

多色双光子成像技术进展

崔 权^{1,2}, 陈忠云^{1,2}, 张智红^{1,2}, 骆清铭^{1,2}, 付 玲^{1,2}

¹华中科技大学武汉光电国家实验室(筹)Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 湖北 武汉 430074;

²华中科技大学生物医学工程系生物医学光子学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要 双光子荧光显微成像是一种非线性光学显微技术,具有高空间分辨率、高信噪比和固有的三维层析分辨能力等优点。传统的双光子荧光显微成像通常使用波长可调谐的 100 fs 超短脉冲激光器作为激光光源。目前,人们对双光子荧光显微成像方法进行了深入研究,改进光源及探测方法是常用的手段。介绍和总结了多色双光子荧光显微成像技术的近期研究进展及其在生物医学中的应用。首先介绍了传统飞秒激光器及光学参量振荡器在多色成像中的应用,然后对光纤超连续谱在多色显微成像中的应用进行了分析,最后简要说明了增强自相位调制效应产生连续光谱以及选择性激发实现多色成像的工作。多色双光子成像技术不仅可以同时获取含有多种荧光团的待测样品的高对比度双光子荧光图像,而且具有系统结构简单、操作简便等优点,这使得其在生物医学和材料科学等领域具有广阔的应用前景,并且为生物医学诊断与研究提供了一种有效的工具和平台。

关键词 显微;非线性显微成像;双光子荧光显微成像;多色成像;超连续谱

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP54.060002

Recent Advances in Multicolor Two-Photon Imaging Technique

Cui Quan^{1,2}, Chen Zhongyun^{1,2}, Zhang Zhihong^{1,2}, Luo Qingming^{1,2}, Fu Ling^{1,2}

¹Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China;

²Key Laboratory for Biomedical Photonics of Ministry of Education, Department of Biomedical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China

Abstract Two-photon fluorescence microscopy is a kind of nonlinear optical microscopy, which has the advantages of high time resolution, spatial resolution, high signal to noise ratio and intrinsic three-dimensional ability. Traditional two-photon fluorescence microscopy generally adopts tunable ultra-short pulse laser with pulsewidth of 100 fs as the light source. At present, two-photon fluorescence microscopy is further studied, and light source and detection method improvements are common means. In this paper, we introduce and summarize the recent advances in multicolor two-photon excited fluorescence microscopy and its application in biomedicine. Firstly, traditional application of femtosecond laser and optical parametric oscillator in multicolor imaging is introduced. Secondly, we focus on the application of fiber supercontinuum in multi-color microscopic imaging. Finally, we make a description of our recent work on continuum spectrum generation by enhanced self-phase modulation and selective excitation to achieve multicolor imaging. Multicolor two-photon imaging technology has the advantages of simple set-up, simple operation, and it has been broadly applied in biomedical and material science. Which provides a powerful tool and platform for biomedical diagnosis and research.

Key words microscopy; nonlinear microscopy imaging; two-photon fluorescence microscopy imaging; multicolor imaging; supercontinuum

收稿日期: 2016-11-25; **收到修改稿日期:** 2017-01-23

基金项目: 国家自然科学基金(61522502)

作者简介: 崔 权(1989—),男,博士研究生,主要从事光纤连续光谱及双光子荧光显微成像方面的研究。

E-mail: D201177657@hust.edu.cn

导师简介: 付 玲(1978—),女,博士,教授,博士生导师,主要从事生物医学光子学方面的研究。

E-mail: lfu@mail.hust.edu.cn(通信联系人)

OCIS codes 180.4315; 170.0180; 190.4370

1 引言

双光子荧光显微成像是 20 世纪 90 年代发展起来的基于双光子荧光激发原理而形成的光学显微技术。虽然早在 20 世纪 30 年代双光子荧光激发原理就由美国物理学家 Maria Göppert-Mayer 提出,但是直到 20 世纪 60 年代因为激光的出现才被实验所证实。最终随着飞秒量级的激光器的出现和普及,1990 年美国康奈尔大学的 Denk 小组在实验上首次实现了双光子荧光显微成像^[1]。与传统的荧光显微成像方法相比,双光子激发只发生在焦点附近极小的区域,减少了对焦点外样品的光漂白和光损伤,而且使用近红外波段的激发光受到生物组织散射的影响小,能够达到更大的成像深度,因此在双光子荧光显微技术中,不需要使用共聚焦针孔即可获得高分辨率的深层三维层析图像。此外,生物样品的荧光发射峰一般在 400~600 nm,可以简单地通过滤光片的方法消除近红外激发光对荧光的干扰,而且使用近红外波段的激发光对于生物组织来说有很好的穿透性。双光子荧光显微成像技术由于具有细胞损伤低、成像深度高以及可实现长时间活体三维扫描成像等特点,因此在神经信号传导、生物代谢过程和药物研究等领域获得广泛应用。

2 双光子荧光显微成像

2.1 双光子荧光成像原理

多光子激发的原理和传统的单光子激发原理不同,可以直观地用 Jablonski 能级图(图 1)表示:在单光子激发过程中,基态荧光分子在激光的照射下吸收一个高能光子使分子从基态跃迁到激发态,经过短暂的振动弛豫过程到达亚稳态,然后从亚稳态返回基态并发射出较长波长的荧光光子;而在多光子激发过程中,分子在强光激励下,荧光分子同时吸收多个光子(双光子激发即吸收两个光子)实现基态到激发态的跃迁,随后经过同样的振动弛豫后,从亚稳态返回基态并发射出一个波长大于激发光波长 $1/n$ (双光子激发即激发波长的二分之一)的光子,其中 $n=2,3,4,\dots$ 。

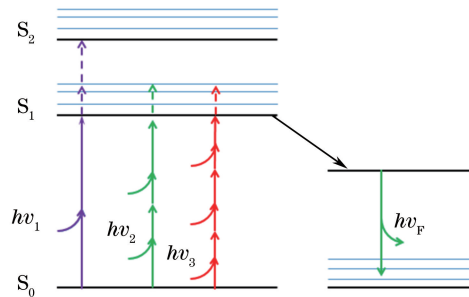


图 1 单光子、双光子和多光子激发的 Jablonski 能级图

Fig. 1 Jablonski energy level diagram excited by one-, two-, and multi-photon

双光子激发荧光是一个非线性过程,其激发光子能量大约为单光子激发光子能量的一半,并且两个光子的能量必须同时被荧光分子吸收。双光子荧光激发效率不仅与分子本身的特性(即双光子吸收截面)有关,还与激发光的特性有关。通常来说,为了使信号强度足够高,需要使用高数值孔径的物镜来实现激发光在空间上的高度聚焦,而高度的时间聚焦则需要超短脉冲激光器来实现。

2.2 双光子荧光显微成像的特点

1990 年,美国康奈尔大学的 Denk 等^[1]将双光子荧光激发和共聚焦激光扫描显微镜相结合,得到了双光子激光扫描显微镜,打开了活体生物高分辨率光学显微成像研究的大门。与传统的单光子共焦显微镜相比,双光子荧光显微镜的优点为:穿透深度更深、具有天然层析能力、光毒性光漂白性低。

单光子荧光激发过程只需吸收一个光子,是一个线性吸收过程。而双光子荧光激发需要同时吸收两个光子,其跃迁概率跟激光功率成平方关系,所以双光子吸收是一个非线性过程:只有在高光子密度的情况下才会发生显著的双光子吸收过程。正是由于双光子荧光激发是一个非线性过程,相比于线性过程的单光子荧光激发具有如下特点:1) 双光子激发是用近红外激光激发,比单光子激发波长要长,而在生物组织中,长

波长的光比短波长的光受散射影响要小,从而容易穿透样品,能达到更大的成像深度。2) 单光子激发过程一般是用可见光波段激发,它的高光子能量会损伤活体细胞,而双光子激发利用近红外波段波长激发,长波激发能够显著降低光损伤和光毒性,并且在近红外波段组织对光的内源性吸收较少,是探测活体组织成像的理想光学窗口。故双光子激发能在不损伤活体组织的情况下进行深层的光学探测。3) 由于单光子激发过程是线性激发,所以在焦平面附近都会产生荧光,导致成像时会有较高的背景荧光,从而影响成像质量;而双光子由于是非线性过程,在高光子密度的限制下,只在焦点附近产生荧光,因此双光子荧光显微成像具备高的时间和空间分辨率、固有的三维层析能力和低的焦点外漂白,这些特性使其有利于对活体组织长时成像。现在,双光子荧光显微成像已经广泛应用于生物代谢过程、药物研究及神经信号传导等领域,如活体细胞的动态生命过程和脑神经活动的监测。其中多色双光子荧光显微成像以其独特的优势,已经成为活体组织细胞动态生命过程研究中最重要工具之一。

2.3 多色双光子荧光成像

在双光子荧光显微成像中,使用具有不同发射光谱的染料或者荧光蛋白标记不同的细胞或者蛋白质,通过探测对应荧光团的光谱信息,从而在图像中将不同的细胞或蛋白质区分开来。为了对不同标记荧光团进行多色成像,需要同时激发这些荧光团,以便快速区分并实时动态监测这些荧光标记物。单光子荧光成像中,不同种类的荧光团的激发光谱比较窄,通常需要多个波长进行激发,这就使得单光子荧光的多色成像难以实现;但许多常见荧光团的双光子激发范围相对于单光子激发要宽得多,用单一的飞秒激光脉冲可以实现不同荧光团的双光子激发^[2-3]。但是在实际的多色双光子成像中,使用单一波长的激光作为光源具有局限性:首先多色荧光物质的最佳激发波长通常不相同,单一波长激发会导致双光子激发效率低下,为了获得足够的荧光信号强度将不得不提升激光功率,这将导致严重的光毒性和光漂白,从而引发对生物组织的损伤;另外,不同染料、荧光蛋白以及生物组织内的自发荧光都可能存在严重的光谱串扰,成像过程中的光谱重叠会严重影响不同荧光物质区分,导致难以实现细胞和蛋白质的动态监测。

为了解决多色双光子荧光显微成像中存在的困难与挑战,人们对双光子荧光显微成像方法进行了深入研究,改进光源及探测方法是常用的手段。目前,已经有文献报道使用包含多种波长的激光光源(如两台飞秒激光器或者一台飞秒激光器和一台光学参量振荡器)用以同时实现不同荧光染料或者荧光蛋白的最优激发。另外,部分商业的双光子荧光显微成像系统已经开始使用双飞秒激光器。但是这种多色成像的方法需要额外增加极其昂贵的飞秒激光器作为激发光源,并且导致成像系统的光路变得复杂,同时降低了系统的稳定性。

超连续谱是指超短激光脉冲经过高非线性介质时,由于非线性效应和色散效应的共同作用而使输出光谱展宽的一种物理现象,超连续谱具有光谱覆盖范围宽、峰值功率高等特点。近年来,具备超宽光谱的超连续谱使得同时激发多种荧光团成为可能。具体实现方法是将超短激光脉冲耦合进光子晶体光纤产生光谱覆盖范围达到数百纳米的超连续谱激光脉冲作为双光子荧光显微成像的激发光源,激发不同的荧光蛋白及染料,实现多色双光子荧光成像。诸多文献研究证实,大部分的荧光物质的双光子荧光最优激发波长都位于近红外波段。因此产生具有高度相干的近红外波段连续光谱实现多色双光子荧光成像是当前研究活体蛋白质结构和功能的一个重要需求。

3 多色双光子技术的进展

对生物组织进行双光子荧光显微成像时所使用的荧光可以分为两种:自发荧光与外源荧光。自发荧光指生物组织本身所含有的荧光团,如生物体中的分子烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)及色氨酸可以被双光子激发产生荧光。NADH最佳激发双光子波长为750 nm,发射光谱位于460 nm左右,生物组织内新陈代谢率高的区域因为含有高浓度的NADH,故所得荧光信号强度比较高,因此NADH的荧光可用来监测组织中的氧化还原态。色氨酸的单光子激发波长在250~300 nm,双光子激发波长位于500~600 nm^[4]。色氨酸在生物组织内的分布密度差异不大,通过以色氨酸荧光作为参考,NADH与色氨酸信号强度对比可以作为细胞代谢的强度指标,从而有助于区分正常细胞与癌细胞^[5]。另外双光子显微技术也可以用来观测细胞外间质,其自发荧光的主要来源为胶原蛋白(荧光发射光谱位于

350~400 nm)与弹性蛋白(荧光发射光谱位于 340~370 nm)。

尽管生物组织内含有自发荧光物质,但是由于自发荧光的吸收截面普遍较低且含量有限,为了更好地利用双光子荧光显微成像观测生物组织,引入外源荧光包括荧光染料或者荧光蛋白是必要的。外源荧光的主要挑战通常是如何均匀并且不破坏活体组织中的细胞活性而进行荧光标记。荧光蛋白技术是荧光标记方面的重要研究内容之一,荧光蛋白可被编译在目标细胞的脱氧核糖核酸(DNA)中由细胞表达出来,这使得其对生物无毒性。通过双光子荧光显微成像,探测荧光来追踪特定蛋白质,可以获得细胞的动态活动过程。基于荧光蛋白的分子探针和标记方法已成为活细胞或活体内动态成像研究生物大分子或细胞功能的重要工具,目前已经研究出了多种荧光蛋白并广泛应用于生物学的众多研究领域^[6-12]。

3.1 单一波长光源实现双光子荧光显微成像

从 Maker 等首次报道激光二极管抽运的钛蓝宝石(Ti:Sapphire)激光器到 1991 年第一台自锁模激光器问世以来,高平均功率全固态可调谐钛蓝宝石激光器由于其峰值功率高、调谐范围宽、脉冲宽度短、寿命长、工作可靠等优点而广泛应用于非线性光学、激光光谱学、激光医疗等领域。钛蓝宝石激光器的调谐波长一般在近红外波段,脉冲宽度小于 100 fs,是多光子成像技术的理想光源。再结合倍频技术、光参量振荡与放大技术,能够将输出波长范围拓宽到紫外至红外。若使用单光子激发,则不同颜色的荧光分子通常无法共享单一激发光,这是因为单光子吸收谱较窄。而荧光分子的双光子吸收谱都较单光子吸收谱要宽,光谱重叠度很高,单一波长就能够同时激发多色标记荧光物质实现多色成像。而且使用多种颜色的荧光分子可在光谱及空间上提高影像的识别度。多色荧光探测的常用方法是利用滤光片将荧光信号分开,然后用光电倍增管(PMT)探测不同波段的信号。传统上是使用转动的滤光片将不同色光分开,较高价位的选择也有可调式液晶滤片、可调式声光滤片。

双光子荧光显微成像作为商业工具广泛应用于神经^[13-15]、癌症^[16-18]、疾病检测^[19-20]以及免疫^[21-22]研究当中。由于很多荧光物质的双光子吸收光谱较宽,单一波长就能够同时激发一些多色标记荧光物质实现相互作用的检测,如实时监测双色标记的 T 细胞和 B 细胞的形态和运行规律^[23]、使用双色荧光蛋白示踪细胞有丝分裂过程、活体皮肤成像研究细胞行为^[24]、关节软骨的胶原纤维^[25]、利用自发荧光研究生物的脂肪组织^[26]、三维重构眼睛结构以研究房水流出系统^[27]等方面。甚至实现了活体猕猴脑部的长时程多色成像,以观测神经活动^[28]。

实际上由于多色荧光物质的双光子最优激发波长不同,而当前大部分商用的双光子荧光显微成像都使用标准的 100 fs 钛蓝宝石激光器作为激发光源(其光谱带宽为 5~10 nm,波长可调范围约为 700~1000 nm),无法同时有效激发多色荧光团,只能调节激发波长以实现平衡激发^[29-30]。例如,上述文献中为了实现对羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)和 4-氯甲基罗丹明(CMTMR)双色标记的 T 细胞和 B 细胞同时监测,波长不得不从 CFSE 的最优激发波长 720 nm 移动到 820 nm。虽然实现了同时监测,但是这样会使多色荧光标记物都不是最优激发的。尤其是当荧光团本身双光子吸收截面较小时,不得不增加功率来获得可观的荧光信号,但是影响了蛋白质的生物活性。如何改进现有飞秒激光器的双光子激发效率,以提升双光子荧光成像系统的信号水平,从而使双光子成像技术更加高效地用于生物医学研究,是当前双光子荧光显微技术研究的重要方向。

3.2 多波长光源实现多色双光子荧光显微成像

在双光子荧光成像中,由于各种荧光团具有不同的激发波长,对于同时含有多种荧光团或未知成分的待测样品,为获得各种荧光团的荧光信号,往往需要依次改变激发光波长以获得最优激发效率。通过调节标准飞秒激光器的波长可以实现最优激发对应荧光团,但是调节波长会导致光路中的物理移动,从而在生物成像中引入误差;另一方面,激光器波长调节需要数十秒,无法进行快速切换以满足多色成像的动态监测,这使得利用调谐激光器改变激发波长以激励不同的荧光团在实际应用中是不可取的。

为了实现多色荧光团的最优激发,最简单最直接的方法就是使用包含不同频率成分的光源,分别对应于特定的荧光团的最优激发波长,这样既可以实现多色荧光团的最优激发,又能保证荧光信号水平。一个简单的思路是使用两个甚至更多的飞秒激光器产生多波长光源^[31-34]。根据实际的多色成像的需求,光参量振荡器也可以作为扩展激发光的光谱波段的光源。通过利用钛蓝宝石振荡器作为抽运源,光参量振荡器可以输

出 1200 nm 以上的红外波段范围内连续调谐的超短脉冲激光(与抽运光的波长相关),这是传统钛蓝宝石振荡器(通常为 700~1000 nm)所远远达不到的光谱波段^[35-37]。100 fs 激光器的抽运脉冲激光与光参量振荡器的输出脉冲激光相结合,能够获得更宽的激发范围,激发更多种类的荧光团,从而实现多色双光子成像。

Herz 等^[33]利用一个钛蓝宝石激光器(波长调谐范围为 700~1000 nm,脉冲宽度为 100 fs,重复率为 80 MHz)和一个光参量振荡器组成双光源系统,激光器的出射波长为 850 nm 或 920 nm 时,光参量振荡器产生的波长为 1110 nm 或 1170 nm,能够实现有效激发的多色双光子荧光成像。Entenberg 等^[38]使用两个钛蓝宝石激光器,一个作为荧光吸收波长在 750~950 nm 范围荧光团的激发光;另一个激光器和光参量振荡器组成一个新的激励源,产生荧光吸收波长在 950~1040 nm 和 1100~1600 nm 范围荧光团的激发光,产生的激光光源对青色荧光蛋白(CFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和标记型红色荧光蛋白 657(TagRFP657)标记的小鼠的乳腺癌肿瘤细胞实现多色成像。Li 等^[4,39]和 Yamanaka 等^[40]利用光学参量振荡倍频的技术获得了 600 nm 波段的超短飞秒脉冲,实现了可见光波段的双光子激发,与传统的 100 fs 激光器结合,用于研究活体自发荧光,通过对 NADH、FAD 及色氨酸的双光子荧光成像,实现了多色皮肤癌症炎症检测、肥大细胞脱颗粒效应的机理研究等,这对于早期疾病诊断及病理学研究有着重要的意义。Mahou 等^[41]利用相干控制的方式实现了多色双光子荧光显微成像,图 2(a)为利用钛蓝宝石激光器及光学参量振荡产生脉冲序列导入显微镜进行双光子荧光显微成像,前向探测二次谐波及三次谐波信号,后向探测双光子信号。图 2 中 τ 为时延,SHG 表示二次谐波产生,SFG 表示和频产生,THG 表示三次谐波产生,2PEF 表示双光子激励荧光,OPO 表示光学参量振荡,Ti:S 表示钛蓝宝石激光器,YFP 表示黄色荧光蛋白,tdTomato 表示番茄红荧光蛋白,1P 表示单光子,2P 表示双光子。由于钛蓝宝石激光器及其抽运的光学参量振荡所产生的脉冲可以保持相干性,所以两束不同波长的脉冲不仅可以分别激发对应的荧光团,也可以在时域重合时实

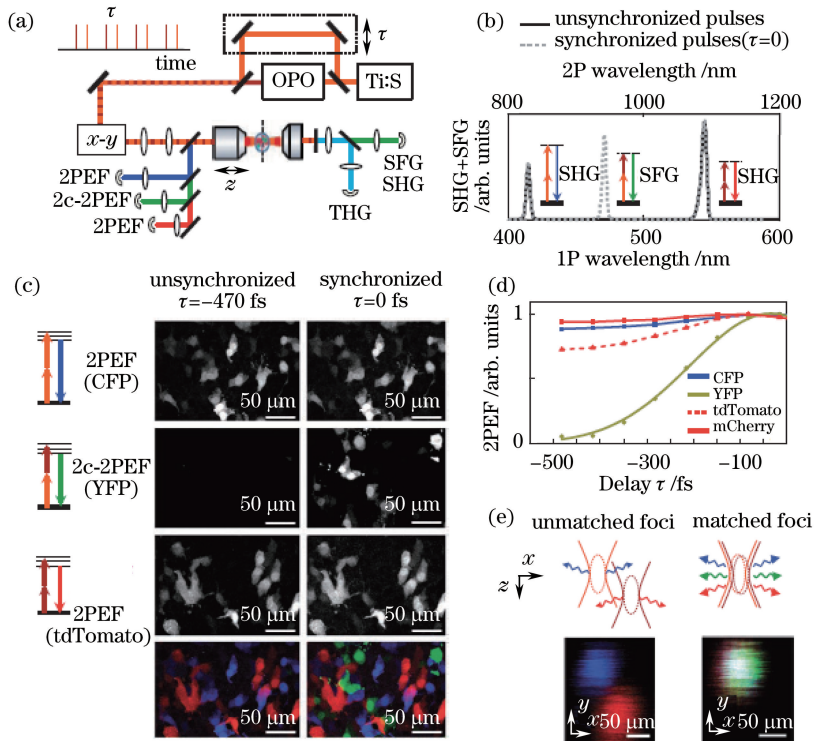


图 2 (a) 双光子荧光显微成像装置;(b) 倍频晶体产生的二次谐波信号,分别对应于三种不同的双光子吸收过程;(c) 三通道分别探测 CFP、YFP、tdTomato 标记的人源胚胎肾(HEK)细胞;(d) 不同荧光蛋白的信号随脉冲序列的时延变化;(e) 不同空间重叠的聚焦钛蓝宝石激光器和光学参量振荡光束产生的图像^[41]

Fig. 2 (a) Two-photon fluorescence microscopic imaging device; (b) second harmonic signal generated by frequency-doubling crystal, corresponding to three different two-photon absorption processes; (c) three-channel fluorescence imaging of human embryonic kidney (HEK) cells for CFP, YFP and tdTomato; (d) measured 2PEF signals with different delays between the pulse trains; (e) images of the focused Ti:S and OPO beams with different spatial overlaps^[41]

现混合双光子激发。利用这一性质,混合双光子激发实现了不同荧光团的三色激发。

另一种多波长光源是 sub-20 fs 超短脉冲激光器^[42-46]。sub-20 fs 超短脉冲激光器可以产生传统的 100 fs 激光器所不具有的宽带光谱,其光谱宽度可达 100~200 nm,覆盖多种荧光蛋白或荧光染料的激发谱,从而实现同时激发多种荧光。sub-20 fs 超短脉冲激光器的宽带光谱可以避免多激光器共线导致的光路复杂和不稳定性。Brenner 等^[42]和 Pillai 等^[46]使用空间光调制器控制超短脉冲激光脉冲的频域相位,结合线性解谱的方式实现了选择性激发多色双光子荧光显微成像,实现了利用双探测通道区分三种不同荧光蛋白标记的细胞。虽然可以同时激发多种荧光团,但是这种光源的中心波长不能调谐,且其钟形的光谱形状不利于激发波长位于光谱边缘的荧光物质,从而限制了其在多色成像中的应用。

3.3 连续光谱实现多色双光子荧光显微成像

相比于传统的光源,基于光纤的超连续谱有多种显著的优点使其更适合应用于生物医学光子学中。第一,超连续谱中同时包含多种波长成分,这一性质在生物医学光子学应用中非常重要(尤其是成像),它使得连续谱和单波长激光器有着一样的空间性质,可以在成像中聚焦达到衍射极限;第二,通过改变光子晶体光纤和抽运光的参数,可以控制超连续谱的能量分布、光谱宽度等参数,特别是能获得普通激光器不能产生的波长成分;第三,光纤超连续谱可以与基于光纤的器件兼容,这意味着超连续谱有望实现光学成像装置的全光纤化,从而使得装置小型化、便携化,这将大大促进光学成像的发展,扩展其应用范围^[47-48]。

早期的超连续谱是利用激光在普通的单模光纤的正常色散区传输产生的,这是因为局限于当时激光器和光纤的发展水平。尽管当时的超连续谱脉冲可以被压缩至 6 fs,但是复杂的激光光源系统导致了超连续谱不能被广泛应用。随着光子晶体光纤飞速发展,研究者们开始利用具有零色散点的光子晶体光纤来产生超连续谱。这主要是因为光子晶体光纤的参数可以控制零色散点的位置,利用孤子效应可以容易地获得光谱范围极大的超连续谱。但是,孤子效应发生于光纤反常色散区,这种机制获得的超连续谱对于抽运激光器的噪声和抖动非常敏感,外界微小的扰动会导致光谱结构的巨大变化,同时造成连续光谱相干性的下降,使得其时域宽度无法被压缩,导致这类连续光谱脉冲并不适合用于多光子成像。研究者们通过改变光子晶体光纤的参数来获得更高平坦性、相干性、稳定性的超连续谱,使其可以被用于显微成像。

近年来,超短脉冲激光器和光子晶体光纤的进一步发展促进了超连续谱在不同领域中的应用,其中高非线性光子晶体光纤以其可控的色散特性和高非线性而成为产生超连续谱的理想介质,而基于光子晶体光纤的超连续谱及其在生物医学光子学中的应用研究更是备受关注^[47]。目前,超连续谱作为激发光源,已经在多色双光子荧光显微成像上有了相当广泛的应用^[49-54]。2012年,Liu 等^[55]利用 1060 nm 激光抽运全正常色散光子晶体光纤(ANDi-PCF)产生 900~1160 nm 的连续光谱,截取超连续谱的部分波长进行脉冲压缩后被应用于多色成像中,实现了不同荧光蛋白标记细胞及猪皮肤的双光子荧光显微成像。2009年 Li 等^[5]和 Teh 等^[56]利用光子晶体光纤产生了 600~700 nm 的连续光谱,并对色氨酸、NADH 进行了研究,该技术提供了一个独特的方法来研究细胞内的细胞代谢活性和蛋白质的表达,用于进行非侵袭性癌变的诊断。2012年 Wang 等^[57]使用 1550 nm 光纤激光器耦合进大模场面积光子晶体光纤,如图 3 所示。由于孤子自平移(SSFS)效应产生中心波长分别为 1728 nm 和 1900 nm 的连续谱,再利用偏硼酸钡晶体(BBO)和硼酸铋晶体(BiBO)的特性分别产生 775, 864, 950 nm 的二次谐波,产生的二次谐波与红色荧光蛋白(RFP)、CFP、YFP 的荧光团的双光子吸收峰匹配,从而实现有效激发。

另一种适用于超连续谱产生的是契伦科夫辐射效应,这种非线性效应产生的脉冲又被称为契伦科夫波或者色散波^[58]。高阶孤子在光纤的反常色散区传输时,在高阶色散和非线性作用的微扰下会产生色散波。有研究者^[59-60]已经成功地利用契伦科夫辐射产生了适用于非线性光学成像的超短脉冲激光,并对小鼠进行了血管的双光子成像以及二次谐波成像,如图 4 所示。色散波是连续谱产生的一个重要物理机制,其波长通常位于短波长,极大地增加了超连续谱的光谱展宽。另外,虽然双光子激发的漂白速率在可见光波段有所增加,但是它可以获得极强的荧光信号,这使得双光子成像过程中使用较低的激发功率从而有益于活体成像^[61-63]。

特种光纤及超短脉冲激光光源技术的飞速发展促进了超连续谱技术的逐步完善,使其在生物医学成像方面的应用领域不断扩大。结合了超连续谱技术的双光子荧光成像技术有望解决多色成像过程中荧光信号

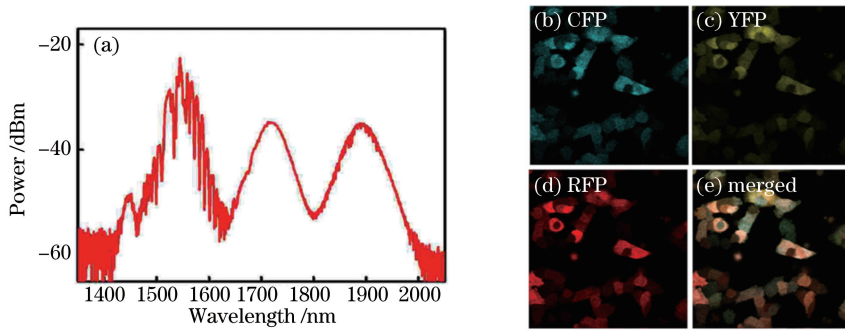


图 3 (a)利用大模场面积光子晶体光纤产生的连续光谱;

(b)~(e) CFP、YFP、RFP 标记细胞的双光子荧光显微成像及其合成图(视场大小为 $343 \mu\text{m} \times 343 \mu\text{m}$)^[57]

Fig. 3 (a) Continuous spectrum generation by using a large-mode-area photonic crystal fiber; (b)-(e) two-photon fluorescence images of CFP, YFP, RFP labeled cells and their merged image (size of fields of view is $343 \mu\text{m} \times 343 \mu\text{m}$)^[57]

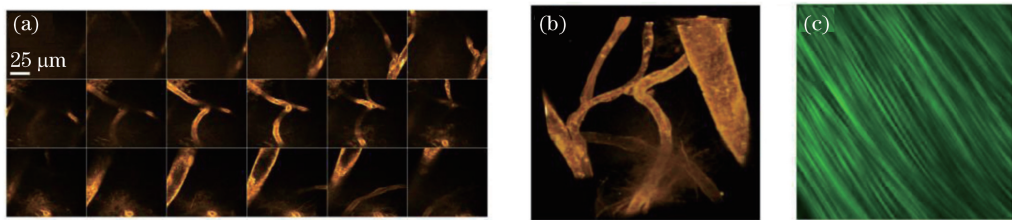


图 4 (a)不同深度的鼠脑血管双光子荧光成像;(b)重构获得的鼠脑血管 3D 图像;

(c)大鼠尾腱的二次谐波成像(图像大小: $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$)^[59]

Fig. 4 (a) Two-photon fluorescence images of blood vessels in mouse brains with different depths; (b) reconstructed blood vessel of the mouse brain in 3D space; (c) second harmonic generation image of mouse tail tendon (image size: $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$)^[59]

串扰的问题;100 fs 的钛蓝宝石脉冲激光通过光子晶体光纤产生的连续光谱能够覆盖大多数荧光蛋白及染料的激发光谱,进一步扩大多色双光子成像的应用范围。光纤连续光谱对于多色双光子荧光显微成像技术有着重要的意义,尤其是在活体多色成像以及免疫和疾病研究的应用方面有着更为广泛的前景。

3.4 光谱成像

随着细胞生物学、分子生物学、临床病理学等学科的发展,人们对分析检测不再是满足一般的定性定量要求,而是提出了“综合形态分析”的要求,即要求在具体区域的定性定量要求,但这是传统的成像技术无法达到的。而结合了光谱技术和图像分析技术的光谱成像技术能够解决定位定性和定量问题,而且光谱成像技术可以消除光谱重叠的干扰,同时标记多个生物分子,对生物体内的新陈代谢过程、信号传导过程等能够进行实时监测。

光谱成像技术是基于成像学和光谱学发展起来的一门技术^[64-65],与普通成像技术的最大区别就是能够获得每张图像每个像素点的高分辨率的光谱。结合双光子荧光激发技术,通过色散元件分光,再结合 CCD 相机等设备,光谱成像能够获得包含高分辨率光谱信息的双光子图像,其中常见的分光方式有光栅分光、棱镜分光、声光可调谐分光、芯片镀膜分光等。Akbari 等^[66]利用超光谱成像研究裸鼠的前列腺肿瘤,根据得到的光谱信息能够区别正常组织和肿瘤。Elliott 等^[67]利用图像映射光谱仪(IMS)对胰腺 β -细胞进行实时超光谱荧光成像,相对于超光谱共聚焦显微技术能够探测到较低的信号强度,提高时间分辨率。Kiyotoki 等^[68]利用超光谱成像技术对胃癌进行研究,通过癌变组织和正常组织的反射光谱的差异判断癌变组织,该技术有望应用于医学诊断。Mori 等^[69]利用超光谱相机在 Wistar 鼠脑中获得光谱数据,能够监测大脑皮层里的氧含量,可以用于手术中氧含量的可视化监测。He 等^[70]利用非线性光学成像方法研究无标记老鼠视网膜细胞的生物化学信息。Yamanaka 等^[40]和 Palero 等^[71]利用非线性光谱成像显微技术监测小鼠角质细胞在缺血状态下与蛋白质结合的 NADH 和自由 NADH 的变化情况。生物组织的自发荧光限制了荧光染料在体内成像的应用,而多光谱双光子荧光显微成像技术可以有效地解决这个问题。相比于传统成像技术

如核磁共振成像、计算机断层摄影、正电子发射断层摄影等,多光谱成像技术具有高灵敏度和高精度,并可同时进行多色标记等,在临床上用于疾病的诊断方面具有广阔的应用前景。

4 基于光纤连续光谱与相位控制实现多色显微成像

4.1 700~900 nm 光纤连续光谱的产生及压缩

Liang 等^[49,72]通过实验验证了将抽运波长设置于光子晶体光纤的低色散区域,能够增强自相位调制效应,从而产生具有更宽光谱的线性可压缩连续光谱。实验中使用了零色散点为 830 nm 的高非线性光子晶体光纤,因此通过调谐 100 fs 激光器的波长至 810 nm,使得抽运激光脉冲的波长接近光子晶体光纤的零色散点,从而保证激光脉冲在光纤的低色散区域传输,尽可能降低色散对脉冲峰值功率的削减作用。

图 5 分别演示了飞秒激光脉冲在光纤传输过程中的时域与频域演化过程,其中,图 5(c)的插图分别表示在不同的光子晶体光纤长度(L)的情况下,脉冲在光纤中的演化情况。脉冲开始传输时,由于光纤色散比较低,以自相位调制为主导的非线性作用,脉冲光谱会不断展宽。当脉冲光谱展宽到一定程度时,部分光谱进入正常色散区域,由于峰值功率的下降导致光谱展宽效应减弱;另一方面,部分光谱进入反常色散区域,由于反常色散和自相位调制效应互相作用,产生孤子效应。由于其他非线性效应及外界的扰动,产生孤子分裂及自频移效应。从图 5 可以观察到,当脉冲传输距离达到 25 mm 时,脉冲光谱出现了色散波和孤子分裂效应,在短波和长波分别产生了双峰结构和迅速展宽的现象^[49]。

光纤中的正色散和负色散都会限制脉冲在光子晶体光纤传输过程中的自相位调制效应:正常色散会使得脉冲在时域上展宽导致峰值功率降低,反常色散会导致孤子分裂的产生从而影响到获得的连续光谱的相干性与稳定性。研究发现,只有当脉冲抽运在靠近光子晶体光纤零色散点时,光谱可以被最大限度地展宽,从而获得光谱带宽大于 200 nm 的线性可压缩宽带连续光谱,如图 5 所示。这主要归因于抽运脉冲经历较低的色散可以延迟孤子分裂过程,并在较长的光纤中增强自相位调制主导的光谱展宽。

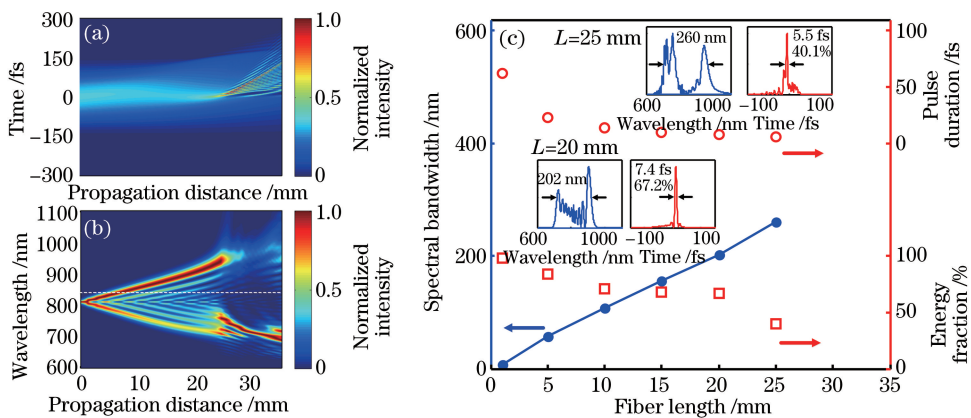


图 5 波长为 810 nm、脉冲宽度为 94 fs、平均功率为 215 mW 的脉冲在高非线性光子晶体光纤 NL-PM-830 中的演化过程。

(a) 脉冲在时域上演化过程; (b) 脉冲在频域上的演化过程; (c) 超连续谱的光谱宽度、脉冲宽度和超连续谱的能量百分比与光纤长度的关系

Fig. 5 Evolution of the pulse with wavelength of 810 nm, pulse width of 94 fs and average power of 215 mW in highly nonlinear photonic crystal fiber NL-PM-830. (a) Pulse evolution at time domain; (b) pulse evolution at frequency domain; (c) relationship between spectral bandwidth, pulse duration and energy fraction of supercontinuum and fiber length

本课题组通过搭建连续光谱产生装置,实验验证了基于分步傅里叶算法的理论计算。根据理论计算,将 810 nm 脉冲抽运在 14 mm 长的高非线性光子晶体光纤(NL-PM-830)中产生了超连续光谱,其光谱范围涵盖 700~900 nm,这与理论预测完全一致。通过光栅对压缩后,脉冲被压缩至 57 fs。尽管连续谱脉冲没有被完全压缩到傅里叶变换极限,但是 57 fs 的时域宽度已经远低于初始的连续谱脉冲宽度和 100 fs 的抽运光脉冲宽度。本课题组使用未压缩连续光谱和压缩后的连续光谱脉冲,分别对 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、德克萨斯红-X 鬼笔环肽(Texas Red®-X phalloidin)和 BODIPY®FL 型山羊抗小鼠免疫球蛋白

(BODIPY®FL goat anti-mouse IgG)三色标记的牛肺动脉内皮(BPAE)细胞进行多色双光子荧光显微成像,结果如图6所示,其中激发功率为70 mW。压缩后的连续光谱脉冲能够同时且有效地激发上述三种不同荧光染料,这是单一波长的激光器所不能实现的。另一方面,相对于未压缩的连续光谱,压缩后的超连续谱脉冲使得荧光信号增强了大概20倍,如图6(c)所示。本课题组的实验表明了超连续光谱不仅可以作为激光光源应用于多色双光子荧光显微成像,并且与传统的100 fs激光器相比具有独特的优势和巨大的潜力。

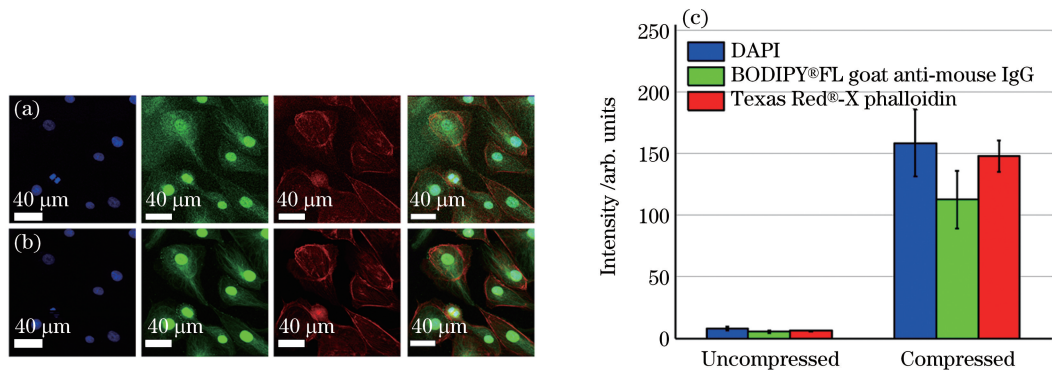


图6 使用(a)未压缩和(b)压缩连续光谱对BPAE细胞进行多色双光子荧光成像;(c)未压缩的连续光谱与压缩后的超连续谱脉冲所激发的荧光信号强度

Fig. 6 Multicolor two-photon fluorescence imaging of BPAE cells by using (a) uncompressed and (b) compressed continuous spectrum; (c) fluorescence signal intensity excited by uncompressed continuous spectrum and compressed supercontinuum pulse

4.2 基于相位控制实现选择性激发多色成像

以连续光谱作为光源,本课题组结合超连续谱产生与脉冲整形技术,开展多色双光子荧光显微成像方法研究,主要包括以下两个方面:1) 利用4f脉冲整形系统矫正连续光谱脉冲的相位畸变。通过相位畸变的矫正,连续光谱脉冲可以被压缩从而获得脉冲宽度在10 fs以下的变换极限脉冲,这将极大地增强双光子荧光信号强度和成像深度,降低生物成像过程中的光毒性和光漂白效应。2) 双光子激发荧光强度与荧光分子的双光子吸收界面和二次谐波能量成正比,而二次谐波的能量与其频域相位有着本质的联系。通过控制激发光脉冲的相位就可以控制脉冲内的相干过程。改变特定激发波长波段的荧光团的双光子激发效率,可以实

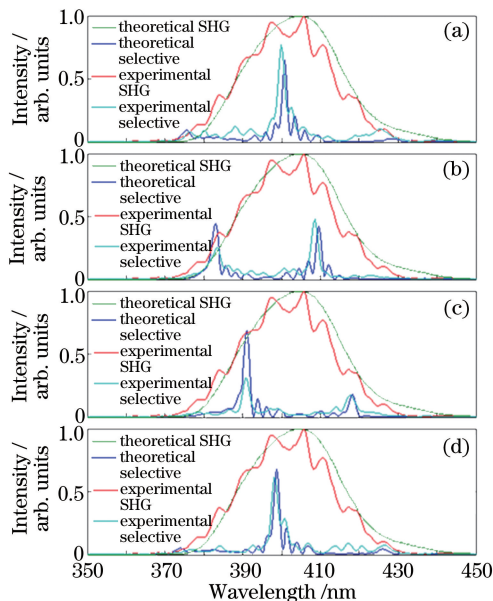


图7 施加不同正弦相位的连续光谱脉冲的二次谐波的理论值与实验值。

(a) $\varphi_0=0$; (b) $\varphi_0=1$ rad; (c) $\varphi_0=2$ rad; (d) $\varphi_0=3$ rad

Fig. 7 Theoretical and experimental curves of SHG of the continuous spectrum pulse by applying different sinusoidal phases. (a) $\varphi_0=0$; (b) $\varphi_0=1$ rad; (c) $\varphi_0=2$ rad; (d) $\varphi_0=3$ rad

现多色双光子荧光成像中的选择性激发。通过相位控制宽带连续光谱,有望解决长期困扰多色双光子荧光成像中的自发荧光引起成像对比度下降以及多色荧光团之间的光谱串扰问题,实现深层组织内多种细胞群体的迁移和相互作用的可视化。

本课题组搭建了用于实现选择性激发的多色双光子荧光显微成像系统,通过快速测量和补偿飞秒脉冲相位畸变实现脉冲压缩,然后使用相位型空间光调制器对宽带连续光谱施加指定的正弦函数相位,从而实现了选择性激发。首先通过多光子脉冲间干涉相位扫描(MIIPS)方法对高非线性光子晶体光纤产生的宽带连续光谱进行相位畸变补偿^[73],在补偿的基础上,通过空间光调制器对连续谱加入正弦相位: $\Phi \sin(\gamma\omega + \varphi_0)$,其中调制深度 $\Phi=2$, ω 为光谱频率, $\gamma=20$,通过改变 φ_0 的值即可实现选择性激发。加入了正弦相位后的脉冲被一个物镜聚焦到一片薄倍频晶体用于产生二次谐波。输出的二次谐波通过透镜聚焦后被光谱仪(型号:HR2000,Ocean Optics公司)探测。施加与未施加正弦相位的连续光谱脉冲的二次谐波的理论值与实验值如图7所示,红色和绿色曲线分别为压缩脉冲的二次谐波的理论值与实验值,可以看到其形状基本相符,即证明了连续光谱已经被很好地压缩至接近傅里叶变换极限。通过空间光调制器对连续谱脉冲加入正弦相位进行调制,可以观察到其对应的二次谐波(青色)随 φ_0 的改变而改变,且与理论值(蓝色)相符,即实现了选择性激发。

为更精确地实现多色成像,同时区分不同的荧光团,需要提高选择性的对比度,即在激发波长附近的二次谐波最大化,同时降低其他波长的二次谐波强度。正弦相位的优势在于参数调整简便,但是其缺陷是过高的背景强度。在这里,本课题组利用二值化相位来实现选择性激发。已有文献^[42,74-75]证实相比于正弦相位而言,二值化相位能够将选择性激发的对比度提高数倍。图8(a)为二次谐波的产生,其中黑色曲线是变换极限脉冲产生的二次谐波(TL-SHG),红色和蓝色曲线分别是施加不同二值化相位产生的二次谐波;图8(b)为小鼠腹股沟淋巴结的双光子荧光显微成像。RFP标记的淋巴细胞注入EGFP转基因小鼠。EGFP的最佳激发波长为880 nm,而RFP的最佳激发波长为700 nm。用变换极限脉冲进行成像时,EGFP和RFP荧光同时被激发。通过相位整形可以分别对RFP和EGFP进行激发,从而实现选择性激发多色双光子荧光显微成像。

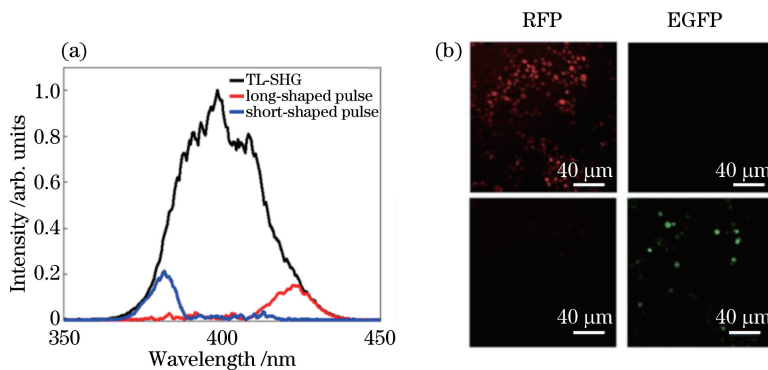


图8 (a)改变二值化相位产生长波激发脉冲与短波激发脉冲,对应的二次谐波光谱中心波长为380 nm与440 nm;

(b)利用施加二值化相位的超连续光谱对RFP和EGFP标记的细胞进行选择性激发双光子荧光成像

Fig. 8 (a) Generating short wavelength pulse and long wavelength pulse by changing binary phase, corresponding SHG central wavelengths are 380 nm and 440 nm; (b) selective excitation two-photon fluorescence imaging of RFP and EGFP labeled cells by applying binary phase in supercontinuum

5 总结与展望

当传统的光学显微镜不能满足人们的研究需要时,非线性光学显微镜以其独特的成像优势走上历史舞台。近年来随着荧光标记技术的出现,多种新型超短脉冲激光器的发展让双光子显微技术实现对活体细胞与蛋白质的观察和监测成为可能。生物医学光子学基础研究的发展,特别是其与多色双光子荧光显微成像技术的结合,将产生许多基于光学的新的生物学研究技术与方法。结合了多种荧光探针、激光光源和显微成

像技术各自优势的技术方法目前已经展现出了原有成像方法所没有的一些功能。过去的10年内,多色双光子荧光显微成像技术已经取得了长足的进步,一系列显著的技术革新已经让人们看到了多色成像技术在生物医学光子学中应用的光明前景。相信新型激光光源的产生以及探测手段的进步,将有望使多色成像技术在生物医学成像领域取得更大的成就。

参 考 文 献

- [1] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [2] Drobizhev M, Makarov N S, Tillo S E, *et al.* Two-photon absorption properties of fluorescent proteins[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(5): 393-399.
- [3] Ye C X, Ma H L, Liang W Z. Two-photon absorption properties of chromophores of a few fluorescent proteins: a theoretical investigation[J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2016, 32: 301-312.
- [4] Li C Q, Pitsillides C, Runnels J M, *et al.* Multiphoton microscopy of live tissues with ultraviolet autofluorescence[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2010, 16(3): 516-23.
- [5] Li D, Zheng W, Qu J Y. Two-photon autofluorescence microscopy of multicolor excitation[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(2): 202-204.
- [6] Weber T, Köster R. Genetic tools for multicolor imaging in zebrafish larvae[J]. *Methods*, 2013, 62(3): 279-291.
- [7] Piatkevich K D, Hulit J, Subach O M, *et al.* Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(12): 5369-5374.
- [8] Morozova K S, Piatkevich K D, Gould T J, *et al.* Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99(2): L13-L15.
- [9] Ghosh S, Yu C L, Ferraro D J, *et al.* Blue protein with red fluorescence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(41): 11513-11518.
- [10] Rodriguez E A, Tran G N, Gross L A, *et al.* A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(9): 763-769.
- [11] Zhang X, Zhang M S, Li D, *et al.* Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(37): 10364-10369.
- [12] Lin Juqiang, Chen Rong, Cai Changmei, *et al.* Biomedical applications of imaging microscopy based on protease-activated fluorescent probe[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2008, 45(4): 50-55.
林居强, 陈 荣, 蔡长美, 等. 蛋白酶荧光探针及新型显微成像技术的生物医学应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2008, 45(4): 50-55.
- [13] Sato M, Kawano M, Yanagawa Y, *et al.* In vivo two-photon imaging of striatal neuronal circuits in mice [J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2016, 135: 146-151.
- [14] Tarus D, Hamard L, Caraguel F, *et al.* Design of hyaluronic acid hydrogels to promote neurite outgrowth in three dimensions[J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(38): 25051-25059.
- [15] Fumagalli S, Ortolano F, De Simoni M G. A close look at brain dynamics: cells and vessels seen by in vivo two-photon microscopy[J]. *Progress in Neurobiology*, 2014, 121: 36-54.
- [16] Zhou Y, Kang D Y, Yang Z R, *et al.* Imaging normal and cancerous human gastric muscular layer in transverse and longitudinal sections by multiphoton microscopy[J]. *Scanning*, 2016, 38(4): 357-364.
- [17] Li L H, Chen Z F, Wang X F, *et al.* Visualization of tumor response to neoadjuvant therapy for rectal carcinoma by nonlinear optical imaging[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2015, 22(3): 158-163.
- [18] Zhao Z, Zhu X P, Cui K, *et al.* In vivo visualization and characterization of epithelial-mesenchymal transition in breast tumors[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(8): 2094-2104.
- [19] Yu Biying, Cai Hemei, Li Zhifang, *et al.* Two-photon fluorescence imaging and its analysis for early acute myocardial ischemia of rat[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2012, 49(2): 021703.
喻碧莹, 蔡吓妹, 李志芳, 等. 大鼠早期急性心肌缺血的双光子荧光成像及分析[J]. *激光与光电子学进展*, 2012, 49(2): 021703.

- [20] Wei Xunbin, Guo Jin, Li Yan, *et al.* Progress of in vivo optical imaging[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2009, 46(8): 41-47.
魏勋斌, 郭进, 李研, 等. 光学活体成像技术进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2009, 46(8): 41-47.
- [21] Katakai T, Kinashi T. Microenvironmental control of high-speed interstitial T cell migration in the lymph node[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 1-8.
- [22] Luu L, Coombes J L. Dynamic two-photon imaging of the immune response to *Toxoplasma gondii* infection[J]. *Parasite Immunology*, 2015, 37(3): 118-126.
- [23] Miller M J, Wei S H, Parker I, *et al.* Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node[J]. *Science*, 2002, 296(5574): 1869-1873.
- [24] Ipponjima S, Hibi T, Nemoto T. Three-dimensional analysis of cell division orientation in epidermal basal layer using intravital two-photon microscopy[J]. *Plos One*, 2016, 11(9): e0163199.
- [25] Finnoy A, Olstad K, Lilledahl M B. Second harmonic generation imaging reveals a distinct organization of collagen fibrils in locations associated with cartilage growth[J]. *Connective Tissue Research*, 2016, 57: 374-387.
- [26] Alonzo C A, Karaliota S, Pouli D, *et al.* Two-photon excited fluorescence of intrinsic fluorophores enables label-free assessment of adipose tissue function[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31012.
- [27] Zhang X Z, Liu N R, Mak P U, *et al.* Three-dimensional segmentation and quantitative measurement of the aqueous outflow system of intact mouse eyes based on spectral two-photon microscopy techniques [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2016, 57(7): 3159-3167.
- [28] Santisakultarm T P, Kersbergen C J, Bandy D K, *et al.* Two-photon imaging of cerebral hemodynamics and neural activity in awake and anesthetized marmosets[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2016, 271: 55-64.
- [29] Kawano H, Kogure T, Abe Y, *et al.* Two-photon dual-color imaging using fluorescent proteins[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(5): 373-374.
- [30] Germain R N, Miller M J, Dustin M L, *et al.* Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(7): 497-507.
- [31] Tragardh J, Murtagh M, Robb G, *et al.* Two-color, two-photon imaging at long excitation wavelengths using a diamond raman laser[J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2016, 22(4): 803-807.
- [32] Ricard C, Lamasse L, Jaouen A, *et al.* Combination of an optical parametric oscillator and quantum-dots 655 to improve imaging depth of vasculature by intravital multicolor two-photon microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(6): 2362-2372.
- [33] Herz J, Siffrin V, Hauser A E, *et al.* Expanding two-photon intravital microscopy to the infrared by means of optical parametric oscillator[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 98(4): 715-723.
- [34] Eissing N, Heger L, Baranska A, *et al.* Easy performance of 6-color confocal immunofluorescence with 4-laser line microscopes[J]. *Immunology Letters*, 2014, 161(1): 1-5.
- [35] Debarre D, Olivier N, Supatto W, *et al.* Mitigating phototoxicity during multiphoton microscopy of live drosophila embryos in the 1.0-1.2 μm wavelength range[J]. *Plos One*, 2014, 9(8): e104250.
- [36] Hall A M, Molitoris B A. Dynamic multiphoton microscopy: focusing light on acute kidney injury[J]. *Physiology*, 2014, 29(5): 334-342.
- [37] Freeman K, Tao W, Sun H L, *et al.* In situ three-dimensional reconstruction of mouse heart sympathetic innervation by two-photon excitation fluorescence imaging[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2014, 221(2): 48-61.
- [38] Entenberg D, Wyckoff J, Gligorijevic B, *et al.* Setup and use of a two-laser multiphoton microscope for multichannel intravital fluorescence imaging[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(10): 1500-1520.
- [39] Li C Q, Pastila R K, Lin C P. Label-free imaging immune cells and collagen in atherosclerosis with two-photon and second harmonic generation microscopy[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2016, 9(1): 272.
- [40] Yamanaka M, Saito K, Smith N I, *et al.* Visible-wavelength two-photon excitation microscopy for fluorescent protein imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(10): 101202.
- [41] Mahou P, Zimmerley M, Loulier K, *et al.* Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 815-818.
- [42] Brenner M H, Cai D, Swanson J A, *et al.* Two-photon imaging of multiple fluorescent proteins by phase-shaping and linear unmixing with a single broadband laser[J]. *Optics Express*, 2013, 21(14): 17256-17264.

- [43] Batista A, Breunig H G, Uchugonova A, *et al.* Two-photon autofluorescence lifetime and SHG imaging of healthy and diseased human corneas[C]. SPIE, 2015, 9307: 93071Q.
- [44] Pope I, Langbein W, Watson P, *et al.* Simultaneous hyperspectral differential-CARS, TPF and SHG microscopy with a single 5 fs Ti:Sa laser[J]. Optics Express, 2013, 21(6): 7096-7106.
- [45] Pestov D, Xu B W, Li H W, *et al.* Delivery and characterization of sub-8fs laser pulses at the imaging plane of a two-photon microscope[C]. SPIE, 2011, 7903(1): 79033B.
- [46] Pillai R S, Boudoux C, Labroille G, *et al.* Multiplexed two-photon microscopy of dynamic biological samples with shaped broadband pulses[J]. Optics Express, 2009, 17(15): 12741-12752.
- [47] Cui Quan, Liang Xiaobao, Huang Shun, *et al.* Supercontinuum for multicolor two-photon microscopy[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2015, 24(1): 1-7.
崔 权, 梁小宝, 黄 顺, 等. 超连续谱进行多色双光子成像[J]. 激光生物学报, 2015, 24(1): 1-7.
- [48] Wang Jie, Lin Feng. Progress of two-photon laser scanning fluorescence microendoscope based on optical fiber[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2010, 47(8): 38-44.
汪 洁, 林 峰. 基于光纤的双光子激光扫描荧光微内窥镜的新进展[J]. 激光与光电子学进展, 2010, 47(8): 38-44.
- [49] Liang X B, Fu L. Enhanced self-phase modulation enables a 700-900 nm linear compressible continuum for multicolor two-photon microscopy[J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2014, 20(2): 42-49.
- [50] Tu H H, Boppart S A. Coherent fiber supercontinuum for biophotonics[J]. Laser & Photonics Reviews, 2013, 7(5): 628-645.
- [51] Graf B W, Jiang Z, Tu H H, *et al.* Dual-spectrum laser source based on fiber continuum generation for integrated optical coherence and multiphoton microscopy[J]. Journal of Biomedical Optics, 2009, 14 (3): 034019.
- [52] Lefort C, O'Connor R P, Blanquet V, *et al.* Multicolor multiphoton microscopy based on a nanosecond supercontinuum laser source[J]. Journal of Biophotonics, 2016, 9(7): 709-714.
- [53] He J P, Miyazaki J, Wang N, *et al.* Biological imaging with nonlinear photothermal microscopy using a compact supercontinuum fiber laser source[J]. Optics Express, 2015, 23(8): 9762-9771.
- [54] Tao W, Bao H C, Gu M. Two-photon-excited photoluminescence and heating of gold nanorods through absorption of supercontinuum light[J]. Applied Physics B, 2013, 112(2): 153-158.
- [55] Liu Y, Tu H H, Benalcazar W A, *et al.* Multimodal nonlinear microscopy by shaping a fiber supercontinuum from 900 to 1160 nm[J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2012, 18(3): 1209-1214.
- [56] Teh S K, Zheng W, Li S X, *et al.* Multimodal nonlinear optical microscopy improves the accuracy of early diagnosis of squamous intraepithelial neoplasia[J]. Journal of Biomedical Optics, 2013, 18(3): 036001.
- [57] Wang K, Liu T M, Wu J W, *et al.* Three-color femtosecond source for simultaneous excitation of three fluorescent proteins in two-photon fluorescence microscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2012, 3(9): 1972-1977.
- [58] He J P, Wang N, Kobayashi T. Generation of stable two-color laser pulses in photonic crystal fiber for microscopy[J]. Japanese Journal of Applied Physics, 2014, 53(9): 092704.
- [59] Chan M C, Lien C H, Lu J Y, *et al.* High power NIR fiber-optic femtosecond Cherenkov radiation and its application on nonlinear light microscopy[J]. Optics Express, 2014, 22(8): 9498-9507.
- [60] Palero J A, Boer V O, Vijverberg J C, *et al.* Short-wavelength two-photon excitation fluorescence microscopy of tryptophan with a photonic crystal fiber based light source[J]. Optics Express, 2005, 13(14): 5363-5368.
- [61] Tragardh J, Robb G, Amor R, *et al.* Exploration of the two-photon excitation spectrum of fluorescent dyes at wavelengths below the range of the Ti:Sapphire laser[J]. Journal of Microscopy, 2015, 259(3): 210-218.
- [62] Botchway S W, Scherer K M, Hook S, *et al.* A series of flexible design adaptations to the Nikon E-C1 and E-C2 confocal microscope systems for UV, multiphoton and FLIM imaging[J]. Journal of Microscopy, 2015, 258(1): 68-78.
- [63] Makarov N S, Drobizhev M, Rebane A. Two-photon absorption standards in the 550-1600 nm excitation wavelength range[J]. Optics Express, 2008, 16(6): 4029-4047.
- [64] Garini Y, Young I T, Mc Namara G. Spectral imaging: principles and applications[J]. Cytometry Part A, 2006, 69A(8): 735-747.
- [65] Zhou L L, El-Deiry W S. Multispectral fluorescence imaging[J]. Journal of Nuclear Medicine, 2009, 50(10): 1563-1566.

- [66] Akbari H, Halig L V, Schuster D M, *et al.* Hyperspectral imaging and quantitative analysis for prostate cancer detection[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(7): 076005.
- [67] Elliott A D, Gao L, Ustione A, *et al.* Real-time hyperspectral fluorescence imaging of pancreatic beta-cell dynamics with the image mapping spectrometer[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(20): 4833-4840.
- [68] Kiyotoki S, Nishikawa J, Okamoto T, *et al.* New method for detection of gastric cancer by hyperspectral imaging: a pilot study[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(2): 026010.
- [69] Mori M, Chiba T, Nakamizo A, *et al.* Intraoperative visualization of cerebral oxygenation using hyperspectral image data: a two-dimensional mapping method[J]. *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*, 2014, 9(6): 1059-1072.
- [70] He S C, Ye C, Sun Q Q, *et al.* Label-free nonlinear optical imaging of mouse retina[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(3): 1055-1066.
- [71] Palero J A, Bader A N, de Bruijn H S, *et al.* In vivo monitoring of protein-bound and free NADH during ischemia by nonlinear spectral imaging microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(5): 1030-1039.
- [72] Liang X B, Hu W Y, Fu L. Pulse compression in two-photon excitation fluorescence microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(14): 14893-14904.
- [73] Xu B W, Gunn J M, Dela Cruz J M, *et al.* Quantitative investigation of the multiphoton intrapulse interference phase scan method for simultaneous phase measurement and compensation of femtosecond laser pulses[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2006, 23(4): 750-759.
- [74] Patas A, Achazi G, Hermes N, *et al.* Contrast optimization of two-photon processes after a microstructured hollow-core fiber demonstrated for dye molecules[J]. *Applied Physics B*, 2013, 112(4): 579-586.
- [75] Silberberg Y. Quantum coherent control for nonlinear spectroscopy and microscopy[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2009, 60: 277-292.