

## 自适应光学在超分辨荧光显微镜中的应用

王翔宇, 陈曦, 曹曦, 马冬晗\*

大连理工大学光电工程与仪器科学学院, 辽宁 大连 116024

**摘要** 超分辨荧光显微镜突破了传统荧光显微镜的分辨率限制,使得人们能够在纳米量级分辨率下观察细胞和组织样品,极大地推动了生命科学的发展。在这一技术中,仪器和样品引入的像差均会导致空间分辨率降低,进而导致成像质量恶化。为此,人们引入了自适应光学技术,通过直接或间接的手段探测像差,再通过波前校正元件来校正像差,从而获得高质量的超分辨图像。本文介绍了自适应光学的起源与工作原理,总结了其在超分辨荧光显微镜中的应用,并展望了其未来的发展前景。

**关键词** 显微; 荧光显微镜; 超分辨; 自动与自适应光学; 像差补偿; 波前传感

**中图分类号** O436 **文献标志码** A

**DOI:** 10.3788/CJL231342

## 1 引言

生命科学领域的发现总是与显微镜的发展紧密相连。荧光显微镜具有标记特异性、观察非侵入性等优点,是探索微观世界的重要工具。然而,由于光的衍射特性,传统荧光显微镜的分辨率止步于横向 200 nm、轴向 500 nm,限制了人们对细胞和组织内微小结构的观察。为了突破这一限制,超分辨荧光显微成像技术应运而生。

现有的超分辨荧光显微成像技术主要分为三种。第一种是基于点扩散函数(PSF)修饰的扫描成像方法,代表性技术是受激发射损耗(STED)显微<sup>[1]</sup>;第二种是基于频谱扩展的宽场成像方法,代表性技术是结构光照明显微(SIM)<sup>[2]</sup>;第三种是基于单分子定位的宽场成像方法(SMLM),代表性技术是光激活定位显微(PALM)<sup>[3]</sup>和随机光学重建显微(STORM)<sup>[4]</sup>。

在超分辨荧光显微镜中,像差的存在会导致空间分辨率降低,进而导致成像质量恶化<sup>[5]</sup>。像差的来源主要有三类:一是显微成像仪器自身的像差,即非理想光学元件、光路调节误差等因素造成的像差,主要形式为低阶彗差、像散等,可使用荧光珠等基准物对其进行预先测量并予以修正;二是显微物镜浸润介质与生物样品折射率不匹配产生的像差,主要形式是幅值与成像深度成正比的低阶球差,可通过调节物镜校正环来修正,但调节范围有限<sup>[6-7]</sup>;三是样品内部折射率不均匀引起的像差,即波前受到高度复杂的生物和光学环境的影响而发生畸变,这类像差是光学系统中最难消

除的像差<sup>[8]</sup>。

为消除超分辨荧光显微镜中的像差,人们引入了自适应光学(AO)技术,即通过直接或间接的手段探测像差,并利用变形镜(DM)、空间光调制器(SLM)、自适应透镜(AL)等波前校正元件校正像差,从而获得高质量的超分辨图像。本文首先介绍了自适应光学的起源与工作原理,接着总结了其在超分辨荧光显微镜中的应用,最后展望了其未来的发展前景。

## 2 自适应光学的起源与工作原理

1953年,美国科学家 Babcock<sup>[9]</sup>首次提出了自适应光学的概念,即实时测量大气湍流引起的波前像差,并通过变形镜产生光学相移,以进行实时补偿。1957年,苏联科学家 Linnik<sup>[10]</sup>首次提出了人造导星的概念,即在待观测恒星的位置发射一个约 10 km 高度的信标,以测量大气湍流扰动。上述构想使得光学系统能够根据外界环境进行自动调整,从而保持最佳工作状态,因此被命名为“自适应光学”。20世纪 60—70 年代,美国军方将自适应光学应用于卫星成像与激光传输等领域<sup>[11]</sup>。1973年,美国 Itek 公司研制出了世界首个实时大气补偿系统,该系统可校正 300 m 水平光路上的波前像差<sup>[12]</sup>。1982年,第一台卫星目标高分辨率自适应光学成像系统被应用于美国 AMOS 光学站,用于识别近地空间目标<sup>[13]</sup>。20世纪 80 年代末,自适应光学开始应用于天文观测。欧洲南方天文台与法国空间研究院等机构合作开展了名为“Come-On”的自适应光学计划,并于 1989 年将其成果应用于法国 Haute

收稿日期: 2023-10-31; 修回日期: 2023-11-23; 录用日期: 2023-11-28; 网络首发日期: 2023-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(62305041)、辽宁省自然科学基金(2023-MS-103)、大连理工大学引进人才科研启动项目(DUT22RC(3)072)

通信作者: \*madonghan@dlut.edu.cn

Provence 天文台,首次获得了自适应光学校正的天文目标图像<sup>[14]</sup>。我国对自适应光学的研究始于 20 世纪 80 年代。1982 年,中国科学院光电技术研究所研制出了第一块国产 7 单元整体压电变形镜<sup>[15]</sup>;1990 年,在 1.2 m 口径望远镜上搭建了 21 单元自适应光学系统,显著提高了望远镜的分辨率;2014 年,在 1.8 m 口径望远镜上安装了四棱锥波前传感器,获得了高分辨率恒星图像<sup>[16]</sup>。中国科学院长春光学精密机械与物理研究所自主研制出了多款不同单元连续镜面变形镜,并将其应用于自适应光学系统<sup>[17-20]</sup>。此外,国家天文台、中国科学院上海光学精密机械研究所、国防科技大学、北京理工大学等单位也开展了自适应光学的相关研究。21 世纪以来,随着光学显微成像技术的发展,自适应光学被广泛应用于生物成像领域<sup>[21-22]</sup>。

基于直接波前探测的自适应光学系统主要包括波前探测器、波前控制器和波前校正器[如图 1(a)所示],先由波前探测器探测波前像差,再由波前控制器根据波前探测器探测到的信息,计算出相应的控制信

号,最后由波前校正器将控制信号转变为波前相位变化,使波前恢复到无像差状态。

波前探测器包括 Shack-Hartmann 传感器<sup>[23-28]</sup>、四棱锥传感器<sup>[29]</sup>、分区孔径波前传感器<sup>[30-31]</sup>、剪切干涉仪<sup>[32]</sup>等。其中,Shack-Hartmann 波前传感器(SHWS)是迄今为止应用最为广泛的波前传感器<sup>[23-28]</sup>,由微透镜阵列和探测器组成。如图 1(b)所示,光束入射到放置于光瞳共轭面上的微透镜阵列,被分割成若干个子波前,各子波前会聚后在探测器上形成光斑阵列。当入射波前为理想平面波时,探测器上得到的是一组均匀分布的光斑;当入射波前携带像差时,探测器上得到的光斑将发生偏移。当光束来自点光源时,探测器上得到的是点阵,可通过质心算法计算偏移量;当光束来自扩展光源时,即基于场景的 SHWS<sup>[26-28]</sup>,探测器上得到的是图案阵列,可通过互相关算法计算偏移量。由于偏移量与对应子波前的倾斜角成正比,因而可计算出每个子波前的倾斜角,并可根据相邻子波前的连续性,重建出整个波前。

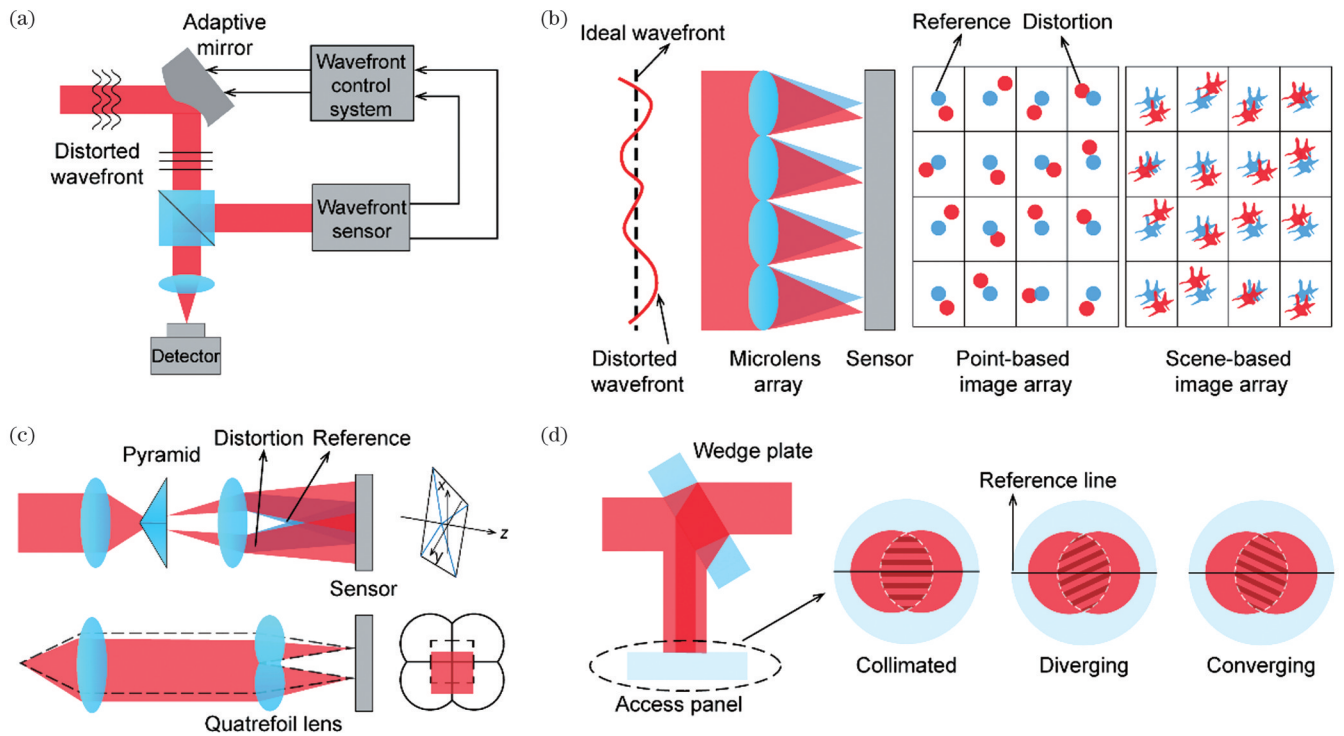


图 1 基于直接波前探测的自适应光学的工作原理。(a) 自适应光学系统; (b) Shack-Hartmann 波前传感器工作原理; (c) 四棱锥波前传感器(上)和分割孔径波前传感器(下)的工作原理; (d) 剪切干涉仪的工作原理

Fig. 1 Working principle of AO on basis of direct wavefront sensing. (a) Schematic of the AO system; (b) working principle of Shack-Hartmann wavefront sensor; (c) working principle of pyramid wavefront sensor (top) and partitioned aperture wavefront sensor (bottom); (d) working principle of shearing interferometer

四棱锥波前传感器(PWS)<sup>[29]</sup>和分割孔径波前传感器(PAWS)<sup>[30-31]</sup>的工作原理相似,都通过探测平面上的 4 个子图像来测量波前,如图 1(c)所示。不同的是,前者使用四棱锥而后者使用 4 个离轴透镜切割并组合成四叶草形状,将入射波前分为 4 个独立的区域。

传感器输出信号为

$$\begin{bmatrix} S_x \\ S_y \end{bmatrix} = \frac{1}{\sum I_i} \begin{bmatrix} (I_3 + I_4) - (I_1 + I_2) \\ (I_2 + I_4) - (I_1 + I_3) \end{bmatrix}, \quad (1)$$

式中: $I_i(i=1, 2, 3, 4)$ 为 4 个区域的图像强度; $[S_x \ S_y]$ 与入射波前的局部梯度 $[G_x \ G_y]$ 成反比,后者与波前



相位  $\phi$  的关系为  $\nabla\phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} G(x, y)$ ,  $\bar{\lambda}$  为平均照明波长, 据此可重建出波前相位  $\phi$ 。相比于 PWS, PAWS 使用  $3f$  成像, 允许透镜直接置于物镜光瞳面的共轭位置上, 更为简单实用; PAWS 对波长和偏振态不敏感, 样品适用性更强。

剪切干涉仪 (SI) 常被用于判断光束的准直程度, 此外, 还可以通过判读干涉条纹的形状来分析光束的波前分布<sup>[32]</sup>。如图 1(d) 所示, 光束入射至楔形光学平板, 平板前后两表面反射的光发生干涉, 通过观察干涉条纹, 就可以判断入射光束的波前分布。若条纹平行于参考线, 则光束为准直光束; 若条纹与参考线不平行, 则光束为发散或会聚光束。SI 判断光束准直需要足够的相干长度与较低的波前像差, 而且要求楔形板的尺寸与光束直径匹配。相比于 SHWS, SI 具有更高的横向分辨率, 但当干涉条纹存在像散、球差、彗差等像差时, 条纹就会出现弯曲, 难以判断是否与参考线平行。

基于间接波前探测的自适应光学系统不需要使用波前传感器, 其根据显微镜采集到的图像来推断像差, 并利用波前校正器予以修正。该系统通常利用变形镜、SLM 等波前校正元件, 输出一系列像差修正方案。采集相应的图像, 选择图像亮度、锐度等作为度量标准评估图像的质量, 并通过高斯拟合、二次拟合等方式, 得到度量标准最优时对应的像差修正方案, 就可以生成对应的波前控制信号。其中最典型的方法是模态波前传感<sup>[33]</sup>, 即: 利用波前校正元件产生一系列互相正交的像差模态 (通常近似于 Zernike 像差), 对每一种模态输入不同的幅值, 得到对应的图像, 然后计算其度量标准, 再通过拟合得到度量标准最优时对应的幅值, 最后将所有模态的幅值叠加起来, 得到最终的像差修正方案。此外, 也可以采用遗传算法、粒子群算法、深度学习等群智能优化算法, 根据度量标准对像差修正方案进行优化迭代, 提高收敛速度。相比于直接波前探测, 间接波前探测只需要在光路中加入波前校正元件, 硬件上易于实现, 因此已被广泛应用于超分辨显微成像技术。

波前校正元件是一种可以快速改变波前相位的主动光学器件, 也是自适应光学系统的核心器件。波前像差实质上是光程 (OP) 不均匀, 光程定义为光在介质中通过的距离与传输介质折射率的乘积。因此, 可以通过改变传输距离或者介质折射率来实现波前校正。波前校正元件主要包括变形镜、SLM 与自适应透镜等。变形镜通常包含几十到数百个驱动器, 通过驱动器的伸缩来改变其表面形状, 从而改变传输距离, 实现波前校正。其优点是校正速度快 (超过 1 kHz)、调制精度高 (最小步长约为 1 nm), 而且对入射光的偏振态无要求, 缺点是空间分辨率低 (反射镜数量少)、驱动

电压高 (超过 200 V)<sup>[34-35]</sup>。SLM 通常包含 10 万甚至上百万个液晶单元, 通过改变施加在液晶像素分子上的电压, 使液晶像素分子的指向矢与入射光的偏振方向产生夹角, 就可以改变液晶单元的折射率, 实现波前校正。其优点是空间分辨率高 (液晶单元数量多)、驱动电压低 (约为 10 V), 缺点是响应速度慢 (约 50 Hz), 只能调制线偏振光的相位, 因此光子利用率低<sup>[36-37]</sup>。自适应透镜是一种新型的可校正任意像差的多驱动器透镜, 由两个厚度约为 150  $\mu\text{m}$  的薄玻璃窗组成, 每个玻璃窗上都有压电驱动环, 通过对其施加电压使薄玻璃窗产生弯曲, 就可以改变传输距离, 实现波前校正。其优点是可以紧贴物镜放置, 便于与各种成像系统兼容, 缺点是驱动器数量较少 (约为 20 个)、空间分辨率较低<sup>[38-39]</sup>。

### 3 自适应光学在 STED 显微镜中的应用

STED 显微镜的工作原理是: 采用两束中心重合的激光同时照射样品, 一束为激发光, 使位于艾里斑内部的荧光分子处于激发态; 另一束为饱和环形损耗光, 使艾里斑边缘被激发的光子迅速返回基态。因此, 只有艾里斑中心区域的光子能够自发辐射荧光, 从而缩小 PSF 尺寸, 实现超分辨成像<sup>[1, 40-41]</sup>, 如图 2(a) 所示。STED 成像光路由激发光路、发射光路和损耗光路组成, 其中激发光路的像差影响聚焦照明的亮度, 发射光路的像差影响荧光信号在共聚焦针孔上的会聚程度, 即影响探测效率。这些与共聚焦显微镜是一致的。与共聚焦显微镜不同的是, 损耗光路的像差会导致环形光束中心强度不为 0, 使成像分辨率显著降低, 因此对成像质量的影响远大于其他两路<sup>[42-43]</sup>, 是自适应光学校正的关键对象。目前, STED 显微镜主要采用间接波前探测中的模态波前传感技术<sup>[33]</sup>对像差进行测量和校正。

2012 年, Gould 等<sup>[44]</sup>首次提出将自适应光学应用于 STED 显微镜校正激发光路和损耗光路的像差, 该方法通过对多个 Zernike 像差模态扫描不同的幅值来获得一系列图像。对于激发光路, 将图像的锐度  $S$  作为度量标准。 $S$  的计算公式为

$$S = \frac{\sum_{n,m} \mu_{n,m} \hat{I}_{n,m} (n'^2 + m'^2)}{\sum_{n,m} \hat{I}_{n,m}}, \quad (2)$$

式中:  $\hat{I}_{n,m}$  为图像的离散傅里叶变换;  $n' = n - \frac{N-1}{2}$ ,  $m' = m - \frac{M-1}{2}$ ,  $n$  和  $m$  分别为从 0 到  $N-1$  以及从 0 到  $M-1$  的坐标;  $\mu_{n,m}$  为圆形掩模。对于损耗光路, 将图像亮度  $B = \sum_{x,y} I(x, y)$  和锐度  $S$  加权得到新的度量标准, 即

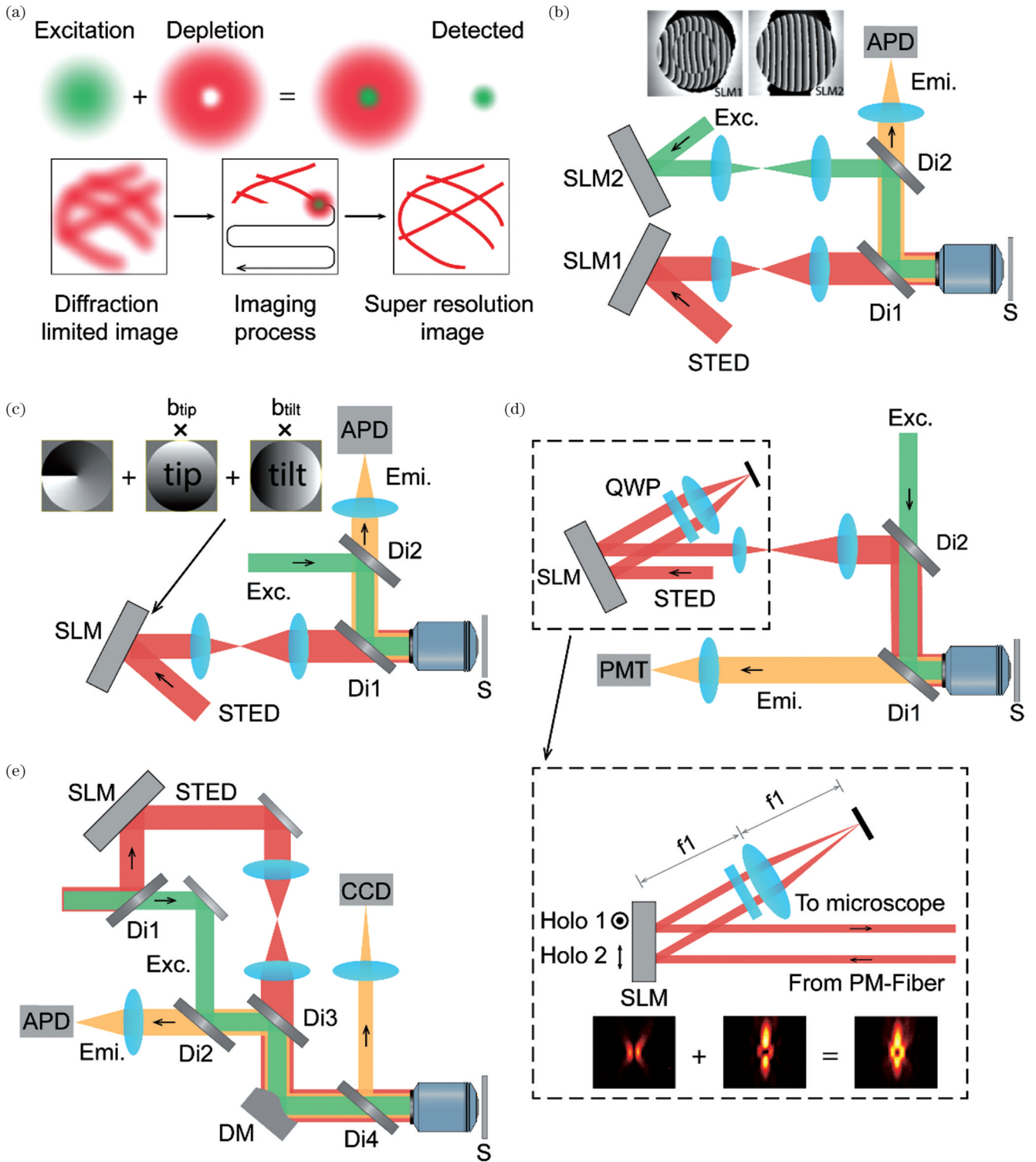


图 2 自适应光学在 STED 显微镜中的应用。(a) STED 显微成像的原理；(b) 使用两个 SLM 分别校正激发光路和损耗光路的像差<sup>[44]</sup>；(c) 利用自适应光学对准激发光路和损耗光路<sup>[45]</sup>；(d) 离轴放置 SLM<sup>[46]</sup>；(e) 利用变形镜和 SLM 校正三条光路的像差<sup>[47]</sup> (S, 样品; Di, 二向色镜; APD, 雪崩光电二极管; Exc., 激发光; Emi., 发射光; QWP, 四分之一波片; PMT, 光电倍增管)

Fig. 2 Application of AO in STED microscopy. (a) Schematic of STED microscopy; (b) using two SLMs to correct aberrations in both excitation and STED paths<sup>[44]</sup>; (c) using AO to align the excitation and STED paths<sup>[45]</sup>; (d) using the SLM in an off-axis holography configuration<sup>[46]</sup>; (e) using DM and SLM to correct aberrations in all the three paths<sup>[47]</sup> (S, specimen; Di, dichroic mirror; APD, avalanche photodiode; Exc., excitation beam; Emi., emission beam; QWP, quarter wave plate; PMT, photomultiplier)

$$M = S + \sigma\beta B \left\{ \frac{1}{1 + \exp[-k(S - S_T)]} \right\}, \quad (3)$$

式中:  $\sigma$  根据像差的种类设为 +1 或 -1;  $\beta, k, S_T$  为设定的经验值。使用上述度量标准评估像差后, 再使用两个 SLM 分别校正激发光路和损耗光路的像差, 如



图 2(b)所示。利用该方法对斑马鱼视网膜切片上方 25  $\mu\text{m}$  深度处的荧光珠成像,实现了 250 nm 的轴向分辨率。在此基础上,2013年,Gould等<sup>[45]</sup>又提出了利用自适应光学对准激发光路和损耗光路的方法。通过调节损耗光束相对于激发光束的倾斜角,可以使两束光完全对准,如图 2(c)所示。在该方法中,采集样品的 STED 图像后,先根据式(3)定义的度量标准进行粗调,随后根据亮度进行精调,最终可将对准精度提高到 4.3 nm  $\pm$  2.3 nm。

2014年,Lenz等<sup>[46]</sup>提出了一种离轴放置 SLM 的方法。他们用一个 SLM 在两个正交偏振分量上分别产生二维 STED 对应的甜甜圈形状和三维 STED 对应的瓶子形状,同时通过校正损耗光路的像差,获得了最优的三维分辨率,如图 2(d)所示。该方法基于 Zernike 多项式描述的相位函数,在 STED 成像之前通过优化 200 nm 金纳米球背向反射生成的 PSF,校正仪器引入的像差;在成像时,利用球差和折射率公式,校正不同深度处折射率不匹配引起的球差。他们利用该方法对自然杀伤细胞和靶细胞之间的微管蛋白进行了成像,在 8~10  $\mu\text{m}$  深度处实现了横向 120 nm、轴向 173 nm 的分辨率。

SLM 只能调制线偏振光的相位,无法校正发射光路的像差。鉴于此,2016年,Patton等<sup>[47]</sup>提出了一种利用双自适应光学器件(变形镜与 SLM)校正厚组织样本像差的方法,该方法可以同时校正三条光路的像差。对于激发光路和发射光路,仍然使用图像亮度作为度量。对于损耗光路,为减小经验参数设置的影响,改用傅里叶环相关(FRC)<sup>[48]</sup>作为度量标准,即

$$F(q) = \frac{\sum_{q \in \text{circle}} f_1(q) f_2(q)^*}{\sqrt{\sum_{q \in \text{circle}} |f_1(q)|^2 \sum_{q \in \text{circle}} |f_2(q)|^2}}, \quad (4)$$

式中: $f_1(q)$ 和 $f_2(q)$ 均为图像的傅里叶变换。这样只需要设置一个经验参数 $q$ 即可。使用上述度量标准评估像差后,通过放置在激发光路、发射光路和损耗光路重合位置上的变形镜对三条光路的像差进行粗略校正,再使用 SLM 对损耗光路的像差进行精细校正,如图 2(e)所示。Patton等利用该方法对完整果蝇大脑突触中的囊泡谷氨酸转运体进行了超分辨成像,成像深度达到了 10  $\mu\text{m}$ <sup>[47]</sup>。

2019年,Zdankowski等<sup>[49]</sup>提出了一种提高损耗光路像差校正精度的方法。该方法将图像的亮度作为度量标准。首先将激发光束和环形损耗光束相结合,用金纳米球产生的信号寻找图像亮度的最大值,以修正仪器引入的像差;随后将损耗光束改为高斯光束,将其与激发光束共同作用于样品,用其产生的信号寻找图像亮度的最小值,以修正样品引入的像差,达到最优的损耗效率。他们利用该方法对 15  $\mu\text{m}$  深度处的有丝分

裂纺锤体实现了三维分辨率为 50 nm  $\times$  50 nm  $\times$  100 nm 的超分辨成像。除了按上述方法校正损耗光路外,对于激发光路,还可以直接使用样品产生的信号来寻找图像亮度的最大值。在此基础上,2020年,Zdankowski等<sup>[50]</sup>提出了使用双 SLM 分别校正激发光路和损耗光路像差的方法,并利用该方法对多巴胺神经元中的 hiPSC 衍生轴突进行了成像,如图 3(a)所示,在 80  $\mu\text{m}$  深度处实现了横向 204 nm、轴向 310 nm 的分辨率。

2020年,Antonello等<sup>[51]</sup>提出了使用多尺度小波分析来量化显微镜像差造成的分辨率损失的方法,并将其应用于 STED 显微镜。相比于傅里叶分析,小波分析具有同时定位空间和频率的能力,是检测像差引起的图像分辨率变化的理想工具。该方法对每个 Zernike 像差模态扫描一系列幅值,在 4 种尺度下进行小波分析,找寻极大值  $m_{\max}$ 、极小值  $m_{\min}$ 、拟合方差  $\epsilon$ ,以及对应的像差  $c_1 \sim c_4$ ,并加权得到最终的像差  $c = \sum_{i=1}^4 s_i c_i / \sum_{i=1}^4 s_i$ ,其中权重定义为

$$s = \frac{(m_{\max} - m_{\min})^3}{m_{\max} \epsilon}. \quad (5)$$

Antonello等利用该方法对 14  $\mu\text{m}$  深度处组织型海马切片中的 CA1 锥体神经元实现了超分辨成像。

4Pi-STED 是一种可提供各向同性三维分辨率的超分辨显微成像技术,深受研究人员的青睐<sup>[52]</sup>。然而,由于受到像差的影响,这一技术通常只能用于对薄细胞样品成像。2021年,Hao等<sup>[53]</sup>将自适应光学与 4Pi-STED 技术相结合,成功地将 4Pi 显微镜的应用范围扩展到了全细胞和组织。该方法使用同一激光的两个正交偏振分量来产生二维和三维的损耗光束,并将两个变形镜分别放置于上下两路,根据模态波前传感测量结果对像差进行校正,如图 4 所示。Hao等利用该方法对细胞中的微管、高尔基体、内质网、线粒体等,以及组织中的神经元突触和环状管进行了超分辨成像,三维分辨率均优于 50 nm。

上述方法均利用间接波前探测中的模态波前传感技术来推断像差。事实上,其他间接或直接波前探测技术也可以用来测量 STED 显微镜的像差。例如,2018年,Wang等<sup>[54]</sup>提出了利用遗传算法实现 STED 显微镜中损耗光路像差测量的方法,并通过 SLM 予以校正。该方法将金纳米球背向散射信号的幅值作为度量标准,通过损耗光路中的 SLM 对仪器和样品引入的像差进行校正,最终实现了 24  $\mu\text{m}$  深度处斑马鱼视网膜和 100  $\mu\text{m}$  深度处斑马鱼胚胎切片的超分辨成像。2021年,Velasco等<sup>[55]</sup>将自适应光学与双光子激发、有机染料 ATTO590、长工作距离水浸物镜相结合,实现了活鼠大脑中神经元的成像。他们利用双光子激发产生导星,将其输入到 SHWS 中测量像差,再利用变形镜予以校正。他们利用该方法对 164  $\mu\text{m}$  深度处的固定鼠脑[如图 3(b)所示]和 76  $\mu\text{m}$  深度处的活体鼠脑实

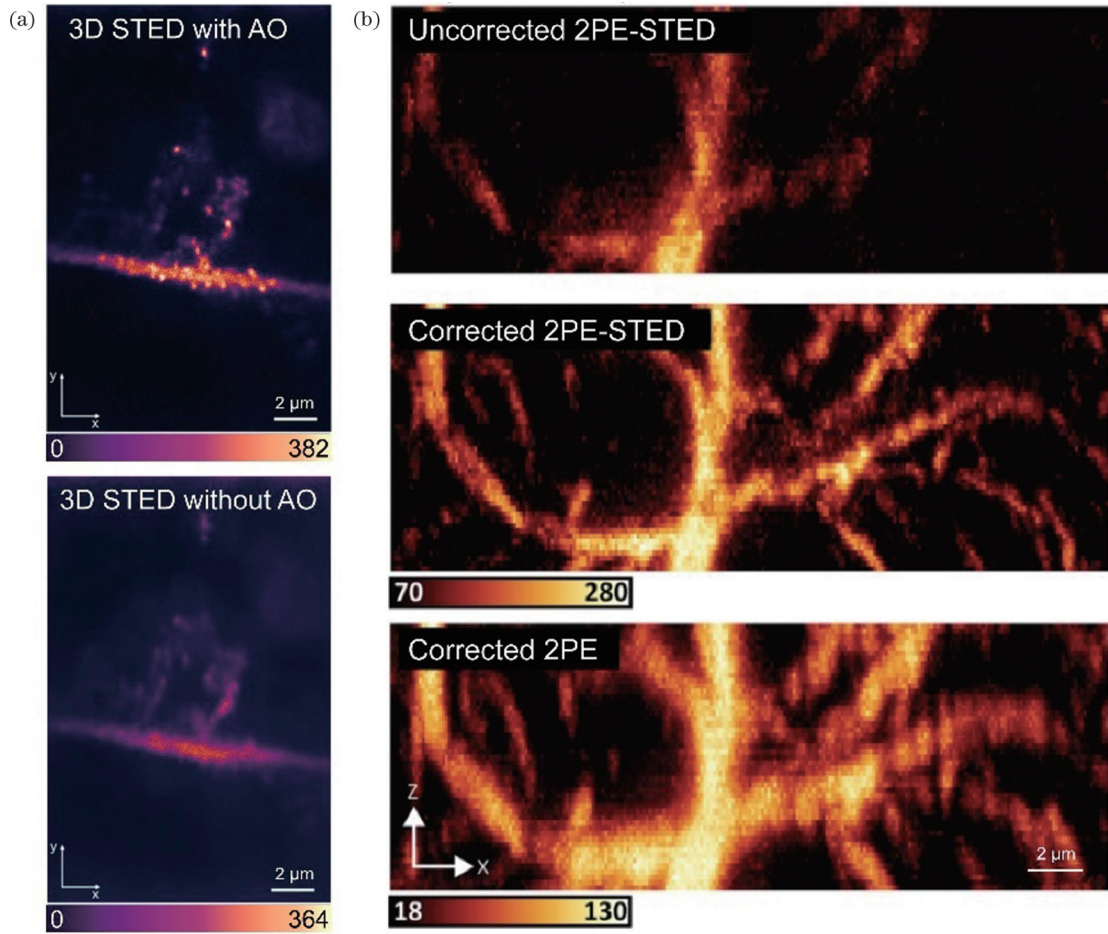


图 3 使用自适应光学前后 STED 成像结果对比。(a)多巴胺神经元中的 hiPSC 衍生轴突在 80 μm 深度处的成像结果<sup>[50]</sup>；(b)固定鼠脑组织中的星形胶质细胞在 164 μm 深度处的成像结果<sup>[55]</sup>  
 Fig. 3 Comparison of STED images with and without AO. (a) Imaging of axon structures of hiPSCs in dopamine neurons at a depth of 80 μm<sup>[50]</sup>; (b) imaging of astrocytes in fixed mouse brain tissues at a depth of 164 μm<sup>[55]</sup>

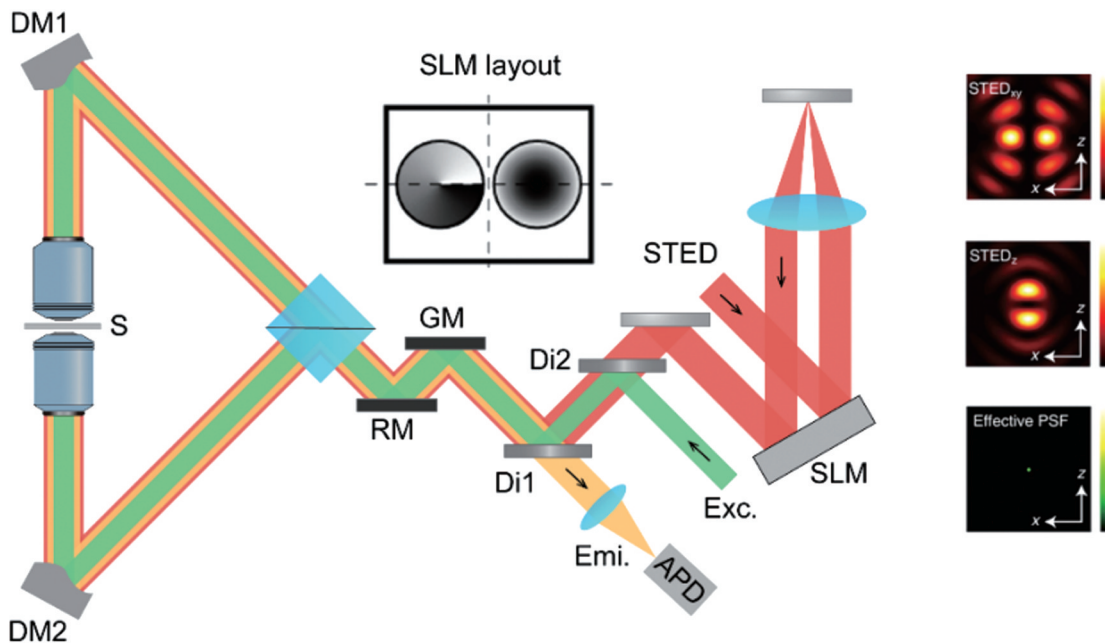


图 4 在 4Pi-STED 显微镜中应用自适应光学<sup>[53]</sup>。S, 样品; Di, 二向色镜; APD, 雪崩光电二极管; Exc., 激发光; Emi., 发射光; RM/GM, 振镜  
 Fig. 4 Application of AO in 4Pi-STED microscopy<sup>[53]</sup>. S, specimen; Di, dichroic mirror; APD, avalanche photodiode; Exc., excitation beam; Emi., emission beam; RM, resonant mirror; GM, galvo mirror



现了超分辨成像。

#### 4 自适应光学在 SIM 显微镜中的应用

SIM 显微镜的工作原理是:采用点阵、条纹等周期性结构光场照明样品,解析出普通显微镜无法获得的高频信息;通过设置不同方向和位置的照明结构以及后续的数据处理,在所有方向上将分辨率提升两倍,实现超分辨成像<sup>[2,56-57]</sup>。SIM 成像光路由激发光路和发射光路组成,激发光路的像差会影响结构光场的复现,发射光路的像差会降低 PSF 的信噪比,因此均需要通过自适应光学进行校正。

2008 年,DeBarre 等<sup>[58]</sup>首次将自适应光学应用于 SIM,在不使用波前传感器的条件下实现了像差校正。他们提出,SIM 的最终成像质量主要取决于照明图案的空间频率,不同类型的像差对照明模式的影响不同,导致对最终图像的影响也不同。他们利用模态波前传感技术实现了像差校正,并使用差分像差成像来减少背景荧光,进一步提升了成像质量,最终对小鼠肠道和花粉实现了更高对比度、更少背景噪声的 SIM 成像。

2015 年,Thomas 等<sup>[59]</sup>将自适应光学与 SIM 结合,对固定在秀丽隐杆线虫下的 100 nm 荧光微珠实现了超分辨成像。他们首先使用相位重建<sup>[60]</sup>方法测量变形镜上每个驱动器的响应函数并校正仪器像差,随后通过模态波前传感技术补偿样品引入的像差,将 200 nm 荧光微珠图像区域的峰值强度作为度量标准,对每个 Zernike 像差的幅值进行扫描,接着通过二次拟合得到度量标准最大时所对应的幅值,并反馈给变形镜。最终,在  $20\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$  的大视场上实现了 140 nm 的分

辨率,将信噪比提升了 60%。

2021 年,Zheng 等<sup>[61]</sup>提出了一种基于深度学习的自适应光学校正方法,并将其用于 SIM。他们通过建立 Zernike 系数与其对应的结构光照明图案之间的映射关系来训练卷积神经网络,从而推测实际拍摄图案中存在的像差,并通过 SLM 进行补偿。他们利用该方法对 BHK 细胞中鬼笔环肽标记的肌动蛋白实现了超分辨成像,相比于不使用自适应光学的情形,该方法在相对密集的肌动蛋白区域获得了更为清晰的视野。

上述方法均利用间接波前探测来推断像差。近年来,直接波前探测技术也在 SIM 中得到了应用。

2019 年,Turcotte 等<sup>[62]</sup>将自适应光学应用于动态超分辨 SIM 成像。他们首先通过调节显微物镜的校正环来修正球差,然后使用双光子激发光路在样品中生成导星,并将其发出的荧光输入到 SHWS 上。如前所述,SHWS 包含一个方形的微透镜阵列,该微透镜阵列可将导星发出的波前分割并聚焦到相机上,根据每个焦点的位移重建波前,并使用变形镜予以校正。他们利用该方法对活幼体斑马鱼[如图 5(a)所示]和小鼠的大脑实现了帧率为 9.3 frame/s、分辨率为 190 nm 的高速成像。类似地,2020 年,Li 等<sup>[63]</sup>将自适应光学应用于光学层析结构光照明显微镜(OS-SIM)。不同的是,这里的 SHWS 所包含的微透镜阵列呈六角形分布,并且利用一个驱动器阵列同样呈六角形分布的变形镜来修正波前,如图 6(b)所示。他们利用该方法对 21~29  $\mu\text{m}$  深度处的小鼠皮层神经元[如图 5(b)所示]、10~110  $\mu\text{m}$  深度处的幼体斑马鱼运动神经元结构实现了快速超分辨成像。

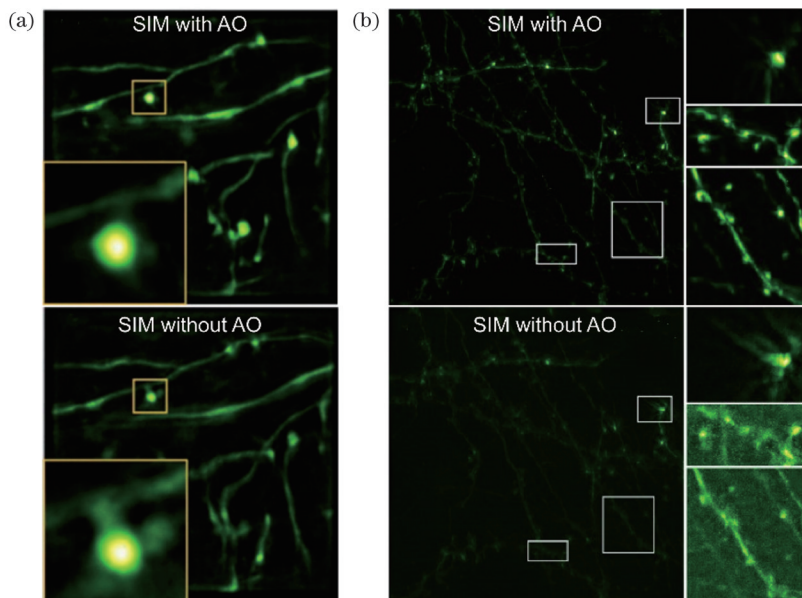


图 5 使用自适应光学前后 SIM 成像结果对比。(a) 幼体斑马鱼大脑中神经突触在  $100\ \mu\text{m}$  深度处的成像结果<sup>[62]</sup>; (b) 小鼠大脑在  $21\sim 29\ \mu\text{m}$  深度处的体内结构成像结果<sup>[63]</sup>

Fig. 5 Comparison of SIM images with and without AO. (a) Imaging of neurites in a larval zebrafish brain at a depth of  $100\ \mu\text{m}$ <sup>[62]</sup>; (b) *in vivo* structural imaging of the mouse brain at a depth of  $21\sim 29\ \mu\text{m}$ <sup>[63]</sup>



2021年, Lin等<sup>[64]</sup>将自适应光学应用于SIM, 通过直接波前探测的方式校正像差。他们所提出的成像光路可以在宽场成像、结构光照明和共聚焦照明之间切换, 并包含直接和间接波前探测, 如图6(c)所示。他们首先利用模态波前传感技术校正200 nm荧光珠的像差, 获得无像差的信号, 记录其在SHWS上的光斑

阵列并将其作为参考。随后, 他们使用共聚焦照明在样品中产生导星, 获得新的光斑阵列, 将其与上述参考阵列进行比较, 重建出波前, 并利用变形镜予以校正。他们利用该方法对秀丽隐杆线虫进行了超分辨成像, 将波前振幅峰谷值从1.5 μm降低到0.1 μm, 显著提高了成像质量。

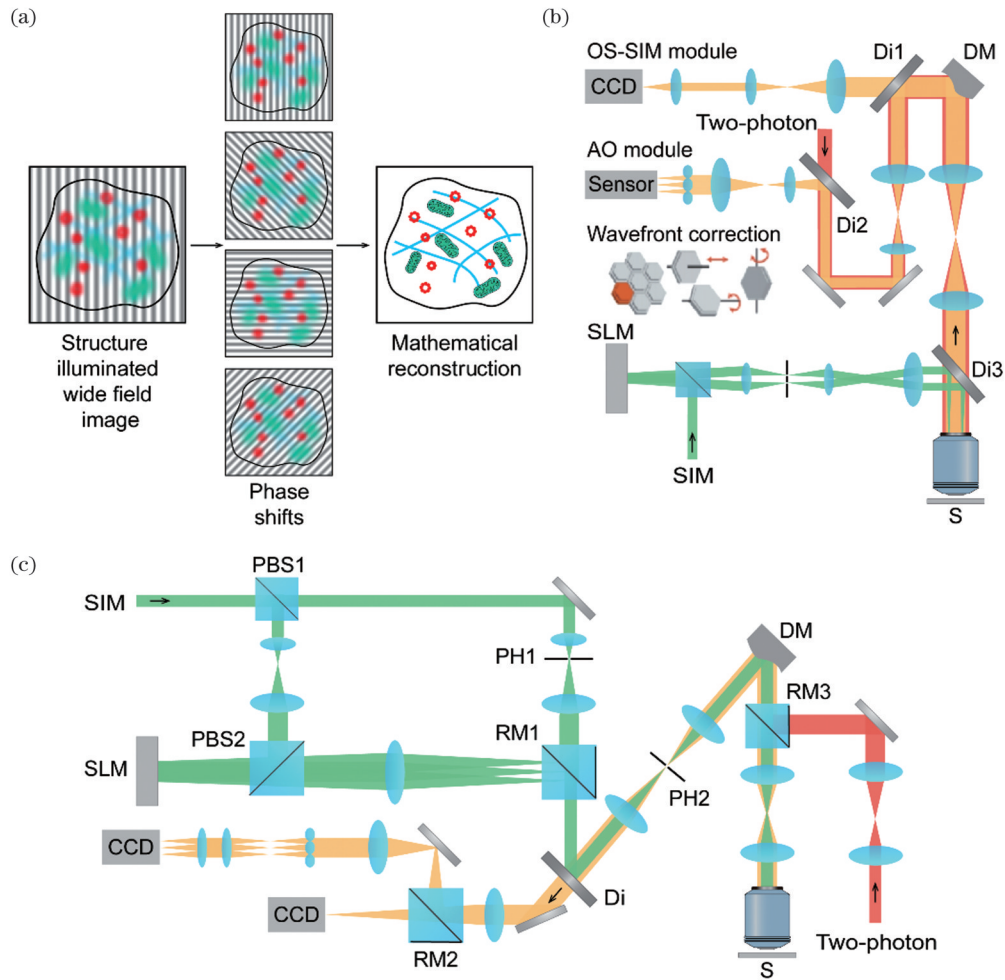


图6 自适应光学在SIM显微镜中的应用。(a)SIM成像原理;(b)在OS-SIM中应用自适应光学<sup>[63]</sup>; (c)将SIM与直接波前探测相结合<sup>[64]</sup>。S, 样品; Di, 二向色镜; PH, 针孔; PBS, 偏振分光镜; RM, 旋转镜

Fig. 6 Application of AO in SIM. (a) Schematic of SIM; (b) application of AO in an OS-SIM<sup>[63]</sup>; (c) combining SIM with direct wavefront sensing<sup>[64]</sup>. S, specimen; Di, dichroic mirror; PH, pinhole; PBS, polarizing beam splitter; RM, rotatable mirror

## 5 自适应光学在SMLM显微镜中的应用

SMLM显微镜的工作原理是: 将荧光团随机激活, 在探测器上获得稀疏分布的PSF, 然后对其定位获得荧光团的精确位置, 再将数百万个定位叠加, 重建出超分辨图像<sup>[3-4, 65-66]</sup>, 如图7(a)所示。在SMLM中, 发射光路的像差会引起PSF的扭曲, 进而导致单分子携带的信息严重缺失, 定位精度恶化, 空间分辨率降低, 因此需要利用自适应光学进行校正。

2012年, Izeddin等<sup>[67]</sup>提出了利用自适应光学消除SMLM仪器自身像差的方法。在发射光路中, 将变形镜置于物镜光瞳面的共轭位置处, 利用翻转镜在图像

拍摄和波前探测之间切换, 如图7(b)所示。首先, 将荧光珠作为导星, 用SHWS探测波前, 并利用变形镜予以校正; 然后拍摄荧光珠的PSF, 利用遗传算法推断像差, 再通过变形镜进行校正。他们利用该方法在800 nm深度处分别实现了对荧光蛋白40 nm的轴向定位精度和对荧光染料20 nm的轴向定位精度。然而, 该方法只能校正仪器自身的像差, 无法校正样品引入的像差。

2015年, Burke等<sup>[68]</sup>采用模态波前传感技术消除了样品引入的像差。他们采用式(2)所定义的图像锐度作为度量标准, 对变形镜生成的13个Zernike像差模式扫描11个幅值, 采集对应的单分子图像并计算其锐度,

再通过高斯拟合得到锐度最大时的幅值,最后将所有模式的幅值叠加起来,生成像差校正方案,如图 7(c)所示。他们利用不超过 200 帧的单分子数据,校正了 SMLM 中复杂样品引入的像差,对 6  $\mu\text{m}$  深度处的微管实现了横向 78 nm、轴向 136 nm 的分辨率。

同年, Tehrani 等<sup>[69]</sup>将与强度无关的傅里叶谱和遗传算法结合起来优化像差。该方法将图像的傅里叶谱作为度量标准,即

$$F = \frac{\sum_{u,v} [1 - G(u, v)] |I(u, v)| \text{circ}\left(\frac{\lambda}{2NA} \sqrt{u^2 + v^2}\right)}{\sum_{u,v} |I(u, v)| \text{circ}\left(\frac{\lambda}{2NA} \sqrt{u^2 + v^2}\right)}, \quad (6)$$

式中:  $I(u, v)$  是图像  $I(x, y)$  的傅里叶变换;  $G(u, v) = \exp\left(-\frac{u^2 + v^2}{2\sigma^2}\right)$ ,  $\sigma$  为高斯分布的标准差(根据经验给定);  $\text{circ}$  函数定义了圆形掩模。这一度量标准与强度无关,可以避免荧光团闪烁引起的强度波动的影响。他们通过遗传算法生成新的波前[如图 7(d)所示],利用傅里叶谱对单分子图像进行度量评估,并对像差进行校正;随着波前像差逐渐减小,将算法进一步细化,降低突变率与变异性,使得到的图像既可用于波前校正,也可用于单分子定位重建。该方法在 50  $\mu\text{m}$  深度下将定位精度提高了 4 倍;但由于需要数千帧图像才能收敛,所用时间较长。

2017 年, Tehrani 等<sup>[70]</sup>提出了通过粒子群优化算法(PSO)与傅里叶谱度量相结合来实时校正波前像差的方法。粒子群优化算法为下一次迭代更新每个个体的速度与位置,对粒子的个体最佳位置与群的最佳位置赋予不同的权重,从而引导个体至最佳位置,如图 7(e)所示。利用该方法,通过 25 次迭代,对 100  $\mu\text{m}$  深度处的果蝇中枢神经系统实现了 146 nm 的分辨率。该方法仅需要 500 帧图像即可收敛,相比于遗传算法速度提升了 10 倍。

2018 年, Mlodzianoski 等<sup>[71]</sup>提出了自适应像散(AA)方法,利用 Nelder-Mead 单纯形法校正波前像差。首先需要生成一个单纯形,通过组合  $N + 1$  个初始猜测向量来生成多个顶点。其中:  $N$  个初始猜测向量中的每一个向量包含一个特定的 Zernike 像差模式的非零元素,而另一个猜测向量包含所有 Zernike 像差模式的非零元素。然后通过反射、展开、收缩、回退等过程,生成新的单纯形。该方法将加权图像锐度作为度量标准,其表达式为

$$S' = -\frac{\sum_{n,m} \hat{I}_{n,m} (1 - O_{n,m})^\alpha O_{n,m} \mu_{n,m}}{\sum_{n,m} \hat{I}_{n,m} \mu_{n,m}}, \quad (7)$$

式中:  $\hat{I}_{n,m}$  为图像的离散傅里叶变换;  $O_{n,m}$  是理想 PSF 的离散傅里叶变换;  $\alpha$  是经验值;  $\mu_{n,m}$  为圆形掩模。对

于球差等引起的焦点位置明显变化的 Zernike 像差模式,度量标准修正为

$$S'' = -\sum_{n,m} \hat{I}_{n,m} \mu'_{n,m}, \quad (8)$$

此处  $\mu'_{n,m}$  的直径缩减为  $\mu_{n,m}$  的一半。利用该方法, Mlodzianoski 等对 95  $\mu\text{m}$  深度处的线粒体实现了横向 20 nm、轴向 50 nm 的分辨率,并重建出了患有阿尔茨海默病的小鼠脑片在 24  $\mu\text{m}$  深度处的  $\beta$ -淀粉样蛋白的结构。该方法可以迅速收敛到局部最小值,并且可以校正高阶像差。然而,相比于仅使用自适应光学的系统,加入的自适应像散会导致 PSF 展宽,进而导致横向定位精度降低。

2021 年, Siemons 等<sup>[72]</sup>提出了鲁棒有效自适应光学定位显微(REALM)。他们利用模态波前传感技术,对变形镜生成的 11 个 Zernike 像差模式扫描 9 个幅值,采集对应的单分子图像,并采用与单纯形法一致的度量标准评估图像质量,如图 7(f)所示。该方法通过 3 次迭代,共使用 297 帧单分子数据,即可校正最大均方根为 1 rad 的像差。Siemons 等利用该方法对 50  $\mu\text{m}$  深度处的微管[如图 8(a)所示]和神经轴突进行了成像,将定位数量增加了 6 倍,分辨率提高了 35%,实现了 76 nm 的 FRC 分辨率。该方法可以检测到更多的分子,获得更高的分辨率。然而,只有当目标结构是平面或者具有较小的轴向范围时才能实现鲁棒性高的校正。

2023 年, Zhang 等<sup>[73]</sup>提出了深度学习驱动自适应光学(DL-AO)方法。其工作原理如下:当检测到独立的 PSF 时,对其子区域进行分割并将分割结果发送到网络;每个输入子区域均经过一系列模板匹配过程,这些过程被组织为卷积层和残差块,其中含有 PReLU 激活和批量归一化,然后通过  $1 \times 1$  卷积层完全将这些子区域连接到 28 个值的输出向量,并根据变形镜的固有模式估计波前形状的幅值,实现对像差的校正,如图 7(g)所示。利用该方法, Zhang 等对 133  $\mu\text{m}$  深度处的线粒体结构[如图 8(b)所示]和小鼠初级视皮层神经实现了横向 14~31 nm、轴向 41~81 nm 的分辨率。该方法只需要 3~20 次迭代即可收敛,适用于离焦量较大的情况;但由于至少需要检测出两个独立的 PSF,不适用于波前像差极大的情形。

上述方法均利用间接波前探测来推断样品引入的像差。最新的一项工作证明了直接波前探测技术也可以用于 SMLM。2023 年, Park 等<sup>[74]</sup>提出了闭环积累单散射(CLASS)并将其应用于 SMLM。CLASS 的工作原理是:在不同的照明角度下记录来自组织结构的多个干涉反射图像<sup>[75-76]</sup>,然后基于测量得到的反射率图像构造的反射矩阵来寻找样本引入的像差,再通过 SLM 进行校正。他们利用翻转镜,实现了在 CLASS 自适应光学模块与 SMLM 成像模块之间的切换,如图 7(h)所示。他们利用该方法对幼体斑马鱼 102  $\mu\text{m}$

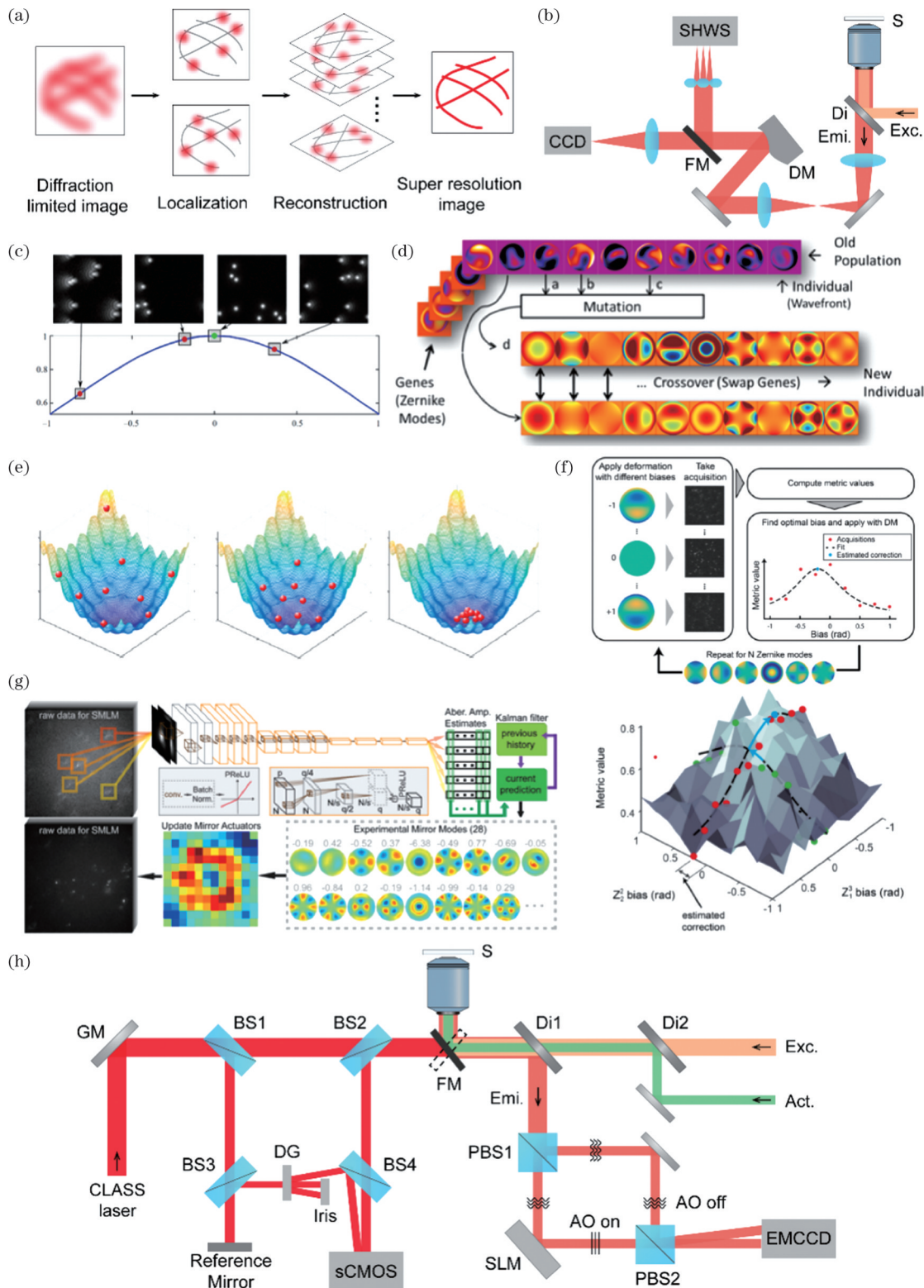


图 7 自适应光学在 SMLM 显微镜中的应用。(a) SMLM 成像原理；(b) 利用自适应光学校正仪器像差<sup>[67]</sup>；(c) 利用模态传感技术校正像差<sup>[68]</sup>；(d) 利用遗传算法校正像差<sup>[69]</sup>；(e) 利用粒子群优化算法校正像差<sup>[70]</sup>；(f) REALM 的工作原理<sup>[72]</sup>；(g) DL-AO 的工作原理<sup>[73]</sup>；(h) CLASS 光路<sup>[74]</sup>。S, 样品; Di, 二向色镜; FM, 翻转镜; GM, 振镜; BS, 分光镜; DG, 衍射光栅; PBS, 偏振分光镜; Exc., 激发光; Act., 激活光; Emi., 发射光

Fig. 7 Application of AO in SMLM. (a) Schematic of SMLM imaging; (b) schematic of instrumentation-induced aberration correction with AO<sup>[67]</sup>; (c) aberration correction with the modal sensing technique<sup>[68]</sup>; (d) aberration correction with genetic algorithm<sup>[69]</sup>; (e) aberration correction with PSO<sup>[70]</sup>; (f) working principle of REALM<sup>[72]</sup>; (g) working principle of DL-AO<sup>[73]</sup>; (h) schematic of CLASS<sup>[74]</sup>. S, specimen; Di, dichroic mirror; FM, flip mirror; GM, galvo mirror; BS, beam splitter; DG, diffraction grating; PBS, polarizing beam splitter; Exc., excitation beam; Act., activation beam; Emi., emission beam



深度处的组织结构实现了超分辨成像,定位精度从自适应光学时的 67 nm 提升至 34 nm,可改善的像差的均方根波前畸变为 2.13~3.08 rad,相比 REALM 方法

提高了 2~3 倍。该方法不依赖于单分子 PSF 图像,可以在弱光照下测量像差,不会导致样品漂白,并且由于是直接探测,测量范围较大。

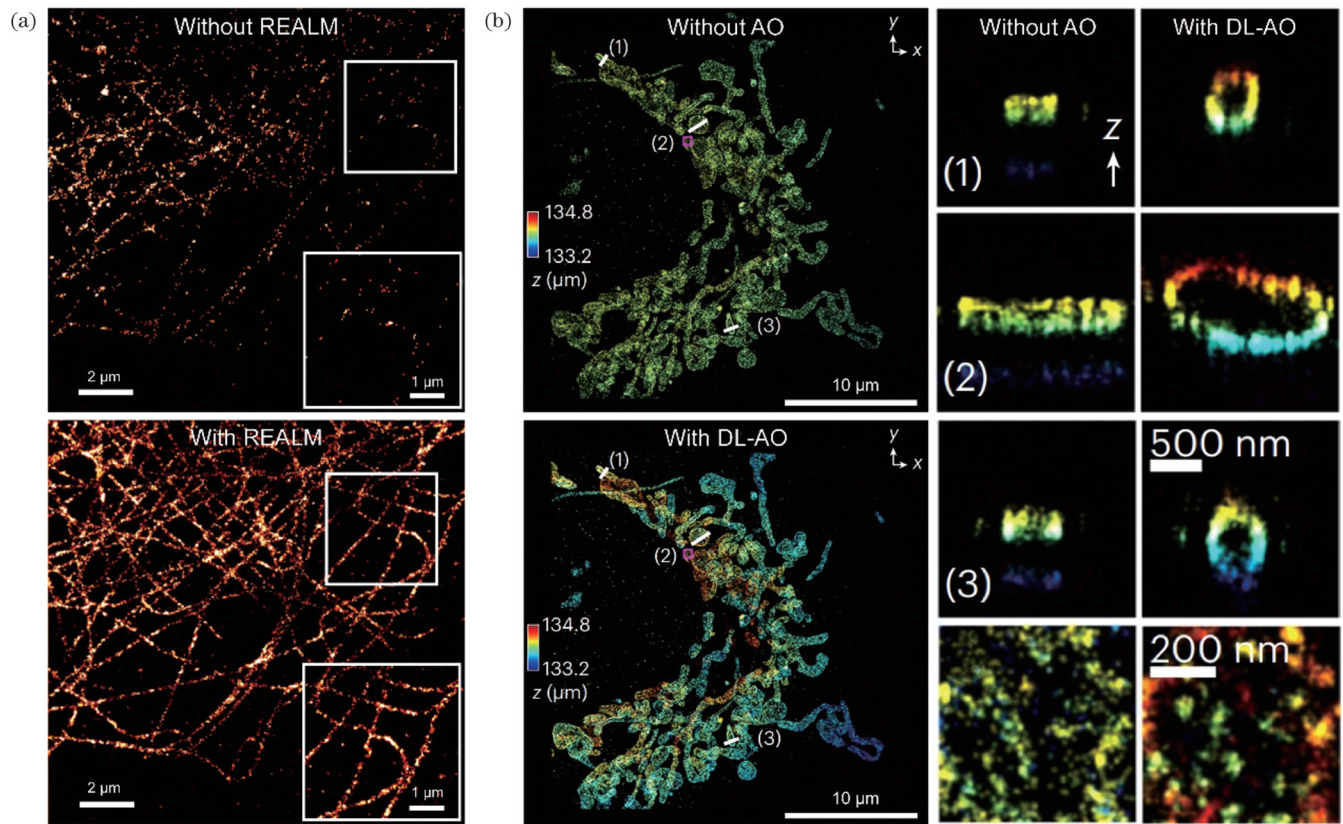


图 8 使用自适应光学前后 SMLM 成像结果对比。(a) 50  $\mu\text{m}$  深度处微管的成像结果<sup>[72]</sup>; (b) 133  $\mu\text{m}$  深度处线粒体的成像结果<sup>[73]</sup>  
Fig. 8 Comparison of SMLM images with and without AO. (a) Microtubules at a depth of 50  $\mu\text{m}$ <sup>[72]</sup>; (b) mitochondria at a depth of 133  $\mu\text{m}$ <sup>[73]</sup>

## 6 结论与展望

本文介绍了自适应光学在 STED、SIM 与 SMLM 等三种超分辨荧光显微镜中的应用。像差对这三种超分辨荧光显微镜均有影响:在 STED 中,激发光路的像差影响聚焦照明的亮度,发射光路的像差影响探测效率,损耗光路的像差影响成像分辨率;在 SIM 中,激发光路的像差影响结构光场的复现,发射光路的像差降低 PSF 信噪比;在 SMLM 中,发射光路的像差引起 PSF 扭曲,降低定位精度。因此,这三种超分辨显微镜都需要通过自适应光学进行校正。目前,超分辨显微镜所用到的自适应光学技术以间接波前探测,特别是模态波前传感技术为主,其优点是除加入波前校正元件外不需要对光路进行改动,降低了仪器成本;其缺点是需要多次扫描迭代,响应速度较慢,测量范围有限,导致超分辨显微成像难以应用于复杂的生物组织,如器官等。如前所述,近年来已有不少研究人员将直接波前探测应用于超分辨荧光显微镜<sup>[55,62-64,74]</sup>,虽然光路系统通常较为复杂,但测量速度快、精度高、范围大,因此具有间接波前探测技术无法比拟的优势。

未来,自适应光学在超分辨荧光显微镜中的发展

前景包括以下几个方面。首先是视场扩展。大视场成像一直是超分辨成像发展的方向<sup>[77-78]</sup>,大视场内不均匀的像差分布限制了成像质量的提升,因此有必要扩展波前校正的视场<sup>[79]</sup>。其次是速度提升。当对活细胞或组织成像时,像差处于动态变化之中<sup>[80-81]</sup>,需要提升波前校正的速率,以实现实时校正。最后是深度增大。目前超分辨成像的深度通常限制在 150  $\mu\text{m}$  以内,如需进一步提高成像深度,就需要增大波前校正的量程,以实现深层细胞和组织的超分辨成像。通过上述发展,自适应光学有望成为超分辨荧光显微镜的必备技术。

## 参 考 文 献

- [1] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [2] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [3] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.

- [4] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [5] Booth M, Andrade D, Burke D, et al. Aberrations and adaptive optics in super-resolution microscopy[J]. *Microscopy*, 2015, 64(4): 251-261.
- [6] Booth M J, Neil M A A, Wilson T. Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media[J]. *Journal of Microscopy (Oxford)*, 1998, 192(2): 90-98.
- [7] 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]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1995, 12(12): 2660-2671.
- [8] 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[J]. *中国科学: 物理学 力学 天文学*, 2017, 47(8): 084204.  
Zhang C H, Zhao Z W, Chen L Y, et al. Application of adaptive optics in biological fluorescent microscopy[J]. *Scientia Sinica (Physica, Mechanica & Astronomica)*, 2017, 47(8): 084204.
- [9] Babcock H W. The possibility of compensating astronomical seeing[J]. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 1953, 65(386): 229-236.
- [10] Linnik V P. On the possibility of reducing the influence of atmospheric seeing on the image quality of stars[J]. *Optics and Spectroscopy*, 1957, 3: 401-402.
- [11] 姜文汉. 自适应光学发展综述[J]. *光电工程*, 2018, 45(3): 170489.  
Jiang W H. Overview of adaptive optics development[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2018, 45(3): 170489.
- [12] Hardy J W, Lefebvre J E, Koliopoulos C L. Real-time atmospheric compensation[J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1977, 67(3): 360-369.
- [13] Hardy J W. *Adaptive optics for astronomical telescopes*[M]. New York: Oxford University Press, 1998.
- [14] Rousset G, Ontanella J C, Kern P, et al. First diffraction-limited astronomical images with adaptive optics[J]. *Astronomy & Astrophysics*, 1990, 230(2): L29-L32.
- [15] 凌宁. 多元整体压电变形反射镜(研究阶段进展报告)[J]. *光学工程*, 1982, 9(6): 44-52, 43.  
Ling N. Multi-element integral piezoelectric deformable mirror (progress report in research stage)[J]. *Optical Engineering*, 1982, 9(6): 44-52, 43.
- [16] Wang S Q, Wei K, Zheng W J, et al. First light on an adaptive optics system using a non-modulation pyramid wavefront sensor for a 1.8 m telescope[J]. *Chinese Optics Letters*, 2016, 14(10): 100101.
- [17] 林旭东, 刘欣悦, 王建立, 等. 137 单元变形镜的性能测试及校正能力实验[J]. *光学精密工程*, 2013, 21(2): 267-273.  
Lin X D, Liu X Y, Wang J L, et al. Performance test and experiment of correction capability of 137-element deformable mirror[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2013, 21(2): 267-273.
- [18] 贾建禄, 王建立, 赵金宇, 等. 961 单元自适应光学系统波前处理器[J]. *光学精密工程*, 2013, 21(6): 1387-1393.  
Jia J L, Wang J L, Zhao J Y, et al. 961-element adaptive optical wave-front processor[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2013, 21(6): 1387-1393.
- [19] 林旭东, 刘欣悦, 王帅, 等. 桌面 97 单元自适应光学系统性能测试[J]. *光学精密工程*, 2016, 24(6): 1272-1280.  
Lin X D, Liu X Y, Wang S, et al. Performance testing of a desktop 97-element adaptive optical system[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2016, 24(6): 1272-1280.
- [20] 王建立, 董玉磊, 姚凯男, 等. 349 单元自适应光学波前处理器[J]. *光学精密工程*, 2018, 26(5): 1007-1013.  
Wang J L, Dong Y L, Yao K N, et al. Three hundred and forty-nine unit adaptive optical wavefront processor[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2018, 26(5): 1007-1013.
- [21] Ji N. Adaptive optical fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 374-380.
- [22] 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.
- [23] Platt B C, Shack R. History and principles of Shack-Hartmann wavefront sensing[J]. *Journal of Refractive Surgery*, 2001, 17(5): S537-S577.
- [24] Tao X D, Fernandez B, Azucena O, et al. Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1062-1064.
- [25] 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.
- [26] Poyneer L A. Scene-based Shack-Hartmann wave-front sensing: analysis and simulation[J]. *Applied Optics*, 2003, 42(29): 5807-5815.
- [27] Wang Y, Chen X, Cao Z, et al. Gradient cross-correlation algorithm for scene-based Shack-Hartmann wavefront sensing[J]. *Optics Express*, 2018, 26(13): 17549-17562.
- [28] Hubert A, Harms F, Juvénal R, et al. Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(10): 2514-2517.
- [29] Iglesias I. Pyramid phase microscopy[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(18): 3636-3638.
- [30] Parthasarathy A B, Chu K K, Ford T N, et al. Quantitative phase imaging using a partitioned detection aperture[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(19): 4062-4064.
- [31] Li J, Beaulieu D R, Paudel H, et al. Conjugate adaptive optics in widefield microscopy with an extended-source wavefront sensor[J]. *Optica*, 2015, 2(8): 682-688.
- [32] Bon P, Maucourt G, Wattellier B, et al. Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells[J]. *Optics Express*, 2009, 17(15): 13080-13094.
- [33] Booth M J. Adaptive optical microscopy: the ongoing quest for a perfect image[J]. *Light: Science & Applications*, 2014, 3(4): e165.
- [34] Huang F, Sirinakis G, Allgeyer E S, et al. Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells[J]. *Cell*, 2016, 166(4): 1028-1040.
- [35] Morgan R E, Douglas E S, Allan G W, et al. MEMS deformable mirrors for space-based high-contrast imaging[J]. *Micromachines*, 2019, 10(6): 366.
- [36] Love G D. Wave-front correction and production of Zernike modes with a liquid-crystal spatial light modulator[J]. *Applied Optics*, 1997, 36(7): 1517-1520.
- [37] 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.
- [38] Bonora S, Jian Y F, Zhang P F, et al. Wavefront correction and high-resolution *in vivo* OCT imaging with an objective integrated multi-actuator adaptive lens[J]. *Optics Express*, 2015, 23(17): 21931-21941.
- [39] Bueno J M, Skorsetz M, Bonora S, et al. Wavefront correction in two-photon microscopy with a multi-actuator adaptive lens[J]. *Optics Express*, 2018, 26(11): 14278-14287.
- [40] Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A. STED super-resolved microscopy[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(3): 173-182.
- [41] Liu Y F, Peng Z, Peng X, et al. Shedding new lights into STED microscopy: emerging nanoprobes for imaging[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 641330.
- [42] Deng S H, Liu L, Cheng Y, et al. Effects of primary aberrations on the fluorescence depletion patterns of STED microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(2): 1657-1666.
- [43] Antonello J, Burke D, Booth M J. Aberrations in stimulated emission depletion (STED) microscopy[J]. *Optics Communications*, 2017, 404: 203-209.
- [44] Gould T J, Burke D, Bewersdorf J, et al. Adaptive optics enables

- 3D STED microscopy in aberrating specimens[J]. *Optics Express*, 2012, 20(19): 20998-21009.
- [45] Gould T J, Kromann E B, Burke D, et al. Auto-aligning stimulated emission depletion microscope using adaptive optics[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(11): 1860-1862.
- [46] Lenz M O, Sinclair H G, Savell A, et al. 3-D stimulated emission depletion microscopy with programmable aberration correction[J]. *Journal of Biophotonics*, 2014, 7(1/2): 29-36.
- [47] Patton B R, Burke D, Oswald D, et al. Three-dimensional STED microscopy of aberrating tissue using dual adaptive optics[J]. *Optics Express*, 2016, 24(8): 8862-8876.
- [48] Nieuwenhuizen R P J, Lidke K A, Bates M, et al. Measuring image resolution in optical nanoscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(6): 557-562.
- [49] Zdankowski P, McGloin D, Swedlow J R. Full volume super-resolution imaging of thick mitotic spindle using 3D AO STED microscope[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(4): 1999-2009.
- [50] Zdankowski P, Trusiak M, McGloin D, et al. Numerically enhanced stimulated emission depletion microscopy with adaptive optics for deep-tissue super-resolved imaging[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(1): 394-405.
- [51] Antonello J, Barbotin A, Chong E Z, et al. Multi-scale sensorless adaptive optics: application to stimulated emission depletion microscopy[J]. *Optics Express*, 2020, 28(11): 16749-16763.
- [52] Hao X, Li Y M, Fu S, et al. Review of 4Pi fluorescence nanoscopy[J]. *Engineering*, 2022, 11: 146-153.
- [53] Hao X, Allgeyer E S, Lee D R, et al. Three-dimensional adaptive optical nanoscopy for thick specimen imaging at sub-50-nm resolution[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(6): 688-693.
- [54] Wang L W, Yan W, Li R Z, et al. Aberration correction for improving the image quality in STED microscopy using the genetic algorithm[J]. *Nanophotonics*, 2018, 7(12): 1971-1980.
- [55] Velasco M G M, Zhang M Y, Antonello J, et al. 3D super-resolution deep-tissue imaging in living mice[J]. *Optica*, 2021, 8(4): 442-450.
- [56] Wu Y C, Shroff H. Faster, sharper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(12): 1011-1019.
- [57] Ma Y, Wen K, Liu M, et al. Recent advances in structured illumination microscopy[J]. *Journal of Physics: Photonics*, 2021, 3(2): 024009.
- [58] Débarre D, Botcherby E J, Booth M J, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy[J]. *Optics Express*, 2008, 16(13): 9290-9305.
- [59] Thomas B, Wolstenholme A, Chaudhari S N, et al. Enhanced resolution through thick tissue with structured illumination and adaptive optics[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(2): 026006.
- [60] Hanser B M, Gustafsson M G L, Agard D A, et al. Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2004, 216(1): 32-48.
- [61] Zheng Y, Chen J J, Wu C X, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy based on deep learning[J]. *Cytometry Part A*, 2021, 99(6): 622-631.
- [62] Turcotte R, Liang Y J, Tanimoto M, et al. Dynamic super-resolution structured illumination imaging in the living brain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(19): 9586-9591.
- [63] Li Z W, Zhang Q R, Chou S W, et al. Fast widefield imaging of neuronal structure and function with optical sectioning *in vivo*[J]. *Science Advances*, 2020, 6(19): eaaz3870.
- [64] Lin R Z, Kner P A. Structured illumination microscopy with direct wavefront sensing[J]. *Proceedings of SPIE*, 2021, 11652: 116520A.
- [65] Möckl L, Moerner W E. Super-resolution microscopy with single molecules in biology and beyond-essentials, current trends, and future challenges[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(42): 17828-17844.
- [66] Lelek M, Gyparaki M T, Beliu G, et al. Single-molecule localization microscopy[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1: 39.
- [67] Izeddin I, El Beheiry M, Andilla J, et al. PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking[J]. *Optics Express*, 2012, 20(5): 4957-4967.
- [68] Burke D, Patton B, Huang F, et al. Adaptive optics correction of specimen-induced aberrations in single-molecule switching microscopy[J]. *Optica*, 2015, 2(2): 177-185.
- [69] Tehrani K F, Xu J Q, Zhang Y W, et al. Adaptive optics stochastic optical reconstruction microscopy (AO-STORM) using a genetic algorithm[J]. *Optics Express*, 2015, 23(10): 13677-13692.
- [70] Tehrani K F, Zhang Y W, Shen P, et al. Adaptive optics stochastic optical reconstruction microscopy (AO-STORM) by particle swarm optimization[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(11): 5087-5097.
- [71] Mlodzianoski M J, Cheng-Hathaway P J, Bemiller S M, et al. Active PSF shaping and adaptive optics enable volumetric localization microscopy through brain sections[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(8): 583-586.
- [72] Siemons M E, Hanemaaijer N A K, Kole M H P, et al. Robust adaptive optics for localization microscopy deep in complex tissue [J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3407.
- [73] Zhang P Y, Ma D H, Cheng X, et al. Deep learning-driven adaptive optics for single-molecule localization microscopy[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(11): 1748-1758.
- [74] Park S, Jo Y, Kang M S, et al. Label-free adaptive optics single-molecule localization microscopy for whole zebrafish[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 4185.
- [75] Kang S, Kang P, Jeong S, et al. High-resolution adaptive optical imaging within thick scattering media using closed-loop accumulation of single scattering[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 2157.
- [76] Kim M, Jo Y, Hong J H, et al. Label-free neuroimaging *in vivo* using synchronous angular scanning microscopy with single-scattering accumulation algorithm[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3152.
- [77] Mau A, Friedl K, Leterrier C, et al. Fast widefield scan provides tunable and uniform illumination optimizing super-resolution microscopy on large fields[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3077.
- [78] Fu S, Shi W, Luo T D, et al. Field-dependent deep learning enables high-throughput whole-cell 3D super-resolution imaging[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(3): 459-468.
- [79] 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.
- [80] Speiser A, Müller L R, Hoess P, et al. Deep learning enables fast and dense single-molecule localization with high accuracy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(9): 1082-1090.
- [81] 高露, 高贝贝, 王富. 超分辨显微成像技术在活体大脑成像中的应用[J]. *中国激光*, 2022, 49(20): 2007301.
- Gao L, Gao B B, Wang F. Applications of super-resolution microscopy techniques in living brain imaging[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(20): 2007301.



# Application of Adaptive Optics in Super-Resolution Fluorescence Microscopy

Wang Xiangyu, Chen Xi, Cao Tun, Ma Donghan\*

School of Optoelectronic Engineering and Instrumentation Science, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

## Abstract

**Significance** Because of the wave characteristics of light, conventional fluorescence microscopy is typically restricted by the diffraction limit, which is approximately 200 nm laterally and 500 nm axially. Super-resolution microscopy has overcome this barrier and improved the imaging resolution to a few nanometers, which enables the observation of biological structures at a nanoscale and revolutionizes the development of life sciences. Super-resolution microscopy can be classified into three types. The first type is scanning imaging based on point spread function (PSF) decoration, whose representative technique is stimulated emission depletion (STED). The second is wide-field imaging based on spectrum spread, whose representative technique is structured illumination microscopy (SIM). The third is single-molecule localization microscopy (SMLM), also known as photoactivated localization microscopy (PALM) and stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). In super-resolution fluorescence microscopy, both instrumentation and sample-induced aberrations decrease the spatial resolution and degrade the imaging quality. Therefore, the adaptive optics (AO) technique is applied, which detects aberrations using direct or indirect methods, and performs compensation through wavefront correction elements to capture high-quality super-resolution images (Fig. 1). This review introduces the origin and working principle of AO, summarizes its application in super-resolution fluorescence microscopy, and highlights its future development prospects.

**Progress** In STED microscopy [see Fig. 2(a)], aberrations in the excitation, depletion, and emission paths influence the image quality simultaneously, particularly in the depletion path, which need to be corrected with AO. In 2012, Gould *et al.* proposed the first implementation of AO in STED microscopy, which used modal sensing with the sharpness metric to examine the aberrations, and performed corrections with two spatial light modulators (SLMs) in both excitation and depletion paths [see Fig. 2(b)]. They imaged fluorescence beads at a depth of 25  $\mu\text{m}$  above the retina sections of a zebrafish, with an axial resolution of 250 nm. In 2014, Lenz *et al.* proposed an off-axis holography configuration that used one SLM to correct instrumentation and sample-induced aberrations [see Fig. 2(d)]. They achieved a lateral resolution of 120 nm and an axial resolution of 173 nm when imaging tubulin at depths of 8–10  $\mu\text{m}$ . In 2016, Patton *et al.* proposed an implementation that incorporates two AO elements to enable aberration correction in all three beam paths [see Fig. 2(e)]. They used modal sensing with the Fourier ring correlation (FRC) metric and resolved glutamatergic vesicles in neural boutons in intact brains of *Drosophila melanogaster* at a depth of 10  $\mu\text{m}$ . In 2019, Zdankowski *et al.* proposed an automated AO solution to correct instrumentation and sample-induced aberrations. They used modal sensing with the brightness metric and achieved super-resolution imaging of a 15  $\mu\text{m}$  mitotic spindle with a resolution of 50 nm  $\times$  50 nm  $\times$  100 nm. On this basis, in 2020, Zdankowski *et al.* combined AO with image denoising algorithm by block-matching and collaborative three-dimensional (3D) filtering (BM3D) to enhance the image quality and super-resolved 3D imaging of axons in differentiated induced pluripotent stem cells growing under an 80  $\mu\text{m}$  thick layer of tissue with lateral and axial resolutions of 204 and 310 nm, respectively [see Fig. 3(a)]. In 2020, Antonello *et al.* proposed using wavelet analysis to quantify resolution loss and established a multivalued image quality metric. They achieved super-resolution imaging of CA1 pyramidal neurons in an organotypic hippocampal slice at a depth of 14  $\mu\text{m}$ . In 2021, Hao *et al.* combined AO with 4Pi-STED. They used two deformable mirrors (DMs) in the two paths and analyzed the aberrations with modal sensing [see Fig. 4]. They achieved sub 50 nm isotropic resolution of structures, such as neuronal synapses and ring canals previously inaccessible in tissues. Other indirect or direct wavefront detection techniques have been also used to measure aberrations in STED microscopy.

In SIM [see Fig. 6(a)], aberrations in excitation and emission paths decrease the imaging quality and should be corrected with AO. In 2008, Débarre *et al.* implemented sensorless AO in SIM. They investigated how the image formation process in this type of microscopy is affected by aberrations and performed aberration correction with modal sensing. In 2015, Thomas *et al.* combined sensorless AO with SIM and achieved super-resolution imaging of 100 nm fluorescence beads fixed beneath a *C. elegans* sample with a 140 nm resolution. In 2021, Zheng *et al.* proposed an AO correction method based on deep learning and utilized the method to correct aberrations with SLM, realizing super-resolution imaging of phalloidin-labeled actin in cultured BHK cells. Recently, direct wavefront sensing has also been used in SIM. In 2019, Turcotte *et al.* applied AO in SIM *in vivo* by generating the guide star with two-photon excitation as the input of the Shack-Hartmann wavefront sensor and performing aberration correction with a DM. They imaged the brains of live zebrafish larvae [see Fig. 5(a)] and mice and observed the dynamics of dendrites and dendritic spines at nanoscale resolution. Similarly, in 2020, Li *et al.* used AO in optical-sectioning SIM [see Fig. 6(b)] and achieved fast, high-resolution *in-vivo* imaging of mouse cortical neurons at depths of 21–29  $\mu\text{m}$  [see Fig. 5(b)] and zebrafish larval motor neurons at depths

of 10–110  $\mu\text{m}$ . In 2021, Lin *et al.* used direct wavefront sensing in SIM with a configuration that can be switched among wide-field imaging, structured illumination, and confocal illumination [see Fig. 6(c)]. They used modal sensing to correct the aberrations of fluorescence beads and then recorded the image arrays in Shack-Hartmann wavefront sensor as a reference. Subsequently, they used confocal illumination to generate the guide star, input it into the Shack-Hartmann wavefront sensor, and reconstructed the wavefront. They decreased the peak-valley values of the wavefront amplitude from 1.5 to 0.1  $\mu\text{m}$  when imaging *C. elegans*.

In SMLM [see Fig. 7(a)], aberrations in the emission path result in distorted PSFs and decreased localization precision, which should be corrected with AO. In 2015, Burke *et al.* proposed a technique for correcting aberrations using modal sensing with the sharpness metric [see Fig. 7(c)]. They achieved a resolution of 78 nm laterally and 136 nm axially for microtubules at a depth of 6  $\mu\text{m}$ . Tehrani *et al.* optimized aberrations using genetic algorithm [see Fig. 7(d)] with the intensity-independent Fourier metric and increased the localization precision by four times at a depth of 50  $\mu\text{m}$ . In 2017, Tehrani *et al.* proposed a real-time wavefront aberration correction approach based on particle swarm optimization [see Fig. 7(e)] and the intensity-independent Fourier metric. They achieved a resolution of 146 nm for the central nervous system of *Drosophila melanogaster* at a depth of 100  $\mu\text{m}$ . In 2018, Mlodzianoski *et al.* developed adaptive astigmatism using Nelder-Mead simplex algorithm to correct wavefront distortions with the weighted sharpness metric. They achieved a resolution of 20 nm laterally and 50 nm axially for mitochondria at a depth of 95  $\mu\text{m}$ . In 2021, Siemons *et al.* proposed robust and effective adaptive optics in localization microscopy (REALM) combined with modal sensing using the weighted sharpness metric [see Fig. 7(f)]. They achieved an FRC resolution of 76 nm for microtubules [see Fig. 8(a)] and cytoskeletal spectrin of the axon initial segment at a depth of 50  $\mu\text{m}$ . In 2023, Zhang *et al.* proposed deep-learning-driven adaptive optics (DL-AO) that examined aberrations from detected PSFs using deep neuron network [see Fig. 7(g)]. They achieved a resolution of 14–31 nm laterally and 41–81 nm axially for mitochondria [see Fig. 8(b)] and dendrites at a depth of 133  $\mu\text{m}$ . In 2023, Park *et al.* developed closed-loop accumulation of single-scattering (CLASS), which measured complex tissue aberrations from intrinsic reflectance and performed compensation [see Fig. 7(h)], and resolved subdiffraction morphologies of cilia and oligodendrocytes in entire zebrafish at a depth of 102  $\mu\text{m}$ , improving the localization precision from 67 nm to 34 nm.

**Conclusions and Prospects** This review summarizes the application of adaptive optics in super-resolution microscopy, including indirect and direct wavefront detection. Indirect wavefront sensing requires no setup modifications, except for inserting the wavefront correction elements, which is economical and practical. However, the low response speed and narrow dynamic range limit its effectiveness for severe distortions. Direct wavefront sensing can provide increased response speed and dynamic range, despite its increasing complexity in instrumentation. The future prospects of AO methods in super-resolution microscopy include increasing the field-of-view, response speed, and imaging depth. We expect that the AO method will be a general option in future super-resolution fluorescence microscopy.

**Key words** microscopy; fluorescence microscopy; super resolution; active and adaptive optics; aberration compensation; wavefront sensing