

一种适用于长期定量观察生物活细胞的 数字全息显微方法

潘 锋 肖 文 刘 烁

(北京航空航天大学仪器科学与光电工程学院, 北京 100191)

摘要 动态定量观察生物样品对生命与生物科学研究具有重要意义。研究了一种适用于长期定量观察生物活细胞的数字全息相衬显微成像方法。针对实际生物细胞显微观察中通常生物样品处于半封闭状态,设计了一种光纤与空间光混合的全息记录光路。针对长期观察过程中光学系统和细胞培养基引起的相位畸变,通过在全息面和成像面分别进行像差校正,获得高质量的样品相衬图像。并对造骨细胞 MC3T3-E1 和骨细胞 MLO-Y4 进行了长时间的显微观察实验,验证了该方法。

关键词 全息;相衬成像;显微观察;生物细胞

中图分类号 TN247;O438;TB877

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201138.0509001

Digital Holographic Microscopy for Long-Term Quantitative Phase-Contrast Imaging of Living Cells

Pan Feng Xiao Wen Liu Shuo

(School of Instrumentation Science & Optoelectronics Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China)

Abstract Dynamic and quantitative observing on the biological samples is important for life and biological sciences research. A digital holographic microscopy for long-term quantitative phase-contrast imaging of living cells is proposed. At the condition that biological cells for microscopic observation are usually in semi-enclosed environment actually, the optical configuration of digital holographic microscopy is designed and optimized by using free-space-fiber hybrid optical structure. Considering the additional phase aberration induced by liquid culture medium in long-term observation, the system aberrations are numerically corrected at the hologram plan and image plan, in order to obtain high quality phase contrast images. The living samples of MC3T3-E1 and MLO-Y4 cells are investigated by long-term microscopic observation, and the experimental results are given to confirm the proposed method.

Key words holography; phase contrast imaging; microscopy; biological cells

OCIS codes 090.1995; 110.0180; 170.3880

1 引 言

数字全息技术借助光电探测器和数字处理技术可以获取物光的振幅和相位信息,重构物体的三维形貌,近年来被广泛研究和应用。特别是在生命和生物科学实验研究中,数字全息显微方法(DHM)作为一种相干显微成像方法,具有非破坏性、实时性、高分辨率、无需标记、全视场和三维成像等特点,已成为一种非常适合于生物样品观察的显微方法,倍

受众多研究者关注^[1~7]。具有代表性的研究为:Kemper 研究组^[4,8~10]建立的 DHM 装置对活的人体胰腺癌细胞和血红细胞进行了定量观测;Depeursinge 研究组使用 DMH 方法测量了花粉、活的阿米巴原虫和老鼠神经元细胞的生理学参数,包括细胞的体积、形状、折射率层析和低渗透压动力等^[5,11,12];Kim 研究组使用 DHM 技术对卵巢癌细胞、血红细胞和视网膜杆细胞进行了定量相衬显微

收稿日期: 2011-03-02; 收到修改稿日期: 2011-03-21

基金项目: 国家自然科学基金(31000387)和中央高校基本科研业务费专项资金(YWF-10-02-087)资助课题。

作者简介: 潘 锋(1979—),男,博士,讲师,主要从事基于数字全息的三维显微成像和相干检测等方面的研究。

E-mail: panfeng@buaa.edu.cn

成像^[6,13]。但是,已有的报道很少有关长时间定量观察活体细胞的研究结果。而长期定量观察活细胞的变化对于生命和生物科学研究是必要的。在实际生物样品长期显微观察过程中,对细胞生长的环境温度、氧气或二氧化碳浓度和气压等有严格要求,有时还需要模拟强磁或失重环境,由此细胞样品通常处于一种半封闭状态。针对上述情况,本文研究了一种适合于长期定量观察活体细胞生长过程的数字全息显微方法。在全息光路方面,设计了一种能够适用于细胞培养环境的光纤-空间光混合的全息图记录光路。在数字再现方面,通过在全息面和成像面分别进行像差校正,有效补偿了光学系统和培养基引起的相位畸变。并通过长期定量观察造骨细胞 MC3T3-E1 和骨细胞 MLO-Y4 的生长过程,验证了该方法。

2 实验装置与方法

全息光路如图 1 所示。采用改进的马赫-曾德尔干涉光路。光源为功率 50 mW、波长 532 nm 的倍频 Nd:YAG 固体激光器。其输出光束通过偏振分光棱镜(PBS)分为样品照明光和参考光。半波片 HP1 和 HP2 用于调节两束光的强度比,同时使两光束偏振态一致。照明光经光纤耦合器(FC)耦合到保偏光纤(PMF)中,在输出端经准直镜(CL)变为平面光波输出。透过样品(Specimen)后,通过数字孔径为 0.4、放大倍率为 20× 的无穷远校正显微物镜(MO)和中继成像镜(TL),得到样品的放大实像。参考光经由空间滤波和准直透镜组成的准直装置(BE)后为准平面光输出。物光(O)和参考光(R)经

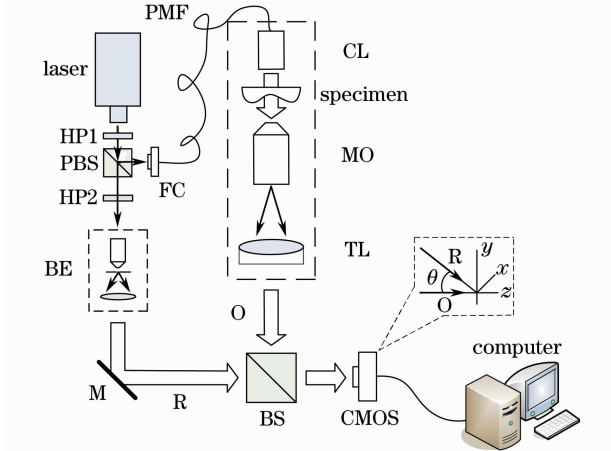


图 1 长期定量观察活细胞相衬图像的数字全息装置
Fig. 1 DHM system for long-term phase-contrast imaging of living cells

棱镜(BS)合光后,以一小角度 θ 相干叠加得到离轴全息图,并由像素为阵列为 1024 pixel×1024 pixel,大小为 $6.7 \mu\text{m} \times 6.7 \mu\text{m}$ 的互补金属氧化物半导体(CMOS)记录。观察实验中,数字全息图的采集速度为 1 frame/min。在重构计算中,进行全息图切趾减小边缘衍射引起的光场起伏,并通过空频域滤波抑制零级项和共轭像的影响。

为获得正确样品的相衬像,在再现计算中需要进行像差校正。相位像畸变主要来自显微物镜像差和离轴光路引起的相位倾斜。对于长期显微观察,还必须考虑培养基的影响。因为培养基液体表面不是与培养皿严格平行的,或在观察过程中存在液面微小的晃动,这都会引起物光波的相位倾斜。由此,在全息面上的重构物光波复振幅可表示为

$$\psi_H = A \exp[i(\varphi^H + \varphi_S^H + \varphi_L^H)], \quad (1)$$

式中 φ^H 表示样品引起的相位延迟, φ_S^H 和 φ_L^H 分别表示由光学系统和培养基引起的相位畸变。对于 φ^H ,可以利用参考全息图在全息面上进行校正,此时物光复振幅可表示为

$$\psi'_H = \psi_H \exp(-i\varphi_S^H) = A \exp[i(\varphi^H + \varphi_L^H)]. \quad (2)$$

利用卷积再现算法将复振幅 ψ'_H 计算传输到成像面,此时物光场可表示为

$$\psi_I = A' \exp[i(\varphi^I + \varphi_L^I)], \quad (3)$$

式中 φ^I 为成像面上样品的相位延迟, φ_L^I 是与培养基相关的相位倾斜因子。

接着,通过在成像面上利用无样品的参考区域的相位分布进行线性拟合构造相位掩模,并将其与 ψ_I 相乘,从而校正 φ_L^I 的影响^[14],得到无畸变的样品相衬图像。在长期显微观察中 φ_L^I 项将随时变化,因此需要针对每次观察进行及时调整。理论上,在像面的像差校正计算也可以在全息面上完成。但是,在成像面进行校正的优势在于:视场内样品成聚焦像,物光衍射条纹对构造像差校正相位掩模的影响小,更为方便和准确。

3 实验结果与分析

以造骨细胞 MC3T3-E1 作为观察对象进行相衬显微观察。预先培养好的造骨细胞接种在直径为 35 mm 的培养皿中,置于 37 °C 恒温且连续输送 CO₂ 实验装置中,全息光路结构如图 1 所示。图 2 给出造骨细胞的相衬像观察图。其中图 2(a)为数字全息图,图中白色方框给出了全息图左上角区域的放大图,可以看出,全息干涉图样以斜直条纹为主,以此充分利用相机的空间带宽积。具体方法是,

通过调节中继成像镜与物镜的相对位置,使得参物光相位曲率匹配。图 2(b)给出了细胞的再现振幅像,可以看出,由于观察对象为没有经化学染色的透明活细胞,强度成像几乎分辨不出细胞轮廓。图 2(c)给出了利用参考全息图进行部分像差校正

后的细胞相位像,可以看出,剩余像差即培养基引起的像差主要为相位面倾斜。图 2(d)给出了通过在成像面上构造相位掩模进行像差校正后的细胞包裹相位像,可以看出,相位倾斜像差被正确校正。图 2(e)给出了相位解包裹后细胞的相衬像。

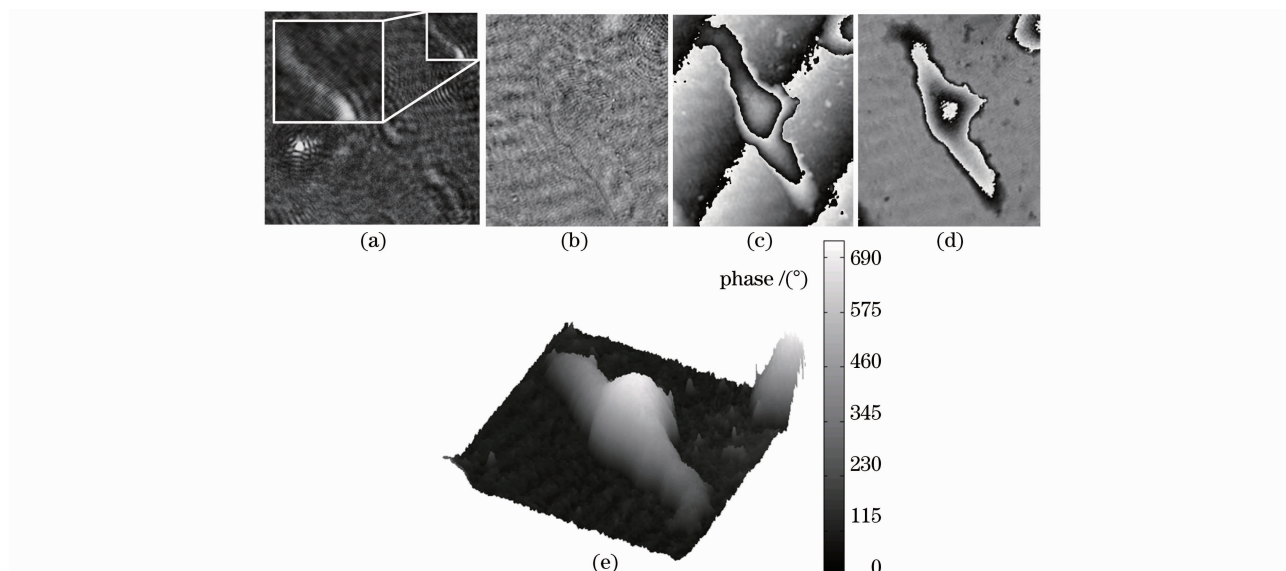


图 2 造骨细胞 MC3T3-E1 的数字全息显微成像实验

Fig. 2 DHM experiments of MC3T3-E1 cells

以骨细胞 MLO-Y4 作为观察对象,开展持续 8 h 的显微观察实验。数字全息图记录频率为 1 frame/min,参考全息图在观察结束后记录,像差校正掩模在每次再现计算中自动、实时调整像差补偿参数。图 3 给出骨细胞在生长过程中的迁移情

况。图 4 给出了骨细胞在分裂过程中不同时刻的形态变化,其相应的视场范围是 $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ 。可以看出,在分裂初期细胞形状变圆,其光学厚度逐渐增加;而在完成分裂之后,细胞形态恢复成常态,同时通过迁移运动分离开。

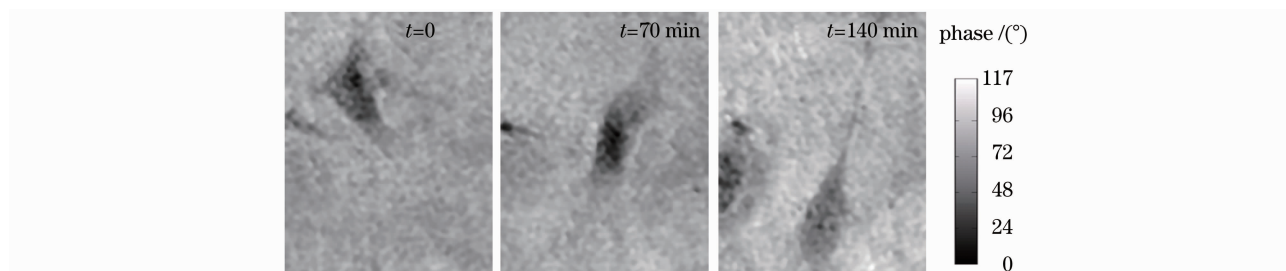


图 3 造骨细胞 MLO-Y4 生长过程中的迁移

Fig. 3 Migration of a MLO-Y4 cell in the generation process

需要指出的是,在长时间细胞显微观察中,实验装置始终放置于无隔振平台上。而实验结果表明外界环境因素对显微观察结果没有明显影响,实验系统具有较好的稳定性和可靠性。这主要得益于记录数字全息图约为 5 ms 的曝光时间,以及针对每一次显微观察利用数字像差校正方法实时校正系统的相位畸变。

4 结 论

研究了一种适用于长期定量观察生物活细胞相衬像的数字全息显微方法。在光路方面,设计了光纤与空间光混合的全息记录光路,能够适应生物细胞观察实验环境的要求,同时充分利用相机的空间带宽积。在再现方面,针对长期显微观察过程中,光学系统和细胞培养基引起的相位畸变,在全息面利

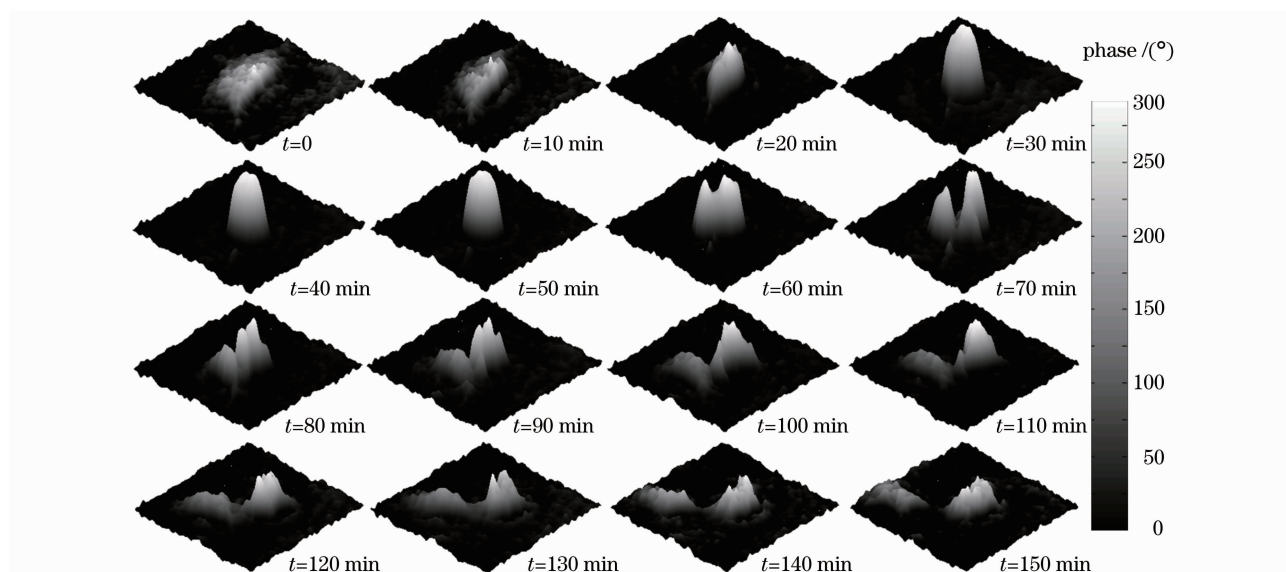


图 4 造骨细胞 MLO-Y4 分裂过程的形态变化

Fig. 4 Morphological variations of a MLO-Y4 cell in the division process

用参考全息图和成像面构造相位掩模分别进行数字像差校正,获得高质量的样品相衬图像。以造骨细胞 MC3T3-E1 和骨细胞 MLO-Y4 作为观察对象,开展了 8 h 的显微观察,观察到细胞在生长及分裂过程中的迁移和形态变化情况。实验结果验证了该方法。

参 考 文 献

- 1 Pan Weiqing, Zhu Yongjian, Lang Haita. Phase-contrast imaging technology with digital holographic microscope based system calibration[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(7): 1812~1820
潘卫清, 朱勇建, 郎海涛. 基于系统定标的相衬显微数字全息方法[J]. *中国激光*, 2010, **37**(7): 1812~1820
- 2 Zhao Jie, Wang Dayong, Li Yan *et al.*. Experimental study on the quantitative phase-contrast imaging of the biological samples by digital holographic microscopy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(11): 2906~2911
赵洁, 王大勇, 李艳等. 数字全息显微术应用于生物样品相衬成像的实验研究[J]. *中国激光*, 2010, **37**(11): 2906~2911
- 3 Di Jianglei, Zhao Jianlin, Fan Qi *et al.*. Phase correction of wavefront reconstruction in digital holographic microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(1): 56~61
邸江磊, 赵建林, 范琦等. 数字全息显微术中重建物场波前的相位校正[J]. *光学学报*, 2008, **28**(1): 56~61
- 4 B. Kemper, P. Langehanenberg, A. Hoink *et al.*. Monitoring of laser micromanipulated optically trapped cells by digital holographic microscopy [J]. *Journal of Biophotonics*, 2010, **3**(7): 425~431
- 5 B. Rappaz, E. Cano, T. Colomb *et al.*. Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, **14**(3): 034049
- 6 Lingfeng Yu, Samarendra Mohanty, Jun Zhang *et al.*. Digital holographic microscopy for quantitative cell dynamic evaluation during laser microsurgery [J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(14): 12031~12038
- 7 Feng Pan, Wen Xiao, Shuo Liu *et al.*. Coherent noise reduction in digital holographic phase contrast microscopy by slightly shifting object [J]. *Opt. Express*, 2011, **19**(5): 3862~3869
- 8 B. Kemper, D. D. Carl, J. Schnekenburger *et al.*. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, **11**(3): 034005
- 9 B. Kemper, G. von Bally. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection [J]. *Appl. Opt.*, 2008, **47**(4): A52~61
- 10 P. Langehanenberg, L. Ivanova, I. Bernhardt *et al.*. Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, **14**(1): 014018
- 11 F. Charrière, N. Pavillon, T. Colomb *et al.*. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba [J]. *Opt. Express*, 2006, **14**(16): 7005~7013
- 12 F. Charrière, A. Marian, F. Montfort *et al.*. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(2): 178~180
- 13 C. J. Mann, L. F. Yu, C. M. Lo *et al.*. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography [J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(22): 8693~8698
- 14 T. Colomb, E. Cucho, F. Charrière *et al.*. Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation [J]. *Appl. Opt.*, 2006, **45**(5): 851~863