

自适应光学高分辨率共聚焦显微成像技术

谭佐军 谢静* 卢军 王贤峰 陈建军

(华中农业大学理学院应用物理系, 湖北 武汉 430070)

摘要 生物样品折射率的空间变化导致了光学畸变的产生,这种畸变对于共聚焦显微镜观察厚的生物样品和活体内组织成像是一种严重的限制。自适应光学(AO)技术是通过快速反应的变形镜使镜面发生形变来补偿像差,在共聚焦显微镜中应用自适应光学技术可以校正光学畸变,观察深层组织活动,进行活体成像和实时检测。详细分析了共聚焦显微镜中像差的来源及光学畸变的特点,讨论了目前在共聚焦显微镜中自适应光学校正的方案及研究现状,讨论了共聚焦显微镜中自适应光学的波前传感器、畸变测量和波前校正器,并探讨了目前超高分辨率显微成像技术的发展方向。

关键词 共聚焦显微镜;自适应光学;生物成像;光学畸变

中图分类号 O439 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP49.090002

High Spatial Resolution Confocal Microscopy Using Adaptive Optics

Tan Zuojun Xie Jing Lu Jun Wang Xianfeng Chen Jianjun

(Department of Applied Physics, College of Basic Sciences, Huazhong Agriculture University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract Spatial variations in the refractive index of the biological specimen introduce optical aberrations that degrade image quality. In confocal microscopy this is a serious limitation when imaging penetrates into thick biological specimens, in particular for *in vivo* tissue imaging. Adaptive optics (AO) enable mirror deformation to compensate the aberration by rapid response deformable mirror. In confocal microscopy, it can correct the aberrations, observe deep tissue activity, perform *in vivo* tissue imaging, measure and restore the optimum resolution. This review discusses the origins and characteristics of aberrations in confocal microscopy. The correction schemes by using adaptive optics in confocal microscopy and the research progress are discussed. Wavefront sensor, aberration measurement and aberration correction devices of adaptive optics in confocal microscope are discussed. The trends of adaptive optics in confocal microscopy are also reviewed.

Key words confocal microscopy; adaptive optics; biological imaging; optical aberration

OCIS codes 010.1080; 180.1790; 170.3880

1 引言

随着新型荧光分子探针的出现和成像方法的改进,高分辨率荧光显微镜技术使得荧光成像的分辨率达到可以和电子显微镜相媲美的精度,使得生物学家可以在活细胞上看到纳米尺度的蛋白质^[1]。但是这些技术无法观察厚的生物样品,因为样品折射率的空间变化导致了光学像差的产生,从而影响到成像质量,最终像差限制了共聚焦显微镜所能观察的样品数量,观察深度也限制在表面附近几个细胞厚的位置。如果想要观察在正常环境中而不是在显微镜切片的非正常环境中的细胞以及它们的过程,这是一种严重的限制^[2]。目前生物成像研究主要采用取材后体外研究,但分子、细胞、组织等与周围环境有着广泛的生物学作用,体外

收稿日期: 2012-03-27; 收到修改稿日期: 2012-04-20; 网络出版日期: 2012-05-22

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2011PY129)资助课题。

作者简介: 谭佐军(1977—),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事生物光学成像与光谱技术及自适应光学等方面的研究。E-mail: tzj@mail.hzau.edu.cn

*通信联系人。E-mail: xiejing000@sina.com

研究不可能真实地模拟生物活体内的精细组成结构和生理或病理环境,由此所获得的大量生物分子和细胞的功能信息,亟待活体内动态研究与确证^[3]。

天文学家长期面临类似的问题并且设计了一些方法解决这种问题。当用望远镜对遥远的星系成像时,来自遥远星系的光进入地球大气层,大气的湍流将导致光学畸变而造成图像质量下降,在望远镜中采用自适应光学(AO)技术,可以实时检测波前畸变并加以校正。AO技术采用波前传感器测量畸变,通过变形镜或空间光调制器改变形状来校正这种畸变^[4]。在对生物组织样品进行高分辨率显微成像时,如果能够使用波前传感器测量到由于生物组织样品光学性质的不均匀造成的光学畸变,通过波前校正器来补偿波前误差,就可以获得接近完美的组织图像,获得更大厚度的组织图像。在此将介绍共聚焦显微镜中的像差、自适应光学高分辨率共聚焦显微成像技术的基本原理和最近的发展状况。

2 共聚焦显微镜中的像差

共聚焦显微镜^[5]中的像差主要是由于光线通过两种不同折射率介质界面会聚不在同一点产生的,即折射率失配。这种现象一般有两种情况:用油浸物镜聚焦通过覆盖的玻璃片时或当进入厚度不均匀的介质时。

聚焦通过覆盖的玻璃片时的折射率失配影响由 Sheppard 等^[6,7]最先进行研究。Egner 等^[8]全面地总结了1998年以前的研究,折射率失配的基本影响就是对应于聚焦深度的焦移和球差,这些可以共同地由一组旋转对称的 Zernike 模表示。在显微镜中,由覆盖的玻璃片引起的折射率失配带来的球差经常通过物镜设计来校正,在对水性样品成像时使用水镜可以获得更多的好处,装配这些物镜可以调节修正覆盖的玻璃片,能够使用不同厚度的玻片。

当进入厚度不均匀的介质时,由于折射率失配导致的像差却要复杂得多。生物组织不是成像的理想结构,因为它们光学性质的不均匀性严重地影响了成像质量。使用传统的共聚焦显微镜无法观察厚度超过数百微米的样品,但果蝇幼虫、哺乳动物的胚胎或者脑组织切片等样品的厚度通常远远超过这个范围。事实上不管是激发光还是发射光都需要穿过组织,一个高数值孔径(NA)的物镜将经过透镜的平面波转换为焦平面上的球面波。如图1所示,当光线经过光学系统和样本时,理想的平面波前或球面波前将会引入扭曲的畸变,理想路径的任何偏离都会导致光学畸变,就算是最先进的显微镜也很难获得有一定厚度的生物组织的理想图像。随着光线进入组织越深,图像质量将进一步退化,最终像差限制了显微镜所能观察的样品的数量,观察深度也限制在表面附近几个细胞厚的位置。

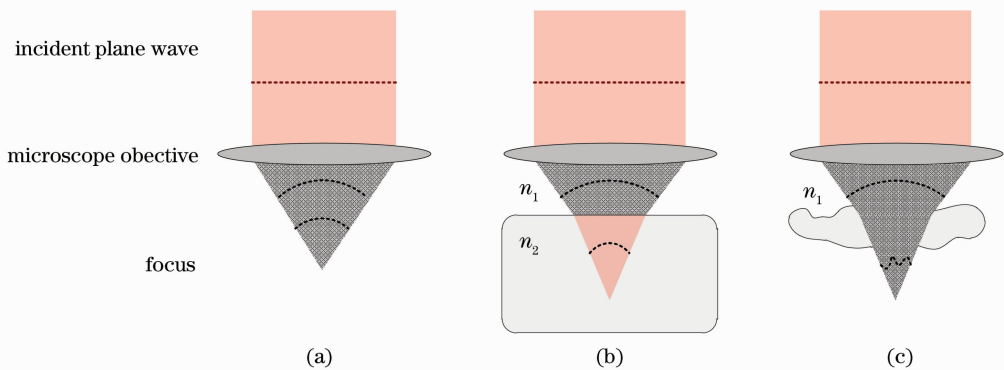


图1 平面波通过高数值孔径的物镜聚焦产生光学畸变示意图。(a)平面波经过物镜聚焦后转变为球面波聚焦;(b)通过覆盖的玻璃片聚焦时折射率不匹配的影响;(c)通过复杂的生物样本聚焦时引起光学畸变

Fig.1 Optical aberration of focusing a plane wave through a high-NA objective lens. (a) After passing through the objective, the plane wave is transformed to a spherical wave and focused; (b) effect of refractive index mismatch when pass through a slide; (c) optical aberration occurs when passing through complicated biological sample

绝大多数生物组织中含有大量的水分,水的折射率为1.33,其折射率是液体和软组织成分中最小的,黑色素颗粒的折射率为1.6,其折射率是其他的软组织成分中最大的。所有的组织(包括部分脑组织、大动脉、肺、胃、肾和膀胱)的折射率在1.36~1.4之间,细胞外液和细胞质的折射率为1.35~1.38,脂肪的折射率为

1.45 左右,细胞和亚细胞器膜主要组分是脂类,细胞质和这些脂类结构折射率的不匹配正是许多细胞组织散射的根本原因。硬组织如牙齿珐琅的折射率在可见光范围内测量值为 1.62,而人体中各种骨骼结构中的每种物质折射率都不一样,脱钙风干的骨骼折射率在室温下是 1.530。由此可见,当会聚的激光穿过这些生物物质时,它的传播路径将受到这些折射率的影响,导致光学畸变,在光轴正交方向上的折射率不匹配将导致球差,球差可能是最主要的光学畸变。

图 2 为 Schwertner 等^[9]实际测量到的激光平面波穿过秀丽隐杆线虫样本后的光学畸变。可见生物组织结构是非常复杂的成像环境,除了球差以外,还有很多其他的光学畸变存在。

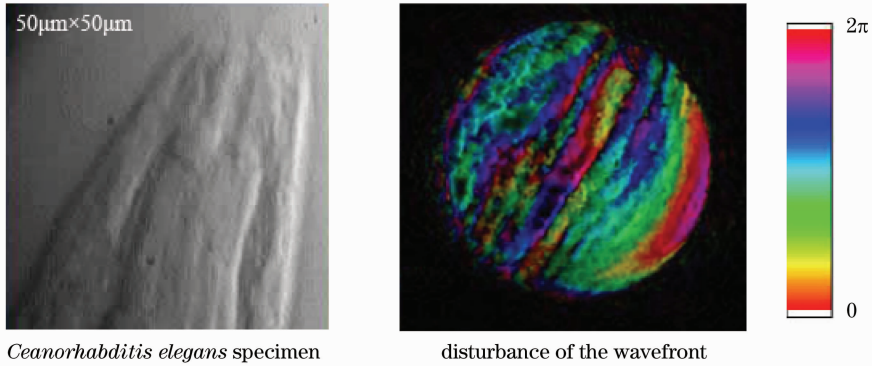


图 2 生物组织成像的光学畸变示意图

Fig. 2 Scheme of optical aberration in biological-tissue imaging

光瞳上的相位畸变与焦斑形状的关系比较复杂。一般来说,畸变导致侧平面和光轴上焦点的扩散,焦点处的光强也随着减弱。焦斑的变形降低了系统的分辨率,使得沿着光轴方向上相邻的位面存在模糊。在共聚焦显微镜中,荧光与焦点光强成比例减弱,进入针孔处探测器的荧光成像也会受到影响,畸变将会对信号产生复杂的影响,检测到的信号会迅速衰减。通过提高激光光源的能量能够恢复信号,从而提高焦点光强,但是这并不能提高分辨率,反而增加了光漂白和光毒性损伤,这对活体细胞成像非常不利。

3 共聚焦显微镜中自适应光学的应用

带有 AO 系统的双光子荧光显微镜能为深层组织和活体细胞成像应用提供最清晰的图像^[10],如图 3 所示。在这种配置中,光入射到样品上,存在生物组织引入的波前畸变,通过波前校正器不断调整波前误差,来自于样品的荧光的波前被校正,产生无像差的图像。这样所成的图像更明亮,对比度更高,即成像样品的像差比较小。在样品内的聚焦光斑大小将会比理论最小值要大,这是由于光学系统和样品本身的像差引起的,结果产生如图 3(a)所示的低分辨率图像。使用 AO 系统校正入射光的波前,使其在样品内的聚焦光斑尺寸最小,结果产生如图 3(b)所示的高分辨率图像。

显微镜中 AO 技术的应用落后于天文学是因为测量生物组织中的光学畸变很困难,波前传感器不可能

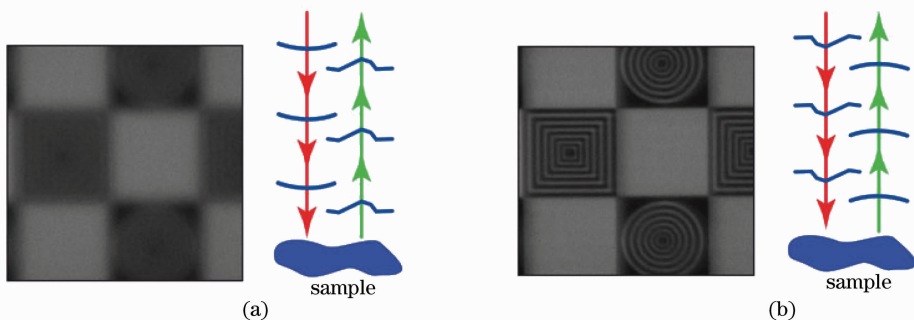


图 3 带有 AO 系统的双光子荧光显微镜校正效果。(a)未校正;(b) AO 校正

Fig. 3 Correction result of two-photon fluorescence microscope with AO system. (a) Without AO correction; (b) with AO correction

放置到生物样品中。Liang 等^[11]最早在生物成像中引入 AO 技术,他们用 Hartmann 波前传感器用于人眼波前误差的探测,观测到超高分辨率的视网膜图像。国内中国科学院光电技术研究所利用 19 单元微变形镜建立了人眼视网膜成像 AO 系统,使我国成为世界上第二个利用 AO 技术实现人眼视网膜高分辨率成像的国家,建立了世界上首台可进入临床试验研究的人眼视网膜 AO 成像仪^[12]。但是这些 AO 系统仅适用于相对比较透明的视网膜这一类生物组织,因为 AO 系统主要探测利用来自生物组织样品的背向散射光。生物组织大部分都是不透光的,而且对光的散射能力特别强,因此拓展 AO 在生物领域中的应用,特别是体内组织成像,研究间接测量生物组织中的光学畸变的方法一直是热点。

1999 年, O'Byrne 等^[13]最早在共聚焦显微镜上采用了 AO 技术,他们分析共聚焦成像时在探测器上的光斑位置由于样品结构的影响会产生侧向移动,在光路中加入一个倾斜的镜子来保持探测器焦点光斑的位置。与他们所用的光学系统不同,大多数显微镜采用外延照明方式,光源光线和探测器光线经过同样的物镜。在这种外延系统中,焦点和探测器总是共轭的,因此倾斜和离焦畸变可以自动校正。

不管是激发光还是发射光都需要穿过组织,当照明激光和荧光都经过样品时,两条光路都存在畸变。显然要恢复接近衍射极限的分辨率,两条光路的畸变都必须校正。Booth 等^[14]在共聚焦荧光显微镜中使用一个变形镜成功地实现了双光路畸变的校正。由于双光子显微镜不需要探测器前的探测针孔,探测光路中的畸变不影响分辨率和信号强度,因此采用 AO 技术的双光子共聚焦荧光显微镜只需要校正照明光路中的畸变。随后 Neil 等^[15~19]先后在共聚焦荧光显微镜中使用变形镜或液晶空间光调制器作为波前校正器的 AO 系统进行了生物组织中光学畸变的校正。图 4 为 Neil 等^[15]使用带有 AO 系统的共聚焦荧光显微镜对于小鼠小肠组织成像的图像。由图 4 可见 AO 系统提高了共聚焦荧光显微镜的成像分辨率,提高了图像对比度。

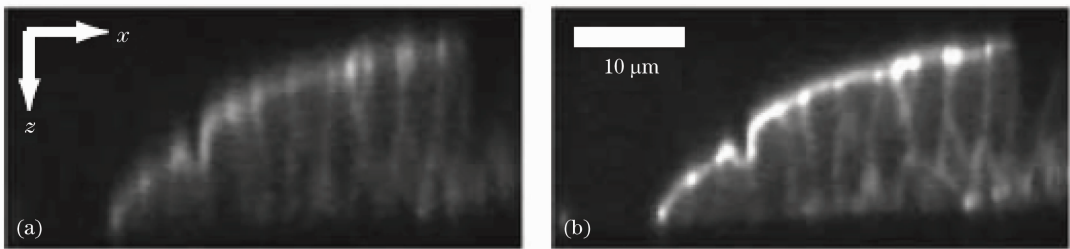


图 4 带有 AO 系统的共聚焦荧光显微镜对小鼠小肠组织成像。(a) 校正前; (b) 校正后

Fig. 4 Images of labeled mouse intestine by confocal fluorescence microscope with AO system. (a) Before correction; (b) after correction

除了扫描显微镜外,成像显微镜也可以采用 AO 技术,AO 技术可以用于光学显微镜的物体二维成像。在其他的应用中,可预测的畸变校正被用来扩大显微镜的视场。Potsaid 等^[20]将一个变形镜和存在剩余像差的物镜组合用来补偿系统视场子区域中的畸变,通过这种方法,他们在大视场成像时保证了子图像分辨率接近衍射极限。

2009 年,波士顿大学 Zhou^[21]采用由变形镜构成的 AO 共聚焦显微成像系统成功地观察了小鼠骨髓的深层图像。2010 年, Ji 等^[22]将荧光蛋白埋入老鼠厚的大脑组织切片中作为导航星,利用空间光调制器实现各个不同的光子孔径来照亮组织样品,然后检测这些光线通过生物组织时的相对位移情况,直接测量并纠正光学畸变,获得了完美的组织图像,后来又采用相同的方法对活体小鼠神经元细胞进行了实时观察。2011 年, Chaigneau 等^[23]通过活的脑部皮质切片中的荧光蛋白成像研究了大脑组织光学不均匀性对双光子荧光显微镜点扩展函数的影响,实验证明这种畸变降低了分辨率和对比度,限制了双光子的光激发。2011 年, Tao 等^[24]采用标记的荧光蛋白作为导航星,使用直接波前畸变测量的方法观察了老鼠大脑组织,实验证明 AO 系统提高了图像分辨率,在 $70 \mu\text{m}$ 成像深度处信号强度增强了 3 倍。

4 共聚焦显微镜中自适应光学的波前传感器和畸变测量

波前传感器位于 AO 系统的最前端,用来实时感知有畸变的波前,为系统中的可变器件提供计算控制信号所需的信息。波前传感器能否准确测量波前畸变直接影响整个 AO 系统的性能。目前用于 AO 系统的波

前传感器有光外差波前探测器、动态剪切干涉仪、Hartmann-Shack 波前传感器、波前曲率传感器、斜面波前传感器(PWFS)和多路高频振荡器等^[25],其中性能最好的是 Hartmann-Shack 波前传感器和动态剪切干涉仪。这些波前传感器需要点状的参考光源,如天文系统中的激光导星,这种参考光源能够产生确切的波前。在共聚焦显微镜的 AO 系统中,情况要更加复杂,因为样品的三维结构使得参考光源通常都不是一个点状光源。在这个情况下,波前探测器探测到的是样品不同部分发出的大量波前,这些光束之间的相互干涉以及样品的结构使得波前很难准确测量^[26]。因此直接波前传感器不能简单用于显微镜的 AO 系统。

到目前为止,大多数 AO 显微镜并没有采用波前传感器而是采用了间接测量畸变的方法^[27]。这些方法避免了上述波前传感器使用中存在的问题。间接测量畸变的方法主要是使用合适的优化算法来使光电探测器探测到最强的光信号,如随机并行梯度下降算法、遗传算法和爬山法等,但是这些寻优算法往往需要很多次的迭代,运行时间长,不适合高速成像的场合,特别是不适合观察生物样品。对于活体成像和长时间成像,最重要的是保证细胞的正常生长,长时间的激光照射将增加光毒性和降低样品的生存能力,特别是观察生物样品时,有些样品暴露时间不能太长。

如果结合排除散焦光的方法,直接波前传感器也可以用于共聚焦显微镜。Booth 等^[28]在共聚焦显微镜中使用模式波前传感器,这些模式波前传感器采用了很多像探测器一样工作的针孔。2004 年,Feierabend 等^[29]使用连续光栅的波前传感器排除了散焦光的影响。这两种方法都是在厚的散射样品如大脑组织中使用波前传感器有前途的方法,然而在这两种方法中,波前畸变的测量仍然在一定程度上依赖于样品的结构。Hanser 等^[30]提出了通过光学图像相位恢复算法来间接测量波前畸变的方法。

5 共聚焦显微镜中自适应光学的波前校正器

AO 在显微镜中的应用主要取决于实用的波前校正器的商业化程度。波前校正器是 AO 系统中的能动器件,用于实时地校正、补偿系统中的波前误差,因此又被称为波前补偿器。从理论上讲,任何可以按照控制信号改变波前相位的器件都可以用作波前校正器。按照波前误差补偿器件改变波前相位方式的不同,波前校正器有两种实现方式,即改变光程(变形反射镜、液晶设备)和移相(声光移相、电光移相)。移相器响应速度快,动态范围大,但是因为受声光、电光器件体积的限制,不能对较大直径的光束进行波前校正,因而其使用范围多局限在光纤干涉仪、光纤激光系统、光纤传感系统中。液晶设备中,广泛使用的是液晶空间光调制器,通过改变液晶电压,使液晶的折射率发生变化,进而引起通过液晶的光束的光程差改变。由于液晶设备的偏振特性和波长与荧光显微镜不匹配,因此目前液晶设备广泛应用于光存储和光学捕获领域。

变形反射镜是应用最为广泛的波前校正器,其种类繁多,在共聚焦显微镜中的 AO 系统选择合适的变形镜就十分重要了。除了需要考虑成本、大小、速度和稳健性,校正能力也是非常重要的指标。Fernandez 等^[31~33]分别提出了检测变形镜特性、校正畸变模式的范围和评价特殊校正任务的性能的方法。早期研制的可变形反射镜多属于模态校正器一类,通常是将压电材料制成的驱动器与反射镜背面连接,通过施加电压使压电材料产生机械运动(膨胀或收缩)从而带动相应的镜面变形,以达到改变镜面面型的目的^[34]。但首先,这种变形镜体积通常比较大且进一步缩小存在很大难度,这就极大地制约了光学系统的小型化;其次,它所需的驱动电压很高,通常可达几百伏,最后它的制造工序复杂、造价昂贵。近年来随着硅微加工技术的发展,微机电系统(MEMS)技术的兴起突破了传统变形镜研究的瓶颈,给变形镜的发展带来新的途径和解决方案,MEMS 微变形镜(MEMS-DM)比传统变形镜更有利于推动 AO 系统向微型化、集成化及单片集成化(SOC)的方向发展^[35]。MEMS-DM 按照反射表面形式,可以分为连续面型 MEMS-DM 和分离式 MEMS-DM。连续表面 MEMS-DM 显示出高的光学效率,有最小的衍射效应,能够增加可校正的像差模式。分离式 MEMS-DM 提供了最高的自由度、最简化的控制算法,但有较低的占空比,光学效率低(约 40%)。由于分离式 MEMS-DM 各个小镜面单元之间存在的间隙会造成能量损失和衍射效应,连续式 MEMS-DM 应用更广泛一些^[36]。

6 共聚焦显微镜中自适应光学的展望

由于生物样品光学性质的不均匀性导致的的光学畸变很大程度上转换成显微镜的视场问题,因此高速实

时的 AO 系统对于共聚焦双光子荧光显微镜非常重要,未来的发展要求加快波前畸变的测量速度和波前校正器的校正速度。目前变形镜频率最高达千赫兹量级,用于商业显微镜的速度至少要超过 100 kHz。

由于将多光子荧光显微镜结合 AO 技术还可以校正场独立性畸变,这可以用于宽场显微镜,包括能够获得与共聚焦显微镜图像类似的宽场切片显微镜^[37]。AO 也可以用于其他新型的光学成像技术中^[38~40]。由于畸变校正正在弱光照明的条件下将提供更好的图像,弱光又可以保证较低的光毒性和提高样品的生存能力,AO 技术与共聚焦显微镜结合,可以使生物学研究更清晰地观察到更深的生物组织,特别适合于活体体内组织成像,从而观察到发生在活体深部组织的复杂生物过程,促进生物学的进一步发展。

尽管 AO 技术在生物成像中还没有被广泛采用,我们相信未来有大量实质的工作将共聚焦显微镜和 AO 结合起来使研究者更清晰地观察到更深的生物组织。

参 考 文 献

- 1 Lu Zhijian, Lu Jingze, Wu Yaqiong *et al.*. Introduction to theories of several super-resolution fluorescence microscopy methods and recent advance in the field [J]. *Prog. Biochem. Biophys.*, 2009, **36**(12): 1626~1634
吕志坚, 陆敬泽, 吴雅琼 等. 几种超分辨率荧光显微技术的原理和近期进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(12): 1626~1634
- 2 Luo Qingming, Zhang Zhihong. Progress in immunophotonics[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(9): 0900114
骆清铭, 张智红. 免疫光子学进展[J]. *光学学报*, 2011, **31**(9): 0900114
- 3 M. J. Booth. Adaptive optics in microscopy[J]. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 2007, **365**(1861): 2829~2843
- 4 Jiang Wenhan. Adaptive optical technology [J]. *Chinese J. Nature*, 2006, **28**(1): 7~13
姜文汉. 自适应光学技术[J]. *自然杂志*, 2006, **28**(1): 7~13
- 5 Sha Dingguo, Jiang Qin, Zhao Weiqian *et al.*. Review and expectation of non-coaxial laser confocal microscopy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(5): 1157~1161
沙定国, 江 琴, 赵维谦 等. 非共轴激光共焦显微技术的研究现状与展望[J]. *中国激光*, 2010, **37**(5): 1157~1161
- 6 C. J. R. Sheppard, C. J. Cogswell. Effects of aberrating layers and tube length on confocal imaging properties[J]. *Optik*, 1991, **87**(1): 34~385
- 7 C. J. R. Sheppard, M. Gu. Aberration compensation in confocal microscopy[J]. *Appl. Opt.*, 1991, **30**(25): 3563~3568
- 8 A. Egner, S. W. Hell. Equivalence of the Huygens-Fresnel and Debye approach for the calculation of high aperture point-spread functions in the presence of refractive index mismatch[J]. *J. Microsc.*, 1998, **193**(3): 244~249
- 9 M. Schwertner, M. J. Booth, T. Wilson. Characterizing specimen induced aberrations for high NA adaptive optical microscopy[J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(26): 6540~6552
- 10 Jiang Pengzhi, Ma Haotong, Zou Yongchao *et al.*. Study of aberration correction in light path of adaptive optical system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(12): 1214002
蒋鹏志, 马浩统, 邹永超 等. 自适应光学系统内光路的像差校正研究[J]. *光学学报*, 2011, **31**(12): 1214002
- 11 J. Liang, D. R. Williams. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1997, **14**(11): 2884~2892
- 12 Jiang Wenhan, Zhang Yudong, Rao Changhui *et al.*. Progress on adaptive optics of Institute of Optics and Electronics, Chinese Academy of Sciences[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(9): 0900106
姜文汉, 张雨东, 饶长辉 等. 中国科学院光电技术研究所的自适应光学研究进展[J]. *光学学报*, 2011, **31**(9): 0900106
- 13 J. W. O'Byrne, W. Fekete, M. R. Arnison *et al.*. Adaptive optics in confocal microscopy[C]. *Proc. 2nd Int. Workshop on Adaptive Optics for Industry and Medicine*, 1999, 85~90
- 14 M. J. Booth, M. A. A. Neil, R. Juškaitis *et al.*. Adaptive aberration correction in a confocal microscope[J]. *PNAS*, 2002, **99**(9): 5788~5792
- 15 M. A. Neil, R. Juškaitis, M. J. Booth *et al.*. Adaptive aberration correction in a two-photon microscope[J]. *J. Microsc.*, 2002, **200**(2): 105~108
- 16 A. J. Wright, D. Burns, B. A. Patterson *et al.*. Exploration of the optimization algorithms used in the implementation of adaptive optics in confocal and multiphoton microscopy[J]. *Microsc. Res. Technol.*, 2005, **67**(1): 36~44
- 17 L. Sherman, J. Y. Ye, O. Albert *et al.*. Adaptive correction of depth-induced aberrations in multiphoton scanning microscopy using a deformable mirror[J]. *J. Microsc.*, 2002, **206**(1): 65~71
- 18 P. N. Marsh, D. Burns, J. M. Girkin. Practical implementation of adaptive optics in multiphoton microscopy[J]. *Opt. Express*, 2003, **11**(10): 1123~1130
- 19 M. Rueckel, J. A. Mack-Bucher, W. Denk. Adaptive wavefront correction in two-photon microscopy using coherence-gated wavefront sensing[J]. *PNAS*, 2006, **103**(46): 17137~17142
- 20 B. Potsaid, Y. Bellouard, J. T. Wen. Adaptive scanning optical microscope (ASOM): a multidisciplinary optical microscope design for large field of view and high resolution imaging[J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(17): 6504~6518

- 21 Yaopeng Zhou. Adaptive Optics Two-Photon Scanning Laser Fluorescence Microscopy [D]. New York; Boston University, 2009
- 22 Na Ji, Daniel E. Milkie, Eric Betzig. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues [J]. *Nature Methods*, 2010, **7**(2): 141~147
- 23 Emmanuelle Chaigneau, Amanda J. Wright, Simon P. Poland *et al.*. Impact of wavefront distortion and scattering on 2-photon microscopy in mammalian brain tissue[J]. *Opt. Express*, 2011, **19**(23): 22755~22774
- 24 Xiaodong Tao, Oscar Azucena, Min Fu *et al.*. Adaptive optics microscopy with direct wavefront sensing using fluorescent protein guide stars [J]. *Opt. Lett.*, 2011, **36**(17): 3389~3391
- 25 Zhou Renzhong, Yan Jixiang. Adaptive Optics Theory [M]. Beijing; Beijing Institute of Technology Press, 1996. 1~45
周仁忠, 阎吉祥. 自适应光学[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 1996. 1~45
- 26 P. Artal, S. Marcos, R. Navarro *et al.*. Odd aberrations and double-pass measurements of retinal image quality[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1995, **12**(2): 195~201
- 27 Yang Huiizhen, Li Xinyang. Effects of imaging system noise on the correction capability of adaptive optics without a wavefront sensor[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(10): 2520~2525
杨慧珍, 李新阳. 成像系统噪声对无波前探测自适应光学校正效果的影响[J]. 中国激光, 2010, **37**(10): 2520~2525
- 28 M. J. Booth, M. A. Neil, T. Wilson. New modal wave-front sensor: application to adaptive confocal fluorescence microscopy and two-photon excitation fluorescence microscopy[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2002, **19**(10): 2112~2120
- 29 M. Feierabend, M. Ruckel, W. Denk. Coherence-gated wave-front sensing in strongly scattering samples[J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(19): 2255~2257
- 30 B. M. Hanser, M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard *et al.*. Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy[J]. *J. Microsc.*, 2004, **216**(1): 36~48
- 31 E. J. Fernandez, P. Artal. Membrane deformable mirror for adaptive optics: performance limits in visual optics[J]. *Opt. Express*, 2003, **11**(9): 1056~1069
- 32 L. J. Zhu, P. C. Sun, D. U. Bartsch *et al.*. Wave-front generation of Zernike polynomial modes with a micromachined membrane deformable mirror[J]. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(287): 6019~6026
- 33 M. J. Booth, T. Wilson, H. B. Sun *et al.*. Methods for the characterization of deformable membrane mirrors[J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(24): 5131~5139
- 34 C. M. Louis, H. John. Historical review of adaptive optics technology[C]. *SPIE*, 1993, **2141**: 122~135
- 35 Hongbin Yu, Haiqing Chen, Sai Fu. A versatile micromirror with multi-movement mode[J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(7): 1178~1181
- 36 D. J. Dagle. Large-stroke MEMS deformable mirrors for adaptive optics[J]. *J. Microelectromech. Syst.*, 2006, **15**(3): 572~583
- 37 Z. Kam, P. Kner, D. Agard *et al.*. Modeling the application of adaptive optics to wide-field microscope live imaging[J]. *J. Microsc.*, 2007, **226**(1): 33~42
- 38 B. E. Cohen. Biological imaging; beyond fluorescence[J]. *Nature*, 2010, **467**(7314): 407~408
- 39 John Paul Pezacki, Jessie A Blake, Dana C Danielson *et al.*. Chemical contrast for imaging living systems: molecular vibrations drive CARS microscopy[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, **7**(3): 137~145
- 40 S. W. Hell. Far-field optical nanoscopy[J]. *Science*, 2007, **316**(5828): 1153~1158