

自适应光学在荧光显微镜中的应用

刘立新^{1,2,*}, 张美玲¹, 吴兆青¹, 杨乾乾¹, 郜鹏¹, 薛平³

¹西安电子科技大学物理与光电工程学院, 陕西 西安 710071;

²中国科学院西安光学精密机械研究所瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 陕西 西安 710119;

³清华大学物理系低维量子物理国家重点实验室, 北京 100084

摘要 荧光显微镜因具有对样品损伤小、可进行特异性标记、适用于活体成像等优点, 一直是生物医学研究中的主要手段。但光学系统自身缺陷、生物样品光学性质的不均匀性以及样品与显微镜浸润介质界面折射率的变化等导致了像差的产生, 降低了成像的对比度和分辨率。自适应光学(AO)技术通过使用主动光学元件, 如可变形镜、空间光调制器等, 对畸变的波前(像差)进行校正, 消除动态波前误差, 恢复衍射受限性能。近年来, 众多学者将 AO 系统与荧光显微镜相结合, 以修正由样品不均匀性引起的像差, 进而改善成像质量。介绍了 AO 技术的基本原理, 综述了近年来 AO 技术在荧光显微镜成像中的应用, 并对其未来发展趋势进行了展望。

关键词 成像系统; 荧光显微镜; 波前像差; 波前探测; 波前校正

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP57.120001

Application of Adaptive Optics in Fluorescence Microscope

Liu Lixin^{1,2,*}, Zhang Meiling¹, Wu Zhaoqing¹, Yang Qianqian¹, Gao Peng¹, Xue Ping³

¹School of Physics and Optoelectronic Engineering, Xidian University, Xi'an, Shaanxi 710071, China;

²State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710119, China;

³State Key Laboratory of Low-Dimensional Quantum Physics, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract Fluorescence microscope has always been the main method in biomedical researches due to its advantages such as less damage to samples, specific labeling, and being suitable for *in vivo* imaging. However, the defects of optical system itself, the optical inhomogeneity of biological samples, and the change in the refractive index at the interface between the sample and the microscope's immersion medium have caused aberrations and reduced the imaging contrast and imaging resolution. Adaptive optics (AO) technology uses active optical components such as deformable mirrors and spatial light modulators to correct distorted wavefronts (aberrations), eliminate dynamic wavefront errors, and restore diffraction-limited performance. In recent years, many researchers have combined AO system with fluorescence microscope to correct the aberration caused by sample inhomogeneity and improve the imaging quality. In this paper, the basic principle of the AO technology is introduced, the applications of AO technology in fluorescence microscopic imaging in recent years are reviewed, and its future development trend is prospected.

Key words imaging systems; fluorescence microscope; wavefront aberration; wavefront detection; wavefront correction

OCIS codes 110.1085; 170.2520; 180.2520

收稿日期: 2019-12-25; 修回日期: 2019-12-30; 录用日期: 2020-01-10

基金项目: 国家自然科学基金(61605150)、高等学校学科创新引智计划、低维量子物理国家重点实验室开放基金(KF201713)、瞬态光学与光子技术国家重点实验室开放基金(SKLST201804)

* E-mail: lxliu@xidian.edu.cn

1 引言

自适应光学(AO)的原始思想来自于天文观测。17世纪初望远镜的发明极大地拓宽了人们的视野,但由于受到大气湍流产生的动态波前误差的影响,在望远镜放大倍率较大时,成像光斑会发生模糊与抖动,这大大影响了观测的分辨率。在随后的两个世纪,这一问题都未能得到有效改善,直到1953年,美国天文学家 Babcock^[1]提出利用闭环校正波前误差,以补偿由大气湍流和其他因素造成的成像过程中的动态波前畸变,AO的原始思想由此诞生。之后的几十年,随着相关技术的发展成熟,AO在天体观测^[2-3]、激光武器^[4]、生物成像^[5-6]以及眼科医疗^[7-8]等领域得到了广泛应用。

显微镜自发明以来一直是进行生物医学研究必不可少的工具,也是开展微观生命科学的重要手段。相比于电子显微镜,光学显微镜具有非接触、无创伤等优势,能够在非侵入样品的情况下,提供样品的多维结构和功能信息。其中,荧光显微镜借助荧光探针针对生物组织或细胞等进行特异性标记,并能够实现活体和高分辨率成像^[9],已经成为研究细胞结构和动力学过程的有力工具之一。但是,由于光的波动特性,传统的光学显微镜受到衍射极限的限制,而且由于像差的存在,其很难达到衍射极限的分辨率^[10]。像差是指实际光学系统中的成像与理论成像之间的偏差。通常显微镜中的像差来源有三种:1)光学系统装调和光学器件不理想引入的低阶像差;2)生物样本折射率不均匀引起的像差;3)生物样本与显微镜浸润介质折射率不匹配引起的像差。像差对不同的显微镜有着不同的影响,但在所有情况下都会导致图像对比度和分辨率的降低,而且随着生物组织成像深度的增加,像差问题变得越来越严重。虽然各种类型的荧光显微镜的出现极大地提高了显微成像的对比度及分辨率,但是生物组织的复杂性(如对光产生反射、散射等效应)影响了光线的传播,使得荧光显微镜无法对活体生物组织的深层进行高分辨率成像。

AO技术提供了一种利用主动光学元件,如空间光调制器(SLM)、可变形镜(DM)等,修复畸变的波前以消除存在的像差进而恢复衍射受限性能的方法。AO技术可以对光在生物组织中传播时产生的波前畸变进行实时探测和校正,从而提升成像的空间分辨率并增大成像深度。2000年,AO技术首次被应用到生物荧光显微镜中,用来校正由样品折射率不均匀性

引起的像差^[11]。虽然影响生物成像的像差与天文学中的像差有很大的差异,但是AO在校正像差方面的巨大潜力使其在生物成像领域获得迅速而广泛的认可,并被应用到一系列的光学显微镜中,用于纠正像差、提高恢复图像质量^[12-15]。例如,基于AO系统的双(多)光子显微镜可以实现对小鼠舌肌、心肌、颅骨和大脑等组织更高分辨率、更高信号水平和更大成像深度的成像^[14,16],这为生物医学基础研究的不断深入奠定了基础。在眼科医疗方面,AO技术为眼科疾病的诊断提供了新手段,极大地提高了视网膜成像的分辨率和灵敏度^[6,17]。在验光配镜领域,AO技术的应用也极大地提高了验光仪的测量精度,实现了更加准确的人眼视力检测^[18]。

根据成像方式的不同,荧光显微镜可以分为宽场成像显微镜和点扫描成像显微镜两大类,本文将分别介绍AO技术在这两类荧光显微镜中的应用及最新研究进展,并对其未来发展趋势进行展望。

2 自适应光学技术

典型的AO系统主要包括波前探测器、波前控制器和波前校正器三个部分,如图1所示^[19]。其工作原理为:首先由波前探测器对来自目标或目标附近的信标光源的光学波前误差进行实时探测;然后由波前控制器对误差进行处理并将其转换成波前校正器的控制信号以驱动波前校正器开始工作;最后由波前校正器将控制信号转变为波前相位变化,对像差进行补偿和校正,使波前恢复到畸变之前的状态,从而消除动态波前误差。

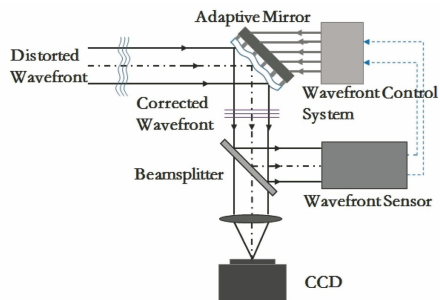


图1 典型自适应光学系统结构图^[19]

Fig. 1 Structure of typical adaptive optical system^[19]

如何测量样品像差是将AO技术应用在显微成像领域中所要解决的关键问题。生物组织通常是非透明非均匀的,形态和结构都相当复杂,本身没有可以作为导引星或者提供稳定信标光的结构。因此在AO中,波前探测可以分为两类:一类是基于几何光学并利用波前传感器(WFS)对畸变波前进行直接

测量;另一类是基于迭代算法,通过一系列图像间接推导出波前,即无波前传感的间接波前探测技术。直接探测技术可以利用荧光微球、荧光蛋白等导引星发出的荧光或利用样品的背向散射光作为 WFS 的信标光对波前畸变进行直接测量,常用的 WFS 有夏克-哈特曼波前传感器 (SHWS)^[20]、剪切干涉仪^[21]、四棱锥波前传感器^[22]等,其中 SHWS 应用最为广泛。基于迭代的优化算法主要包括基于模型的模态法和不需要模型的搜索算法两类,模态法通过估计像差与图像评价指标的函数关系进行采样拟合,间接得到像差信息;搜索算法包括遗传算法、爬山法 (GA)、模拟退火算法以及随机并行梯度下降 (SPGD) 算法等,其中,SPGD 算法是目前效率最高、应用最广泛的搜索算法。波前校正器是一种可以快速改变波前相位的主动光学器件,同时也是 AO 系统的核心器件,可以通过改变经过传输介质的路程或传输介质的折射率对畸变波前进行校正。常用的波前校正器主要有 DM 和 SLM 两种,其中 SLM 校正波段较窄且只对线偏振光具有调制作用,能量利用率低,因此在 AO 系统中的应用具有局限性。

3 AO 技术在宽场成像显微镜中的应用

宽场成像显微镜首先将相干光或非相干光聚焦于物镜的后焦平面,进而在样品空间形成近似平行的照明光,照明光对样品较大范围进行照射并激发荧光,最后通过面阵探测器进行探测成像,因此宽场成像显微镜具有成像视场大及成像速度快的优点。然而,在利用面阵探测器进行探测时,成像光路中的荧光图像会直接呈现在探测器上,导致成像质量受

到波前像差的影响。因此,对于宽场成像显微镜,成像光路的 AO 校正是必须的,照明光路是否校正取决于显微镜的激发原理和光路特点。这类显微镜主要包括普通宽场荧光显微镜、结构光照明显微镜以及单分子定位显微镜等,下面将介绍 AO 技术在这几种显微镜中的应用及最新研究进展。

3.1 普通宽场荧光显微镜

宽场荧光显微镜是现代细胞生物学研究的重要工具,可以实现较快速度的大视场显微成像,其照明方式为科勒照明,照明光路的像差对成像质量没有影响,所以只需对成像光路进行校正。

在直接波前探测方面,将荧光微球注入样品并将其发出的荧光作为 SHWS 的参考光源是测量畸变波前的一种方法。2011 年 Azucena 等^[23]利用 SHWS、荧光微球和 DM 测量和校正生物样品引起的波前像差,在果蝇胚胎 20 μm 深度处实现了微米量级的成像,并通过对比像差校正前后的绿色荧光珠图像验证了该方法的有效性,如图 2 所示。在该技术中,AO 系统首先利用深红色荧光珠发出的光作为 SHWS 的参考光源测量波前误差;然后通过重构矩阵方法并利用波前信息产生 DM 控制电压;最后对 DM 施加 10% 的电流校正电压直到波前误差最小,闭合 AO 环路。但是人工引入导引星的方法相对比较复杂,且引入的荧光蛋白很难固定于样品内。2013 年 Bourgenot 等^[24]报道了一种闭环 AO 宽场显微成像系统,将样品的背向散射光作为信标光并提供反馈信号,使用 SHWS 进行波前直接探测,消除了双程效应以及杂散导引星反射的影响,并对样品的不同区域进行自优化。这种方法不需要荧光导引星,但是系统结构仍旧比较复杂。

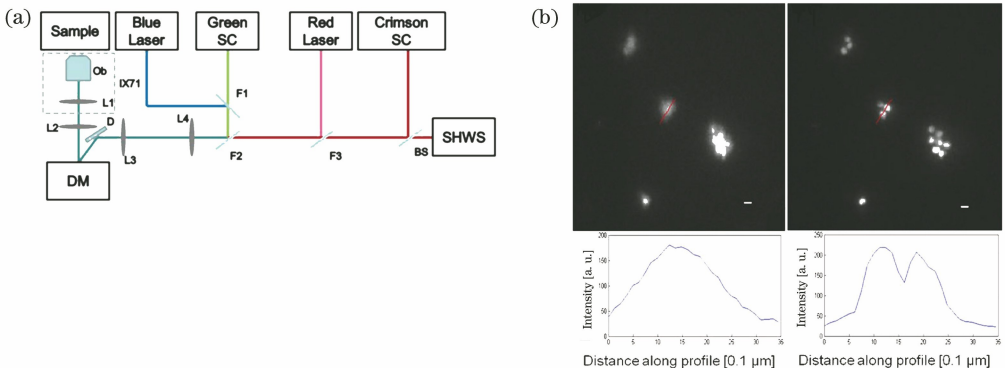


图 2 AO 宽场显微镜系统及 AO 校正前后成像对比^[23]。(a)基于 SHWS、荧光微球和 DM 的 AO 宽场显微镜系统; (b) AO 校正前后绿色荧光珠的宽场成像

Fig. 2 AO wide-field microscope system and comparison of wide-field images before and after AO correction^[23]. (a) Schematic of AO wide-field microscope system based on SHWS, fluorescent beads, and DM; (b) wide-field images of green fluorescent beads before and after AO correction

在间接波前探测方面,2010年 Kner 等^[25]演示了相位恢复作为波前传感机制在三维宽场荧光显微镜中的应用,在没有 WFS 的情况下实现了闭环波前控制,斯特列尔比达到 0.78,最大信号强度至少增加 10 倍。Bourgenot 等^[24]研究了基于模型的寻优算法,以图像清晰度为评价指标,利用 DM 进行波前校正,经过多次迭代使评价函数收敛,获得了较好的校正效果。但是上述两种方法在速度方面都受到一定的限制,研究更快的相位检索算法和度量优化算法将有利于技术的进一步发展。

在宽场成像显微镜中引入 AO 后,等晕区会将高分辨率成像限制在一个较小的范围内,共轭 AO 的出现在一定程度上改善了这一问题。2015 年 Li 等^[26]提出了一种基于传感器且不需要导引星的快速闭环反馈共轭 AO 实现方法,如图 3(a)所示。该方案将样本本身作为照明光源,利用分区孔径波前

(PAW)传感技术直接探测波前,并把 DM 和 PAW 传感器放置在可移动平台上以实现共轭调整,最终实现了几乎与显微镜整个视场等大的校正视场。PAW 传感器不需要使用准直光,只需要简单的图像算法就可以直接观察任意形状样品,获得高的空间分辨率,而且具有动态范围大、校正速度快的特点。在此基础上,2016 年该课题组提出利用多重散射产生的斜背向散射光作为 WFS 的信标光^[27],在获得较好的校正效果的同时获得了较大的成像视场,如图 3(b)所示。2018 年赵琪等^[28]结合共轭型 AO 系统和相干光自适应校正技术,提出了一种并行共轭的波前校正算法。该算法可以并行提取多路光强反馈信号,在 SLM 刷新次数相同的情况下可增大有效校正视场的范围并实现快速波前校正。可见,共轭 AO 在扩大显微成像视场方面有着广阔的应用前景。

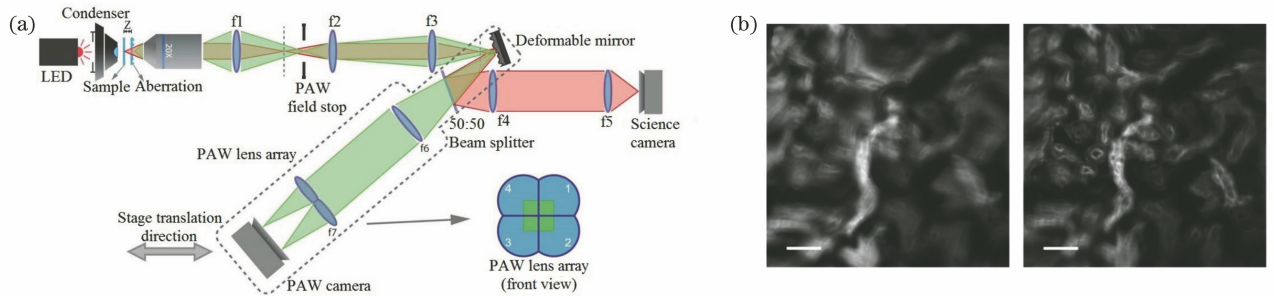


图 3 共轭 AO 宽场显微镜系统及 AO 校正前后成像对比。(a)基于 PAW 的共轭 AO 宽场显微镜系统^[26];
(b)共轭 AO 校正前后荧光标记的异常小鼠肾脏切片荧光图像^[27]

Fig. 3 Conjugate AO wide-field microscope system and comparison of images before and after AO correction. (a) Schematic of PAW-based conjugate AO wide-field microscope system^[26]; (b) fluorescence images of aberrated fluorescently-labeled mouse kidney section without and with conjugate AO correction^[27]

3.2 结构光照明显微镜

结构光照明显微(SIM)是一种通过结构化照明在频率域以空间混频的方式将物体的高频信息载入到光学系统的探测通频带内以突破衍射极限的超分辨成像技术^[29-30]。SIM 通常使用干涉条纹进行照明,像差的存在会影响照明结构光的质量,且照明光路对像差敏感,同时 SIM 为宽场成像方式,因此需对其照明光路和成像光路进行像差校正。

2008 年 Booth 课题组将无 WFS 的 AO 应用到 SIM 中^[31],将 DM 置于照明和成像路径的共同光路中并成功对小鼠肠道样品进行了像差校正,图像质量得到明显改善。2015 年 Thomas 等^[32]提出了一种基于 DM 的无波前传感 AO-SIM 方案,对 35 μm 厚的秀丽隐杆线虫组织中的荧光珠进行成像,AO 校正后成像分辨率达到 140 nm,信噪比至少提高

60%。但这两种方法不适用于具有动态像差的样本,后者也不能校正高空间频率像差。2017 年 Li 等^[33]提出了一种基于 woofer-tweeter 双变形镜和 WFS 的自适应光学结构光照明显微镜(AOSIM),通过将低空间频率大行程变形镜(woofer)与高空间频率小行程变形镜(tweeter)相结合来消除大幅度像差和高阶像差,同时加快了探测与校正速度,如图 4(a)所示;利用该系统对果蝇胚胎中绿色荧光蛋白(GFP)标记的运动神经元进行成像,发现经像差校正后图像的信噪比提高了 5 倍,斯特列尔比达到 0.85,远大于校正前的 0.50,如图 4(b)所示。可见, SIM 中不同像差的校正对高分辨率成像起着至关重要的作用,基于迭代算法的间接法会在一定程度上削弱 SIM 成像速度快的优点,直接法在实现高分辨率的实时 SIM 成像方面将发挥越来越重要的作用。

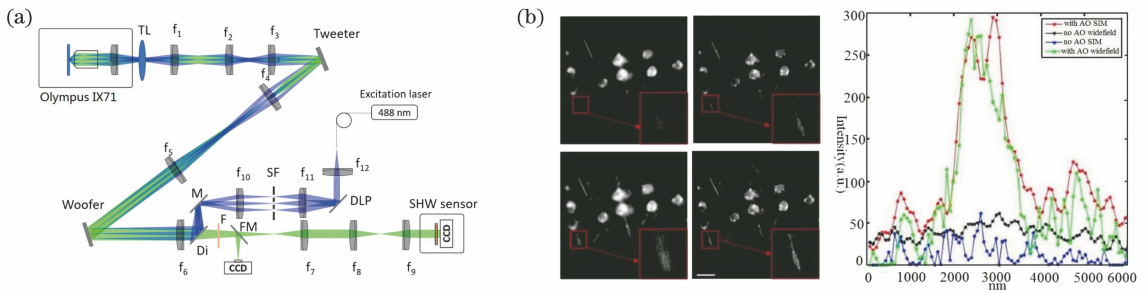


图4 AOSIM系统及AO校正前后成像对比^[33]。(a) Woofer-tweeter AOSIM系统；(b) AO校正前后果蝇胚胎中GFP标记的aCC/RP2运动神经元的宽场和SIM图像

Fig. 4 AOSIM system and comparison of images before and after AO correction^[33]. (a) Schematic of woofer-tweeter AOSIM system; (b) wide field and SIM images of GFP-labeled aCC/RP2 motoneurons of a *Drosophila* embryo before and after AO correction

3.3 单分子定位显微镜

利用超灵敏的检测方法,可以计数、定位和跟踪细胞环境中的生物分子,随着显微技术的不断发展,单分子定位显微镜,如光激活定位显微镜(PALM)和随机光学重构显微镜(STORM),已经成为细胞成像中普遍使用的工具之一。PALM和STORM都是基于传统的宽场显微镜,因此只需对成像光路进行像差校正。

PALM^[34]的基本原理是利用一种绿色荧光蛋白(GFP)的变种来标记蛋白质,利用405 nm和488 nm的激光激活、定位、漂白荧光分子,循环几百次之后得到细胞中所有荧光分子的精确定位,最后将所有的荧光分子图像整合到一张图上得到超分辨显微图像。2012年Izeddin等^[35]提出了一种利用AO技术对点扩展函数(PSF)进行整形,进而实现

单分子三维定位与追踪的新方法,该方法利用WFS对畸变波前直接进行测量,采用DM对像差进行校正,如图5(a)所示,将此方法应用于PALM和量子点三维追踪成像系统,验证了AO技术在单分子成像中的潜力。除了基于WFS的直接法外,无传感器的AO方案在PALM中也得以成功实现。2013年Burke等^[36]提出了一种基于图像锐度的图像质量度量,并将其定义为图像傅里叶变换的二阶矩,应用于PALM中实现了像差校正及成像质量改善。2015年该课题组又提出了一种基于图像锐度度量的反馈AO实现方案^[37],设计了一个包含DM的单分子开关显微成像系统,如图5(b)所示,利用该系统首次实现了复杂样本中相关像差的校正,该研究有望通过对深层细胞和组织的成像扩大单分子定位显微镜的应用范围。

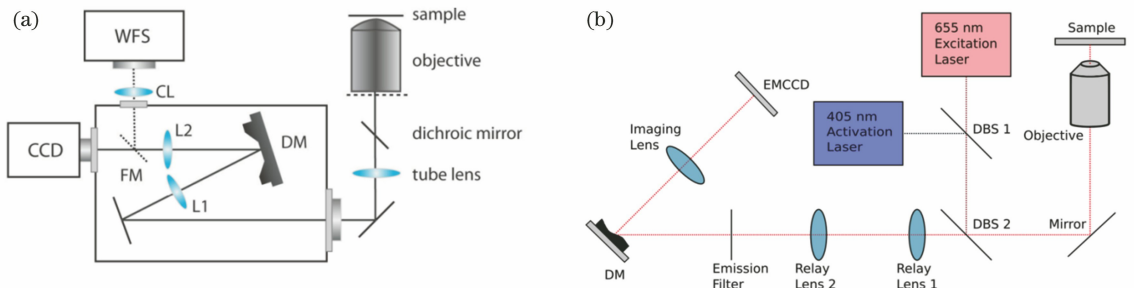


图5 两种AO单分子定位显微镜系统。(a)基于WFS和DM的AO光激活定位显微镜系统^[35]；(b)基于DM和图像锐度度量的无波前传感器反馈AO单分子开关显微镜系统^[37]

Fig. 5 Schematics of two AO single molecule location microscope systems. (a) Schematic of AO-PALM system based on WFS and DM^[35]; (b) schematic of wavefront sensorless feedback AO single molecule switch microscope based on DM and image sharpness measurement^[37]

然而,PALM只能观察外源表达的蛋白质,对于细胞中内源蛋白质的分辨与定位却无能为力。2006年底,Zhuang课题组开发出一种类似于PALM的单分子定位超分辨成像技术(STORM),

用来研究细胞内源蛋白的超分辨定位^[38]。STORM采用具有光开关性质的荧光染料获取单个荧光分子的高精度定位,通过多次重复这个过程重建荧光图像。

2015年 Tehrani 等^[39]提出了一种基于 GA 的 AO-STORM, GA 是一种通过模拟自然进化过程搜索最优解的方法,将它与强度独立度量函数相结合以优化 PSF,实现了单分子定位采集过程中波前畸变的实时校正,对 hepG2 细胞微管进行了高分辨率成像。2017年该课题组又提出了一种基于粒子群优化 (PSO)算法的 AO-STORM^[40], PSO 是一类随机全局优化技术,通过粒子间的相互作用发现复杂搜索空间

中的最优区域进而缩短寻找阈值的时间,将它与傅里叶度量相结合,在 STORM 数据采集过程中实现了对畸变波前的实时校正,对 HeLa 细胞微管进行了高分辨率成像。图 6(a)、(b)分别为基于 GA 和 PSO 算法对像差进行校正前后的成像对比,结果表明,PSO 算法的收敛速度较 GA 快一个数量级,将其与对强度不敏感的傅里叶度量相结合可以有效校正随机闪烁荧光团图像采集过程中的波前畸变。

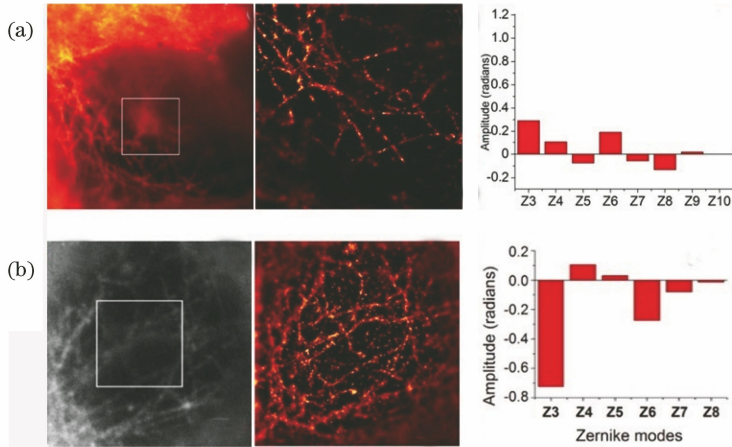


图 6 基于搜索算法的 AO-STORM 系统对细胞微管的像差校正。(a)利用基于 GA 的 AO-STORM 系统对 hepG2 细胞微管进行像差校正^[39]; (b)利用基于 PSO 算法的 AO-STORM 系统对 HeLa 细胞微管进行像差校正^[40]

Fig. 6 Aberration correction of microtubules by AO-STORM system based on search algorithm. (a) Aberration correction using GA-based AO-STORM system on microtubules of hepG2 cell^[39]; (b) aberration correction using PSO-based AO-STORM system on microtubules of HeLa cell^[40]

单分子定位显微镜的分辨率取决于 PSF 的宽度和所收集的光子数,且对样品引起的像差十分敏感,成像的对比度和分辨率受像差的限制。目前应用于单分子定位显微镜中的 AO 方案通常是基于迭代的优化算法的间接 AO 方案,近些年随着算法种类的增多以及算法功能的不断优化,波前探测与校正速度不断加快,成像的分辨率也不断提升,进一步扩大了单分子显微镜的应用范围。

4 AO 技术在点扫描成像显微镜中的应用

在点扫描成像显微镜中,点光源发出的光经扩束、准直后以平行光的形式入射到显微物镜,经物镜聚焦后的聚焦光斑照射样品中的某一点并激发出荧光。荧光由成像系统收集,利用点探测器进行探测,最终通过点扫描的方式进行成像。可见,样品的像差不可避免地会对照明光路中的聚焦点产生影响,使焦点弥散,导致无法对样品激发出荧光或在离焦面产生不必要的背景光。因此,对于点扫描成像显微镜,照明光路的校正是必须的,成像光路是否校正

取决于共焦针孔的存在与否,存在则需校正,不存在则不需要校正。这类显微镜主要包括共聚焦荧光显微镜、双(多)光子荧光显微镜以及受激发射损耗显微镜等,下面将介绍 AO 技术在这几种显微镜中的应用及最新研究进展。

4.1 共聚焦荧光显微镜

共聚焦荧光显微镜利用激光作为激发光源,在光电探测器前放置一个针孔,使针孔与点光源共轭以滤除杂散光,通过对样品进行逐点、逐层扫描从而实现样品的高分辨率三维成像^[41]。在共聚焦显微镜中,照明光路的像差会使焦点弥散,导致无法对样品激发荧光或产生背景光,而成像光路的像差会使荧光信号减弱,影响探测效率,进而降低成像质量,因此照明和成像光路都需要进行像差校正。

在基于 WFS 的直接 AO 系统中,自体荧光、荧光微球、荧光标记蛋白等分别被用作人工导引星,作为 SHWS 的信标光源实现样品中特定位置的波前畸变探测, Tao 课题组在这方面做了大量工作。2011 年和 2012 年,该课题组分别用荧光微球^[42]、组织中荧光蛋白标记的结构^[43]以及荧光蛋白中心

体^[44]作为导引星,在共聚焦显微镜中对畸变波前进行了直接测量并利用 DM 对像差进行校正,在利用荧光微球作为导引星对固定的小鼠脑组织 100 μm 深度处进行成像时,斯特列尔比提高了 4.3 倍,信号强度提高了 2.4 倍,如图 7 所示。然而,如前所述,人工引入导引星的方法相对来说比较复杂,引入的荧光蛋白很难固定于样品空间内。此外,基于 SHWS 的波

前测量依赖于导引星的发射光,散射效应不仅会限制入射到导引星的光子数量,而且增加了邻近导引星的背景噪声,进而降低了波前测量的信噪比。为解决上述问题,2013 年 Tao 等^[45]提出基于导引星干涉聚焦的直接波前测量方法,提高了导引星的荧光强度并有效降低了散射引起的激发信号损失,进一步改善了波前测量的信噪比并增大了校正深度。

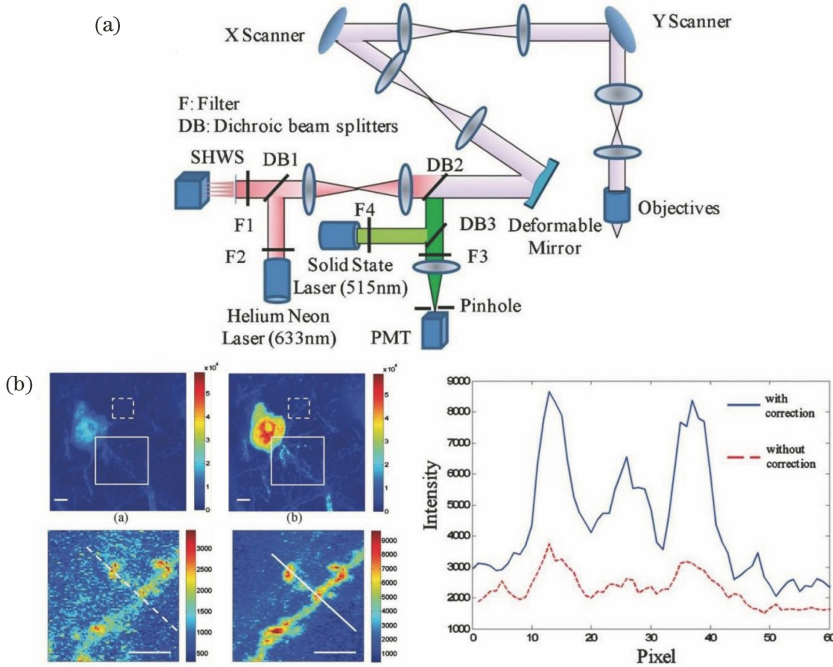


图 7 AO 共聚焦显微镜系统及 AO 校正前后成像对比^[42]。(a) 基于 SHWS、荧光微球和 DM 的 AO 共聚焦荧光显微镜系统;(b) 100 μm 厚小鼠脑组织 AO 校正前后的共聚焦荧光成像

Fig. 7 AO confocal microscope system and comparison of images before and after AO correction^[42]. (a) Schematic of AO confocal fluorescence microscope based on SHWS, fluorescent beads, and DM; (b) confocal fluorescence images through 100 μm thick mouse brain tissue before and after AO correction

在基于迭代算法的间接 AO 实现方面,2014 年 Wang 等^[46]提出基于 SPGD 算法的 AO 共聚焦显微系统,如图 8 所示,以图像清晰度为优化指标利用 DM 对小鼠骨髓血管成像过程中由样本引起的像差

进行了校正,在更大的对比度下观测到了更清晰的骨髓血管结构,并提高了信噪比。实验结果显示,深度为 38 μm 和 75 μm 的血管图像质量分别提高了 3 倍和 2 倍。SPGD 算法是目前应用最为广泛的搜索

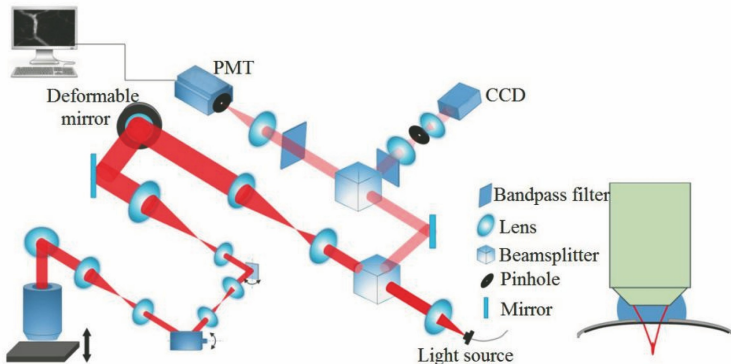


图 8 基于 DM 和 SPGD 算法的无波前传感器 AO 共聚焦荧光显微镜系统^[46]

Fig. 8 Schematic of wavefront sensorless AO confocal fluorescence microscope based on DM and SPGD algorithm^[46]

算法,但是其收敛速度受多种因素的影响。2019年胡栋挺等^[47]在不降低精度的前提下,对SPGD算法中关键参数随机扰动幅值与增益系数的关系进行了优化,进一步提高了SPGD算法的收敛速度和精度。同年,文良华等^[48]提出了一种基于波前像差梯度平方寻优的SPGD算法,实现了函数快速收敛与全局最优,参数设置简单,具有良好的适应性。除此之外,无波前传感的数字微镜共焦显微镜^[49]以及基于模型的优化算法^[50]也相继被提出,相比传统的爬山算法校正速度更快并获得了较好的成像效果。

基于导引星全息的数字自适应光学(DAO)是一种新兴的主动成像方式。2015年Liu等^[51]将DAO技术应用于线扫描共焦成像系统,提出了一种DAO线扫描共焦成像系统(DAOLCI)。该系统省去了传统自适应光学共焦成像系统采用的SHWS、DM等硬件和闭环反馈,降低了光学系统的复杂性和成本。在此基础上,为了解决直接反演法在样品与导引星焦平面不一致时校正引起的图像质量下降问题,2017年Liu等^[52]又提出了基于图像度量的迭代方法,它对于从聚焦或非聚焦的导引星全息图中提取的像差都能获得较高的校正准确率,从而提高了DAO的实用性,实验系统如图9所示。这种新兴的成像方式与共焦显微镜的结合改善了光学系统复杂性和高成本对开展实验的限制,在显微成像领域有着巨大的应用潜力。

针对共聚焦显微镜中存在的畸变,Zheng等^[53]提出了基于孔径分割的单光束相位测量技术,实现了对共聚焦激光扫描显微镜的畸变测量和补偿,如

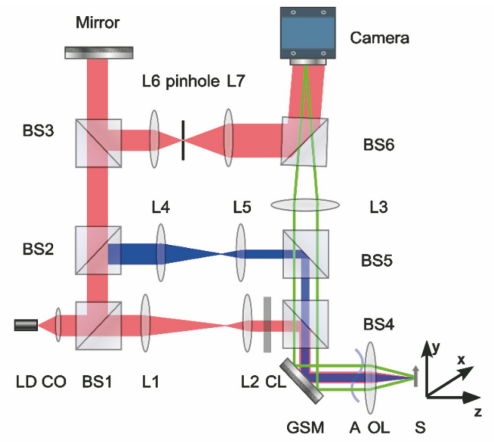


图9 基于导引星全息的DAO共聚焦显微镜系统^[52]
Fig. 9 Schematic of DAO confocal microscope based on guide star hologram^[52]

图10所示。该方法利用SLM对共聚焦镜入射光进行分割,将入射光的横截面分解成一系列圆形子区域。通过加载相位光栅,每次只选通两个圆形子区域:一个位于入射光的中心,另一个在入射光的横截面上逐次移动。来自于这两个子区域的光通过物镜的聚焦作用会聚于一点并发生干涉,干涉图样被CCD记录。通过SLM在这两个圆形子区域之间引入相移量 $0, \pi/2, \pi$,可以产生不同相移量的干涉图样,利用相移干涉的再现方法可以得到两个子区域之间的相位差。以此类推,通过依次切换移动子区域使其覆盖整个入射光的横截面,可以测量出共聚焦镜入射光的相位畸变。最后,通过SLM对该畸变相位进行补偿,可以提高共聚焦镜的成像空间分辨率和信噪比。

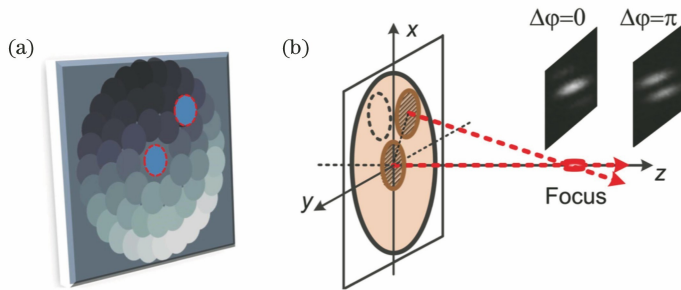


图10 共聚焦显微镜畸变测量^[53]。(a) SLM上的孔径分割示意图;(b)通过聚焦两个圆形子区域的光产生的干涉图案
Fig. 10 Aberration measurement by confocal microscope^[53]. (a) Pupil segmentation on SLM;
(b) interference patterns generated by focusing light from two selected circular segments

4.2 双(多)光子荧光显微镜

双(多)光子荧光显微镜基于双(多)光子激发这一非线性效应,只在焦点附近的微小区域对样品进行激发,探测器前无需利用针孔滤除杂散光,因此只需对照明光路进行像差校正。

在无波前传感的间接AO方面,自2000年Albert等^[11]将AO技术与双光子显微镜相结合后,关于AO双光子显微技术的研究相继展开。2012年Wang和Ji提出了一种基于孔径分割的AO方法,将SLM共轭到显微物镜后焦平面进行像差补

偿,纠正了双光子荧光内窥镜中大数值孔径梯度折射率透镜(GRIN)的固有畸变^[54],在大的成像视场($200\ \mu\text{m}\times 200\ \mu\text{m}$)中成功探测到了小鼠大脑切片中原本不可能观测到的精细结构。孔径分割是指物镜的后孔径被分成若干子区域,入射的光被单独引导到每一个子区域,通过图像偏移来测量每组光线从物镜出射到向焦点移动时所产生的偏转,进而测量局部斜率。虽然这种方法使成像视场扩大,但是成像深度较浅,因此2014年该课题组基于孔径分割AO提出了一种多路像差测量方法^[55],利用与SLM共轭的数字微阵列光处理器(DMD)并行调制多个子区域的光线强度和相位以确定它们的相位梯度,在双光子荧光显微镜中实现了在活体小鼠深层区域($300\sim 500\ \mu\text{m}$)成像中近衍射极限的成像分辨率。2019年Zhang等^[56]将基于Zernike模式的优化算法应用于双光子光片显微镜中进行像差分析及成像性能评价,通过模拟双光子光片显微成像系统,提出了一种基于积分强度的新指标用以评估存在像差的

光片,并研究了各种Zernike模式和随机像差对光路的影响,结果表明高阶像差对系统的轴向分辨率和激发效率影响很小,实际中只需要对低阶分量进行校正。

另一方面,AO与双光子显微镜的结合也实现了波前畸变的直接探测与校正。2013年Tao等^[57]采用基于SHWS和开环控制的AO系统,将DM置于照明光路中,最终实现了快速、直接的波前测量和校正;利用该方法对果蝇胚胎进行活体成像,首次测得了胚胎中央的像差,但探测深度只有 $51\ \mu\text{m}$,如图11所示。2015年Wang等^[58]在双光子显微镜中以近红外荧光蛋白为导引星利用SHWS和DM对畸变波前进行了测量与校正,减弱了深层组织中散射效应的影响并实现了小鼠大脑 $700\ \mu\text{m}$ 处的活体高分辨率成像,极大地增大了探测深度。深层组织的折射率不均匀导致双光子点扫描成像的波前像差不断变化,所以相比于间接AO方法,直接法更有利于波前像差的实时校正和双光子点扫描成像。

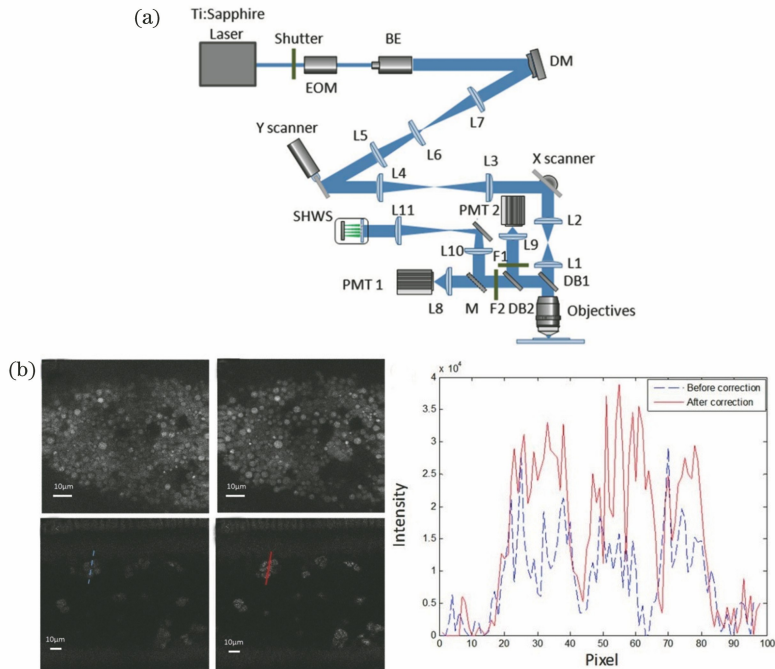


图11 AO双光子显微镜系统及AO校正前后成像对比^[57]。(a)基于SHWS和开环控制的AO双光子显微镜系统;
(b)AO校正前后活体果蝇胚胎 $51\ \mu\text{m}$ 深度处的双光子成像

Fig. 11 AO two-photon microscope system and comparison of images before and after AO correction^[57]. (a) Schematic of AO two-photon microscope based on SHWS and open-loop control; (b) two-photon images of live *Drosophila* embryo at depth of $51\ \mu\text{m}$ before and after AO correction

由上可见,AO在双光子荧光显微镜中得到广泛应用,除此之外,基于多光子的AO系统也逐渐发展起来。2015年Sinefeld等^[59]提出了基于三光子和四光子荧光非线性负反馈的AO系统,证明荧光

微球的三光子信号经畸变校正后有了明显的改善,而且由像差校正引起的信号改善程度随非线性阶数呈指数增加。2018年Bueno等^[60]将多致动器自适应透镜与多光子显微镜相结合,通过爬山算法,对样品

诱导的畸变进行了校正,提高了多光子显微镜在厚样品中的成像质量。实验证明,AO在三光子显微镜等高阶非线性显微镜中的应用比双光子显微镜更加迫切,并有机会大幅度增大成像深度、提高生物组织的分辨率。

4.3 受激发射损耗显微镜

1994年Hell等^[61]提出受激发射损耗(STED)显微技术,其核心思想是利用受激辐射选择性损耗PSF边缘区域的激发态荧光分子压缩PSF尺度。STED显微镜包括三条光束路径:激发光路、耗尽光路、发射光路,三条路径都会受到像差的影响,运用AO技术时最好是对所有的光束路径进行像差校正。

2012年Gould等^[62]将AO应用到STED显微镜中,利用基于图像反馈的方法补偿由系统和样品引起的像差,得到了厚生物组织(约14 μm和25 μm斑马鱼视网膜切片)的三维超分辨成像。系统采用两个分别置于耗尽光路和激发光路的SLM同时实现STED相位掩模和像差校正,且允许使用超分辨图像本身对像差进行校正,并将图像锐度和图像亮

度相结合作为新的图像质量度量,系统如图12(a)所示。在此基础上,2016年Patton等^[63]提出了一种包含两种校正元件(DM和SLM)的AO方案,如图12(b)所示,DM置于公共光路中用于校正三条光路中的像差,SLM用于校正DM校正之后的残余像差,最终成功实现了所有光束路径中像差的校正,同时提升了在厚组织样本中的成像性能。利用此方法对果蝇大脑复杂结构(深度15 μm)进行了超分辨率的3D-STED成像,得到了较好的成像效果。2018年Zdańkowski等^[64]提出了一种用于厚组织成像的无WFS的AO 3D-STED显微镜,利用SLM校正来自光路和样品的像差,实现了对厚度为12 μm的有丝分裂纺锤体的成像,并且通过块匹配和3D滤波算法进行背景噪声的抑制。可见,STED显微技术在厚组织的深处成像以及三维成像方面具有显著优势,其与AO技术的结合更是拓宽了其应用范围,提高了成像的分辨率和对比度,AO在STED中的应用主要是基于图像的无波前传感器AO方案,获得的成像效果也比较好。

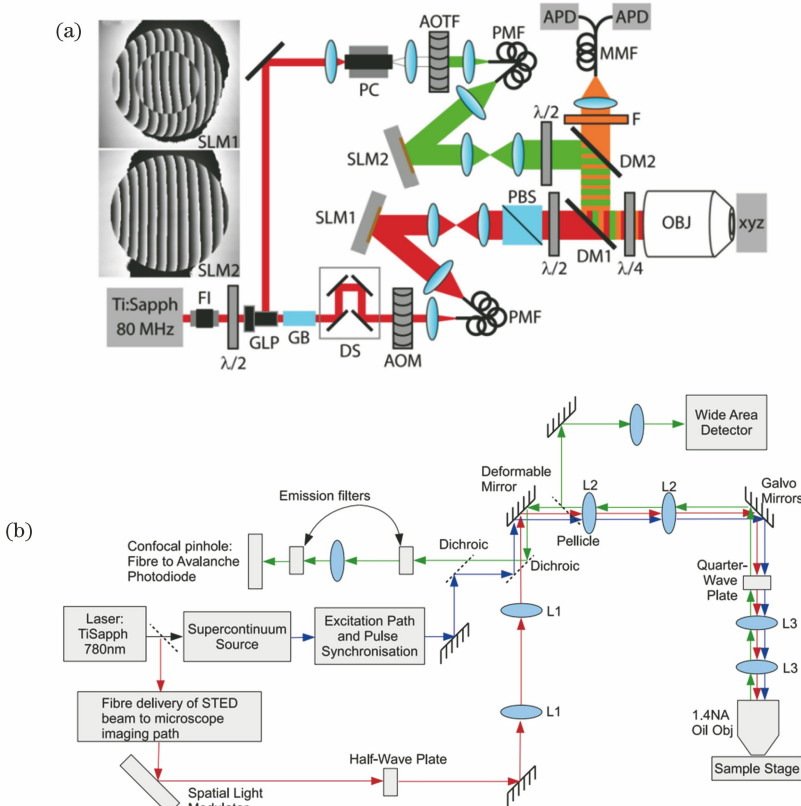


图12 两种AO-STED显微镜系统。(a)利用两个SLM校正像差的AO-STED系统^[62];
(b)利用DM、SLM两种校正元件校正像差的AO-STED系统^[63]

Fig. 12 Schematics of two AO-STED microscope systems. (a) Schematic of AO-STED system using two SLMs for aberration correction^[62]; (b) schematic of AO-STED system using DM and SLM for aberration correction^[63]

STED 的环状焦斑经常因为装置本身的畸变或样品本身的畸变而变得不均匀,并且中心出现残余光强,如图 13(a)所示。Gao 等^[65-66]利用基于孔径分割的方法测量并补偿了 STED 系统中装置本身

的相位畸变,并利用 SLM 对其进行了补偿,所得 STED 环状焦斑如图 13(b)所示。利用畸变补偿后的 STED 系统对样品进行扫描成像时,成像分辨率和信噪比大大提高。

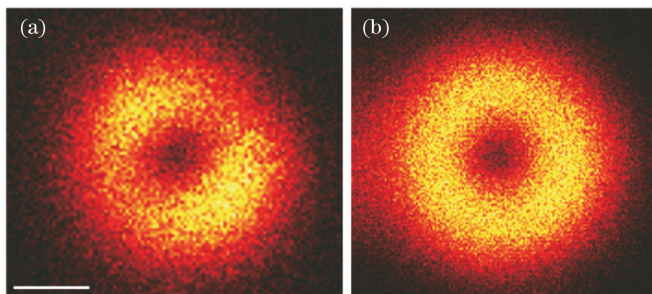


图 13 环状焦斑^[66]。(a)畸变校正前;(b)畸变校正后

Fig. 13 Annular focal spots^[66]. (a) Before aberration compensation; (b) after aberration compensation

5 结束语

主要对近 10 年来 AO 技术的发展及其在荧光显微镜中的应用进行了归纳与分析。根据成像方式将显微镜分为宽场成像显微镜和点扫描成像显微镜两大类,前者对于成像光路的像差校正是必须的,后者对于照明光路的像差校正是必须的。在宽场成像显微镜中,为了将 AO 技术应用于普通宽场荧光显微镜,可以向样品中注入荧光微球、荧光蛋白等作为导引星或利用样品的背向散射光对畸变波前进行直接探测,或者采用基于相位恢复与基于模型的模态法的间接波前探测技术。为了改善引入 AO 校正后宽场成像视场减小的问题,基于分区孔径波前的共轭 AO 方法以及并行共轭校正算法等相继被提出,这些算法在改善成像视场的同时获得了较好的成像效果。SIM 中对于照明光路和成像光路的共同校正可明显改善成像质量。基于图像锐度度量和基于搜索的优化算法在单分子定位系统中可显著提高点源的定位精度和系统的成像精度。在点扫描成像系统中,AO 技术的引入也极大地改善了系统的成像质量。在共聚焦显微镜的照明光路和成像光路中同时进行像差校正以及基于导引星全息数字自适应光学与共聚焦显微镜的结合有效提高了成像信噪比、增大了校正深度。将基于孔径分割的间接 AO 技术引入双(多)光子显微镜并结合 SLM 进行像差校正可以极大地提高样品中聚焦光斑的质量,增大成像深度及成像视场。在 STED 显微镜中将激发光路、耗尽光路及发射光路中三条光束路径结合 DM、SLM 进行像差校正,可以实现对厚样本的三维高分辨率成像。

根据畸变测量和补偿的方式,AO 技术可以分为直接 AO 和间接 AO 技术。基于 WFS 的直接 AO 技术解决了像差准确测量的问题,具有测量速度快、测量精度高等优点,但由于生物组织通常是非透明非均匀的复杂三维结构,且样品发出的光强一般较弱,不易于探测,直接 AO 技术在应用时存在系统结构和操作复杂、成像对象受限等不足,这大大限制了它在生物组织以及活体成像中的应用。相比之下,虽然基于无波前探测的间接 AO 技术需要的迭代耗时更长,但是其具有系统结构简单、成像对象不受限等优势,在大多数显微镜中易于实现,在现代荧光显微成像系统中应用更为广泛。今后,在荧光显微成像领域,AO 技术的发展和方向如下:

1) 扩大 AO 系统的校正视场。显微系统的大视场、高分辨率活体成像一直是科研人员不断追求的目标之一,然而在将 AO 应用于显微镜中后其高分辨率成像视场受到限制,影响了成像质量和观测的效率,共轭 AO、多层共轭 AO 以及多信标 AO 的出现在一定程度上改善了这一问题,未来可以结合更加高效的共轭像差校正算法进一步扩大显微成像视场。

2) AO 测量与校正的高速实时化。生物组织中的波前畸变往往是不断变化的,要想对其进行实时的探测与校正就必须加快波前畸变的探测速度和波前校正器的校正速度,实现 AO 系统的高速实时化。在这方面,基于波前探测器的直接 AO 技术更占优势,而基于迭代算法的间接 AO 校正需要的时间较长,因此需要开发更高效的优化算法。

3) 进一步推动深层高分辨荧光显微成像的发展。研究深层组织的大视场和高时空分辨成像是当

前成像领域的一个前沿问题,AO技术与荧光显微镜的结合使得对深层生物组织的高时空分辨率活体成像成为可能。但是现在显微技术所能达到的成像深度通常在微米量级,尽管双光子成像对于小鼠脑部血管结构的成像深度能达到2000 μm 左右,但这对于人脑成像来说却是很难实现的。未来生物医学成像深度(如脑成像、眼底成像等)至少要达到毫米量级才能实现更好的诊断与治疗,因此可借助AO技术进一步增大成像深度,实现深层组织的高分辨率成像。

参 考 文 献

- [1] Babcock H W. The possibility of compensating astronomical seeing [J]. Publications of the Astronomical Society of the Pacific, 1953, 65(386): 229-236.
- [2] Merkle F, Gerard R, Kern P Y, et al. First diffraction-limited astronomical images with adaptive optics[J]. Proceedings of SPIE, 1990, 1236: 193-203.
- [3] Wei K, Li M, Chen S Q, et al. First light for the sodium laser guide star adaptive optics system on the Lijiang 1.8 m telescope[J]. Research in Astronomy and Astrophysics, 2016, 16(12): 183.
- [4] Salmon J T, Bliss E S, Byrd J L, et al. An adaptive optics system for solid-state laser systems used in inertial confinement fusion [C] // 1st Annual International Conference on Solid State Lasers for Application to Inertial Confinement Fusion, May 30-June 2, 1995, Monterey, CA, United States, 1995.
- [5] Wang Q, Kocaoglu O P, Cense B, et al. Imaging retinal capillaries using ultrahigh-resolution optical coherence tomography and adaptive optics [J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2011, 52(9): 6292-6299.
- [6] Schallek J, Geng Y, Nguyen H, et al. Morphology and topography of retinal pericytes in the living mouse retina using *in vivo* adaptive optics imaging and *ex vivo* characterization [J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2013, 54(13): 8237-8250.
- [7] Kitaguchi Y, Fujikado T, Bessho K, et al. Adaptive optics fundus camera to examine localized changes in the photoreceptor layer of the fovea [J]. Ophthalmology, 2008, 115(10): 1771-1777.
- [8] Ooto S, Hangai M, Sakamoto A, et al. High-resolution imaging of resolved central serous chorioretinopathy using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy[J]. Ophthalmology, 2010, 117(9): 1800-1809.
- [9] Herman B. Fluorescence microscopy [M]. New York: Springer, 1998.
- [10] Booth M J. Adaptive optics in microscopy [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2007, 365(1861): 2829-2843.
- [11] Albert O, Sherman L, Mourou G, et al. Smart microscope: an adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy[J]. Optics Letters, 2000, 25(1): 52-54.
- [12] Ji N. Adaptive optical fluorescence microscopy[J]. Nature Methods, 2017, 14(4): 374-380.
- [13] 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): 21-34.
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): 21-34.
- [14] Cha J W, Ballesta J, So P T C. Shack-Hartmann wavefront-sensor-based adaptive optics system for multiphoton microscopy [J]. Journal of Biomedical Optics, 2010, 15(4): 046022.
- [15] Bourgenot C, Saunter C D, Taylor J M, et al. 3D adaptive optics in a light sheet microscope[J]. Optics Express, 2012, 20(12): 13252-13261.
- [16] Tang J, Germain R N, Cui M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(22): 8434-8439.
- [17] Legras R, Gaudric A, Woog K. Distribution of cone density, spacing and arrangement in adult healthy retinas with adaptive optics flood illumination [J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191141.
- [18] Wu Y K. The therapeutic application of adaptive optics in amblyopia treatment [D]. Luzhou: Southwest Medical University, 2013: 6-22.
吴榆可. 自适应光学视力治疗仪在弱视治疗中的应用[D]. 泸州: 西南医科大学, 2013: 6-22.
- [19] Wang Z B. The application of adaptive optical fluorescence closed-loop technology in confocal imaging[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2015: 15-25.
王志斌. 自适应光学荧光闭环技术在共聚焦成像中的应用[D]. 北京: 中国科学院大学, 2015: 15-25.
- [20] Platt B C, Shack R. History and principles of Shack-

- Hartmann wavefront sensing [J]. *Journal of Refractive Surgery*, 2001, 17(5): S573-S577.
- [21] Bon P, Maucort G, Wattellier B, et al. Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells[J]. *Optics Express*, 2009, 17(15): 13080-13094.
- [22] Costa J B. Modulation effect of the atmosphere in a pyramid wave-front sensor [J]. *Applied Optics*, 2005, 44(1): 60-66.
- [23] Azucena O, Crest J, Kotadia S, et al. Adaptive optics wide-field microscopy using direct wavefront sensing[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(6): 825-827.
- [24] Bourgenot C, Saunter C D, Love G D, et al. Comparison of closed loop and sensorless adaptive optics in widefield optical microscopy[J]. *Journal of the European Optical Society: Rapid Publications*, 2013, 8: 13027.
- [25] Kner P, Winoto L, David A, et al. Closed loop adaptive optics for microscopy without a wavefront sensor [J]. *Proceedings of SPIE*, 2010, 7570: 757006.
- [26] 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.
- [27] Li J, Bifano T G, Mertz J. Widefield fluorescence microscopy with sensor-based conjugate adaptive optics using oblique back illumination[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(12): 121504.
- [28] Zhao Q, Shi X, Gong W, et al. Large field-of-view and deep tissue optical micro-imaging based on parallel wavefront correction algorithm[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(12): 1207001.
赵琪, 石鑫, 龚薇, 等. 基于并行波前校正算法的大视场深穿透光学显微成像[J]. *中国激光*, 2018, 45(12): 1207001.
- [29] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198: 82-87.
- [30] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination [J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [31] Débarre D, Botcherby E J, Booth M J, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2008, 16(13): 9290-9305.
- [32] 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.
- [33] Li Q, Reinig M, Kamiyama D, et al. Woofer-tweeter adaptive optical structured illumination microscopy [J]. *Photonics Research*, 2017, 5(4): 329-334.
- [34] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [35] 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.
- [36] Burke D, Kenny F, Patton B, et al. Optimal sensorless adaptive optics schemes for super-resolution microscopy [C] // *Imaging and Applied Optics*, June 23-27, 2013, Arlington, Virginia. Washington, D.C.: OSA, 2013: pOTu1A.2.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Pawley J B. *Handbook of biological confocal microscopy*[M]. 3rd ed. Berlin: Springer, 2006.
- [42] 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.
- [43] Tao X D, 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.
- [44] Tao X D, Crest J, Kotadia S, et al. Live imaging using adaptive optics with fluorescent protein guide-stars[J]. *Optics Express*, 2012, 20(14): 15969-

- 15982.
- [45] Tao X D, Dean Z, Chien C, et al. Shack-Hartmann wavefront sensing using interferometric focusing of light onto guide-stars[J]. *Optics Express*, 2013, 21(25): 31282-31292.
- [46] Wang Z B, Wei D, Wei L, et al. Aberration correction during real time *in vivo* imaging of bone marrow with sensorless adaptive optics confocal microscope[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(8): 086009.
- [47] Hu D T, Shen W, Ma W C, et al. Fast convergence stochastic parallel gradient descent algorithm [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(12): 122201.
胡栋挺, 申文, 马文超, 等. 一种快速收敛的随机并行梯度下降算法[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(12): 122201.
- [48] Wen L H, Huang Q Y, Xu X Q. Optimizing correction algorithm for adaptive optics based on square of wavefront gradient [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(24): 240103.
文良华, 黄琴英, 徐勋前. 基于波前梯度平方的自适应光学优化校正算法[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(24): 240103.
- [49] Pozzi P, Wilding D, Soloviev O, et al. High speed wavefront sensorless aberration correction in digital micromirror based confocal microscopy [J]. *Optics Express*, 2017, 25(2): 949-959.
- [50] Pozzi P, Soloviev O, Wilding D, et al. Optimal model-based sensorless adaptive optics for epifluorescence microscopy[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194523.
- [51] Liu C G, Kim M K. Digital adaptive optics line-scanning confocal imaging system [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(11): 111203.
- [52] Liu C G, Thapa D, Yao X C. Digital adaptive optics confocal microscopy based on iterative retrieval of optical aberration from a guidestar hologram [J]. *Optics Express*, 2017, 25(7): 8223-8236.
- [53] Zheng J J, Gao P, Shao X P. Aberration compensation and resolution improvement of focus modulation microscopy[J]. *Journal of Optics*, 2017, 19(1): 015302.
- [54] Wang C, Ji N. Pupil-segmentation-based adaptive optical correction of a high-numerical-aperture gradient refractive index lens for two-photon fluorescence endoscopy[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(11): 2001-2003.
- [55] Wang C, Liu R, Milkie D E, et al. Multiplexed aberration measurement for deep tissue imaging *in vivo* [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(10): 1037-1040.
- [56] Zhang C H, Sun W Q, Mu Q Q, et al. Analysis of aberrations and performance evaluation of adaptive optics in two-photon light-sheet microscopy [J]. *Optics Communications*, 2019, 435: 46-53.
- [57] 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.
- [58] Wang K, Sun W Z, Richie C T, et al. Direct wavefront sensing for high-resolution *in vivo* imaging in scattering tissue [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7276.
- [59] Sinefeld D, Paudel H P, Ouzounov D G, et al. Adaptive optics in multiphoton microscopy: comparison of two, three and four photon fluorescence [J]. *Optics Express*, 2015, 23(24): 31472-31483.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] Zdańkowski P, Trusiak M, Cywińska M, et al. An adaptive optics 3D STED microscope for super-resolution imaging of thick samples with background noise suppression using digital image processing[J]. *Proceedings of SPIE*, 2018, 10834: 108342G.
- [65] Gao P, Nienhaus G U. Precise background subtraction in stimulated emission double depletion nanoscopy[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(4): 831-834.
- [66] Gao P, Prunsche B, Zhou L, et al. Background suppression in fluorescence nanoscopy with stimulated emission double depletion [J]. *Nature Photonics*, 2017, 11(3): 163-169.