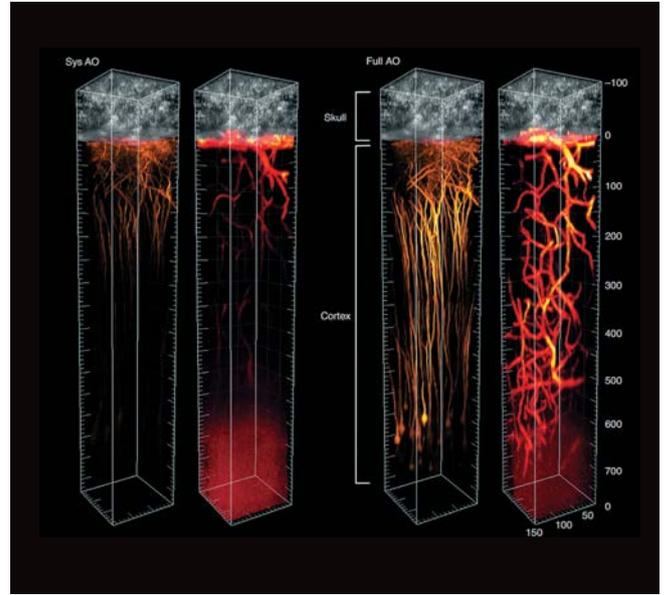
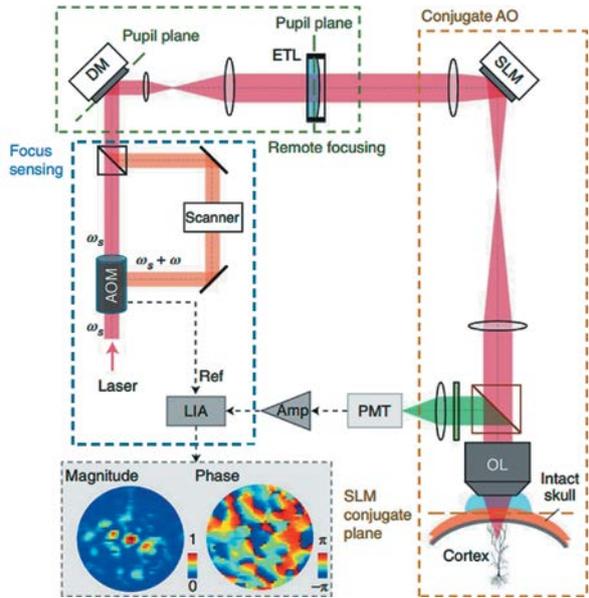


非线性显微镜

功能性 3P 神经成像

实时记录清醒的动物大脑深层的单神经元活动对于理解行为以及大脑活动和功能至关重要。通过使用在SWIR范围内可调谐的高功率,高能量,中等重复频率激光进行神经元成像和刺激可以推进这些应用的发展,该波长范围跨越1300 nm和 1700 nm 的生物透明窗口。对于深部组织中的双光子和三光子激发荧光(2PEF,3PEF)和谐波产生(SHG,THG)成像,可输出色散可控飞秒脉冲的I-OPA系列,ORPHEUS 系列OPAs和显微镜专用CRONUS 激光器确实是最佳选择。



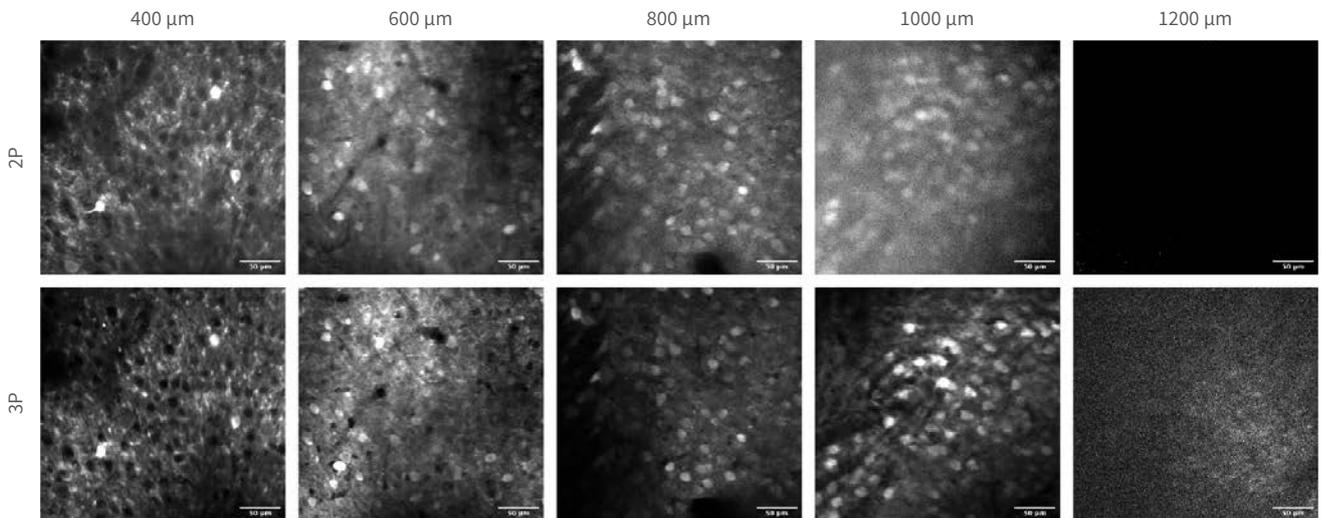
3P 显微镜,具有用于聚焦传感和整形的自适应光学器件,以补偿像差和散射。在 1300 nm 处的 ORPHEUS-F 激发能够在完整的大脑中在远视下方 1.1 mm 处成像。

感谢香港科技大学的Jianan Y. Qu团队提供的图片。来源:Zh. Qin et al., Deep tissue multi-photon imaging using adaptive optics with direct focus sensing and shaping, Nature Biotechnology 40 (2022)。

小鼠大脑深层的双光子 (2P) 和三光子 (3P) 钙成像

三光子显微镜 (3PM) 作为一种能够扩展双光子显微镜 (2PM) 功能的工具而日益受到欢迎,它能够使大脑以及肿瘤和骨骼的更深层组织成像。双光子显微镜

(2PM) 的成像深度受到组织内激发光的散射和吸收的限制。三光子显微镜 (3PM) 克服了这一限制,因为三光子激发的更高非线性降低了背景噪声。

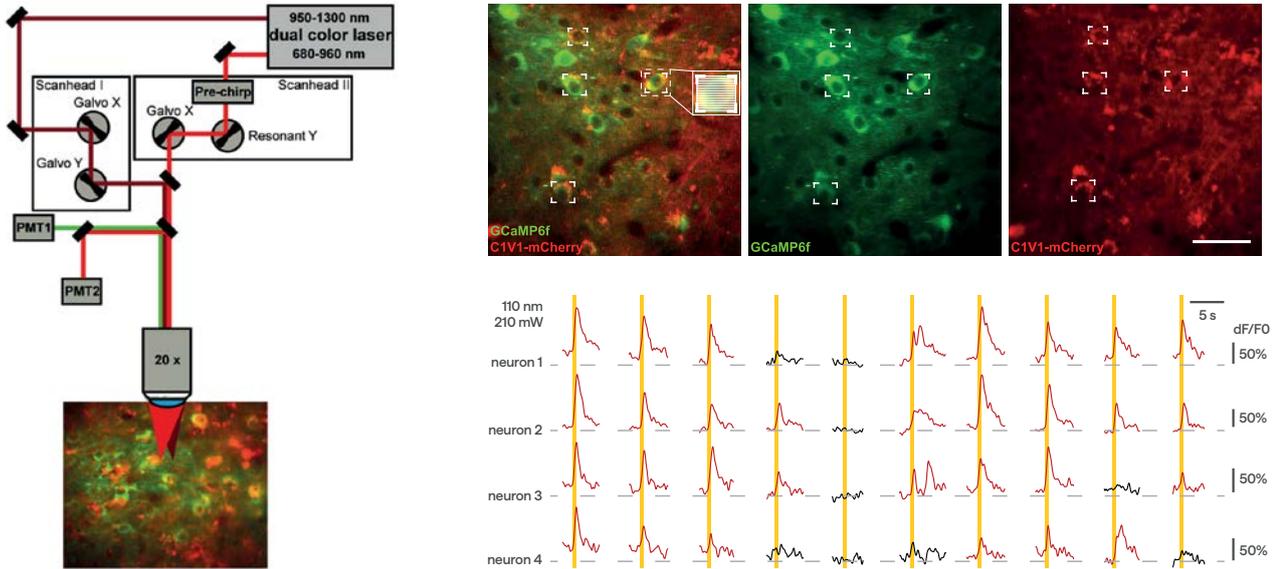


图片为Thorlabs Bergamo II显微镜下,使用典型的2P激光和Light Conversion CRONUS-3P (3P) 激光,在920纳米和1300纳米波长下,对小鼠视觉皮层GCaMP神经元进行了体内双光子 (2P) 和三光子 (3P) 钙成像的对比。

由CSHL ISFNS 2024课程组织者Willis Broden Jr.和Sergey Matveev (Thorlabs) 提供。

2P 光遗传学

尽管三光子激发源在输出更长波长和更高脉冲能量方面更有优势,但当成像速度是首要考虑因素时,基于可调谐高重复率振荡器激光器仍能更好地解决某些成像挑战。对于这些应用,具有三个光学同步输出的CRONUS-2P激光器给出了终极解决方案,其中两个输出是独立可调的。三光源可实现多种多光子激发途径,其中许多途径是使用传统的单光束和双光束解决方案无法实现的。此外,两光束的独立可调性可实现全新相干拉曼散射模式。

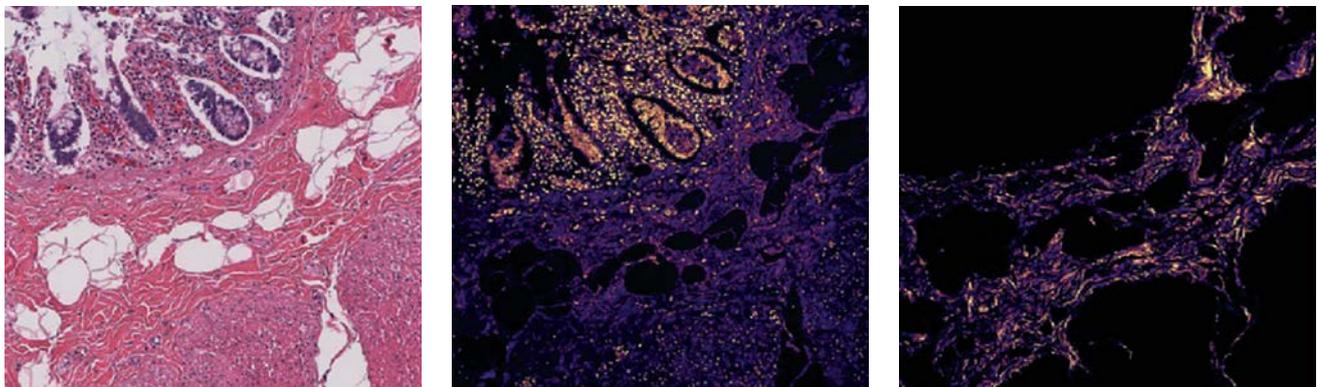


使用 CRONUS-2P 对单个神经元进行 2P 光遗传学刺激。

由 Albrecht Stroh 小组,美因茨大学医学中心和莱布尼茨弹性研究所提供。
来源: T. Fu 等人,《探索双光子超过 1100 nm 的光遗传学,用于特定和有效的全光生理学》(iScience 24 (2021))。

光栅扫描 2P / 3P 显微镜

对于需要固定波长飞秒激光的应用,如在 $1\ \mu\text{m}$ 处被激发的多光子驱动荧光 (MPEF) 和谐波发生 (SHG, THG) x 显微学, FLINT 振荡器作为高性能固态光源曾经经过无数验证,也有着工业级封装和紧凑体积的优点。尤其, FLINT 振荡器在提供 24/7 的稳定操作,具有如下出色的噪声特性,在 200kHz 以上时 $\text{RIN} < 140\text{dBc/Hz}$, 和 1MHz 以上时散粒噪声限在 -160dBc/Hz 。

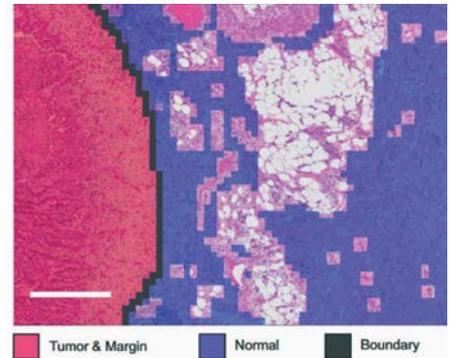
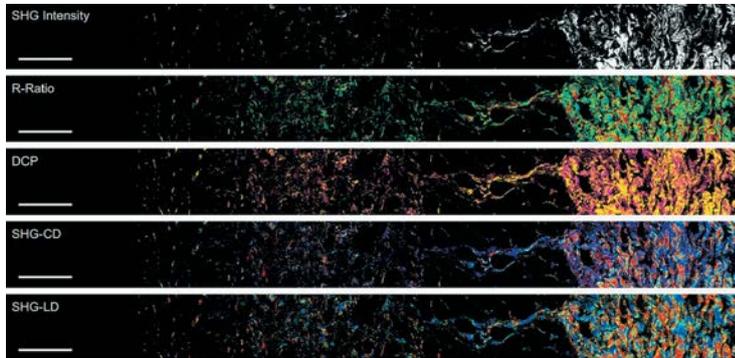


使用 FLINT 飞秒振荡器拍摄的 H&E 染色结肠的 SHG 和 THG 图像。

由维尔纽斯大学 Virgis Barzda 小组提供。

宽场偏振二次谐波显微镜

依赖影像学的癌症诊断与外科治疗要求高度特异性和高通量。偏振分辨二次谐波生成 (P-SHG) 显微镜在可视化伴随肿瘤发展的胶原网络和细胞外基质结构变化方面展现出潜力。该技术无需标记且与深度活体组织成像兼容。然而,传统的光栅扫描方式在临床应用上显得过于缓慢,且P-SHG的结构灵敏度解释通常较为复杂。非线性宽场显微镜通过利用放大的飞秒激光,有效提升了成像的数量和视野范围。同时,机器学习 (ML) 能够实现数据驱动的分析,例如对肿瘤边缘的自动化描绘和测评。PHAROS和CARBIDE激光器,结合机器学习增强的宽场显微镜,有望将非线性显微镜的优势拓展至生物医学和临床应用所需的规模。

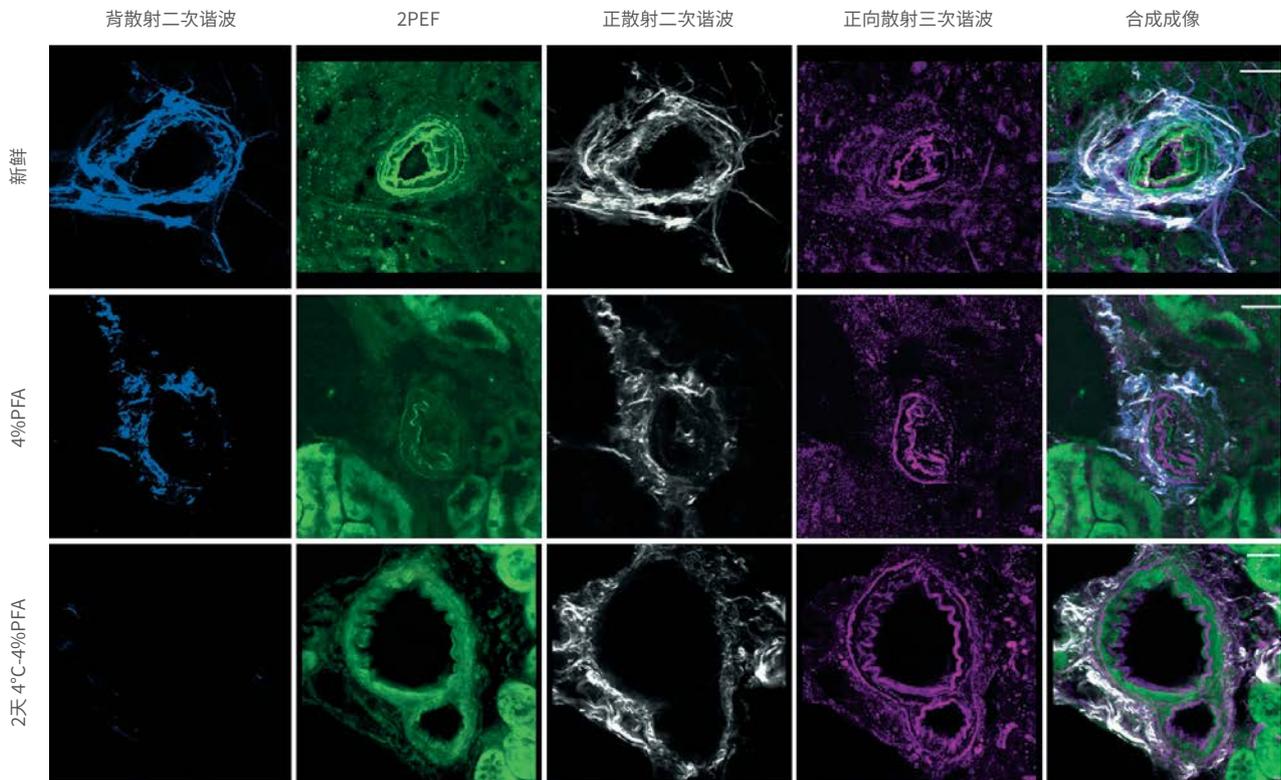


使用 PHAROS 激光对人肺组织肿瘤边缘进行大面积宽场偏振分辨二次谐波显微镜检查。在无监督机器学习中使用图像参数,如 SHG 强度,R比和圆偏振度,以及 SHG 圆形和线性二向色性,来确定肿瘤边界。

图片由多伦多大学 Virginijus Barzda 小组和 Princess Margaret Cancer Centre 的 Brian C. Wilson 小组提供。来源: Mirsanaye 等人,《使用宽场偏振二次谐波显微镜的无监督肺肿瘤边缘确定》(Scientific Reports 12 (2022))。

SH,THG 和 2P 成像

福尔马林等化学试剂常被用于保存生物组织,以使其结构尽可能接近原生状态。然而,这些试剂的化学成分会与生物组织的分子发生化学反应从而改变它们的结构。为了更好地评估化学试剂对生物组织造成的改变,利用非线性双光子 (2P) 显微镜和 CRONUS-2P 飞秒激光,研究了化学固定剂等对小鼠组织内蛋白质组分非线性能力的影响。这些技术利用了组织成分的 SHG 和 THG 发射特性。



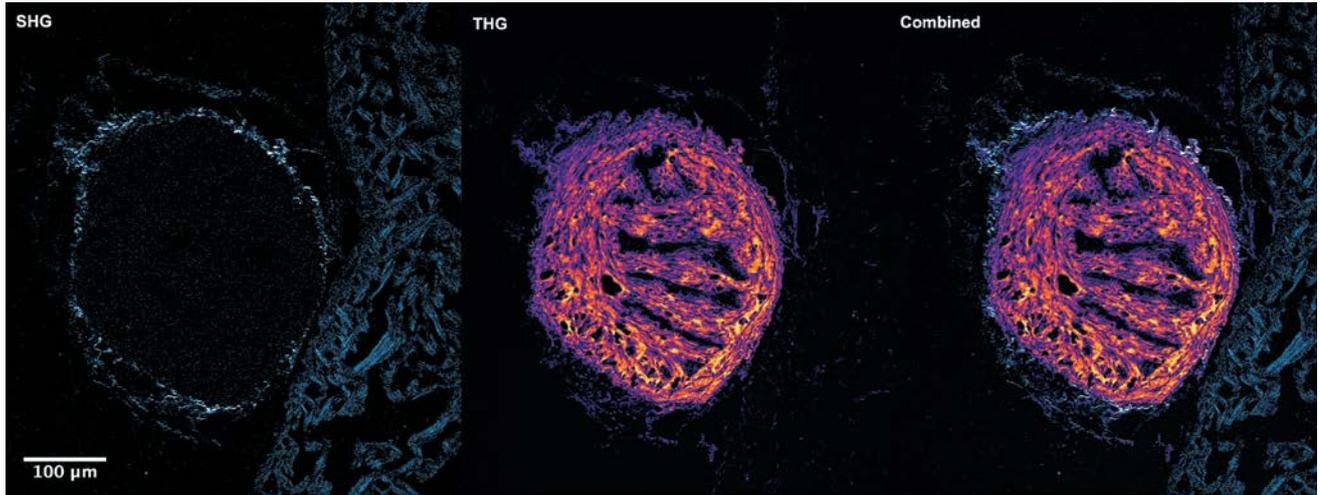
小白鼠肾脏切片在经过不同处理方式后使用 CRONUS-2P 飞秒激光光源观察其中胶原蛋白的 SHG 信号和弹性蛋白的 2PEF,THG 信号。

由德国马普多学科科学研究所的 Frauke Alves 和 Fernanda Ramos-Gomes 提供。

SHG 和 THG 联合成像

该研究使用FLINT飞秒振荡器对成年斑马鱼心室切片进行成像,以研究疤痕形成。明场图用马森三色染色法(MT)染色,其中结缔组织呈蓝色,

肌肉呈红色/棕色。二次谐波(SHG)和三次谐波(THG)产生的图像揭示了主动脉球囊表面的胶原和肌肉结构,而MT染色的弹性蛋白则在THG中可视化地显示在中心。



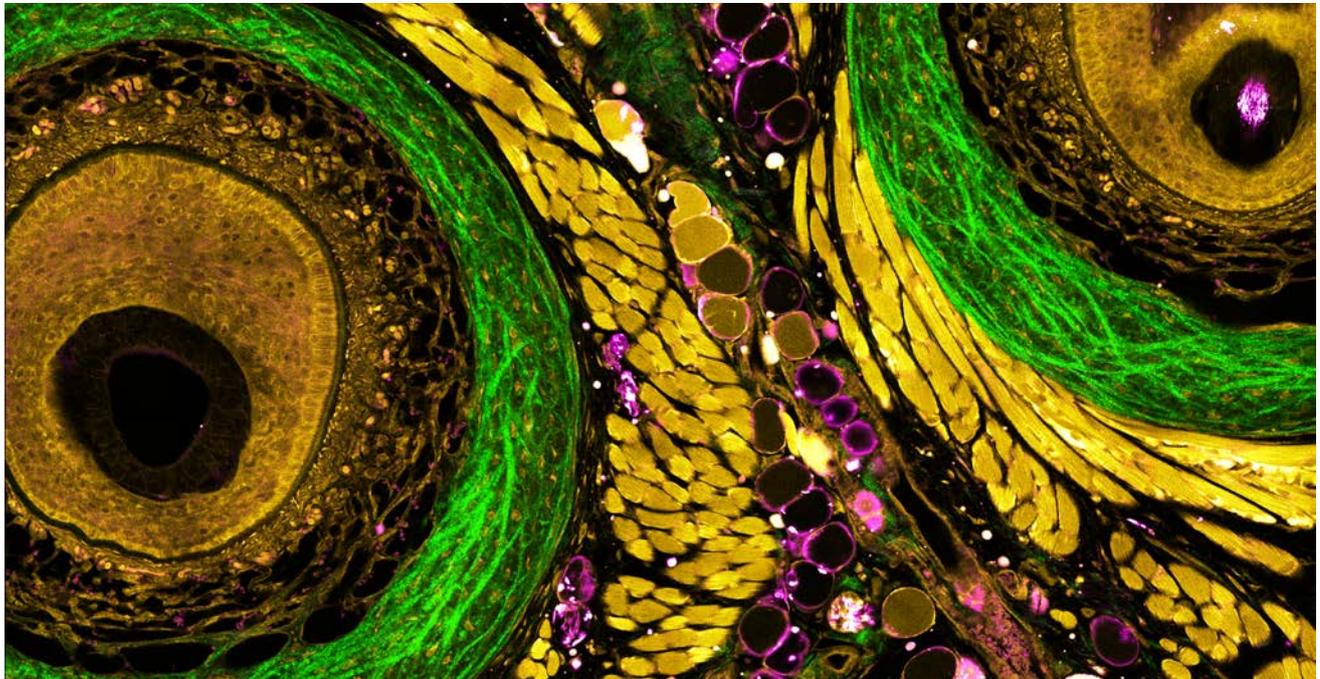
FLINT 飞秒振荡器被用于成年斑马鱼的心室成像。

样品由维尔纽斯大学生命科学中心的 Justas Lazutka 提供。非线性成像由维尔纽斯大学物理系 Barzda 小组提供。

无标记活体成像

了解生物复杂性需要能够提供多重分子对比度且对生物体干扰最小的成像工具。为了满足这一需求,麻省理工学院S. You实验室正在开发一种通过使用CRONUS-3P的非侵入性、无标记显微镜方法来可视化生物系统。

作为神经病理性疼痛研究的一部分,该图像揭示了一个未经处理、完整的小鼠触须垫的丰富微观环境:包括由肌肉(黄色)支撑的毛囊构成的胶原胶囊(绿色)、脂肪细胞(紫色)、间质细胞和免疫细胞。



使用无标记显微镜观察小鼠触须垫。

由麻省理工学院的Sixian You团队提供。