·生物应用·

双光子活体成像在生命科学领域的应用与展望

柏文娟 王靳 赵文颖 王静*

（上海交通大学医学院上海市免疫学研究所，上海 200025）

【摘要】 双光子活体成像技术具有深层成像的优势，可以直观地监测活体的体内动态过程，已成为生命科学领域研究的重要手段。本文简要介绍了双光子显微镜的技术原理，综述了双光子显微镜在生命科学研究中的应用领域，重点分析了双光子显微活体成像技术的发展趋势，探讨其当前面临的挑战及未来的优化方向，旨在为进一步优化双光子活体成像技术，推动双光子活体成像技术更加广泛的应用提供参考。

【关键字】 活体成像；双光子显微镜；生命科学

【中图分类号】 R318; Q819 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11876/mimt202504012

Applications and prospects of two-photon intravital imaging in the field of life sciences

Bai Wenjuan, *Wang Jin*, *Zhao Wenying*, *Wang Jing**

(Shanghai Institute of Immunology, *Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*, *Shanghai 200025*, *China)*

【Abstract】 Intravital two-photon imaging technology has the advantage of deep imaging, enabling the direct monitoring of the dynamic processes within living organisms. It has become an important research tool in the field of life sciences. We briefly explain the basic principles of two-photon microscopy and its applications in life science research in recent years. We mainly focuse on analyzing the development trends of intravital two-photon imaging technology and discuss the current challenges and future optimization directions. We look forward to the continuous optimization of intravital two-photon imaging technology, which can promote its wider application.

【Key words】 Intravital imaging; Two-photon microscope; Life Sciences

双光子显微镜诞生于1990年[1]，它基于长波长激发，具有高分辨率、低光毒性和深度成像的特点。双光子活体成像技术凭借其可以直观监测活体体内动态过程的优势，已越来越多地被应用于神经科学、细胞生物学、免疫学、皮肤成像和癌症研究等生命科学领域。双光子活体成像技术在深入理解疾病机制如癌症转移、神经退行性疾病、免疫性疾病动态，评估药物疗效，发展新型诊疗策略如基于便携式或者微型化的双光子显微镜成像的精准手术导航、术中监测等方面可能带来突破性的进展。

本文简要介绍了双光子显微镜的技术原理，综述了双光子显微镜在生命科学研究中的应用领域，重点分析了双光子显微活体成像技术的发展趋势，探讨其当前面临的挑战及未来的优化方向，旨在为进一步优化双光子活体成像技术，推动双光子活体成像技术更加广泛的应用提供参考。

1 双光子显微镜的原理

双光子显微镜的核心原理是基于双光子激发，需要两个低能量光子同时被荧光分子吸收，从而将其激发到高能态。双光子显微镜通常使用脉冲激光，发射波长在700～1 000 nm的近红外光，这种长

基金项目：国家自然科学基金面上项目（82371760）

第一作者：柏文娟，女，博士研究生，实验师，研究方向：主要从事显微成像平台、大型显微镜的管理工作

通信作者：王静，女，博士研究生，研究员，研究方向：运用活体成像研究天然免疫细胞的动态及功能

波长光具有更好的组织穿透能力，并且对生物组织的光毒性较低，脉冲激光的高峰值功率确保了双光子激发的效率。激光通过物镜聚焦到样品上，由于荧光发射强度与激发强度的平方成正比，因此只有在焦点区域的荧光分子才会被有效激发，这种非线性激发特性使得双光子显微镜具有天然的光学切片能力，无需物理遮挡即可实现三维成像（图1）。激发出的荧光通过物镜收集并被分光镜分离，探测器捕捉荧光信号，并将其转换为电信号用于成像。

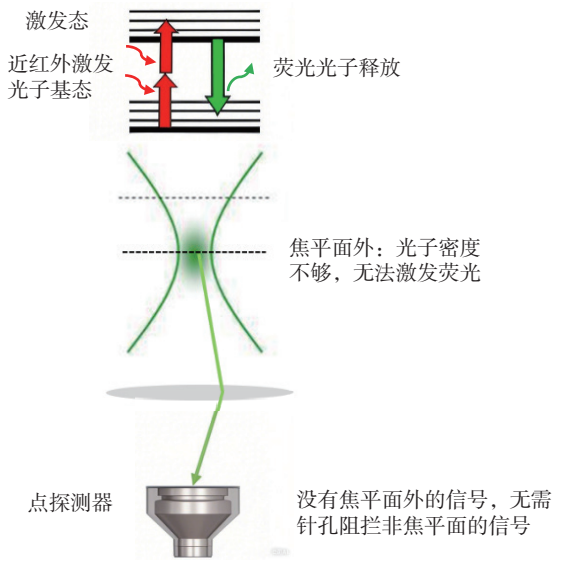


图1 双光子显微镜的原理

双光子显微镜的技术原理使其具备独特的优势：高分辨率、低光毒性和深度成像。基于这种独特的光学特性和成像能力，双光子显微镜已成为生物医学研究和活体成像的重要工具。

2 双光子显微镜活体成像在生命科学领域的应用

双光子显微镜自问世以来已在越来越多的领域得到了广泛的应用，随着技术的不断进步，其应用范围将会进一步拓展，有望成为生命科学研究更加强大的工具。

2.1 神经科学领域

双光子显微镜在神经科学研究中应用最多，其中双光子钙成像应用十分广泛，用于观察神经元之间的突触连接[2]，以及各个区域的神经元活动，如视顶盖神经元[3]、听皮层神经元[4]、海马区神经元[5]等。此外，双光子显微镜还被用来研究脑部疾病，如神经系统疾病中神经回路的变化[6]、阿尔茨海默症和缺血性脑血管疾病的发病机制等。

2.2 细胞生物学领域

双光子显微镜具有低光毒性和低光漂白的特点，适合对活体样本进行长时间成像，因此双光子显微镜最重要的应用之一是体内追踪细胞的动态过程，如观察细胞迁移[7]、血管生成[8]、细胞形态的动态性变化过程[9]、细胞增殖过程[10]等。此外，运用短波长激发时间与光谱分辨新型双光子显微镜，能够激发传统技术无法成像的生物体的内源性荧光团，如色氨酸和血红蛋白，可用于无创地观察活体生物体内细胞的代谢过程等[11]。

2.3 免疫学领域

双光子显微镜活体成像技术已逐渐成为理解免疫反应机制的重要支持，主要包括以下几个方面：①观察机体稳态、炎症以及感染状态下的免疫过程，如观察肝脏、肾脏和视觉相关的免疫系统[12]；②观察免疫细胞的动态变化过程，如观察细胞与细胞的相互作用[13]、免疫细胞的稳态调节[14]、血小板的起源组织[15]、血管里免疫细胞的自我更新[16]等；③观察炎症反应过程中涉及的血小板的活化与聚集、中性粒细胞的动态变化[7]、组织驻留巨噬细胞的应答、适应性免疫应答；④观察感染过程中的免疫应答[17]和自身免疫反应[18]等。

2.4 皮肤与组织成像领域

双光子显微镜强大的组织穿透能力和低损伤性使其在皮肤组织成像中也有广泛的应用，可用于研究皮肤生物学、皮肤损伤修复[19]、皮肤疾病机制[20]以及药物递送效果[21]等。我国自主研发的便携式双光子显微镜首次在轨获取了航天员皮肤表皮和真皮浅层的高分辨率三维影像。这一技术突破为长期太空飞行中的航天员的健康监测建立了全新的无创检测方法，标志着我国在空间生物医学成像技术领域取得重要突破。

2.5 癌症研究领域

双光子显微镜能够对癌组织进行高分辨率成像，可用于观察肿瘤细胞以及免疫细胞的动态过程。例如，研究人员利用二次谐波完成了下列观察：①肿瘤细胞从休眠到重新激活的转变过程中伴随的Ⅲ型胶原结构和丰度的变化[22]；②肺泡巨噬细胞在乳腺癌转移过程中的动态变化[23]；③CAR-T细胞在肿瘤治疗中的动态行为[24]；④基于树突状细胞的肿瘤治疗中细胞的动态行为[25]；

⑤荧光纳米颗粒在靶向癌症治疗中的动态过程，也可进一步应用在药物筛选方面[26]。此外，双光子激发还可用于肿瘤的光动力治疗研究[27]。

此外，双光子显微镜还可与其他技术结合实现更广泛的应用，如结合光遗传、电生理记录[28]和单分子成像，实现多模态成像，这种结合将为复杂生物过程的研究提供更全面的视角。

3 双光子显微镜活体成像的挑战与展望

随着生命科学研究对活体成像的需求逐渐增加，双光子显微镜活体成像将面临更多的挑战，同时也迎来了前所未有的发展机遇。得益于双光子显微镜配置的不断改进提升，将实现更高分辨率、更深、更快、更长时间的活体成像。

3.1 深度成像与更长时间的活体成像

双光子显微镜在活体成像中需要兼顾成像深度[29]和分辨率，提高分辨率可能会限制成像深度，三光子显微成像技术虽然在一定程度上解决了深度问题，但由于热损伤限制了激光重复率，导致其视场较小且成像通量较低。随着大视场、单细胞分辨率的双光子和三光子显微镜的出现，可实现深度成像，比如可实现3.5 mm直径视场的单细胞分辨率的深层成像[30]，可以观察小鼠淋巴结的整个深度[31]，这将为免疫应答全过程、疫苗效力或淋巴瘤浸润的研究提供全景视角。双光子合成孔径显微术通过多角度针状光束的扫描，在实现高速三维感知的同时，将双光子成像光毒性降低了1 000倍以上，融合数字自适应光学架构，同时具备高速多区域像差矫正能力，即使在恶劣复杂的活体环境下依然能够保持近衍射极限的空间分辨率，并且进一步提升了传统双光子成像的穿透深度和成像时长[32]。此外，也许可结合在体透明化技术实现更深的活体成像。

3.2 多色成像与新型荧光探针的开发

可用的荧光探针数量有限，且亮度和稳定性不足，限制了双光子显微镜的多色成像。利用胶体金纳米颗粒和纳米团簇的双光子吸收和光致发光的特性开发探针，可以实现更深深度和更少光毒性的成像[33]。通过荧光纳米探针标记，运用双光子显微镜可成像主动脉血管内壁次氯酸和膦酸化水平[34]，此类探针结合双光子成像有望实现动脉粥样硬化斑块易损性的早期无创评估。结合基于pH值的双光子探针，运用双光子显微镜可检测人类结肠癌[35]。用于多光子成像的水溶性硒化镉–硫化锌量子点仅有几个微米的大小，这些荧光探针的双光子作用截面高达47 000 GM，通过活体小鼠的皮肤，观察到了量子点在数百微米深的毛细血管中的动态变化情况[36]。基于碱金属和碱土金属以及过渡金属（例如铜、锌、铁离子和其他重金属离子）的双光子探针，可追踪活体内金属的动态变化，但是仍需要提高其标记能力、水溶性、光稳定性并降低其细胞毒性[37]。利用乙酰胆碱传感器，运用微型双光子显微镜可以监测体内胆碱能的活性[28]，将传感器与双光子显微镜结合起来，还能够同时测量静息和活跃状态下的神经活动和代谢通量[38]。

无标记技术观测生命过程更加无创，利用短波长激发时间与光谱分辨新型双光子显微镜，该技术可以实现荧光光谱和荧光寿命的同时检测，从而实现紫外波段自体荧光的有效激发与探测，极大地拓展了双光子成像技术的应用范围[11]。基于双振镜和荧光寿命模块的双光子显微镜，配备时间相关单光子计数板，再结合一种基于共振能量转移的生物传感器，可实现通过观察膦酸酶与张力蛋白同源物基因蛋白的构象来反映其活性状态[39]，可用于肿瘤模型的研究。随着新型荧光探针的开发，双光子显微镜将实现更高效、更精准的多色成像。

3.3 清醒状态下的活体成像

双光子显微镜活体成像实现了从观察离体样本到观察在体样本的飞跃，但需要先进行动物麻醉，再进行手术操作，即活体成像是在动物麻醉的状态下观察体内动态过程。对于脑科学研究来说，活体成像的发展趋势是实现在自由行为状态下的活体细胞成像。要研究动物自由行为时的体内动态过程，就需要在动物非麻醉即清醒的状态下进行活体成像，于是佩戴式微型双光子显微镜应运而生且不断发展。2017年时快速高分辨率微型双光子显微镜（fast high–resolution, miniaturized two–photon microscope, FHIRM–TPM）1.0[40]和FHIRM–TPM 2.0[41]重2.2 g，2022年时微型双光子显微镜（miniaturized two–photon microscope, MINI2P）重量不到3.0 g[42]，2025年时FHIRM–TPM 3.0可实现780 nm、920 nm、1 030 nm激发的三色成像，通过校

正球差和优化荧光收集，实现更深的脑成像，深度可达850 μm，视场扩大10倍，最大可达1.0 mm×0.8 mm。微型双光子显微镜可用于动物清醒状态下的基础神经学研究[42-44]、脑部疾病机制研究[45]、脑部疾病药物研发[46]等领域。

传统的双光子显微镜成像系统体积庞大、成本高昂，限制了其在临床和活体成像中的应用，双光子显微镜的微型化发展将使其更适合活体成像。微型双光子显微镜在自由行为动物中的应用，为研究帕金森病运动障碍、癫痫发作机制或药物成瘾行为背后的神经环路动态提供了新工具，甚至有望应用于临床诊断。

3.4 双光子显微镜装置的改造

为了观察高致病性病原菌感染的动态过程，可改造装置的光路，将激光器放在生物安全3级（BSL3）实验室的外面，而镜头等成像系统放在BSL3实验室的里面，可使得双光子显微镜在BSL3实验室中进行活体成像[47]。

双光子显微镜活体成像用于听觉反应的相关研究时，其本身组件如扫描单元由于机械振动会产生噪音，会严重干扰动物神经元的听觉反应，故需要改造显微镜的装置，如引入一对正交的声光偏转器，同时对显微镜所有其他发声组件都进行声学隔离，从而使显微镜系统的本底噪声低于听力阈值，以防止仪器本身的噪音干扰动物神经元的听觉反应[48]，有望用于研究听觉疾病模型。

广泛用于研究活体动物组织的常规双光子显微镜是通过对空间聚焦的脉冲激光束进行点扫描来形成图像，会导致激发的时间分辨率有限。而用时间聚焦的宽场照明代替点扫描消除了这一限制，对于双光子显微镜具有里程碑式的意义。时间聚焦是将扩散或色散光学元件放置在与物镜焦平面共轭的平面，以产生与位置有关的时间脉冲展宽，从而在轴向上限制多光子吸收，无需严格的空间聚焦。时间聚焦已运用于很多技术领域，包括双光子活体成像、无扫描成像、超分辨率成像、光刻，以及通过光刺激控制神经递质的释放[49]。

与广泛运用的双光子钙成像不同，电压成像需要千赫兹采样率，从而可以将荧光检测降低到接近散粒噪声的水平。高光子通量激发可以克服散粒噪声，但光漂白和光损伤严重，限制了同时一起成像神经元的数量和成像的持续时间。针对低双光子通量的替代方法，可改用低于散粒噪声极限的电压成像，该框架开发了具有改进尖峰检测功能的正向电压指示器，使得双光子显微镜可在0.4 mm×0.4 mm视场内进行千赫兹帧率成像，且运用了从散粒噪声限制信号推断荧光的自监督去噪算法，通过这些改进，可在1 h内对清醒行为小鼠的100多个密集标记的神经元进行同步高速深层组织成像[50]。其临床应用价值主要体现在为神经系统疾病的精准诊疗提供了全新工具，尤其在手术导航如癫痫手术、肿瘤切除手术功能区保护及神经退行性疾病研究中展现出独特价值。

混响双光子显微镜通过瞬时轴向扫描，在三维空间上保持微米级的分辨率，实现双光子显微镜的视频速率多平面成像[51]。三维声光透镜双光子显微镜可记录数百个小脑颗粒细胞轴突[52]，将声光透镜的随机访问三维激光扫描与快速闭环场可编程门阵列处理相结合，能够以高达1 kHz的频率实时跟踪3D大脑运动并校正运动伪影[53]。通过优化多光子荧光信号产生效率，可在一定程度上克服双光子显微镜成像深度的局限性和三光子显微镜成像视场的局限性，于是开发出了一种具有自适应的双激发系统激发多边形扫描多光子显微镜，可实现更深更大视场的成像[54]。自适应光学双光子显微镜可以在体内实现近衍射极限成像，适用于功能性视网膜成像[55]。双光子合成孔径显微镜可在微创条件下快速三维成像深层组织中的亚细胞行为[32]。利用聚焦扫描全息像差探测的共轭波前整形方案，可实现小鼠脑组织的高分辨率成像且获得更深的视场，将视场深度加深超过了400 μm[56]。使用光珠显微镜，能以细胞分辨率对神经活动进行高速、全皮层体积记录，这是一种可扩展且时空优化的采集方法，仅受荧光寿命限制，采用的技术是轴向分离且时间上不同的焦点几乎可以同时记录整个轴向成像范围[57]。使用全光学激光扫描支持的超快双光子荧光显微镜，能以高达每秒3 000帧的速率和亚微米空间分辨率对体内神经元活动进行成像，能够监测头部固定的清醒小鼠大脑表面以下345 μm的超阈值和亚阈值电活动[58]。这些显微镜技术的进步为术中实时监测深层肿瘤边界或神经纤维完整性带来可能性。

3.5 与其他技术的融合

随着人工智能和自动化技术的发展，双光子显微镜的数据处理和成像操作将更加高效。双光子显微镜融合实时噪声抑制的自监督深度学习方法，允许在双光子显微镜上进行实时处理，可以用标准成像方法1/10的光子获得高的成像信噪比[59]。针对钙离子成像这一具有时间冗余特性的数据，可以融合基于无监督学习的自启发学习去噪方法（self-inspired noise2noise, SN2N），SN2N 流程中纳入了时间交错采样策略，以在实现优异空间去噪效果的同时更好地维持时间信号稳定性，可对双光子显微镜钙离子数据进行去噪，SN2N 在处理不同钙离子瞬变幅度时未出现非线性扰动，定量分析显示其去噪过程具有较高的准确性，具有很好的时空去噪能力[59]。多帧重构算法用于双光子成像，结合研发的自适应光学模块和相位补偿方法，实现了双光子成像轴向分辨率3倍的提升，信噪比提升也超过3倍[49]。运用更有效的图像和视频分析软件及机器学习算法可加快双光子活体成像数据的分析和处理。低噪声改造结合AI分析，有望用于开发基于神经活动解码的新型脑机接口。

4 小结

双光子活体成像技术凭借其深层组织成像的优势，近年来取得显著进展，并在神经科学、肿瘤学等生命科学领域展现出广阔的应用前景。随着生命科学研究对活体成像需求的日益增长，双光子活体显微技术将面临新的挑战与机遇。可以预见，随着光学技术、探针开发和图像算法的持续创新，双光子活体显微技术将迎来更深入的发展和更广泛的应用。

[参 考 文 献]

[1] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. Science, 1990, 248(4951): 73-76.

[2] Kuan A T, Bondanelli G, Driscoll L N, et al. Synaptic wiring motifs in posterior parietal cortex support decision-making [J]. Nature, 2024, 627: 367-373.

[3] Shainer I, Kappel J M, Laurell E, et al. Transcriptomic neuron types vary topographically in function and morphology [J]. Nature, 2025, 638: 1023-1033.

[4] Drieu C, Zhu Z, Wang Z, et al. Rapid emergence of latent knowledge in the sensory cortex drives learning [J]. Nature, 2025, 641: 960-970.

[5] Sun W, Winnubst J, Natrajan M, et al. Learning produces an orthogonalized state machine in the hippocampus [J]. Nature, 2025, 640: 165-175.

[6] Xiong H, Tang F, Guo Y, et al. Neural circuit changes in neurological disorders: evidence from in vivo two-photon imaging [J]. Ageing Res Rev, 2023, 87: 101933.

[7] Haage T R, Charakopoulos E, Bhuria V, et al. Neutrophil-specific expression of JAK2-V 617F or CALRmut induces distinct inflammatory profiles in myeloproliferative neoplasia [J]. J Hematol Oncol, 2024, 17: 43.

[8] Cheng L, Liu W, Zhong C, et al. Remodeling the homeostasis of pro- and anti-angiogenic factors by Shenmai injection to normalize tumor vasculature for enhanced cancer chemotherapy [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113770.

[9] Schoofs H, Daubel N, Schnabellehner S, et al. Dynamic cytoskeletal regulation of cell shape supports resilience of lymphatic endothelium [J]. Nature, 2025, 641: 465-475.

[10] Pae J, Schwan N, Ottino-Loffler B, et al. Transient silencing of hypermutation preserves B cell affinity during clonal bursting [J]. Nature, 2025, 641: 486-494.

[11] Wu T, Liao J, Xiang F, et al. Short-wavelength excitation two-photon intravital microscopy of endogenous fluorophores [J]. Biomed Opt Express, 2023, 14(7): 3380-3396.

[12] Wang Y, Heymann F, Peiseler M. Intravital imaging: dynamic insights into liver immunity in health and disease [J]. Gut, 2024, 73(8): 1364-1375.

[13] Liu D, Winer B Y, Chou M Y, et al. Dynamic encounters with red blood cells trigger splenic marginal zone B cell retention and function [J]. Nat Immunol, 2024, 25(1): 142-154.

[14] Gaertner F, Ishikawa-Ankerhold H, Stutte S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control homeostasis of megakaryopoiesis [J]. Nature, 2024, 631: 645-653.

[15] Asquith N L, Carminita E, Camacho V, et al. The bone marrow is the primary site of thrombopoiesis [J]. Blood, 2024, 143(3): 272-278.

[16] Santocki M, Such A, Drab D, et al. NETs persisting in vasculature undergo self-renewal with consequences for subsequent infection: a mouse model study [J]. Blood, 2025, 145(18): 2070-2085.

[17] van de Wall S, Anthony S M, Hancox L S, et al. Dynamic landscapes and protective immunity coordinated by influenza-specific lung-resident memory CD8+ T cells revealed by intravital imaging [J]. Immunity, 2024, 57(8): 1878-1892.

[18] Uderhardt S, Neag G, Germain R N. Dynamic multiplex tissue imaging in inflammation research [J]. Annu Rev Pathol, 2024, 19: 43-67.

[19] Zhu X, Tang Y, Chen J, et al. Monitoring wound healing of elastic cartilage using multiphoton microscopy [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2013, 21(11): 1799-1806.

[20] Vicanolo T, Özcan A, Li J L, et al. Matrix-producing neutrophils populate and shield the skin [J]. Nature, 2025, 641: 740-748.

[21] Pappinen S, Pryazhnikov E, Khiroug L, et al. Organotypic cell cultures and two-photon imaging: tools for in vitro and in vivo assessment of percutaneous drug delivery and skin toxicity [J]. Journal of Controlled Release, 2012, 161(2): 656-667.

[22] Di Martino J S, Nobre A R, Mondal C, et al. A tumor-derived type III collagen-rich ECM niche regulates tumor cell dormancy [J]. Nat Cancer, 2022, 3: 90-107.

[23] Dalla E, Papanicolaou M, Park M D, et al. Lung-resident alveolar macrophages regulate the timing of breast cancer metastasis [J]. Cell, 2024, 187(23): 6631-6648.

[24] Isshiki Y, Chen X, Teater M, et al. EZH2 inhibition enhances T cell immunotherapies by inducing lymphoma immunogenicity

and improving T cell function [J]. Cancer Cell, 2025, 43(1): 49–68.
[25] Kim H R, Park J S, Park J H, et al. Cell–permeable transgelin–2 as a potent therapeutic for dendritic cell–based cancer immunotherapy [J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 43.
[26] Wu Y X, Zhang D, Hu X, et al. Multicolor two–photon nanosystem for multiplexed intracellular imaging and targeted cancer therapy [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2021, 60(22): 12569–12576.
[27] Fang F, Yuan Y, Wan Y, et al. Near–infrared thermally activated delayed fluorescence nanoparticle: a metal–free photosensitizer for two–photon–activated photodynamic therapy at the cell and small animal levels [J]. Small, 2022, 18(6): e2106215.
[28] Wei W, Hao M, Zhou K, et al. In situ multimodal transparent electrophysiological hydrogel for in vivo miniature two–photon neuroimaging and electrocorticogram analysis [J]. Acta Biomater, 2022, 152: 86–99.
[29] Liu Z, Lu X, Villette V, et al. Sustained deep–tissue voltage recording using a fast indicator evolved for two–photon microscopy [J]. Cell, 2022, 185(18): 3408–3425.
[30] Waters J. A large field of view 2– and 3–photon microscope [J]. Light Sci Appl, 2025, 14(1): 106.
[31] Choe K, Hontani Y, Wang T, et al. Intravital three–photon microscopy allows visualization over the entire depth of mouse lymph nodes [J]. Nat Immunol, 2022, 23(2): 330–340.
[32] Zhao Z, Zhou Y, Liu B, et al. Two–photon synthetic aperture microscopy for minimally invasive fast 3D imaging of native subcellular behaviors in deep tissue [J]. Cell, 2023, 186(11): 2475–2491.
[33] Olesiak–Banska J, Waszkielewicz M, Obstarczyk P, et al. Two–photon absorption and photoluminescence of colloidal gold nanoparticles and nanoclusters [J]. Chem Soc Rev, 2019, 48(15): 4087–4117.
[34] Lu J, Li Z, Lu M, et al. Assessing early atherosclerosis by detecting and imaging of hypochlorous acid and phosphorylation using fluorescence nanoprobe [J]. Adv Mater, 2023, 35(52): e2307008.
[35] Hong S T, Kim T H, Choi J W, et al. Two–photon probes for pH: detection of human colon cancer using two–photon microscopy [J]. Anal Chem, 2017, 89(18): 9830–9835.
[36] Larson D R, Zipfel W R, Williams R M, et al. Water–soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo [J]. Science, 2003, 300(5624): 1434–1436.
[37] Juvekar V, Park S J, Yoon J, et al. Recent progress in the two–photon fluorescent probes for metal ions [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2021, 427: 213574.
[38] Mann K, Deny S, Ganguli S, et al. Coupling of activity, metabolism and behaviour across the Drosophila brain [J]. Nature, 2021, 593: 244–248.
[39] Kagan T, Gabay M, Meenakshisundaram A, et al. Genetically encoded biosensor for fluorescence lifetime imaging of PTEN dynamics in the intact brain [J]. Nat Methods, 2025, 22: 764–777.
[40] Zong W, Wu R, Li M, et al. Fast high–resolution miniature two–photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice [J]. Nat Methods, 2017, 14: 713–719.
[41] Zong W, Wu R, Chen S, et al. Miniature two–photon microscopy for enlarged field–of–view, multi–plane and long–term brain imaging [J]. Nat Methods, 2021, 18: 46–49.
[42] Zong W, Obenhaus H A, Skytøen E R, et al. Large–scale two–photon calcium imaging in freely moving mice [J]. Cell, 2022, 185(7): 1240–1256.
[43] Gu X, Zhao Z, Chen X, et al. Imaging microglia surveillance during sleep–wake cycles in freely behaving mice [J]. eLife, 2023, 12: RP86749.
[44] Cheng N, Dong Q, Zhang Z, et al. Egocentric processing of items in spines, dendrites, and somas in the retrosplenial cortex [J]. Neuron, 2024, 112(4): 646–660.
[45] Zhao Z, Zeng F, Wang H, et al. Encoding of social novelty by sparse GABAergic neural ensembles in the prelimbic cortex [J]. Sci Adv, 2022, 8(35): eabo4884.
[46] Zhang Z, Jiang S, Shi K, et al. Visualizing seizure propagation in freely–moving mice via miniature two–photon microscopy [J]. Neurosci Bull, 2022, 38: 1593–1597.
[47] Ueki H, Wang I H, Zhao D, et al. Multicolor two–photon imaging of in vivo cellular pathophysiology upon influenza virus infection using the two–photon IMPRESS [J]. Nat Protoc, 2020, 15: 1041–1065.
[48] Song X, Guo Y, Chen C, et al. A silent two–photon imaging system for studying in vivo auditory neuronal functions [J]. Light Sci Appl, 2022, 11: 96.
[49] Papagiakoumou E, Ronzitti E, Emiliani V. Scanless two–photon excitation with temporal focusing [J]. Nat Methods, 2020, 17: 571–581.
[50] Platisa J, Ye X, Ahrens A M, et al. High–speed low–light in vivo two–photon voltage imaging of large neuronal populations [J]. Nat Methods, 2023, 20: 1095–1103.
[51] Beaulieu D R, Davison I G, Kılıç K, et al. Simultaneous multiplane imaging with reverberation two–photon microscopy [J]. Nat Methods, 2020, 17: 283–286.
[52] Lanore F, Cayco–Gajic N A, Gurnani H, et al. Cerebellar granule cell axons support high–dimensional representations [J]. Nat Neurosci, 2021, 24: 1142–1150.
[53] Griffiths V A, Valera A M, Lau J Y, et al. Real–time 3D movement correction for two–photon imaging in behaving animals [J]. Nat Methods, 2020, 17: 741–748
[54] Mok A T, Wang T, Zhao S, et al. A large field–of–view, single–cell–resolution two– and three–photon microscope for deep and wide imaging [J]. eLight, 2024, 4: 20.
[55] Qin Z, He S, Yang C, et al. Adaptive optics two–photon microscopy enables near–diffraction–limited and functional retinal imaging in vivo [J]. Light Sci Appl, 2020, 9: 79.
[56] Papadopoulos I N, Jouhanneau J S, Takahashi N, et al. Dynamic conjugate F–SHARP microscopy [J]. Light Sci Appl, 2020, 9: 110.
[57] Demas J, Manley J, Tejera F, et al. High–speed, cortex–wide volumetric recording of neuroactivity at cellular resolution using light beads microscopy [J]. Nat Methods, 2021, 18: 1103–1111.
[58] Wu J, Liang Y, Chen S, et al. Kilohertz two–photon fluorescence microscopy imaging of neural activity in vivo [J]. Nat Methods, 2020, 17: 287–290.
[59] Li X, Li Y, Zhou Y, et al. Real–time denoising enables high–sensitivity fluorescence time–lapse imaging beyond the shot–noise limit [J]. Nat Biotechnol, 2023, 41: 282–292.