

用于小鼠脑皮层双光子成像的大视场弯曲视野 离轴三反系统设计

黄剑¹, 周镇乔^{2*}, 李敏², 贾宏博²

¹南京理工大学电子工程与光电技术学院, 江苏 南京 210094;

²中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163

摘要 为解决传统双光子显微镜进行脑皮层成像时, 存在的视场小和视野与脑轮廓曲率不匹配的问题, 提出了一种具有大视场弯曲视野的双光子显微物镜光学设计方案。所提方法根据赛德尔像差理论, 推导出了一组用于求解同轴三反初始结构的解。在同轴的基础上, 进一步优化为利用自由曲面的离轴三反成像系统。优化后系统的数值孔径达到了 0.15, 视野曲率半径达到了 6 mm, 视场角达到了 $9^\circ \times 18^\circ$, 视野大小达到了 3.5 mm, 系统光学性能良好。合理控制系统结构参数获得了无物理干涉下双物镜联合使用的设计方案, 这有利于进一步扩大成像视野。

关键词 光学设计; 大视场; 弯曲视野; 离轴三反; 脑皮层成像; 自由曲面

中图分类号 O439 **文献标志码** A

DOI: 10.3788/AOS221159

1 引言

哺乳动物大脑是高等动物最复杂的器官, 协调各种神经活动, 其中有上千亿个神经元。神经元与神经元之间通过神经回路连接, 并通过大量神经突触连接点形成大脑神经网络和脑功能环路^[1]。对哺乳动物大脑进行成像对于揭示脑功能和研究神经性疾病具有重大意义。双光子显微镜^[2-4]作为活体动物荧光显微镜的首选技术, 神经科学家已使用该技术测量了活体动物大脑深处的钙离子活动浓度^[5]、研究了活体小鼠大脑中神经元的可塑性^[6]和对神经退行性疾病模型进行了监测^[7]。

传统的双光子显微镜能够以亚细胞分辨率成像哺乳动物大脑神经元活动, 但它仅限于直径为 1 mm 的视场, 不能同时观察分布在多个大脑区域中的活动。目前, 大视场双光子显微成像系统的应用领域也越来越广泛, 主要包括哺乳动物的跨脑区或者全脑成像。大视场双光子图像最初是通过拼接小视场的双光子图像实现的^[8]。然而, 这种拼接实现的大视场方式面临着一些关键性的问题: 在图像拼接过程中可能会丢掉重要的边缘信息; 不适用于需要快速成像的应用。近年来, 通过优化系统各部分组件实现大视场双光子成像的方式逐渐成为主流。Bumstead 等^[9]提出了以阿贝

正弦条件为基础的理论分析方法, 在已选取了大视场物镜的情况下, 控制光学不变量分析系统中其余各组件的光学不变量尽可能接近物镜的光学不变量, 以尽可能优化成像系统的视场、分辨率等参数, 最终实现了在直径为 7 mm 的视野上的成像。Sofroniew 等^[10]使用自制物镜设计出了一款视场直径为 5 mm 的亚细胞分辨率大视场随机扫描双光子中视镜。双光子扫描显微成像系统的大视场往往对应着扫描过程中的大扫描角度, 而大扫描角度会使得光学系统产生较大的边缘像差。另外, 现有的绝大多数双光子显微镜都是在其视野是平面的基础上进行优化的。由于大脑的形状是不规则的, 形似曲面, 故显微镜的平面视场在进行哺乳动物大脑成像时会造成视野中心和视野边缘成像深度不均匀, 且随着成像视场的扩大, 该现象会越来越明显, 最终会影响成像质量。

基于此, 本文在同轴三反结构的基础上, 采用视场离轴方式并将像差校正能力更强和具有更多设计自由度的自由曲面应用于设计中, 设计了一种基于 xy 多项式的自由曲面大视场弯曲视野离轴三反光学系统。该系统的数值孔径 (NA) 可达到 0.15, 成像视野的曲率半径为 6 mm, 视场为 $9^\circ \times 18^\circ$, 物方视野可达到 3.5 mm。对系统结构参数进行合理选择可以实现无物理干涉条件下双物镜联合使用, 这可以进一步扩大

收稿日期: 2022-05-19; 修回日期: 2022-06-09; 录用日期: 2022-06-20; 网络首发日期: 2022-06-30

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(61705251)、中国科学院院级重大科研仪器研制项目(GJJSTD2019003)、中国科学院科研仪器设备研制项目(YJKYYQ20200052)、苏州市基础研究试点项目(SJC2021021)

通信作者: *zhouzq@sibet.ac.cn

成像视野范围。本工作为大视场弯曲视野双光子显微镜的设计提供了有价值的参考和技术依据。

2 光学系统设计

2.1 设计指标

为了获得小鼠大脑大视场清晰均匀图像,需要考虑到小鼠大脑轮廓曲率的问题。小鼠大脑的冠状截面如图 1 所示,图片源于 <https://alleninstitute.org>。视野曲率半径为 6 mm 时,系统可以较好地匹配小鼠大脑表面,左右脑中匹配视场大小为 3.5 mm。系统数值孔径为 0.15,分辨率可达到 3.74 μm ,满足对细胞胞体(直径为 10~20 μm)进行观察的要求。为了提高双光子成像深度,双光子的激发波长通常选取 920 nm。依据系统设计要求,光学系统的设计参数如表 1 所示。

2.2 初始结构

2.2.1 初始结构求解方法

离轴三反光学系统可以在同轴三反光学系统的基础上通过光阑离轴、视场离轴或者两者结合的方式优化后得到^[11]。离轴三反光学系统的初始结构可以在同轴三反系统推导的公式基础上进行计算。同轴三反系统结构示意图如图 2 所示,主要参数包括结构参数和轮廓尺寸参数: M_1 、 M_2 、 M_3 分别为系统的主镜、次镜、

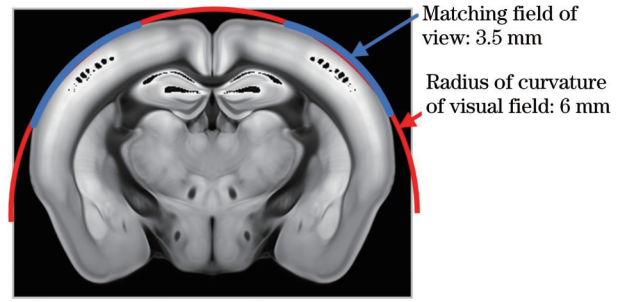


图 1 小鼠大脑截面结构图

Fig. 1 Cross-sectional structure of mouse brain

表 1 光学系统的设计参数

Table 1 Design parameters of optical system

Parameter	Value
Wavelength /nm	920
Field of view /[(°)×(°)]	9×18
Radius of curvature of visual field /mm	6
NA	0.15
Matching field of view /mm	3.5

三镜; h_1 、 h_2 、 h_3 为主镜、次镜、三镜的半直径; d_1 为主镜与次镜的间距; d_2 为次镜与三镜的间距; L_1 、 L_3 分别为系统的前工作距离和后工作距离; β_1 和 β_2 为系统的遮拦比。

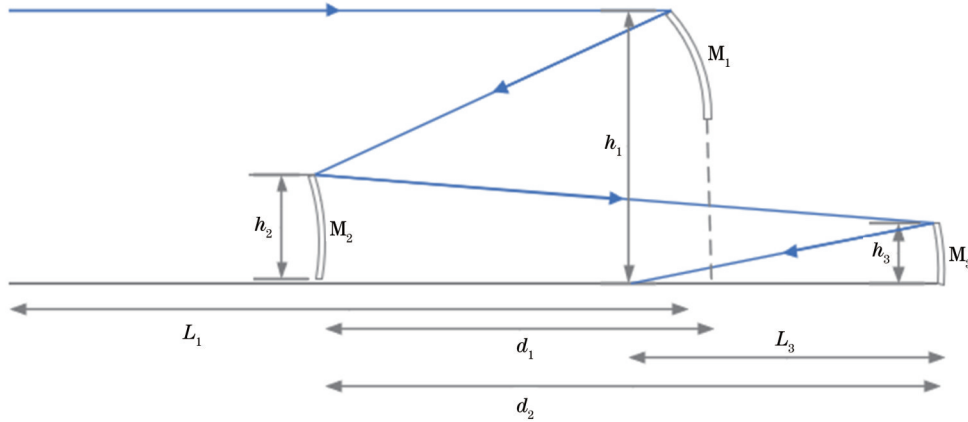


图 2 同轴三反结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of coaxial triple reverse structure

赛德尔像差理论在光学成像系统设计中有着重要的作用。在本工作中,赛德尔像差理论被进一步拓展

以获得一个具有特定曲率的图像平面。赛德尔像差系数(球差 A 、彗差 B 、像散 C 、场曲 D)的计算公式^[12-13]为

$$A = \tau_1^{-4} [c_1^3(k_1 + e_1^2) - \beta_1^4 c_2^3(k_2 + e_2^2) + \beta_1^4 \beta_2^4 c_3^3(k_3 + e_3^2)], \quad (1)$$

$$B = \tau_1 p_1 A + \tau_1^{-2} [0.25(1/L_1^2 - \beta_1^2 \beta_2^2 / L_3^2) - \beta_1^3 d_1 c_2^3(k_2 + e_2^2) + \beta_1^2 \beta_2^3 (\beta_1 \beta_2 d_1 - d_2) c_3^3(k_3 + e_3^2)], \quad (2)$$

$$C = -2\tau_1^2 (p_1 + \tau_1 d_1 / \beta_1) A + 2\tau_1 (2p_1 + \tau_1 d_1 / \beta_1) B - 0.5 / \beta_1 [\beta_1 \beta_2 / L_3^2 (\beta_1 \beta_2 d_1 - 2d_2) + d_1 / L_1^2] + 1 / L_1 + 1 / L_3 - 2\beta_2^2 d_2 (\beta_1 \beta_2 d_1 - d_2) c_3^3(k_3 + e_3^2), \quad (3)$$

$$D = -2C + 2(c_1 - c_2 + c_3), \quad (4)$$

式中: τ_1 是图像尺度系数; p_1 是入瞳和主镜之间距离; e_1 、 e_2 、 e_3 是主镜、次镜、三镜的偏心率; c_1 、 c_2 、 c_3 是三个反

射镜的顶点曲率; k_1, k_2, k_3 为三个反射镜的二次曲面系数。这些参数的计算公式为

$$\left\{ \begin{array}{l} \beta_1 = h_2/h_1 \\ \beta_2 = h_3/h_2 \\ p_1 = -d_1/\beta_1 \\ \tau_1 = 1 + d_1/\beta_1 L_1 \\ e_1 = \frac{L_1(1-\beta_1) - d_1}{L_1(1-\beta_1) + d_1} \\ e_2 = \frac{\beta_1 d_1(1-\beta_2) - d_2(1-\beta_2)}{\beta_1 d_1(1-\beta_2) + d_2(1-\beta_2)} \\ e_3 = \frac{\beta_2 d_2 - L_3(1-\beta_2)}{\beta_2 d_2 + L_3(1-\beta_2)} \\ c_1 = \frac{1}{2} \left(\frac{1-\beta_1}{d_1} + \frac{1}{L_1} \right) \\ c_2 = \frac{1}{2} \left(\frac{1-\beta_1}{\beta_1 d_1} + \frac{1-\beta_2}{d_2} \right) \\ c_3 = \frac{1}{2} \left(\frac{1-\beta_2}{\beta_2 d_2} + \frac{1}{L_3} \right) \end{array} \right. \quad (5)$$

式(1)~(3)构成了反射镜二次曲面系数的线性方程组,通过解该透镜的二次曲面系数线性方程,可以得到一个良好的无像散的初始解,这种情况下场曲被称为 Petzval 场曲,使它匹配小鼠大脑轮廓曲率半径 R , 则有

$$R_{\text{pet}} = 1/2(c_1 - c_2 + c_3) = R. \quad (6)$$

2.2.2 初始结构选型

该同轴三反系统可由 6 个独立的参数 ($d_1, d_2, \beta_1, \beta_2, L_1, L_3$) 和三个反射镜表面二次曲面系数 (k_1, k_2, k_3) 确定。合理控制这些参数的值可以得到一个理想的系统结构。为了获得更大的视野,采用了无中间像面的离轴三反系统结构,遮拦比 β_1 和 β_2 的取值范围为 0.1~3.0。孔径光阑位于次镜上,系统结构更加对称,有利于获得更大的视场。由于双光子成像时是平行光入射,故前工作距离 L_1 为无穷大,计算中取其值为 40000 mm。

令 $d_2 = -d_1$, 可实现主三镜一体化设计,此时系统结构更加紧凑,有利于制造加工。为得到一个较好的初始结构,需要合理选择反射镜间的距离。反射镜间距过小会导致离轴时容易出现光线遮拦,而间距过大会造成系统后工作距离与光学系统总长度不协调,容易与物方脑皮层发生干涉。在后续离轴优化时选取了多个 d_2 值进行方案比较,得到 d_2 取 10 mm 时能同时避免光线遮拦和物理干涉。

根据式(5)和式(6),在 d_1, d_2, L_1 选取确定后, Petzval 场曲大小还受 L_3, β_1, β_2 影响。进一步借助 MATLAB 程序研究 L_3 与视野曲率的关系。图 3 为当 $L_3 = 25$ mm 时, β_1 和 β_2 与视野曲率半径倒数 $1/R_{\text{pet}}$ 的关

系图。可以发现, $1/R_{\text{pet}}$ 的取值存在上限,图 3 中约为 0.04,正好是 L_3 的倒数。进一步改变 L_3 ,以同样的方法获得 R_{pet} 的取值下限,如图 4 所示。可以发现, L_3 与 R_{pet} 满足线性关系。因此,为了满足匹配小鼠脑轮廓曲率半径 6 mm 的需求,物方工作距离 L_3 取值不能大于 6 mm,故将 L_3 选取为 6 mm,在保证视野曲率下让工作距离最大化。 L_3 确定后,进一步根据式(1)~(6)可以计算出其他参数。三个反射镜的初始结构参数如表 2 所示。

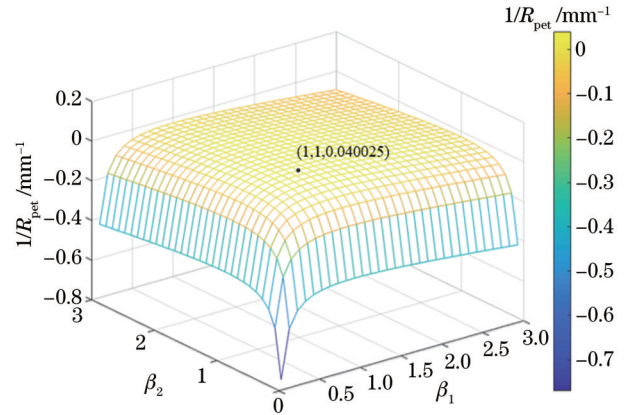


图 3 $1/R_{\text{pet}}$ 随 β_1 和 β_2 的变化

Fig. 3 $1/R_{\text{pet}}$ varying with β_1 and β_2

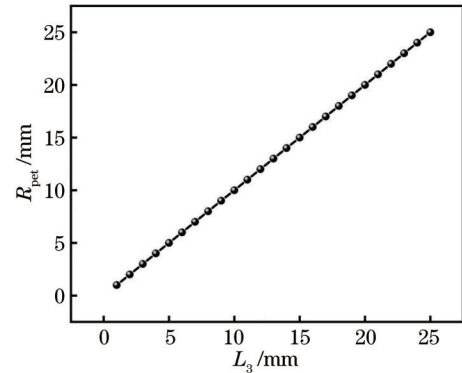


图 4 系统后工作距离 L_3 与视野可达到的最小曲率半径 R_{pet} 的关系图

Fig. 4 Relationship between working distance behind system L_3 and minimum radius of curvature R_{pet} of visual field

表 2 三个反射镜的初始结构参数

Table 2 Initial structural parameters of three mirrors

Mirror	Radius /mm	Distance /mm	Conic
M ₁	-200.501	-10	-468.089
M ₂	-219.512	10	5153.146
M ₃	-12.149	-6	0.069

2.3 系统优化

2.3.1 结构约束

在对初始结构进行离轴优化时,为防止在优化过程中出现光线遮拦的情况,需要根据光学系统中光线的走向对系统结构进行限制。本文设计中采用的是点线关系原理。结构限制示意图如 5 所示。在光学软件

ZEMAX 中采用光线追迹的方法,通过宏语言编程控制主镜上边缘光线 ab 与次镜下边缘 c 点、三镜下边缘光线 ef 与次镜上边缘 d 点间的点线距离。利用评价函数中的宏语言调用在优化过程中对光学系统中光线的走向进行限制,以此来达到无遮挡设计的目的。

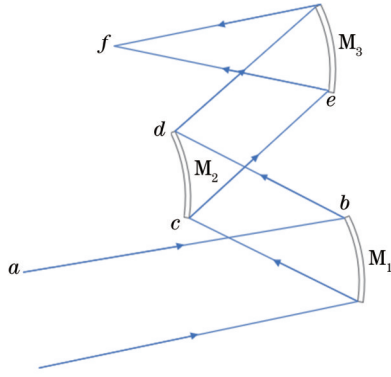


图 5 结构限制示意图

Fig. 5 Schematic diagram of structural restriction

2.3.2 基于 xy 拓展多项式的自由曲面设计

光学自由曲面是指非旋转对称的光学表面。与传统的旋转对称球面和非球面相比,自由曲面具有更丰富的设计自由度,能更好地校正光学系统边缘视场像差、扩大视场角和提高成像质量^[14]。随着制造加工技术的不断进步,自由曲面在光学系统设计中应用越来越广泛。

xy 拓展多项式是在二次曲面的基础上添加多个 xy 多项式,其面形表达式为

$$z = \frac{Cr^2}{1 + \sqrt{1 - (1+k)C^2r^2}} + \sum_{i=1}^N A_i E_i(x, y), \quad (7)$$

式中: C 为二次曲面曲率; r 为径向坐标; k 为二次曲面圆锥系数; N 为添加的 xy 多项式的数量; A_i 为添加的 xy 多项式的系数; E_i 为添加的 xy 多项式项。

传统面形的光学系统是旋转对称的,像面的像质也关于光轴对称,可以给光学系统的装调带来便利。自由曲面是非旋转对称面形,面形自由度完全放开,像质也失去了对称性。在工程应用中,结合其他误差项的引入,光学系统非对称性的像质会给装调工作带来一定难度^[15]。基于此,在自由曲面设计时,为构建对称像质,只采用 xy 拓展多项式中含有 x 偶次幂的多项式,从而使得系统像质关于子午面对称。

3 设计结果与系统光学性能分析

3.1 设计结果

基于 2.2 节初始结构的求解方法,以选型和系统优化的设计思路,使用光学设计软件中的默认评价函数,以点列图为基准优化光学系统。该系统的入瞳直径为 2 mm, F 数为 3.7,系统焦距为 6.3 mm,视场角为 $9^\circ \times 18^\circ$,系统数值孔径为 0.15,视野曲率半径为 6 mm,视野大小为 3.5 mm。系统结构图如图 6 所示。

优化后系统各反射镜的参数如表 3 所示。

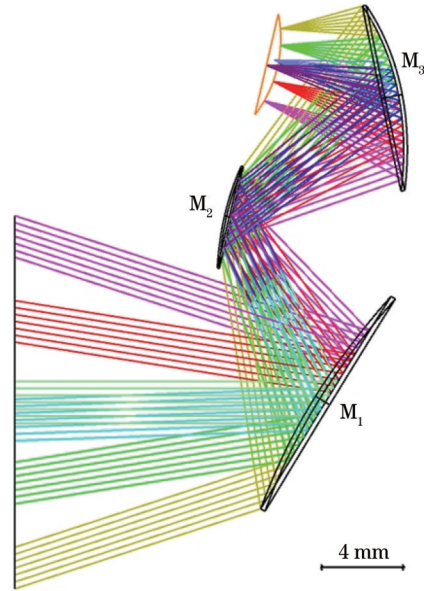


图 6 优化后系统的结构图

Fig. 6 Structural diagram of optimized system

表 3 优化后各反射镜参数

Table 3 Parameters of each mirror after optimization

Mirror	Radius /mm	Distance /mm	Conic	x tilt /($^\circ$)
M ₁	-258.450	-10	910.069	31.485
M ₂	-135.356	10	-421.540	-49.544
M ₃	-12.310	-6	0.937	24.615

在系统面形设计时,主镜、次镜、三镜均采用 xy 拓展多项式光学自由曲面面形来校正光学系统像差。为降低光线追迹复杂性,提高优化速度,选用了 1~6 阶 xy 多项式。优化后自由曲面面形参数如表 4 所示。

表 4 自由曲面的 xy 多项式系数

Table 4 xy polynomial coefficients of free-form surfaces

Parameter	M ₁	M ₂	M ₃
y	0.012	-0.577	1.146
x^2	-136.212	-331.288	3.841
y^2	29.701	42.460	26.914
x^2y	161.257	-352.956	-712.502
y^3	12.218	327.263	-712.529
x^4	1305.665	1.218×10^4	9232.172
x^2y^2	1554.671	-7030.459	1.268×10^4
y^4	-195.878	-5152.896	4183.796
x^4y	1.848×10^4	-4.361×10^5	-2.512×10^4
x^2y^3	7187.777	-2.177×10^5	-1.407×10^5
y^5	1.182×10^4	2.049×10^4	-4.179×10^4
x^6	-3.234×10^4	-1.302×10^7	1.458×10^6
x^4y^2	7.098×10^5	9.665×10^6	3.597×10^6
x^2y^4	4.256×10^5	-7.519×10^5	1.857×10^6
y^6	1.372×10^5	9.774×10^5	9.034×10^5

3.2 系统光学性能分析

将离轴系统与自由曲面结合后光学系统不再具有旋转对称性, 仅仅凭借像差曲线不能准确评价系统的成像质量。点列图、圈入能量分布、全视场波前误差的综合判断可以很好地反映系统的性能。

点列图如图 7 所示。可以看出, 全视场范围内弥

散斑的均方根(RMS)半径均小于艾里斑半径。圈入能量分布可以很好地反映系统能量弥散位置, 分布图如图 8 所示。可以看出, 各视场在半径为 $10\ \mu\text{m}$ 的圆里, 能量占比可以达到 90% 以上, 系统能量集中度高。全视场像差分布如图 9 所示, 系统全视场像差平均值为 0.014λ , 其中 λ 为系统波长。

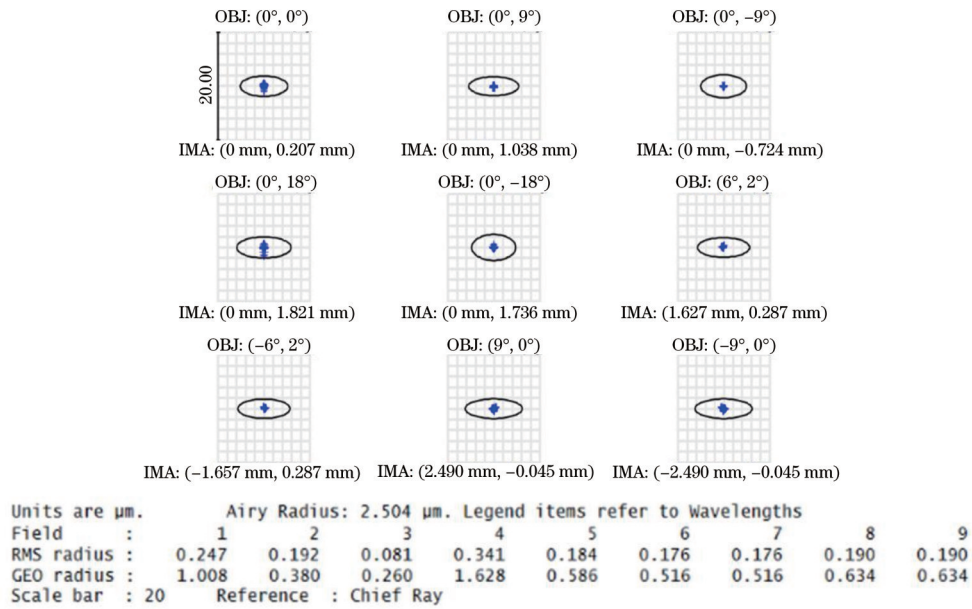


图 7 系统点列图
 Fig. 7 System point diagram

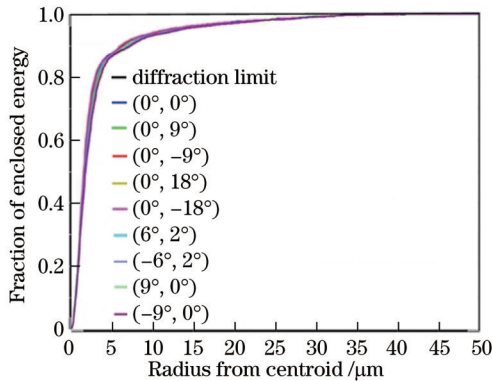


图 8 圈入能量分布图
 Fig. 8 Circled energy distribution

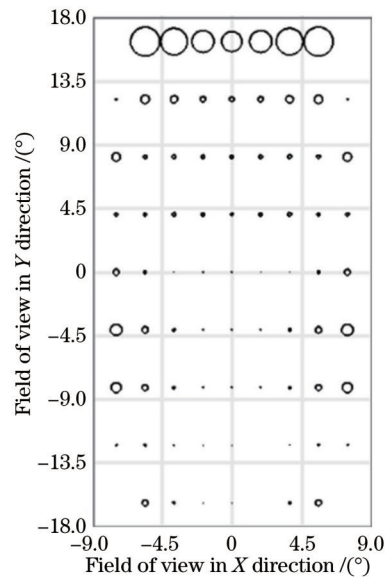


图 9 全视场像差分布图
 Fig. 9 Full field aberration distribution

4 双物镜联合使用设计

离轴三反光学系统具有视场大、像质优、谱段宽、结构紧凑和易于实现轻量化等优点^[16]。在本文设计中除实现无中心遮拦外, 还利用离轴三反系统的结构优势在初始结构选型中合理控制各反射镜间距, 实现了无物理干涉的双物镜系统联合使用设计, 为实现小鼠左右半脑皮层同时成像提供了设计基础, 进一步增大了实际可用的成像视野范围。设计效果如图 10 所示。

5 结 论

针对传统双光子显微镜进行小鼠脑皮层成像时视场小, 以及视场中心和边缘成像不均匀问题, 提出了一种大视场弯曲视野双光子显微物镜设计方法。通过赛

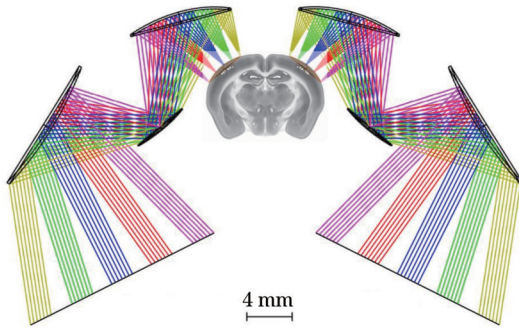


图 10 双物镜联合使用方案的设计图

Fig. 10 Design drawing of dual objective lens combined use scheme

德尔像差理论得到一组基础像差已校正好的初始解。在无像散条件下增大 Petzval 场曲, 以达到匹配鼠脑轮廓曲率的目的。应用所提方法成功设计了系统数值孔径为 0.15、视野曲率半径为 6 mm、视场为 $9^\circ \times 18^\circ$ 的离轴三反系统。充分利用离轴反射式光学系统的优点, 创新地实现了无物理干涉的双物镜系统联合使用设计, 为小鼠左右脑皮层同时成像提供了设计基础, 提高了成像视野。采用 15 项 xy 多项式来表征系统自由曲面面形, 系统像差得到了良好校正, 系统全视场像差平均值为 0.014λ , 满足大视野高分辨神经网络成像的需求。所提方法对大视场弯曲视野双光子显微镜设计具有参考价值, 并且可以运用到其他对视野曲率半径有要求的场景中。

参 考 文 献

- [1] Luo L Q, Callaway E M, Svoboda K. Genetic dissection of neural circuits[J]. *Neuron*, 2008, 57(5): 634-660.
- [2] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [3] 杨梦柯. 快速双光子多脑区荧光成像技术的研究[D]. 长春: 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 2020.
Yang M K. Study on fast two-photon multiarea fluorescence real-time *in vivo* imaging system[D]. Changchun: Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, 2020.
- [4] 陈德强, 夏安东. 双光子激光扫描荧光显微镜及其应用[J]. 物理, 2000, 29(4): 232-236.
- [5] Chen D Q, Xia A D. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy and its applications[J]. *Physics*, 2000, 29(4): 232-236.
- [6] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1369-1377.
- [7] Svoboda K, Tank D W, Denk W. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts[J]. *Science*, 1996, 272(5262): 716-719.
- [8] Christie R H, Bacskaï B J, Zipfel W R, et al. Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer's disease observed by *in vivo* multiphoton microscopy[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2001, 21(3): 858-864.
- [9] Baria E, Nesi G, Santi R, et al. Improved label-free diagnostics and pathological assessment of atherosclerotic plaques through nonlinear microscopy[J]. *Journal of Biophotonics*, 2018, 11(11): e201800106.
- [10] Bumstead J R, Park J J, Rosen I A, et al. Designing a large field-of-view two-photon microscope using optical invariant analysis[J]. *Neurophotonics*, 2018, 5(2): 025001.
- [11] Sofroniew N J, Flickinger D, King J, et al. A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for *in vivo* imaging[J]. *eLife*, 2016, 5: e14472.
- [12] 倪栋伟, 李旭阳, 杨明洋, 等. 基于自由曲面的大视场天基探测光学系统[J]. 光学学报, 2018, 38(11): 1122003.
Ni D W, Li X Y, Yang M Y, et al. Large field of view space-based optical detection system based on freeform surfaces[J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(11): 1122003.
- [13] Korsch D. *Reflective optics*[M]. Amsterdam: Academic Press, 2012.
- [14] Nie Y F, Gross H, Zhong Y, et al. Freeform optical design for a non-scanning corneal imaging system with a convexly curved image[J]. *Applied Optics*, 2017, 56(20): 5630-5638.
- [15] 马子轩, 李旭阳, 任志广, 等. 基于自由曲面的大相对孔径大视场光学探测系统[J]. 光学学报, 2020, 40(17): 1722002.
Ma Z X, Li X Y, Ren Z G, et al. Freeform-surface-based optical detection system with large relative aperture and large field of view[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(17): 1722002.
- [16] 孟庆宇, 汪洪源, 王严, 等. 大线视场自由曲面离轴三反光学系统设计[J]. 红外与激光工程, 2016, 45(10): 1018002.
Meng Q Y, Wang H Y, Wang Y, et al. Off-axis three-mirror freeform optical system with large linear field of view[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2016, 45(10): 1018002.
- [17] 钟兴, 马驰, 李艳杰, 等. 大视场离轴三反光学系统场曲特性与装调方法[J]. 光学学报, 2021, 41(9): 0922001.
Zhong X, Ma C, Li Y J, et al. Field curvature characteristics and alignment method for the off-axis three-mirror optical system with wide field-of-view[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(9): 0922001.

Design of Off-Axis Three-Mirror System with Large Curved Field of View for Two-Photon Imaging of Cerebral Cortex of Mice

Huang Jian¹, Zhou Zhenqiao^{2*}, Li Min², Jia Hongbo²

¹*School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China;*

²*Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China*

Abstract

Objective As one of the important means of optical imaging *in vivo*, two-photon microscopes are widely used in biomedical related research fields, such as brain neuroscience, neurodegenerative diseases, embryonic development, and especially in cerebral cortex imaging. The shape of the mammalian brain is irregular and the contour is like a curved surface, but most microscopes are plane field of view. Therefore, the two-photon fluorescence imaging of the mammalian brain will cause uneven imaging depth of the field center and field edge, and with the expansion of the imaging field of view, it will become more and more obvious, thus affecting the imaging quality. In order to solve the problems of small field of view and mismatch between field of view and curvature of brain contour when traditional two-photon microscope is used for two-photon fluorescence imaging of cerebral cortexes, an optical design scheme of two-photon microscope objective lens with large field of view and curved field of view is proposed.

Methods According to Seidel aberration theory, the major aberrations in the optical system, including spherical aberration, coma and astigmatism, are completely corrected and the field curvature is retained. The field curvature at this time is called Petzval field curvature. The curvature radius of the mouse brain contour is matched by controlling the value of Petzval field curvature. A set of solutions for solving the initial structure of coaxial three-mirror system is derived. On the basis of the coaxial system, the aperture occlusion in the optical system is eliminated by means of an off-axis field of view. By introducing free-form surface to the primary mirror, the secondary mirror and the third mirror, and using 15 term xy polynomials to characterize the free-form surface shape of the system, an off-axis three-mirror imaging system using free-form surface is further optimized.

Results and Discussions Based on Seidel aberration theory, a set of corrected initial solutions of the basic aberration is derived. In the absence of astigmatism, the Petzval field curvature is increased to match the radius of curvature of the mouse brain contour. A set of solutions for the initial structure of coaxial three-mirror system with bending field of view is derived (Table 2). The numerical aperture NA is 0.15, the radius of curvature of the field of view reaches 6 mm, the field of view angle reaches $9^\circ \times 18^\circ$, and the size of the field of view is up to 3.5 mm (Fig. 6), which demonstrates that the optical performance of the optimized system is good (Figs. 7–9). By reasonably controlling the system structure parameters in the initial structure selection and taking advantage of the structural advantages of the off-axis reflective optical system, a design scheme for the joint use of dual objective lenses without physical interference (Fig. 10) is obtained, which is conducive to further improving the size of the imaging field of view.

Conclusions In order to solve the problems of small field of view and uneven imaging of the center and the edge of the field of view in two-photon imaging of mouse cerebral cortexes by conventional two-photon microscopy, a design method of two-photon microscope objective lens with large field of view and curved field of view is proposed. Based on Seidel aberration theory, a set of initial solutions of coaxial three-mirror system with corrected basic aberration is obtained. In the absence of astigmatism, the Petzval field curvature is increased to match the radius of curvature of the mouse brain contour. The designed system has a numerical aperture of 0.15, a radius of curvature of the field of view of 6 mm, and a field of view angle of $9^\circ \times 18^\circ$. Taking advantage of off-axis reflective optical system, an innovative design scheme for the joint use of the dual objective lens system without physical interference is realized, which provides a design basis for the simultaneous two-photon fluorescence imaging of the left and right cerebral cortexes of mice, and increases the size of the imaging field of view. The 15 term xy polynomials are introduced to characterize the free-form surface shape of the system, and the system aberration is well corrected. The average aberration of the system in the full field of view is 0.014λ , which can meet the needs of high-resolution brain neural network imaging in large field of view. This method has reference value for the design of two-photon microscope with large field of view and curved field of view. In addition, the proposed method can also be applied to other scenes that require the radius of curvature of the field of view

Key words optical design; large field of view; curved field of vision; off-axis three-mirror; cortical imaging; free-form surface