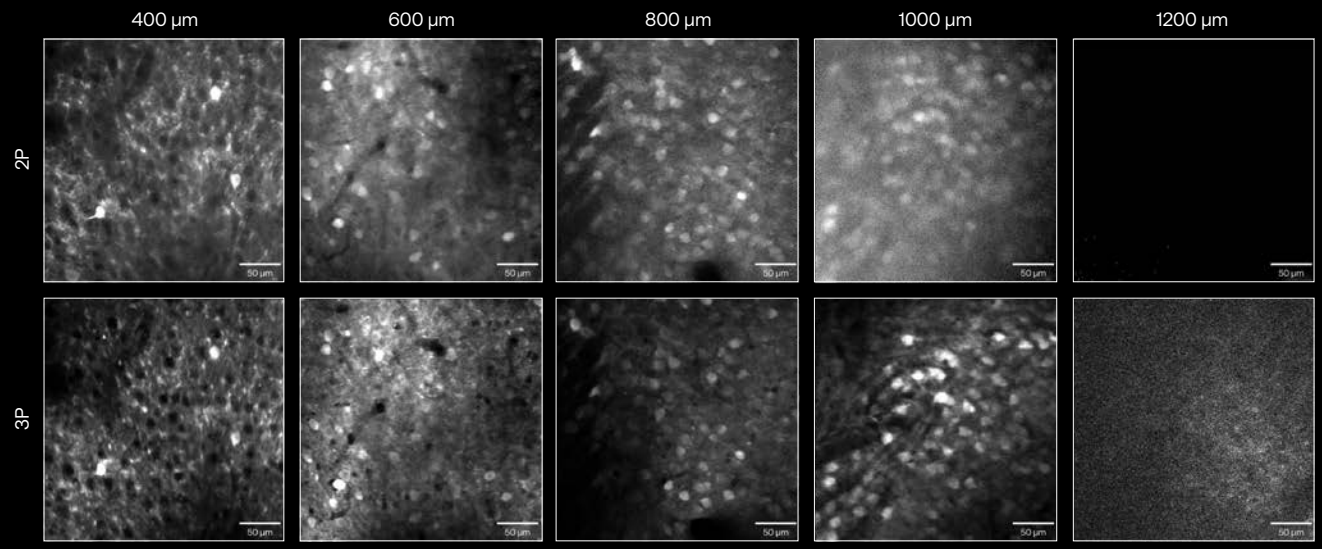
非线性显微镜
在体三光子成像

在清醒动物的大脑深层记录单个神经元的实时活动，对于理解行为、大脑连接机制及功能至关重要。这类研究应用借助高功率、高脉冲能量、中等重复频率且可在短波红外波段调谐的激光器实现神经元成像与刺激，从而取得了显著进展 — 该波段包含1.3 µm和1.7 µm的生物透明窗口。

三光子显微镜已被证实能在更大深度下提供更高的图像度对比。**CRONUS-2P**、**CRONUS-3P** 和 **ORPHEUS** OPA是用于深层组织双光子 / 三光子激发荧光（2PEF、3PEF）以及谐波生成（SHG、THG）成像的最先进设备选择。

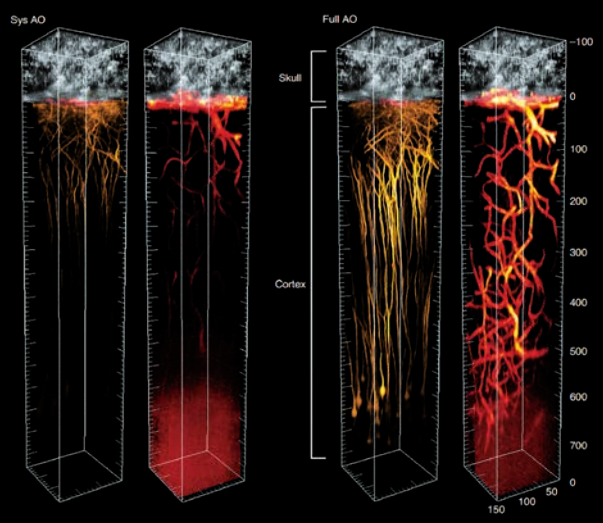
小鼠大脑深层的双光子（2P）和三光子（3P）钙成像



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。

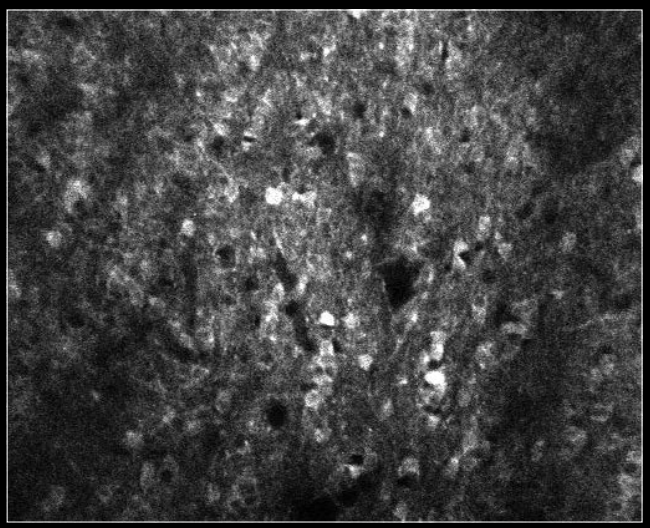
透过完整颅骨的三光子自适应光学脑成像



ORPHEUS-F 激光器在1300 nm波长下的激发，能够在完整大脑中实现软脑膜下深度达1.1 mm的成像。

由香港科技大学Jianan Y. Qu 团队惠赠。来源：Zh. Qin 等人，《利用具有直接焦点传感与塑形功能的自适应光学实现深层组织多光子成像》，《Nature Biotechnology》40 卷（2022 年）。

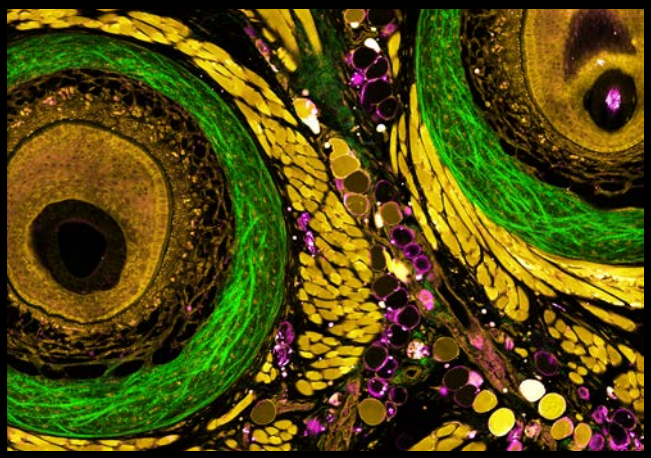
小鼠嗅球的三光子解剖成像



带有 GCaMP8 s 标记抑制性细胞的小鼠嗅球。采用620 µm三光子显微镜拍摄的解剖学 Z-stack 图像。

由Francis Crick 研究所的Fred Marbach，Andreas Schaefer 实验室提供。

无标记活体成像

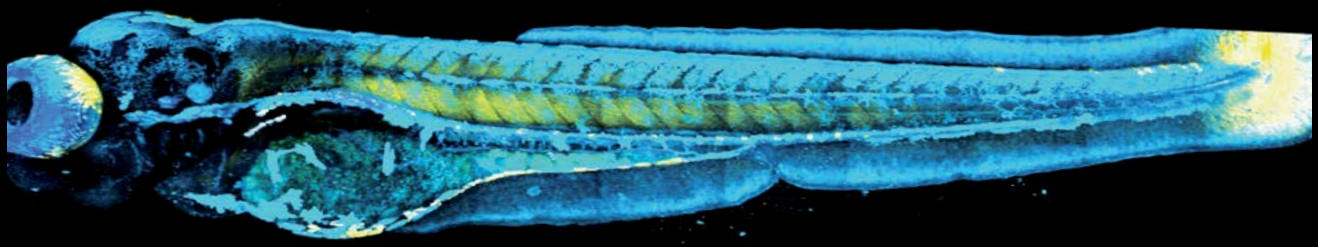


了解生物的复杂性，需要具备提供多重分子对比度的微创成像工具。为满足这一需求，麻省理工学院 S. You 的实验室正在开发一种无创、无标记的显微镜成像方法，通过 **CRONUS-3P** 对生物系统进行可视化观察。

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。

由麻省理工学院的Sixian You团队提供。

斑马鱼的多模态三维在体成像

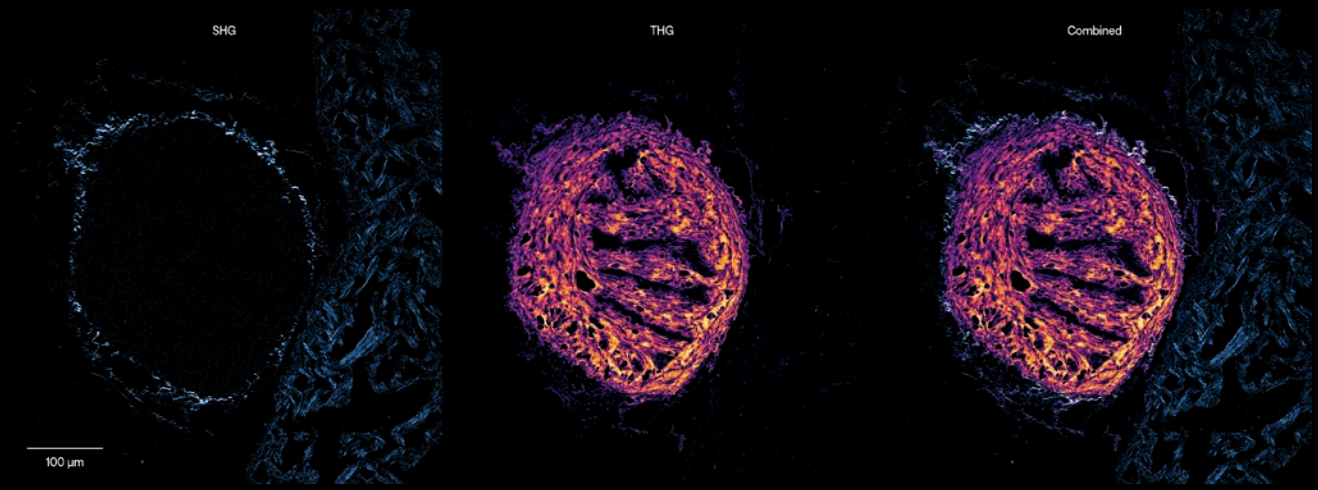


成活的 4 日龄斑马鱼胚胎的多模态三维无标记成像。成像后胚胎状态健康。
3PF：绿色，二次谐波透射：黄色，THG epi：深蓝色，三次谐波透射：青色。
激发光：1300 nm，XY 像素尺寸：0.39 µm/ px，Z-stack：522 µm范围，1 µm步长，拼接：11×2 的 400×400 µm视野，总成像时间：12 h。

由日内瓦大学的 Luigi Bonacina 团队提供。

SHG 和 THG 联合成像

成年斑马鱼心室切片来自一项瘢痕形成研究。明场图像经马松三色（MT）染色：结缔组织呈蓝色，肌肉组织呈红 / 棕色。二次谐波产生和三次谐波产生图像可显示动脉球外周的胶原蛋白和肌肉结构，而经马松三色染色的弹性蛋白则在三次谐波产生图像的中心区域显影。



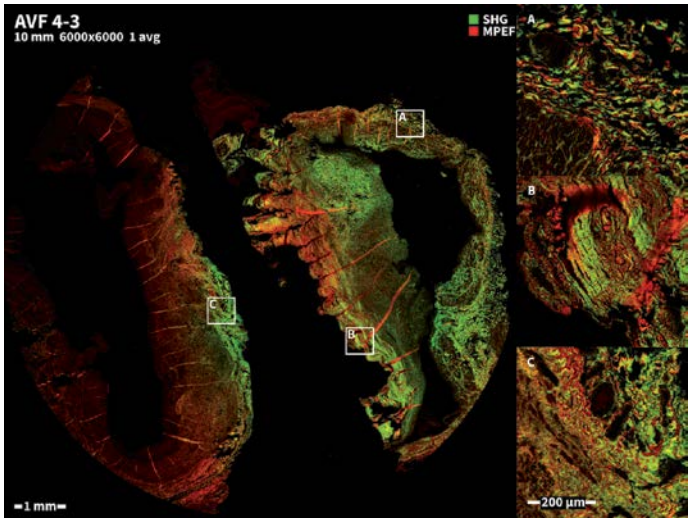
FLINT 飞秒振荡器被用于成年斑马鱼的心室成像。

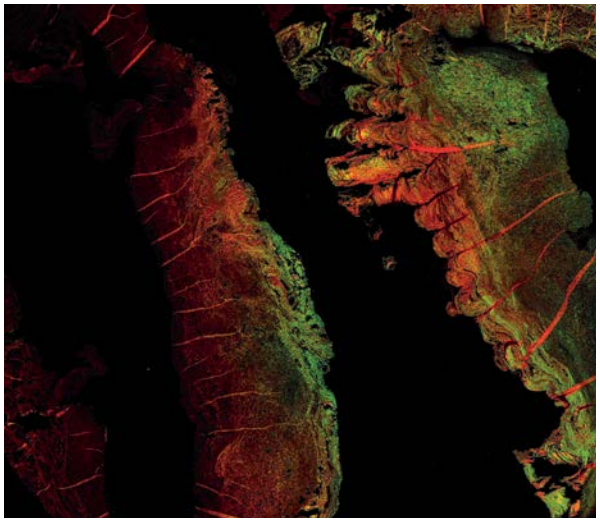
样品由维尔纽斯大学生命科学中心的 Justas Lazutka 提供。非线性成像由维尔纽斯大学物理系 Virginijus Barzda 小组提供。

模态非线性显微镜成像

本图为人静脉纤维化内膜两处横断面的多光子显微成像，采用搭载FLINT振荡光源的大视场显微镜采集。
成像采用1030纳米激发光单次扫描完成，成像视场直径10毫米，搭配数值孔径0.8的物镜。

图像中，胶原通过二次谐波产生（SHG）信号显影，呈绿色；经范赫夫染色的弹性纤维产生多光子激发荧光（MPEF），显示为红色。
左侧为分辨率压缩至1000×1000像素的全景缩略总图；右侧展示总图中白色方框标注区域对应的全分辨率感兴趣区（ROI）。



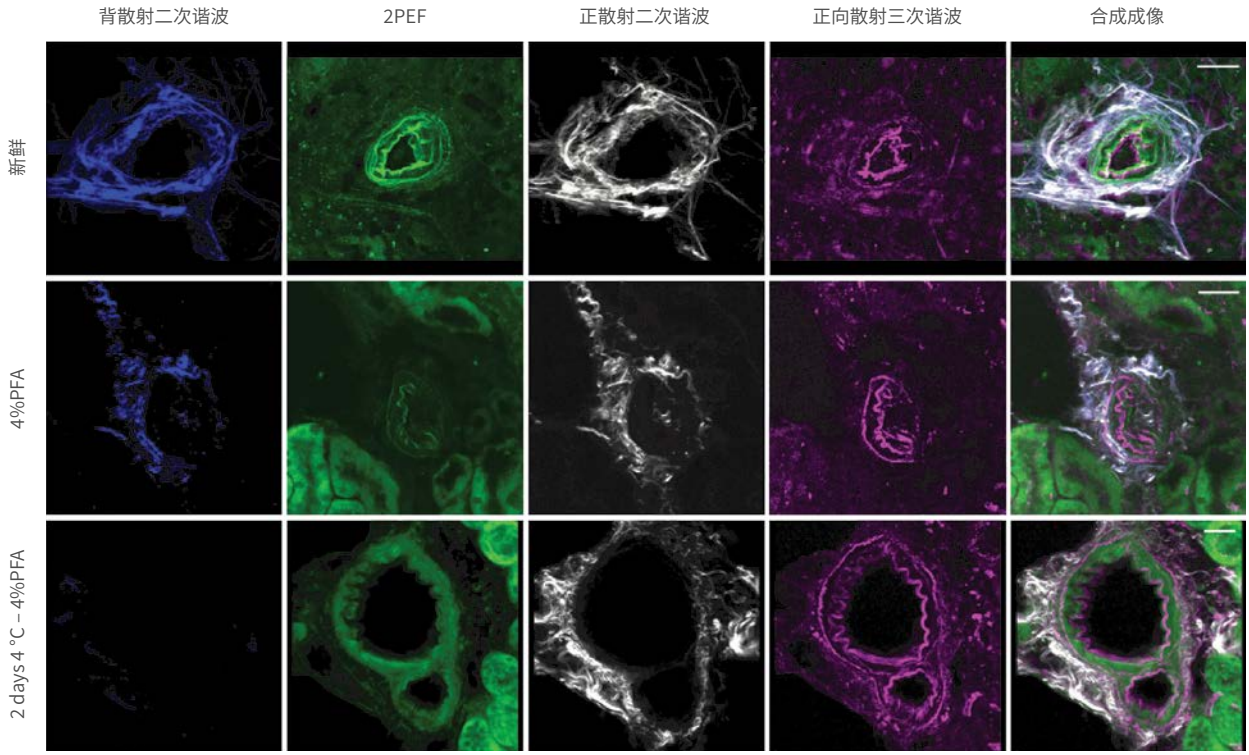


样本：人体动静脉内瘘，两处薄横断面切片。

维尔纽斯大学 Virginijus Barzda 课题组。

SH,THG 和 2P 成像

福尔马林等固定方法通常用于保存组织，使其结构尽可能接近天然状态。然而，固定剂会与组织分子发生化学相互作用，并可能改变其结构。借助这些成分的二次谐波和三次谐波发射能力，研究人员利用非线性双光子显微镜和CRONUS-2P飞秒激光器，评估了化学固定剂等保存方法对小鼠组织内蛋白质成分非线性光学特性的影响。



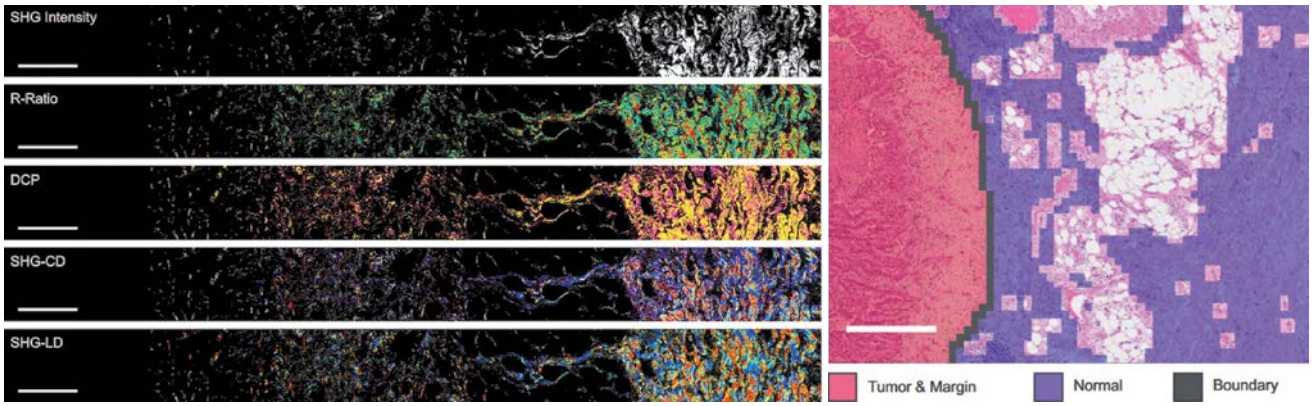
经不同处理后，在小鼠肾脏振动切片中，利用 **CRONUS-2P** 飞秒激光源获取的胶原蛋白二次谐波信号，以及弹性蛋白的双光子激发荧光和三次谐波信号。

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

宽场偏振二次谐波显微镜

癌症的诊断和外科治疗依赖于具有特异性和高通量的成像技术。偏振分辨二次谐波产生（P-SHG）显微镜在可视化与肿瘤发展相关的胶原蛋白网络及细胞外基质结构变化方面展现出潜力。此外，P-SHG 成像具有无标记特性，且适用于深层活组织成像。然而，传统的光栅扫描方法速度过慢，难以满足临床应用需求，同时解读 P-SHG 的结构敏感性也存在挑战。

非线性宽场显微镜通过使用放大的飞秒激光器提高成像吞吐量和视野，从而解决了这些局限性。此外，机器学习（ML）技术可实现数据驱动的分析，助力肿瘤边缘自动勾画和评分等任务。通过将 **CARBIDE** 和 **PHAROS** 激光器与机器学习增强的宽场显微镜相结合，我们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。



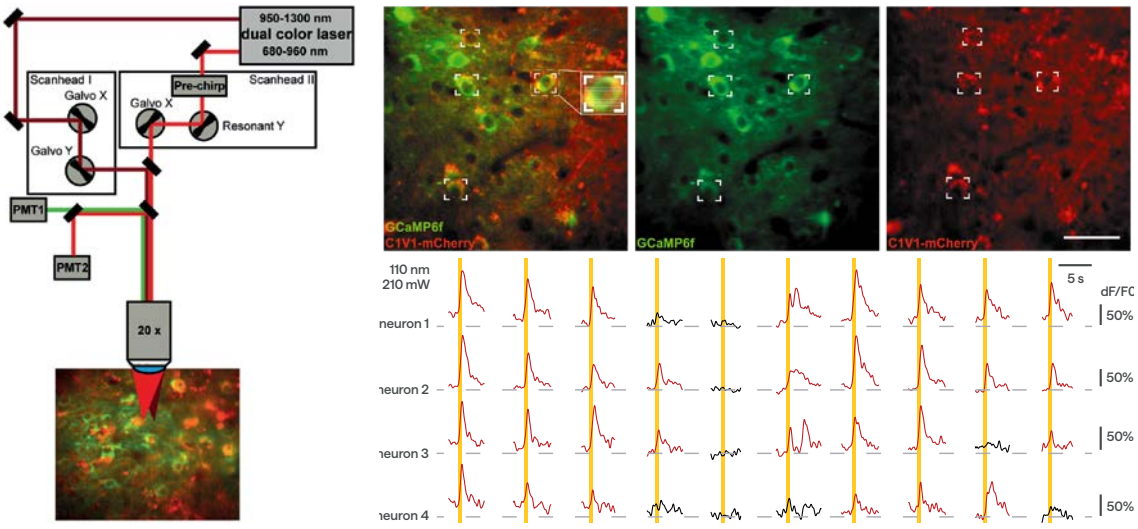
使用 **PHAROS** 激光对人肺组织肿瘤边缘进行大面积宽场偏振分辨二次谐波显微镜检查。在无监督机器学习中使用图像参数，如 SHG 强度，R比和圆偏振度，以及 SHG 圆形和线性二向色性，来确定肿瘤边界。

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）。

全光学生理学

尽管三光子成像可在深层组织中实现高对比度成像，但诸多实验问题仍通过双光子成像能得到更好的解决 — 尤其是在需要视频速率采集的情况下。针对这类应用，**CRONUS-2P** 激光器可提供理想解决方案，该激光器配有三个光学同步输出端，其中两个可独立调谐。

这种三光束光源可实现多种多光子激发路径，而其中有很多是传统单光束或双光束方案无法实现的。对于需要同时激活大量细胞的实验，**CARBIDE** 激光器仍是经实践验证的高性能选择，可满足高要求的双光子光遗传学研究。



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)）。