

光学学报

基于双螺旋点扩展函数工程的三维多焦点双光子激光扫描显微技术

任苏霞¹, 张晨爽¹, 曹慧群², 林丹樱¹, 于斌^{1*}, 屈军乐¹

¹深圳大学物理与光电工程学院, 光电子器件与系统教育部/广东省重点实验室, 广东 深圳 518060;

²深圳大学化学与环境工程学院, 广东 深圳 518060

摘要 为了进一步提高成像速度和分辨率,提出了基于双螺旋点扩展函数(DH-PSF)工程的多焦点双光子激光扫描显微成像方法和系统(DH-MTPLSM)。在激发光路中,通过高速相位型空间光调制器(SLM)同时实现了三维多焦点阵列的产生和在样品面上的高精度并行数字寻址扫描;在探测光路中,通过双螺旋相位片将系统探测 PSF 调制为 DH-PSF,从而提供样品的轴向信息,减少轴向扫描层数,进而提高三维成像速度;结合基于 DH-PSF 的数字重聚焦算法,恢复出不同深度样本的宽场图像,通过单次二维扫描获得样品的三维光切片信息。在此基础上,利用搭建的 DH-MTPLSM 系统开展了小鼠肾组织切片的双光子成像实验,验证了该方法的快速三维高分辨成像能力,这对于 MTPLSM 的发展具有重要的意义。

关键词 成像系统; 荧光显微; 多焦点双光子激光扫描显微; 双螺旋点扩展函数; 数字重聚焦; 空间光调制器

中图分类号 TH742

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS202242.1411001

Three-Dimensional Multifocal Two-Photon Laser Scanning Microscopy Based on Double-Helix Point Spread Function Engineering

Ren Suxia¹, Zhang Chenshuang¹, Cao Huiqun², Lin Danying¹, Yu Bin^{1*}, Qu Junle¹

¹College of Physics and Optoelectronic Engineering, Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China;

²College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

Abstract We present a method and a system of multifocal two-photon laser scanning microscopy (MTPLSM) based on double-helix point spread function (DH-PSF) engineering (DH-MTPLSM) to improve the imaging speed and resolution. In the excitation light path, a high-speed phase-only spatial light modulator (SLM) is employed to generate three-dimensional (3D) multifocal arrays and implement high-precision parallel digital addressing scanning of the sample surfaces. In the detection light path, a double-helix phase plate is inserted to modulate the system detection PSF to DH-PSF, which provides axial information of the sample. The aim is to reduce the number of layers scanned axially and ultimately enhance the speed of 3D imaging. Moreover, with a DH-PSF-based digital refocusing algorithm, we reconstruct the wide-field images of the sample at different depths and obtain the 3D optical sections of the sample by single 2D scanning. On this basis, we build a DH-MTPLSM system, carry out two-photon imaging experiments on mouse kidney sections with this system, and verify the ability of the proposed method in fast 3D high-resolution imaging, which is of great significance for the development of MTPLSM.

Key words imaging systems; fluorescence microscopy; multifocal two-photon laser scanning microscopy; double-helix point spread function; digital refocusing; spatial light modulator

收稿日期: 2021-11-26; 修回日期: 2021-12-06; 录用日期: 2022-01-29

基金项目: 国家自然科学基金(61975131, 62175166, 61835009, 61775144)、深圳市基础研究项目(JCYJ20200109105411133)

通信作者: *yubin@szu.edu.cn

1 引言

双光子激光扫描显微术(TPLSM)利用双光子非线性吸收,将荧光激发限制在激发焦点区域,具有空间分辨率高、光学层析能力强、光损伤小、成像深度大、信噪比高等优点,已成为生命科学、生物医学等研究领域的重要工具之一^[1-2],可实现活体生物样品三维结构的可视化,对于揭示它们的精细结构动力学和功能至关重要。然而,在传统的TPLSM中:二维光切片图像是通过振镜对样品进行逐点扫描获得的,激光能量利用率低,成像速度慢;三维图像则是由通过移动物镜或样品台来获取样品不同深度处的二维光切片图像序列来构建的,这进一步限制了该技术的三维成像速度,其中移动样品台的方式还会对生物样品产生一定干扰,降低图像质量。其中,针对单点扫描速度慢的问题,研究人员提出了多焦点双光子激光扫描显微术(MTPLSM)^[3-11],通过多焦点并行激发和探测,大大提高了采集速度和激光光能利用率,实现生物样品的三维快速双光子激发荧光显微成像。目前,为了能够获得高效的多焦点双光子激发,MTPLSM系统主要利用光分束器^[12]、微透镜阵列^[6,13]、衍射光学元件^[14]、相位型空间光调制器(SLM)^[15]等器件产生多焦点阵列,再利用扫描振镜来实现该点阵在样品中的横向二维扫描和双光子激发,系统通常较为复杂且容易受到扫描装置机械惯性的影响,灵活性较差。为此,Yu等^[16]提出了一种不受机械惯性制约的基于高速相位型SLM的双光子多焦点结构光照明超分辨显微(2P-MSIM)系统,实现了三维超分辨双光子数字扫描显微成像,而且灵活性较高。

然而,上述方法虽然大幅提升了TPLSM的二维光切片图像获取速度,但在进行三维成像时仍需要大量的轴向逐层扫描,成像速度受到物镜或样品台扫描装置的限制,仍需要发展新的技术,以进一步提升MTPLSM的三维成像速度。点扩展函数工程是提高TPLSM成像速度的另外一个策略。在基于点扩展函数工程的TPLSM^[1]中,利用无衍射光束如贝塞尔光束、艾里光束等作为激发光,将三维荧光图像投射到二维,可实现双光子体成像,大大提高成像速度,但该方法牺牲了轴向分辨率,只适用于稀疏标记的生物样品。基于点扩展函数工程的数字重聚焦扫描显微(RESCH)技术^[17],通过在激光扫描显微镜探测光路中引入双螺旋点扩展函数(DH-PSF)相位片,将系统探测点扩展函数转换成双螺旋的形式,实现深度信息编码,结合虚拟针孔处理,可从单次二维扫描采集的图像数据中同时获得轴向400 nm范围内的多层光切片图像信息。因此,如能将RESCH中的这种探测方案和数据处理方法应用到MTPLSM中,就可以大幅减少三维成像时的轴向扫描层数,提升激光扫描显微镜的三维成像速度。

本文在课题组前期发展的基于高速相位型SLM的MTPLSM技术^[16]基础上,发展了一种基于

DH-PSF工程的MTPLSM(DH-MTPLSM)技术。一方面,该技术结合RESCH的思路,通过在探测光路引入DH-PSF相位片将系统的探测PSF调制为双螺旋形状用于对轴向信息进行编码,并利用RESCH重构算法,从单次扫描采集的双光子荧光图像数据中重建出样品不同深度的光切片图像;另一方面,在激发光路中利用高速SLM产生的轴向双层多焦点阵列对样品进行三维双光子并行激发和快速数字扫描,以增大激发焦深和扫描速度,进一步增加单次扫描成像可获取的光切片图像数量,从而大幅提高MTPLSM的三维成像速度并减少对样品的光损伤。利用搭建的DH-MTPLSM系统,完成了对小鼠肾切片的单次二维扫描多焦点双光子荧光显微成像实验,所得结果具有较好的成像效果,验证了该方法的三维快速成像能力。

2 DH-MTPLSM的原理与系统

2.1 DH-MTPLSM的成像原理

DH-MTPLSM的成像原理涉及双光子激光荧光、DH-PSF工程、扫描成像和虚拟共焦,因此每个扫描点位置 r_s 处的荧光信号强度 $I_m(r_s)$ 可表示为

$$I_m(r_s) = \iint \rho(r') h_{\text{ex}}^2(r_s - r') h_{\text{em}}(r_s - r' - r) P_m(r) dr' dr, \quad (1)$$

式中: r 和 r' 分别为样品面和探测面坐标; ρ 为样品荧光发射密度; h_{ex}^2 为系统的双光子激发强度点扩展函数; m 代表不同的轴向位置; h_{em} 为系统发射(探测)强度点扩展函数,此处为双螺旋的形状; P_m 为与 h_{em} 相对应的虚拟针孔大小。 $I_m(r_s)$ 的表达式可以进一步简化为

$$I_m(r_s) = \int \rho(r') h_m(r_s - r') dr', \quad (2)$$

其中 h_m 的定义为

$$h_m(r_s) = \int P_m(r) h_{\text{em}}(r_s - r) h_{\text{ex}}^2(r_s) dr = \left[P_m(r_s) * h_{\text{ex}}^2(r_s) \right] h_{\text{em}}(r_s), \quad (3)$$

式中: $*$ 代表卷积。

对于无限小的针孔, h_m 变为 $h_{\text{ex}}^2 h_{\text{em}}$,即传统TPLSM系统的PSF。

由于探测光路双螺旋相位片的调制, h_{em} 变成了如图1(a)所示的DH-PSF,DH-PSF随着轴向位置 z 的变化会发生旋转,且旋转角度 θ 与 z 呈线性关系,如图1(b)所示。于是,式(3)中 h_{em} 的三维强度分布在直角坐标系下可以表示为

$$h_{\text{em}}(x, y, z) = \text{rotate} \left[g \left(x + \frac{\Delta x}{2}, y \right) + g \left(x - \frac{\Delta x}{2}, y \right), kz \right], \quad (4)$$

式中: $\text{rotate}(h, \theta)$ 表示对 h 进行逆时针旋转 θ 的变换,令 $h = g \left(x + \frac{\Delta x}{2}, y \right) + g \left(x - \frac{\Delta x}{2}, y \right)$, $\theta = kz$; Δx 为DH-PSF中两个旁瓣中心点的间距; k 为DH-PSF中两旁瓣连线旋转角度 θ 与样品轴向离焦量 z 之间的比例

系数; g 表示 DH-PSF 中单个旁瓣的强度分布函数, 在显微系统中, 通常可以用二维高斯函数来近似, 即

$$g(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma_x\sigma_y} \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma_x^2} - \frac{y^2}{2\sigma_y^2}\right), \quad (5)$$

式中: σ_x 、 σ_y 分别为高斯函数在 x 、 y 方向的标准差。

因此, DH-MTPLSM 采用的虚拟针孔大小 P_m 应为对应 DH-PSF 两个旁瓣的一对小孔大小。通过选择对应某个轴向深度 z_m 的特定旋向的 P_m , 对每个焦点处

的荧光图像进行虚拟合成针孔滤波、求和, 即数字重聚焦处理, 得到作为该轴向深度 z_m 处对应横向扫描位置 r_s 的信号强度值 $I_m(r_s)$ 。通过对所有焦点执行同样的操作, 可得到轴向深度 z_m 处的光切片图像, 从而重构出三维图像。

当 DH-MTPLSM 进行三维成像时, 相比于单层点阵激发, 利用双层点阵可以进一步增大样品的轴向激发范围, 其与 DH-PSF 的轴向探测范围相匹配。

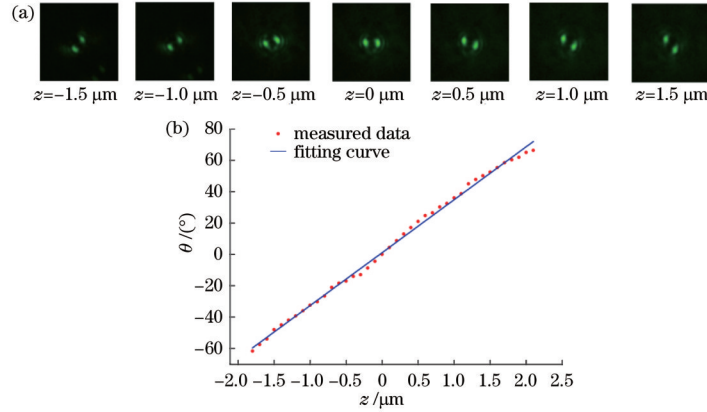


图 1 不同轴向深度 z 处的双光子 DH-PSF 图像, 以及旋转角度 θ 与 z 的线性关系。(a) 不同轴向深度 z 处的双光子 DH-PSF 图像; (b) 旋转角度 θ 与 z 的线性关系

Fig. 1 Two-photon DH-PSF image at different depth z , and linear relationship between rotation angle θ and z . (a) Two-photon DH-PSF image at different depth z ; (b) linear relationship between rotation angle θ and z

2.2 DH-MTPLSM 的光路设计

所搭建的 DH-MTPLSM 系统示意图如图 2 所示。首先, 波长为 1036 nm、功率为 1 W、脉宽为 145 fs 的光纤激光器 (Femto YL-6, 安扬) 发出的准直激光束经过半波片 WP1 和偏振分光棱镜 PBS, 激光功率被调节。随后, 激光束通过半波片 WP2, 用于调整激光束的偏振方向, 再通过由透镜 L1 (焦距 $f_1 = 25$ mm) 和 L2 (焦距 $f_2 = 80$ mm) 组成的 $4f$ 扩束系统, 照射到高速相位型 SLM (频率为 845 Hz, 像素数为 1920×1152 , 像素尺寸为 $9.2 \mu\text{m} \times 9.2 \mu\text{m}$, Meadowlark Optics, 美国) 的

光学窗口上。通过在 SLM 上加载一系列特定的计算全息 (CGH) 相位图, 即可在其谱平面 (与样品面共轭) 上产生多个聚焦点阵列并进行扫描。经 SLM 相位调制后的光束经过由透镜 L3 (焦距 $f_3 = 300$ mm)、L4 (焦距 $f_4 = 300$ mm) 和可调光阑组成的 $4f$ 系统进行空间滤波, 只保留 +1 级衍射光。滤波后的光束经反射镜 M1、双色镜 DM 和显微物镜 (水浸, 放大倍数为 60, NA 为 1.27, Nikon, 日本) 照射到样品上, 其中物镜后焦面应与 SLM 光学面共轭。样品发出的荧光经同一物镜收集后由双色镜 DM 反射并由管镜 TL

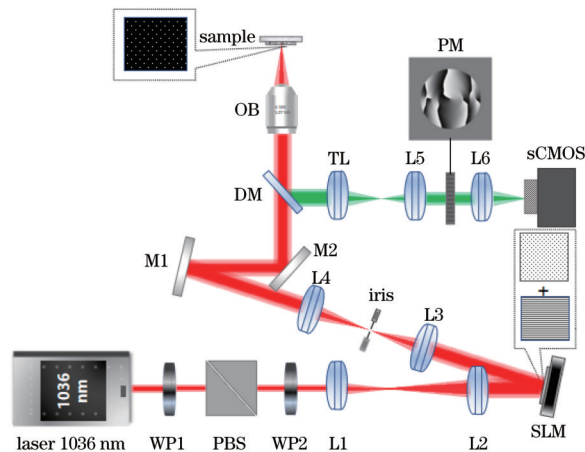


图 2 DH-MTPLSM 系统的光路示意图

Fig. 2 Schematic diagram of DH-MTPLSM system

(焦距 $f_{TL} = 200$ mm) 进行成像。为了对探测 PSF 进行双螺旋调制, 荧光信号再次经过由透镜 L5 ($f_5 = 125$ mm)、L6 ($f_6 = 125$ mm) 和 DH-PSF 相位片 PM 组成的 $4f$ 空间滤波系统, 产生的双螺旋阵列由高灵敏 sCMOS 相机 (ORCA-Flash4.0 v3, 滨松, 日本) 采集。

2.3 三维点阵的产生和扫描相位图设计

与传统 MTPLSM 系统不同的是, 在 DH-MTPLSM 系统中, 为了与 DH-PSF 的探测深度相匹配、进一步增大轴向采样间距、提高成像速度, 需要增大激发点阵的焦深, 因此, 本文通过设计特定的 CGH 相位图, 利用高速相位型 SLM 对入射光束进行调制, 生成双层多焦点激发点阵并进行二维数字扫描。

目前, 多焦点阵 CGH 的设计算法主要有 GS (Gale-Shapley) 算法^[18]、广义自适应加法算法 (GAA)^[19]、直接搜寻算法^[20], 以及改进的全基因组测序 (WGS) 算法^[21-24] 等。本文采用改进的 WGS 算法设计 CGH, 其产生的点阵具有均匀性好、衍射效率高和

收敛速度快等优势。双层多焦点扫描的 CGH 的设计步骤如下: 1) 根据拟生成的双层多焦点阵列, 利用改进的 WGS 算法生成相位图; 2) 依据合适的扫描步长生成线性相位光栅, 以实现点阵在频谱面上的平移, 用于数字扫描成像; 3) 将双层点阵相位图与线性相位光栅相位图相加, 生成最终的复合相位图。考虑到双光子激发时聚焦点的焦深范围以及 DH-PSF 的探测深度, 将双层点阵的轴向间隔设置为 $1 \mu\text{m}$, 即离焦面的距离分别为 $\pm 0.5 \mu\text{m}$; 考虑到点阵之间的相互串扰, 两层点阵按列交错排列, 横向相隔 $3.256 \mu\text{m}$, 每层点阵数量为 7×4 。实际设计的双层点阵的 CGH 相位图如图 3(a) 所示。图 3(b) 为采用该点阵激发均匀伊红溶液时直接采集的双光子激发荧光图像, 可以看到由于相邻两列激发深度不同, 得到的荧光光斑大小不一样。在探测光路上加入 DH-PSF 相位片后的成像结果如图 3(c) 所示, 可以看到不同深度的激发点阵对应不同旋向的双螺旋点阵图像。

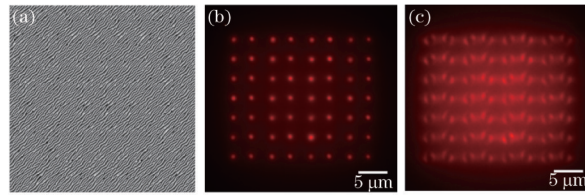


图 3 双层点阵的 CGH 相位图、均匀伊红染料的传统双光子荧光点阵图像和双螺旋荧光点阵图像。(a) 双层点阵的 CGH 相位图; (b) 均匀伊红染料的传统双光子荧光点阵图像; (c) 双螺旋荧光点阵图像

Fig. 3 CGH phase pattern for two-layer multifocal array, conventional two-photon excitation fluorescence image of multifocal array in solution of eosin dye, and DH-PSF image of same array. (a) CGH phase pattern for two-layer multifocal array; (b) conventional two-photon excitation fluorescence image of multifocal array in solution of eosin dye; (c) DH-PSF image of same array

2.4 DH-MTPLSM 的图像重构过程

与 RESCH 技术类似, 基于不同旋向虚拟针孔的数字重聚焦算法可对 DH-MTPLSM 采集的图像进行重构, 获取轴向不同位置的光切片图像。首先, 每个扫描点 (i, j) 处的荧光强度就是重构图像中对应位置像素 (i, j) 的灰度值 $I(i, j)$; 其次, 引入 DH-PSF 调制后, 不同轴向位置激发点的深度信息会发生对应角度的旋转, 在探测器上呈现多个 DH-PSF 图像的累加。基于上述特性, 考虑用不同旋向的虚拟数字针孔对不同样品层的信息进行滤波筛选, 最终重构出多个样品层的图像。图 4(a) 为原始图像。图像重构的具体步骤如下: 1) 标定基准点, 采用均匀溶液标定未经 DH-PSF 调制 (即不加 DH-PSF 相位片) 的扫描点阵位置, 作为系统扫描的基准点; 2) 利用基准点位置从单张实验图像数据 $M_k (n \geq k \geq 1, n$ 为扫描图像数量) 中获得所有 DH-PSF 对应的一系列子区域图像数据 S_1, S_2, \dots, S_l , 并根据扫描点的位置 (i, j) 构造一个子图像堆栈 $R_{i,j}(x, y)$, 其中 (x, y) 表示 DH-PSF 子区域图像坐标; 3) 通过降噪、形态学处理后, 对 $R_{i,j}(x, y)$ 中的子区域图像数据 S_l 进行双高斯拟合, 获取 DH-PSF 两个旁瓣的中心点坐标 $(x_1, y_1), (x_2, y_2)$; 4) 根据两个中心点坐标, 求出两点连线的中心点坐标及两点间的距离; 5) 根

据曲线关系 $\theta = kz$, 可以得到特定轴向位置 z 对应的数字针孔的旋转角度 θ , 再结合中心点坐标以及两点间距离, 得到不同角度下每个扫描点处对应的虚拟双高斯针孔大小 P_m , 如图 4(b) 所示; 6) 将 P_m 与子区域图像 S_l [即 $R_{i,j}(x, y)$] 相乘后, 对所有 (x, y) 进行求和, 可得到每个像素对应的灰度值 $I_m(i, j)$, 即

$$I_m(i, j) = \sum_{x, y} R_{i,j}(x, y) \cdot P_m(x, y); \quad (6)$$

7) 依次按照点阵的扫描顺序将每个像素点的灰度值 $I_m(i, j)$ 进行排列, 即可重构出对应特定轴向位置 z 处的虚拟共焦图像, 如图 4(c) 所示。

通过上述数字重聚焦过程, 可以从一幅二维扫描图像中重构出多幅对应不同轴向深度的光切片图像。

3 成像结果与讨论

3.1 成像分辨率标定

本文发展的 DH-MTPLSM 技术结合了 RESCH 方法, 因此具有一定的超分辨成像能力。为了标定 DH-MTPLSM 系统的成像分辨率, 采用直径为 100 nm 的荧光珠进行成像。首先, 用单层点阵激发, 分别采集放置在 DH-PSF 相位片前后荧光珠样本的荧光图像, 其中未经 DH-PSF 调制的图像用于标定基准

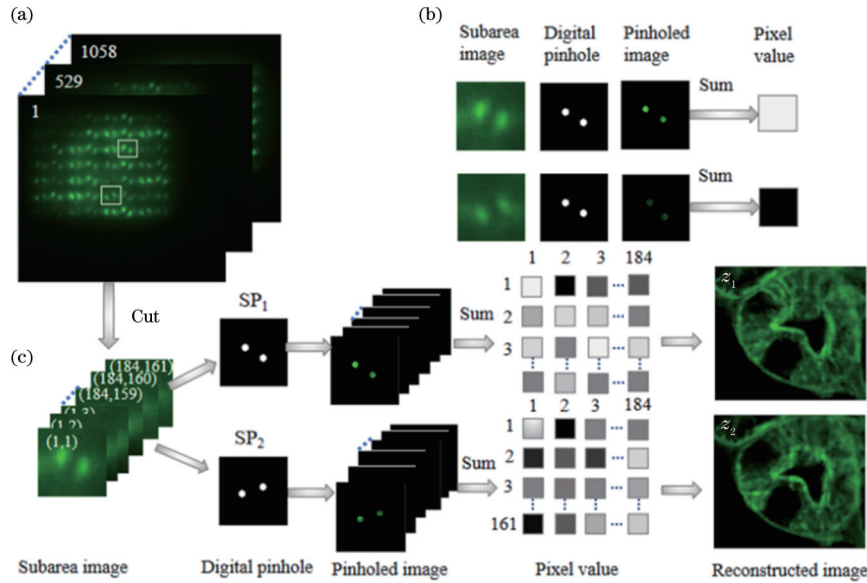


图 4 DH-MTPLSM 的数据处理方法示意图。(a)原始图像；(b)双高斯针孔滤波处理；(c)图像重构过程

Fig. 4 Data process for DH-MTPLSM. (a) Original images; (b) filtering with a pair of Gaussian pinholes; (c) image reconstruction process

点,利用上述数据处理算法对经 DH-PSF 调制的图像进行处理,获得重构图像,利用所得图像上荧光珠像斑强度截面曲线的半峰全宽(FWHM)作为其尺寸标定系统的分辨率。图 5(a)为单个荧光珠的宽场(WF)图像(由未经数字重聚焦处理的扫描图像直接叠加得到),图 5(b)为 DH-MTPLSM 重构图像,图 5(c)和图 5(d)分别为两种情况下荧光珠三维图像的 yz 投影图像;图 5(e)~(g)分别表示两种情况下荧光珠图像在

x, y, z 三个方向上的强度截面曲线。高斯拟合结果表明,宽场成像时,荧光珠像斑在 x, y, z 三个方向上的 FWHM 分别为 343 nm、356 nm 和 1083 nm,而经过 DH-MTPLSM 重构后的 FWHM 分别为 252 nm、270 nm 和 1059 nm,即相比 WF 成像,DH-MTPLSM 成像分别将分辨率提升了 1.36 倍(x 方向)、1.32 倍(y 方向)和 1.15(z 方向),这与传统 RESCH 技术是一致的。

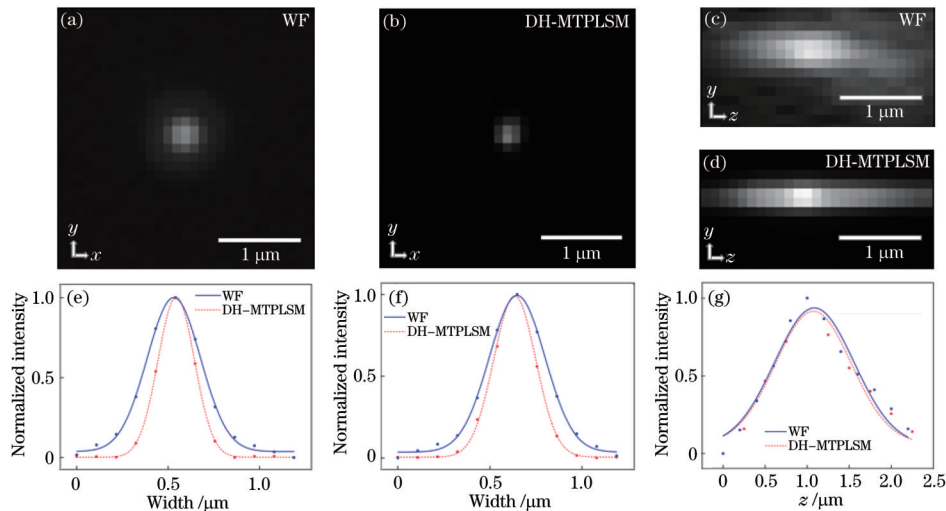


图 5 直径为 100 nm 的荧光珠图像。(a)宽场图像；(b) DH-MTPLSM 重构图像；(c)宽场图像的 yz 投影；(d) DH-MTPLSM 重构图像的 yz 投影；(e)~(g) x, y, z 方向上的强度截面曲线及其高斯拟合

Fig. 5 Images of fluorescent beads with diameter of 100 nm. (a) Wide field image; (b) DH-MTPLSM reconstruction image; (c) yz projection of wide field image; (d) yz projection of DH-MTPLSM reconstruction image; (e)~(g) intensity profiles in $x, y,$ and z directions, respectively, and their Gaussian fitting curves

3.2 小鼠肾切片三维成像

相比传统的 MTPLSM, DH-MTPLSM 的主要特点是可大幅提升三维成像速度。为了验证 DH-

MTPLSM 三维成像速度的提升,采用商用的小鼠肾切片进行成像实验。按照前面的设计,激发扫描点阵设置为双层点阵,每层点阵数量均为 7×4 。综合考虑

扫描速度与点阵串扰等因素,将点阵间隔设置为横向间隔 6500 nm,纵向间隔 3250 nm。系统扫描步长为 140 nm,因此一共需要产生 1058 幅 CGH 相位图来进行扫描,整幅图像的成像时间是 31.74 s,成像区域大小约为 $22.84 \mu\text{m} \times 22.84 \mu\text{m}$ 。

利用前述的数字重聚焦图像重构技术,采用不同旋转角度的数字针孔对采集到的 DH-PSF 编码数据进行重建,获得了轴向 $3.6 \mu\text{m}$ 深度范围内的多幅光切片图像,部分图像如图 6 所示。可以看到,相比于宽场图像,每幅光切片图像都显示了更多的细节信息,即图像分辨率和对比度都显著提高了。同时还可以看到,不同深度位置处重构出来的光切片图像各不相同,与不

具有层析能力的传统宽场图像相比显示出很强的光学层析能力。更重要的是,图 6 所示的所有光切片图像是通过单次二维扫描获得的。传统 MTPLSM 对样品进行三维成像时,需要利用物镜或位移台进行轴向扫描,考虑到轴向分辨率和采样定律,对 $3.6 \mu\text{m}$ 深度范围进行成像大致需要轴向扫描 15 次(轴向扫描间隔 250 nm),而采用本文发展的 DH-MTPLSM 则只需要扫描一次,相当于将成像采集时间缩短为原来的 1/15,三维成像速度得到大幅提高。与传统基于单点扫描的 TPLSM 相比,DH-MTPLSM 成像速度的提高就更加显著了。

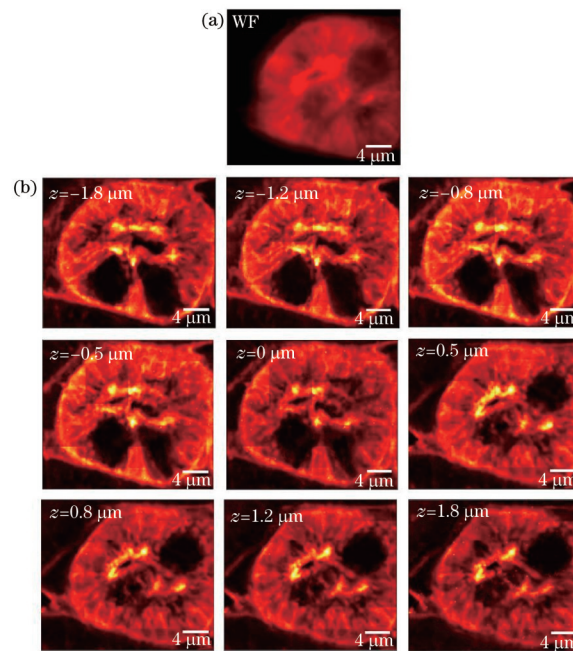


图 6 小鼠肾切片成像结果。(a)焦面处的宽场图像;(b)不同轴向深度处的重构图像

Fig. 6 Imaging results of mouse kidney section. (a) WF image at focal plane; (b) reconstructed images at different axial depths

4 结 论

提出和搭建了基于双螺旋点扩展函数工程的三维多焦点双光子扫描荧光显微成像系统,利用高速相位型空间光调制器生成双层多焦点激发点阵,提高了轴向激发范围,解决了激发焦深与双螺旋点扩展函数探测深度的失配问题,同时降低了系统的复杂性,提高了多焦点激发的灵活性和扫描速度;同时,将具有纳米尺度轴向定位特性的双螺旋点扩展函数工程引入多焦点双光子激光扫描显微技术中,可有效增大轴向探测范围。另外,通过后期的数字重聚焦图像重构算法,能够仅从单次二维扫描的双螺旋图像信息中重建出样品的多层光切片图像,增大了轴向扫描采样间隔,大幅缩短了三维成像的采集时间,提高了三维成像速度,同时也减少了样品的光漂白和光毒性,为进一步开展活体细胞和组织的快速高分辨双光子荧光成像提供了基础。

在本文工作的基础上,还可以结合图像扫描显微中的数字重聚焦技术或多视角解卷积技术^[25]来进一步

提高成像分辨率,实现基于 DH-MTPLSM 的超分辨成像。在对活体厚样品进行三维成像时,样品的散射以及生物样品折射率的不均匀导致的像差会限制 DH-MTPLSM 的成像深度和分辨率,因此还可以结合自适应光学技术^[26]对激发光路和探测光路的像差进行校正,以提高系统的整体性能。

参 考 文 献

- [1] Wu J, Ji N, Tsia K K. Speed scaling in multiphoton fluorescence microscopy[J]. Nature Photonics, 2021, 15(11): 800-812.
- [2] 林宏心,左宁,卓双木,等.多光子显微技术在医学诊断中的应用[J].中国激光,2018,45(2):0207014.
Lin H X, Zuo N, Zhuo S M, et al. Application of multiphoton microscopy in disease diagnosis[J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207014.
- [3] Bewersdorf J, Pick R, Hell S W. Multifocal multiphoton microscopy[J]. Optics Letters, 1998, 23(9): 655-657.
- [4] Jureller J E, Kim H Y, Scherer N F. Stochastic scanning

- multiphoton multifocal microscopy[J]. *Optics Express*, 2006, 14(8): 3406-3414.
- [5] Fittinghoff D N, Squier J A. Time-decorrelated multifocal array for multiphoton microscopy and micromachining[J]. *Optics Letters*, 2000, 25(16): 1213-1215.
- [6] Egner A, Andresen V, Hell S W. Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment[J]. *Journal of Microscopy*, 2002, 206(1): 24-32.
- [7] Fricke M, Nielsen T. Two-dimensional imaging without scanning by multifocal multiphoton microscopy[J]. *Applied Optics*, 2005, 44(15): 2984-2988.
- [8] Martini J, Andresen V, Anselmetti D. Scattering suppression and confocal detection in multifocal multiphoton microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(3): 034010.
- [9] Qu J L, Liu L X, Shao Y H, et al. Recent progress in multifocal multiphoton microscopy[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2012, 5(3): 12500186.
- [10] Winter P W, York A G, Nogare D D, et al. Two-photon instant structured illumination microscopy improves the depth penetration of super-resolution imaging in thick scattering samples[J]. *Optica*, 2014, 1(3): 181-191.
- [11] 张荣丽, 李慧, 吴岳恒, 等. 利用光谱和时间分辨的多光子显微技术识别人体冠状动脉粥样硬化斑块[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207025.
Zhang R L, Li H, Wu Y H, et al. Identification of human coronary atherosclerotic plaques using spectrum- and time-resolved multiphoton microscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207025.
- [12] Nielsen T, Fricke M, Hellweg D, et al. High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2001, 201(3): 368-376.
- [13] Straub M, Hell S W. Fluorescence lifetime three-dimensional microscopy with picosecond precision using a multifocal multiphoton microscope[J]. *Applied Physics Letters*, 1998, 73(13): 1769-1771.
- [14] Sacconi L, Froner E, Antolini R, et al. Multiphoton multifocal microscopy exploiting a diffractive optical element[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(20): 1918-1920.
- [15] Shao Y, Qin W, Liu H, et al. Multifocal multiphoton microscopy based on a spatial light modulator[J]. *Applied Physics B*, 2012, 107(3): 653-657.
- [16] Yu H H, Zhang C S, Lin D Y, et al. Two-photon multifocal structured light microscopy based on high-speed phase-type spatial light modulator[J]. *Acta Physica Sinica*, 2021, 70(9): 098701.
- [17] Jesacher A, Ritsch-Marte M, Piestun R. Three-dimensional information from two-dimensional scans: a scanning microscope with postacquisition refocusing capability[J]. *Optica*, 2015, 2(3): 210-213.
- [18] Sinclair G, Leach J, Jordan P, et al. Interactive application in holographic optical tweezers of a multi-plane Gerchberg-Saxton algorithm for three-dimensional light shaping[J]. *Optics Express*, 2004, 12(8): 1665-1670.
- [19] Curtis J E, Koss B A, Grier D G. Dynamic holographic optical tweezers[J]. *Optics Communications*, 2002, 207(1-6): 169-175.
- [20] Meister M, Winfield R J. Novel approaches to direct search algorithms for the design of diffractive optical elements[J]. *Optics Communications*, 2002, 203(1/2): 39-49.
- [21] Wu Y, Wang J, Chen C, et al. Adaptive weighted Gerchberg-Saxton algorithm for generation of phase-only hologram with artifacts suppression[J]. *Optics Express*, 2021, 29(2): 1412-1427.
- [22] di Leonardo R, Ianni F, Ruocco G. Computer generation of optimal holograms for optical trap arrays[J]. *Optics Express*, 2007, 15(4): 1913-1922.
- [23] Poland S P, Krstajić N, Knight R D, et al. Development of a doubly weighted Gerchberg-Saxton algorithm for use in multibeam imaging applications[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(8): 2431-2434.
- [24] Kim D, Keesling A, Omran A, et al. Large-scale uniform optical focus array generation with a phase spatial light modulator[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(12): 3178-3181.
- [25] Roeder C, Heintzmann R, Piestun R, et al. Deconvolution approach for 3D scanning microscopy with helical phase engineering[J]. *Optics Express*, 2016, 24(14): 15456-15467.
- [26] Ji N. Adaptive optical fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 374-380.