

高灵敏度干涉定量相位显微前沿进展与应用(封面文章·特邀)

周楠森¹, 吴沐蕾¹, 聂宇洁², 程加雨^{1,3}, 周仁杰^{1*}

(1. 香港中文大学 生物医学工程系, 香港特别行政区 999077;
2. 深圳市倍捷锐生物医学科技有限公司, 广东 深圳 518000;
3. 南开大学 物理科学学院, 天津 300071)

摘要: 在无标记原生状态下对活细胞进行精准观测具有重大挑战, 因其结构变化引起的形变可小至亚纳米尺度。此外, 针对下一代原子级尺度制造, 缺乏高精度在线表征工具将导致大规模芯片生产中良品率偏低。干涉定量相位显微技术 (Interferometric Quantitative Phase Microscopy, iQPM) 作为一种无标记宽场显微技术, 已被广泛应用于定量解析样本形貌及其动态变化, 在晶圆缺陷检测与疾病诊断等应用上展现出巨大潜力。文中聚焦于高灵敏度 iQPM 技术的发展, 首先介绍 iQPM 的工作原理、相位灵敏度理论和制约因素。针对细胞动态分析及原子材料计量需求, 从干涉光路设计、探测和照明等方面进一步讨论了相位灵敏度极限拓展的策略, 并梳理高灵敏度 iQPM 在前沿应用领域的进展。最后, 分析并讨论了相位灵敏度提升的新思路。

关键词: 定量相位显微; 灵敏度增强; 干涉显微成像; 弱信号探测

中图分类号: O436.1 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA20240358

0 引言

活细胞成像技术为细胞结构与功能研究提供了分析手段, 对探索疾病机理、药物开发具有重要意义。基于荧光蛋白标记的显微成像技术因其良好的特异性被广泛应用于神经科学、细胞生物学等领域。但荧光成像只能获取来源于标记分子的局部信号, 缺乏对细胞整体形态的表征能力, 并且标记物可潜在影响活细胞的原生态观测。原生态实时观测细胞形态及其动态对于研究细胞活动以及物质相互作用过程至关重要。活细胞的动态变化可小至亚纳米尺度, 如神经元动作电位发生时细胞膜的微小形变。此外, 针对逐步缩小的芯片制程以及下一代原子尺度制造, 无损且精确地在线表征晶圆结构对于大规模芯片生产中实现高良品率尤为关键。现今广泛使用的芯片表征工具, 如扫描电子显微 (Scanning Electron Microscopy, SEM) 和原子力显微 (Atomic Force Microscopy, AFM),

其测量通量极低, 甚至可能对样品造成损害, 因而不适合被广泛应用到在线检测中。针对以上的应用需求, 高灵敏度光学成像技术可提供潜在解决方案。

相位是一种与照明波长 λ 、样本折射率 $n(x,y)$ 和厚度分布有关的内源性对比度, 可被定义为 $\phi(x,y) = 2\pi/\lambda \cdot \int n(x,y) dz$, 其中 $\int n(x,y) dz$ 表示光程 (Optical Path Length, OPL)。相位测量可用于揭示半透明或微纳结构 (即相位物体) 的形貌信息^[1]。通过将背景光与经过样品的散射光之间的相位差转换为强度差, ZERNIKE F 发明了相衬显微技术 (Phase-contrast Microscopy, PCM), 实现了对相位物体的高对比度观测。然而, PCM 技术只能定性地提供相位差信息, 不能满足当前定量生物学与材料计量的应用需求。20世纪 60 年代, 高相干激光光源的发明推动了激光干涉测量技术的快速发展。20世纪 90 年代, 图像传感器技术 (CCD 或 CMOS) 的快速发展推动了数字全息 (Digital Holography, DH) 技术的发展, 使得相

收稿日期:2024-08-07; 修订日期:2024-09-14

基金项目:国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合科研资助基金合作研究项目 (NSFC/RGC) (N_CUHK431/23); 国家重点研发计划项目 (2023YFF1500900)

作者简介:周楠森,男,博士生,主要从事无标记干涉显微成像方面的研究。

导师(通讯作者)简介:周仁杰,男,副教授,博士,主要从事无标记生物成像与干涉显微测量方面的研究。

位延迟分布 $\Delta\phi(x,y)$ 可在光学显微成像系统中被定量获取, 定量相位显微技术 (Quantitative Phase Microscopy, QPM) 由此诞生。30 余年来, 各种 QPM 技术竞相涌现, 可分为基于干涉的 QPM (Interferometric QPM, iQPM)^[2-5], 以及基于光强图的计算 QPM 方法^[6-10]。这些技术已被广泛应用于生物医学 (如亚细胞动力学^[11-12] 和血液分析^[13]) 及材料科学 (如各向异性材料特性分析^[14-16] 与晶圆缺陷检测^[17]) 等领域。其中, iQPM 利用干涉图提取相位信息, 并通过建立精确的成像物理模型, 模拟所需计量参量 (如几何厚度) 和相位的关系, 可在单帧下可实现高灵敏、高精度的材料结构测量。相比之下, 基于光强图的计算 QPM 系统配置相对简单, 选用的低相干光源可减少散斑噪声, 有助于实现对生物样品的高对比成像^[18]。然而, 其所需要的计算过程 (如求导) 会引入大量低频噪声, 导致无法对精细样本 (如纳米颗粒或者二维材料) 进行精确测量^[19]。此外, 计算 QPM 方法通常需要拍摄多帧图像重建相位, 牺牲了成像速度与图像处理速度。

作为 QPM 系统的关键指标, 相位灵敏度 (Phase sensitivity) 决定了在时空背景噪声中可分辨的最低相位信号水平^[1]。由于测量的相位差与光程差 (Optical Path Difference, OPD) 有关, $OPD = \Delta\phi \cdot \lambda / 2\pi$, OPD 的标准差也常被用来评估相位灵敏度。由于激光光源的高相干性和高稳定性, iQPM 的相位灵敏度可达亚纳米量级, 可实现对细胞形态及其动力学特性的精确测量。近 10 多年来, 为满足活细胞在亚纳米尺度的动态分析以及原子材料计量等需求, 研究人员在提高 iQPM 的相位灵敏度方面做了大量工作, 显著降低了环境扰动和探测噪声等灵敏度受限因素的影响, 使相位灵敏度达到了皮米水平。

文中将介绍 iQPM 技术中相位灵敏度的提升方法以及相关应用。首先, 从 iQPM 的工作原理和相位灵敏度的理论出发, 分析相位灵敏度的制约因素; 其次, 综述相位灵敏度极限拓展的策略, 包括干涉光路设计、照明和探测等方面; 再次, 介绍高灵敏度 iQPM 在血细胞分析、生物神经成像、原子材料计量与晶圆缺陷检测等前沿应用领域的进展; 最后, 针对基于噪声抑制策略的灵敏度提升瓶颈, 提出进一步提升相位灵敏度的新思路。

1 iQPM 工作原理与时空相位灵敏度理论

围绕着 iQPM 技术, 首先介绍移相干涉仪 (Phase-shifting interferometry)、离轴干涉仪 (Off-axis interferometry) 与林尼克干涉仪 (Linnik interferometry) 的原理与相位解析算法; 然后进一步定义相位的时间和空间灵敏度; 最后推导时空相位灵敏度理论, 进一步讨论影响时空相位灵敏度的约束因素, 特别是光子散粒噪声的影响, 为相位灵敏度提升提供理论基础与实验指导。

1.1 iQPM 工作原理

iQPM 是将宽场光学显微和激光干涉技术相结合的 QPM 方法。图 1 为三种典型的干涉仪组成的 iQPM 系统示意图, 包括基于马赫-曾德尔干涉仪的透射式系统 (分为移相干涉仪和离轴干涉仪) 与基于林尼克干涉仪的反射式系统。图 1(a) 和 (b) 分别为基于移相干涉仪和离轴干涉仪的系统示意图。首先, 照明光入射到样品面后, 经物镜 (Objective lens, OL) 放大后再通过透镜成像。对于这两种 iQPM 系统, 物光都同样地通过以成像面 1 (Image plane 1) 作为前焦面的 $4f$ 系统到达图像传感器。移相干涉仪中的参考光在分光镜 BS 的作用下与物光同轴干涉, 并通过相位调制器 (Phase modulator) 引入与物光间的相位差 (图 1(a))。而在离轴干涉仪中, 通过在参考光与物光间引入一个空间夹角可以形成干涉 (图 1(b))。图 1(c) 所示为基于林尼克干涉仪的反射式 iQPM 系统, 通过使用双物镜的对称干涉设计, 林尼克干涉仪具有补偿参考光和物光两路色散的优点。它依靠轴向移动参考光 (Reference beam) 来引入与物光 (Sample beam) 的相位差, 最终物光和参考光同轴汇合在图像传感器面形成干涉图。

iQPM 通过解析参考光 U_R 与携带物体信息的物光场 $U_o(r)$ 在图像传感器上形成的干涉图 $I(r,t)$, 可以实现像场的相位分布提取。 $I(r,t)$ 可被表示为:

$$I(r,t) = |U_o(r)|^2 + |U_R|^2 + 2|U_o(r)||U_R| \cdot \cos[\omega(t - t_R) - (\mathbf{k} - \mathbf{k}_R) \cdot \mathbf{r} + \Delta\phi(\mathbf{r})] \quad (1)$$

式中: $\mathbf{r} = (x, y)$ 代表空间坐标; t 代表时域坐标; $\Delta\phi(\mathbf{r})$ 为需要被解耦的相位分布; U_R 为沿 \mathbf{k}_R 波矢传播的平面波参考光场, 具有 t_R 时延; ω 代表角频率, 其附近的时间频率展宽则确定了时间相干性, \mathbf{k} 附近的空

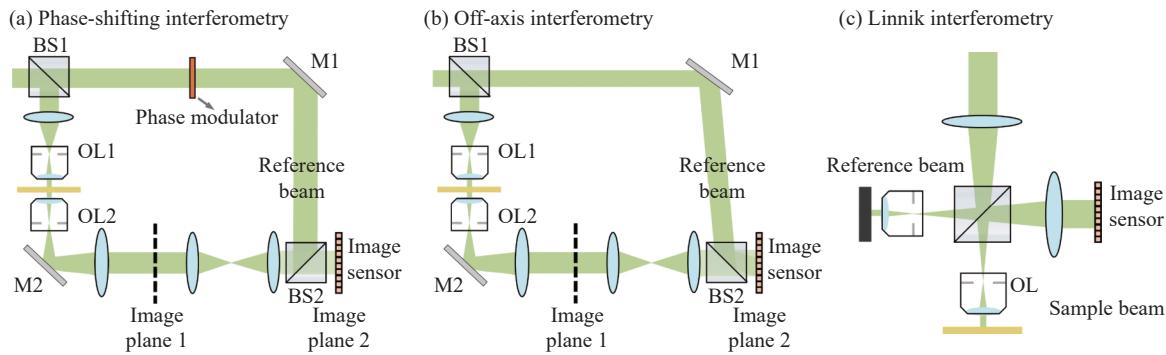


图1 iQPM原理与系统示意图。(a) 基于移相干涉仪的透射式系统;(b) 基于离轴干涉仪的透射式系统;(c) 基于林尼克干涉仪的反射式系统

Fig.1 Working principle and schematic system design of (a) Phase-shifting interferometry-based transmission-mode iQPM; (b) Off-axis interferometry-based transmission-mode iQPM; (c) Linnik interferometry-based epi-mode iQPM

间频率展宽确定了空间相干性。根据公式(1), 相位分布 $\Delta\phi(\mathbf{r})$ 的解析可以从时间和空间两个维度实现。从时间角度来说, 可以通过拍摄不同时间延迟 t_R 下的干涉图像来实现相位图提取, 即移相干涉术。从空间角度来说, 可通过利用单次拍摄下的一张载波周期为 $2\pi/|\mathbf{k} - \mathbf{k}_R|$ 的干涉图实现相位提取, 即离轴干涉术。相比之下, 后者由于其单次拍摄优势更适用于实时快速成像应用场景。

1.2 时间与空间相位灵敏度定义与实验测量

时间相位灵敏度受时间相位噪声的影响, 可用于衡量相位测量在时域内的稳定性; 其限制了可检测的最小相位变化, 在观测动态生物样本时尤为重要, 因为较大的时间相位噪声可能会掩盖微弱的动态信号。此外, 由于相位图的获取通常需要背景校准, 对于相位较小的样品而言, 系统的不稳定会导致相位测量不准确。为了定量描述干涉测量实验中的时间相位灵敏度, 可定义一个随机时间相位波动项 $\delta\phi(t)$, 该波动项主要来自空气波动和光学元件的机械振动, 与待测量的相位 $\phi(t)$ 共同组成了最终相位测量的结果(见图2(a))。在实验中, 通过连续测量无样本条件($\phi(t) = 0$)下的时序相位图可以获得时间相位灵敏度。时间相位噪声 σ_t 可以由空间中某一点的时域相位波动 $\delta\phi(t)$ 的标准差表述:

$$\sigma_t = \sqrt{[\delta\phi(t) - \langle \delta\phi(t) \rangle_t]^2} \quad (2)$$

式中: $\langle \delta\phi(t) \rangle_t$ 代表时序相位图中某一点的时域相位波动 $\delta\phi(t)$ 的均值。

空间相位灵敏度受空间相位噪声 σ_r 的影响, 可用于衡量系统检测最小形貌或折射率变化的能力(见

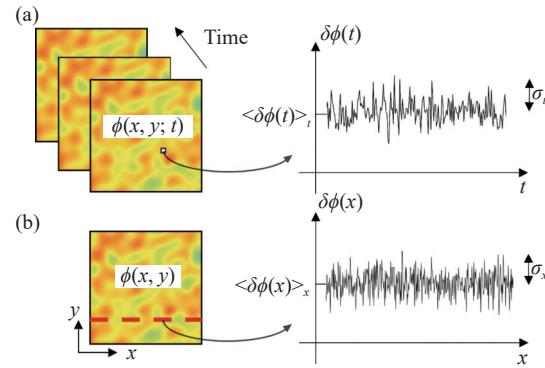


图2 (a) 相位图像的时间序列与指定点的时间相位噪声;(b) 相位图像与沿红线位置的空间相位噪声

Fig.2 (a) Time series of quantitative phase images and the temporal phase noise of the specified point; (b) The quantitative phase image and the spatial phase noise along the red line

图2(b))。空间相位噪声主要来源于光学表面杂质和样品基底起伏引起的随机干涉图样或散斑图样。这些噪声会在像面上叠加, 造成背景波动。 σ_r 可以通过计算无样品背景区域的相位图的空域标准差获得:

$$\sigma_r = \sqrt{[\delta\phi(r) - \langle \delta\phi(r) \rangle_r]^2} \quad (3)$$

式中: $\langle \delta\phi(r) \rangle_r$ 代表无样品背景相位图中空域相位波动 $\delta\phi(r)$ 的均值。图2(b)展示了沿x轴的空间相位噪声。

在实际测量中, 时间相位灵敏度 $\delta\phi_t$ 是空间上多点的标准差 σ_t 的平均值, 而空间相位灵敏度 $\delta\phi_r$ 则是多帧时序图的平均结果。这种统计处理方法是为了避免实验测量的偶然性。

1.3 时空相位灵敏度理论

相位测量过程中存在诸多噪声来源, 如相机噪声

(包括光子散粒噪声、暗噪声、读出噪声)、 $1/f$ 噪声、光源的不稳定波动、机械振动、空气扰动等影响时间相位灵敏度的噪声源(图3)、以及散斑噪声等影响空间相位灵敏度的噪声源。结合这些因素,可以得到一个定性的时空相位灵敏度公式:

$$\delta\phi \propto \delta\phi_{\text{det}} + \delta\phi_{\text{speckle}} + \delta\phi_{\text{vibration}} + \delta\phi_{\text{air}} + \delta\phi_{\text{source}} + \delta\phi_{\text{others}} \quad (4)$$

其中,相机噪声 $\delta\phi_{\text{det}}$ 主要包括了暗噪声 $\delta\phi_{\text{dark}}$ 、光子散粒噪声 $\delta\phi_{\text{photon}}$ 、读出噪声 $\delta\phi_{\text{read}}$ 和 $1/f$ 噪声 $\delta\phi_{1/f}$ 的贡献。暗噪声 $\delta\phi_{\text{dark}}$ 与温度和曝光时间有关,可通过减小曝光时间降低暗噪声;读出噪声 $\delta\phi_{\text{read}}$ 与电子信号的产生和放大以及数模转换有关。在照明强度足够大且曝光时间很短的情况下,光子散粒噪声 $\delta\phi_{\text{photon}}$ 将在相机探测端噪声中占主导作用, $1/f$ 噪声 $\delta\phi_{1/f}$ 属于电子噪声,其主要分布于低频。当高相干激光光源照射在系统中的不均匀表面时,由表面散射光场间的干涉将引入散斑噪声 $\delta\phi_{\text{speckle}}$ 。 $\delta\phi_{\text{vibration}}$ 来源于机械振动, $\delta\phi_{\text{air}}$ 来源于空气扰动, $\delta\phi_{\text{source}}$ 来源于光源的不稳定波动,这些都属于与样品无关的背景噪声。除此之外,在厚样品(如深组织)成像中,样品带来的系统像差对成像的影响将不可忽略;在探测大背景信号下的微小变化时,样品本身的背景结构也会干扰对微弱信号的探测。

为了提高iQPM的灵敏度水平,首先,需要降低环境扰动(如背景噪声)对干涉测量的干扰;其次,通过提升照明光强和降低曝光时间,使得来源于相机的读出噪声和暗噪声的影响可以被忽略;最后,通过优化照明模块调制光源相干性,以减少散斑噪声的影响。

在假设无环境干扰和光源稳定的理想条件下,CHEN等利用克拉美-罗界(Cramer-Rao Bound, CRB)

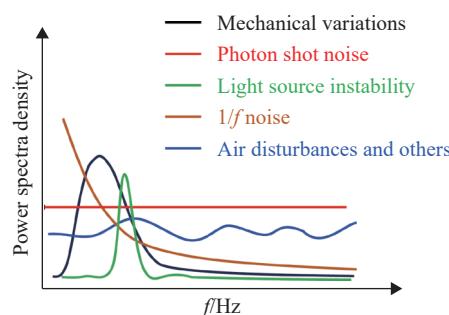


图3 相位测量中噪声源的功率谱密度分布

Fig.3 The noise power spectra density in phase measurement

提出了一个灵敏度评估框架,并将这个框架应用于移频干涉测量系统中,推导了在光子散粒噪声限制下的CRB条件^[20]。此外,HOSSEINI等则利用误差传播理论推导了受限于光子散粒噪声的时间相位灵敏度极限,得到了与CRB理论相同的结论^[21]。下文将简要复述后者的推导过程。

图4展示了离轴iQPM方法在相机上沿x方向的干涉条纹图,其周期为4个像素,该条纹内 x_1 点的相位可表示为:

$$\phi = \arctan\left(\frac{I_1 - I_3}{I_2 - I_4}\right) \quad (5)$$

其中,每个像素的强度 I_1, I_2, I_3, I_4 与相应的光子数量成正比。假设量子效率为100%,光子数完全转化为电子数 n_i ,并且在无样品条件下, $\phi \ll 1$ 。公式(5)可以进一步写为:

$$\phi \cong \left(\frac{n_1 - n_3}{n_2 - n_4}\right) \quad (6)$$

利用误差传播公式,可以由公式(6)得到相位的不确定性如下:

$$\delta^2\phi_{\text{photon}} \cong \left(\frac{n_1 - n_3}{n_2 - n_4}\right)^2 \left[\frac{\delta^2(n_1 - n_3)}{(n_1 - n_3)^2} + \frac{\delta^2(n_2 - n_4)}{(n_2 - n_4)^2} \right] \quad (7)$$

在仅存在光子散粒噪声的情况下,光子数服从泊松分布,即有 $\delta^2 n_i = n_i$ 。在条纹可见度为1的最佳条件下,干涉条纹中波峰点的电子数与相机的满电子阱容量 N 相等,即 $n_2 = N$,而波谷点的电子数 $n_4 = 0$,并且 $n_1 = n_3 = N/2$,如图4所示。公式(7)可以进一步简化为:

$$\delta^2\phi_{\text{photon}} \cong \frac{\delta^2(n_1 - n_3)}{(n_2 - n_4)^2} = \frac{n_1 + n_3}{(n_2 - n_4)^2} = \frac{1}{N} \quad (8)$$

考虑到实际相位成像中的衍射效应,每个像素的相位测量值还会受到整个衍射斑的影响。因此,为了准确评估时间相位灵敏度,需要对一个衍射斑内的 m 个像素进行加权处理。同时,在实验过程中,由于难以充分利用整个电子势阱容量,在估计灵敏度极限时,需要从干涉图的直方图中获取相机的有效电子势阱容量(Effective electron-well-capacity) N_{eff} ,即:

$$\delta\phi_{\text{photon}} = \frac{1}{\sqrt{mN_{\text{eff}}}} \quad (9)$$

其中, m 由成像物镜的数值孔径、系统的总放大倍数和相机的像素大小决定。公式(9)表明:增加有效电子势阱,即增强探测的干涉光强度,可以提升时间相

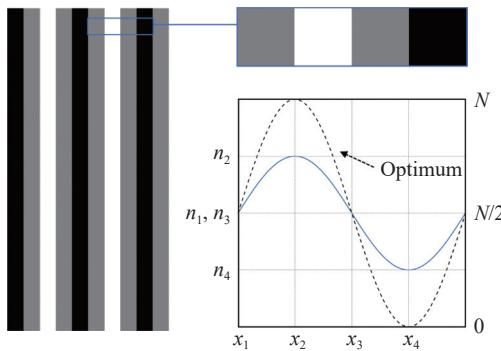


图4 干涉图示意图与相对于相机满电子阱的强度分布

Fig.4 Sketch of the raw interferogram and the intensity profile distribution relative to the full electron well depth of the camera

位灵敏度。虽然通过公式(9)可以得出, m 的增加也可以提升时间相位灵敏度, 但它会牺牲成像分辨率。

2 相位灵敏度提升策略

上节已经分析了相位测量中的噪声来源, 它们限制了 iQPM 的相位灵敏度水平。近年来, 针对这些限制因素, 研究人员提出了诸多策略来提升相位灵敏度。下面将从环境噪声抑制(2.1节)、探测噪声抑制(2.2节)和散斑噪声抑制(2.3节)等方面着重介绍灵敏度提升策略中的一些突破性工作和最新进展。

2.1 环境噪声抑制策略

2.1.1 共路干涉减振策略

在基于双光束干涉的 iQPM 中, 分离的物光和参考光束容易受到环境中的机械振动和空气波动影响, 导致光轴偏离和光程差变化, 从而降低了干涉条纹的稳定性。而基于共路干涉的离轴 iQPM 技术可以消除这种噪声, 这是由于物光和参考光在同一干扰下引起的相同噪声影响可以在测量相位差时被消除, 从而提高了系统的稳定性。

POPESCU 等^[22]开发了衍射相位显微技术(Diffraction Phase Microscopy, DPM), 通过在像平面放置一个衍射光栅, 并选择空间滤波后的零级和完整的一级衍射光束分别作为参考光和物光, 在相机面形成共路干涉, 可获得高稳定性定量相位成像。为了深入探究环境机械振动对时间相位灵敏度的影响, NIE 等比较了在四种不同的噪声环境条件下共路 iQPM 和非共路 iQPM 系统的时间相位灵敏度水平^[23]。在每种条件下, 以 500 frame/s 的速度记录 25 个堆栈, 每个堆栈包含 601 帧干涉图, 每帧图像大小为 1024 pixel ×

1 024 pixel。在每个堆栈中, 利用每个相位帧的平均相位值计算频谱。共路干涉(Common-path interferometer)系统和非共路干涉(Non-common path interferometer)系统的 25 个叠加的平均频谱分别如图 5(a) 和 5(b) 所示。频谱分析表明, 共路干涉设计通过隔离由机械振动和环境空气扰动引起的频率为 15~30 Hz 与 185~

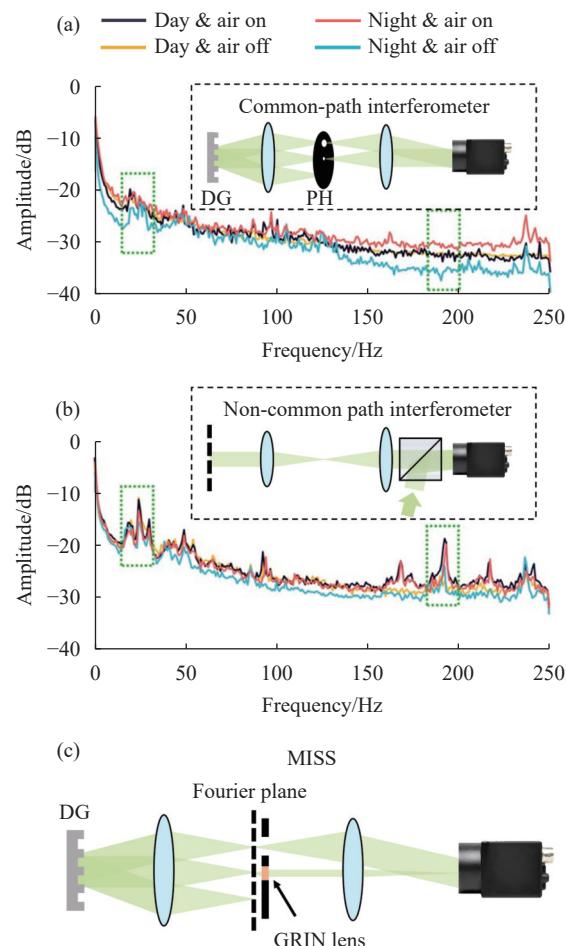


图5 利用共路干涉降低噪声的策略。(a)~(b) 用共路和非共路 QPM 系统测量的相位图的平均频谱(对数标度)^[23](图改编自文献 [23])。带宽选择: 15~30 Hz、185~200 Hz。BS-分束器、DG-衍射光栅、PH-针孔;(c) MISS 显微系统干涉部分示意图

Fig.5 Noise reduction strategies with common-path interference.

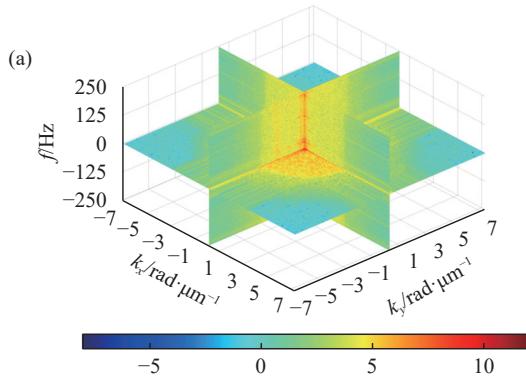
(a)-(b) The averaged frequency spectra (in logarithmic scale) of the phase maps measured with common-path and non-common-path QPM systems, respectively^[23] (figures adapted from reference [23]). Selected bandwidth: 15-30 Hz and 185-200 Hz. BS-beam splitter, DG-diffraction grating, and PH-pinhole; (c) The schematic design of interferometric imaging part of MISS microscopy

200 Hz 的噪声, 提高了时间相位灵敏度。

此外, MAJEED 等^[24]针对 DPM 技术存在的挑战, 如微米级针孔尺寸所导致的参考光利用效率降低以及针孔易于随时间偏移等问题, 提出了放大图像空间光谱 (Magnified Image Spatial Spectrum, MISS) QPM 技术, 如图 5(c) 所示。与 DPM 类似的是, MISS 也使用衍射光栅构建共路干涉仪。但是, MISS 未使用微米级针孔进行空间滤波, 而是在傅里叶平面后放置了一个 350 μm 直径的小焦距梯度折射率透镜 (gradient index lens, GRIN lens), 并使其前焦面与傅里叶平面重合, 以此放大空间光谱。这种设计避免了每次实验前对针孔的调整。此外, 使用 GRIN 透镜不仅使系统易于对齐, 还因为其较大直径, 使得 MISS 系统在长时间测量中更不易漂移。尽管 GRIN 透镜的引入会导致焦面位置不准确, 但与 DPM 相比, MISS 的结构改进使得参考光的信号收集更加高效, 提高了条纹对比度, 从而提升了时间相位灵敏度。

2.1.2 时空滤波方法

时间和空间带宽 (Bandwidth, BW) 滤波方法 (简称时空滤波方法) 可以用来消除振动噪声。对所选的图像堆栈在 x 、 y 和 t 三个维度进行傅里叶变换, 可以绘制出时空域对应的 k_x - k_y - f 三维频谱图, 如图 6 所示。所选的空间频率 BW 是以原点为中心、半径分别为 2π 、 π 和 $\pi/2$ 的圆。当选择的时间频率 BW 处于低频时 (如显著受振动噪声影响的 15~55 Hz 频段), 降低空间频率 BW 使得时间相位灵敏度值分别降至 5.6 pm (2π)、4.4 pm (π) 和 3.4 pm ($\pi/2$), 表明牺牲所选时间频率范围的空间分辨率可以提高时间相位灵敏度。另一方面, 当选择的时间频率 BW 处于高频 (如 180~220 Hz 频段, 其中振动噪声可忽略不计) 时, 若空



	Temporal BW/Hz	Spatial BW/rad·μm⁻¹	OPL/nm
15-55	2π	5.6	
	π	4.4	
	$\pi/2$	3.4	
	2π	4.3	
180-220	π	3.1	
	$\pi/2$	1.9	

图 6 时空滤波方法示意图。(a) k_x - k_y - f 三维时空频域中 k_x - k_y , k_x - f , k_y - f 三个不同平面的时空频谱, k_x , k_y 分别代表 x , y 的空间频域变量, f 代表时间频域变量, 颜色尺为对数比例尺; (b) 在所选时空频率带宽上进行带通滤波, 其中时间带宽 (Temporal bandwidth) 分别取频率为 15~55 Hz 和 180~220 Hz 的区域, 空间带宽 (Spatial bandwidth) 分别取 k_x - k_y 平面上以 2π 、 π 和 $\pi/2$ 为半径的圆形区域^[23]

Fig.6 The schematic of spatiotemporal filtering method. (a) Spatiotemporal spectrum along three different planes (k_x - k_y , k_x - f , k_y - f) in the k_x - k_y - f 3D frequency domain, where k_x and k_y stand for spatial frequencies in the x - and y -directions, respectively, and f axis stands for the temporal frequency in the t direction, color map is in the log scale; (b) Bandpass filtering over the selected spatiotemporal bands, where two temporal bandwidth regions of 15~55 Hz and 180~220 Hz and three spatial bandwidth regions with radii of 2π , π and $\pi/2$ are selected, respectively^[23]

间频率 BW 设置为 $\pi/2$, 最佳时间相位灵敏度为 1.9 pm。上述分析表明, 灵活选择空间和时间频率 BW 可以有效突破相位灵敏度的限制。

2.2 探测端噪声抑制策略

2.2.1 高电子势阱探测

根据 1.3 节的时空相位灵敏度理论, 电子势阱容量越大, 时间相位灵敏度就越高。这是因为增加了相机探测信号的强度, 在相同的时间波动条件下, 噪声对信号的干扰相对减少, 从而显著提升了时间相位灵敏度。基于这一理论, HOSSEINI 等首先使用高电子势阱容量的相机获得时间相位灵敏度提升^[21]。进一步, NIE 等在 DPM 的基础上, 采用高电子势阱容量的相机并结合时空滤波方法与帧求和法 (见 2.2.2 节), 突破了时间相位灵敏度的限制, 将离轴 iQPM 的时间相位灵敏度提升至 2 pm^[23]。

2.2.2 帧求和法

考虑理想情况, 相机的满电子势阱容量为 N , 采集 M 个原始干涉图后并将其相加, 最终获得的

求和干涉图中, 电子数为 $n_2 = M \cdot N, n_4 = 0, n_1 + n_3 = M \cdot N/2$ 。因此, 在帧求和方法下的时间相位灵敏度可以表达为:

$$\delta\phi'_{\text{photon}} = \frac{1}{\sqrt{M \cdot m N_{\text{eff}}}} \quad (10)$$

由公式(10)可知, 通过对 M 帧干涉图进行求和, 时间相位灵敏度可以提高 \sqrt{M} 倍, 提升效果与使用满电子势阱为 $M \cdot N$ 的相机探测相当, 该方法的流程如图 7 所示。首先从每个像素的强度中减去单帧的平均值, 并将原始干涉图的强度归一化到 0~1 范围。将归一化的原始干涉图分成 l 组, 每组包含 T 帧。之后, 对每组中的图像逐像素求和, 生成求和干涉图堆栈 ($S = \{I_{s1}, I_{s2}, \dots, I_{sl}\}$)。随后, 使用第一个求和干涉图 I_{s1} (蓝色虚线框表示) 作为校准相位图像, 得到相位堆栈 $Q = \{P_{s2}, P_{s3}, \dots, P_{sl}\}$ 。通过从每个相位图中减去

帧平均值进行校准, 然后计算每个像素的标准差。最终, 时间相位灵敏度值由这些标准差图的平均值确定。

时间相位灵敏度会同时受到有效电子势阱容量 N_{eff} 与帧总数的影响。通过改变激光照射强度, 干涉图直方图中两个峰值之差 $N_{\text{eff}} = N_2 - N_1$ 可以被调节, 如图 7(b) 所示。分析六组不同的 N_{eff} 值, 从图 7(c) 的结果可以观察到, N_{eff} 与时间相位灵敏度呈现反比关系, 这与灵敏度理论相符。图 7(d) 展示了时间相位灵敏度与采集帧数之间的关系。结果表明, 当帧求和数从 10 增加至 50 时, 降噪效果并未有很大提升, 这是因为在帧求和数大于 10 的情况下, 环境振动等其他噪声的作用会超过光子散粒噪声而起主导作用, 帧求和法降噪作用将有所降低, 所以, 通过牺牲拍摄时间来提高时间相位灵敏度的帧求和法的提升效果是有限的。

2.2.3 自适应动态范围拓展

传统技术中的图像传感器经常暴露于强光照下, 限制了测量的动态范围。为了解决这一问题, TODA 等^[25]提出了自适应动态范围偏移 QPI (Adaptive Dynamic Range Shift Quantitative Phase Imaging, ADRIFT-QPI) 方法, 其工作原理如图 8(a) 所示。该方法在获取大的相位分布后, 使用相位空间光调制器 (Spatial Light Modulator, SLM) 对波前进行整形, 以消除大 OPD 分布的影响, 从而使光恢复到准平面波。随后, 相消暗场定量相位成像 (Phase-cancelling Dark-field Quantitative Phase Imaging, PC-DF-QPI) 技术被应用其中, 通过在傅里叶平面放置单点暗场掩模 (DF 掩模), 选择性隔离光场的低频部分, 仅允许高频部分的光被图像传感器接收。因此, 当 PC-DF-QPI 使用更强光照进行第二次测量时, 动态范围会被移动到较小的相位探测范围。通过将 PC-DF-QPI 测量图像与 SLM 输入的 OPD 分布进行叠加, 可以重建出具有动态范围扩展的 OPD 图像, 实现对细胞全局结构和微小散射信号的同步定量检测。

图 8(b) 展示了在中红外泵浦光关闭状态下, 通过数字全息 (Digital Holography, DH) 和 ADRIFT-DH 获得的二氧化硅微球的 OPD 图像。由中红外泵浦光作用后, 二氧化硅微球会吸收泵浦光, 产生 OPD 变化, 图 8(c) 展示了通过 DH 和 ADRIFT-DH 方法测量的结

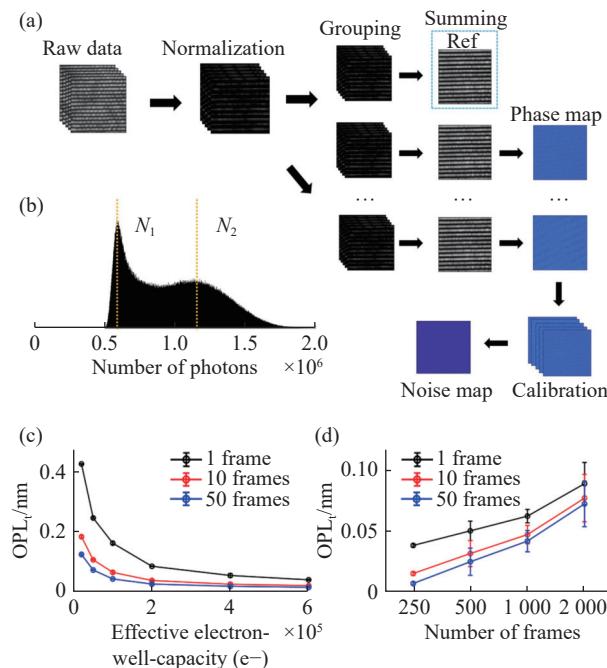


图 7 帧求和法示意图 (a) 帧求和算法流程图; (b) 原始干涉图强度分布直方图; (c) 和 (d) 分别为应用帧求和法时, 时间相位灵敏度与有效电子势阱容量和帧数的关系^[23](图改编自文献 [23])

Fig.7 The schematic of frame summing method (a) Flow chart of the frame summing algorithm; (b) Histogram of the intensity distribution of a raw interferogram; (c) and (d) show the relations between the temporal phase sensitivity and the effective well capacity and frame numbers, respectively^[23] (figures adapted from reference [23])

果图。实验结果表明, ADRIFT-DH 方法可检测到的最小 OPD 变化相比传统 DH 方法降低了 6.6 倍, 能

够同时显示样品原始的 OPD 分布与细微的 OPD 变化。

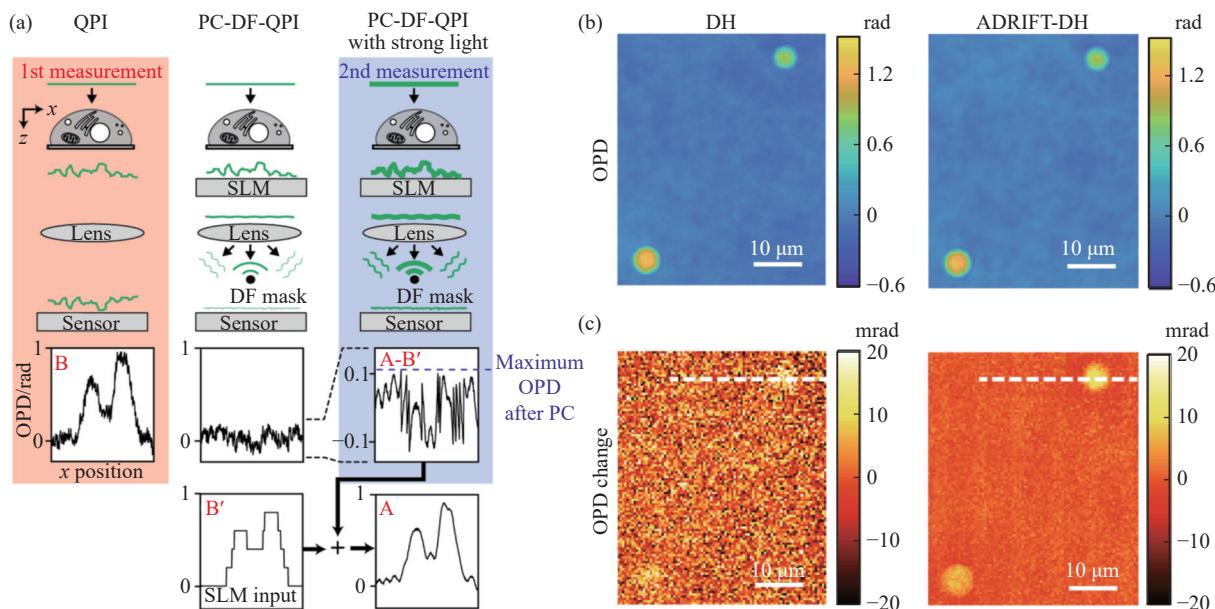


图 8 (a) ADRIFT-QPI 的动态范围拓展原理;(b) 在 MIR OFF 状态下,由 DH(左)和 ADRIFT-DH(右)测量的 OPD 图像;(c)由 DH(左)和 ADRIFT-DH(右)测量的 MIR 泵浦光吸收引起的光热 OPD 变化图像^[25]

Fig.8 (a) Principle of dynamic range expansion in ADRIFT-QPI; (b) PD images measured by DH (left) and ADRIFT-DH (right) in the MIR OFF state; (c) Images of the photothermal OPD changes due to absorption of the MIR pump light measured by DH (left) and ADRIFT-DH (right)^[25]

2.3 散斑噪声抑制策略

散斑噪声抑制策略的核心是叠加互不相干的散斑图案, 这可以通过降低照明光源的时间相干性或调制照明光的空间频谱来实现^[26]。2017 年, SHIN 等系统研究了不同光照时空相干度下对干涉显微成像质量的影响, 给出了散斑噪声(σ_ϕ)与空间和时间相干长度(l_s, l_t)的关系, 如图 9 所示。研究结果表明, 随着空间和时间相干长度的减小, 散斑噪声逐渐减少。此外, 降低空间相干性对散斑噪声的抑制效果是降低了时间相干性的 2.6~7.1 倍, 如图 9(e) 和 9(f) 所示。这一研究结果揭示了低相干光源在时间和空间两个维度上对散斑噪声抑制的协同效应和对比效果。本节主要回顾了基于照明光源带宽的时间相干性调制和基于合成孔径方法与散斑照明的照明光空间频谱调制的灵敏度提升策略。

2.3.1 照明光时间相干性的降低

在时间上降低光源相干性主要依靠宽带光照明

的方法, 原理如图 9(b) 所示。空间光干涉显微术 (Spatial Light Interference Microscopy, SLIM) 是一种基于宽带照明移相干涉的高灵敏度 iQPM 技术^[28-29]。SLIM 系统在商用相衬显微镜的基础上增加一个模块, 如图 10(a) 所示, 其附加模块中的 SLM 在瞳孔平面上施加增量为 $\pi/2$ 的相移, 图中四个圆表示 SLM 产生的不同相移。这种相移控制了散射场和非散射场之间的相位延迟, 并通过相机捕获四幅不同相移的图像, 最终用于相位图的重建。SLIM 结合了白光照明的时间低相干性和共路干涉测量的稳定性, 与 DPM 技术相比, SLIM 展现了较高的空间均匀性和测量精度, 如图 10(b) 和 10(c) 所示, 这得益于 SLIM 使用的宽带照明降低了散斑噪声的影响。通过对 SLIM 图像的直方图分析(图 10(d)), 能够量化其相位灵敏度, 其中时间和空间相位灵敏度分别达到了 0.03 nm 和 0.3 nm。

2020 年, CHEN 等^[30]开发了基于 SLIM 技术的

Wolf 相位层析术 (Wolf Phase Tomography, WPT)。WPT 通过结合部分相干照明的优点, 实现了对弱散射样本的无散斑三维成像, 通过对三维活细胞动

态变化的成像证明了其折射率灵敏度可达 10^{-5} 量级。

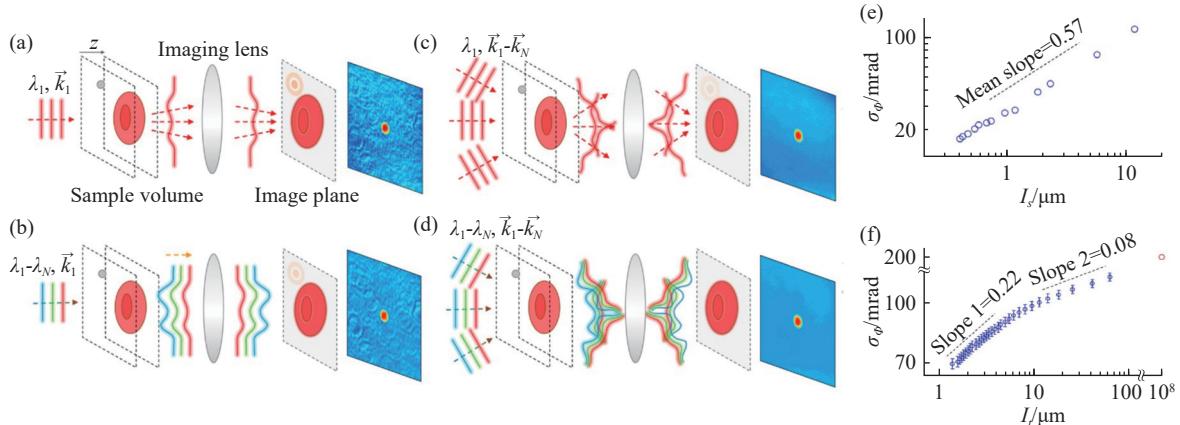
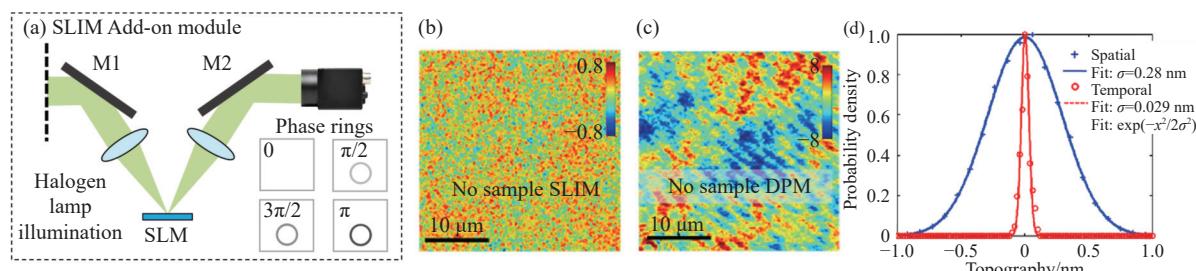


图 9 (a) 时空高相干, (b) 空间高相干、时间低相干, (c) 时间高相干、空间低相干, (d) 时空低相干下的散斑噪声示意图; (e) 控制 $l_t = 63.3 \mu\text{m}$ 时散斑噪声关于空间相干长度的变化图; (f) 控制 $l_t = 11.8 \mu\text{m}$ 时散斑噪声关于时间相干长度的变化图^[27](图改编自文献 [27])

Fig.9 Speckle noises whose illuminations are (a) spatiotemporally coherent, (b) temporally coherent and spatially low coherent, (c) spatially coherent and temporally low coherent, and (d) spatiotemporally low coherent; (e) σ_ϕ against l_s with $l_t = 63.3 \mu\text{m}$ and (f) is σ_ϕ against l_t with $l_s = 11.8 \mu\text{m}$ ^[27] (figures adapted from reference [27])

采取拓展照明时间相干性的思路, 多色数字全息显微术 (Polychromatic Digital Holographic Microscopy, P-DHM) 通过获取多光谱全息图降低散斑噪声^[31]。图 10(e)展示了 P-DHM 的照明模块, 其中传统的相干光源被超连续白光激光器 (Supercontinuum White-Light Laser, SWLL) 和多波长声光可调滤波器 (Acousto-optic Tunable Filter, AOTF) 组成的可调谐激光照明系统所取代。P-DHM 需要首先在 500~850 nm 的波长范围内, 以 10 nm 为步长, 共采集 36 个全息图的堆栈。通过平均在多波长照明下的 36 个 OPD 图像, 可以获得降噪后的 P-DHM 图像。作为对照, 研究人员采集了 36 张相同波长 (540 nm) 照明下的全息图, 以生成

单波长平均的对照 OPD 图像。结果显示, 与单帧单一波长的 OPD 图像相比, 对照组的 OPD 图像噪声减少了约 1.4 倍, 而由 P-DHM 方法获得的 OPD 图像的噪声降低了近 6 倍。图 10(f)展示了图像中的轮廓线的比较, 对照组的 36 张 OPD 曲线几乎一致, 而 P-DHM 中不同波长的 OPD 曲线则表现出较大差异。这表明波长变化显著降低了各 OPD 图像间的相干噪声, 从而解释了 P-DHM 在降低相干噪声方面的高效性。图 10(g)展示了对照组和 P-DHM 的 OPD 图像中线轮廓的统计分析。对于 P-DHM 而言, 随着叠加的波长数目 M 的增加, 背景标准差 (空间噪声) 遵循 $1/\sqrt{M}$ 的关系。



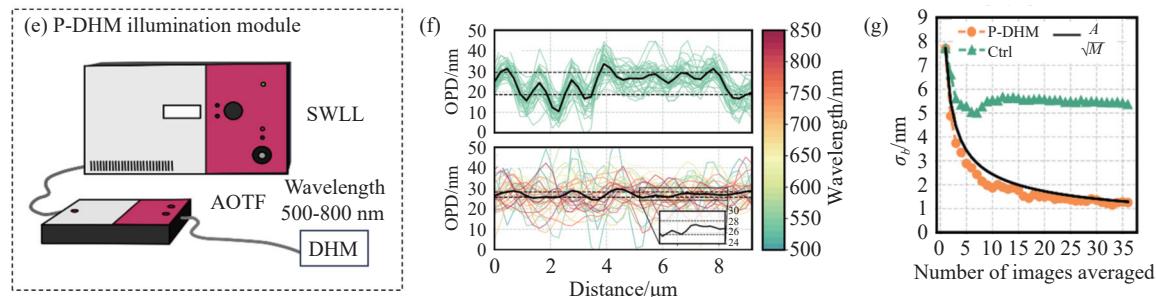


图 10 (a) 与商用相衬显微镜结合的 SLIM 附加模块示意图。SLIM 采用了相干长度极短的卤素灯照明 (中心波长约为 552.3 nm), 并利用 SLM 在瞳孔平面上产生以 $\pi/2$ 为增量的相移, 通过记录不同相移下的图像实现相位重建; (b) SLIM 和 (c) DPM 重建的无样品区域 OPD 图, 其中 SLIM 在具有共路干涉测量的高稳定性优势的同时, 采用宽光谱照明以减轻散斑效应, 使得其空间均匀性和测量精度明显优于 DPM, 颜色尺以 nm 为单位; (d) 空间和时间上测量的光程长度噪声, 分别为 0.3 nm 和 0.03 nm, 实线表示高斯拟合结果^[28]; (e) P-DHM 中采用超连续白光激光器 (Supercontinuum White-Light Laser, SWLL) 与多波长声光可调滤波器 (Acousto-optic Tunable Filter, AOTF) 结合的照明模块以代替传统的相干光源; (f) 对照组 (36 张 540 nm 相同波长照明下的全息图) 和 P-DHM 方法 (36 张 500~850 nm 多波长照明下的全息图) 测量的 OPD 平均值曲线以黑色显示, 用于帧平均法的单帧图像的 OPD 轮廓以彩色显示, 对应于采集波长; (g) 对照组 (绿色) 和 P-DHM (橙色) 方法中的 σ_0 和平均帧数 N 的关系^[31], 黑线为理论曲线, A 为第一个数据点

Fig.10 (a) Schematic of the SLIM add-on module integrated with a commercial microscope. The system employs white light illumination (central wavelength 552.3 nm) with ultra-short coherence length. A SLM is placed at the pupil plane to generate phase shifts in $\pi/2$ increments, and phase reconstruction can be realized by recording images under different phase shifts; (b) The OPD maps of the sample-free region obtained by (b) SLIM and (c) DPM reconstruction. Benefiting from high stability of common-channel interferometry, and the reduction of speckle noise with white light illumination, the phase image retrieved by SLIM has the superior spatial uniformity and measurement precision, where colorbar in nanometers; (d) OPD noise levels measured spatially and temporally, which are 0.3 nm and 0.03 nm, respectively. The solid lines indicate Gaussian fitting^[28]; (e) In P-DHM, the traditional coherent illumination module is replaced by a SWLL combined with an AOTF; (f) The average OPD curves for the control group (36 holograms under 540 nm illumination) and the P-DHM method (36 holograms under 500~850 nm multi-wavelength illumination) are shown in black, while the OPD curves of single-frame images used for frame averaging are shown in colors corresponding to the respective wavelengths; (g) The relationship between σ_0 and the averaged frame number N in the control (green) and P-DHM (orange) methods^[31]. The black line is the theoretical curve, where A is value of the first data point

2.3.2 照明光空间频谱调制

调制照明光的空间频谱的方案可以分为两种: 角度扫描照明与结构光照明, 原理如图 9(c) 所示。采用角度扫描照明方案, ZHENG 等^[32] 提出了高时空分辨率合成孔径相位显微技术 (High Spatial and Temporal Resolution Synthetic Aperture Phase Microscopy, HISTR-SAPM), 利用数字微镜器件 (Digital Micro-mirror Device, DMD), HISTR-SAPM 实现了高速、高稳定性的照明光束的角度扫描。

通过获得在多角度照明条件下的相位图, HISTR-SAPM 可以重建出分辨率提升 2 倍的相位图像。图 11(a) 展示了 HISTR-SAPM 的照明模块, 图 11(b)~(e) 分别展示了正入射照明下和基于 HISTR-SAPM 重建后的 COS-7 细胞和 HeLa 细胞的相位图。由于照明角度变化会降低各相位图像间的相干噪声, 在 HISTR-SAPM 重建的高分辨图像中, 噪声显著减少, 细胞轮廓和亚细胞结构更加清晰, 例如 COS-7 细胞中

的亚细胞结构和 HeLa 细胞的核膜及核仁。

对于结构光照明方案, 2018 年, CHOI 等^[33] 提出了一种反射式相位显微成像技术, 该技术整体采用了林尼克干涉仪的结构, 使用中心波长为 800 nm、带宽为 170 nm 的宽谱照明作为时间相干门控, 并通过引入旋转的扩散片生成动态散斑照明场作为空间相干门控, 利用光栅和偏振片实现物光和参考光的分离, 以实现离轴干涉, 最终达到 1 nm 的成像灵敏度, 成功对活细胞核膜的动态变化完成实时观测。最近, 由 KANG 等提出的散斑衍射层析术 (Speckle Diffraction Tomography, SDT)^[34] 则使用中心波长为 800 nm、带宽为 40 nm 的宽谱照明, 并利用扩散片产生散斑场, 此外, 该技术还引入了四维点扩散函数 (Four-Dimensional Point Spread Function, 4D PSF), 通过将待观测样品分解为层状结构, 利用动态散斑场干涉技术进行时空间门控, 成功抑制了多重散射背景的干扰, 实现了对厚生物组织 (如大鼠眼角膜) 的三维成像, 并量化了其光学特性,

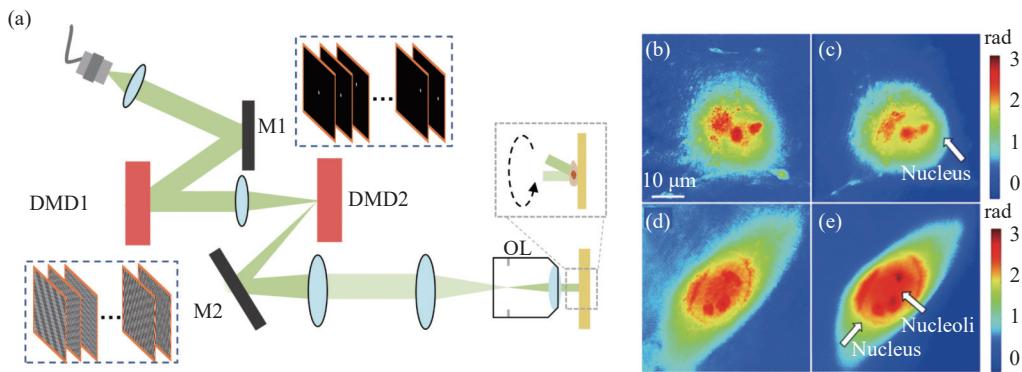


图 11 (a) HISTR-SAPM 中基于双 DMD 器件的高速角度扫描照明示意图; (b)~(c) 正常光照下 COS-7 和 HeLa 细胞的相位图; (d)~(e) 用 HISTR-SAPM 重建的 (a)、(d) 中显示细胞的相位图^[32](图改编自文献 [32])

Fig.11 (a) Schematic design of high-speed angle-scanning illumination based on dual DMD devices in HISTR-SAPM; (b)-(c) Phase maps of a COS-7 and a HeLa cell under normal illumination; (d)-(e) Phase maps reconstructed with HISTR-SAPM for the cells in (a), (d)^[32] (figures adapted from reference [32])

绘制出了 Dua 膜和 Descemet 膜的纳米级形貌特征。

3 高灵敏度 iQPM 的应用

相位灵敏度的提升使得 iQPM 可以满足一些前沿应用领域的需求,如血细胞分析、神经成像、原子材料厚度计量以及晶圆缺陷检测。下面将着重介绍高灵敏度 iQPM 在这些应用领域的最新进展。

3.1 血细胞分析

血细胞分析是诊断机体健康状况的重要方法。精准分类血细胞亚群,分析形态特征可以为疾病诊断

提供重要参考。例如,量化红细胞机械变形有助于快速诊断遗传性血液病;高精度区分白细胞亚群有助于快速筛查免疫和传染性疾病。目前的分析方法包括血液涂片试验和免疫荧光流式细胞术,依赖于对大量细胞的标记。为了实现原生态实时监测红细胞动力学特性,NIE 等^[23]开发了高灵敏度 iQPM 技术,实现了对悬浮在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中活性红细胞的纳米级膜位移的精准测量,测量结果如图 12(a)所示。结合机器学习算法,SHU 等^[35]利用不同白细胞亚型的相位图(图 12(b))训练具有两步分类的级联

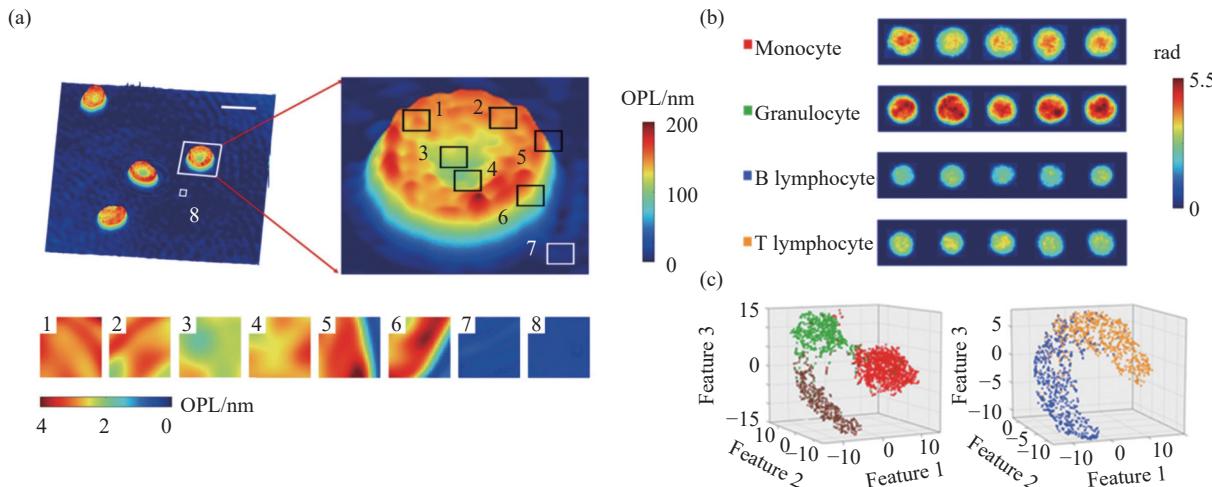


图 12 (a) 高灵敏度 iQPM 用于监测人类红细胞力学特性^[23](比例尺: 10 μm); (b) 单核细胞(红色)、粒细胞(绿色)、B 淋巴细胞(蓝色)、T 淋巴细胞(橙色)的代表性相位图; (c) 单核-粒细胞-淋巴细胞分类器和 B-T 淋巴细胞分类器提取特征的 t-SNE 可视化^[35]

Fig.12 (a) Dynamics monitoring of human red blood cells by high-sensitivity iQPM^[23] (Scale bar: 10 μm); (b) Representative phase images for monocytes (red), granulocytes (green), B lymphocytes (blue), and T lymphocytes (orange); (c) t-SNE visualization of the feature extracted by the monocyte–granulocyte–lymphocyte classifier and the B-T lymphocyte classifier^[35]

残差神经网络 (Cascaded-ResNet) 模型, 提取细胞图像特征, 实现了对单核细胞、粒细胞以及 B 和 T 淋巴细胞的分类, 其平均分类准确率高达 90.5%。通过采用 t-随机邻近嵌入法 (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding, t-SNE) 对两步分类提取的特征进行可视化, 结果如图 12(c) 所示。

3.2 神经成像

细胞动作电位的探测主要通过电学或光学记录。电学方法要求电极放置在观察的细胞附近, 具有侵入性, 而光学测量依赖于外源性荧光探针, 如 Ca^{2+} 指示剂。 Ca^{2+} 成像的时间分辨率较低, 并且受到光漂白的限制。2018 年, LING 等^[36] 通过对目标区域进行帧求和与迭代空间平均来实现高灵敏相位成

像。利用非侵入性的高灵敏度 iQPM 方法, 对动作电位传播过程进行全场干涉成像, 在无外源标记和无电极侵入的情况下, 成功检测单个动作电位下整个 HEK-293 细胞 3 nm (0.9 mrad) 的微弱形变的动力学响应的检测。2020 年, LING 等进一步报告了一种基于棘波触发平均 (Spike-triggered Averaging, STA) 技术的高速 QPM 方法, 对伴随动作电位的神经元形变进行高时空分辨率全场干涉成像^[37]。该技术通过引入高电子势阱容量相机, 优化 STA 过程的噪声因素, 达到 0.1 ms 的时间分辨率和每像素 4 pm 的相位灵敏度。图 13(a) 展示了该方法对伴随动作电位的神经元快速形变的成像结果, 成功揭示了电生理细胞中的机电耦合机制。

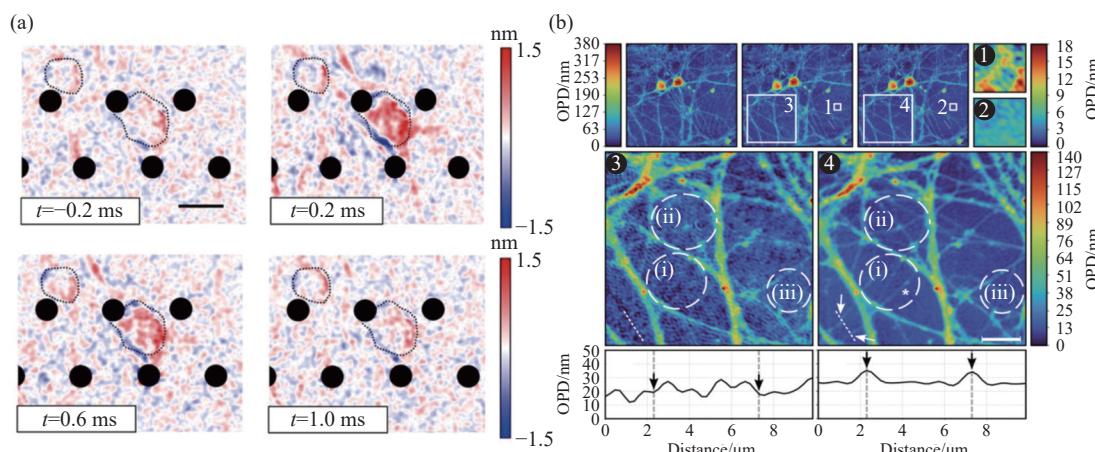


图 13 (a) 神经元的形变检测^[37](比例尺: 20 μm); (b) 540 nm 光照下获取的单次图像、对照图像和 P-DHM 图像^[31](比例尺: 10 μm)

Fig.13 (a) The inspection of the cellular deformation across a neuron^[37] (Scale bar: 20 μm); (b) Comparison between the single-shot image acquired with 540 nm illumination, control image, and P-DHM image^[31] (Scale bar: 10 μm)

为减轻相干噪声对 DHM 图像质量的影响, LARIVIÈRE-LOISELLE 等^[31] 开发了 P-DHM(图 13(b)), 该技术可以有效抑制噪声, 并捕捉到 DHM 无法识别的 1 μm 宽度的薄神经元突起。P-DHM 技术特别适用于研究神经元连接及其发育过程, 它能够有效、长时间(从几小时到几周) 观测神经突起的生长过程。

值得注意的是, 以上方法都是通过采集多帧相位图来实现相位灵敏度的提升。为了实时监测毫秒级神经动作电位过程中引起的细胞微弱形变, 需要进一步探索可直接利用单帧成像实现超高灵敏度探测的新技术。

3.3 原子材料厚度计量

二维材料由于其优异的光电子特性, 被认为是下一代光电子器件的重要候选材料。为了保证二维材料器件的高产量和性能, 需要开发具有高通量且原子级精度的计量工具。现有二维材料厚度测量方法如 AFM, SEM 虽然有较高的测量精度, 但是都面临着通量不足等问题。针对此问题, NIE 等提出传输矩阵定量相位轮廓术 (Transmission-matrix Quantitative Phase Profilometry, TM-QPP)^[38], 实现了快速、高精度的原子材料厚度检测。其中, TM-QPP 利用了激光照明共路离轴干涉的优势, 显著减少了外部环境扰动对系统成

像稳定性的影响。利用高速、高电子势阱容量相机采集干涉图像，并通过帧求和法与时空滤波后处理方法，将相位灵敏度提升到时间上小于 6 pm、空间上小于 19 pm 的水平。为精确测量样品的几何厚度，他们进一步提出了一种基于传输矩阵的厚度重建模型，这一模型考虑了光在样品界面处的多次折射和反射，而传统的厚度重建模型则未考虑这些因素。TM-QPP 不仅能够用来精确绘制各种单层和少层二维材

料（如 MoS₂、MoSe₂ 和 WSe₂）的厚度分布，还能准确分辨材料的层数，如图 14 所示，实验结果与 AFM 的测量结果相符。与基于点扫描的 AFM 相比，TM-QPP 测量的吞吐量提高了 100 倍。此外，TM-QPP 的非接触特性在无损表征中展现了独特的优势，这进一步证明了 TM-QPP 在未来高速、高精度薄膜结构厚度分布测量中具有广泛的应用潜力。

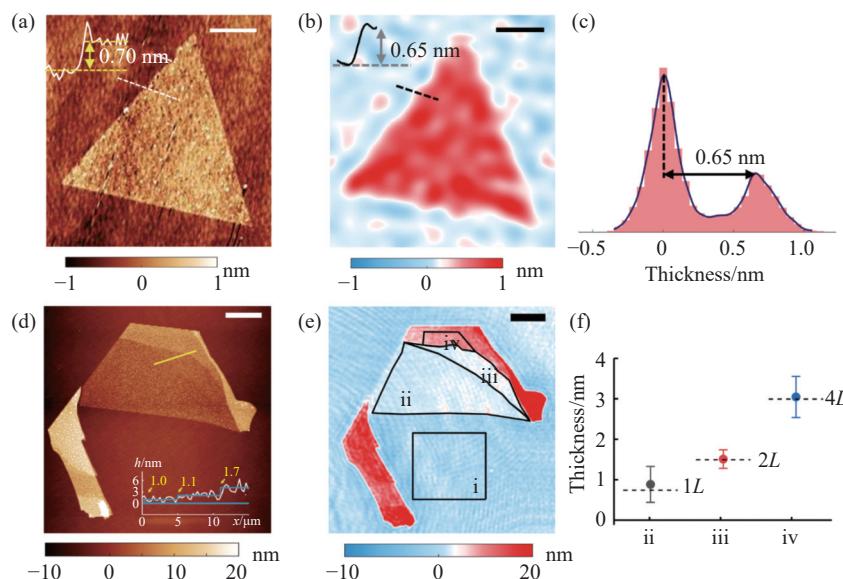


图 14 (a)~(b) 单层 MoS₂ 的 AFM 和 TM-QPP 测量厚度结果图 (比例尺: 2 μm); (c) 图 (b) 的直方图分析; (d)~(e) 多层 WSe₂ 的 AFM 和 TM-QPP 测量厚度重建图 (比例尺: 10 μm); (f) 通过计算各个区域的几何厚度并与虚线标出的对应层数的参考厚度值对比，可以确定 ii~iv 区域的层数分别为 1L、2L、4L，误差线由对应区域几何厚度的标准差决定^[38](图改编自文献 [38])

Fig.14 (a)-(b) The thickness mapping results of a monolayer MoS₂ sample by AFM and TM-QPP, respectively (scale bars: 2 μm); (c) The histogram of the geometric thicknesses map shown in (b); (d) and (e) The thickness mapping results of a multilayer WSe₂ sample by AFM and TM-QPP, respectively (scale bars: 10 μm); (f) The geometric thickness values for ii-iv regions can be calculated, and the number of layers for each region can be determined by comparing the thickness values with the reference values (dashed lines). The error bars indicate the standard deviation values of the geometric thickness of the corresponding regions^[38] (figures adapted from reference [38])

3.4 晶圆缺陷检测

随着智能手机、计算机和电子医疗设备等智能设备的需求不断增长，超大规模集成电路得到了快速发展。然而，随着晶圆工艺节点达到亚 10 nm 级别，制造过程中的纳米级缺陷可能会降低器件的性能。同时，为了保证芯片的高产量制造，对纳米尺度缺陷的无损高通量检测显得至关重要。但是，极弱的深亚波长缺陷信号和图像中的噪声影响将使缺陷的可见性极差。2013 年，ZHOU 等报道了一种非侵入性的低噪

声干涉成像方法，并开发了一种针对缺陷探测的高灵敏度成像方法^[39]。该方法结合了激光干涉成像技术与二阶差分、图像拼接和卷积 (Second order Difference, Image Stitching, and Convolution, 2DISC) 等手段，通过去除样品本身的周期信号背景对目标缺陷的微弱信号的干扰，实现了在宽视场下对 20 nm 宽的稀疏缺陷高灵敏检测，如图 15(a) 所示。次年，ZHOU 等进一步探索了 9 nm 节点的 IDA 晶圆缺陷检测方法^[40]。通过采用高稳定性的 405 nm 二极管激光器，

选取最优的偏振和聚焦条件，并利用 2DISC 方法实现了对 9 nm 节点晶圆平行桥缺陷的相位和振幅图像的分析。与此同时，使用白光照明系统进行 z-扫描产生晶圆的三维图像，可以从二阶微分 z-扫描堆叠图像中清晰地识别出横截面上的缺陷信号，如图 15(b) 所示。

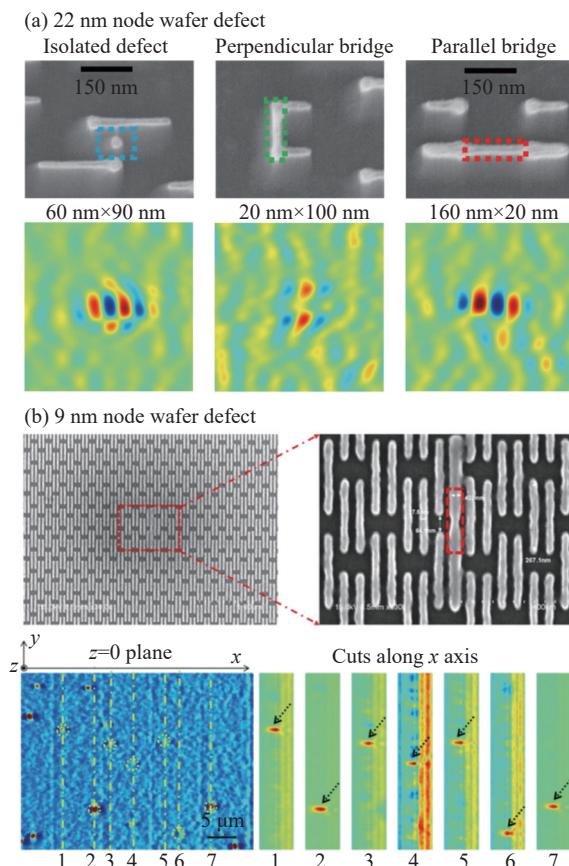


图 15 (a) 22 nm 节点晶圆缺陷检测^[39]; (b) 9 nm 节点晶圆缺陷检测^[40]

Fig.15 (a) 22 nm node wafer defect inspection^[39]; (b) 9 nm node wafer defect inspection^[40]

4 结 论

文中介绍了 iQPM 相位灵敏度提升的策略以及高灵敏度 iQPM 在血细胞分析、生物神经成像、原子材料厚度计量和晶圆缺陷检测领域的前沿应用进展。目前灵敏度提升策略都是基于抑制相位噪声实现的，借助这些噪声抑制手段，iQPM 的时间相位灵敏度已经突破至 2 pm。图 16 描述了相位灵敏度的提升发展历程^[21–24, 37, 41–42]，其中，信噪比 (Signal-to-Noise Ratio, SNR) 与最小可探测 OPD 关系为 $SNR=10\lg(\lambda/OPD)$ 。

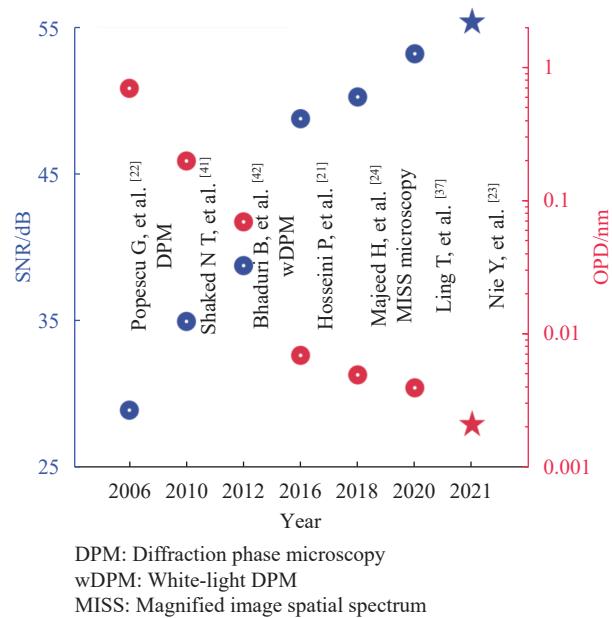


图 16 iQPM 相位灵敏度提升发展历程^[21–24, 37, 41–42]

Fig.16 The roadmap of phase sensitivity improvement in iQPM^[21–24, 37, 41–42]

随着激光脉冲达到了阿秒量级，人们得以研究复杂分子中的超快电子动力学（2023 年诺贝尔物理学奖），相关重大突破可促进激光精密计量技术（如 iQPM）应用于更小的电子尺度。然而，对现有 iQPM 技术而言，高精度高灵敏测量仍然受限于空间上的散斑噪声。各种降噪手段会受到固有光子散粒噪声极限的制约，因此难以实现更大的突破。如能直接放大相位信号，可为相位灵敏度的进一步提升提供新的思路。

从应用角度出发，未来对亚原子甚至电子尺度微观世界的探索对灵敏度提出了更高的要求。例如新兴的扭转电子学 (Twistronics) 为操控二维层状材料的电子特性提供了可能，可潜在推动下一代光电子器件的发展。然而，其中因原子层间不同堆叠顺序产生的层间间距变化在亚原子级别，需要相应的计量工具。可以展望，iQPM 技术在灵敏度上的进一步突破将继续推动前沿材料科学与生物医学的发展。

参考文献：

- [1] POPESCU G. Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues [M]. New York: McGraw-Hill, 2011.
- [2] BIANCO V, MEMMOLO P, LEO M, et al. Strategies for reducing speckle noise in digital holography [J]. *Light:*

- Science & Applications**, 2018, 7: 48.
- [3] NIU M, LUO G, SHU X, et al. Portable quantitative phase microscope for material metrology and biological imaging [J]. *Photonics Research*, 2020, 8(7): 1253-1259.
- [4] PIRONE D, LIM J, MEROLA F, et al. Stain-free identification of cell nuclei using tomographic phase microscopy in flow cytometry [J]. *Nature Photonics*, 2022, 16(12): 851-859.
- [5] HUANG Z, CAO L. Quantitative phase imaging based on holography: trends and new perspectives [J]. *Light: Science & Applications*, 2024, 13: 145.
- [6] RIVENSON Y, ZHANG Y, GüNAYDIN H, et al. Phase recovery and holographic image reconstruction using deep learning in neural networks [J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7: 17141.
- [7] CHOWDHURY S, CHEN M, ECKERT R, et al. High-resolution 3D refractive index microscopy of multiple-scattering samples from intensity images [J]. *Optica*, 2019, 6(9): 1211-1219.
- [8] LEDWIG P, ROBLES F E. Quantitative 3D refractive index tomography of opaque samples in epi-mode [J]. *Optica*, 2021, 8(1): 6-14.
- [9] MIN Q, TRAPP J, FANG T, et al. Varifocal metalens for compact and accurate quantitative phase imaging [J]. *ACS Photonics*, 2024, 11(7): 2797-2804.
- [10] ZHOU J, JIN Y, LU L, et al. Deep learning-enabled pixel-super-resolved quantitative phase microscopy from single-shot aliased intensity measurement [J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2024, 18(1): 2300488.
- [11] WU J, LU Z, JIANG D, et al. Iterative tomography with digital adaptive optics permits hour-long intravital observation of 3D subcellular dynamics at millisecond scale [J]. *Cell*, 2021, 184(12): 3318-3332.
- [12] FANG J, ZHANG H, PAN Y, et al. Label-free analysis of organelle interactions using organelle-specific phase contrast microscopy (OS-PCM) [J]. *ACS Photonics*, 2023, 10(4): 1093-1103.
- [13] NIU M, WANG Y, DUAN L, et al. Compact morpho-molecular microscopy for live-cell imaging and material characterization [J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2024, 18(4): 2300741.
- [14] GE B, ZHANG Q, ZHANG R, et al. Single-shot quantitative polarization imaging of complex birefringent structure dynamics [J]. *ACS Photonics*, 2021, 8(12): 3440-3447.
- [15] ZHANG Q, ZHANG R, GE B, et al. Structures and topological defects in pressure-driven lyotropic chromonic liquid crystals [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(35): e2108361118.
- [16] SHIN S, EUN J, LEE S S, et al. Tomographic measurement of dielectric tensors at optical frequency [J]. *Nature Materials*, 2022, 21(3): 317-324.
- [17] ZHU J, LIU J, XU T, et al. Optical wafer defect inspection at the 10 nm technology node and beyond [J]. *International Journal of Extreme Manufacturing*, 2022, 4(3): 032001.
- [18] LI J, ZHOU N, SUN J, et al. Transport of intensity diffraction tomography with non-interferometric synthetic aperture for three-dimensional label-free microscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2022, 11(1): 154.
- [19] CHAUMET P, BON P, MAIRE G, et al. Quantitative phase microscopies: accuracy comparison [DB/OL]. (2024-03-18) [2024-03-22]. <https://arxiv.org/abs/2403.11930>.
- [20] CHEN S, LI C, ZHU Y. Sensitivity evaluation of quantitative phase imaging: a study of wavelength shifting interferometry [J]. *Optics Letters*, 2017, 42(6): 1088-1091.
- [21] HOSSEINI P, ZHOU R, KIM Y-H, et al. Pushing phase and amplitude sensitivity limits in interferometric microscopy [J]. *Optics Letters*, 2016, 41(7): 1656-1659.
- [22] POPESCU G, IKEDA T, DASARI R R, et al. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(6): 775-777.
- [23] NIE Y, ZHOU R. Beating temporal phase sensitivity limit in off-axis interferometry based quantitative phase microscopy [J]. *APL Photonics*, 2021, 6: 011302.
- [24] MAJED H, MA L, LEE Y J, et al. Magnified Image Spatial Spectrum (MISS) microscopy for nanometer and millisecond scale label-free imaging [J]. *Optics Express*, 2018, 26(5): 5423-5440.
- [25] TODA K, TAMAMITSU M, IDEGUCHI T. Adaptive dynamic range shift (ADRIFT) quantitative phase imaging [J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 1.
- [26] AHMAD A, DUBEY V, et al. High-throughput spatial sensitive quantitative phase microscopy using low spatial and high temporal coherent illumination [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 15850.
- [27] SHIN S, KIM K, LEE K, et al. Effects of spatiotemporal coherence on interferometric microscopy [J]. *Optics Express*, 2017, 25(7): 8085-8097.
- [28] WANG Z, MILLET L, MIR M, et al. Spatial light interference microscopy (SLIM) [J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1016-1026.
- [29] CHEN X, KANDEL M E, POPESCU G. Spatial light interference microscopy: principle and applications to biomedicine [J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2021,

- 13(2): 353-425.
- [30] CHEN X, KANDEL M E, HU C, et al. Wolf phase tomography (WPT) of transparent structures using partially coherent illumination [J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 142.
- [31] LARIVIÈRE-LOISELLE C, BÉLANGER E, MARQUET P. Polychromatic digital holographic microscopy: a quasicoherent-noise-free imaging technique to explore the connectivity of living neuronal networks [J]. *Neurophotonics*, 2020, 7(4): 040501.
- [32] ZHENG C, JIN D, HE Y, et al. High spatial and temporal resolution synthetic aperture phase microscopy [J]. *Advanced Photonics*, 2020, 2(6): 065002.
- [33] CHOI Y, HOSSEINI P, KANG J W, et al. Reflection phase microscopy using spatio-temporal coherence of light [J]. *Optica*, 2018, 5(11): 1468-1473.
- [34] KANG S, ZHOU R, BRELEN M, et al. Mapping nanoscale topographic features in thick tissues with speckle diffraction tomography [J]. *Light: Science & Applications*, 2023, 12: 200.
- [35] SHU X, SANSARE S, JIN D, et al. Artificial - intelligence - enabled reagent - free imaging hematology analyzer [J]. *Advanced Intelligent Systems*, 2021, 3(8): 2000277.
- [36] LING T, BOYLE K C, GOETZ G, et al. Full-field interferometric imaging of propagating action potentials [J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7: 107.
- [37] LING T, BOYLE K C, ZUCKERMAN V, et al. High-speed interferometric imaging reveals dynamics of neuronal deformation during the action potential [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(19): 10278-10285.
- [38] NIE Y, ZHOU N, TAO L, et al. Transmission-matrix quantitative phase profilometry for accurate and fast thickness mapping of 2D materials [J]. *ACS Photonics*, 2023, 10(4): 1084-1092.
- [39] ZHOU R, EDWARDS C, ARBABI A, et al. Detecting 20 nm wide defects in large area nanopatterns using optical interferometric microscopy (OPEM) [J]. *Nano Letters*, 2013, 13(8): 3716-3721.
- [40] ZHOU R, EDWARDS C, POPESCU G, et al. 9 nm node wafer defect inspection using visible light [C]//Proceedings of SPIE, 2014, 9050: 332-338.
- [41] SHAKED N T, ZHU Y, BADIE N, et al. Reflective interferometric chamber for quantitative phase imaging of biological sample dynamics [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(3): 030503.
- [42] BHADURI B, PHAM H, MIR M, et al. Diffraction phase microscopy with white light [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(6): 1094-1096.

Recent advances and applications of high-sensitivity interferometric quantitative phase microscopy (*cover paper-invited*)

ZHOU Nansen¹, WU Mulei¹, NIE Yuji², CHENG Jiayu^{1,3}, ZHOU Renjie^{1*}

(1. Department of Biomedical Engineering, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR 999077, China;

2. Shenzhen BayRay Biomedical Technology Co., LTD., Shenzhen 518000, China;

3. School of Physics, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract:

Significance Live-cell imaging techniques offer an analytical platform for investigating cellular structures and functions, significantly advancing our understanding of disease mechanisms and drug development. The real-time observation of morphology and dynamics of cellular structures is crucial for studying cell activity and cell-materials interactions. Dynamic changes in living cells can occur even at the subnanometer level, such as the minute deformation of the cell membrane during neuronal action potentials. Additionally, to meet the trend of next-generation atomic manufacturing, nondestructive and accurate in-line characterization is crucial for ensuring high yields in large-scale manufacturing. However, the widely used metrology tools, such as scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM), suffer from extremely low measurement throughput and

may introduce invasiveness to the samples. Interferometric Quantitative Phase Microscopy (iQPM), a label-free wide-field imaging technique, has been widely employed to obtain morphology distributions and dynamic changes of samples quantitatively. To satisfy the application demands, the development of high-sensitivity iQPM is of great significance and importance.

Progress Firstly, the noise sources involved in the phase measurement process are introduced, such as camera noise (including photon shot noise, dark noise, readout noise), $1/f$ noise, instability of light source, mechanical vibrations, and air disturbances. By analyzing these noise sources, the key limiting factors affecting the phase sensitivity of the iQPM system are discussed, which provides a solid theoretical basis for developing strategies to improve the phase sensitivity of iQPM. The sensitivity improvement strategies are introduced from the suppression of environmental noise, detection noise, and speckle noise, respectively. In terms of environmental noise, the common-path interferometry-based iQPM techniques can effectively alleviate the optical path difference changes between the sample beam and reference beam due to mechanical vibrations and air disturbances, thus improving the temporal phase sensitivity. Meanwhile, the noise caused by mechanical vibrations can be further reduced through the optimized spatiotemporal filtering method. To reduce the influence of camera noise on phase sensitivity, the methods of increasing the effective well capacity and expanding the dynamic range have been proposed, enabling the measurement of subtle phase changes. From the perspective of speckle noise, the proposed strategies aim to superpose images with uncorrelated speckle patterns, which can be achieved by reducing the illumination temporal coherence and modulating the spatial spectrum of the illumination light. The high-sensitivity iQPM techniques have been applied in cutting-edge fields such as neuroscience, atomic-scale material metrology, and wafer defect detection.

Conclusions and Prospects This review summarizes critical strategies that have driven substantial advancements in the phase sensitivity of iQPM. By employing these methods, the temporal phase sensitivity of iQPM has been pushed to an impressive 2 pm level. The primary objective of this work is to provide an important reference for further improvement of phase sensitivity. Notably, current noise suppression-based sensitivity enhancement strategies are constrained by the inherent photon shot noise, sensitivity improvement methods based on signal amplification may offer a path to break through the current limitations and achieve higher phase sensitivity.

Key words: quantitative phase microscopy; phase sensitivity enhancement; interferometric microscopy; weak signal detection

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (NSFC)/Research Grants Council (RGC) of Hong Kong Joint Research Scheme (JRS) (N_CUHK431/23); National Key Research and Development Program of China (2023YFF1500900)