

自适应宽场高分辨率显微成像技术的研究进展

徐 洋, 满天龙, 万玉红

北京工业大学应用数理学院, 北京 100124

摘要 光学显微成像技术可以用来观察微小物体的结构细节,但在生物样品的显微成像领域中,像差的存在使得任何显微成像技术的成像质量都无法达到理论预期。为了解决这一问题,自适应光学技术被应用于不同类型的显微成像系统中进行像差的探测和校正。着重总结了自适应宽场高分辨率显微成像技术的研究动态,阐明了数字全息自适应光学技术和非相干数字全息自适应光学技术的特点、优势以及存在的问题。

关键词 自适应光学; 宽场显微成像; 数字全息; 非相干数字全息

中图分类号 O436 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP54.090003

Research Progress on Adaptive Wide-Field Microscopic Imaging Technology with High Resolution

Xu Yang, Man Tianlong, Wan Yuhong

College of Applied Sciences, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

Abstract Optical microscopic imaging technology makes it possible to observe the fine structure of tiny samples. However, in the field of microscopic imaging of biological samples, the aberration makes the imaging quality of any microscopic imaging technology unable to achieve the theoretical expectation. For the purpose of improving imaging quality, adaptive optics technology is applied to different types of microscopic imaging systems for aberration detection and correction. In this study, the research of adaptive wide-field microscopy imaging system is illustrated in detail. Furthermore, we demonstrate the characteristics, advantages and existing problems of the digital holography and incoherent digital holography adaptive optics technologies.

Key words adaptive optics; wide-field microscopic imaging; digital holography; incoherent digital holography

OCIS codes 010.1080; 090.1995

1 引 言

光学显微成像技术的目标就是看得更细、更清,成像速度更快。几十年来,光学显微成像技术取得了长足发展,成像分辨率已经可以突破衍射极限,实现超分辨率显微成像。依据照明方式的不同,可以将现代显微系统分为宽场和共焦两种类型。宽场显微成像系统使用平行光照射样品,利用面阵图像探测器记录样品的图像,其优势为成像视场大和采集速度快,但其断层成像能力较差,不适合用于较厚的样品。共焦显微成像系统^[1]使用聚焦光照射样品,利用点探测器探测样品上某点发出的光强度,通过点扫描的方式实现样品结构的成像。共焦显微成像系统对样品某一深度处的显微结构进行成像时,其他深度处发出的光大部分被点探测器滤除,从而可以获得较好的断层成像能力。因此,共焦显微成像技术的优势在于可以实现光学断层成像,适用于构建较厚样品内部的三维结构图像,但其成像过程中的扫描机制极大地限制了它的成像速度,导

收稿日期: 2017-03-24; **收到修改稿日期:** 2017-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(61575009)

作者简介: 徐 洋(1991—),女,硕士研究生,主要从事非相干数字全息术及其应用方面的研究。

E-mail: yang_xu@emails.bjut.edu.cn

导师简介: 万玉红(1976—),女,博士,副教授,博士生导师,主要从事数字全息与三维成像/体全息技术及其应用方面的研究。E-mail: yhongw@bjut.edu.cn(通信联系人)

致该系统不适合用于观察动态的样品。

在实际应用中,宽场和共焦显微成像系统的成像性能均极大地受限于光学系统本身或样品内存在的光学像差。在使用大数值孔径、高放大倍率的显微物镜进行高分辨率成像时,光学显微成像系统对像差特别敏感。在生物学显微研究中,样品内折射率的不均匀分布、样品与显微物镜浸没介质间折射率不匹配以及光学系统光轴未对准等原因均会引入不可避免的像差,最终导致亮度、对比度和分辨率等成像质量下降,极大地影响了对样品细节的观察^[2]。提高光学显微成像系统成像性能的有效途径之一是引入自适应光学技术,对系统中的像差进行动态的探测和校正。自适应光学技术来源于天文成像领域,现已被广泛地应用于校正各种显微成像系统的像差,提高系统的成像性能^[3]。自适应光学技术的基本思想是通过某种方式对像差进行探测和校正,其系统一般由波前传感器、波前控制器和波前校正器组成。利用波前传感器探测像差,通过数值算法恢复像差相位,并将其转化成波前校正器的控制信号,进而控制波前校正器的面形或相位分布,实现像差校正。在现代荧光显微成像技术中,样品发出的光强一般较弱,使用波前传感器进行直接波前探测时,子孔径分波后的光信号强度进一步下降,这会加大探测难度或降低探测精度。进行实时探测时,波前传感器的引入还会降低图像探测器的入射光强,影响最终成像的信噪比。因此,无波前传感器的间接波前探测技术更适合于现代荧光显微成像系统^[4]。

无波前传感器的间接波前探测技术已广泛应用于多种显微成像系统中。在多光子显微、受激发射损耗(STED)超分辨率显微和 4π 超分辨显微等基于共焦系统的成像方法中^[5],光学像差将极大地影响探测到的信号强度和信噪比。在共焦显微的激发光和发射光路径中同时实现自适应像差的探测和校正,可以有效地提高系统的成像质量^[6]。由于双光子显微等非线性显微系统中激发光路径对光学像差更为敏感,自适应光学技术可以极大地改善样品内聚焦激发光斑的质量,进而提高系统的成像性能^[7]。在STED超分辨率显微技术中,通过在激发光路径中引入空间光调制器(SLM)实现间接自适应波前探测,可以对较厚的样品实现三维超分辨率成像^[8];在此基础上,在荧光路径中引入可变形镜(DM)对样品发出的荧光实现像差校正,可以进一步提高系统的成像质量^[9]。在多光子显微系统中引入基于孔径分割的间接自适应波前探测技术,可以极大地提高样品内聚焦光斑的质量,实现样品内深度为 $20\ \mu\text{m}$ 处的多光子成像^[10]。

自适应光学技术还广泛地应用于宽场显微系统中。在透射显微系统中,结合有波前传感器的自适应光学技术可以提高二维样品的成像质量^[11];自适应光学技术还可以提高宽场显微系统的衍射受限成像视场^[12]。与共焦显微成像系统不同,宽场显微成像系统难以获取单个衍射极限分辨率尺寸的点状样品像。虽然采用特殊操作手段向成像视场内注入单个荧光蛋白,通过直接波前探测的方法可以实现自适应像差校正,但此类方法存在操作困难、荧光蛋白易被光漂白、像差探测时光强度信号较低等问题。使用一种基于分区孔径波前(PAW)传感器波前探测装置的自适应光学方法,可以在无点状样品参考的情况下实现宽场图像的像差探测和校正^[13]。此外,还可以使用合适的图像质量评价参数的间接波前探测自适应方法解决上述问题,从而在宽场显微成像系统中实现高精度、高效率的自适应光学像差探测和校正。基于图像锐度参数的间接波前探测自适应光学方法,可在超分辨率随机光学重建显微(STORM)系统中提高点源的定位精度和系统的最终成像精度^[14];根据不同样品的结构特点,间接波前探测的自适应宽场显微成像系统还可以采用功率谱密度、傅里叶环相关(FRC)等图像质量评价参数对成像质量进行评价^[15]。近年来,基于全息波前记录和再现原理发展了一种数字全息自适应光学技术^[16-19],该技术法采用了自干涉数字全息理论,已被拓展至荧光显微等空间非相干成像领域^[20-24]。

本文详细分析了宽场显微成像系统间接波前传感自适应光学技术的基本原理,并介绍了具体的应用案例。结合本课题组的研究工作,介绍了数字全息自适应光学和非相干数字全息自适应光学技术的基本原理,并列出了其在具体显微成像系统中的应用。

2 自适应光学显微成像的有关概念

2.1 共焦和宽场显微成像系统

图1所示为共焦和宽场显微成像示意图^[25]。共焦显微成像系统的照明方式如图1(a)所示,激光点光源发出的光经过准直和扩束后形成强度均匀的平行光入射显微物镜,经过物镜聚焦后形成衍射极限尺寸的聚

焦光斑,照射样品中某一很小的区域,由该聚焦光束激发出的荧光被成像系统收集并被点探测器探测到。宽场显微成像系统的照明方式如图 1(b)所示,相干或非相干照明光聚焦于显微物镜的后焦面附近,在样品空间内形成近似平行的照明光束;在样品上较大范围内激发出荧光,利用面阵的图像探测器接收图像。宽场显微成像系统的成像视场较大,成像速度较快。

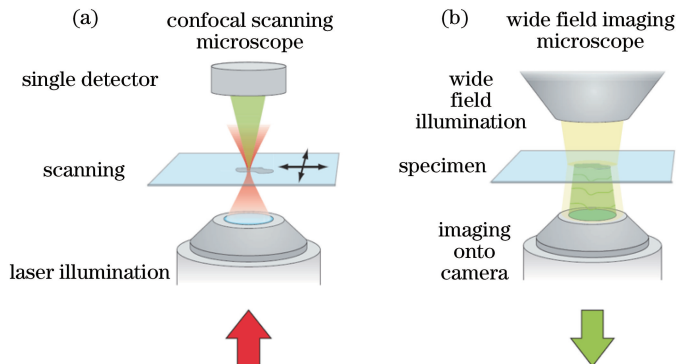


图 1 (a)共焦和(b)宽场显微成像系统示意图

Fig. 1 Schematics of (a) confocal microscopy system and (b) wide field microscopy system

在选取具体的自适应光学方法之前,应结合显微成像系统的特性进行分析。不同类型显微成像系统的图像质量评价方法不同。为了获得更高的三维成像分辨率,共焦扫描显微成像系统倾向于提高样品上聚焦照明光斑的能量密度和亮度。因此,图像质量通常可以简单地使用光强度或图像总体光子数等参数进行评价。而宽场显微成像系统更倾向于兼顾整个照明区域内图像的平均质量,需要使用较为复杂的图像锐度、功率谱密度、FRC^[15]等作为图像质量评价参数。

2.2 直接和间接波前探测的自适应光学技术

目前应用于显微成像领域的自适应光学技术主要分为两类:基于几何光学的采用直接波前探测的自适应光学技术和无波前传感器(WFS)的间接波前探测技术。前者的原理如图 2(a)所示^[25],在此类技术中,波前传感器直接测量像差。以常用的 Shack-Hartmann 传感器为例^[26],该传感器需要使用引导星发出的光作为信标光,入射光波首先被微透镜阵列空间分割为若干个子波前,每个子波前被对应的微透镜会聚到图像探测器上,图像探测器放置在微透镜的后焦面上,可获得一系列空间散布的聚焦光斑。针对某一聚焦光斑,通过计算其二维空间位置与微透镜中心在图像探测器平面投影点之间的距离,可以得到对应该子波前沿二维方向变化的斜率。综合考虑所有的局部斜率,而后通过解包裹数值算法^[27-28]恢复像差的相位,并将其转化成波前校正器的控制信号,进而控制波前校正器的面形或相位分布^[29-30],最终实现像差的校正。

针对大多数宽场显微系统中引导星获取困难以及现代荧光显微成像系统中光信号强度较弱等问题,发展无波前传感器的间接波前探测技术,其核心是基于衍射光学和适当的相位复原算法实现波前探测和校正。如图 2(b)所示^[25],当系统的像差最小时,图像质量评价参数达到极值,系统成像的分辨率和信噪比最高。利用像差与图像质量评价参数的这种间接的对应关系,可以在不采用波前传感器的前提下实现像差的间接探测。在实际操作中,首先利用算法产生 N 个不同类型和振幅的光学像差模式,然后在校正器上加载某一具体的光学像差,以探测到的图像的某一质量评价参数作为反馈信号。从 1 至 N 不断改变校正器加载像差的同时,利用某一算法寻找图像质量评价参数的极值。此时对应的具体像差模式即为系统中真实存在的光学像差的相位共轭,且获得的图像质量达到最优,像差的探测和校正过程同时完成。

上述无波前传感器的间接波前探测技术是一种基于图像分析的自适应光学技术,也是目前显微成像系统中最常用的一种技术。应用在显微成像系统中的无波前传感自适应光学技术还包括基于光瞳分割的自适应光学技术^[13]和基于数字全息自适应光学技术^[16-19]。对这几种无波前传感器的自适应光学技术的校正速度、是否有波前校正器、是否有引导星进行对比,结果如表 1 所示。

可见,需根据不同的显微成像系统选取合适的自适应光学技术。考虑到探测精度、系统成本和系统复杂程度等因素,无波前传感器的自适应光学技术在现代荧光显微成像系统中具有独特的优势。然而,具体实施

中依然需要根据系统的照明方式、样品结构、光谱特性,以及系统中主要的像差类型等因素,选取合适的图像质量评价参数。

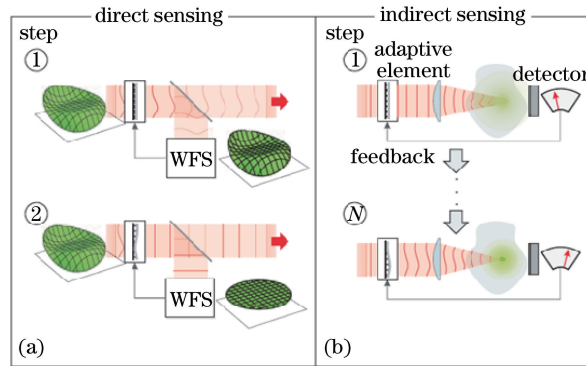


图 2 (a)直接波前探测和(b)间接波前探测的自适应光学技术原理图

Fig. 2 Schematics of adaptive optics technique for (a) direct wavefront detection and (b) indirect wavefront detection

表 1 无波前传感器的自适应光学技术的对比

Table 1 Comparison on adaptive optics technology without wavefront sensor

Adaptive optics technique	Correction speed	Wavefront corrector	Guide star
Adaptive optics technique based on imaging analysis	Middle	Yes	No
Adaptive optics technique based on pupil segmentation	Slower	Yes	Yes
Adaptive optics technique based on digital holography	Faster	No	Yes

3 无波前传感器自适应光学技术在宽场显微成像系统中的应用

3.1 宽场显微成像系统中自适应光学技术的选取

宽场显微成像系统的照明区域较大,往往很难获取引导星图像,但可以人为地制造引导星,而后通过直接波前探测的方式实现自适应光学像差校正,提高系统的成像质量。Tao 等^[31-32]使用注射的荧光微球和荧光蛋白作为引导星对像差进行校正,但人工引入引导星的方法较为复杂,且引入的荧光蛋白很难固定于样品空间内。Li 等^[13]提出了一种不需要引导星的波前传感器,该传感器可以直接观察任意形状的样品,且只需要简单的图像算法就能直接测量波面,具有校正速度快、空间分辨率高等特点,可以在低放大倍数的扩展光源中使用。但是使用这种波前传感器的前提是样品和像差必须是二维分布的。

Débarre 等^[33]提出了一种无波前传感器的自适应光学技术,并将其应用于非相干成像系统,将图像空间频率的低频成分作为优化指标,利用光学传递函数描述成像过程,通过优化图像谱密度的低频和高频成分比例,实现了无波前传感器的自适应光学像差校正,该方法同样适用于散射型物体。由图 3 所示的具体校正过程可以观察到,谱密度分布中的高频成分越多,图像质量越好。在图 3 所示的 Lorentzian 拟合曲线中,横轴 a 为自适应校正像差系数, $g(a)$ 为图像质量评价参数。像差校正前后的对比结果如图 4 所示,对于散射型物体,校正前残余像差相位的均方根值 $\phi_{\text{RMS}} = 2.58 \text{ rad}$,校正后残余像差相位 $\phi_{\text{RMS}} = 0.44 \text{ rad}$ 。分辨率板校正前残余像差相位 $\phi_{\text{RMS}} = 2.01 \text{ rad}$,校正后残余像差相位 $\phi_{\text{RMS}} = 0.38 \text{ rad}$ 。

Débarre 等^[34]将一种无波前传感器的自适应光学技术应用于宽场结构光照明显微镜(SIM)中,研究像差在 SIM 中的影响。根据像差是否会影响照明方式,将像差分为 2 种类型,而图像的最终质量主要取决于照明模式的空间频率。荧光标记的小鼠肠组织在 SIM 中的自适应像差校正结果如图 5 所示,将图像锐度函数作为优化指标,将荧光标记的小鼠肠组织切片作为样品,成像深度约为 $10 \mu\text{m}$,盖玻片厚度约为 $170 \mu\text{m}$,图 5(a)、(b)中左下角插入图为系统中加入的用于校正的像差相位,5(b)中加入的相位 $\phi_{\text{RMS}} = 0.61 \text{ rad}$ 。图 5(c)为沿图 5(a)(黑色虚线)和图 5(b)(红色实线)中箭头方向的图像强度分布。对强度均值进行归一化处理后可以看出,像差校正后的图像具有更高的对比度。

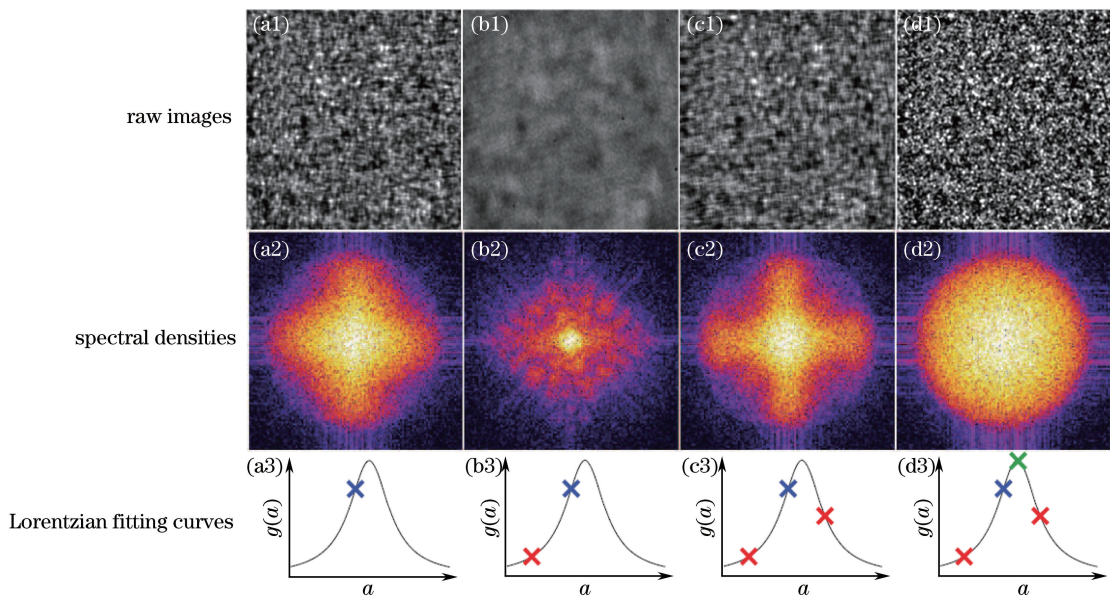


图 3 散射型物体校正过程示意图。(a) $a = -4.9$; (b) $a = -16.4$; (c) $a = 6.6$; (d) 最优的 a 值

Fig. 3 Schematics of correction process of scatter. (a) $a = -4.9$; (b) $a = -16.4$; (c) $a = 6.6$; (d) optimized a

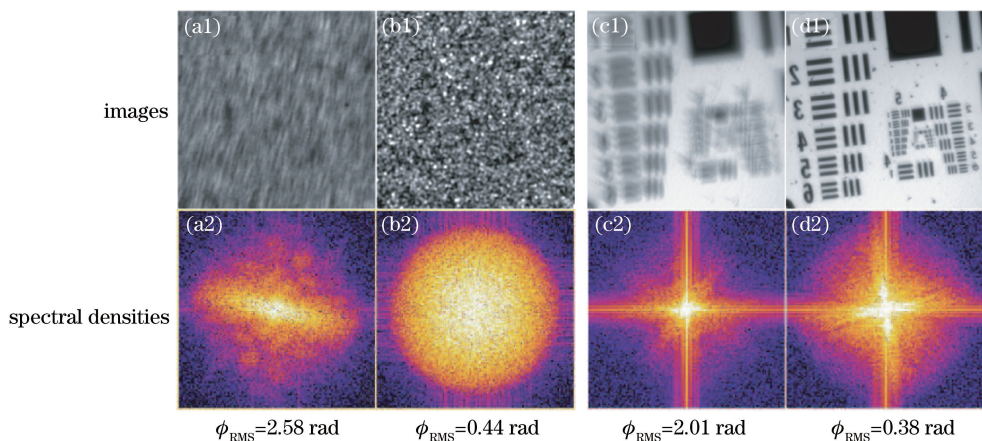


图 4 散射型物体(a)校正前和(b)校正后的图像及对应的谱密度;分辨率板(c)校正前和(d)校正后的图像及对应的谱密度

Fig. 4 Images and spectral densities of scatter (a) before and (b) after correction; images and spectral densities of resolution test chart (c) before and (d) after correction

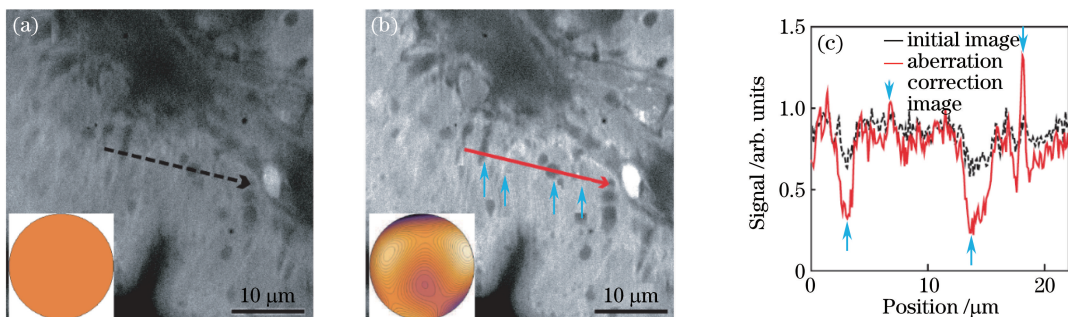


图 5 荧光标记的小鼠肠组织在 SIM 中的自适应像差校正结果。

(a) 校正前图像; (b) 校正后图像; (c) 沿图 5(a) 中黑色虚线和图 5(b) 中红色实线方向的图像强度分布

Fig. 5 Adaptive aberration correction of fluorescent mouse intestine sample in SIM. (a) Initial image; (b) aberration correction image; (c) intensity profile along black dotted line drawn on Fig. 5 (a) and red solid line drawn on Fig. 5 (b)

3.2 数字全息自适应光学显微成像

3.2.1 相干光照明的数字全息自适应光学

间接波前探测自适应光学方法在宽场显微成像系统中的具体应用体现了该类方法的普适性和有效性。然而,间接波前探测中像质参数的优化过程和波前校正的迭代过程在较大程度上限制了整个系统的成像速度。针对这一问题,近年来出现了一种基于全息波前记录和再现原理的数字全息自适应光学技术。2011年, Kim 课题组^[16-19]将数字全息与自适应光学相结合,提出了数字全息自适应光学(DHAO)的概念。数字全息自适应光学技术利用全息干涉记录光波前的特性,将物体全息图与点源全息图进行数值校正,得到了物体的清晰图像,并用其代替传统自适应光学系统中的波前传感器。校正过程不再采用波前校正器,而是通过计算机数值处理获取物体的再现像。数字全息自适应光学技术的优势在于可以实现全场、大动态范围的波前探测和校正,并且校正精度高,光路配置简单,操作便捷,成本低。

3.2.2 非相干数字全息自适应光学

为了降低对光源相干性的要求,实现在非相干光照明条件下的波前校正过程,拓展数字全息自适应光学技术在生物荧光成像等领域中的应用,2007年, Rosen 等^[35]提出了菲涅耳非相干相关数字全息(FINCH)。2012年, Kim 课题组^[20-22]基于 FINCH 技术又提出了非相干数字全息自适应光学(IDHAO)技术,定性分析了像差的类型、强度以及噪声等因素对图像校正效果的影响。Jang 等^[36]将 IDHAO 技术应用于荧光显微镜中,将背面有荧光板的 USAF-1951 分辨率板作为待测物体,将汞灯照射物体激发的荧光作为非相干光源,将破碎的玻璃板作为引入的像差,将直径为 $35\ \mu\text{m}$ 的针孔作为引导星对系统进行校正,校正结果如图 6 所示。

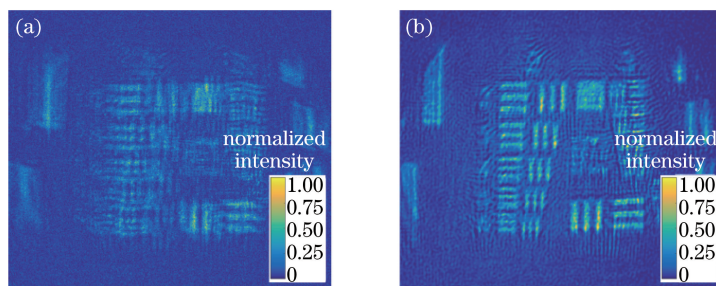


图 6 IDHAO 对分辨率板成像。(a)校正前;(b)校正后

Fig. 6 IDHAO imaging for resolution test chart. (a) Before correction; (b) after correction

从图 6 可以看出:使用传统方法再现时,由于像差的影响,图像对比度低,失真比较严重;使用引导星对图像进行校正后,图像质量显著提高。

本课题组研究了 IDHAO 技术中引导星的大小、引导星与待测物体的相对位置、系统像差类型和像差强度等因素对系统波前校正效果的影响。使用 IDHAO 技术进行波前探测时,需要分别记录引导星的全息图和待测物体的全息图,但记录速度较慢。因此,本课题组提出了并行波前探测和校正的 IDHAO 系统,光路如图 7 所示,使用两个光源分别同时照射引导星和待测物体,将引导星的全息图与待测物体的全息图记录在同一幅图中,在计算机中通过数值算法从中截取出引导星的全息图与物体的全息图进行校正。分别使用红色发光二极管(LED)和高压电弧灯照射引导星和分辨率板,令引导星平面和分辨率板平面与分束器 BS1 距离相等,引导星的横向位置与物体之间相隔一定的距离 Δd ,以保证它们的全息图不重叠。将引导星安装在二维平移台上,移动引导星的位置,观察该光路中实现良好校正的引导星的选择范围,实验结果如图 8 所示。

从图 8 的实验结果可以看出,当引导星与物体的间隔距离 Δd 较小时,物体全息图会受到引导星全息图的干扰,波前探测误差增大,再现像中的干扰噪声较大[图 8(e1)]。随着 Δd 增大,再现像质量不断提高,如图 8(e2)~(e5)所示,但当 Δd 过大时,使用引导星探测过程中引入的波前探测误差较大,导致校正效果下降,如图 8(e6)所示。可见,使用并行 IDHAO 技术能够提高波前探测速度,但需要在适当范围内选取引导星实现波前校正。

上述光路是同轴光路,记录的全息图包含零级像和共轭像,在重建时几种图像会叠加,进而影响再现图像的质量。因此,在使用同轴光路记录物体的全息图时,需要结合相移技术消除零级像和共轭像,从而提取物

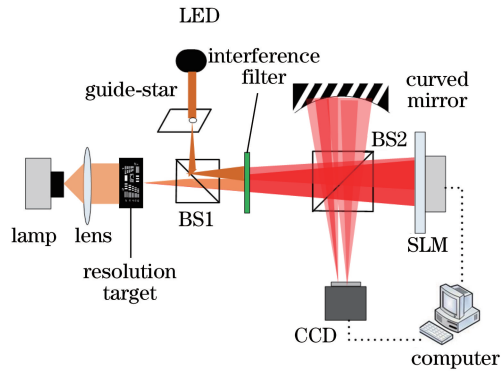


图7 并行波前探测和校正的IDHAO系统光路示意图

Fig. 7 Schematic of IDHAO system for parallel wavefront detection and correction

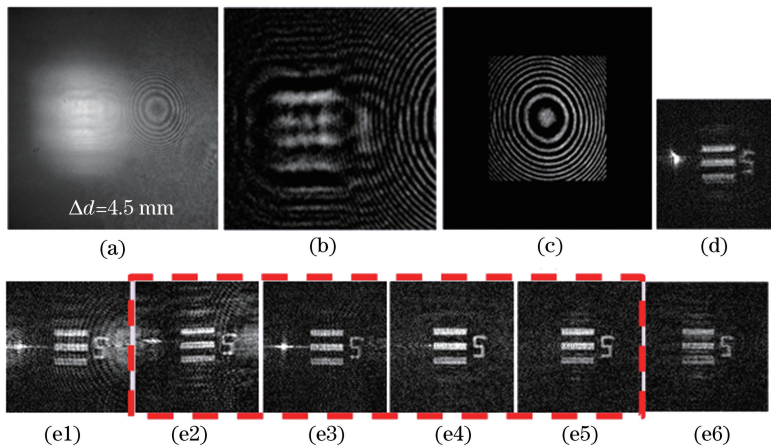


图8 并行波前探测和校正的IDHAO系统实验结果。(a)待测物体和引导星全息图;(b)截取的待测物体全息图;(c)截取的引导星全息图;(d)未校正像差的分辨率板再现图像;(e1)~(e6)引导星与分辨率板中心间距分别为2.4, 2.6, 2.8, 4.5, 5.0, 6.0 mm时物体的校正再现图像

Fig. 8 Experimental results of IDHAO system for parallel wavefront detection and correction. (a) Hologram of object and guide star; (b) object hologram extracted from Fig. 8(a); (c) guide star hologram extracted from Fig. 8(a); (d) uncorrected image of resolution test chart; (e1)-(e6) corrected images when distance between guide star and resolution test chart is 2.4, 2.6, 2.8, 4.5, 5.0, 6.0 mm, respectively

光波。相移技术是指定量地改变参与干涉的两束光波中的一束光的相位,每改变一次记录一幅全息图^[37]。以四步相移为例,在上述IDHAO系统中,需要记录4幅物体和引导星的全息图,无法实现实时校正。

三角干涉仪是一种同轴共路的光路,可以使入射到干涉仪的光波分为两路,并分别沿顺时针方向和逆时针方向传播^[38]。在出射平面上,沿顺时针方向和逆时针方向传播的两路光波具有不同的放大倍率,但是由于是共路传播,它们之间的光程差为零,因此,在其出射平面上可以忽略光源的时间相干性对干涉图样的影响,单纯地分析空间相干性对干涉图的影响。结合三角光路搭建的IDHAO系统如图9所示^[24]。

使用直径为 $10\ \mu\text{m}$ 的针孔作为引导星。由于系统的光路是离轴光路,只需要记录一幅物体的全息图和一幅引导星的全息图就足以校正重建图像中的像差,从而显著提高记录速度,实验结果如图10所示。

通过对比校正前和校正后白色矩形区域内垂直方向的强度图[即分辨率板的第5组第3线对($40.32\ \text{lp}\cdot\text{mm}^{-1}$)垂直方向的强度图]可以看到,后者的峰值强度为前者的4倍,成像质量得到显著改善。

IDHAO技术不再依赖于传统的波前探测器和变形镜等波前校正器件,波前探测过程利用全息术提取像差相位,通过数值算法进行波前校正。通过使用并行的波前探测操作,选取离轴光路可进一步提高运行速度。

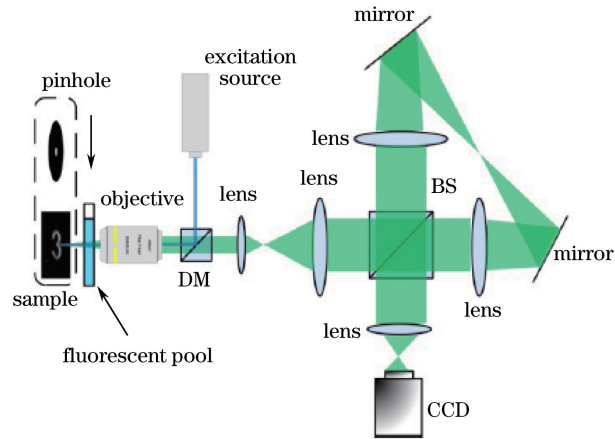


图9 离轴傅里叶三角全息光路示意图

Fig. 9 Schematic of off-axis Fourier triangular holography

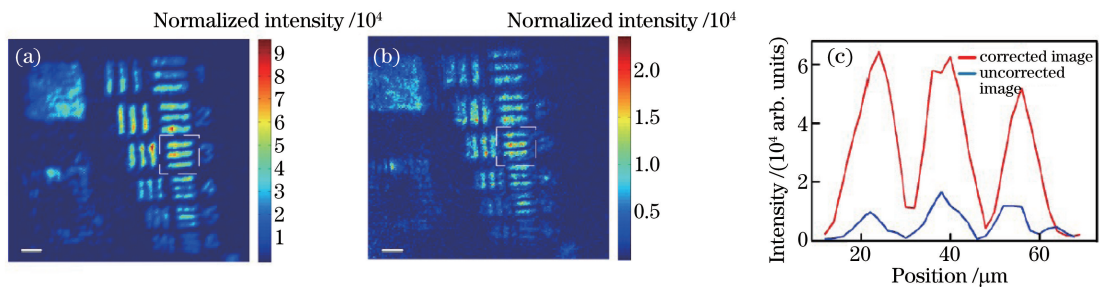


图10 IDHAO系统的波前校正。(a)校正后的图像;(b)未校正的图像;

(c)图10(a)和图10(b)中白色矩形区域内垂直方向的强度图

Fig. 10 Wavefront correction for IDHAO system. (a) Corrected image; (b) uncorrected image;

(c) intensity profile in white rectangle of Fig. 10 (a) and Fig. 10 (b) along the vertical direction

3.2.3 其他全息波前传感自适应光学

现有的天文望远镜等光学系统多采用基于 Shack-Hartmann 传感器的自适应光学系统,该系统存在校正速度较慢、信号处理过程较为复杂等缺陷。基于将上述复杂的信号步骤过程尽可能地集成在波前探测过程中以提高自适应光学系统校正速度这一考虑,研究者在基于全息波前传感的自适应光学领域展开研究。Neil 等^[39]使用二值全息图进行了波前探测,仅用较少的迭代次数便获得了较好的成像结果。Ghebremichael 等^[40]使用复用全息光学元件实现了基于 Zernike 模式的波前探测。Andersen 等^[41-42]提出了一种校正速度大于 10 kHz 的闭环全息自适应光学系统(HALOS)。与采用 Shack-Hartmann 传感器的传统自适应光学方法相比,全息波前传感自适应光学具有更快的校正速度,适用于对校正速度有严苛要求的特殊场合。

4 结束语

应用于生物医学领域的超分辨显微成像技术的成像性能有待提高和优化。自适应光学技术在显微成像系统中的应用是提高成像分辨率等具体指标的有效途径之一。针对不同类型的显微系统,总结了自适应光学技术实施时需要考虑的具体因素,着重介绍了无波前传感器的间接自适应光学技术,并分析了该技术的特点。列举了无波前传感器的自适应光学技术在宽场显微成像中的应用,明确其更适用于宽场显微成像系统。结合本课题组的研究工作,介绍了 IDHAO 技术的基本原理,并简述了其在荧光显微成像系统中的应用情况。

参 考 文 献

- [1] Paddock S W. Confocal laser scanning microscopy[J]. Biotechniques, 1999, 27(5): 992-996.
- [2] Booth M J. Adaptive optics in microscopy[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society A, 2007, 365(1861):

- 2829-2843.
- [3] Babcock H W. The possibility of compensating astronomical seeing[J]. Publications of the Astronomical Society of the Pacific, 1953, 65(386): 229-236.
- [4] Tan Zuojun, Xie Jing, Lu Jun, *et al.* High spatial resolution confocal microscopy using adaptive optics[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2012, 49(9): 090002.
谭佐军, 谢静, 卢军, 等. 自适应光学高分辨率共聚焦显微成像技术[J]. 激光与光电子学进展, 2012, 49(9): 090002.
- [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, Wilson T. New modal wave-front sensor: application to adaptive confocal fluorescence microscopy and two-photon excitation fluorescence microscopy[J]. Journal of the Optical Society of America A, 2002, 19(10): 2112-2120.
- [7] Sherman L, Ye J Y, Norris T B. Adaptive correction of depth-induced aberrations in multiphoton scanning microscopy using a deformable mirror[J]. Journal of Microscopy, 2002, 206(1): 65-71.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues[J]. Nature Methods, 2010, 7(2): 141-147.
- [11] Debarre D, Booth M J, Wilson T. Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies[J]. Optics Express, 2007, 15(13): 8176-8190.
- [12] Potsaid B, Bellouard Y, Wen J. Adaptive scanning optical microscope (ASOM): a multidisciplinary optical microscope design for large field of view and high resolution imaging[J]. Optics Express, 2005, 13(17): 6504-6518.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Nieuwenhuizen R P, Lidke K A, Bates M, *et al.* Measuring image resolution in optical nanoscopy[J]. Nature Methods, 2013, 10(6): 557-562.
- [16] Liu C, Kim M K. Digital holographic adaptive optics for ocular imaging: proof of principle[J]. Optics Letters, 2011, 36(14): 2710-2712.
- [17] Liu C, Kim M K, Yu X, *et al.* Digital holographic adaptive optics for retinal imaging[C]. Digital Holography and Three-Dimensional Imaging, 2011: DWC37.
- [18] Kim M K. Adaptive optics by digital holography[C]. SPIE, 2012, 8587(5): SM3F.1.
- [19] Liu C, Yu X, Kim M K. Fourier transform digital holographic adaptive optics imaging system[J]. Applied Optics, 2012, 51(35): 8449-8454.
- [20] Kim M K. Adaptive optics by incoherent digital holography[J]. Optics Letters, 2012, 37(13): 2694-2696.
- [21] Kim M K. A proposal for astronomical adaptive optics by incoherent digital holography[C]. Digital Holography and Three-Dimensional Imaging, 2012: DW1C.7.
- [22] Kim M K. Incoherent digital holographic adaptive optics[J]. Applied Optics, 2013, 52(1): A117-A130.
- [23] Guo Xiaole, Wan Yuhong, Man Tianlong, *et al.* Correction characteristics of wavefront aberration in incoherent digital holographic adaptive optics[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(11): 1109004.
郭小乐, 万玉红, 满天龙, 等. 非相干数字全息自适应光学波前校正特性研究[J]. 中国激光, 2014, 41(11): 1109004.
- [24] Man T, Wan Y, Wang D. Fluorescence digital holographic adaptive optics microscopy[C]. SPIE, 2015, 9508: 950804.
- [25] Booth M J, Débarre D, Jesacher A. Adaptive optics for biomedical microscopy[J]. Optics and Photonics News, 2012, 23(1): 22-29.

- [26] Seifert L, Liesener J, Tiziani H J. The adaptive Shack-Hartmann sensor[J]. *Optics Communications*, 2003, 216(4): 313-319.
- [27] Li Xinyang, Jiang Wenhan, Wang Chunhong, *et al.* Analysis of an adaptive control algorithm used in an adaptive optical system[J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, 21(3): 283-289.
李新阳, 姜文汉, 王春红, 等. 自适应光学系统中的自适应控制算法研究[J]. *光学学报*, 2001, 21(3): 283-289.
- [28] Li Xinyang, Jiang Wenhan. Analysis of the optimal-gradient reconstruction algorithm used in adaptive optical systems [J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, 23(6): 756-760.
李新阳, 姜文汉. 自适应光学系统的最优斜率复原算法[J]. *光学学报*, 2003, 23(6): 756-760.
- [29] Fernandez E J, Artal P. Membrane deformable mirror for adaptive optics: performance limits in visual optics [J]. *Optics Express*, 2003, 11(9): 1056-1069.
- [30] Dayton D, Sandven S, Gonglewski J, *et al.* Adaptive optics using a liquid crystal phase modulator in conjunction with a Shack-Hartmann wave front sensor and zonal control algorithm[J]. *Optics Express*, 1997, 1(11): 338-346.
- [31] Tao X, Azucena O, Fu M, *et al.* Adaptive optics microscopy with direct wavefront sensing using fluorescent protein guide stars[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(17): 3389-3391.
- [32] Tao X, Crest J, Kotadia S, *et al.* Live imaging using adaptive optics with fluorescent protein guide-stars[J]. *Optics Express*, 2012, 20(14): 15969-15982.
- [33] Débarre D, Booth M J, Wilson T. Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies [J]. *Optics Express*, 2007, 15(13): 8176-8190.
- [34] Débarre D, Botcherby E J, Booth M J, *et al.* Adaptive optics for structured illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2008, 16(13): 9290-9305.
- [35] Rosen J, Brooker G. Digital spatially incoherent Fresnel holography [J]. *Optics Letters*, 2007, 32(8): 912-914.
- [36] Jang C, Kim J, Clark D C, *et al.* Holographic fluorescence microscopy with incoherent digital holographic adaptive optics [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(11): 111204.
- [37] Yamaguchi I, Zhang T. Phase-shifting digital holography [J]. *Optics Letters*, 1997, 22(16): 1268-1270.
- [38] Man Tianlong, Wan Yuhong, Jiang Zhuqing, *et al.* Measurement of the spatial coherence of extended light source by twin beams-interference method [J]. *Acta Physica Sinica*, 2013, 62(21): 214203.
满天龙, 万玉红, 江竹青, 等. 孪生光束干涉法测量光源的空间相干性 [J]. *物理学报*, 2013, 62(21): 214203.
- [39] Neil M A, Booth M J, Wilson T. Closed-loop aberration correction by use of a modal Zernike wave-front sensor [J]. *Optics Letters*, 2000, 25(15): 1083-1085.
- [40] Ghebremichael F, Andersen G P, Gurley K S. Holography-based wavefront sensing [J]. *Applied Optics*, 2008, 47(4): A62-A69.
- [41] Andersen G. High-speed holographic wavefront correction [C]. *Imaging and Applied Optics Congress*, 2016: AOM4C.3.
- [42] Andersen G, Gelsinger-Austin P, Gaddipati R, *et al.* Fast, compact, autonomous holographic adaptive optics [J]. *Optics Express*, 2014, 22(8): 9432-9441.