样品的双光子成像分辨率

高玉峰¹, 夏先园², 李 慧², 郑 炜²

¹哈尔滨工业大学深圳研究生院电子与信息工程学院, 广东 深圳 518055;

²中国科学院深圳先进技术研究院生物医学光学与分子影像研究室, 广东 深圳 518055

摘要 组织光透明技术结合双光子显微成像(TPM)技术能够有效提升生物样品的显微成像深度,然而现有的光透明剂与常用显微物镜的浸润介质折射率并不匹配,会引入球差从而降低深层组织成像的荧光强度和分辨率。针对该问题分析了球差对 TPM 荧光强度和分辨率的影响,建立了由物镜特性(数值孔径和浸润介质)、聚焦深度和物体折射率等参数构成的球差补偿模型,进而指导空间光调制器进行球差补偿。对荧光小球仿体样品和光透明脑组织样品的双光子成像结果显示,该球差补偿方法能显著提升样品信号量和系统纵向分辨率。另外,该方法在校正过程中无需多次成像,操作简单且耗时短,对光透明剂和显微物镜无特殊要求,具有较强的通用性。

关键词 生物光学; 双光子显微成像; 自适应光学技术; 组织光透明技术; 像差校正

中图分类号 O435

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201744.0107002

Wavefront Modulation Improves Two-Photon Microscopy Resolution of Clearing Tissues

Gao Yufeng¹, Xia Xianyuan², Li Hui², Zheng Wei²

¹School of Electronic and Information Engineering, Harbin Institute of Technology Shenzhen Graduate School, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

²Research Laboratory for Biomedical Optics and Molecular Imaging, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong 518055, China

Abstract Tissue optical clearing technique combined with two-photon microscopy (TPM) can improve the imaging depth of biological samples. However, the refractive index mismatch between objective medium and optical clearing agent will cause spherical aberration which degrades the fluorescence intensity and axial resolution. To solve this problem, we analyzed the effect of SA at the focus, and built a spherical aberration compensation model based on objective characteristics (numerical aperture and immersion media), the imaging depth and the sample refractive index. Then, we corrected the spherical aberration by incorporating a spatial light modulator into the TPM system. The TPM images of fluorescent bead phantom and optical clearing brain tissues show considerable improvement of fluorescence intensity and axial resolution. The proposed correction process is simple and fast since it does not require repeated imaging. More importantly, it is suitable for different objectives and optical clearing agents.

Key words biotechnology; two-photon microscopy; adaptive optics; tissue optical clearing; aberration compensation

OCIS codes 170.4090; 170.3880; 220.1000; 330.6130

收稿日期: 2016-08-22; 收到修改稿日期: 2016-09-23

基金项目: 国家自然科学基金(81471702)、深圳市科技创新委员会项目(KQCX20120816155352228, JCYJ20140610153345808)

作者简介: 高玉峰(1992—),男,硕士研究生,主要从事双光子显微系统方面的研究。E-mail: gaoyufenghit@126.com

导师简介: 郑 炜(1980—),男,博士,副研究员,主要从事生物医学光子学,荧光多参量显微成像技术及应用,非线性光学显微技术及应用等方面的研究。E-mail: zhengwei@siat.ac.cn(通信联系人)

1 引 言

组织光透明技术是近年来新兴的生物样品处理技术,它通过采用特定的化学试剂(或物理方法)使生物组织折射率均一化,从而变得透明。组织光透明技术能极大地增加光在生物组织内的穿透深度,降低散射,从而提高光学成像系统尤其是显微成像系统的图像质量^[1]。至今,已有包括 BABB^[2]、Scale^[3]、SeeDB^[4]、ClearT^[5]、CUBIC^[6]、CLARITY^[7]和 PACT^[8]在内的一系列技术陆续开发出来^[9],且成功应用于皮肤组织^[10-11]、骨组织^[12]、脑组织^[6]甚至整只小鼠^[13]的光学成像,这使得光透明技术成为目前生物光学领域的研究热点之一。

双光子显微成像技术与组织光透明相结合能够显著提高生物样品显微成像的探测深度和成像质量。双光子成像是基于光与生物组织的非线性效应建立的,具有分辨率高、探测深度大、生物毒性小等优点,并且可以实现基于光学层析的三维成像功能,目前可以观察到深度在 500 μm 以上的生物组织结构^[14]。但是,由于生物样品的高散射特性,在对样品进行深层成像时,无论是分辨率还是信噪比都会显著下降。组织光透明技术可以有效降低生物组织的散射特性,借助该技术,双光子显微成像技术有望观测到深度在 1 mm 以上的亚细胞结构^[15-16]。

然而,已报道的透明剂的折射率从 1.43 到 1.56 不等^[17],与目前常用的显微物镜浸润介质的折射率并不匹配。光学理论已经证明,折射率不匹配会导致球差(SA),使得焦点光强和轴向分辨率随聚焦深度增加而下降。为了降低球差的影响,奥林巴斯公司和莱卡公司分别专门开发了 XLSLPLN25XSVM 和 HCX Apo L20 \times 两款物镜,但这两款物镜不仅价格高,而且只分别针对 FocusClear 和 BABB 两种透明剂,通用性较差。考虑到目前已有十几种不同折射率的组织光透明剂配方,并且这个数目还在持续上升中,发展一种通用的折射率不匹配补偿方法无论是对组织光透明剂的研发还是对光透明样品的双光子显微成像研究都具有重要意义。

自适应光学(AO)技术可以比较灵活地补偿各种像差,它通过在光路中引入空间光调制器或变形镜来精确控制光束的波前,从而达到相位补偿的目的。依据对波前相位的探测方式,目前的自适应光学技术大体可分为直接探测和间接探测两大类。直接探测指在光路中增加相位探测器件如 Shack-Hartmann 探测器、干涉型相位探测器等来直接测量点状样品的波前相位,通过实际测量的相位畸变情况来指导相位补偿。代表性研究包括美国加州大学 Tao 等^[18]利用荧光蛋白作为点样品测量相位,美国霍华德休斯医院 Betzig 等利用双光子焦点荧光作为点样品测量相位^[19]。直接探测方式具有速度快、补偿精确的优点,但是额外增加的相位探测装置会使系统复杂化,同时损失信号强度。间接探测无需测量波前相位,通过人为引入不同种预设相位,由实际采得的信号来反推出相位畸变情况从而进行补偿^[20]。代表性研究包括英国牛津大学 Booth 提出的图像迭代法^[21]和 Wang 等^[22-23]提出的孔径迭代法。该类方法需要多次迭代补偿,比较耗时。这两类自适应光学技术虽然能够很好地补偿各类像差甚至是高阶像差,但是对于以球差为主要畸变的光学系统相位补偿而言,其补偿过程步骤繁琐,成像速度慢。

针对光透明剂和显微物镜因折射率不匹配而引起的球差问题,本文建立了由物镜特性(数值孔径和浸润介质)、聚焦深度和样品折射率等参数构成的球差补偿模型,由该模型计算出系统球差后指导空间光调制器进行相位补偿。从对荧光小球仿体和光透明后的脑组织样品的成像实验中发现,该方法能够显著提升成像深度和分辨率,并且系统简单、校正过程快、无需多次成像,减少了光损伤和光漂白。此外该方法对光透明剂和显微物镜无特殊要求,易于移植到现有双光子显微镜中开展光透明样品的双光子成像研究。

2 材 料 和 方 法

2.1 折射率不匹配引起球差的数学模型

为了简化球差模型,将样品看作折射率均匀的介质,此时波前畸变的来源是物镜浸润介质(如空气、水、油)折射率 n_1 和样品的折射率 n_2 不匹配。如图 1 所示,进入样品的激发光在 n_1 和 n_2 相等的情况下聚焦于 O_1 ,这时有良好的横向和纵向分辨率,但是当 n_2 大于 n_1 时,近轴光线聚焦在离分界面近的地方,远轴光线聚焦在远离分界面的地方,导致聚焦的光斑纵向分辨率下降,成像效果变差。这类折射率不匹配导致的球

差,与数值孔径 NA , 聚焦深度 d 正相关,可表达为^[24-25]

$$\Phi(\rho) = -\frac{2\pi d}{\lambda} [(1+\alpha) \sqrt{n_2^2 - (NA \cdot \rho)^2} - \sqrt{n_1^2 - (NA \cdot \rho)^2}], \quad (1)$$

式中 ρ 表示归一化的径向变量, d 为折射率匹配时 ($n_1 = n_2$) 的成像深度, NA 是数值孔径, $(1+\alpha)d$ 为折射率不匹配 ($n_1 < n_2$) 时的成像深度。 $1+\alpha$ 为折射率不匹配时聚焦深度与匹配时聚焦深度的比值, 调节 α 不影响焦点的聚焦效果。 图 1(b) 为根据上述公式计算出的相位图 ($d = 200 \text{ mm}$, $n_1 = 1$, $n_2 = 1.43$)。 为了更直观地显示折射率不匹配对焦点光场的影响, 模拟了球差对焦点附近光场的影响^[26-28]。 当 $n_1 = n_2$ 时, 激发光能很好地聚焦在一点, 如图 1(c) 所示; 当 $n_2 = 1.43$, $n_1 = 1$ 时, 光场如图 1(d) 所示, 受折射率不匹配的影响, 焦点移动到原位置下方 70 mm 处, 最大光强明显下降, 光斑弥散, 纵向旁瓣增加。 根据以上理论可知, 折射率不匹配会使系统焦点光强和分辨率下降, 制约双光子系统的成像深度和层析能力。

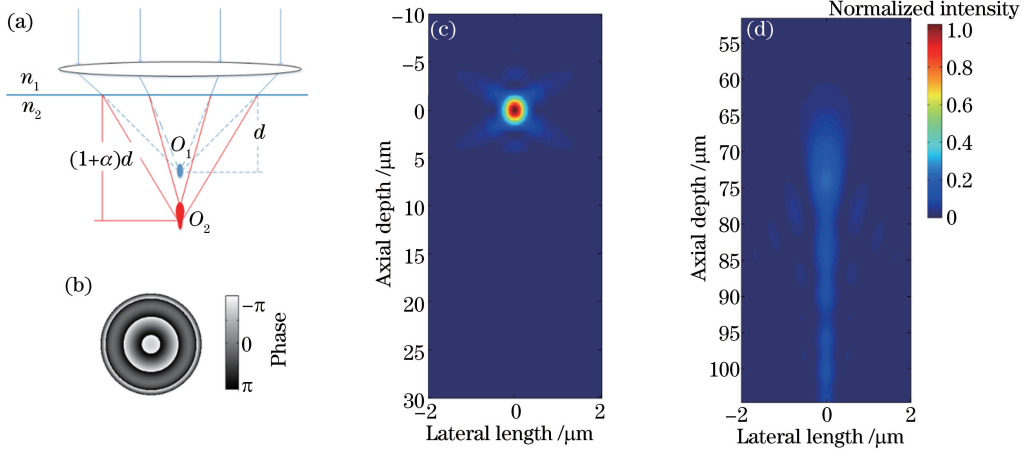


图 1 物镜与样品折射率不匹配对成像的影响。(a) 折射率不匹配引起的光线偏折; (b) 折射率不匹配 ($d = 200 \text{ mm}$, $NA = 0.75$) 引起的相位畸变模拟; (c) O_1 点光场图; (d) O_2 点的光场图

Fig. 1 Pattern of aberration caused by refractive index mismatch. (a) Schematic of refraction between two types of media; (b) phase simulation of wavefront with spherical aberration caused by refractive index mismatch ($d = 200 \text{ mm}$, $NA = 0.75$); (c) intensity distribution of light at O_1 ; (d) intensity distribution of light at O_2 .

2.2 双光子显微成像系统搭建

搭建的自适应双光子显微成像系统如图 2 所示。光源为被动锁模的蓝宝石飞秒激光器 (Chameleon Ultra, Coherent 公司), 激光器出射的光经透镜组准直扩束后得到直径约为 3 mm 的平行光照射在检流计扫描振镜 (Model 6210, Cambridge 公司) 上, 进行二维扫描。振镜扫描光经过一组中继透镜 (焦距 $f_1 = 40 \text{ mm}$, $f_2 = 150 \text{ mm}$) 后共轭成像到液晶空间光调制器 (SLM, Pluto NIR 2, Holoeye 公司), 由空间光调制

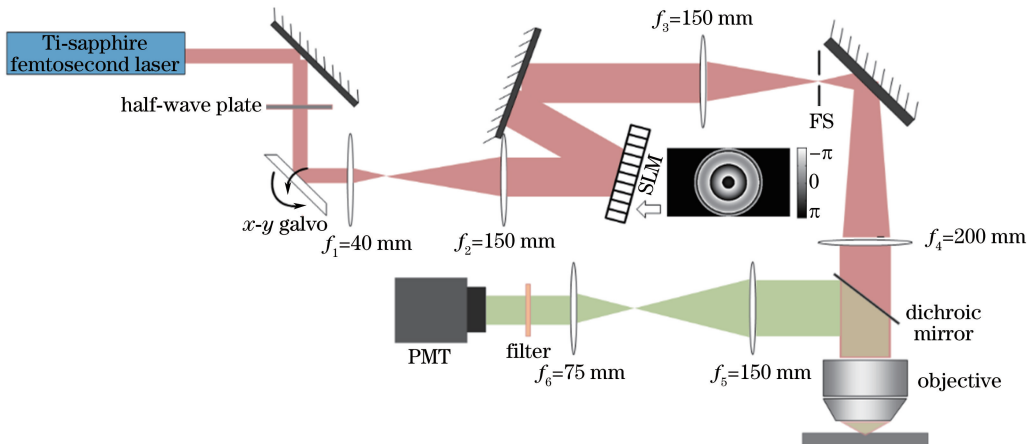


图 2 自适应双光子显微成像系统示意图

Fig. 2 Schematic of AO TPM system.

器调节波前相位,空间光调制器经过透镜组(焦距 $f_3 = 150$ mm, $f_4 = 200$ mm)与二色镜(FF665-Di02-25 \times 36, Semrock 公司)后共轭成像到显微物镜(UPLSAPO, 20 \times , $NA = 0.75$, Olympus 公司)的后焦面上,由显微物镜聚焦激发双光子荧光。样品激发出的双光子荧光由同一物镜背向收集,信号光与激发光在二色镜处分离,信号光经收集透镜(焦距 $f_5 = 150$ mm, $f_6 = 75$ mm)会聚后被光电倍增管(PMTH, 10722, Hamamatsu 公司)接收。为了彻底滤除残留的激发光, PMT 前放置短通滤光片(FES0650, Thorlabs 公司)。

由于液晶 SLM 只能调制单一方向的偏振光,所以在 SLM 前加 1/2 玻片(WPH05M-830, Thorlabs 公司)对偏振方向进行旋转(激光器的出射光具有很好的偏振性)。为了避免 SLM 衍射光进入光路,实验中还需用孔径光阑(FS)滤除 SLM 其他级次的衍射光。同时为了保证相位调制的有效性,系统通过 4*f* 系统使扫描振镜、SLM 反射面、物镜后背孔径和 PMT 靶面两两共轭。由于 SLM 的分辨率有限,不能加载过密的相位图,实验中需调节(1)式中的 α 参数,使相位图平缓变化。

2.3 实验样品制备

荧光小球仿体样品的制备:实验采用嵌于聚丙烯酰胺凝胶中的荧光小球作为仿体样品。首先将荧光小球溶液(F8803, Thermo Fisher 公司)稀释 500 倍,然后取丙烯酰胺 300 mL、稀释后的荧光小球水溶液 300 mL、质量分数为 10% 过硫酸铵 30 mL 混匀,最后加入 3 mL 四甲基乙二胺,快速混匀后滴加至载玻片,待凝固后使用。

透明小鼠脑片的制备:Thy1-GFP 小鼠麻醉后,心脏灌注 0.01 mol/L 磷酸缓冲溶液和 4% 全氟烷氧基树脂。小鼠死亡后取下整脑放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱经全氟烷氧基树脂固定过夜。光透明前,脑组织经磷酸缓冲溶液清洗 3 次,将整脑放入脑模具中用刀片沿冠状面切成 500 mm 或 1 mm 厚度切片用于后续透明。组织光透明剂选用 CUBIC 方案^[6],按文献中所述配方配制好后室温保存。组织光透明时,脑片放入透明剂 8 min,用于双光子显微成像。

实验涉及的动物实验方案经中国科学院深圳先进技术研究院实验动物伦理委员会审核,均符合实验动物福利伦理规范要求(受理号:SIAT-IRB-160223-YGS-ZHENGW-A0188)。

3 实验结果与分析

为了验证本文方法对球差的补偿效果,首先对荧光小球仿体开展双光子显微成像实验。选用直径为 0.1 mm 的荧光小球作为目标样品是因为该直径小于系统的理论分辨率 0.48 mm,常被用于测量系统分辨率。选用聚丙烯酰胺凝胶(折射率约为 1.43)作为样品载体是因为该凝胶折射率均匀,散射和吸收系数较小,其与显微物镜(折射率为 1.0)间的折射率不匹配会引起球差,从而影响成像效果。

图 3 所示为荧光小球仿体双光子显微成像的侧向投影图。可以看出,在不校正球差的情况下,小球亮度随成像深度的增加而急剧下降,同时小球的纵向长度(即系统纵向分辨率)也随深度逐渐拉长[图 3(a)]。与之相比,位于同一深度的荧光小球经球差校正之后荧光强度变强,纵向长度缩短[图 3(b)]。图 3(e)、(f)为探测深度在 200 mm 和 450 mm 处对应区域的放大图像。随机选择其中 10 个小球的荧光图像进行对比,发现在 450 mm 处,校正球差后的荧光强度是未校正球差时的 3.02 ± 0.40 倍,校正球差后的小球纵向长度是未校正时的 $35\% \pm 3\%$ 。需要说明的是,由于球差校正能够使焦点沿光轴方向向上偏移(具体参见 2.1 节),因而图 3(e)比图 3(d)对应的纵向位置偏上。

为了进一步研究球差校正对系统分辨率的影响,选取 500 mm 深度处的同一荧光小球进行比较。图 4(a)是球差校正前后小球在 xy 和 xz 方向的强度分布。从图 4(a)左图可以看出,受折射率不匹配影响, xz 方向的光斑有分瓣现象,这与 2.1 节的光场模拟结果类似。考虑到双光子成像对纵向信号仅是简单累加,并没有共聚焦成像的小孔滤波功能,激发光的纵向旁瓣对双光子成像效果会有较大影响,因此选取焦点功率 30% 处的纵向距离作为纵向分辨率来进行对比。在深度为 500 mm 处[图 4(b)、(c)],校正球差后的荧光强度是校正前的 2.7 倍,同时,横向分辨率从原来的 0.83 mm 提升到 0.67 mm,纵向分辨率从原来的 20.92 mm 提升到 6.91 mm。这些结果表明,校正折射率不匹配引起的球差能够提升系统的信号量和分辨率。特别是对于深层荧光小球成像而言,图像质量得到显著提升。

此外,为了比较不同深度球差校正对分辨率的影响,统计了每一个深度的小球校正前后分辨率变化的情

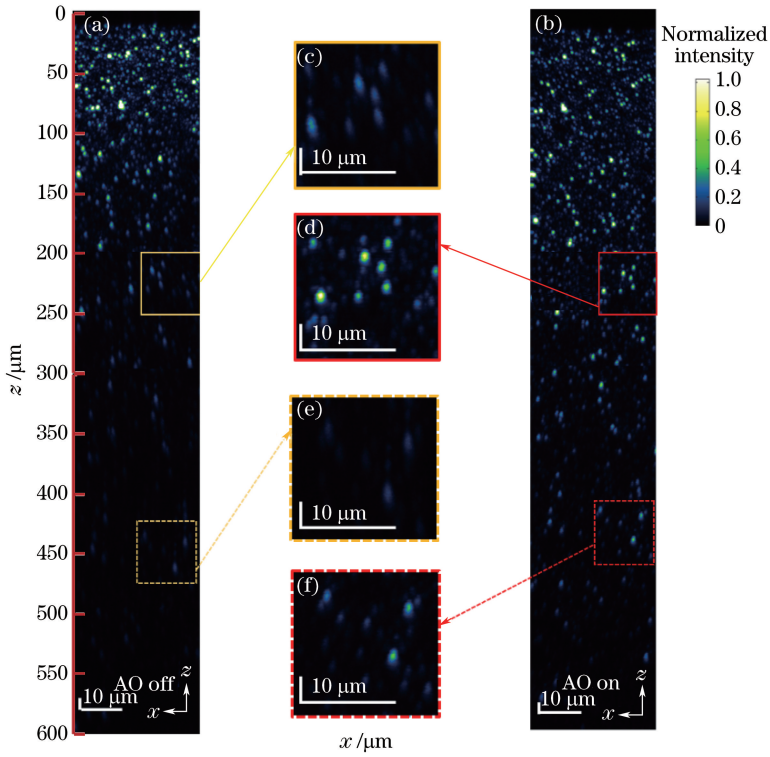


图 3 直径 0.1 mm 荧光小球在球差校正前后的双光子显微成像对比。(a) 未经过球差校正的 xz 方向最大强度投影图；(b) 经过球差校正的 xz 方向最大强度投影图；(c)~(f) 图 3(a)、(b) 中对应区域放大

Fig. 3 TPM images of fluorescent beads in polyacrylamide gel with or without SA correction. (a) xz maximum intensity projection (MIP) image without SA correction; (b) xz MIP image with SA correction; (c)-(f) magnified images corresponding to Fig. 3(a) and 3(b)

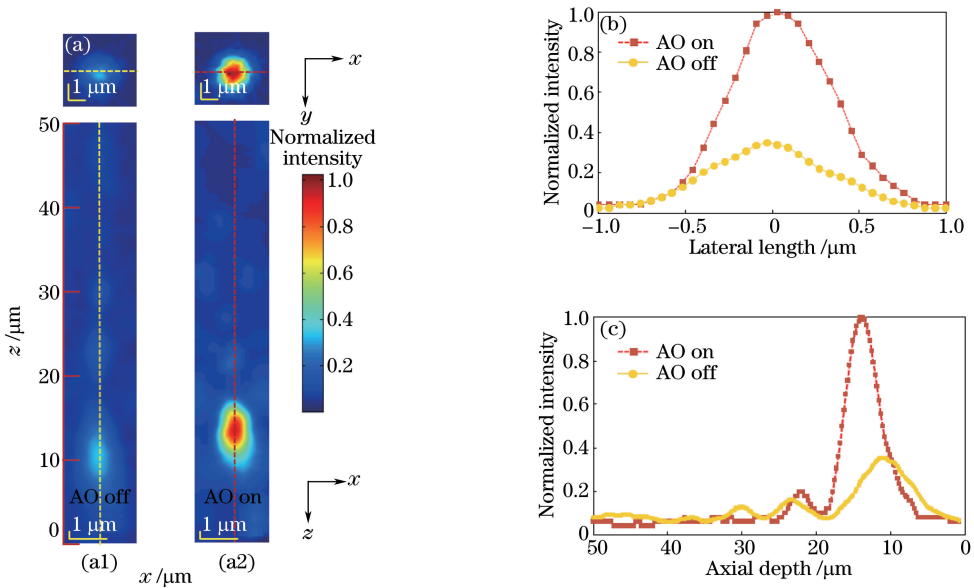


图 4 在 500 μm 深处球差校正前后的系统分辨率比较。(a)球差校正(a1)前(a2)后直径为 0.1 mm 荧光小球横向(上)和纵向(下)光强分布图；(b) 图 4(a) 中标线处的横向光强分布；(c) 图 4(a) 标线处的轴向光强分布

Fig. 4 System resolution at the depth of 500 μm with or without SA correction. (a) Lateral (top) and axial (bottom) views of 0.1 mm fluorescent bead (a2) with and (a1) without SA correction; (b) lateral and (c) axial line profiles as indicated in Fig. 4(a) show the improvement of resolution with SA correction

况并与理论仿真结果进行了对比,如图 5 所示。其中,浅绿色和暗红色点分别是校正前后系统轴向分辨率随探测深度的变化情况。可以看出球差校正后的轴向分辨率有很大提高,并且该分辨率随着深度的增加基本

保持稳定。蓝色虚线是根据实验参数模拟的轴向分辨率变化情况,与实验结果对比可以看出,实验和理论在 100~300 mm 处契合得较好,在 300~600 mm 处实验分辨率分布离散,偏差稍大,可能是因为该深度荧光光强减弱,信噪比变差所致。另外理论曲线分辨率随深度波动的原因是,球差随深度变大的过程中,焦点处的光会出现分瓣现象^[26-28],逐渐分开过程中焦点的纵向分辨率会变大,完全分开成为两个单独的瓣后,纵向分辨率又会变小。校正后各深度荧光光强和纵向分辨率的提高率如图 5(b)所示,可以看出球差校正能有效提高系统的分辨率和双光子荧光信号量。

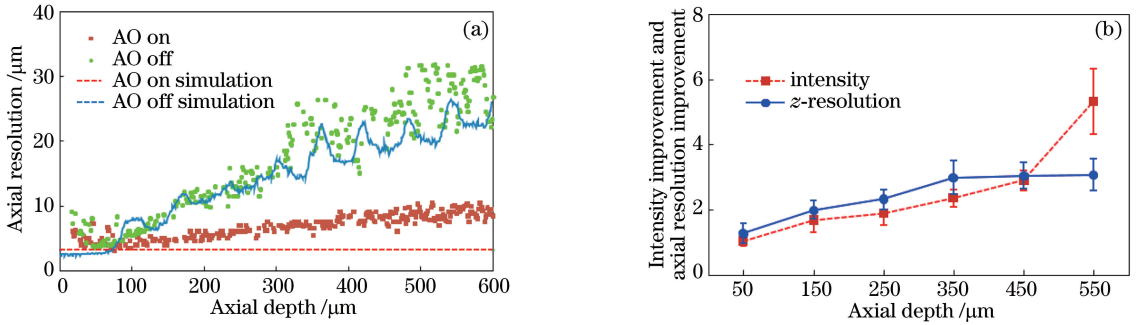


图 5 不同样品深度的轴向分辨率与荧光强度比较。(a) 轴向分辨率随成像深度的变化;
(b) 球差校正对荧光强度和轴向分辨率的提高

Fig. 5 AO improves the axial resolution and fluorescence intensity at different depth. (a) Axial resolution at different depth with or without SA correction; (b) statistical results of fluorescence intensity improvement and axial resolution improvement at different depth

为了验证上述方法能改善光透明样品的双光子成像效果,并且证明该方法具有一定的通用性,选用较常用的 CUBIC 透明剂($n=1.45$)来处理 Thy1-GFP 小鼠的脑组织,同时选取了常用的 Olympus 20×空气镜作为成像物镜。球差校正前后的侧向最大强度投影图见图 6(a)、(b)。图中荧光信号来自神经元的绿色荧光蛋白。可以看出,利用本文方法校正球差之后,荧光强度有了很大提升,在相同激发条件下能够获得更多的细节信息。对比在 200 mm 深度处校正前后的成像结果[图 6(c)、(d)],球差校正后的荧光信号强度是校正前的 1.6 倍,同时校正后的图像能够清晰地展示出轴突的细节。图 5(e)是图 5(a)、(b)中参考线的强度分布,校正后荧光强度在 180 mm 处为校正前的 2.5 倍。同时,从图中可以看出,在未作球差校正的图像中,神经元胞体有很长的拖尾现象,但是在校正之后拖尾变短。这说明球差校正后,系统的纵向分辨率得到了提高从而使得双光子的层析能力变强。另外,荧光强度的提高意味着可以采用更低的激发功率进行成像,这能够有效降低光漂白与光损伤对生物样品的影响。

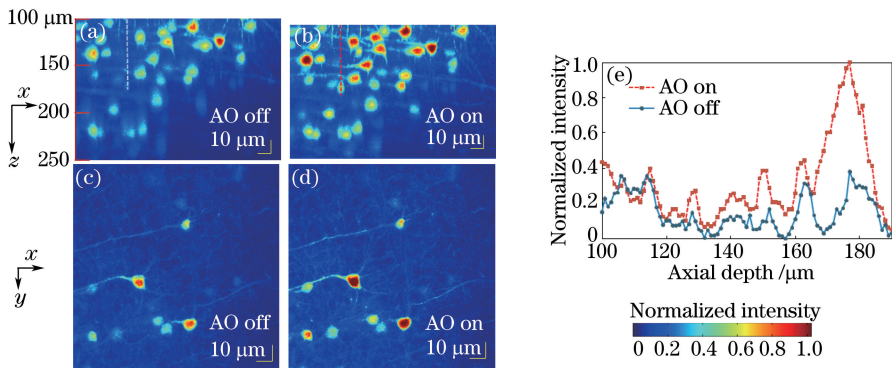


图 6 经光透明处理的 Thy1-GFP 小鼠脑组织在球差补偿前后的双光子成像对比。(a) 无校正和 (b) 有校正的 xz 投影图。
190 mm 深处 (c) 无校正和 (d) 有校正的 xy 截面图。(e) 图 6(a)、(b) 中 100~180 mm 标线处的强度分布图
Fig. 6 Two-photon microscopic images of clearing Thy1-GFP mouse brain tissue. xz maximum intensity projection images
(b) with and (a) without SA correction; xy images (d) with and (c) without SA correction at measurement depth of
190 mm below the surface; (e) intensity line profiles as indicated in Figs. 6(a) and 6(b)

需要指出的是,实验中发现对光透明生物样品进行球差校正后,图像质量的提升没有荧光小球的结果明显。这是因为生物组织虽然经过了光透明处理,但仍无法保证其折射率的均匀性,而目前的数学模型把样品当作折射率均匀的物体来处理。这种理论与实际的不匹配会降低球差校正的效果,但仍然获得了比较明显的分辨率和信号强度的提升。后续研究中将建立样品折射率随空间变化的数学模型,可进一步提升校正效果。

4 结 论

探索了一种快速便捷的球差补偿方法,以解决组织光透明剂与常用显微物镜折射率不匹配问题,从而提高光透明样品的双光子显微成像效果。根据物镜参数、聚焦深度和样品参数折射率建立了相应的数学模型,并利用该模型指导空间光调制器进行相位调节。仿体实验表明,该方法可使荧光强度和纵向分辨率显著提升。对经组织光透明处理过的 Thy1-GFP 小鼠脑片成像显示,球差校正后的图像能很好地区分出不同深度的信号,有效地减小了折射率不匹配而导致的纵向分辨率下降的问题,同时使荧光信号强度得到提升。本文所提出的方法在校正过程中无需多次成像作为反馈,适用于任何一款双光子显微镜,相比前人的工作,该方法具有更大的灵活性和便捷性。

参 考 文 献

- [1] Zhu D, Larin K V, Luo Q, *et al.* Recent progress in tissue optical clearing[J]. *Laser and Photonics Reviews*, 2013, 7(5): 732-757.
- [2] Dodt H U, Leischner U, Schierloh A, *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(4): 331-336.
- [3] Hama H, Kurokawa H, Kawano H, *et al.* Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain[J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14(11): 1481-1488.
- [4] Ke M T, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction[J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16(8): 1154-1161.
- [5] Kuwajima T, Sitko A A, Bhansali P, *et al.* ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue[J]. *Development*, 2013, 140(6): 1364-1368.
- [6] Susaki E A, Tainaka K, Perrin D, *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis[J]. *Cell*, 2014, 157(3): 726-739.
- [7] Chung K, Wallace J, Kim S Y, *et al.* Structural and molecular interrogation of intact biological systems[J]. *Nature*, 2013, 497(7449): 332-337.
- [8] Yang B, Treweek J B, Kulkarni R P, *et al.* Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing[J]. *Cell*, 2014, 158(4): 945-958.
- [9] Xu Xiangqun, Wu Liu, Dependence of optical clearing effect on tissue structure[J]. *Chinese J Lasers*, 2006, 33(7): 998-1002.
徐向群, 吴 柳. 不同结构生物组织光透明作用比较[J]. *中国激光*, 2006, 33(7): 998-1002.
- [10] Xu X, Sun C. Ultrasound enhanced skin optical clearing: microstructural changes[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2010, 3(3): 189-194.
- [11] Cen Jian, Zhu Dan, Luo Qingming, *et al.* Monitoring osmotic agents induced the change in optical properties of mouse skin[J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, 24(7): 873-876.
岑 建, 朱 丹, 骆清铭, 等. 渗透剂对小鼠皮肤光学特性影响的实时动态监测[J]. *光学学报*, 2004, 24(7): 873-876.
- [12] Genina E A, Bashkatov A N, Tuchin V V. Optical clearing of cranial bone[J]. *Advances in Optical Technologies*, 2008, 2008: 267867.
- [13] Tainaka K, Kubota S I, Suyama T Q, *et al.* Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization [J]. *Cell*, 2014, 159(4): 911-924.
- [14] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [15] Olson E, Levene M J, Torres R. Multiphoton microscopy with clearing for three dimensional histology of kidney biopsies[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(8): 3089-3096.
- [16] Costantini I, Ghobril J P, Di Giovanna A P, *et al.* A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging [J].

- Scientific Reports, 2015, 5: 9808.
- [17] Hama H, Hioki H, Namiki K, *et al.* ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging [J]. Nature Neuroscience, 2015, 18(10): 1518-1529.
- [18] Tao X D, Crest J, Kotadia S, *et al.* Live imaging using adaptive optics with fluorescent protein guide-stars[J]. Optics Express, 2012, 20(14): 15969-15982.
- [19] Wang K, Sun W, Richie C T, *et al.* Direct wavefront sensing for high-resolution *in vivo* imaging in scattering tissue [J]. Nature Communications, 2015, 6: 7276.
- [20] Yang Ping, Ao Mingwu, Liu Yuan, *et al.* Adaptive optics genetic algorithm based on Zernike mode coefficients[J]. Chinese J Lasers, 2008, 35(3): 367-372.
杨 平, 敖明武, 刘 渊, 等. 基于泽尼克模式系数的自适应光学遗传算法[J]. 中国激光, 2008, 35(3): 367-372.
- [21] Débarre D, Botcherby E J, Watanabe T, *et al.* Image-based adaptive optics for two-photon microscopy[J]. Optics Letters, 2009, 34(16): 2495-2497.
- [22] Wang C, Liu R, Milkie D E, *et al.* Multiplexed aberration measurement for deep tissue imaging *in vivo*[J]. Nature Methods, 2014, 11(10): 1037-1040.
- [23] Park J H, Sun W, Cui M. High-resolution *in vivo* imaging of mouse brain through the intact skull[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(30): 9236-9241.
- [24] Matsumoto N, Inoue T, Matsumoto A, *et al.* Correction of depth-induced spherical aberration for deep observation using two-photon excitation fluorescence microscopy with spatial light modulator[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(7): 2575-2587.
- [25] Salter P S, Baum M, Alexeev I, *et al.* Exploring the depth range for three-dimensional laser machining with aberration correction[J]. Optics Express, 2014, 22(15): 17644-17656.
- [26] Török P, Varga P, Booker G R. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field. I[J]. Journal of the Optical Society of America A, 1995, 12(10): 2136-2144.
- [27] Török P, Varga P, Konkol A, *et al.* Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field. II[J]. Journal of the Optical Society of America A, 1996, 13(11): 2232-2238.
- [28] Török P, Varga P, Laczik Z, *et al.* Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation[J]. Journal of the Optical Society of America A, 1995, 12(2): 325-332.