

文章编号: 0253-2239(2006)12-1823-6

# 随机扫描多光子荧光显微成像系统<sup>\*</sup>

吕晓华<sup>1</sup> 占 成<sup>1</sup> 张红民<sup>1</sup> 骆清铭<sup>1</sup> 陈 伟<sup>2</sup> 曾绍群<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室 武汉光电国家实验室(筹)生物医学光子学研究部, 武汉 430074)  
(<sup>2</sup> 耶鲁大学神经生物学系, New Haven, CT, 06511)

**摘要:** 多光子荧光显微成像是生物学研究的有力手段,但目前的成像速度难以满足神经成像中快事件检测的需要。针对这一问题,提出了一套随机扫描快速多光子荧光显微成像系统。系统采用二维声光偏转器快速扫描飞秒激发光束,能够以每点 10  $\mu\text{s}$  的速度对特定的感兴趣区域进行跳跃式扫描,即随机扫描,使得有效的扫描速度大为提高。引入单棱镜补偿方法解决应用声光偏转器带来的色散问题。以 170 nm 荧光小球为样品,测得系统的横向分辨力为 0.3  $\mu\text{m}$ ,纵向分辨力为 1.3  $\mu\text{m}$ 。给出了随机扫描系统和商品化多光子荧光显微镜对同一个荧光细胞的成像结果,证明了新系统的成像能力。

**关键词:** 显微成像; 随机扫描; 声光偏转器; 飞秒激光; 多光子荧光成像

中图分类号: TH742 文献标识码: A

## Construction of Random-Access Scanning Multiphoton Fluorescence Microscope System

Lü Xiaohua<sup>1</sup> Zhan Cheng<sup>1</sup> Zhang Hongmin<sup>1</sup> Luo Qingming<sup>1</sup> Wei R. Chen<sup>2</sup> Zeng Shaoqun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Biomedical Photonics, Ministry of Education, Division of Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics (proposed), Wuhan 430074)  
(<sup>2</sup> Department of Neurobiology, Yale University, New Haven, CT, 06511)

**Abstract:** Multiphoton fluorescence microscopy is a powerful tool for studying biology. However, the current scanning method is not fast enough to fulfill the requirement for fast functional event detection in the neuroimaging field. A random-access scanning multiphoton fluorescence microscope system is reported. Two-dimensional acousto-optic deflectors (AODs) are used to scan rapidly the femtosecond excitation laser. The system is capable of achieving the scanning speed of 10  $\mu\text{s}$  per scanning spot in the region of interest, and increases the effective scanning speed greatly. A single prism is used to compensate the severe dispersion of the excitation light introduced by the AODs. Using a 170 nm fluorescent bead, the lateral resolution of the system is measured to be 0.3  $\mu\text{m}$  and the axial resolution is about 1.3  $\mu\text{m}$ . Multiphoton fluorescence image of a fluorophore-labelled cell is acquired by using the random-access scanning system and a commercial multiphoton fluorescence microscope, respectively. The result proves the multiphoton fluorescence collection efficiency of the system.

**Key words:** microscopy; random-access scanning; acousto-optic deflector; femtosecond laser; multiphoton fluorescence imaging

## 1 引 言

多光子激发荧光成像内在的光学层析能力<sup>[1]</sup>和相比于共聚焦成像技术更深的成像深度<sup>[2]</sup>,使其在

生命科学研究领域得到了广泛的应用,与功能性荧光标记技术的结合更使其成为功能性研究中不可缺少的手段。多光子激发荧光成像的光学层析能力来

\* 国家自然科学基金(30370463,60278017,30328014)和国家重点基础研究发展规划项目(2004CB520804)资助课题。

作者简介: 吕晓华(1981~),男,江西丰城人,华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室博士研究生,主要从事显微成像方面的研究工作。E-mail: xhualv@163.com

导师简介: 曾绍群(1969~),男,湖南洞口人,华中科技大学生命科学与技术学院教授,博士生导师,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: sqzeng@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2005-11-21; 收到修改稿日期: 2006-06-15

自于多光子激发荧光局部激发的特点<sup>[1,3,4]</sup>,只有在焦点位置激发光子数密度才足以实现多光子荧光激发的要求,这一特点也决定了多光子激发荧光成像是一种扫描成像技术,一般通过对激发光束进行扫描来实现成像。现在最广为使用的基于  $xy$  扫描镜的扫描技术每秒只能得到几帧扫描图像,远不能满足神经功能成像中快事件(ms级)检测的需要。

基于声光偏转器的扫描技术因为不受机械惯性的影响,可以实现若干不连续的扫描位置之间的跳跃式扫描,这样就无需为获得感兴趣区域的信号而把整个样品顺序地扫描一遍,从而提高了有效的扫描速度。商业共聚焦显微镜 NORAN OZ 在其扫描机构中使用了声光偏转器, Lechleiter 等<sup>[5]</sup> 和 Roorda 等<sup>[6]</sup> 将其改造为多光子激发荧光显微镜,但是声光偏转器在其中只用于完成沿一个方向的扫描,另一个方向的扫描仍通过普通扫描镜扫描实现,不能利用声光偏转器的随机扫描能力。Bullen 等<sup>[7]</sup> 建立了基于两个声光偏转器的随机扫描单光子荧光显微成像系统。多光子激发荧光使用超短脉冲光为激发光,而声光偏转器的色散问题限制了其在这一领域的应用。Iyer 等<sup>[8]</sup> 分析了声光偏转器扫描超短脉冲光的时间色散和空间色散问题,并分别提出了时间色散补偿和空间色散补偿方法,但并未将这些补偿方法应用于其建立的随机扫描多光子显微系统<sup>[9]</sup> 中,使得系统的空间分辨力等受到限制。我们曾简要报道了基于单棱镜补偿方法<sup>[10]</sup> 的二维声光偏转器的随机扫描多光子激发荧光显微成像系统的实现<sup>[11]</sup>,给出了系统成像和随机扫描功能初步的验证性实验。本文对系统的工作原理、设计考虑进行更为详细的介绍,同时以近似点源的 170 nm 荧光小球对系统的横向和纵向分辨力进行了测量,并给出了与商品化多光子荧光显微镜对相同的荧光标记细胞样品的多光子荧光图像的对比,表明系统在随机扫描能力之外,并没有牺牲其空间分辨能力且具有较好的多光子荧光图像获取能力。

## 2 原 理

### 2.1 声光偏转器扫描原理

声光偏转器(AOD)是一种基于衍射光栅的扫描器件<sup>[7,8,12]</sup>。一定频率的正弦信号,通过声光晶体上的压电换能器的作用,产生同频率的声波通过晶体传播。声光偏转器中的声波为疏密波,会造成晶体沿声波传播方向上密度的周期性分布,从而造成

晶体折射率的周期性分布。这时晶体相当于一个光栅,其光栅常量等于声波的波长,入射光通过晶体发生衍射(图1)。当入射光的入射角满足布拉格条件<sup>[7,13]</sup>时,输出光的能量几乎完全集中于第一衍射级(衍射效率接近100%),改变声波的频率即改变声光晶体光栅的光栅常量可以改变第一衍射级相对于衍射零级的夹角,即实现了光束的偏转扫描。偏转角可以表达为

$$\theta = \lambda f / V, \quad (1)$$

其中  $\lambda$  为光波长,  $f$  为声波频率,  $V$  为声光偏转器中的声速。在光入射角度固定的情况下,布拉格条件在一定的声波频率范围内才能得到满足(或近似满足)。声波频率范围(带宽)决定了偏转角的范围,即最大扫描角:

$$\Delta\theta = \lambda \Delta f / V, \quad (2)$$

$\Delta f$  为声波带宽。将两个声光偏转器分别沿  $x$  和  $y$  方向放置,即可实现对  $xy$  平面的二维扫描。

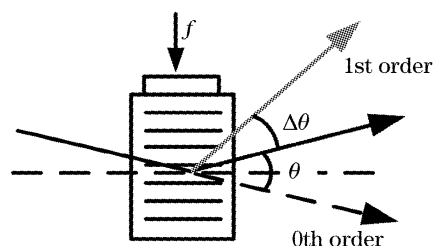


图1 声光偏转器扫描原理

Fig. 1 Illustration of the mechanism of acousto-optic deflector

声光偏转器的扫描定位时间由声波通过光束所需时间(称为渡越时间)决定,即

$$t = d / V, \quad (3)$$

$d$  取声光偏转器通光孔径和光束直径两者中的较小者。

声光偏转器的衍射机制决定了声光偏转器的偏转光存在一定的发散角,限制了整个扫描范围内可分辨的扫描方向的个数。由衍射效应导致的偏转光的发散角可近似表示为<sup>[7]</sup>:  $\Delta\theta_d = \lambda / d$ 。则可分辨的扫描方向的个数(静态扫描<sup>[13]</sup> 情况下的可分辨点数)为

$$N = \frac{\Delta\theta}{\Delta\theta_d} = \frac{d \Delta f}{V} = t \cdot \Delta f, \quad (4)$$

可分辨点数正好等于渡越时间与声波带宽的乘积,所以又称为时间带宽积<sup>[6]</sup>。

### 2.2 顺序扫描与随机扫描

声光偏转器扫描时,通过改变声波频率,在经过渡越时间( $\mu\text{s}$ 级)的延迟后光束即可确定地扫描到

指定的角度。声波频率的改变通过电子电路和压电换能器实现,其扫描定位的重复性和精度都非常高。与此相反,普通扫描镜等机械式扫描方法,因为受到机械惯性的影响,难以在很短的时间内稳定地定位于一个指定的扫描角度,因而只能采取逐行顺序扫描的方式,并不在特定的扫描位置停留。而声光偏转器扫描方式则可以通过改变  $x$  方向和  $y$  方向声光偏转器的声波频率快速地跳跃到扫描范围内的任一扫描点(图 2),即拥有对扫描范围内任意扫描点的随机寻访能力,因而称为随机扫描。多光子激发荧光显微技术应用于生物领域功能性研究中时,研究者往往只关注扫描图像中若干感兴趣区域的多光子荧光信号的快速(ms 量级)变化过程,随机扫描方式可以只对选定的感兴趣区域进行反复的快速高精度扫描,无需进行全场扫描,从而将系统的有效扫描速率提高到了 kHz 量级以上。

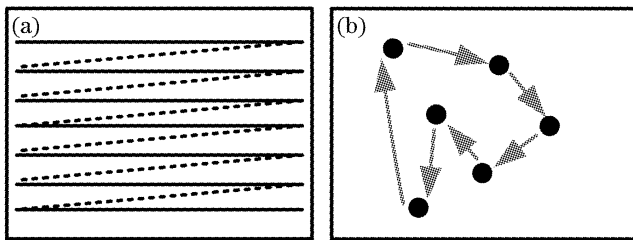


图 2 顺序扫描方式。(a)与随机扫描方式,(b)的对比  
Fig. 2 Scanning trajectory comparison of sequence scanning method (a) and random-access scanning method (b)

### 2.3 声光偏转器的色散及色散补偿

声光偏转器的偏转角依赖波长,而多光子激发荧光成像中激发光为高重复频率的超短脉冲光。脉冲宽度越小,则光谱越宽。超短脉冲光经过声光偏转器时不同光谱分量的偏转角度不同,使偏转光产生一定的发散。发散角为  $\Delta\theta_{\text{dispersion}} = \Delta\lambda f/V$ ,其中  $\Delta\lambda$  为光谱宽度,这即称为空间色散。空间色散会减少整个扫描范围内可分辨的扫描方向的数量,导致空间分辨力的降低。两个声光偏转器的共同作用,会使得偏转光沿与  $x$  成  $45^\circ$  左右的方向发散。偏转光的这种发散将导致得到的荧光图像产生倾斜方向的拉伸畸变<sup>[10]</sup>。另一方面,超短脉冲光中不同光谱分量在声光偏转器中传播速度的不同(群速度色散)会导致偏转光脉冲宽度的展宽,这就是声光偏转器对超短脉冲光的时间色散。脉冲展宽会降低多光子荧光的激发效率。

单棱镜补偿方法<sup>[10]</sup>通过在光路中加入一块补偿棱镜,使该棱镜的色散与两个声光偏转器大小相等而方向相反,可以使空间色散得到补偿。而补偿

棱镜与声光偏转器又构成了类似棱镜光栅对的脉冲压缩器结构,改变棱镜和声光偏转器之间的距离,可以对扫描光脉宽进行压缩,即实现时间色散补偿。

## 3 系统实现

### 3.1 光路设计

声光偏转器做为系统的核心,其时间分辨力和空间分辨力对系统的扫描速度和成像的空间分辨力有直接的影响,是最为重要的参量。声光偏转器的时间分辨力和空间分辨力分别由渡越时间[(3)式]和可分辨点数[(4)式]描述。从(4)式可以看出,两参量之间存在相互矛盾的关系,即提高时间分辨力(减小  $t$ )的同时必然会降低空间分辨力( $N$  减小),反过来也一样,必须折衷考虑。首先考虑时间分辨力的要求,以满足神经成像中快事件检测的需要。设想对 100 个扫描位点能够达到 1 kHz 的扫描速率,则要求声光偏转器的渡越时间小于  $10 \mu\text{s}$ 。选择 AA 公司的二维声光偏转器 AA. DTS. XY,晶体中声速为 650 m/s,有效通光孔径为 4.5 mm,渡越时间在  $7 \mu\text{s}$  左右。受声光偏转器所能实现的声波带宽的限制(36 MHz,中心频率 96 MHz),可分辨点数为 250。但考虑到系统的采样特性,在进行高分辨力成像时,可以进行过采样,图像大小将并不局限于  $250 \times 250$ 。

图 3 给出了简化的系统结构示意图。使用钛蓝宝石激光器(Mai Tai, Spectra-Physics)输出中心波长为 800 nm,带宽 10 nm 左右的超短脉冲光为多光子荧光的激发光。经过电光调制器(eom, Model 302, Conoptics)调节光强并经过扩束(以便充满声光偏转器的有效孔径充分利用声光偏转器的分辨能力)和准直之后导入棱镜和声光偏转器构成的色散补偿单元。扫描镜(Scan lens),筒镜(Tube lens)和物镜共同构成了一个显微成像系统。图 3 为简化示意图,实际系统中为了便于观察样品,使用正置显微镜(BX61WI, Olympus),筒镜内置于显微镜中。扫描镜和筒镜焦点重合,将声光偏转器偏转光的偏转起始位置成像到物镜的后焦面对样品进行扫描,同时也起扩束作用,使激发光能充分充满物镜;另一方面,扫描角则会因此而缩小,且缩小的倍数等于扩束比。假设声光偏转器引入的色散被完全补偿,则系统的横向分辨力主要由声光偏转器的可分辨点数  $N$  和所使用物镜的数值孔径  $NA$  共同决定。光路设计时,近似地,认为系统的分辨力取决于两者中影响较大者。对于双光子荧光物镜决定的分辨力(照

明点扩展函数平方的半峰全宽值)由(5)式决定<sup>[3]</sup>:

$$\Delta l_{\text{obj}} = 2 \sqrt{\ln 2} \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2NA^{0.91}}}, \quad NA > 0.7 \quad (5)$$

如果不考虑声光偏转器之后的光学元件的衍射效应,则物平面内可分辨的相邻扫描点的间隔由偏转光的发散角  $\Delta\theta_d$ ,物镜焦距  $f_{\text{obj}}$ 和扫描镜和管镜对光束的扩束比  $A$  决定:

$$\Delta l_{\text{aod}} = \Delta\theta_d \times f_{\text{obj}}/A, \quad (6)$$

选择  $A$  的大小,当  $\Delta l_{\text{aod}} < \Delta l_{\text{obj}}$ ,且声光偏转器引入

的色散得到满意的补偿时,可以接近显微成像系统所能提供的最高空间分辨力。做为演示,系统中物镜使用  $60\times$ ,  $NA = 1.42$  的油镜,为了满足  $\Delta l_{\text{aod}} < \Delta l_{\text{obj}}$  的关系,扩束比  $A$  应大于 2.5,实际系统中将  $A$  设置为 3 左右,能同时完全满足对扩束的要求(过充满物镜孔径)。物镜收集到的荧光经过二向色镜 (DM) (675DCSP, chroma) 和一块红外截止片 (BG39) 为光电倍增管所探测。

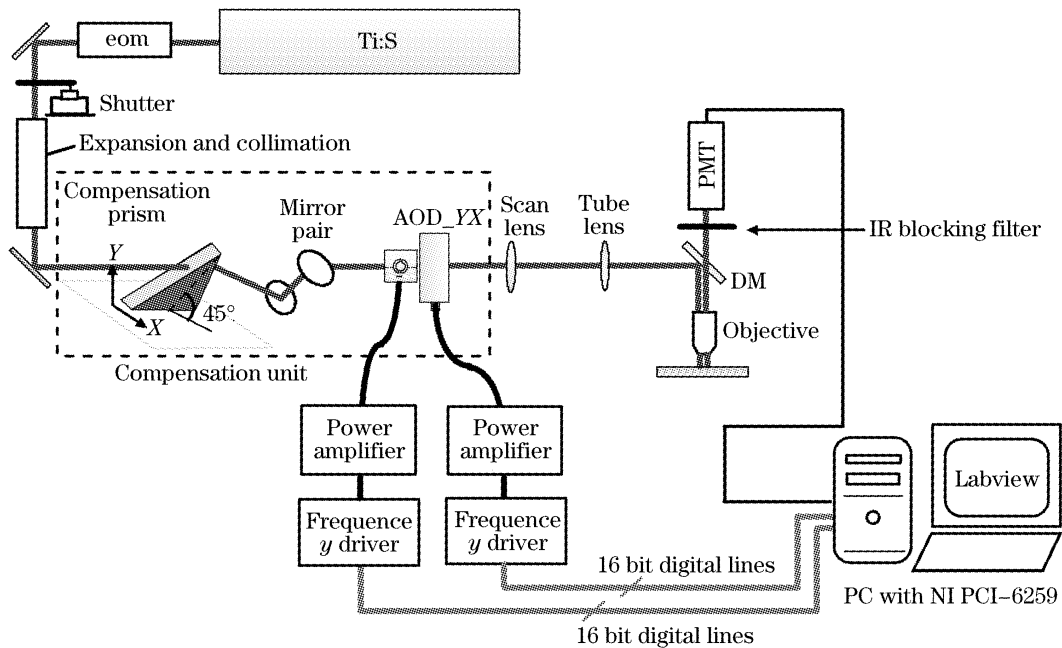


图 3 随机扫描多光子荧光显微系统示意图

Fig. 3 Schematic of the random-access scanning multiphoton fluorescence microscope system

### 3.2 色散补偿单元

补偿棱镜与  $x$  方向成  $45^\circ$  倾斜放置,棱镜的出射光经过两个反射镜水平出射。为了满足对空间色散量的要求,使用的棱镜材料为高色散的 ZF4 (SF10) 玻璃,棱镜顶角为  $60^\circ$ 。改变棱镜入射角可以调节棱镜空间色散补偿量的大小,可以计算得到当棱镜的入射角为  $47^\circ$  时,正好可以满足两个声光偏转器(均工作于中心频率)空间色散补偿量的要求,调节放置棱镜的旋转台对入射角进行设置。改变棱镜和声光偏转器之间的距离并用自相关仪 (Model 409, Spectra-Physics) 测量扫描光的脉宽,当棱镜和声光偏转器之间的光程为 35 cm 时,脉宽最短(中心频率下 140 fs 左右,不使用棱镜时为 570 fs 左右;激光器输出光的脉宽为 90 fs 左右)。

### 3.3 声光偏转器的扫描控制

声光偏转器扫描单元由频率源,功率放大器和声光偏转器晶体和换能器组成。频率源采用直接数字合成技术用于输出指定频率的正弦信号,输出的

正弦信号的频率由 15 位数字信号控制。频率源输出经两个功率放大器驱动声光偏转器晶体上的压电换能器产生在晶体内传播的相同频率的声波。单独对频率源和功率放大器进行测试,正弦信号产生相对于控制信号发出的时间延迟小于 100 ns,可以忽略不计。声光偏转器的渡越时间为  $7 \mu\text{s}$ ,考虑信号采集所需时间和对系统时间分辨力的要求,将单个像素的扫描时间(像素时间)定为  $10 \mu\text{s}$ 。这个时间比扫描镜扫描的像素时间 ( $1 \mu\text{s}$  或更短) 要长。但是与声光偏转器的随机扫描能力相结合,则能以更高的速度得到感兴趣区域的荧光信号的变化,且因为荧光信号收集时间更长而可以获得更高的信噪比。

选用 National Instruments 公司的 PCI-6259 多功能数据采集卡进行扫描控制和 PMT 信号采集。系统软件使用 LabVIEW 编写,实现全场扫描多光子荧光图像的获取,感兴趣区域的选取和感兴趣区域荧光信号的采集和实时显示。

## 4 实验与讨论

为了对系统的空间分辨力进行测量,以 170 nm 荧光小球 (PS-Speck, Molecule Probes) 为样品,使用  $z$  轴压电扫描器 (P-721, PI) 按  $0.1 \mu\text{m}$  步距移动物镜,获取不同聚焦面的荧光小球 AOD 扫描图像。每一聚焦面获取 10 帧图像进行图像平均以提高信噪比,结果如图 4 所示。从图 4(c)和图 4(d)得到系统的横向分辨力为  $0.3 \mu\text{m}$  左右,纵向分辨力为  $1.3 \mu\text{m}$  左右。理论计算结果<sup>[2]</sup>横向分辨力[(5)式]

为  $0.22 \mu\text{m}$ ,纵向分辨力为  $0.51 \mu\text{m}$ 。在商品化多光子荧光显微镜(基于扫描镜进行扫描, FV1000, Olympus)对相同的 170 nm 荧光小球得到的横向分辨力和纵向分辨力分别为  $0.3 \mu\text{m}$  和  $0.8 \mu\text{m}$  左右。可见系统具有较好的空间分辨力,其中横向分辨力较好,而纵向分辨力略差。纵向分辨力的差距可能与衍射效应引起的激发光中不同波长成分发散角的差异以及光路导入部分使用的普通透镜的色差相关。

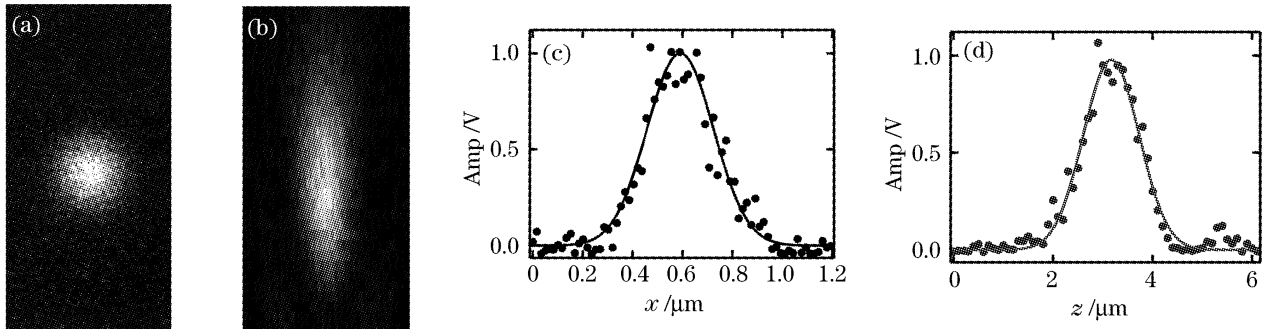


图 4 170 nm 荧光小球中心层面多光子荧光图像(a);多光子荧光图像纵向截面(b);横向荧光强度分布(c), 纵向荧光强度分布(d)

Fig. 4 Multiphoton fluorescence image (a), axial view (b), lateral fluorescence intensity distribution (c), axial fluorescence intensity distribution (d) of a 170 nm fluorescent bead

图 5 为随机扫描系统和商品化多光子荧光显微镜(FV1000, Olympus)对同一个荧光标记细胞的成像结果(两者通过一个切换光路共享同一台激光器)。实验中保证样品处功率基本一致(1.5 mW 左右),像素时间基本一致(随机扫描系统为  $3 \mu\text{s}$ , FV1000 为  $4 \mu\text{s}$ ),并通过加入发射滤片使随机扫描系统与 FV1000 有相近的荧光探测光谱范围(500~550 nm)。因为 FV1000 系统的原因,以共聚焦方式使用内部 PMT 收集荧光信号,将共焦针孔设置为最大位置( $800 \mu\text{m}$ ),但这种方式会造成荧光收集效

率一定程度的降低。因为探测方式以及使用的 PMT 不同,对成像结果的比较不是基于完全一致的条件。但按上述设置,根据实验结果判断,随机扫描系统收集到的荧光信号略强,这也可以从图 5 中图像信噪比的表现看出。需要注意的是 FV1000 因为使用共聚焦方式探测而使其荧光收集效率降低,但这样的实验结果至少表明随机扫描系统多光子荧光收集效率可以达到比较高的水平。从图 5(a)中也可以看到图像左上角信号很弱。这是由声光偏转器边缘频率(对应扫描场边缘位置)较低的衍射效率引起的,这对于扫描荧光成像有一定的影响,但可以通过根据声光晶体衍射效率的分布进行校正;而进行感兴趣区的随机扫描时,因为关注的是同一位置信号随时间的变化,则这种影响并不太大,而这种扫描模式也正是随机扫描系统的优势所在。

随机扫描多光子荧光显微系统相比于传统扫描镜扫描方式的多光子荧光显微系统,其像素时间受声光偏转器渡越时间的影响其实并不高( $10 \mu\text{s}$ , 传统扫描显微镜可以达到  $2 \mu\text{s}$  或更短),如果进行全场扫描成像时在速度上并不具有优势,但其随机寻访能力,使得在获取特定区域的荧光信号时能够提供高得多的有效扫描速度。而上面的实验结果说明随机扫描系统在空间分辨力方面也可以达到传统方

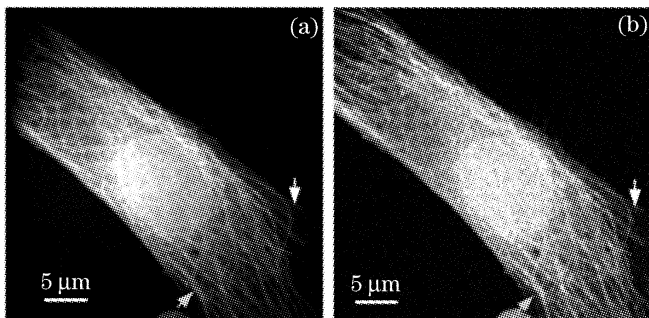


图 5 荧光标记细胞多光子荧光图像。(a)随机扫描系统成像结果;(b)商品化系统(FV1000,Olympus)成像结果  
Fig. 5 Multiphoton fluorescence image of a fluorophore-labelled cell, acquired by using the random-access scanning system (a) and commercial system (FV1000, Olympus) (b)

式的水平,这对于将随机扫描系统应用于一些细微功能结构(如树突棘)的研究是非常重要的保证。

## 5 结 论

基于二维声光偏转器实现了随机扫描多光子激发荧光显微成像系统。该系统能够对感兴趣区域以  $10 \mu\text{s}/\text{pixel}$  的速度进行快速随机扫描。实验结果表明当扫描范围比较小时(通过扫描镜和管镜的作用),该系统能够达到很高的横向分辨力和较好的纵向分辨力。并且与基于扫描镜扫描的商品化系统相比,其荧光收集和成像的能力也较为满意。

## 参 考 文 献

- 1 Wang Jie, Tang Zhilie, Xu Xianfeng. Application of two-photon excitation in three-dimensional imaging and storage[J]. *Optical Technique*, 2002, **28**(4): 296~301 (in Chinese)  
汪 洁,唐志列,徐险峰. 双光子技术在三维成像和三维存储技术中的应用[J]. *光学技术*, 2002, **28**(4): 296~301
- 2 Fu Ling, Luo Qinming, Lu Qiang *et al.*. Effect of scattering and absorption properties of biological tissue on two-photon excitation and confocal imaging depth[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2001, **30**(3): 262~266 (in Chinese)  
傅 玲,骆清铭,鲁 强 等. 生物样品的散射和吸收特性对双光子激发和共焦成像深度的影响[J]. *光子学报*, 2001, **30**(3): 262~266
- 3 Warren R. Zipfel, Rebecca M. Williams, Watt W. Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**(11): 1369~1377
- 4 Winfried Denk, Karel Svoboda. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick[J]. *Neuron*, 1997, **18**(3): 351~357
- 5 James D. Lechleiter, Da-Ting Lin, Ilse Sieneart. Multi-photon laser scanning microscopy using an acoustic optical deflector[J]. *Biophys. J.*, 2002, **83**(4): 2292~2299
- 6 Robert D. Roorda, Tobias M. Hohl, Ricardo Toledo-Crow *et al.*. Video-rate nonlinear microscopy of neuronal membrane dynamics with genetically encoded probes[J]. *J. Neurophysiol.*, 2004, **92**(1): 609~621
- 7 A. Bullen, S. S. Patel, P. Saggau. High-speed, random-access fluorescence microscopy: I. High-resolution optical recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators[J]. *Biophys. J.*, 1997, **73**(1): 477~491
- 8 Vijay Iyer, Bradley E. Losavio, Peter Saggau. Compensation of spatial and temporal dispersion for acousto-optic multiphoton laser-scanning microscopy[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2003, **8**(3): 460~471
- 9 Vijay Iyer, Tycho M. Hoogland, Peter Saggau. Fast functional imaging of single neurons using random-access multiphoton (RAMP) microscopy [J]. *J. Neurophysiol.*, 2006, **95**(1): 535~545
- 10 Shaoqun Zeng, Xiaohua Lv, Chen Zhan *et al.*. Simultaneous compensation for spatial and temporal dispersion of acousto-optical deflectors for two-dimensional scanning with a single prism[J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(8): 1091~1093
- 11 Xiaohua Lv, Chen Zhan, Shaoqun Zeng *et al.*. Construction of multiphoton laser scanning microscope based on dual-axis acousto-optic deflector[J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 2006, **77**(4): 046101-1~046101-4
- 12 Roger Y. Tsien, Brian J. Bacskai. *Video-Rate Confocal Microscopy. Handbook of Biological Confocal Microscopy* [M]. ed. J. B. Pawley. New York: Plenum Press, 1995
- 13 Wen Tao, Wei Jibo, Ma Dongtang *et al.*. A novel method of increase acousto-optic deflector spatial resolution[J]. *Chin. J. Lasers*, 2005, **32**(12): 1631~1635 (in Chinese)  
温 涛,魏急波,马东堂 等. 提高声光偏转器空间分辨率的方法研究[J]. *中国激光*, 2005, **32**(12): 1631~1635