

## 自适应光学在双光子显微成像技术中的应用

章辰<sup>1</sup>, 高玉峰<sup>2</sup>, 叶世蔚<sup>2</sup>, 李慧<sup>2</sup>, 郑炜<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>深圳信息职业技术学院信息与通信学院, 广东 深圳 518172;

<sup>2</sup>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中心, 广东 深圳 518055

**摘要** 光学显微镜是生物医学研究必不可少的工具,其中双光子显微成像技术具有大深度三维显微成像功能,被认为是深层生物组织研究的首选工具。但是,在双光子成像系统使用过程中,光学系统的装配偏差、光学元件不理想以及生物样品的不均匀性都会在成像过程中引入像差,从而降低成像质量。通过在双光子显微成像系统中引入自适应光学技术,可实现对像差的有效校正,从而提高成像的分辨率、深度和视场。介绍了双光子显微成像中的像差来源和特点,概述了自适应光学技术中不同的探测和校正方法,综述了近年来自适应光学技术在双光子显微成像中不同的应用成果,最后对自适应光学在双光子显微成像中的发展进行了展望。

**关键词** 生物光学; 双光子显微成像; 自适应光学; 波前像差; 波前校正

中图分类号 O437 文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL221250

### 1 引言

自适应光学(AO)的出现最早是为了提高天文望远镜的成像分辨率。在天文观测时,大气湍流产生的动态波前会在望远镜的成像光路中产生扰动,使成像光斑变得模糊。随着望远镜口径和放大倍率的不断增大,大气湍流对成像分辨率的影响也增大。美国天文学家 Babcock<sup>[1]</sup>在 1953 年提出了实时校正动态波前畸变的概念和工作原理:在望远镜的成像光路中引入一个波前传感器,用于实时获取大气湍流产生的动态波前畸变;同时引入一个表面形状可变的光学元件即波前校正器,对波前畸变进行实时补偿。AO 的概念由此诞生,在随后半个多世纪的发展中,AO 技术已被广泛地应用于天文观测、激光光束控制、光学精密检测和制造、生物成像、医学诊疗等多个领域<sup>[2-4]</sup>。

自 17 世纪第一台显微镜问世以来,显微成像技术已成为生物医学研究必不可少的工具,其中光学显微成像技术以其高分辨率、高灵敏度、无损伤、非接触的观察手段,使得科研人员在自然微环境中观测完整样品和研究活细胞成为可能,为细胞组学、基因组学、蛋白组学、肿瘤学等研究提供了强大的技术支撑。无论是在临床诊疗还是在生物医学基础研究上,光学显微成像都是一项不可或缺的技术。双光子显微(TPM)成像技术作为常见的光学显微成像技术之一,最早是

在 1990 年由美国康奈尔大学 Denk 等<sup>[5]</sup>提出,该技术利用双光子激发的荧光信号进行三维显微成像,具有非线性和长波长激发的特点,不仅使信号仅在焦点附近产生,也增加了激发光在生物组织中的穿透深度。因此,双光子显微成像技术具有大成像深度的“光学切片”功能,是学术界公认的深层生物组织无损三维显微成像的首选工具。此外,该技术还能够利用内源性光学标志物获得对比度,实现无标记成像。因此,双光子显微成像技术也被认为是目前最适合用于活体光学显微成像的技术之一<sup>[6-8]</sup>。

然而在实际应用中,生物组织的折射率不均匀性导致激发光在传播过程中会产生畸变和散射效应,降低了激发光的聚焦能力,从而使成像深度减小、成像分辨率降低,在一定程度上限制了双光子显微成像的效果。2000 年,AO 技术首次被应用到光学显微成像领域<sup>[9]</sup>,在双光子显微成像系统中采用遗传算法计算波前畸变,使用变形镜校正由生物样品引入的像差,自此开启了 AO 技术应用于显微成像领域的大门,使高成像分辨率、大成像深度的活体成像研究成为可能<sup>[10]</sup>。

本文介绍了双光子显微成像中的像差来源和特点,归纳了 AO 技术中不同的探测和校正方法,总结了 AO 技术在双光子显微成像中不同的应用成果,最后对 AO 技术在双光子显微成像中的发展进行了展望。

收稿日期: 2022-09-16; 修回日期: 2022-10-28; 录用日期: 2022-11-02

基金项目: 国家自然科学基金(81927803)、广东省自然科学基金(2020B121201010, 2021KTSCX279)、深圳市科技计划基础研究项目(RCJC20200714114433058, RCYX20210609104445093, ZDSY20130401165820357, JSGG20211029095003004)、深圳信息职业技术学院博硕士科研启动扶持项目(SZIT2022KJ043)

通信作者: \*zhengwei@siat.ac.cn

## 2 双光子显微成像技术及其像差分析

### 2.1 双光子显微成像技术

双光子显微成像技术是基于双光子效应实现的。一般情况下荧光分子会吸收一个高能量的光子,从基态跃迁至激发态,经过一段弛豫时间后回到基态,同时辐射出一个能量比激发光光子能量小但是波长更长的

光子,这就是单光子效应。但是在高光子密度的条件下,荧光分子可同时吸收两个能量较小、波长较长的光子,从基态跃迁至激发态,随后在激发态弛豫一段时间后再回到基态,这时辐射出能量比激发光光子能量高但是小于两个光子能量总和的光子,这就是双光子效应。双光子激发是一个非线性光学过程,激发原理图如图 1 所示<sup>[6]</sup>。

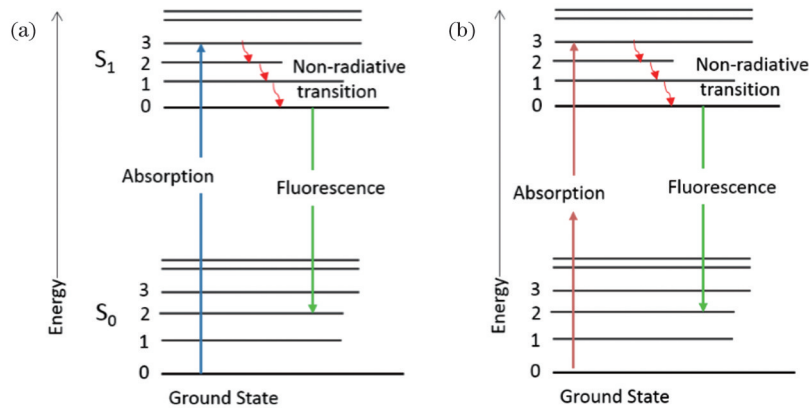


图 1 激发原理图<sup>[6]</sup>。(a)单光子激发原理示意图;(b)双光子激发原理示意图。

Fig. 1 Schematics of excitation<sup>[6]</sup>. (a) Schematic of single photon excitation; (b) schematic of two-photon excitation

### 2.2 双光子显微成像系统中的像差

在衍射受限的条件下,双光子显微成像系统的横向分辨率( $r_{x/y}$ )和轴向分辨率( $r_z$ )<sup>[11]</sup>分别为

$$r_{x/y} = \begin{cases} \frac{0.32\lambda}{\sqrt{2} NA}, NA \leq 0.7 \\ \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2} NA^{0.91}}, NA > 0.7 \end{cases}, \quad (1)$$

$$r_z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2} (n - \sqrt{n^2 - NA^2})}, \quad (2)$$

式中: $\lambda$ 为激发光波长; $NA$ 为数值孔径; $n$ 为成像介质折射率。当成像系统存在像差时,聚焦光斑会展宽,成像分辨率、亮度和对比度均会下降,从而成像质量受到影响。

双光子显微成像系统中的像差主要有两个来源:一是由光学系统装调和光学元件不理想引入的像差,称之为系统像差;二是由生物样品的折射率不均匀性引入的像差,称之为样品像差。其中,系统像差通常为固定的低阶像差,不随时间变化,因此可以通过对光学系统的优化设计来减小像差,同时也可以预先测量、标定和补偿像差。与系统像差相比,样品像差除了大部分的低阶像差以外,还包括更复杂的高阶像差,这些像差通常会随着成像深度的增加而增大。由于不同样品或同一样品不同区域的散射体大小和折射率不尽相同,不同样品或同一样品不同区域产生的像差也不一样,因此样品像差是无规律的、不可预测的,这也是双光子显微成像系统中最主要也是最难消除的像差<sup>[12]</sup>。

双光子显微成像系统包含了激发光和发射光两条光路,激发光在生物样品上聚焦以激发荧光物质发出

荧光。而生物样品的折射率不均匀性会降低激发光的聚焦能力,进而影响荧光发射。因此在进行像差补偿时,对激发光光路进行像差校正是必须的。对于发射光而言,通常采用光电倍增管(PMT)进行点探测成像,成像过程实际上是对荧光能量进行收集,发射光光路中的像差对成像质量的影响可忽略,因此无须对发射光光路进行像差校正。

## 3 自适应光学技术

典型的AO技术主要包括波前获取和波前校正两部分,其工作原理如下:首先获取目标信号的波前畸变信息(获取方式可以是直接探测获得也可以是计算获得),然后通过控制系统计算畸变波前的相位或振幅分布,将其转换为补偿波前信号并发送给波前校正器,波前校正器输出补偿波前的相位或振幅分布,抵消目标信号中的畸变波前,从而实现像差的补偿和校正。

### 3.1 波前探测方法

在AO技术中,通常把波前探测方法分为两类:一类是使用波前传感器(WS)基于几何光学原理对波前进行探测,称之为直接波前探测;另一类是不使用波前传感器,而是通过优化算法对一系列图像进行计算,推导得出波前,称之为间接波前探测。直接波前探测需要借助一个足够亮的引导星来探测畸变波前,然而生物组织样品是一个复杂的三维系统,受激辐射的荧光来自样品的各个位置,导致波前探测会受到离焦面杂光的干扰,因此在AO技术被引入显微成像系统的研究初期,直接波前探测方法没有得到有效的应用。首次将AO技术应用到显微成像领域中并在双光子显微



成像系统中验证了 AO 有效性的研究工作采用的是间接波前探测方法<sup>[9]</sup>。

### 3.1.1 间接波前探测

间接波前探测的概念最早来自 1974 年出现的像清晰化技术,但是随着 20 世纪 90 年代后期硬件技术的革新和优化控制算法的更新,间接波前探测的应用才开始蓬勃发展起来。间接波前探测无需专门的波前传感器,直接利用成像探测器获得的光强信息建立像质评价函数,然后基于特定的优化算法在波前校正器上附加某些特定的相位,以寻找评价函数的极值,达到获取最优信号强度的目的,当评价函数达到极值时认为畸变波前已得到了校正。

间接波前探测又可细分为搜索算法和模式法两大类。

搜索算法无须预知畸变波前与评价函数之间的具体数学关系,而是通过在波前校正器上加入特定的相位变化,从而在光学系统中引入特定的波前变化。然后,计算评价函数的改变量,根据评价函数的变化对畸变波前进行重新估计,最终按一定的搜索路径进行多次迭代,使评价函数趋于极值。常用的搜索算法有遗传算法(GA)<sup>[13]</sup>、模拟退火(SA)算法<sup>[14]</sup>、随机并行梯度下降(SPGD)算法<sup>[15]</sup>等,其中 SPGD 算法是目前效率最高、应用最广泛的搜索算法,但是它无法保证收敛到全局最优。在实际的应用场景中,为了兼顾收敛速度和全局最优,除了将两种算法混合使用之外,研究人员也会将光瞳的搜索迭代分为全孔径搜索和子孔径搜索,其中子孔径搜索是将光瞳分割为多个大小相同的子区域,依次对每个子孔径进行搜索迭代,从而获得整个光瞳的畸变波前<sup>[16]</sup>。

模式法是通过理论分析建立畸变波前与评价函数之间的数学模型,通常是用一组正交多项式来表示畸变波前,然后对各个多项式对应的模式系数进行优化控制,主要特点是需要知道波前校正器中致动器的影响函数。模式法通常分为迭代和非迭代两种方法:基于迭代的模式法是利用表示畸变波前的一组多项式及其系数与波前校正器的致动器建立关系矩阵,结合搜索算法迭代优化出多项式系数,从而获得畸变波前。基于非迭代的模式法首先需要选择合适的评价函数和一组正交多项式作为基函数,并假设畸变波前是基于该基函数线性展开的,然后根据多项式系数与评价函数的数学关系,求解出多项式系数,最后获得畸变波前。常用的正交多项式有 Zernike 多项式<sup>[17-18]</sup>、Lukosz 多项式<sup>[19]</sup>等。由于模式法将畸变波前的多次迭代搜索过程简化为确定性的拟合求解过程,因此校正速度更快、校正实时性更强。

### 3.1.2 直接波前探测

直接波前探测是通过波前探测器和波前重建算法来获得畸变波前的相位分布,然后将相位信息反馈给波前校正器,波前校正器产生一个与畸变波前互补的补偿波前,从而达到波前校正的目的。常用的波前探

测器是夏克-哈特曼波前传感器(SHWS),其工作原理是首先利用微透镜阵列把畸变波前分割成多个小块并聚焦到照相机的靶面上,通过照相机采集各个焦点的空间位置信息,然后计算各个焦点与微透镜阵列理想中心点的偏移量,得到畸变波前的斜率分布,最后根据 Zernike 梯度多项式计算得到畸变波前的相位分布<sup>[20]</sup>。

干涉测量技术是另一种非接触、高精度的直接波前探测技术,目前在天文探测、光学元件精密制造、眼科治疗等领域中得到广泛应用。在干涉测量技术中,通常使用相移法使参考光与被测光之间产生稳定变化的相位差,通过多幅相位差图像计算出两束光波前的相位差信息,再根据干涉测量的具体工作原理,得到被测光路中的畸变波前相位分布。随着科学技术的发展,干涉测量技术已从一种静态测量技术发展为动态测量技术,其测量速度已使其可以用于活体成像<sup>[21]</sup>。

### 3.2 波前校正方法

波前校正器是 AO 系统中进行像差校正的执行器件,通过改变入射光束不同位置的光程差来进行畸变波前的相位补偿。波前的畸变在本质上是光程的差异,光程可表示为光在传输介质中经过的路程与传输介质折射率的乘积,因此可以通过改变光在传输介质中经过的路程或改变传输介质的折射率来对畸变波前进行补偿。因此,波前校正器可分为两类:一类是通过改变传输介质折射率来实现相位补偿的波前校正器,如液晶空间光调制器(SLM);另一类是通过改变光在传输介质中经过的路程来进行相位补偿的波前校正器,如变形镜(DM)。

SLM 进行相位调制是通过偏转液晶面板上的双折射液晶分子来实现的:在液晶面板的两端施加不同的电压,双折射液晶分子随着电压的变化而产生不同的偏转角度,使液晶面板的折射率发生变化,从而改变穿过液晶的光程,实现相位调制。此外,可以通过调制电压独立地改变 SLM 上每一个像素对应的液晶分子折射率,实现高空间分辨率的相位调制。但是,SLM 具有偏振依赖性,入射光必须为线偏振光才能实现相位调制,大大降低了器件的光能利用率。因此,在双光子显微成像系统中,必须提高激发光的功率,才能保证 SLM 校正后的激发光能量足以激发荧光<sup>[22]</sup>。

DM 是通过改变反射镜的表面形状来改变 DM 反射的光程,从而实现相位补偿。根据驱动器的不同,常用的 DM 有微机电系统(MEMS)变形镜和压电陶瓷变形镜。MEMS 变形镜采用的是微机电技术,主要由镜面层、电极层和基底层组成,反射镜为反射率较高的镀铝或镀银薄膜,在给电极层上分布的各个电极施加不同的电压后,镜面层与电极层之间会产生电势差,从而产生静电力吸附薄膜,使反射镜产生形变。压电陶瓷变形镜是通过改变压电驱动器的控制电压来实现驱动器的伸缩,进而带动驱动器支撑的反射镜产生形变。相比于 SLM,DM 的校正速度更快,也无偏振依赖性,但是 DM

的空间分辨率受驱动器个数的限制,且价格相对昂贵。

#### 4 AO 在双光子显微成像中的前沿应用

具有高成像分辨率及大成像深度和视场的显微成像技术一直是双光子显微成像乃至整个显微成像领域的研究热点,其中 AO 技术在探测和校正像差中发挥了重要作用。自 2000 年 AO 技术首次被应用于双光子显微成像以来,不同探测方法和校正方法的成功应用使得具有大视场、高成像分辨率的深层生物组织活

体成像成为可能。

##### 4.1 间接波前探测方法在双光子显微成像中的应用

2010 年, Ji 等<sup>[23-27]</sup>提出了基于子孔径分割的间接波前探测算法,将光瞳分割为若干个子孔径,使用 SLM 调制波前相位,使子孔径依次被“点亮”,计算各个子孔径图像的偏移量并估计其波前斜率,从而得到畸变波前的相位分布。使用 SLM 对小鼠大脑皮层切片产生的像差进行预校正,使双光子显微成像系统能达到接近衍射极限的成像分辨率,算法原理和成像结果如图 2 所示。

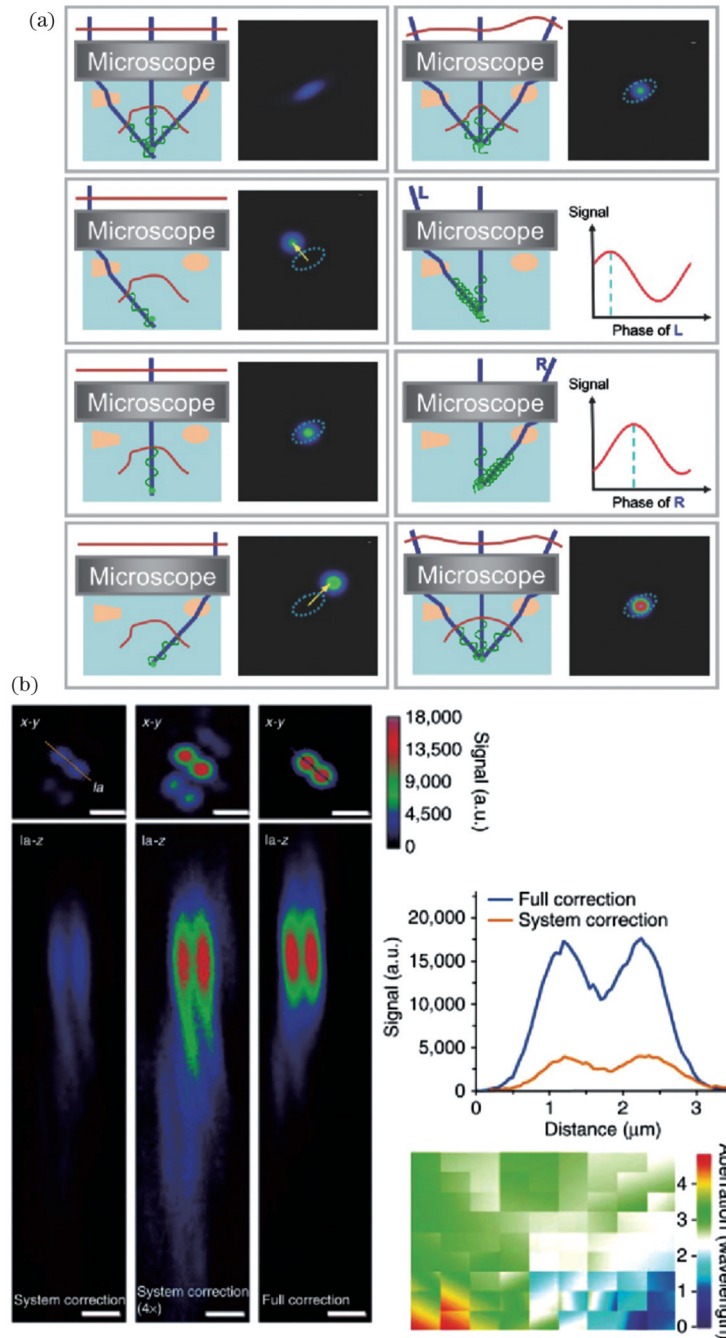


图 2 基于 SLM 间接波前探测的双光子显微成像系统<sup>[23]</sup>。(a)子孔径分割技术的工作原理;(b)系统校正和全局校正的置于 250 μm 厚小鼠脑片下的直径为 1 μm 的荧光小球成像及全局校正波前图

Fig. 2 Two-photon microscopic imaging system with indirect wavefront detection using SLM<sup>[23]</sup>. (a) Working principle of sub-aperture segmentation technology; (b) systemically and globally corrected images of 1 μm diameter fluorescent beads placed under 250 μm thick mouse brain slices and globally corrected wavefront



但是子孔径分割算法的校正过程耗时较长,限制了该方法在活体成像中的应用,因此研究人员对该算法进行了不同程度的改进与优化。

2012年,Tang等<sup>[28-29]</sup>提出了二分迭代法的间接波前探测算法,使用DM在多个子孔径上同时加载一个单独

的频率,然后从采集到的反馈信号中分离出各个子孔径对应的最优相位,从而得到畸变波前的相位分布。该方法不仅提高了波前探测速度,也获得了近 100 nm 的成像分辨率,实现了 400  $\mu\text{m}$  深度的活体小鼠大脑皮层神经元的成像,其光路示意图和成像结果如图 3 所示。

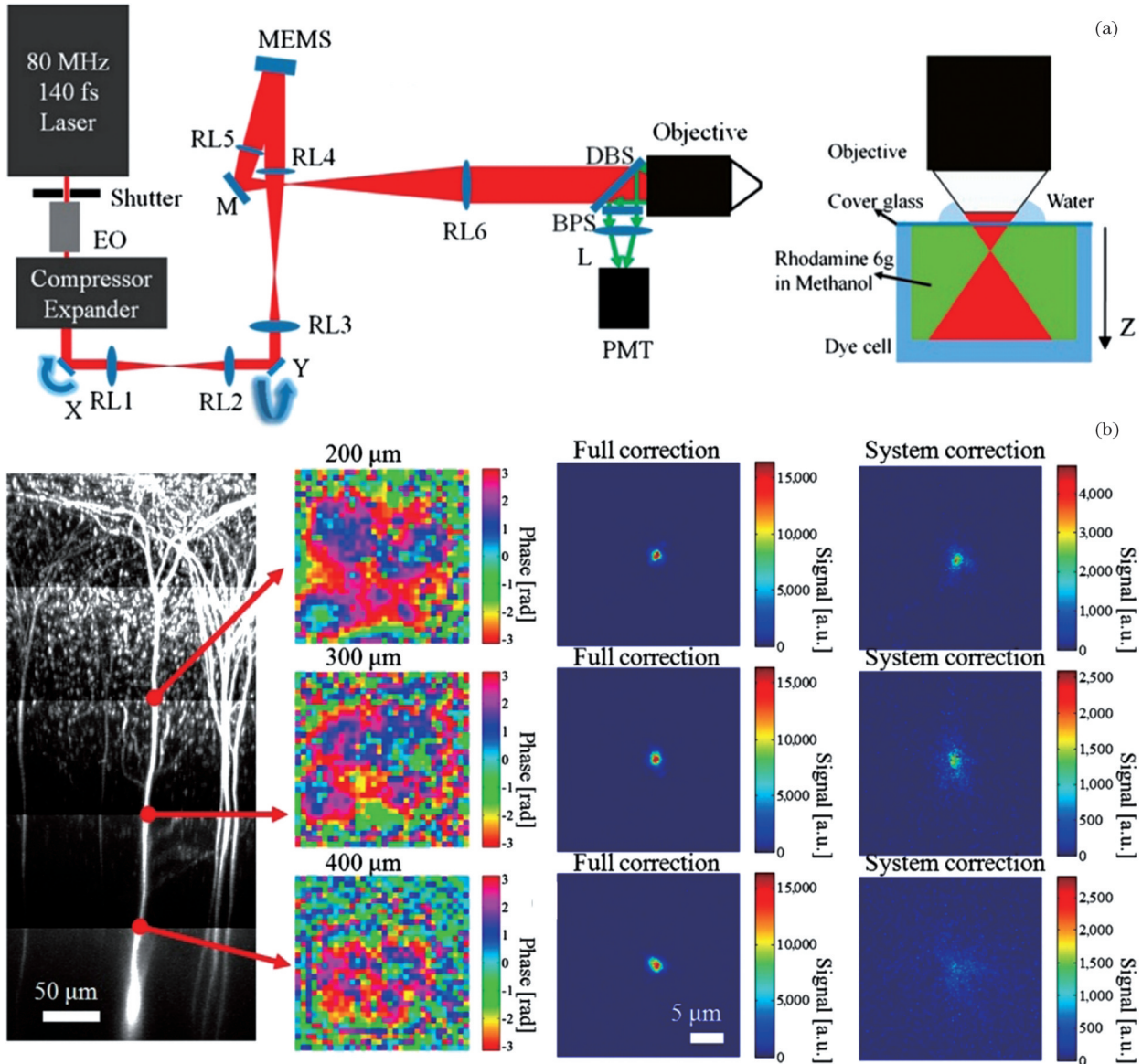


图 3 基于二分迭代法间接波前探测的双光子显微成像系统及其成像结果<sup>[28]</sup>。(a)光路示意图;(b)小鼠大脑皮层第5层神经元的成像结果

Fig. 3 Two-photon microscopic imaging system based on iterative multiphoton adaptive compensation technique and its imaging results<sup>[28]</sup>. (a) Schematic of optical path ; (b) imaging results of 5th layer neurons in mouse cerebral cortex

随后,Wang等<sup>[30]</sup>在2014年引入了数字微镜器件(DMD),利用频率复用技术并行调制多个子孔径,缩短了子孔径分割算法的校正时长。不仅保证了近衍射极限的成像分辨率,还实现了 550  $\mu\text{m}$  深度内的活体小鼠大脑皮层神经元的成像,其光路示意图和成像结果如图 4 所示。

2021年,Rodríguez等<sup>[31]</sup>设计了一个更紧凑的子孔径探测模块,在光路中引入了压电变形镜代替最初的SLM,每个驱动轴对应一个子孔径,从人为设

定子孔径的大小和区域变为器件自动分割。同SLM相比,DM的响应速度更快,缩短了多次迭代计算的工作时间,实现了活体小鼠大脑皮层和脊髓中神经元的结构成像以及脊髓神经元中钙离子的功能成像。同时,通过在三光子显微成像系统中使用比双光子波长更长的激发光,不仅实现了上述结构和功能成像,还进一步提升了成像深度。双光子和三光子显微成像系统的光路示意图和成像结果如图 5 所示。

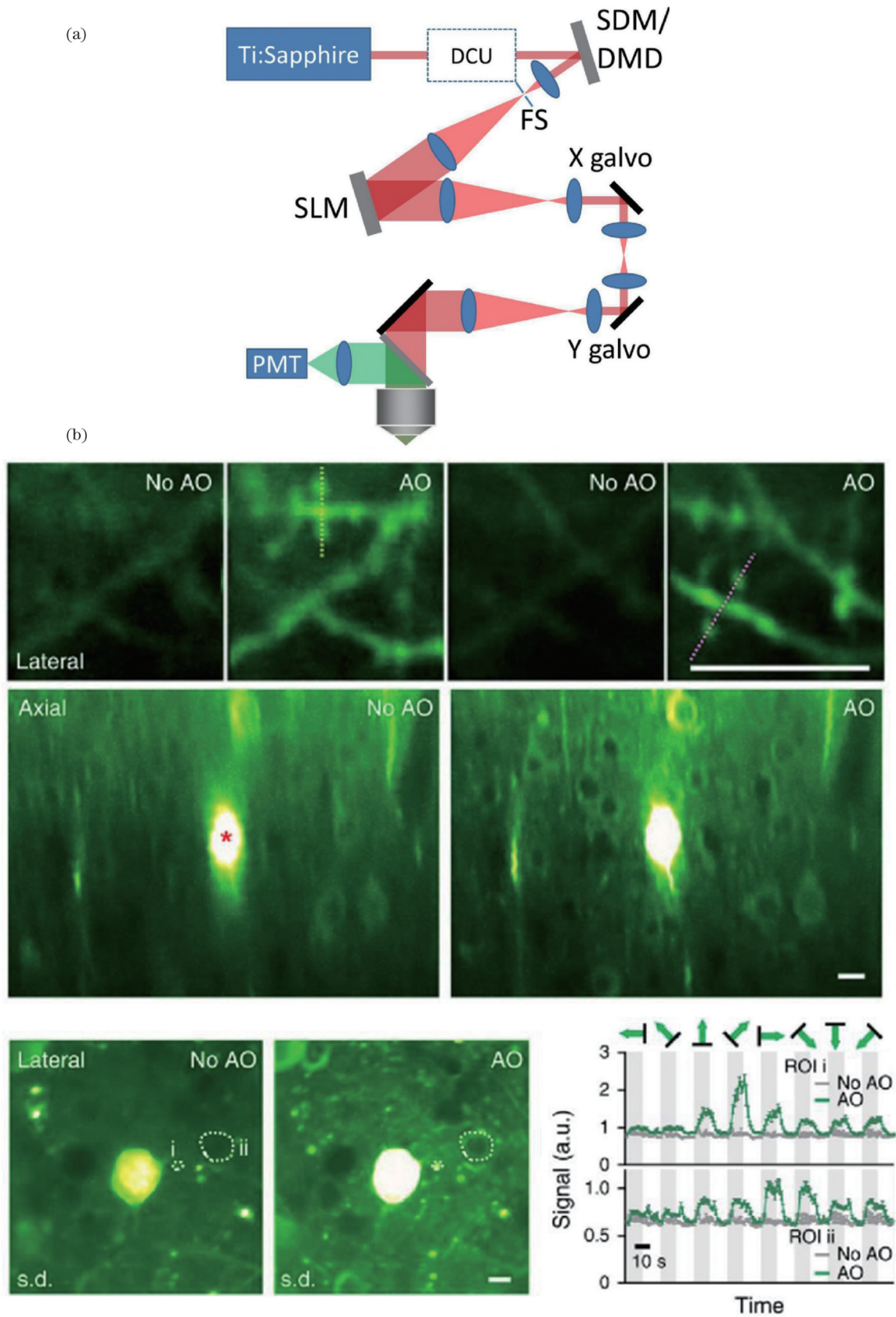


图 4 基于 DMD 和 SLM 的子孔径分割双光子显微成像系统及其成像结果<sup>[30]</sup>。(a)光路示意图;(b)校正前、后的活体小鼠大脑皮层第 4、5 层神经元的成像结果

Fig. 4 DMD and SLM based sub-aperture segmentation two-photon microscopic imaging system and its imaging results<sup>[30]</sup>. (a) Schematic of optical path; (b) imaging results of 4th and 5th layer neurons in cerebral cortex of *in vivo* mouse before and after AO correction



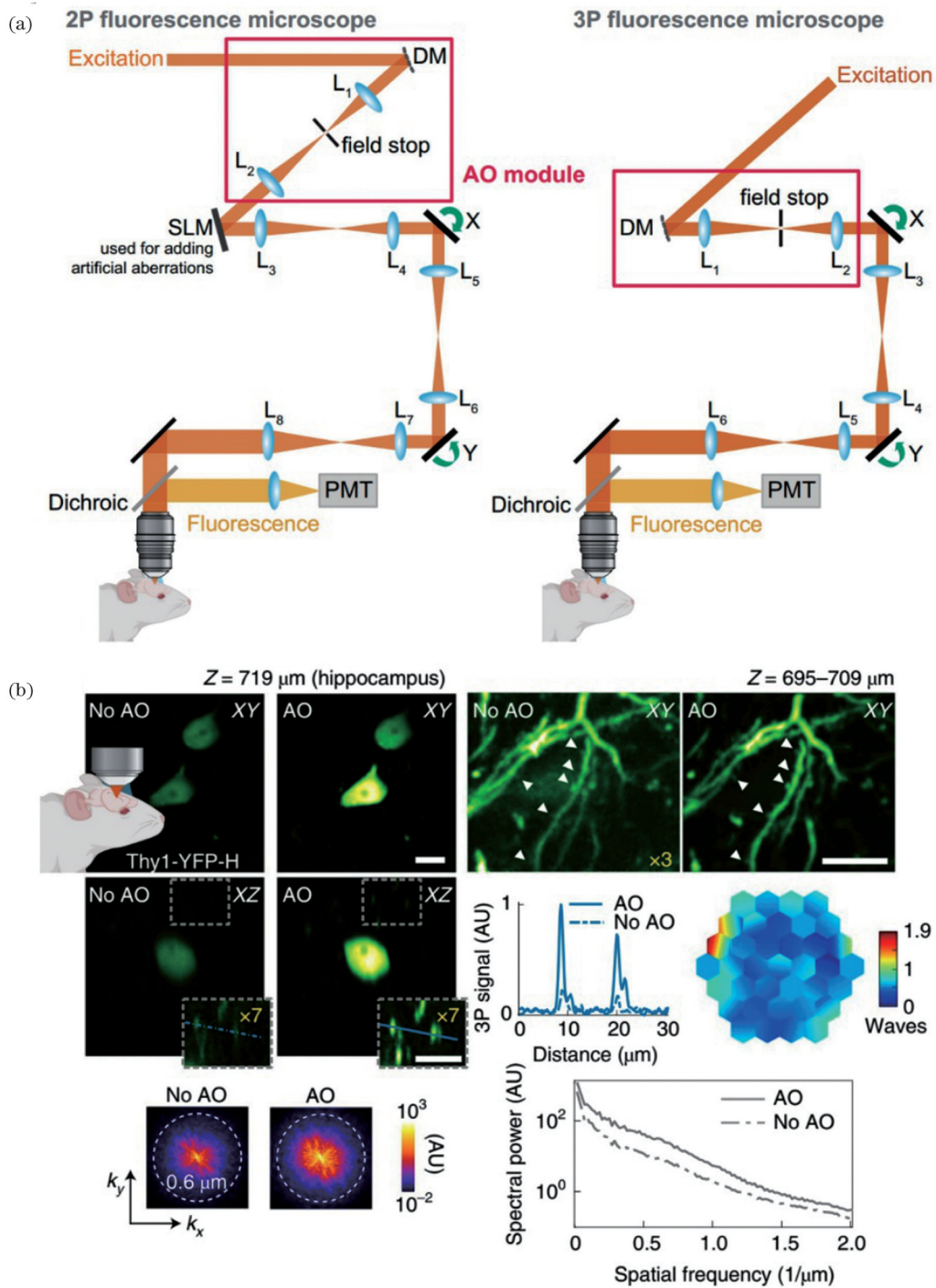


图5 基于子孔径分割的多光子显微成像系统及其成像结果<sup>[31]</sup>。(a)双光子和三光子显微成像系统的光路示意图；(b)校正前、后活体小鼠大脑皮层和海马体中神经元的三光子显微成像结果

Fig. 5 Multiphoton microscopic imaging system based on sub-aperture segmentation and its imaging results<sup>[31]</sup>. (a) Optical path diagrams of two- and three-photon microscopic imaging system; (b) three-photon microscopic imaging results of neurons in cerebral cortex and hippocampus of *in vivo* mice before and after correction

受子孔径分割算法的启发,我们课题组在2020年提出了环形子孔径分割算法,用于校正由样品折射率不匹配引起的旋转对称像差<sup>[32]</sup>。不同于前面所述的矩形分割,我们将光瞳分割成不同宽度的环形孔径,依次改变每个环形子孔径的相位分布,根据反馈光强拟合得到每个子孔径的最优相位值,从而得到畸变波前的相位分布。使用SLM对畸变波前进行校正,也能达到近衍射

极限的成像分辨率,算法原理和成像结果如图6所示。

上述子孔径分割方法是整个光瞳(物镜后背孔径)分割为矩形或环形的子孔径,再使用不同的搜索算法计算子孔径内的波前相位,从而获得整个畸变波前的相位分布。除此之外,模式法在间接波前探测方法中也有十分广泛的应用。

2017年, Park等<sup>[33]</sup>提出了基于模式法的间接波前

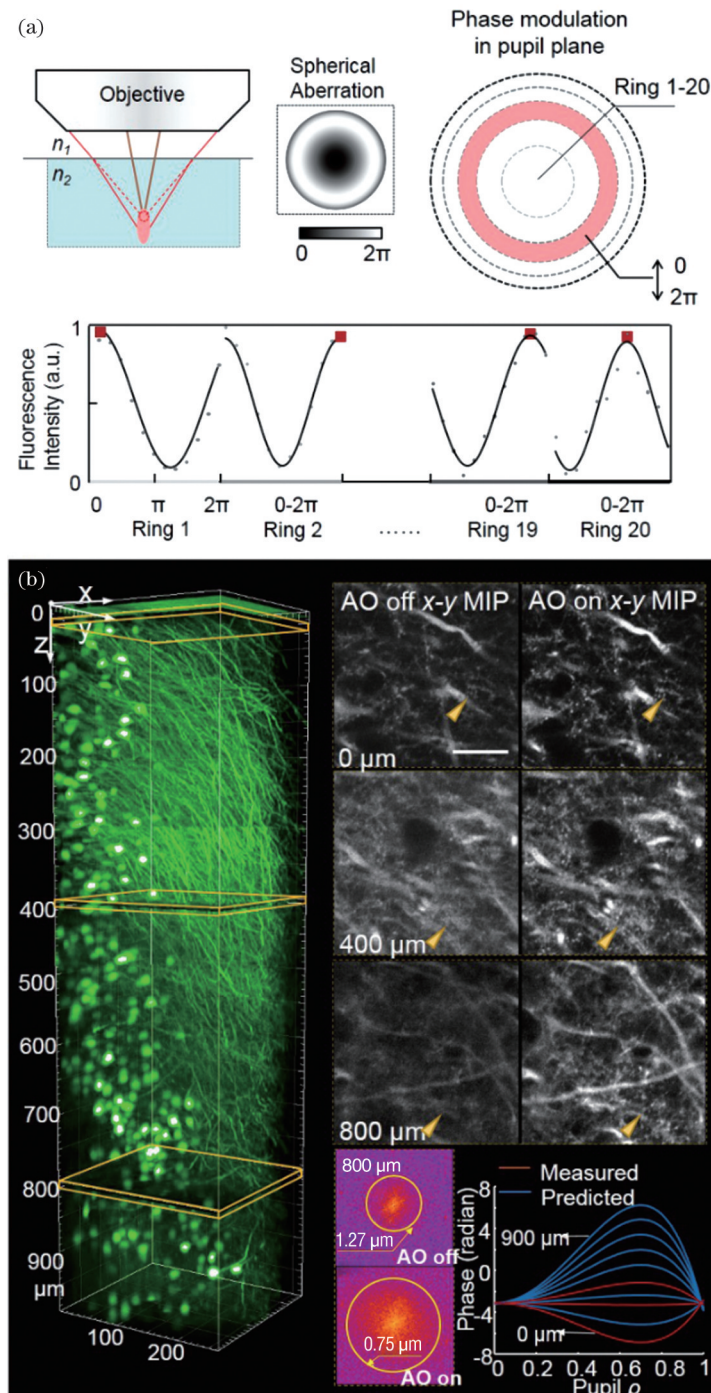


图 6 基于环形子孔径分割的双光子显微成像系统及其成像结果<sup>[32]</sup>。(a) 环形子孔径分割的原理示意图；(b) 校正前、后小鼠大脑皮层神经元的双光子显微成像结果

Fig. 6 Two-photon microscopic imaging system based on ring sub-aperture segmentation and its imaging results<sup>[32]</sup>. (a) Schematics of ring sub-aperture segmentation; (b) two-photon microscopic imaging results of neurons in mouse cerebral cortex before and after correction

探测方法。在双光子显微成像系统中引入了两个  $3 \times 3$  的棱镜阵列, 将视场划分为不同的子孔径, 并共轭到波前校正器 SLM 上, 使用 Zernike 多项式计算每个子孔径中的畸变波前并依次进行校正, 实现了  $450 \mu\text{m} \times 450 \mu\text{m}$  的大视场像差校正。通过对小鼠大脑皮层产生的像差进行预校正, 并对小胶质细胞和神经元中的钙离子进行结构和功能成像, 验证了该方法的有效性,

其探测原理和成像结果如图 7 所示。

波长越长的光在同一介质中的散射效应越小, 因此通常多光子显微成像系统的成像深度比双光子显微成像系统更深。在 AO 技术中, 像差对信号强度的影响随非线性阶次的增加呈指数式增长。因此, 非线性阶次越高, 像差校正效果越明显<sup>[34]</sup>。为了进一步增大成像深度, Streich 等<sup>[35]</sup>将基于模式法的无波前探测技



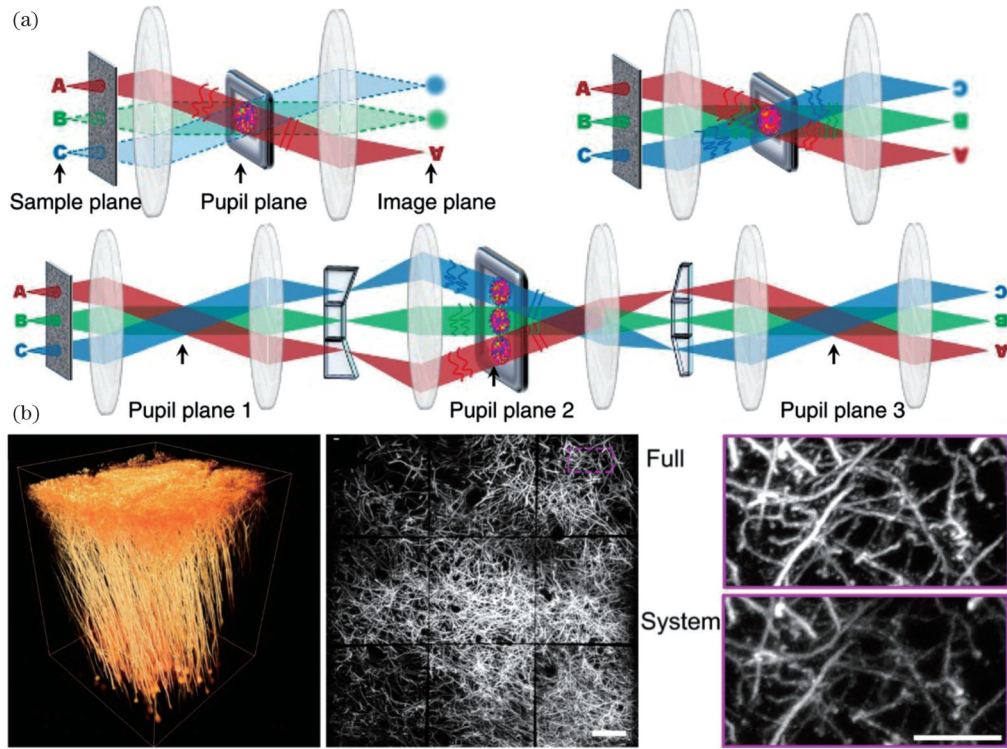


图 7 多孔径间接波前探测技术的工作原理和成像结果<sup>[33]</sup>。(a)多孔径波前探测原理示意图;(b)活体小鼠的大脑皮层神经元成像结果  
Fig. 7 Working principle and imaging results of multi-aperture indirect wavefront detection technology<sup>[33]</sup>. (a) Schematics of multi-aperture wavefront detection principle; (b) imaging results of neurons in *in vivo* mouse cerebral cortex

术引入到三光子显微成像系统中,在 1400  $\mu\text{m}$  深度处对小鼠大脑皮层神经元进行了结构和功能成像,光路示意图和成像结果如图 8 所示。

受视场子孔径分割的启发,为了进一步校正视场边缘的离轴像差,本课题组在 2022 年对视场进行子孔

径分割,使用 Zernike 多项式对每个子孔径的像差进行拟合,使用 SLM 依次对每个子孔径的畸变波前进行校正,提高了视场边缘的成像分辨率,实现了  $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$  的大视场成像<sup>[36]</sup>,光路示意图和成像结果如图 9 所示。

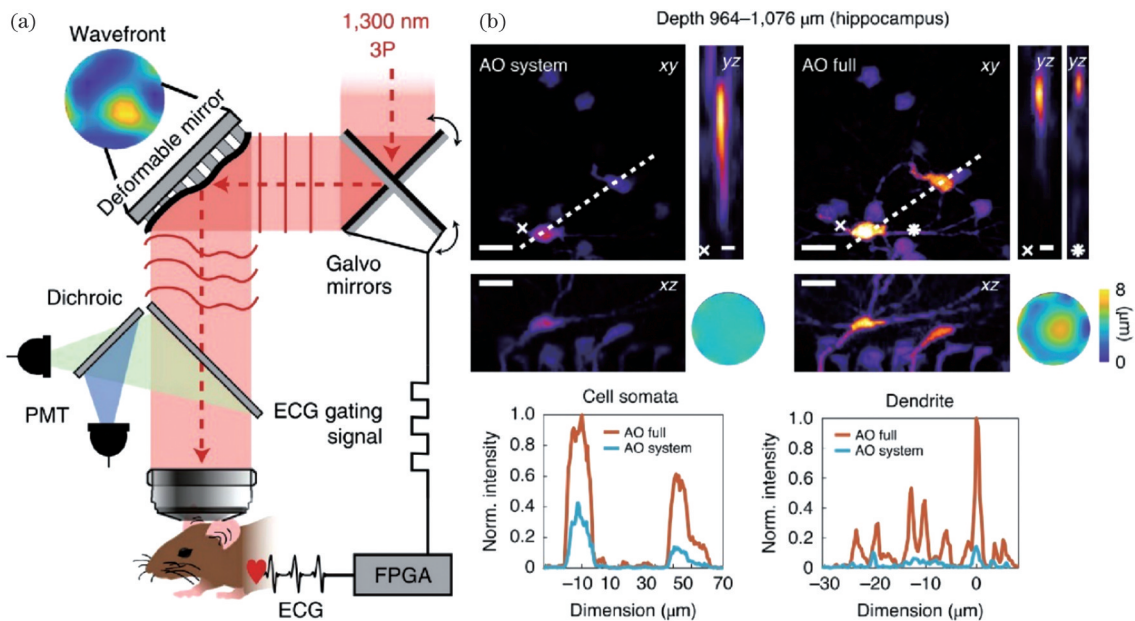


图 8 基于模式法的间接波前探测三光子显微成像系统及其成像结果<sup>[35]</sup>。(a)光路示意图;(b)活体小鼠大脑海马体神经元的三光子显微成像结果

Fig. 8 Indirect wavefront detection three-photon microscopic imaging system based on mode method and its imaging results<sup>[35]</sup>. (a) Schematic of optical path; (b) three-photon microscopic imaging results of hippocampus neurons of *in vivo* mouse brain

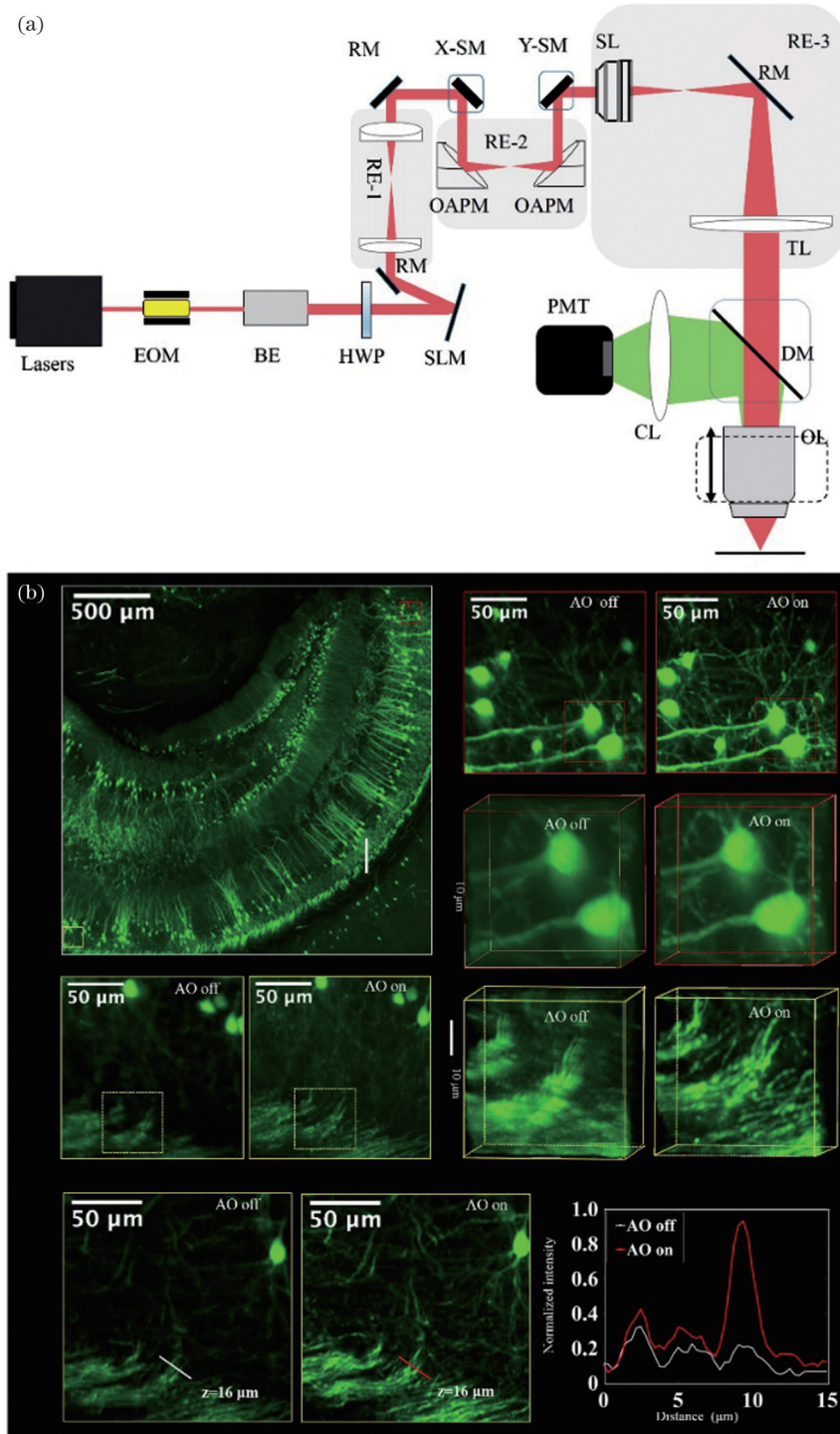


图 9 大视场双光子显微成像系统及其成像结果<sup>[36]</sup>。(a)光路示意图;(b)校正前、后小鼠大脑切片的双光子显微成像结果

Fig.9 Large-field two-photon microscopic imaging system and its imaging results<sup>[36]</sup>. (a) Schematic of optical path; (b) two-photon microscopic imaging results of mouse brain sections before and after correction

在通常情况下,间接波前探测系统的结构相对简单,对成像对象没有限制,易于实现。但是,间接波前探测需要预先采集多幅图像并进行反复迭代运算,才能获得满足评价标准的波前校正信息,整个波前校正过程计算量大、耗时长,很难满足快速成像的需求。同时,间接波前获得的畸变波前只是迭代算法的最优解,并不一定是真实的畸变波前,不同的算法或不同的评价函数都有可能得到不同的结果,这使得其测量精度

低于直接波前探测。

#### 4.2 直接波前探测方法在双光子显微成像中的应用

在双光子显微成像系统中,被激发的荧光被局限在激发光焦点附近的很小区域内,这样的荧光点为波前传感器提供了一个天然的引导星,使得直接波前探测方法在双光子显微成像系统中得到了充分应用。2010年 Cha等<sup>[37]</sup>、2013年 Tao等<sup>[38]</sup>在样品里注射外源荧光物质作为引导星,使用SHWS探测发射光、DM校正激发光,



对离体的小鼠大脑组织进行了成像,提高了成像分辨率,如图 10 所示。但是,在样品中注入引导星无疑会对样品产生干扰,并且引导星在样品中的空间位置也很难精确控制,所以这些方法并没有被广泛使用。

2014 年, Wang 等<sup>[39-40]</sup>认为双光子激发的荧光本身就局限在一个很小的范围内(焦点处),可以作为引导星使用。他们进一步发现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具有相似性,于是提出了

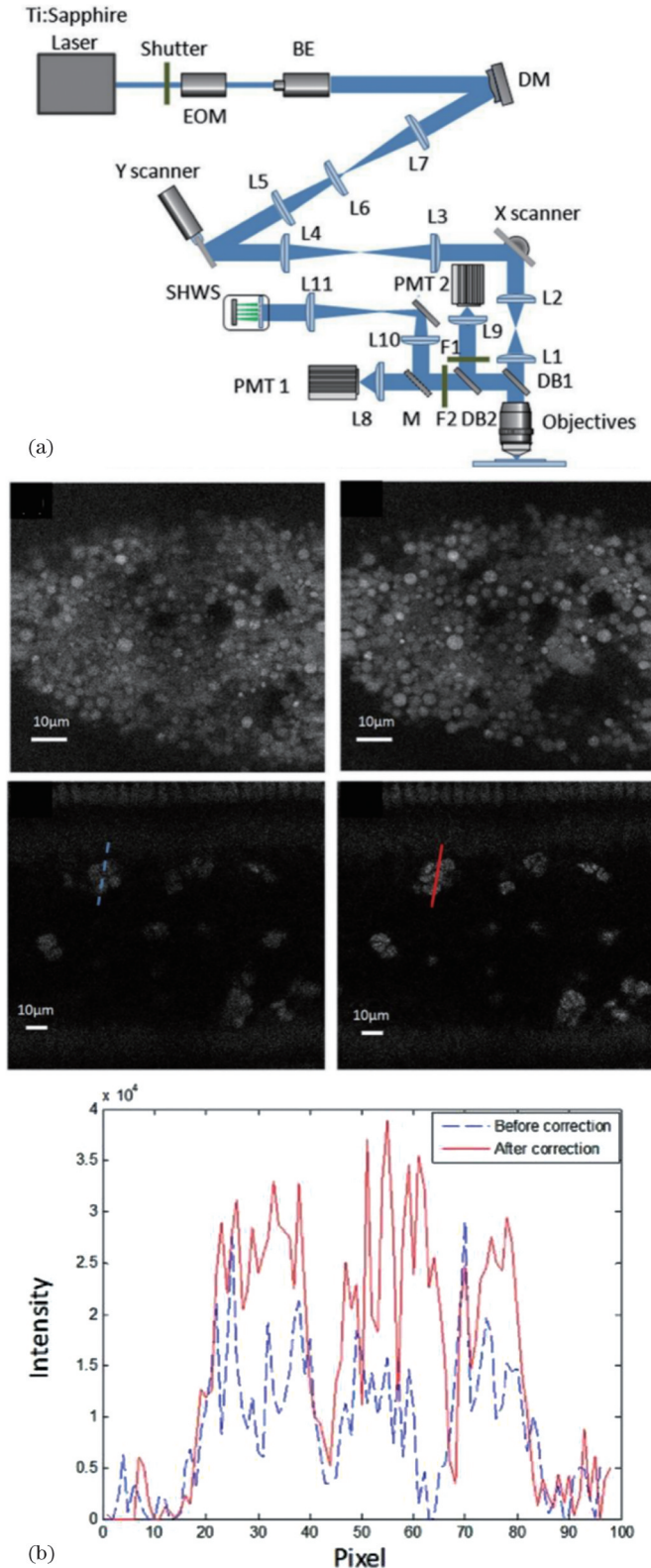


图 10 基于直接波前探测的双光子显微成像系统及其成像结果<sup>[38]</sup>。(a)光路示意图;(b)校正前、后果蝇胚胎的双光子显微成像结果  
Fig. 10 Two-photon microscopic imaging system based on direct wavefront detection and its imaging results<sup>[38]</sup>. (a) Schematic of optical path; (b) two-photon microscopic imaging results of Drosophila embryo before and after correction

去扫描技术,将同一等晕区内所有发射光信号叠加之后再将其输入到 SHWS 中进行波前探测,提高了直接波前探测的质量和效率。使用 SLM 对双光子显微成像系统中的激发光进行校正,对开颅活体小鼠大脑皮层神经元进行结构成像。然后将引导星从转基因小鼠神经元的自发荧光改为近红外荧光蛋白,对活体小鼠大脑皮层神经元中的钙离子传导进行了功能成像,成像深度达

700  $\mu\text{m}$ ,其光路示意图和成像结果如图 11 所示。

2019 年, Liu 等<sup>[41]</sup>也将近红外荧光染料作为直接波前探测的引导星,同时把波前校正器换成了 DM。对小鼠大脑皮层中的微血管和神经元进行结构成像,成像深度可达 1100  $\mu\text{m}$ 。同时对神经元释放谷氨酸和钙离子的过程进行了高信噪比的功能成像,进一步提升了成像质量,光路示意图和成像结果如图 12 所示。

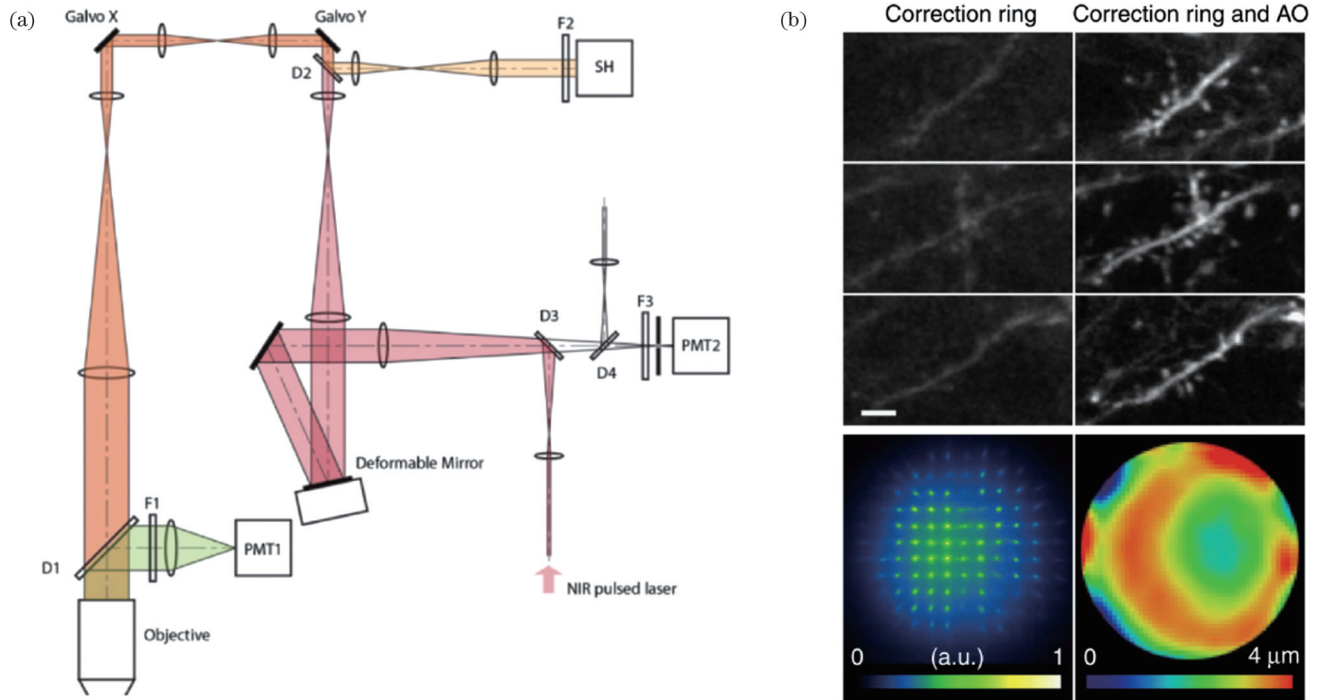


图 11 基于 SHWS 和 SLM 直接波前探测的双光子显微成像系统及其成像结果<sup>[40]</sup>。(a)光路示意图;(b)校正前、后小鼠大脑皮层神经元的双光子显微成像结果

Fig. 11 Two-photon microscopic imaging system with direct wavefront detection based on SHWS and SLM and its imaging results<sup>[40]</sup>. (a) Schematic of optical path; (b) two-photon microscopic imaging results of neurons in mouse cerebral cortex before and after correction

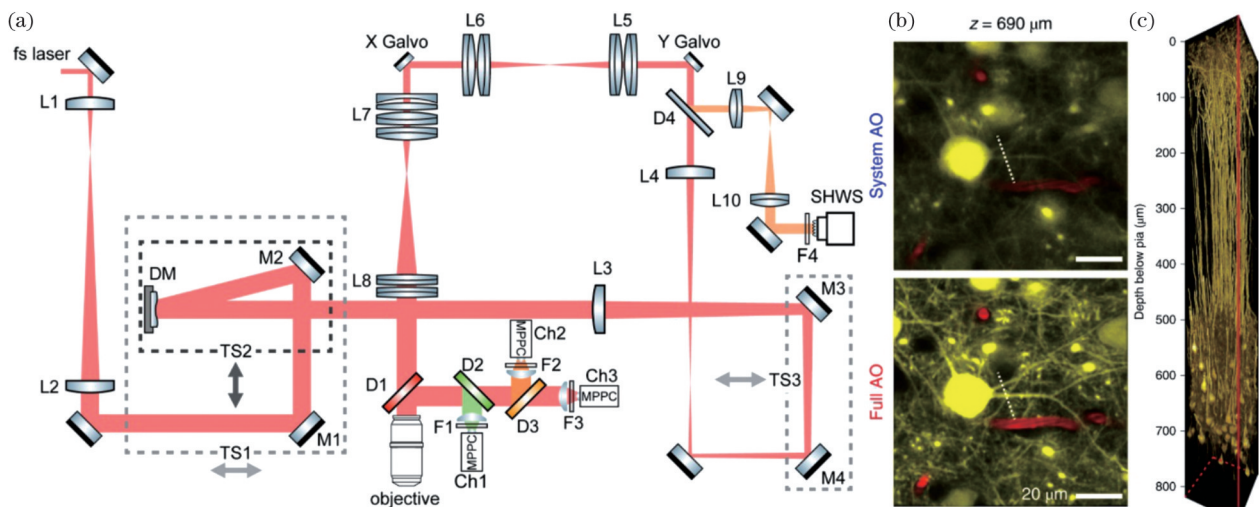


图 12 基于 SHWS 和 DM 直接波前探测的双光子成像系统及其成像结果<sup>[41]</sup>。(a)光路示意图;(b)系统校正和全局校正后的小鼠大脑皮层树突棘的双光子显微成像图;(c)校正后的小鼠大脑皮层神经元的双光子显微成像图

Fig. 12 Two-photon microscopic imaging system with direct wavefront detection based on SHWS and DM and its imaging results<sup>[41]</sup>. (a) Schematic of optical path; (b) two-photon microscopic imaging maps of dendritic spines in mouse cerebral cortex after systematic and global correction; (c) corrected two-photon microscopic imaging maps of neurons in mouse cerebral cortex



2020年, Qin等<sup>[42-43]</sup>将DM置于去扫描后的探测光路中, 也就是激发光先经过DM再进入SHWS, 利用该光路结构可以实现对激发光的迭代校正。小鼠视网膜成像的实验结果表明, 三次迭代校正后的成像分辨率优于一次校正后的成像分辨率, 进一步提升了成像质量。随后, 对波前重建算法进行了优化, 将SHWS获

得的图像进行了平均化处理, 同时优化了双光子显微成像系统中激发光的数值孔径, 降低了激发光的散射效应, 从而增加了直接波前探测的探测深度。通过与光透明技术的结合, 实现了小鼠颅骨完整状态下的大脑皮层神经元的成像, 成像深度为700 μm, 数值孔径优化原理和成像结果如图13所示。

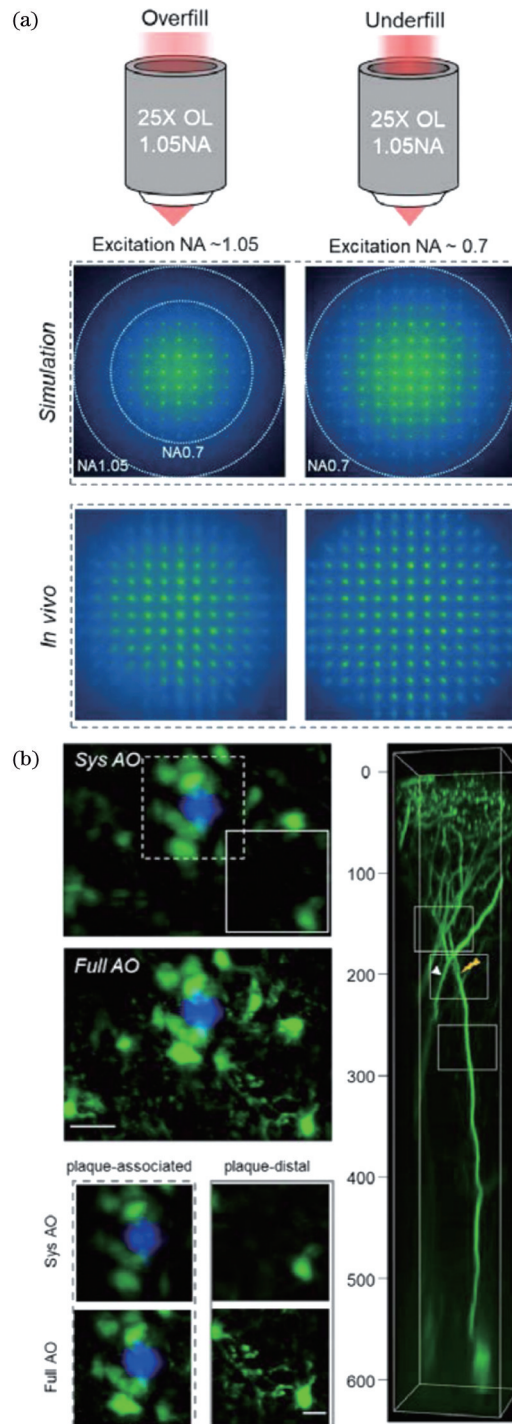


图 13 基于数值孔径优化算法和直接波前探测的双光子显微成像系统及其成像结果<sup>[43]</sup>。(a)数值孔径优化示意图;(b)校正前、后活体小鼠脑膜下方神经元的两光子显微成像图

Fig. 13 Two-photon microscopic imaging system based on numerical aperture optimization algorithm and direct wavefront detection and its imaging results<sup>[43]</sup>. (a) Schematics of numerical aperture optimization; (b) two-photon microscopic imaging maps of neurons below meninges of *in vivo* mice before and after correction

直接波前探测能够得到畸变波前的客观描述,测量速度更快、准确度更高。但是,直接波前探测需要在光路中增加波前探测器,将发射光分成两部分,一部分用于波前探测,另一部分用于荧光成像,这样不仅会使系统结构复杂化,还会降低成像信噪比。同时,波前探测器的灵敏度和探测精度也会受信噪比的影响。

### 4.3 F-SHARP 技术在双光子显微成像中的应用

间接和直接波前探测分别有其优点和缺点,为

了充分发挥两者的优点,其中一种思路是在无波前传感器的探测光路中获得客观的畸变波前。2017年, Papadopoulos 等<sup>[44-46]</sup>提出了一种聚焦扫描全息像差探测(F-SHARP)方法。通过双光束干涉直接测量畸变波前的点扩散函数(PSF),并使用测量得到的PSF相位的共轭来校正波前。通过对斑马鱼和小鼠薄颅骨大脑皮层神经元的成像,验证了该技术的有效性,其光路示意图和成像结果如图14所示。

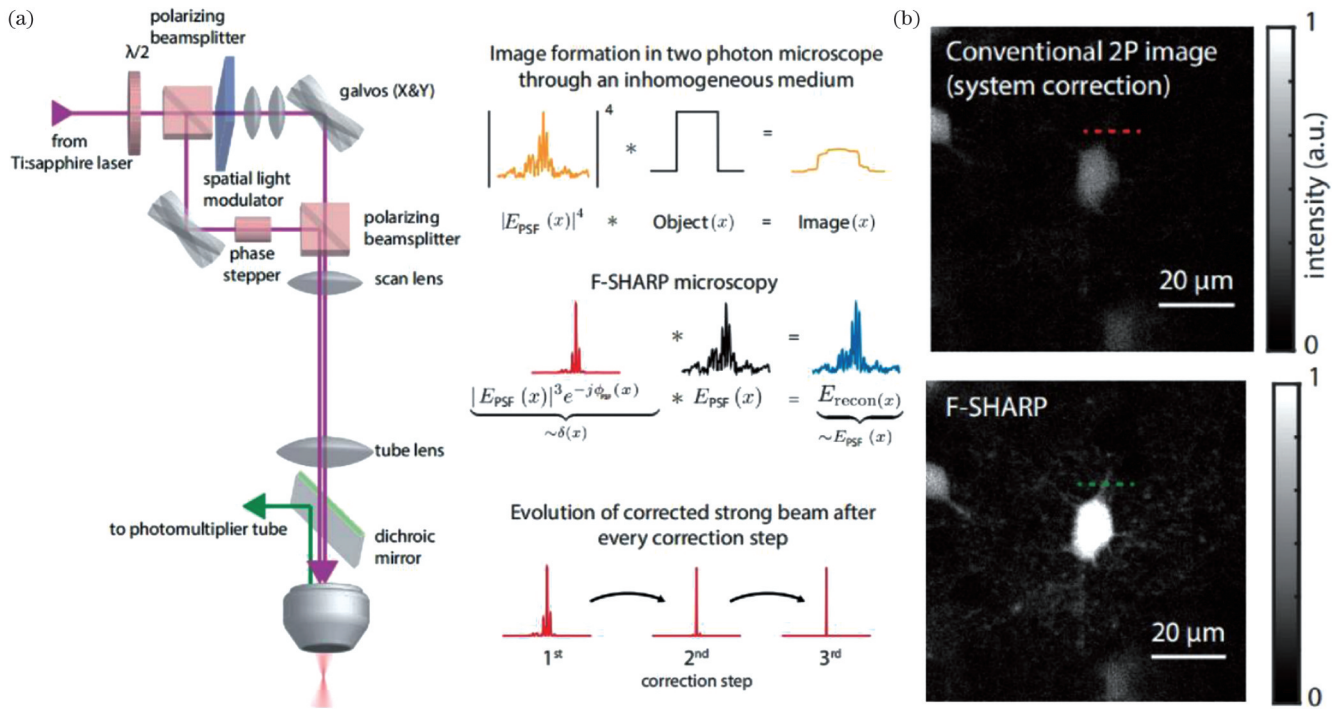


图 14 基于 F-SHARP 的双光子显微成像系统及其成像结果<sup>[44]</sup>。(a) 光路示意图及 F-SHARP 工作原理; (b) 校正前、后小鼠大脑皮层神经元的两光子显微成像图

Fig. 14 Two-photon microscopic imaging system based on F-SHARP and its imaging results<sup>[44]</sup>. (a) Schematic of optical path and F-SHARP operating principle; (b) two-photon microscopic imaging maps of neurons in mouse cerebral cortex before and after correction

2022年, Qin 等<sup>[47]</sup>在 F-SHARP 系统中将远程聚焦方法与共轭 AO 相结合, 同时使用锁相放大器简化 PSF 的测量步骤, 提高了畸变波前的测量速度和准确度, 光路示意图如图 15 所示。同时, 将改进后的 F-SHARP 技术应用于三光子显微成像系统中, 在保持小鼠颅骨完整的状态下, 实现了小鼠大脑皮层神经元的结构成像, 直至软脑膜下方  $750 \mu\text{m}$  的深度, 从而在大脑皮层中实现近乎无创的高分辨率成像。同时, 对大脑皮层下的海马体进行了高分辨率成像, 成像深度可达  $1100 \mu\text{m}$ 。

F-SHARP 技术无需专门的波前传感器, 将发射光全部用于成像, 保证了成像信噪比。F-SHARP 由于使用了双光束干涉技术, 部分激发光功率损失, 但是与传统的间接波前探测相比, 探测时间大幅缩短。此外, 再与快速相移技术相结合, 探测速度得到进一步提升, 使间接波前探测用于活体功能成像成为可

能。目前, 将间接和直接波前探测两者优势结合起来的 AO 技术已成为提升显微成像质量的研究热点之一。

## 5 结束语

具有更大成像视场、更深成像深度和更高成像分辨率的双光子显微成像系统可以为生物学和医学的研究提供更丰富、更准确的影像信息。随着科技水平的发展和生命科学的进步, AO 技术将会在显微成像领域发挥越来越重要的作用, 为成像质量的进一步突破提供强有力的技术支持, 同时显微成像也对 AO 技术提出了更多更高的要求。

目前, 脑科学和神经科学等学科的发展势头迅猛, 显微成像越来越多地被应用到活体成像尤其是功能成像中。不同活体生物组织样品产生的像差各不相同且毫无规律, 同一活体生物组织样品在不同时间产生的



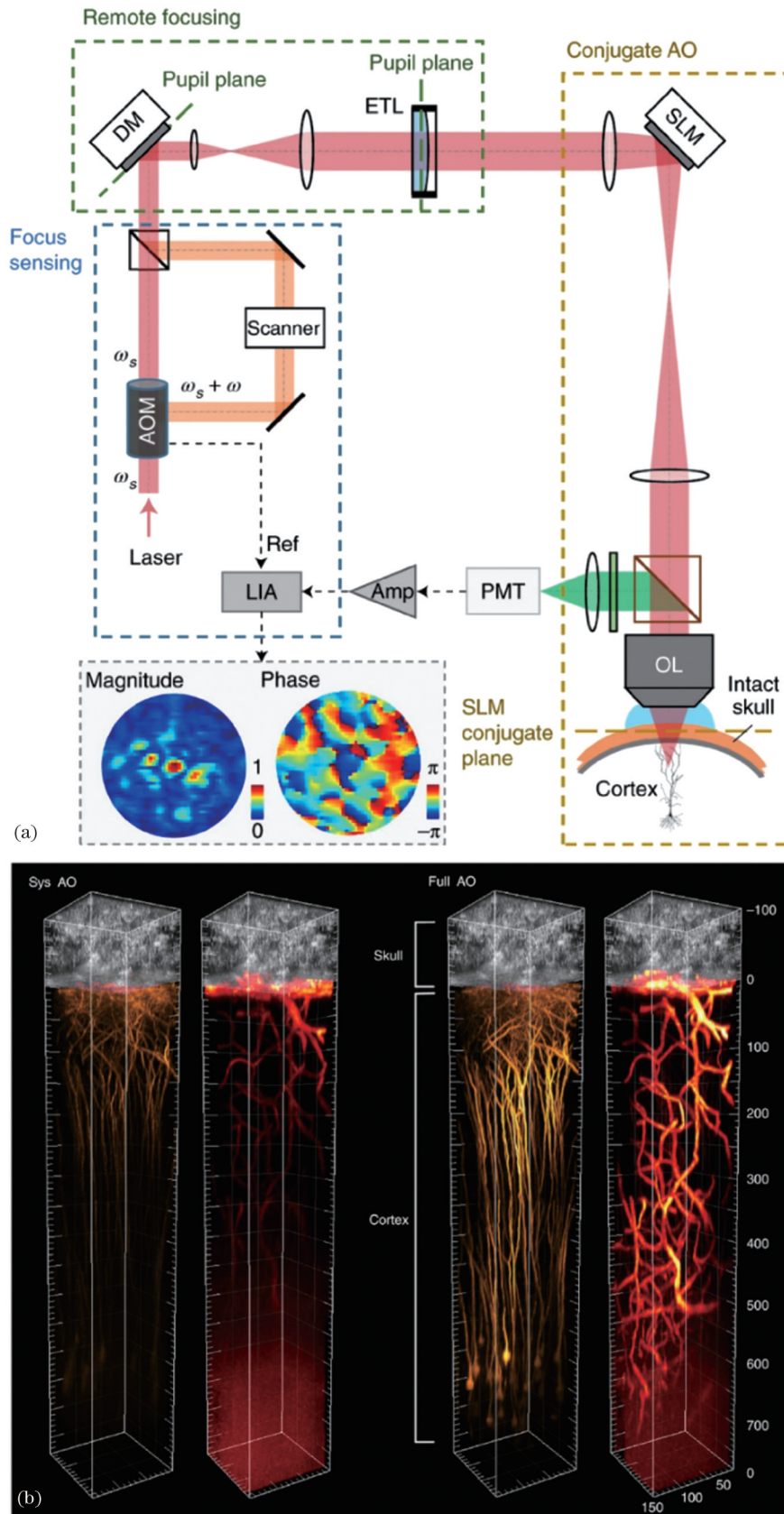


图 15 基于共轭 AO 和锁相放大器的 F-SHARP 三光子显微成像系统及其成像结果<sup>[47]</sup>。(a) 光路示意图；(b) 系统校正和全局校正后的活体小鼠大脑皮层的双光子显微成像图

Fig. 15 F-SHARP three-photon microscopic imaging system based on conjugate AO and lock-in amplifier and its imaging results<sup>[47]</sup>. (a) Schematic of optical path; (b) two-photon microscopic imaging maps of *in vivo* mouse cerebral cortex after systematic and global correction

像差也会有一定变化,这就要求 AO 技术在像差探测和校正的过程中既快速又准确。因此,加快畸变波前的探测和校正速度、提升校正的动态范围成为了实现活体快速成像的必经之路。加快探测和校正的速度既可以从提升波前传感器的性能出发,也可以从结合快速波前重建算法入手,充分发挥软硬件的自身优势。提升校正的动态范围首先要研发新型的波前校正器,或是优化提升现有波前校正器的性能。同时,也可根据实际的样品选取合适的波前校正器。比如 MEMS 变形镜的响应速度很快,但是可校正的像差范围较小;压电陶瓷变形镜可校正的像差范围较大,但是响应速度稍慢;SLM 响应速度最慢,但校正像差的精度最高。

随着波前传感器和波前校正器性能的进一步提升及各种波前重建算法的进一步优化,把各种探测、校正和控制技术有效地结合在一起将会成为活体显微成像的重点研究内容。此外,AO 技术还可以与组织光透明技术<sup>[48]</sup>、光束整形技术<sup>[49]</sup>等多种技术融合,进一步提高成像深度和成像分辨率、加快成像速度,为现代生命科学研究提供更有价值的影像信息。

### 参 考 文 献

- [1] Babcock H W. The possibility of compensating astronomical seeing [J]. Publications of the Astronomical Society of the Pacific, 1953, 65(386): 229.
- [2] Booth M J. Adaptive optical microscopy: the ongoing quest for a perfect image[J]. Light: Science & Applications, 2014, 3(4): e165.
- [3] Ji N. Adaptive optical fluorescence microscopy[J]. Nature Methods, 2017, 14(4): 374-380.
- [4] Hampson K M, Turcotte R, Miller D T, et al. Adaptive optics for high-resolution imaging[J]. Nature Reviews, 2021, 1: 68.
- [5] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. Science, 1990, 248(4951): 73-76.
- [6] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 932-940.
- [7] Svoboda K, Yasuda R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience[J]. Neuron, 2006, 50(6): 823-839.
- [8] Hoover E E, Squier J A. Advances in multiphoton microscopy technology[J]. Nature Photonics, 2013, 7(2): 93-101.
- [9] Albert O, Sherman L, Mourou G, et al. Smart microscope: an adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy[J]. Optics Letters, 2000, 25(1): 52-54.
- [10] 刘立新, 张美玲, 吴兆青, 等. 自适应光学在荧光显微镜中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(12): 120001.  
Liu L X, Zhang M L, Wu Z Q, et al. Application of adaptive optics in fluorescence microscope[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(12): 120001.
- [11] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1369-1377.
- [12] Simmonds R D, Wilson T, Booth M J. Effects of aberrations and specimen structure in conventional, confocal and two-photon fluorescence microscopy[J]. Journal of Microscopy, 2012, 245(1): 63-71.
- [13] Yang P, Liu Y, Yang W, et al. An adaptive laser beam shaping technique based on a genetic algorithm[J]. Chinese Optics Letters, 2007, 5(9): 497-500.
- [14] El-Agmy R, Bulte H, Greenaway A H, et al. Adaptive beam profile control using a simulated annealing algorithm[J]. Optics Express, 2005, 13(16): 6085-6091.
- [15] Vorontsov M A, Carhart G W, Ricklin J C. Adaptive phase-distortion correction based on parallel gradient-descent optimization [J]. Optics Letters, 1997, 22(12): 907-909.
- [16] Zhou Z, Huang J F, Li X, et al. Adaptive optical microscopy via virtual-imaging-assisted wavefront sensing for high-resolution tissue imaging[J]. PhotonIX, 2022, 3(1): 13.
- [17] Booth M J. Wave front sensor-less adaptive optics: a model-based approach using sphere packings[J]. Optics Express, 2006, 14(4): 1339-1352.
- [18] Debarre D, Botcherby E J, Watanabe T, et al. Image-based adaptive optics for two-photon microscopy[J]. Optics Letters, 2009, 34(16): 2495-2497.
- [19] Booth M J. Wavefront sensorless adaptive optics for large aberrations[J]. Optics Letters, 2007, 32(1): 5-7.
- [20] Seifert L, Tiziani H J, Osten W. Wavefront reconstruction with the adaptive Shack-Hartmann sensor[J]. Optics Communications, 2005, 245(1/2/3/4/5/6): 255-269.
- [21] Bon P, Linares-Loyez J, Feyeux M, et al. Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations[J]. Nature Methods, 2018, 15(6): 449-454.
- [22] Li C, Xia M L, Mu Q Q, et al. High-precision open-loop adaptive optics system based on LC-SLM[J]. Optics Express, 2009, 17(13): 10774-10781.
- [23] Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues[J]. Nature Methods, 2010, 7(2): 141-147.
- [24] Ji N, Sato T R, Betzig E. Characterization and adaptive optical correction of aberrations during *in vivo* imaging in the mouse cortex [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(1): 22-27.
- [25] Milkie D E, Betzig E, Ji N. Pupil-segmentation-based adaptive optical microscopy with full-pupil illumination[J]. Optics Letters, 2011, 36(21): 4206-4208.
- [26] Wang C, Ji N. Pupil-segmentation-based adaptive optical correction of a high-numerical-aperture gradient refractive index lens for two-photon fluorescence endoscopy[J]. Optics Letters, 2012, 37(11): 2001-2003.
- [27] Wang C, Ji N. Characterization and improvement of three-dimensional imaging performance of GRIN-lens-based two-photon fluorescence endomicroscopes with adaptive optics[J]. Optics Express, 2013, 21(22): 27142-27154.
- [28] Tang J Y, Germain R N, Cui M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(22): 8434-8439.
- [29] Kong L J, Cui M. *In vivo* fluorescence microscopy via iterative multi-photon adaptive compensation technique[J]. Optics Express, 2014, 22(20): 23786-23794.
- [30] 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.
- [31] Rodríguez C, Chen A, Rivera J A, et al. An adaptive optics module for deep tissue multiphoton imaging *in vivo*[J]. Nature Methods, 2021, 18(10): 1259-1264.
- [32] Gao Y F, Liu L N, Yin Y X, et al. Adaptive optics via pupil ring segmentation improves spherical aberration correction for two-photon imaging of optically cleared tissues[J]. Optics Express, 2020, 28(23): 34935-34947.
- [33] Park J H, Kong L J, Zhou Y F, et al. Large-field-of-view imaging by multi-pupil adaptive optics[J]. Nature Methods, 2017, 14(6): 581-583.
- [34] Sinefeld D, Paudel H P, Ouzounov D G, et al. Adaptive optics in multiphoton microscopy: comparison of two, three and four photon fluorescence[J]. Optics Express, 2015, 23(24): 31472-31483.



- [35] Streich L, Boffi J, Wang L, et al. High-resolution structural and functional deep brain imaging using adaptive optics three-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(10): 1253-1258.
- [36] Yao J, Gao Y F, Yin Y X, et al. Exploiting the potential of commercial objectives to extend the field of view of two-photon microscopy by adaptive optics[J]. *Optics Letters*, 2022, 47(4): 989-992.
- [37] Cha J W, Ballesta J, So P T C. Shack-Hartmann wavefront-sensor-based adaptive optics system for multiphoton microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(4): 046022.
- [38] Tao X D, Norton A, Kissel M, et al. Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(23): 5075-5078.
- [39] Wang K, Milkie D E, Saxena A, et al. Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(6): 625-628.
- [40] Wang K, Sun W Z, Richie C T, et al. Direct wavefront sensing for high-resolution *in vivo* imaging in scattering tissue[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7276.
- [41] Liu R, Li Z Y, Marvin J S, et al. Direct wavefront sensing enables functional imaging of infragranular axons and spines[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(7): 615-618.
- [42] Qin Z Y, He S C, Yang C, et al. Adaptive optics two-photon microscopy enables near-diffraction-limited and functional retinal imaging *in vivo*[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 79.
- [43] Chen C P, Qin Z Y, He S C, et al. High-resolution two-photon transcranial imaging of brain using direct wavefront sensing[J]. *Photonics Research*, 2021, 9(6): 1144-1156.
- [44] Papadopoulos I N, Jouhannau J S, Poulet J F A, et al. Scattering compensation by focus scanning holographic aberration probing (F-SHARP)[J]. *Nature Photonics*, 2017, 11(2): 116-123.
- [45] Papadopoulos I N, Jouhannau J S, Takahashi N, et al. Dynamic conjugate F-SHARP microscopy[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 110.
- [46] Berlage C, Tantirigama M L S, Babot M, et al. Deep tissue scattering compensation with three-photon F-SHARP[J]. *Optica*, 2021, 8(12): 1613-1619.
- [47] Qin Z Y, She Z T, Chen C P, et al. Deep tissue multi-photon imaging using adaptive optics with direct focus sensing and shaping [J]. *Nature Biotechnology*, 2022: 1-9.
- [48] 高玉峰, 夏先园, 李慧, 等. 利用波前调制技术提升光透明样品的双光子成像分辨率[J]. *中国激光*, 2017, 44(1): 0107002.
- Gao Y F, Xia X Y, Li H, et al. Wavefront modulation improves two-photon microscopy resolution of clearing tissues[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2017, 44(1): 0107002.
- [49] Yu Z P, Li H H, Zhong T T, et al. Wavefront shaping: a versatile tool to conquer multiple scattering in multidisciplinary fields[J]. *Innovation*, 2022, 3(5): 100292.

## Application of Adaptive Optics in Two-photon Microscopic Imaging

Zhang Chen<sup>1</sup>, Gao Yufeng<sup>2</sup>, Ye Shiwei<sup>2</sup>, Li Hui<sup>2\*</sup>, Zheng Wei<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*School of Information and Communication, Shenzhen Institute of Information Technology, Shenzhen 518172, Guangdong, China;*

<sup>2</sup>*Research Center for Biomedical Optics and Molecular Imaging, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China*

### Abstract

**Significance** Two-photon microscopy (TPM) has been widely used in biological imaging owing to its sub-micron lateral resolution, intrinsic optical sectioning, and deep penetration abilities. TPM enables the observation of cellular and sub-cellular dynamics in deep live tissues within highly complex and heterogeneous environments such as the mammalian brain, thereby providing critical *in situ* and *in vivo* information.

However, because of the nonuniformity of the refractive index of biological tissues, the laser is distorted and scattered during propagation. Consequently, the focus point becomes a diffuse spot, which leads to a decreased imaging depth and poor resolution of TPM.

Adaptive optics (AO) technology was first applied to TPM in 2000, where a genetic algorithm was used to calculate the wavefront distortion and a deformable mirror (DM) was used to correct the aberration introduced by biological samples. Since then, various AO schemes have been developed for a wide range of high-resolution microscopes to advance the development of biological exploration.

In this study, the sources and characteristics of aberrations in TPM are examined, and different detection and correction methods in AO are summarized. The different applications of AO in TPM in recent years are comprehensively reviewed.

**Progress** For AO technology, wavefront detection methods are generally divided into direct wavefront detection, which uses a wavefront sensor (WS) to detect wavefronts, and indirect wavefront detection, which estimates the aberrated wavefront using iterative algorithms.

In 2010, the pupil-segmentation AO method was proposed by Ji *et al.* This method involves the division of the pupil into several sub apertures and the use of spatial light modulator (SLM) to modulate the wavefront phase, and the imaging resolution of a fixed mouse cortex slice was restored to the near-diffraction-limited (Fig. 2). In 2012, Tang *et al.* proposed an iterative multiphoton adaptive compensation technique that exploits the nonlinearity of multiphoton signals to determine and compensate for distortions and focus light inside deep tissues. The technique was tested using a variety of highly heterogeneous biological samples, and an imaging resolution of approximately 100 nm was obtained (Fig. 3). In 2014, Wang *et al.* adopted a digital micromirror device (DMD) to rapidly modulate the intensity or phase of light rays of multiple pupil segments in parallel to determine the wavefront aberration

(Fig. 4). Subsequently, Park *et al.* developed a multi-pupil adaptive optics (MPAO) method in 2017 that allows the simultaneous correction of a wavefront over a field of view of  $450\ \mu\text{m} \times 450\ \mu\text{m}$ , thereby expanding the correction area to nine times larger than those of conventional methods (Fig. 7). Recently, Rodríguez *et al.* developed a compact adaptive optics module and incorporated it into both TPM and three-photon microscopy to correct tissue-induced aberrations. They also demonstrated that their technology allows the *in vivo* high-resolution imaging of both neuronal structures and somatosensory-evoked calcium responses in the spinal cord of mice at great depths (Fig. 5).

Generally, the indirect wavefront detection system is relatively simple and easy to implement, but it is also time-consuming and has high computational expense. In the typical TPM, the excited fluorescence is limited to a small area near the focus. Such fluorescence points act as a natural guide star for the wavefront sensor to allow the application of direct wavefront detection in TPM. From 2010 to 2013, Cha *et al.* and Tao *et al.* used Shark-Hartmann wavefront sensor (SHWS) to detect the emission light and DM to correct the excitation light by injecting foreign fluorescent substances into the sample as a guide star for the *in vitro* imaging of mice brain tissue (Fig. 10). In 2014, Wang *et al.* proposed descanning technology to accumulate all the transmitted optical signals for wavefront detection and improve the quality and efficiency of direct wavefront detection. The SLM was used to correct the excitation light and *in vivo* structural imaging was performed on the brain neurons of mice (Fig. 11). In 2019, Liu *et al.* used near-infrared fluorescent dye as a guide star for direct wavefront detection, but replaced the SLM with DM. Structural imaging was carried out on the microvessels and neurons of mice, and an imaging depth of up to  $1100\ \mu\text{m}$  was obtained (Fig. 12).

Compared with indirect wavefront detection, direct wavefront detection is faster and more accurate. However, the optical system for direct wavefront detection is complex, which reduces the imaging signal-to-noise ratio. To effectively use the two detection methods, the real distorted wavefront should be obtained in the optical detection path without a wavefront sensor. In 2017, Papadopoulos *et al.* proposed the focus scanning holographic aberration probing (F-SHARP) method, which directly measures the point spread function (PSF) of the distorted wavefront using interference technology and corrects the wavefront using the phase conjugation of the PSF (Fig. 14). In 2022, Qu *et al.* combined a conjugate AO with the F-SHARP system and used a phase-locked amplifier to simplify the measurement steps of PSFs, which improves the measurement speed and correction accuracy (Fig. 15).

**Conclusions and Prospects** Currently, there is an increasing demand for high-resolution structural and functional neuroimaging systems owing to the rapid development of brain science. However, the aberrations caused by tissues are complex, irregular, and rapidly changing and fast aberration detection and accurate correction systems are required. Therefore, it is necessary to use high-performance adaptive elements such as a high sensitivity wavefront sensor and correction elements with a high refresh rate and large compensation range. In addition, fast and accurate compensation algorithms can also improve the AO performance. In summary, the effective combination of various detection, correction and control techniques is the focus of *in vivo* microscopic imaging, which provides valuable information for scientific research.

**Key words** bio-optics; two-photon microscopic imaging; adaptive optics; wavefront aberration; wavefront correction