

自适应光学技术在深层动态荧光显微成像中的应用和发展

毛 珩¹, Tao Louis², 陈良怡³

(1. 北京大学 数学科学学院, 北京 100871; 2. 北京大学 生命科学学院, 北京 100871;

3. 北京大学 分子医学所, 北京 100871)

摘要: 荧光显微成像技术是开展微观生命科学研究的重要手段和工具, 使用该技术可以观察生物体内的精细结构、动态追踪生物体内组织、细胞、细胞核、蛋白、小分子等不同尺度的生命活动过程。其中, 研究深层组织高时空分辨率荧光显微成像技术, 是当前成像领域一个前沿问题。应用自适应光学技术实时补偿经由不透明散射、非均匀生物组织传播而引入的复杂波前畸变已被证实是实现上述技术的一种有效途径。文中首先归纳了深层动态荧光显微成像的需求和特点, 随后分别介绍了自适应光学技术近几年在共聚焦显微成像、随机光学重构显微成像、光激活定位显微成像、受激辐射光淬灭显微成像、双光子/多光子激发显微成像中的相关应用, 并对今后的研究问题和发展方向提出展望。

关键词: 荧光显微成像; 自适应光学; 深层组织; 波前传感; 波前校正

中图分类号: TP273.2 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201645.0602001

Application and development of adaptive optics to three-dimensional *in vivo* deep tissue fluorescent microscopy

Mao Heng¹, Tao Louis², Chen Liangyi³

(1. School of Mathematical Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

2. School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

3. Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Fluorescent microscopy (FM) is an essential means for the Life Sciences research in micro-scale. By use of these advanced techniques, the most finest structures of *in vivo* biological tissue could be observed, as well as the dynamics mechanism at different levels be traced in realtime. At present, 3D *in vivo* FM with high spatiotemporal resolution through the deep scattering tissue is full of challenges. Being experienced nearly one decade development, the Adaptive Optics methodologies have been proven to be an effective way to correct the wavefront aberrations in space-variant caused by the heterogeneous tissue. In this paper, the imaging requirements and characteristics of 3D *in vivo* FM were summarized firstly. Then many feasible AO applications attaching to the Confocal Microscopy, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, Photoactivated Localization Microscopy, Stimulated Emission Depletion

收稿日期: 2016-04-05; 修订日期: 2016-05-12

基金项目: 国家自然科学基金(61101156, 91232715, 61421062, 61375022)

作者简介: 毛珩(1980-), 男, 讲师, 硕士生导师, 博士, 主要从事复杂光学成像反问题、前沿光电成像技术及其应用方面的研究。

Email: heng.mao@pku.edu.cn

Microscopy, Two-Photon/Multi-Photon Microscopy were presented, respectively. Finally, some probable research points and further trend were given.

Key words: fluorescent microscopy; adaptive optics; deep tissue; wavefront sensing; wavefront correction

0 引言

自适应光学(Adaptive Optics, AO)技术是伴随着地基望远镜的天文观测活动而产生的。由于观测需要,各种提高望远镜成像分辨力的方法付诸实施,但当口径增大到一定程度之后,分辨力并不再随着口径的增大而提高。其中的主要原因是大气扰动,由于无法在成像光路中消除扰动影响,最初只能被动选择扰动较小的观测地点和时间。1953年,天文学家 H. W. Babcock 提出了“自适应光学”的基本思想:在望远镜成像光路中运用波前传感器实时获知大气扰动引入的出瞳面波前畸变(分布),并运用波前校正器实时反馈补偿该波前畸变,使成像系统具有自适应补偿大气扰动的能力,全时保持与望远镜口径相匹配的成像分辨力。

半个世纪以来随着各项核心技术的提出和发展完善,包括激光导星技术、各种波前传感方法、各种波前校正器件、实时波前重建算法、以及高速并行反馈控制技术等等,自适应光学已成为一门集科学性与工程性于一体的高新技术学科,涉及物理学、光学、计算数学、自动控制原理、微机电技术、材料科学等众多研究领域。与此同时,基于“像差主动补偿”的主旨思想,自适应光学技术在光学成像中的应用也不断得到拓展,成功运用于自由空间光通信、激光光束控制、光学精密制造加工、复杂大口径成像系统对准装调、眼科诊疗、荧光显微成像等。

荧光显微成像技术(Fluorescent Microscopy, FM)是开展生命科学研究的重要手段和工具,通过使用荧光报告基因和荧光染料等,该技术可以观察和追踪活体内不同尺度的荧光信号,从而获得活体的组织、细胞、细胞核、蛋白、小分子等的定位、结构、变化情况等信息,从而加深对相关生命过程的探求和理解。成像观测前,先用荧光蛋白或染料标记生物样品中的特定对象。成像观测时,使用特定波长或波段的激发光(Excitation Light)照射所标记的荧光蛋白或染

料,荧光物质中的电子从低能级被激发到高能级→弛豫到亚稳态→回落到低能级的不同高处,会在标记点形成一定光谱分布的发射荧光(Emission Fluorescence),从而使用光电二极管(点探测)或高灵敏度(科学级)面阵 CCD/CMOS 器件(面探测)实时记录荧光强度分布。荧光显微成像技术具有操作简单、荧光蛋白和染料标记能力强、活体成像等优点。

近年来,随着超分辨荧光显微成像技术的提出以及自适应光学技术在其中的应用和初步发展,使得针对深层生物组织的高时空分辨率三维荧光显微活体成像成为可能。文中将梳理并归纳深层动态荧光显微成像中的需求和特点,分别介绍 2010 年以来自适应光学技术在其中一些显微成像技术中的应用,并对其今后的研究问题和发展方向提出展望。

1 深层动态荧光显微成像的前沿需求

1.1 高时间分辨率

由于发射荧光信号的表达、传导的形式和速率各有不同,对于成像的时间分辨率提出了 50~500 Hz 甚至 500~1 000 Hz 的要求。

1.2 高三维空间分辨率

生物组织的荧光显微成像通常需要三维体成像(Volume Imaging),对应的空间分辨率除了垂轴分辨率还有轴向分辨率,理论近视公式为^[1]:

$$\text{垂轴分辨率 } \sigma_{xy} \approx 0.61\lambda/NA$$

$$\text{轴向分辨率 } \sigma_z \approx \frac{2n\lambda}{NA^2} \text{ (紧聚情形)}$$

根据观测对象的不同,有些是细胞水平(~1 μm),有些是亚细胞水平(~100 nm),还有些是分子水平(~10 nm)。

1.3 成像大视场区域

除了成像空间分辨力的需求,还有成像的广度需求,为此需要更多的探测器像元数目,甚至采取多探测器拼接技术。

1.4 成像深度组织(Deep tissue)

除了成像广度的需求,还有成像的深度需求,为

此必须实时补偿激发光去程以及发射荧光回程经由生物组织内部传播所引入的波前畸变分布。

1.5 光毒性(Phototoxicity)和光漂白(Photobleaching)

生物组织在持续激发光照射下会有光毒性和光漂白现象。上述制约使得激发光的瞬时功率不能过大、累积时间不能过长,于是很大程度上限制了发射荧光的辐出度,造成荧光信号微弱。为此,必须确保激发光的照射时序与相机曝光时序同步,尽可能减少不必要的激发光照射,并使用灵敏度高的科学级相机成像记录。

1.6 长时间(Long-term)观测

对于一些生物活动过程,目前的成像技术水平很难做到既高时空分辨率又动辄一小时以上的连续成像,一方面是受限于科学级相机的读出速率和大数据量图像序列的实时存储(~1 GB/s),另一方面是受限于激发光的总辐照度(带来光毒性和光漂白)。

将上述成像需求归纳为图 1 所示的四个维度,各维度都具有容量(Capacity)和最小尺度(Resolution),两者的比值即为该维度的动态范围(Dynamic Range)。

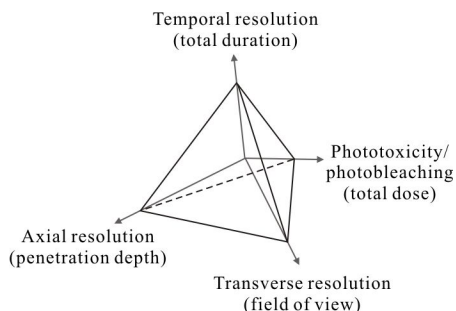


图 1 深层动态荧光显微成像指标

Fig.1 Main performances of 3D *in vivo* deep tissue FM

2 深层动态荧光显微成像的特点

(1) 为暗场荧光成像,图像包含当前工作距离层面上点状发射荧光的稀疏排布以及景深范围内邻近层面点状发射荧光的弥散光斑叠加;

(2) 显微成像的物方焦深非常小,20 倍下通常~2 μm,40 倍下通常~1 μm。

(3) 荧光辐出度很低,属于弱光甚至微弱光水平,并随激发光照射时间的累积而逐步衰减。

(4) 经历过生物组织内部的复杂传播过程,各个发射荧光团在像平面上的相干性较差,均视为非相干光场。

(5) 不同类型荧光物质的发射荧光光谱会有部分重叠,在激发/成像时需分时。

(6) 发射荧光的谱段较宽,通常使用半高宽为 30~50 nm 的带通滤光片在峰值附件截取。图 2 所示为常见五种荧光蛋白的发射谱线。

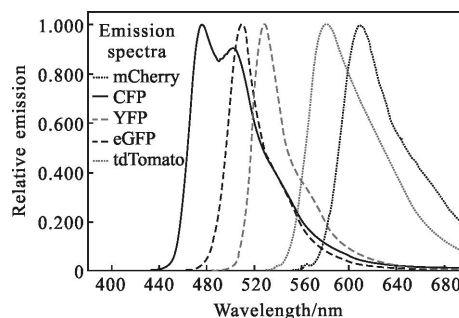


图 2 五种常见荧光蛋白的发射谱线

Fig.2 Emission spectra of five typical fluorescent proteins in FM

(7) 深层动态荧光显微成像的波前畸变来源主要有三种:一是光学系统装调和光学器件不理想引入的低阶像差;二是光学系统中使用了滤镜转轮、扫描振镜、空间光调制器等器件所产生的附加光学像差;三是由于吸收、散射、折射率分布不均匀(Heterogeneous)等因素导致各个荧光团(Fluorophore)的发射荧光经由生物组织内部传播到光学系统出瞳面会引入波前畸变(Sample-induced Wavefront Distortion)。

其中,第一种是光学系统中产生的固有波前畸变,可预先传感标定;第二种是光学系统中产生的变化波前畸变,需要评估实际变化量的大小决定是否可忽略;第三种是传播过程中产生的相对缓慢变化的波前畸变,时间带宽多在 0.01~0.1 Hz,造成成像空间分辨率下降主要是其中的中低频分量(前 21 阶 Zernike 系数^[2-3])。并且由于该波前畸变依赖于生物组织的复杂结构,成像视场中各局部区域内对应的波前畸变各不相同,必须遵循分层、分等晕区波前传感和校正的策略。

(8) 在深层动态荧光成像时,波前校正量需要逐层、逐等晕区的高速切换。是否仅针对发射荧光回程开展波前校正,还是对激发光去程和发射荧光回程均开展波前校正,取决于激发光照射方式以及允许照射的激发光总剂量(Total Dose)。

综上所述,针对深层动态荧光显微成像,波前传感和校正的主要对象是靠近物方经由生物组织内部

传播引入的波前畸变。其中,波前传感可以间隔 10~100 s 实施一次,传感需要逐层、逐等晕区开展,整个传感和波前重构过程需要快速完成,仅能使用针对非单色、非相干的点状(Point-like)光源信标或是扩展(Extended)光源信标的传感方法,并且参考信标的光信号微弱、曝光时间受限;波前校正需要逐层、逐等晕区配合高速荧光成像同步进行。

3 自适应光学技术在深层动态荧光显微成像中的应用和初步发展

目前国内外已报道的、可用于深层动态荧光显微成像的显微镜系统包括,转盘式共聚焦显微技术(Spinning-Disk Confocal Microscopy)、随机光学重构显微技术(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)、光激活定位显微技术(Photoactivated Localization Microscopy, PALM)、受激辐射光淬灭显微技术(Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)、饱和结构光照明显微技术(Saturated Structure Illumination Microscopy, SSIM)、多光子激发显微技术(Multi-Photon Microscopy, MPM)、荧光光片扫描显微镜(Digital Scanned Light-Sheet Microscopy, DSLM)等等。此节将介绍近几年来自适应光学技术在上述某些显微成像系统中的应用。

针对共聚焦显微技术,2011 年 J.Kubby 研究组提出使用自适应光学系统实时传感和校正共聚焦成像小鼠脑组织时各扫描点引入的波前畸变,将成像 70 μm 深度荧光图像的对比度提高 3 倍^[4]。如图 3 所示,在与出瞳面(设定为显微物镜后端面)共轭的

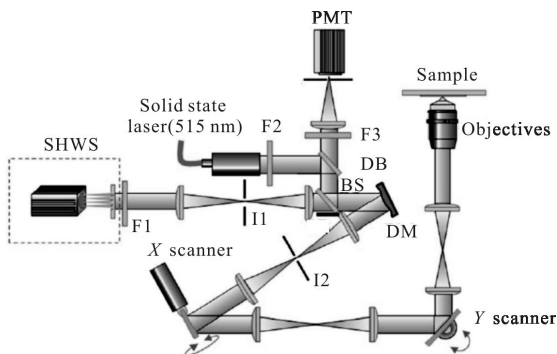


图 3 使用 S-H WFS 和 DM 在共聚焦显微镜中逐点传感校正波前畸变

Fig.3 By using S-H WFS and DM to compensate the wavefront aberrations point by point in Confocal Microscopy

位置分别放置两个单轴振镜实现对成像视场点激发的二维扫描,各扫描点的发射荧光经由两个振镜反射回来后始终作为轴上点光分布再经由分光棱镜被 S-H 和 PMT 接收,系统中使用子孔径数目 44×44 、子孔径 $F\# = 60$ 的 S-H 波前传感器(@AOA)实时传感各扫描点发射荧光引入的波前畸变,同时使用 140 个致动单元的薄膜变形镜(@Boston Micromachines)实时校正上述波前畸变。该研究工作充分验证了开展深层动态荧光成像时进行逐点、逐层波前传感和校正的必要性。但是,我们也注意到逐点波前传感+校正会导致共聚焦成像的时间分辨率很低;同时接近 2000 个的 S-H 子孔径数目会严重降低发射荧光在 S-H 各子孔径内的图像信噪比,由此可见上述显微成像方法的适用性十分有限。后续的技术改进思路必须要克服上述两个问题。

针对单分子成像定位的 STORM/PALM 技术,2012 年 M.Dahan 研究组提出使用自适应光学系统一方面补偿系统像差、另一方面主动引入可调节的像散波前分布(模拟柱面镜的轴向检测作用^[7],如图 4 所示)从而获得单个发射荧光团的精确 z 轴轴向定位^[5]。其中,波前校正器(@Imagine Optic)为 52 单元致动器的薄膜变形镜;波前传感既使用 Shark-Hartmann(S-H,@Imagine Optic)直接传感方法(Direct Wavefront Sensing),也使用基于致动器并行迭代(遗传算法)和图像质量评估的无波前传感方法(Wavefront Sensorless)^[6]。该显微镜在 ~800 nm 的深度对荧光蛋白获得了 40 nm 的 z 轴定位精度,对荧光染料获得了 20 nm 的 z 轴定位精度。如图 5 所示,由 Tube Lens 和 Lens1(L1)构成 4-f 系统,在 L1 后焦面(二次出瞳面)上放置波前校正器,又由 Lens2(L2)和共轭 Lens(CL)构成 4-f 系统,在 CL 后焦面(三次出瞳面)上放置波前传感器,使用会聚透镜和 EMCCD 完成显微

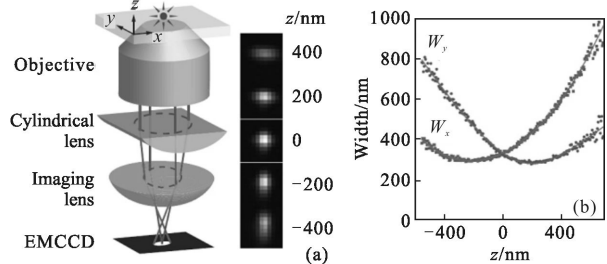


图 4 使用柱面镜精确检测单个荧光团 z 轴位置的 STORM 技术^[7]

Fig.4 By using cylindrical lens to detect the z-axis position in STORM with high accuracy^[7]

成像。实验中通过波前传感发现显微物镜后放置柱面镜引入的波前像差并非只有像散模式,也包含其他不期望的附加像差模式。因此,上述使用波前校正器提供可调节像散波前的 z 轴定位检测方法更具优势。

针对改造光源点扩散函数的 STED 技术,2012 年 M. J. Booth 研究组提出分别在激发光路(Excitation Path)和受激辐射光路(STED Path)中使用 SLM(反射型液晶空间光调制器)实现对深层生物样本的 STED 成像,结果显示对于 $14\ \mu\text{m}$ 厚和 $25\ \mu\text{m}$ 厚视网膜切片下的直径 $200\ \text{nm}$ 荧光珠, AO+STED 的成像分辨率分别为 $\sim 208\ \text{nm}$ 和 $\sim 249\ \text{nm}$ ^[8]。如图 6 所示,在激发光路中,SLM2 用于预补偿激发光经由深层组织引入的波前畸变;在受激辐射光路中,SLM1 除了引入相位掩膜构造受激辐射光环状分布^[9],还用于预补偿受激辐射光经由深层组织引入的波前畸变,精确定位光环能量峰值的轴向(焦平面)位置,从而保证超分辨成像的质量。其中,SLM1 和 SLM2 的波前像差校正量均使用基于 Zernike 模式的无波前传感方法迭代估计,参考荧光图像源于加入荧光珠的生物样本。

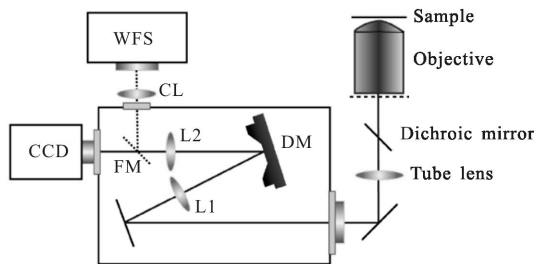


图 5 使用 S-H WFS 和 DM 在单分子显微镜中校正发射荧光波前分布^[5]

Fig.5 By using S-H WFS and DM to compensate the emission path in STORM^[5]

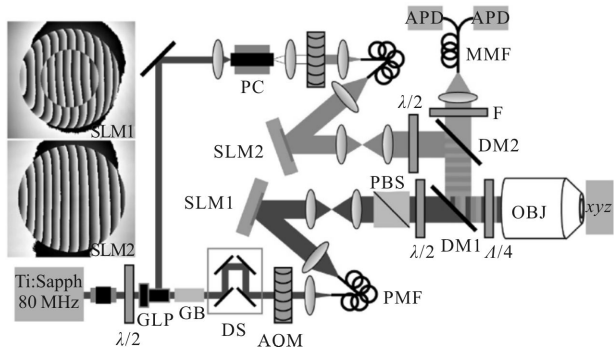


图 6 使用 SLM 在 STED 显微镜中校正激发光波前分布^[8]

Fig.6 By using SLM to compensate the excitation path and STED path in STED^[8]

针对双光子激发(Two-Photon Excitation, TPE)的逐点扫描显微技术,2010 年 Eric Betzig 研究组提出针对中心视场(轴上点)的出瞳面分区波前校正方法,实现对轴上点激发光的去程复杂波前畸变的预补偿^[10]。该方法校正原理如图 7 所示,逐次产生经过瞳面不同区域的激发光平行细光束,通过各次发射荧光光斑的位移量即可获取瞳面局部区域的倾斜波前分布并使用 SLM 实施出瞳面各个局部区域的预校正,再由两两叠加的荧光分布通过无波前校正方法实施出瞳面各个局部区域的共相位波前预校正。该方法对于轴上点的双光子激发光具有很好的补偿效果,能达到接近衍射极限的空间分辨率,原理光路图如图 8 所示。但是校正过程耗时长而且仅针对轴上点经历深层组织的波前畸变有效,无法由此给出轴外视场的波前分布补偿量。

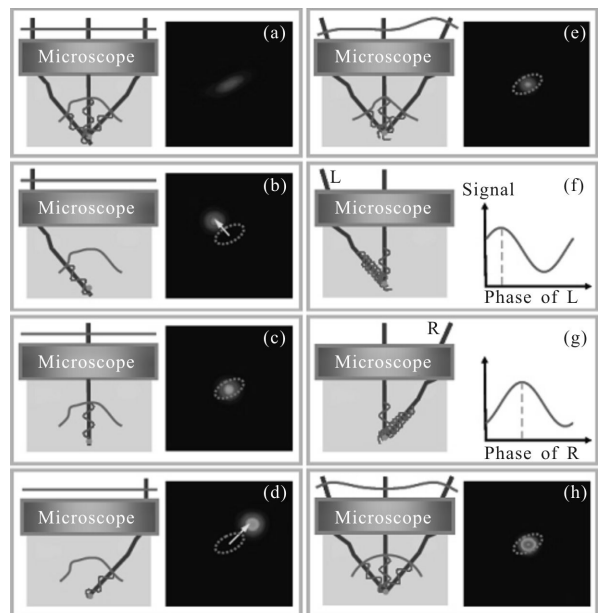


图 7 出瞳面分区校正轴上点的倾斜波前和共相位波前^[10]

Fig.7 Sketches illustrating the AO algorithm via pupil segmentation in^[10] to respectively compensate the tip/tilt and co-phasing aberrations of three independent subregions

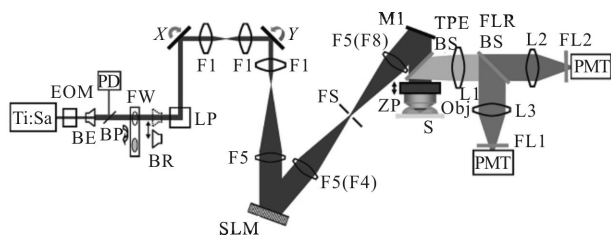


图 8 使用 SLM 在双光子点扫描显微镜中校正激发光波前分布^[10]

Fig.8 By using SLM to compensate the excitation path in TPE FM^[10]

2012 年 Meng Cui 研究组提出使用 32×32 个单元的分立表面变形镜(如图 9 中标示“MEMS”),运用无波前传感的二分式迭代步骤,实现对轴上点复杂波前畸变的快速预校正,在 400 μm 以上深度也获得了接近 100 nm 的成像分辨率^[11]。在多光子激发光的迭代波前校正过程中,首先确定一个感兴趣扫描点的位置;再将其中一半数目的致动单元状态静止仅对余下一半数目的致动单元开展无波前传感校正,各致动器按照各自的变化频率同时进行相位调制并由“PMT”记录发射荧光值;然后对 PMT 记录的强度序列进行傅里叶变换并从频谱中提取出这一半数目致动器的最终相位调制值;之后交换次序转而对上次校正中处于静止的一半数目致动单元开展上述校正;继续重复两次上述二分式校正过程,完成该扫描点的激发光波前畸变预补偿。注意到,上述波前校正仅对视场中某一点的发射光波前实施校正,不适用于严重不透明、不均匀的深层生物样本。为此,2015 年 Meng Cui 研究组提出改进的 AO 系统,将波前校正平面与样本的主要扰动层(Turbid Layer)共轭,从而能够使视场中不同区域的波前畸变在校正平面上近似空间可分,由此具有分视场(等晕区)波前校正的能力^[12]。

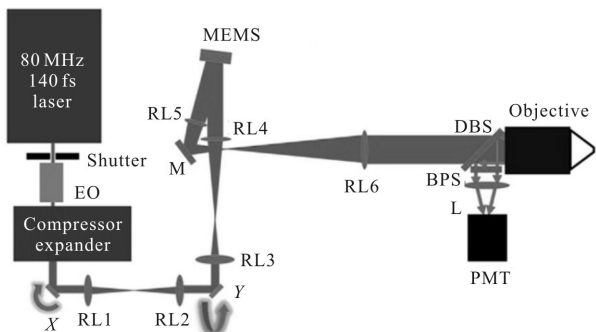


图 9 使用 MEMS 变形镜在多光子点扫描显微镜中校正激发光波前分布^[11]

Fig.9 By using MEMS mirror to compensate the excitation path in MPE FM^[11]

近几年来,从事双/多光子激发点扫描显微成像的研究人员逐渐形成共识,由于大视场深层生物组织异质性(Heterogeneous)对双/多光子点扫描成像的影响复杂并使波前扰动不具有空间不变性,因此采取逐层、逐等晕区的直接波前传感和校正最为有效。但是注意到使用 S-H 波前传感器时微透镜阵列分光会导致各子孔径图像的信噪比极低甚至探测不

到,此外发射荧光的回程相对于多光子激发的去程更需要波前校正。

2014 年, Eric Betzig 研究组提出使用 S-H 波前传感和 Descanning 方法实现逐层、逐等晕区的波前传感和校正成像^[13]。如图 10 所示,分别可对单光子和双光子激发光的去程实施波前校正(对应图中“SLM_VIS”和“SLM_NIR”)以及发射荧光的回程实施波前校正(“SLM_VIS”)。使用 S-H 波前传感器和 Descanning 方法对各个等晕区分别开展波前畸变传感,具体操作是在共轭出瞳面上驱动两个单轴振镜完成对等晕区内逐点的双光子激发扫描,各扫描点的发射荧光经由两个振镜后始终作为轴上点光分布分别被 S-H 和 PMT 所接收,由于等晕区内各点波前畸变分布趋同而造成 S-H 各子孔径的光斑质心偏心量也趋同,于是使 S-H 传感器在等晕区内扫描期间一直连续曝光,由此累积荧光信号增加 S-H 子图像的信噪比。当完成一个等晕区的波前传感之后,立即开展该等晕区的波前校正和单光子/双光子激发点扫描成像,然后切换至下一个等晕区、下一个深度层,如此往复。上述波前传感方法充分结合了点扫描成像模式和等晕区波前分布的特点,被认为是现阶段自适应光学在深层动态生物组织成像中最成功的一次应用。2015 年, Eric Betzig 研究组改用近红外光作为波前传感导星从而避免传感时生物组织对可见光的强散射影响,由此对小鼠大脑 0~700 μm 的深度范围开展了高时空分辨率的双光子活体形态学成像和功能成像,结果令人信服^[14]。

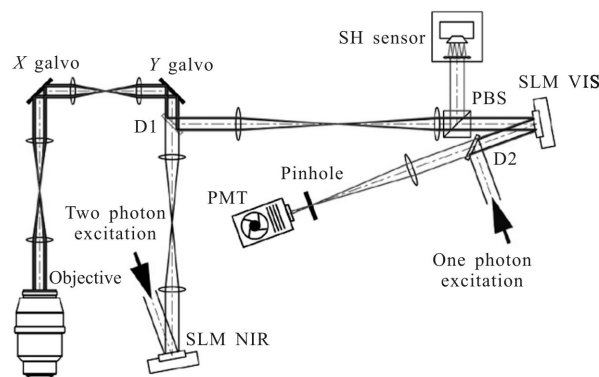


图 10 使用 S-H 和 SLM 在双光子显微镜中逐层、逐等晕区校正去程和回程的波前畸变^[13]

Fig.10 By using S-H sensor and SLM to compensate both excitation path and emission path slice by slice and block by block in TPE FM^[13]

4 自适应光学技术在深层动态荧光显微成像中的发展展望

(1) 在现有的双光子激发点扫描模式下, 使用现有的“S-H +Descanning”传感方法时, 设法通过各子孔径内叠加光强分布的中心矩特征来评价等晕区划分的合理性。此外还可通过其他成像技术预先获知生物组织内部大尺度的结构分布, 由此自定义更合理的全视场等晕区划分;

(2) 使用波长更长、穿透性更佳的三光子激发点扫描模式^[15], 配合现有的“S-H +Descanning”传感方法, 实现更深层的生物组织动态显微成像;

(3) 对每一层, 首先使用双光子激发模式以及现有的“S-H +Descanning”传感方法完成逐个等晕区的波前传感, 再使用“荧光光片激发^[16]+全视场复杂波前校正”完成当前层的高时空分辨率二维显微成像, 之后通过样本升降逐层开展上述传感和校正成像。此方法能够进一步提高成像的时间分辨率、降低光毒性、延缓光漂白速度、增加成像时长;

(4) 结合光路设计、器件革新、荧光标记新技术以及激发工作模式, 提出其他可行的非单色、非相干点光源信标或扩展光源信标(微弱光信号)的波前传感方法。

参考文献:

[1] Novotny L, Hecht B. Principles of Nano-Optics [M]. New York: Cambridge University Press, 2006.

[2] Malacara D, DeVore S. Optical Shop Testing (2nd ed)[M]. New York: John Wiley and Sons, 1992.

[3] Noll R J. Zernike polynomials and atmospheric turbulence [J]. *J Opt Soc Am*, 1976, 66(3): 207-211.

[4] Tao Xiaodong, Oscar Azucena, Fu Min, et al. Adaptive optics microscopy with direct wavefront sensing using fluorescent protein guide stars[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(17): 3389-3391.

[5] 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]. *Opt Express*, 2012, 20(5): 4957-67.

[6] Martin J Booth. Wave front sensor-less adaptive optics: a model-based approach using sphere packings [J]. *Opt Express*, 2006, 14: 1339-1352

[7] Huang B, Wang W, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.

[8] Gould T J, Burke D, Bewersdorf J, et al. Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens [J]. *Opt Express*, 2012, 20(19): 0998-1009.

[9] Katrin I Willig, Silvio O Rizzoli, Volker Westphal, et al. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis [J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 935-939.

[10] Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(2): 141-147.

[11] Tang J, Germain R N, Cui M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique[J]. *PNAS*, 2012, 109(22): 8434-8439.

[12] Park J H, Sun W, Cui M. High-resolution in vivo imaging of mouse brain through the intact skull[J]. *PNAS*, 2015, 112(30): 9236-9241.

[13] Wang K, Milkie D E, Saxena A, et al. Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(6): 625-628.

[14] Wang K, Sun W, Richie C T, et al. Direct wavefront sensing for high-resolution in vivo imaging in scattering tissue[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7276.

[15] Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain[J]. *Nat Photonics*, 2013, 7(3): 1-2.

[16] Bi-Chang Chen, Wesley R Legant, Kai Wang, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. *Science*, 2014, 346(6208): 1257998.