

用于神经活动观测的随机扫描双光子显微成像*

姜润华 吕晓华 李德荣 全廷伟 刘秀丽 骆清铭 曾绍群**

(武汉光电国家实验室(筹)Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要 双光子荧光显微镜是神经科学研究中的重要观测仪器, 但是现有的商品化仪器受限于较低的成像速度, 难以满足脑功能研究中毫秒量级神经信号检测的需要. 基于声光偏转器的快速随机扫描双光子显微成像技术, 有望在保持信噪比的同时提高观测速度. 本文综述了这一研究的最新进展, 从飞秒激光经过角色散器件后的时空演化理论、声光偏转器的色散补偿方法、随机扫描成像仪器及仪器应用到神经成像时钙信号的识别方法四个方面分别进行介绍, 最后分析了随机扫描双光子显微成像技术的发展趋势. 这项技术的系统深入研究将为神经活动观测提供一种全新的方法, 推动脑科学研究的发展.

关键词 飞秒激光, 随机扫描, 声光偏转器, 色散补偿, 双光子显微成像, 钙信号, 峰电位重建

学科分类号 Q42, Q63

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00234

大脑是个复杂的多级系统, 神经信息处理的关键步骤被认为是发生在局部微回路水平上^[1]. 神经回路的研究需要一种能在高散射脑组织中进行快速、高分辨及低损伤观测的成像技术. 飞秒激光双光子荧光显微镜, 相比于共聚焦显微镜, 具有天然的高空间分辨能力、高组织穿透能力及低损伤等优点^[2-5], 在神经科学研究中得到了广泛的应用. 现在商品化双光子显微镜大多采用二维扫描镜做扫描器件. 由于存在机械惯性, 只能采用光栅式逐行扫描的扫描模式(如图 1a), 每秒只能获得几帧图像, 无法满足毫秒级神经信号探测的需求. 采用高速振镜或者多焦点同时激发荧光的方式, 可以实现视频速率甚至更快速率的扫描. 但是这些方法在提高扫描速率的同时, 往往减少了单点停留时间, 从而降低了信噪比. 还有一种提高扫描速率的方法是利用线扫描获得感兴趣点的信号, 而实际上感兴趣点往往是随机分布在视野中的多个点, 并不一定局限在一条线上.

声光偏转器(acousto-optic deflector, AOD)是基于声光衍射实现光束偏转的一种器件^[6]. AOD 可用于无惯性的随机扫描, 实现视野内多个感兴趣点的跳跃式扫描(如图 1b). 相比于光栅式扫描, 随机扫描更加灵活、有效^[7]. 然而, 用 AOD 扫描飞秒激

光进行双光子激发时, 存在严重的空间和时间色散问题, 极大降低了双光子激发荧光的效率. 为了解决这一问题, 相关的研究小组提出了不同的色散补偿方法^[8-11], 这些色散补偿方法均遵循空间和时间色散分别补偿的思路, 扫描光路过于复杂, 难以调节和维护, 并且占用很大空间, 不便于广泛应用.

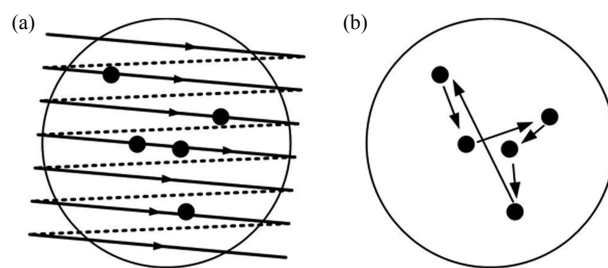


Fig. 1 Comparison of the scanning mode: raster (a) vs random-access (b)

图 1 光栅式扫描方式(a)与随机扫描方式(b)的对比

* 国家杰出青年科学基金资助项目(30925013).

** 通讯联系人.

Tel: 027-87792033, E-mail: sqzeng@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2012-04-30, 接受日期: 2012-05-17

近几年, 飞秒激光经角色散器件后的传输理论及 AOD 的色散补偿方法都有了创新性的发展. 在此基础上构建了随机扫描双光子显微成像仪器, 建立了新的钙信号解析方法. 飞秒激光随机扫描双光子显微成像技术的发展和进一步应用将极大促进脑功能成像的研究. 本文将从理论、方法、仪器及信号重建四个方面对随机扫描双光子显微成像技术的最新进展进行综述, 并对其未来发展趋势进行分析.

1 飞秒激光经角色散器件后的时空演化理论

采用 AOD 快速扫描飞秒激光是实现随机扫描双光子显微成像的核心技术, AOD 的色散补偿是其难点. 飞秒激光经角色散器件后的传输特性研究将为解决这一问题提供理论基础. 所谓角色散是指复色光源经光栅、棱镜等波长相关的光学器件后, 不同的光谱成分出射角不同, 光斑在空间上横向展开. AOD 也是一种角色散器件. 飞秒激光经角色散后的传输特性研究主要包括时间上的脉冲展宽和空间上的光斑展宽, 而脉冲宽度和光斑形状对飞秒激光双光子显微成像的分辨率和信噪比有重要影响.

飞秒激光经角色散后会引引起时间展宽, 直接表现为脉冲宽度随传输距离增大. 脉宽展宽导致峰值功率下降, 会极大降低双光子荧光的激发效率. 飞秒脉冲高斯光束经角色散后脉宽演化的经典理论指出, 脉宽受光谱横向离散效应和群延时色散效应两个因素影响. 但是这一理论假设飞秒脉冲的传输距离小于瑞利长度(大约 1 m), 而实际双光子显微成像光路往往在 3~4 m 左右, 所以经典理论无法直接用于双光子显微成像. 通过分析飞秒高斯光束经角色散器件后任意传输距离处的频域电场表达式, 对经典理论进行拓展, 得到了在更一般情况下的脉宽表达式^[12]:

$$\frac{\tau}{\tau_0} = [(1+U) + \frac{V^2}{1+U}]^{1/2} \quad (1)$$

式(1)中, U 为高斯光束经角色散器件后的横向离散效应, 是指高斯光束经角色散器件后光谱在空间横向展开. V 为群延时色散(GDD: group delay dispersion), 是指高斯光束经过角色散器件后, 不同光谱成分沿不同方向传输, 导致不同光谱成分在传输方向具有相对延迟, 使得整个脉冲包络在时间轴上拉伸, 引起脉冲展宽. 群延时色散除了由角色

散引起外, 还会由色散介质的材料色散 GDD_m 引起. 材料色散是由于飞秒脉冲的不同光谱成分在经过介质时传播速度不同, 造成在传输方向具有相对延迟, 导致脉冲展宽. U 和 V 的具体表达式为^[12]:

$$U = \frac{2\ln 2 z_R^2}{(d + \alpha^2 z)^2 + z_R^2} \left(\frac{2\alpha\beta z}{w_0 \tau_0} \right)^2 \quad (2)$$

$$V = \frac{(4\ln 2)}{\tau_0^2} [GDD_m - k\beta^2 z \frac{(d + \alpha^2 z)d + z_R^2}{(d + \alpha^2 z)^2 + z_R^2}] \quad (3)$$

式(2, 3)中, τ_0 为激光器原始脉宽, w_0 为高速光束的束腰尺寸, α 为角度放大因子, β 为器件的角色散参数, d 为高斯光束束腰到角色散器件的距离, z_R 为高斯光束的瑞利长度, k 为波数, z 为飞秒激光经角色散器件后的传输距离. 以棱镜和声光偏转器为例, 上述理论得到了精确的实验验证^[12-13]. 实验测量结果还证明用高斯光束模型的预测结果更为精确, 而常用的平面波模型则存在较大偏差. 在此基础上, 还建立了统一的脉冲展宽公式^[14], 同时适用于平面波、球面波和高斯光束, 不同光束模型下的脉冲展宽机制也得到了阐述.

飞秒激光经角色散后的空间展宽表现为光斑尺寸随传播距离逐渐增大. 传统估算光斑尺寸的方法大多只采用简单的几何光学方法进行计算, 远不够精确. 飞秒激光的振幅和相位的空间分布接近于高斯型分布, 用高斯光束做模型来研究飞秒激光经过角色散后的光斑展宽. 通过求解高斯光束经角色散后电场分布, 获得了任意传输距离 z 处的光斑尺寸表达式^[15]:

$$w = w_0 \left\{ \frac{1+U}{\alpha^2} \left[1 + \frac{(d + \alpha^2 z)^2}{z_R^2} \right] \right\}^{1/2} \quad (4)$$

从上述公式可以看出, 高斯光束的光斑展宽是两方面因素相乘的结果: a. 角色散引起的光谱横向离散效应; b. 高斯光束本身的发散角. 将该理论用于预测 AOD 对飞秒激光的光斑展宽, 用光斑分析仪测量 AOD 后不同传输距离处的光斑尺寸, 实验结果与高斯光束模型的计算结果非常符合^[15]. 基于这一模型得到的飞秒激光经角色散后啁啾传输规律也得到了证实^[16-17].

2 声光偏转器的色散及补偿方法

如上所述, AOD 扫描飞秒激光时存在严重的色散效应, 制约了声光扫描在双光子显微成像中的应用. 这种色散效应可以分为空间色散和时间色散. 空间色散是由于 AOD 对激光的偏转角度是波长依赖的(公式 5^[6]), 而飞秒激光具有一定的光谱带

宽, 一束飞秒激光经过 AOD 后会有一定的发散角. 时间色散是指不同波长的光经过声光偏转器后在传播方向上具有不同的群速度, 导致飞秒脉冲在时间上被展宽. 空间和时间色散直接的表现是飞秒激光光斑的发散和脉冲的展宽.

$$\theta = \frac{\lambda f}{v} \quad (5)$$

随机扫描显微成像需要两个正交放置的 AOD 来实现二维的声光扫描, 二维声光偏转器的色散效应如图 2 所示. 飞秒激光经过两个 AOD 后, 光斑在倾斜成 45° 方向上被拉伸, 导致物镜聚焦后的光斑面积增大, 形成椭圆形光斑. 这会降低激发光的功率密度, 并且导致扫描图像的畸变. 由于构成 AOD 的声光材料 TeO_2 是一种高色散介质, 飞秒激光经过两个 AOD 后脉宽会从 90 fs 展宽到 572 fs. 而双光子荧光激发效率取决于激发光光强平方的均值 $\langle I(t)^2 \rangle$, 与激发光强均值的平方 $\langle I(t) \rangle^2$ 成正比, 与飞秒激光的脉冲重复频率 R 及脉冲宽度 τ 成反比^[3]. 可见, 脉宽的增加会降低荧光激发效率. 要获得相同的荧光激发效率, 就需要增加激发光强, 这对样品是不利的, 而且会增大荧光漂白速率.

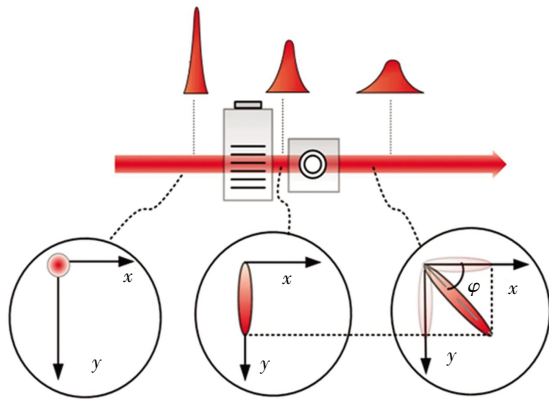


Fig. 2 Spatial and temporal dispersion for two-dimensional AOD^[18]

图 2 二维声光偏转器的空间和时间色散效应^[18]

最上一排的 3 个高斯脉冲分别表示飞秒激光进入 AOD 前、经过第 1 个 AOD 及经过 2 个 AOD 后的脉冲形状, 最下一排的圆圈中展示了一个圆光斑分别经过 1 个和 2 个 AOD 后光斑形状的改变.

由于缺乏有效的 AOD 色散补偿方法, 飞秒激光的声光扫描一直未能得到广泛应用. 通常在解决这一问题时都是采用空间色散和时间色散分别补偿的思路^[8-11]. 即利用一个空间色散大小相同、方向

相反的角色散器件补偿 AOD 的空间色散, 再利用飞秒光学里经典的棱镜对或者光栅对方案, 提供负的群延时色散, 来补偿 AOD 的时间色散. 分别补偿的方法使得 AOD 的色散补偿光路极其复杂, 难以调节和维护, 系统透过率低, 时间色散补偿距离需要 3~4 m, 占用很大的空间, 这些缺点导致其不便于广泛应用. 对飞秒激光经角色散器件后空间和时间展宽效应的理论研究发现, 空间色散和时间色散实际上是通过角色散这个因素耦合在一起的, 角色散器件可以同时提供空间和时间色散, 所以在补偿 AOD 的两种色散时只需要引入一个角色散器件. 如图 3 所示, 通过调节光束到棱镜的入射角 φ 来改变棱镜提供的角色散量, 以补偿 AOD 的空间色散, 然后通过调节棱镜到 AOD 的距离 L 来改变由棱镜角色散引起的群延时色散量, 以补偿 AOD 的时间色散^[19]. 这种同时补偿的方法极大简化了色散补偿光路, 补偿距离只需要 35 cm, 增加了系统透过率, 使得飞秒激光的能量可以得到充分利用. 为补偿二维 AOD 的空间色散, 补偿棱镜需要从水平放置改为 45° 角放置, 通过监测补偿后的脉宽达到最短来调节补偿距离的大小. 这种单棱镜同时补偿的方案可以很方便地推广到其他角色散器件, 比如光栅或者 AOD^[18].

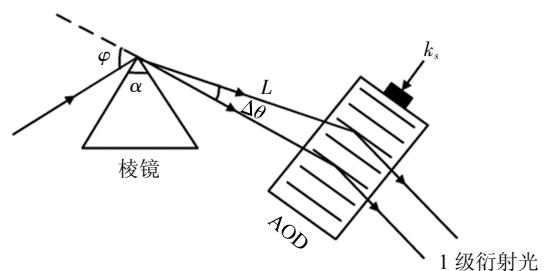


Fig. 3 Simultaneously compensate the spatial and temporal dispersion of AOD using a single prism^[20]

图 3 利用单棱镜同时补偿 AOD 的空间和时间色散^[20]

从飞秒激光经角色散器件后脉宽和光斑的演化理论看, 色散效应除了受角色散器件的参数 α 、 β 影响外, 与高斯光束的特性参数, 如 w_0 、 d 、 z_R 等也直接相关. 所以实际做色散补偿时, 除改变器件的参数外, 还可通过改变光束本身的特性参数, 以改变光谱横向离散效应和群延时色散, 达到最优补偿目的. 扩束后的飞秒激光相对于不扩束, 可以使角色散器件提供的负色散量提高一个数量级, 用更

短的补偿距离得到更接近原始脉宽的飞秒脉冲^[21]. 单个器件同时补偿 AOD 时空色散的方法正逐渐得到应用. 基于这种方法所构建的系统已用于获取神经网络的快速功能活动^[22-23].

3 随机扫描双光子显微成像仪器

基于同时补偿空间和时间色散的二维声光偏转器, 结合普通显微镜, 可构建一套随机扫描双光子显微成像仪器^[24-25], 如图 4 所示. 仪器在硬件上主要包括飞秒脉冲激光器、预处理光路、色散补偿光路、AOD、显微镜导入光路、显微镜(图 4 虚线框内的部分)、荧光探测光路、荧光探测器、AOD 驱动器、数据与图像采集卡、控制主机等主要部分.

预处理光路是将飞秒激光光束进行扩束和准直. 采用单个棱镜倾斜 45° 放置来同时补偿二维 AOD 的空间和时间色散. 调节棱镜的入射角来补偿两个 AOD 均工作于中心频率时的空间色散量. 然后调节棱镜和 AOD 之间的距离使物镜后脉宽最短, 来补偿时间色散. 通过改变 AOD 的信号频率就可以实现不同角度的扫描, 改变射频信号的幅度还可以实现光强的控制. 显微镜导入光路的作用使扫描光路的光轴与显微镜的光轴重合. 扫描透镜与

显微镜自带的筒镜组成一个中继光路, 将 AOD 中心位置成像到物镜的后焦面进行扫描. 需要合理选择两个透镜的焦距比, 以获取合适的光斑和扫描角大小. 比如, 两透镜组合可实现扩束的效果, 同时 AOD 的扫描角范围就会被缩小相应的倍数. 进入物镜的光斑大小直接决定了物镜的有效数值孔径, 从而决定成像的空间分辨率; 而扫描范围的大小直接决定了扫描成像的视场大小, 所以扫描透镜焦距的选取需要折中考虑. 荧光探测器采用光电倍增管(PMT), 双通道的结构可用来同时观察双色标记的荧光. 因为双光子荧光成像时不需要共聚焦成像时的针孔结构, 所以可以不经过退扫描. 通过设计探测光路使得探测器尽可能地靠近物镜, 以提高荧光收集效率. AOD 的扫描光路可以方便地与商品化的正置荧光显微镜(如 BX61WI, Olympus)整合到一起, 在实现随机扫描的同时, 还可实现落射式荧光成像及红外 DIC 成像等多种成像模式. 系统中 AOD 扫描控制、PMT 信号采集及光强控制等是由多功能数据采集卡和计算机来完成的. 系统软件基于 LabVIEW 编写, 可以实现荧光图像的全场/局部扫描, 感兴趣区域的选取及随机扫描, 荧光信号的采集及实时显示等功能.

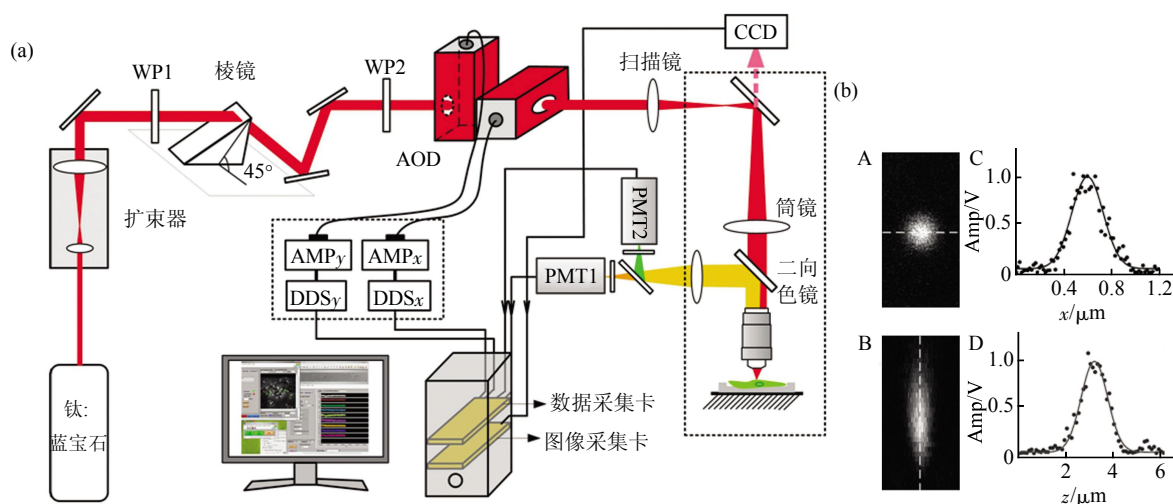


Fig. 4 The schematic of random-access two-photon microscopy and the measurement results of spatial resolution^[25]

图 4 随机扫描双光子显微成像系统及空间分辨率测量结果^[25]

(a) 成像系统示意图. WP: 1/2 波片, PMT: 光电倍增管, DDS: 直接数字合成器, AMP: 功率放大器. (b) 用 170 nm 荧光小球测得的横向和纵向空间分辨率. A: 170 nm 小球荧光图的横向截面; B: 纵向截面; C: 横向荧光强度分布曲线; D: 纵向荧光强度分布曲线.

目前随机扫描双光子显微成像的仪器可以实现与商品化双光子显微镜相当的空间分辨率. 用 60 倍、数值孔径为 1.42 的油镜测量的空间分辨率为横向 0.3 μm , 纵向 1.3 μm . 相比于传统的扫描方式, AOD 不受机械惯性影响, 可以选择性地快速

随机寻址, 实现更灵活的扫描. 采用每点 10 μs 的停留时间, 对视场内 100 个感兴趣区域进行扫描, 可以实现 1 kHz 的扫描速率, 这一点是传统扫描显微镜无法比拟的.

4 随机扫描神经成像中钙信号的识别

利用随机扫描双光子显微成像仪器, 可以对神经回路中多个位点的活动进行同步的监测^[26-30]. 神经元的钙信号受噪声、慢动力学和非线性变化的影响, 难以直接用于构造神经元回路. 所以为了确定神经元之间的功能连接, 观测神经回路的动态变化模式, 需要精确的重建方法从钙信号中重建出对应的神经元电活动^[31].

从钙荧光信号重建神经元峰值电位, 常用的方法有模板匹配法^[32]、逆卷积法^[33]和序列蒙特卡洛方法^[34]等. 其中, 模板匹配法是用一个标准的钙荧光信号模板波形和实际信号的波形进行匹配, 综合波形和幅度信息来识别峰电位发放. 这种方法具有较强的抗噪声能力, 但只适合于峰电位发放比较稀疏的情况, 对神经元群落的簇发放信号无能为力; 基于卷积系统发展的逆卷积方法, 可以用来重建峰电位簇发, 但它用钙信号上升速率来识别峰电位, 实际钙信号波形上升限短下降限长, 使得上升限很容易受到噪声干扰. 所以逆卷积算法不适合解析低信噪比的钙荧光信号; 序列蒙特卡洛方法能适应较低信噪比的钙荧光信号分析, 但是假设限制很多, 并且得到的解可分离性较低.

利用多尺度滤波 - 模板卷积(MSF_TC)的方法可以基本克服上述方法的缺点^[35], 实现较低信噪比情况下峰电位簇发放的钙信号解析, 能成功地从钙信号中识别 40 Hz 以内的峰电位. 其基本实现过程为: 用一个低尺度的低通滤波器(10 Hz)来降低噪声, 识别存在峰电位发放的时间段, 作为有效钙信号段; 再用一个较大尺度的低通滤波器(100 Hz)保留信号的细节信息, 识别有效钙信号段的峰电位发放时刻; 通过阈值估计出神经元产生电活动的时间区间, 并对该区间里信号进行差分, 差分信号的峰值时刻作为峰电位发放的预估时刻; 将预估时刻序列集与模板函数作卷积, 得到若干模拟信号; 将这些模拟信号与实际信号进行比较, 差异最小者对应的序列信息即为重建的峰电位发放时间序列. 如图 5 实验所示, MSF_TC 方法能够有效解析神经元群落的复杂钙信号, 重建的峰电位序列与真实情况可以很好地吻合. MSF_TC 方法利用低尺度滤波来提取有效信号段, 能够去除噪声段干扰; 采用模板卷积能够剔除虚假峰电位, 保留真实峰电位. 它更好地适应了峰电位簇发放对应的钙荧光信号的多样性, 适合峰电位簇发放的重建, 为准确获取神经网络功能结构提供了有力的保障.

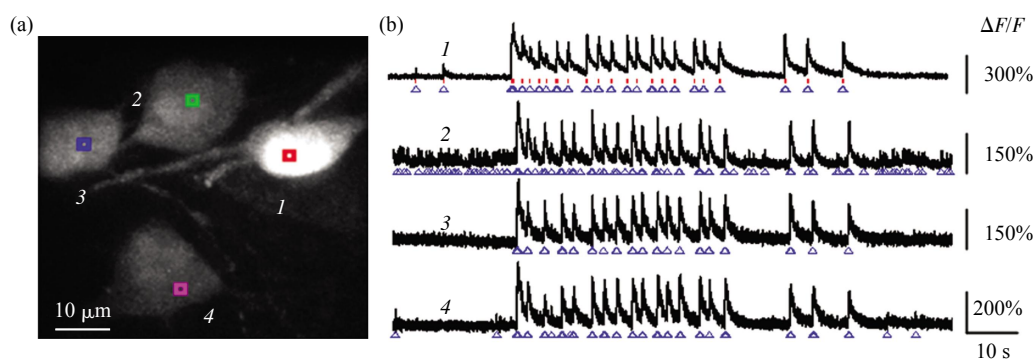


Fig. 5 High frequency calcium signal detection of multi-cells and spike reconstruction

图 5 多细胞高频钙荧光信号的探测及峰电位重建

(a)同步记录钙荧光信号的 4 个神经元, 采用电极逐个注入的方法进行 100 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-5F 钙染料的标记, 每个细胞荧光信号的采样时间为 250 μs , 其中 1 号细胞同时进行电生理信号的记录. (b)药物诱导细胞产生癫痫样发放时的钙荧光信号(黑色线)以及重建出的峰电位序列(蓝色三角形), 红色竖线为 1 号细胞的真实峰电位发放序列.

5 随机扫描双光子显微成像技术的发展趋势

综上所述, 飞秒激光经角色散器件后时空演化理论及高效简洁的色散补偿方法的建立, 使飞秒激

光声光扫描在双光子显微成像中得以应用. 随机扫描双光子显微成像仪器为大脑微回路神经信息处理的研究提供了一种全新的手段. 通过精确的峰电位重建方法, 可以有效地解析神经元群落的钙信号,

有助于构建神经回路的功能连接。

为进一步满足神经科学需要,随机扫描双光子显微成像技术也还有待进一步发展和完善。未来的发展趋势可以概括为以下几个方面:

a. 实现更大的视场范围。AOD 是实现随机扫描双光子显微成像的核心器件,相比于其他扫描器件,它可以获得无惯性的跳跃式扫描,具有快速、高精度和高重复性的优点。但是受 Bragg 频率带宽的限制,AOD 的扫描角度范围较小,一般小于 3° ,而显微物镜可接受的角度范围大约为 $5^\circ \sim 6^\circ$ ^[36],这导致随机扫描成像的视场较小。为了采用更大的视场观察神经微回路,通常采用光学角放大的方法^[22-23,26],但这会牺牲空间分辨率和信噪比。解决 AOD 扫描角度小的根本方法是从器件设计入手,综合考虑 AOD 的各项参数指标,增大 AOD 的工作带宽。

b. 三维随机扫描双光子显微成像。目前用双轴 AOD 实现的是二维随机扫描,轴向仍是通过机械电动的方法扫描。在二维随机扫描的基础上实现三维随机扫描,最关键的能在轴向快速、无惯性地移动光束焦点。Reddy 等^[37]利用 4 个 AOD 演示了三维随机扫描的系统。通过快速扫描声波频率,使得 AOD 等效于一个柱透镜,改变频率变化率获得不同的透镜焦距。目前这种方法的缺点是扫描过程中由于后面几个 AOD 无法满足 Bragg 角入射导致衍射效率下降很快,轴向扫描范围只有不到 $50 \mu\text{m}$ 。而且 4 个 AOD 引入的时间色散量很大,很难完全补偿,需要通过增加激发光功率来提高双光子激发效率的降低。Kirkby 等^[38]优化了 AOD 的设计,增大了 AOD 的可接受入射角,缩短了晶体长度,使得衍射效率和轴向扫描范围有所增加,且时间色散量更容易补偿。但这种方法应用于三维神经成像仍然有很多问题。比如,快速扫描造成激发光斑产生的畸变没有得到有效地校正,使得图像产生畸变;扫描范围内的衍射效率不够均匀,导致扫描体积只能是一个八面体,而无法在更大范围内实现有效的双光子激发。这些问题的解决需要进一步优化 AOD 设计,引入实时光斑校正的新方法。

c. 光纤化的随机扫描系统。目前随机扫描双光子显微成像技术已用于活体动物的钙成像^[23],但仅限于麻醉的动物。研究表明,动物在麻醉和清醒状态下的神经响应是不同的^[39]。为了能将随机扫描双光子显微成像技术应用于活体清醒动物的研究,需要将成像仪器光纤化和微型化。将声光扫描与光纤双光子内窥成像^[40-41]相结合,有望实现光纤化的

随机扫描双光子显微成像系统。

d. 以单个峰电位精度解析低信噪比的非线性钙信号。随机扫描提供了观测神经网络快信号的方法,但是信号识别与解析的方法还不够完善。基于卷积系统发展的峰电位重建方法在很多情况下都是有效的,但当峰电位簇发放持续时间较长,钙离子浓度处于即将饱和或饱和状态时会产生钙信号的非线性响应。如何从低信噪比、非线性变化的钙信号中以单峰电位精度重建出电活动是钙信号解析下一步要解决的问题。

总之,随机扫描双光子显微成像技术的进一步发展、完善和应用,有望实现对活体动物三维神经微回路活动的动态观测,增加人们对于大脑在回路水平的信息处理机制的了解,推动脑科学研究的发展。

参 考 文 献

- [1] Gobel W, Helmchen F. *In vivo* calcium imaging of neural network function. *Physiology*, 2007, **22**(6): 358-365
- [2] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, **248**(4951): 73-76
- [3] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(11): 1369-1377
- [4] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2005, **2**(12): 932-940
- [5] Svoboda K, Yasuda R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron*, 2006, **50**(6): 823-839
- [6] Xu J, Stroud R. *Acousto-Optic Devices: Principles, Design and Applications*. New York: John Wiley and Sons, 1992
- [7] Bullen A, Patel S S, Saggau P. High-speed, random-access fluorescence microscopy: I. High-resolution optical recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators. *Biophys J*, 1997, **73**(1): 477-491
- [8] Iyer V, Losavio B E, Saggau P. Compensation of spatial and temporal dispersion for acousto-optic multiphoton laser-scanning microscopy. *J Biomed Opt*, 2003, **8**(3): 460-471
- [9] Lechleiter J D, Lin D T, Siemart I. Multi-photon laser scanning microscopy using an acoustic optical deflector. *Biophys J*, 2002, **83**(4): 2292-2299
- [10] Roorda R D, Hohl T M, Toledo-Crow R, *et al.* Video-rate nonlinear microscopy of neuronal membrane dynamics with genetically encoded probes. *J Neurophysiol*, 2004, **92**(1): 609-621
- [11] Ngoi B K A, Venkatakrishnan K, Tan B, *et al.* Angular dispersion compensation for acoustooptic devices used for ultrashort-pulsed laser micromachining. *Opt Express*, 2001, **9**(4): 200-206
- [12] Zeng S Q, Li D R, Lv X H, *et al.* Pulse broadening of the femtosecond pulses in a Gaussian beam passing an angular

- disperser. *Opt Lett*, 2007, **32**(9): 1180–1182
- [13] Li D R, Zeng S Q, Lv X H, *et al.* Dispersion characteristics of acousto-optic deflector for scanning Gaussian laser beam of femto-second pulses. *Opt Express*, 2007, **15**(8): 4726–4734
- [14] Li D R, Lv X H, Zeng S Q, *et al.* A generalized analysis of femtosecond laser pulse broadening after angular dispersion. *Opt Express*, 2008, **16**(1): 237–247
- [15] Li D R, Lv X H, Zeng S Q, *et al.* Beam spot size evolution of a Gaussian beam after angular dispersion. *Opt Lett*, 2008, **33**(2): 128–130
- [16] Li D R, Zeng S Q, Luo Q M, *et al.* Propagation dependence of chirp in Gaussian pulses and beams due to angular dispersion. *Opt Lett*, 2009, **34**(7): 962–964
- [17] Li D R, Lv X H, Bowlan P, *et al.* Evolution of the frequency chirp of Gaussian pulses and beams when passing through a pulse compressor. *Opt Express*, 2009, **17**(19): 17070–17081
- [18] Zeng S Q, Lv X H, Bi K, *et al.* Analysis of the dispersion compensation of acousto-optic deflectors used for multiphoton imaging. *J Biomed Opt*, 2007, **12**(2): 024015
- [19] Zeng S Q, Lv X H, Zhan C, *et al.* Simultaneous compensation for spatial and temporal dispersion of acousto-optical deflectors for two-dimensional scanning with a single prism. *Opt Lett*, 2006, **31**(8): 1091–1093
- [20] 李德荣, 吕晓华, 吴 萍, 等. 声光偏转器扫描飞秒激光的时间色散补偿. *物理学报*, 2006, **55**(9): 4729–4733
Li D R, Lv X H, Wu P, *et al.* *Acta Physica Sin*, 2006, **55**(9): 4729–4733
- [21] Du R, Jiang R H, Fu L. Enhanced dispersion compensation capability of angular elements based on beam expansion. *Opt Express*, 2009, **17**(19): 16415–16422
- [22] Kremer Y, Leger J F, Lapole R, *et al.* A spatio-temporally compensated acousto-optic scanner for two-photon microscopy providing large field of view. *Opt Express*, 2008, **16**(14): 10066–10076
- [23] Grewe B F, Langer D, Kasper H, *et al.* High-speed *in vivo* calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision. *Nat Methods*, 2010, **7**(5): 399–405
- [24] Lv X H, Zhan C, Zeng S Q, *et al.* Construction of multiphoton laser scanning microscope based on dual-axis acousto-optic deflector. *Rev Sci Instrum*, 2006, **77**(4): 046101
- [25] 吕晓华, 占 成, 张红民, 等. 随机扫描多光子荧光显微成像系统. *光学学报*, 2006, **26**(11): 1823–1828
Lv X H, Zhan C, Zhang H M, *et al.* *Acta Optica Sin*, 2006, **26**(11): 1823–1828
- [26] Iyer V, Hoogland T M, Saggau P. Fast functional imaging of single neurons using random-access multiphoton (RAMP) microscopy. *J Neurophysiol*, 2006, **95**(1): 535–545
- [27] Otsu Y, Bormuth V, Wong J, *et al.* Optical monitoring of neuronal activity at high frame rate with a digital random-access multiphoton (RAMP) microscope. *J Neurosci Meth*, 2008, **173**(2): 259–270
- [28] Liu X L, Lv X H, Zeng S Q, *et al.* Non-contact and non-destructive identification of neural circuits with a femtosecond laser. *Appl Phys Lett*, 2009, **94**(6): 061113
- [29] Zhou W, Liu X L, Lv X H, *et al.* Monitor and control of neuronal activities with femtosecond pulse laser, *Chinese Sci Bull*, 2008, **53**(5): 687–694
- [30] Wu Y X, Liu X L, Zhou W, *et al.* Observing neuronal activities with random access two-photon microscope. *J Innovative Optical Health Sciences*, 2009, **2**(1): 67–71
- [31] Grewe B F, Helmchen F. Optical probing of neuronal ensemble activity. *Curr Opin Neurobiol*, 2009, **19**(5): 520–529
- [32] Kerr J N, Greenberg D, Helmchen F. Imaging input and output of neocortical networks *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(39): 14063–14068
- [33] Yaksi E, Friedrich R W. Reconstruction of firing rate changes across neuronal populations by temporally deconvolved Ca^{2+} imaging. *Nat Method*, 2006, **3**(5): 377–383
- [34] Vogelstein J, Watson B, Packer A, *et al.* Spike inference from calcium imaging using sequential monte carlo methods. *Biophys J*, 2009, **97**(2): 636–655
- [35] Quan T W, Liu X L, Lv X H, *et al.* Methods to reconstruct neuronal action potential train from two-photon calcium imaging. *J Biomed Opt*, 2010, **15**(6): 066002
- [36] Pawley J B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (third edition). New York: Springer, 2006
- [37] Reddy G D, Kelleher K, Fink R, *et al.* Three-dimensional random access multiphoton microscopy for functional imaging of neuronal activity. *Nat Neurosci*, 2008, **11**(6): 713–720
- [38] Kirkby P A, Nadella K M, Sliver R A. A compact acousto-optic lens for 2D and 3D femtosecond based 2-photon microscopy. *Opt Express*, 2010, **18**(12): 13721–13745
- [39] Greenberg D S, Houweling A R, Kerr J N. Population imaging of ongoing neuronal activity in the visual cortex of awake rats. *Nat Neurosci*, 2008, **11**(7): 749–751
- [40] Fu L, Gan X S, Gu M. Nonlinear optical microscopy based on double-clad photonic crystal fibers. *Opt Express*, 2005, **13**(14): 5528–5534
- [41] Fu L, Gu M. A double-clad photonic crystal fiber coupler for compact nonlinear optical microscopy imaging. *Opt Lett*, 2006, **31**: 1471–1473

Random-access Two-photon Microscopy for Neural Activity Observation*

JIANG Run-Hua, LÜ Xiao-Hua, LI De-Rong, QUAN Ting-Wei, LIU Xiu-Li, LUO Qing-Ming, ZENG Shao-Qun**

*(Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics,
College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)*

Abstract Two-photon microscope has become an important instrument in neuroscience research. However, the current commercial instruments can hardly meet the need for the detection of neural signal in millisecond scale due to their low imaging rates. Fast random-access two-photon microscopy based on acousto-optic deflector (AOD) has the potential for increasing the observation speed while maintaining adequate signal to noise ratio (SNR). We summarize the latest related research progress. It is demonstrated from four parts, including the spatio-temporal evolution theory of the femtosecond laser after passing the angular dispersion devices, dispersion compensation method for AOD, random-access two-photon microscopy instrument, and calcium signal identification method in the instrument applications. In the end, the future development trends for random-access two-photon microscopy are discussed. The systematic and in-deep research on this technology will provide a new tool for the neural activity observation and boost the development of brain science.

Key words femtosecond laser, random-access scan, acousto-optic deflector, dispersion compensation, two-photon microscopy, calcium signal, spike reconstruction

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00234

* This work was supported by a grant from The National Science Fund for Distinguished Young Scholars of China (30925013).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87792033, E-mail: sqzeng@mail.hust.edu.cn

Received: April 30, 2012 Accepted: May 17, 2012