

数字全息显微定量相位成像的实验研究

马利红 王 辉 金洪震 李 勇

(浙江师范大学信息光学研究所, 浙江 金华 321004)

摘要 建立了一套预放大式数字全息显微成像系统,通过对样品进行显微放大,实现了高分辨率的定量相位成像;并通过计算机控制相机自动曝光记录序列的数字全息图实现了动态相位成像。用标准样品验证了系统测量的准确性;以活体洋葱表皮细胞和血红细胞为样品,获得了清晰的定量相位像;以置于水环境的草履虫为样品,实现了动态成像。实验结果表明建立的系统可以实现高分辨率的动态定量相位成像,可以应用于生物活体样品的显微研究。

关键词 全息;数字全息;数字全息显微;定量相位成像;活体生物样品

中图分类号 TB877.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201239.0309002

Experimental Study on Quantitative Phase Imaging by Digital Holographic Microscopy

Ma Lihong Wang Hui Jin Hongzhen Li Yong

(Institute of Information Optics, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

Abstract Digital holographic microscopy apparatus with pre-magnification has been set up, which can well acquire the quantitative phase images for living biological specimens. In addition, a series of digital holograms can be automatically recorded and movies of holographic phase images of living biological specimens can be created. The accuracy of quantitative imaging is verified by a self-produced stepped transparent sample with known height and refraction. Onion epidermal cells and red blood cells are measured and quantitative high-quality phase images are obtained. The movies of phase images for paramecium are achieved. Experimental results demonstrate that the established system can achieve real-time quantitative high-resolution holographic phase image and can be effectively applied to living biological specimens phase imaging.

Key words holography; digital holography; digital holographic microscopy; quantitative phase imaging; living biological specimen

OCIS codes 090.1995; 110.6880; 110.0180; 100.3010; 100.5088

1 引 言

数字全息术^[1]的迅猛发展使其应用领域得到了广泛的拓展^[2~6],其中显微测量^[7~14]是最有潜力的应用领域。全息图携带有物体振幅和相位的全部信息,将全息技术与数字技术相结合可以精确地分析物体的三维分布和相位信息,因而数字全息显微技术具有其他显微技术不可替代的优点。尤其在生物样品显微测量领域^[15~20],数字全息显微术更具有独

特的优势,因为其无需对样品进行标记、染色、固定等处理,能实现真正无损、无侵入、全场测量;而且数字全息显微术还可以使生物样品置于生理溶液中进行真实环境下的动态监测,继而可以用于获取细胞的动态特性、细胞间的相互作用以及细胞对药物的反应等信息。

本文搭建了预放大式数字全息显微光路,通过对样品进行显微放大,可以克服数字全息术受电子

收稿日期: 2011-09-16; **收到修改稿日期**: 2011-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(60877002)、浙江省自然科学基金(Z1080030)、浙江省教育厅项目(201016465)、金华市科学技术研究项目(2010-1-050)和浙江师范大学创新团队项目资助课题。

作者简介: 马利红(1979—),女,博士,讲师,主要从事光信息处理与数字全息技术等方面的研究。

E-mail: zjnumlh@zjnu.cn

记录器件低分辨率的限制,实现高分辨率的成像;同时为了实现动态相位成像,编写了硬件控制程序,使相机能在计算机控制下自动曝光记录序列的数字全息图。在此系统上进行了大量的实验研究,实验结果表明建立的系统可以实现高分辨率的动态定量相位成像。

2 系统装置

预放大数字全息显微成像技术是数字全息技术和显微技术相结合的产物,透射式系统光路结构如图 1 所示。其基本原理和数字全息原理相同,用分束棱镜(BS1)将激光束分成两束,一束作参考光,另一束照明样品作物光波,两束光又经 BS2 合束,在 CCD 记录面相遇干涉形成全息图。所不同的是,在记录光路中加入了显微物镜(MO)对样品进行显微放大成像。显微物镜的大数值孔径保证收集样品尽可能多的频谱信息,同时利用放大成像将物光波的频率信息压缩到满足 CCD 的采样频率,压缩率和放大倍率成反比。CCD 相机可置于像平面或像平面前后。在系统中,可将显微放大像看作是记录物体,像平面和 CCD 之间的距离看作是记录距离。

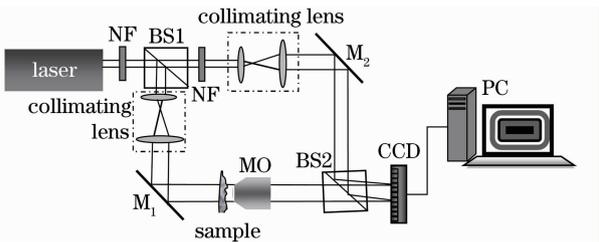


图 1 透射式数字全息显微光路原理图
Fig. 1 Schematic of transmission digital holographic microscopy

实验系统中光源采用上海高益公司生产的 DPGL-2100F 型固体激光器,波长为 532 nm,最大功率为 100 mW,功率大小可调。使用的 CCD 相机是加拿大 PointGrey 公司生产的 Grasshopper-50S5 型,通过 IEEE1394b 卡与计算机相连。CCD 的像素尺寸是 $3.45 \mu\text{m} \times 3.45 \mu\text{m}$,像素数是 2048 pixel \times 2248 pixel,可根据需要选择部分像素,帧频与选择像素区域的大小有关,在 5.3 节动态相位成像研究中,像素区域选择 1024 pixel \times 1024 pixel,此时帧频为 24.6 frame/s。根据样品频率特点,选择数值孔径合适的显微物镜,并设计合适的放大倍率,满足 CCD 的采样,文献[21]具体分析了这两个参数的优化设计条件。光路中加入的 2 个连续衰减片(NF)可进一步调节物光波和参考光波的强度。图 2 为系统实验装置图。



图 2 数字全息显微系统实验装置图
Fig. 2 Experimental setup for transmission digital holographic microscopy

3 数字显微全息图的记录和再现原理

预放大数字全息显微系统采用显微物镜对样品进行显微放大,在理想成像的情况下,所成像的复振幅分布可以表示为

$$u_{oi} = \frac{\exp[ik(d_1 + d_2)]}{M} \times \exp\left[-i \frac{\pi}{\lambda M f} (x_i^2 + y_i^2) u_o\left(\frac{x_i}{M}, \frac{y_i}{M}\right)\right], \quad (1)$$

式中 d_1 表示物距, d_2 表示像距, $M = -\frac{d_2}{d_1}$ 是放大倍数, f 表示焦距, λ 表示波长, u_o 表示物平面物光波分布。由(1)式可知,像空间的物光场频率分布和显微成像系统的放大倍率成反比。因此,经过设计合适的放大倍率,可以使像空间的物光波频率被压缩到完全满足 CCD 记录器件的采样要求。在这样的条件下,预放大数字全息显微系统的成像分辨率由显微物镜的数值孔径决定,从而可以克服 CCD 记录器件低分辨率的限制,实现高分辨率成像。

假设在 CCD 记录面,物光波分布为 $O(x_H, y_H)$, 参考光波为 $R(x_H, y_H)$, 两光波叠加后的光强分布为

$$I(x_H, y_H) = |R(x_H, y_H) + O(x_H, y_H)|^2 = |R(x_H, y_H)|^2 + |O(x_H, y_H)|^2 + R^*(x_H, y_H)O(x_H, y_H) + R(x_H, y_H)O^*(x_H, y_H). \quad (2)$$

该光强分布被 CCD 相机采样并记录后,得到离散化的光强分布,设 CCD 的像素数为 $M \times N$, 像素间隔为 $\Delta x \times \Delta y$, 在理想抽样时,离散化的光强为

$$I(m, n) = I(x_H, y_H) \times \text{comb}\left(\frac{x_H}{\Delta x}, \frac{y_H}{\Delta y}\right) \text{rect}\left(\frac{x_H}{M\Delta x}, \frac{y_H}{N\Delta y}\right). \quad (3)$$

为提高重构像的质量,通常需要对数字全息图进行滤波等预处理,滤除零级项和共轭项,得到只包含物光波的复数全息图:

$$I'(x_H, y_H) = R^*(x_H, y_H)O(x_H, y_H). \quad (4)$$

全息图数值再现是通过计算机模拟产生照明光波 R_D ，并与数字全息图相乘，得到全息图的透射光场分布：

$$U_H(x_H, y_H) = R_D(x_H, y_H)I'(x_H, y_H) = R_D(x_H, y_H)R^*(x_H, y_H)O(x_H, y_H). \quad (5)$$

该透射光场从全息图平面到再现平面的衍射传播，常用的计算方法有菲涅耳变换重建法、角谱重建法和卷积重建法。像面全息图是一种特殊情况，无需再进行衍射传播计算，(5)式已经表示重构物光波的复振幅分布。由于计算得到的是物光波复振幅分布，因此可以同时得到重构像的光强和相位分布：

$$I(x_i, y_i) = |U(x_i, y_i)|^2, \quad (6)$$

$$\varphi(x_i, y_i) = \arctan\left[\frac{\text{Im}U(x_i, y_i)}{\text{Re}U(x_i, y_i)}\right], \quad (7)$$

式中 $U(x_i, y_i)$ 表示重构平面的复振幅分布，Im 表示取复振幅的虚部，Re 表示取实部。由(7)式得到的相位值分布在 $[-\pi, \pi]$ 区间，是四项限包裹相位值。因此要得到物体的真实相位分布还通常需要利用二维解包裹算法得到展开的相位分布。本文采用基于离散余弦变换(DCT)的最小二乘相位解包裹算法^[22]。

4 再现像的相位补偿方法

在预放大全息显微系统中，要得到准确的相位重构，首先数字照明光波必须是原参考光波的准确复制。如果假设全息图记录时采用的是离轴平面光波，则 $R_D(x_H, y_H)$ 可以表示为

$$R_D(x_H, y_H) = \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda}(k_x x_H + k_y y_H)\right], \quad (8)$$

式中参数 k_x, k_y 定义了平面光波的传播方向，对于准确再现，参数 k_x, k_y 应该被调整到与记录时参考光波的传播方向完全一致。其次显微物镜放大成像，在像平面会产生一个附加的二次相位因子：

$$\varphi_{MO}(x_i, y_i) = \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda d_i}\left(1 + \frac{d_0}{d_i}\right)(x_i^2 + y_i^2)\right] = \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda D}(x_i^2 + y_i^2)\right]. \quad (9)$$

为了准确重建，这个二次相位因子也必须被消除。手动调整获取参数 D, k_x, k_y 是非常复杂困难的工作。而且，系统中往往还可能存在其他的像差，因此手动调节的方法往往无能为力。

本文采用再现平面相位相减的方法获取准确的相位重构^[23]。其基本思想是：在同一个光路系统中，采集两幅全息图，一幅称为背景全息图，即没有放置

样本信息的物光波直接和参考光波干涉形成的干涉图；一幅称为样本全息图，即在记录系统中放置了样本后记录的全息图。两幅全息图各自数值再现，并经过相位解包裹计算后，得到各自的相位分布，再通过相减处理，不但能消除再现照明光波参数不准确产生相位差和预放大显微成像产生的二次相位因子，而且能消除显微成像系统的像差以及其他背景误差，能得到样品准确的相位信息。再现平面相位相减的方法简单实用，特别适用于动态测量，在连续的动态测量中，只需一次性记录下参考全息图，并计算得到参考相位，所以在后续的动态测量中，相位补偿计算速度将大幅提高。

5 实验结果

5.1 标样测量

为了测试这套透射式数字全息显微系统测量的准确性，首先选用一个已知厚度和折射率的样品作为测试样品，该样品是采用分子束外延技术制作的，在玻璃基底上镀一个小区域的五氧化二钽膜，膜的厚度为 50 nm，膜的折射率为 2.6。

将此样品置于系统中，选用 $4\times/0.1$ 的显微物镜，光路放大倍数为 6.7 倍，CCD 置于像平面，记录的全息图如图 3(a) 所示，对全息图进行频域滤波，由于是像面全息图，所以只需再经逆傅里叶变换就得到物光波复振幅，对物光波复振幅求反正切值得到包裹相位，利用基于 DCT 的最小二乘解包裹算法进行解包裹运算。采用减去参考平面相位像的方法进行相位补偿，保持所有参数不变的情况，将物体移除，记录一张全息图，如图 3(b) 所示，对这张参考全息图进行同样的处理，得到包裹展开的相位图，需要注意的是对两个全息图的频域选择区域需一致。将两个包裹展开的相位图进行相减运算，得到相位像，利用已知的折射率，可以计算得到台阶形貌，如图 3(c) 所示。图 3(d) 是台阶形貌的三维图，图 3(e) 是沿图 3(c) 中所画直线的截面图，由图 3(e) 截面图可以清晰地显示台阶高度约为 50 nm，证实了搭建的透射式数字全息显微系统能够用于定量测量，在已知样品折射率的情况下，可以由定量相位值得到定量形貌，并且它的纵向分辨率至少可以达到 50 nm。

5.2 生物活体样品相位成像

图 4 是洋葱表皮细胞的数字全息显微相位成像实验结果。洋葱表皮细胞样品的制备过程：在一张无划痕、清洁的载玻片上滴一滴生理盐水，用镊子撕一

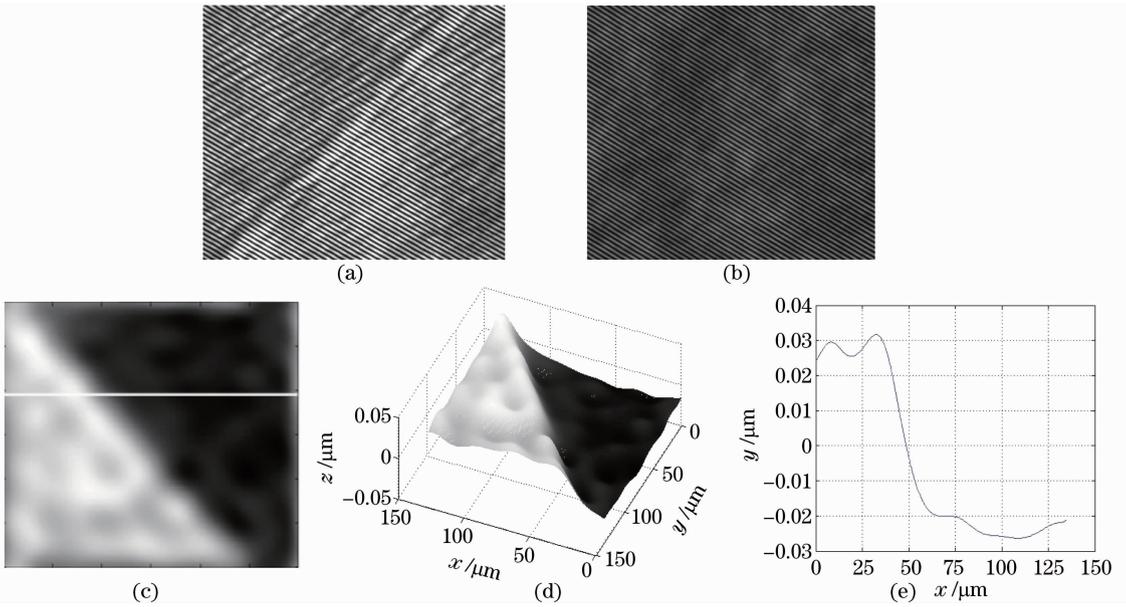


图 3 已知折射率和高度的台阶形物体测试结果。(a)全息图;(b)参考全息图;(c)重构形貌的二维图;
(d)重构形貌的三维图;(e)沿(c)中直线的截面图

Fig. 3 Experimental results of a self-produced stepped transparent sample with known height and refraction. (a) Hologram with the existence of the stepped sample; (b) hologram with the absence of the object; (c) reconstructed morphology; (d) three-dimensional map of the reconstructed morphology; (e) sectional map along the straight shown in Fig. 3(c)

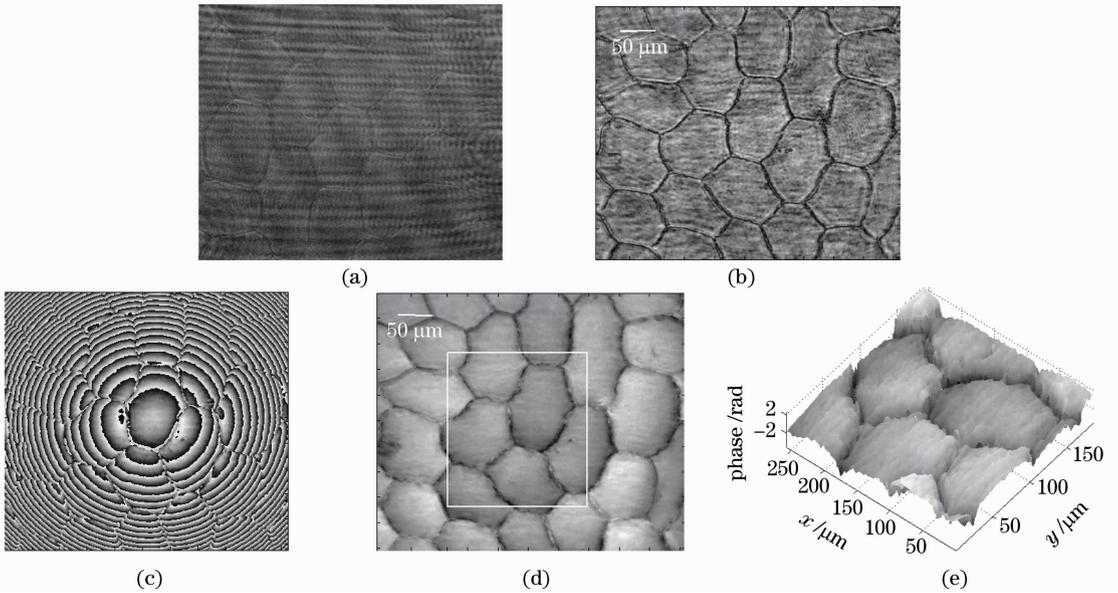


图 4 活体洋葱表皮细胞数字全息显微成像结果。(a)全息图;(b)再现强度像;(c)包裹相位图;(d)相位像;
(e)局部相位像三维图

Fig. 4 Experimental results of living onion epidermal cells. (a) Hologram; (b) reconstructed intensity image;
(c) wrapped phase map; (d) phase image; (e) three-dimensional map of the phase image

层洋葱内表皮细胞,置于载玻片上的生理盐水中,然后盖上盖玻片,用滤纸吸取盖片四周多余的水分,使盖玻片能吸附在载玻片上。样品制备的关键点是撕取的洋葱表皮细胞需是单层细胞,置于载玻片上时须展平,盖盖玻片时要尽量避免产生气泡。制备好的样品放置在系统的样品光具座上,选用 $10\times/0.25$ 的显

微物镜,显微放大成像 10 倍,CCD 置于像平面。图 4(a)是记录的像面全息图,对像面全息图进行频域滤波,再经逆傅里叶变换即得到物光波复振幅,由振幅信息得到强度像如图 4(b)所示,对复振幅求反正切值得到包裹相位图如图 4(c)所示,利用基于 DCT 的最小二乘解包裹法解包裹,并利用参考全息图再现

相位相减的方法得到洋葱表皮细胞的相位像,图 4(d)是再现相位像二维图,图 4(e)是图 4(d)中矩形框所示局部的相位像三维图。

图 5 是血红细胞的数字全息显微实验结果。血红细胞样品采自实验室一健康男生,直接将取来的新

鲜血液涂于干净的载玻片上,要求涂成单层即可。系统中选用 $60\times/0.85$ 的显微物镜,显微放大成像 60 倍,CCD 置于像平面。(a)是像面全息图,(b)是再现振幅像,(c)是包裹相位图,(d)是再现相位像二维图,(e)是(d)中矩形框所示局部的相位像三维图。

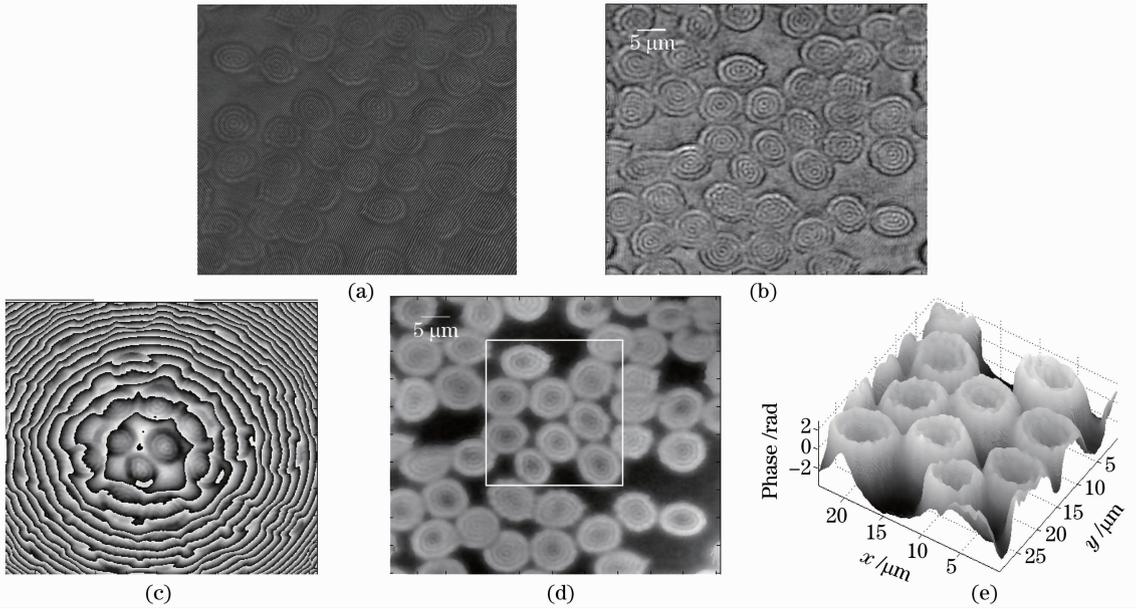


图 5 血红细胞的数字全息显微成像结果。(a)全息图;(b)再现强度像;(c)包裹相位图;(d)相位像;(e)局部相位像三维图

Fig. 5 Experimental results of living red blood cells. (a) Hologram; (b) reconstructed intensity image; (c) wrapped phase map; (d) phase image; (e) three-dimensional map of the phase image

5.3 数字全息显微动态相位成像

草履虫是一种原生动动物,只有一个细胞组成,体长大约 $180\sim 220\ \mu\text{m}$,但是在这个单细胞体内包含许

多复杂的结构和成分,这些结构在相位像上都能充分反映。实验用的草履虫是直接来自自然界中抓来的,置于干净的载玻片上,为了保持草履虫的活性,加入它

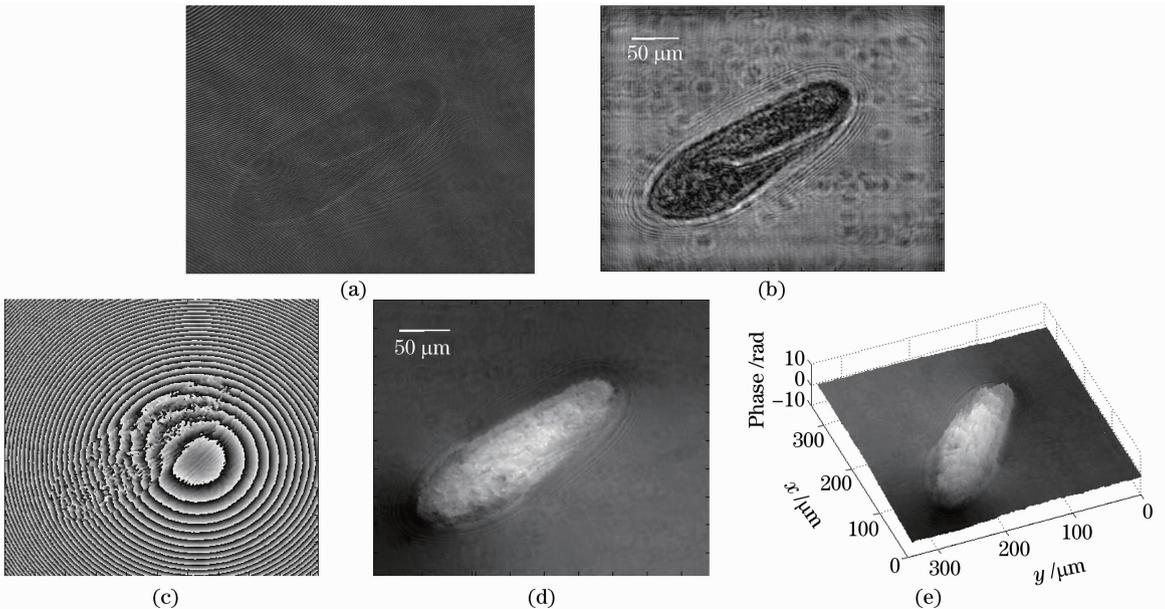


图 6 草履虫的数字全息显微成像结果。(a)全息图;(b)再现强度像;(c)包裹相位图;(d)相位像;(e)相位像三维图

Fig. 6 Experimental results of living paramecium. (a) Hologram; (b) reconstructed intensity image; (c) wrapped phase map; (d) phase image; (e) three-dimensional map of the phase image

生存的水溶液,水溶液的量即要保证草履虫能自由活动,又不能太多以避免草履虫离焦,然后盖上盖玻片,并将盖玻片和载玻片密封。

系统中选用 $10\times/0.25$ 的显微物镜,显微放大成像 10 倍。CCD 相机置于像平面,像素区间选择 $1024\text{ pixel}\times 1024\text{ pixel}$,此时帧频为 24.6 frame/s 。编写了相机控制程序,使相机在计算机控制下自动曝光记录序列的数字全息图。在实验中,单帧全息图的曝光时间为 20 ms ,每隔 0.1 s 记录下一帧全息图。记录完一段时间内的全息图后,在计算机中对这一序列全息图进行频域滤波、逆傅里叶变换,得到再现复振幅,再对包裹相位像进行解包裹计算和相位补偿。可

以把这一序列的再现像制作成 AVI 文件,实现动态播放。图 6 是其中一帧全息图的实验结果。(a)是像面全息图,(b)是再现强度像,(c)是包裹相位图,(d)是再现相位像二维图,(e)是相位像三维图。图 7 是从实验结果中选取的连续一小段再现相位像二维图,相邻相位图的时间间隔为 0.1 s ,这一序列图不仅显示了草履虫在这一小段时间内的运动位置变化情况,而且在这一序列图中草履虫相位图的灰度变化也很好地反映了草履虫在运动过程中内部结构的变化。因此,建立的数字全息显微成像系统可以应用于生物样品在真实生理环境中的动态观测。

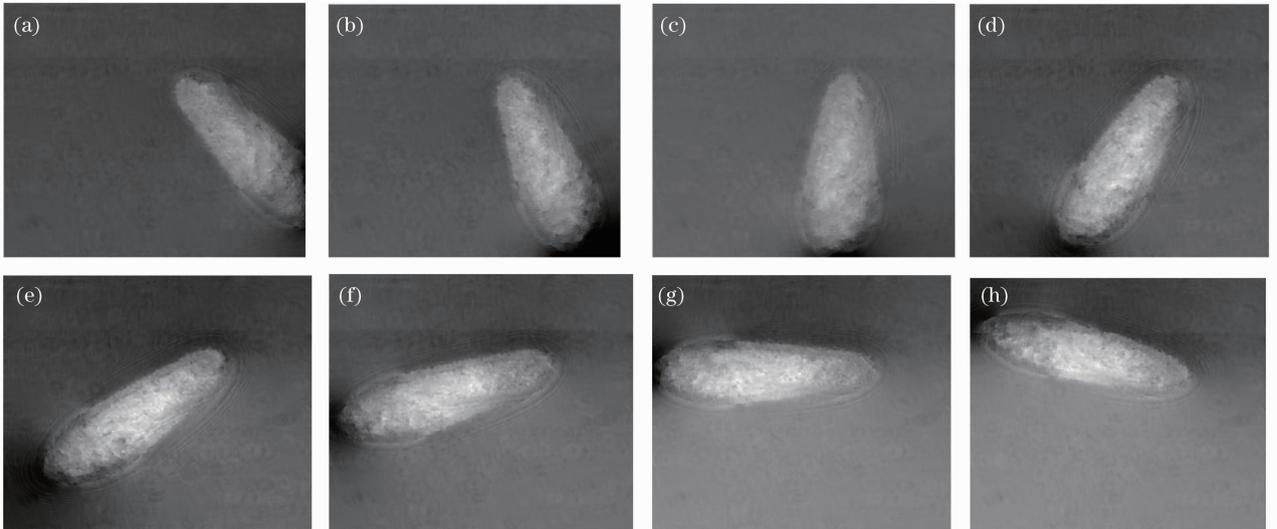


图 7 草履虫动态相位像序列

Fig. 7 Movie of phase images for living paramecium

6 结 论

构建了透射式预放大数字全息显微成像系统,并进行了大量的实验研究。实验结果表明该系统在生物样品的定量测量方面很有优势,并且为活体细胞的动态研究提供了一种很有效的手段,期望为早期医学诊断和药物设计等提供一定的分析评价依据,这将具有一定的应用意义和应用前景。在下一步工作中,将对系统进行进一步优化设计,以提高系统的测量分辨力,并对系统测量的精度进行标定。

参 考 文 献

- 1 U. Schnars, W. Jüpter. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction[J]. *Appl. Opt.*, 1994, **33**(2): 179~181
- 2 Zhu Linwei, Zhou Changhe, Wu Tengfei *et al.*. Femtosecond off-axis digital holography for monitoring dynamic surface deformation[J]. *Appl. Opt.*, 2010, **49**(13): 2510~2518
- 3 S. Boucherit, L. Bouamama, H. Benchickh *et al.*. Three-

- dimensional solid particle positions in a flow via multiangle off-axis digital holography[J]. *Opt. Lett.*, 2008, **33**(18): 2095~2097
- 4 M. Torre-Ibarra, F. Mendoza-Santoyo, C. Pérez-López *et al.*. Detection of surface strain by three-dimensional digital holography[J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(1): 27~31
- 5 A. T. Saucedo, F. M. Santoyo, M. Torre-Ibarra *et al.*. Endoscopic pulsed digital holography for 3D measurements[J]. *Opt. Express*, 2006, **14**(4): 1468~1475
- 6 M. M. Hossain, C. Shakher. Temperature measurement in laminar free convective flow using digital holography[J]. *App. Opt.*, 2009, **48**(10): 1869~1877
- 7 E. Cuche, P. Marquet, C. Depeursinge. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms[J]. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(34): 6994~7001
- 8 T. Colomb, F. Montfort, J. Kühn *et al.*. Numerical parametric lens for shifting, magnification, and complete aberration compensation in digital holographic microscopy[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2006, **23**(12): 3177~3190
- 9 G. Coppola, G. D. Caprio, M. Gioffré *et al.*. Digital self-referencing quantitative phase microscopy by wavefront folding in holographic image reconstruction[J]. *Opt. Lett.*, 2010, **35**(20): 3390~3392
- 10 L. F. Yu, S. Mohanty, J. Zhang *et al.*. Digital holographic

- microscopy for quantitative cell dynamic evaluation during laser microsurgery[J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(14): 12031~12038
- 11 Wang Yunxin, Wang Dayong, Zhao Jie *et al.*. 3D profile measurement for micro-optical component by using digital holographic microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(4): 0412003
王云新, 王大勇, 赵洁等. 基于数字全息显微成像的微光学元件三维面形检测[J]. *光学学报*, 2011, **31**(4): 0412003
- 12 W. J. Qu, Y. J. Yu, C. O. Choo *et al.*. Digital holographic microscopy with physical phase compensation[J]. *Opt. Lett.*, 2009, **34**(8): 1276~1278
- 13 V. Mico, Z. Zalevsky, C. Ferreira *et al.*. Superresolution digital holographic microscopy for three-dimensional samples [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(23): 19260~19270
- 14 F. Dubois, N. Callens, C. Yourassowsky *et al.*. Digital holographic microscopy with reduced spatial coherence for three-dimensional particle flow analysis[J]. *Appl. Opt.*, 2006, **45**(5): 864~871
- 15 P. Marquet, B. Rappaz, P. Magistretti *et al.*. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy[J]. *Opt. Lett.*, 2005, **30**(5): 468~470
- 16 B. Rappaz, F. Charrière, C. Depeursinge *et al.*. Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium[J]. *Opt. Lett.*, 2008, **33**(7): 744~746
- 17 P. Langehanenberg, B. Kemper, D. Dirksen *et al.*. Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for live cell imaging[J]. *Appl. Opt.*, 2008, **47**(19): D176~D182
- 18 Pan Weiqing, Zhu Yongjian, Lang Haitao. 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. 基于系统标定的相衬显微数字全息方法[J]. *中国激光*, 2010, **37**(7): 1812~1820
- 19 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
- 20 Pan Feng, Xiao Wen, Liu Shuo. Digital holographic microscopy for long-term quantitative phase-contrast imaging of living cells [J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(5): 0509001
潘锋, 肖文, 刘烁. 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[J]. *中国激光*, 2011, **38**(5): 0509001
- 21 Ma Lihong, Wang Hui, Li Yong *et al.*. Effect of system parameters on the reconstructed image quality in digital holographic microscopy [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(2): 300~307
马利红, 王辉, 李勇等. 数字全息显微系统结构参量对再现像质的影响[J]. *光子学报*, 2011, **40**(2): 300~307
- 22 J. Arines. Least-squares modal estimation of wrapped phases: application to phase unwrapping[J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(17): 3373~3378
- 23 P. Ferraro, S. D. Nicola, A. Finizio *et al.*. Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging[J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(11): 1938~1946

栏目编辑:何卓铭