

无透镜显微成像技术在即时检测中的应用进展

李聪慧^{1,2}, 曹若凡^{1,2*}, 许夏瑜^{1,2}, 李菲^{2,3}, 张镇西¹, 徐峰^{1,2}

¹西安交通大学生命科学与技术学院生物信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049;

²西安交通大学仿生工程与生物力学中心, 陕西 西安 710049;

³西安交通大学理学院化学系, 陕西 西安 710049

摘要 疾病诊断、食品安全监测和环境污染检测等领域常涉及细菌等微生物的即时检测, 光学显微镜是常用于检测和分析这些微小样品的工具。无透镜显微成像技术是将样品与电荷耦合元件 (CCD) 或互补金属半导体氧化物 (CMOS) 芯片等光检测器紧密接触、无需光学元件、直接对样品进行成像的技术, 较传统显微装置具有结构简单、体积小、操作简便、价格低廉等优点, 已被应用于微小组织结构检查、细胞形态数量分析、微生物检测等领域。根据成像原理, 无透镜显微成像技术可分为阴影成像、荧光成像及数字全息成像三类。分别阐述了三种无透镜显微成像技术的成像原理和物理结构, 并综述了无透镜显微成像技术在即时检测中的应用, 最后展望了无透镜显微成像技术的发展。

关键词 生物光学; 显微成像; 阴影成像; 荧光成像; 全息成像; 即时检测

中图分类号 Q-336

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207018

Application Progress of Lensless Microscopy Imaging Technology for Point-of-Care Testing

Li Conghui^{1,2}, Cao Ruofan^{1,2}, Xu Xiayu^{1,2}, Li Fei^{2,3}, Zhang Zhenxi¹, Xu Feng^{1,2}

¹Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China;

²Bioinspired Engineering and Biomechanics Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China;

³Department of Chemistry, School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China

Abstract Microorganisms, such as bacteria, are always detection objects in point-of-care testing, such as infectious diseases diagnosis, food safety monitoring and environment pollution detection. Optical microscopy is always a tool which is used to detect and analyze these detection objects. Lensless microscopy combines the sample with photodetectors such as charge coupled device (CCD) or complementary metal-oxide semiconductor (CMOS). This technique does not need optical devices, and the samples are imaged directly. The device is significantly simpler, smaller, easier to manipulate and cheaper than that of lens-based conventional microscope, which has been used in microstructure examinations, cell morphological analysis and microorganism detection. The lensless microscopic technology can be divided into three types, such as shadow imaging, fluorescence imaging and digital inline holography according to imaging principle. This paper reviews imaging principle and physical structure of three kinds of lensless microscopic technologies, and summaries the applications of lensless microscopic technologies in point-of-care testing. At last, we discuss the future development of lensless microscopic technologies.

Key words biotechnology; microscopy; shadow imaging; fluorescence imaging; holography imaging; point-of-care testing

OCIS codes 110.0180; 180.2520; 180.3170

收稿日期: 2017-03-30; **收到修改稿日期:** 2017-06-06

基金项目: 国家重大仪器专项(2013YQ190467)、西安交通大学基本科研业务费(xjj2016092)

作者简介: 李聪慧(1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事无透镜成像方面的研究。E-mail: 315168897@qq.com

导师简介: 徐峰(1980—), 男, 博士, 教授, 主要从事生物医学工程方面的研究。E-mail: fengxu@mail.xjtu.edu.cn

* **通信联系人.** E-mail: caoruofan66@163.com

1 引 言

疾病传播^[1](如艾滋病^[2])、食品安全^[3-4](如病原性大肠杆菌^[5])和环境污染^[6](如水体富营养)等全球性社会问题,具有突发性和地域性等特点,长期以来极大地威胁着人类的健康与生活。检测和分析是预防和控制上述问题的必备环节。然而,传统分析检测仪器价格昂贵,体量重大,需要专业人员就地采样后返回实验室进行操作分析,影响到检测速度。特别是对一些不发达的边远地区,落后的检测条件和资源无法保证有效的检测分析。因此,研究人员致力于研究即时检测装置和技术^[7-10]。在无需专业人员的条件下,即时检测技术可快速采集样品并对结果进行分析,提供检测报告^[11]。在即时检测过程中,常常需要分析细胞^[12]、微生物^[13]等微小样品的形态学信息以及核酸^[14-15]、抗原抗体等生化反应后的荧光影像信息,而这些信息的获取通常需要用显微成像设备。而无透镜显微成像装置原理简单,结构简便,价位低廉,常集成于即时检测装置^[16]中。

无透镜成像技术是将样品与电荷耦合元件(CCD)或互补金属半导体氧化物(CMOS)芯片等光检测器紧密接触、无需光学元件、直接对样品进行成像的技术^[17]。根据成像原理的不同,无透镜成像技术分为阴影成像、荧光成像和数字全息成像三类。这三类无透镜成像技术各有优缺点,适用于不同的应用领域。其中,阴影无透镜成像系统结构最为简单,所得图像与原始样品比例为1:1,常用于细胞分类计数、尺寸测量^[18];荧光无透镜成像系统^[19]结合了荧光成像的特点,可实现荧光酶联免疫分析^[20]等功能;数字全息无透镜成像系统^[21]采用同轴数字全息成像的结构,可以获得样品的空间三维信息^[22]。同时,人们还将无透镜显微成像方法与手机等其他便携式电子设备相结合用于即时诊断领域^[17]。

本文将综合介绍这三类无透镜成像技术的成像原理、物理结构、元件选择及常用算法,并按照检测物的不同对无透镜成像技术在即时检测中的应用进行了分类介绍,最后对无透镜成像技术的发展前景进行展望。

2 无透镜成像基本原理

传统的光学显微镜主要由光源、光学透镜、光检测器三部分组成。光学透镜的主要作用是将样品进行光学放大并将其聚焦在光检测器上进行成像。但光学透镜通常需要和光学镜筒、光圈以及调焦系统

等部件配合使用以获得清晰的图像,大大增加了显微镜的体积和复杂程度,成为显微镜用于即时检测领域必须克服的一大阻力^[23]。相比传统显微镜,无透镜显微装置的基本结构只由光源和光检测器组成,整个系统无需光学透镜,另外省去了配套使用的光学元件,因此大大简化了显微装置的结构,同时规避了透镜成像过程中引起的像差,保证了图像的真实性。无透镜显微镜的光源常使用能耗低、体积小的发光二极管(LED),由此组成的简易无透镜显微装置^[24-25]可满足即时检测应用的需要。另外,为进一步实现无透镜成像技术的荧光成像功能,有时会选用谱带窄、能量高的激光作为激发光源,并且基于激光良好的光学相干性,还可将其作为全息无透镜显微镜的光源。无透镜显微镜的光检测器通常根据需求不同选用 CCD 或 CMOS。这两种光检测器各有优缺点:CCD 图像质量较高,但能耗高,易发热,同时制作工艺复杂,价格高;CMOS 能耗低,制作工艺简单,价格低廉,但图像质量较低。因此光学检测器的选择需要设计者根据具体情况权衡判断^[26]。无透镜成像过程中,通过调整光源、样品和光检测器之间的距离和结构可实现样品的阴影成像、荧光成像和数字全息成像。下面简单介绍每种成像方法的工作原理和异同点。

2.1 阴影无透镜成像

无透镜成像技术的阴影成像是利用光沿直线传播的光学原理,通过光检测器采集样品的投影进而表征其物理形态的成像方法,如图 1(a)所示。成像过程中应尽可能增大 LED 光源与样品间的距离,使其远大于样品的尺寸,这样入射光线近似为平行光。同时,应减小样品与光检测器的距离($<1 \mu\text{m}$),以减小光线衍射而引起的图像失真现象^[17],获得与样品等大的图像。另外,由于过小的样品体积会使其与光检测器间的光线衍射不可被忽略,造成图像失真^[17],因此样品的体积也不宜过小。

阴影成像方法的主要局限是其检测样品的最小限度受光检测器像素点大小的限制。目前,市面上常见的 CMOS 工业相机的像素尺寸约为 $2.2 \mu\text{m} \times 2.2 \mu\text{m}$, CCD 相机的像素尺寸约为 $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ 。但在生物检测中,生物样品(如细胞和细菌等)的直径均处于微米量级,而由无透镜阴影成像技术的1:1光学放大,无法获取尺寸小于单位像素的样本的图像信息。同时图像采集过程中的伪影、传感器内部和数据传输过程中的噪声以及传感器本身存在缺陷等问题还会导致样品图像

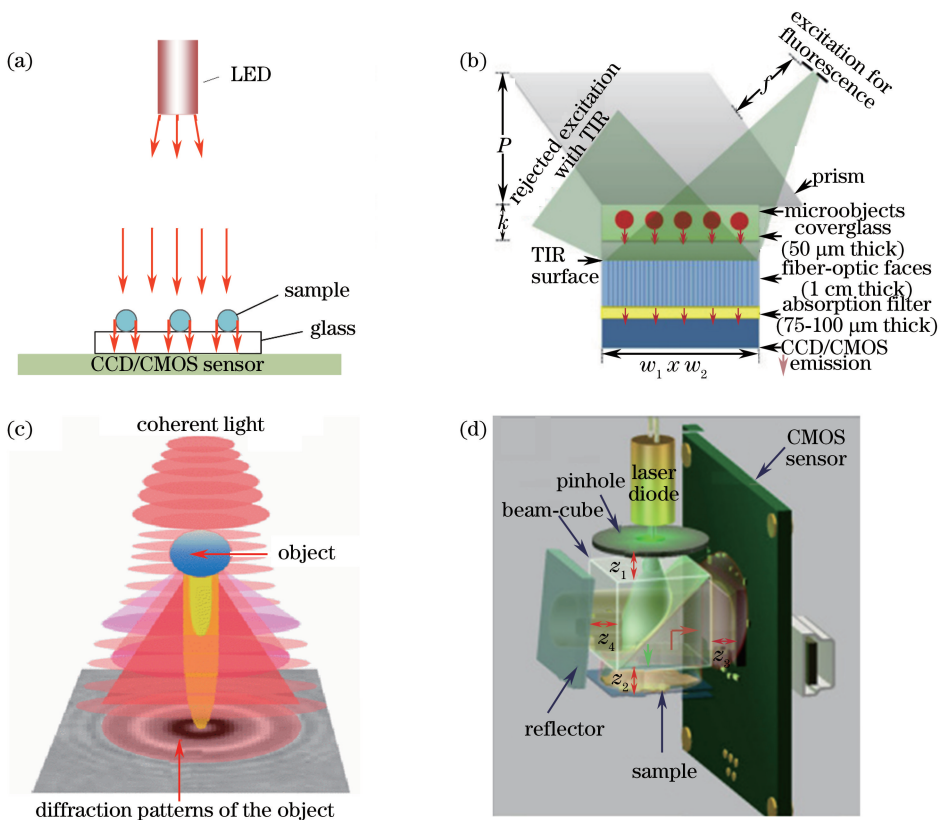


图 1 无透镜成像技术装置示意图^[27-29]。(a)阴影无透镜显微成像;(b)荧光无透镜显微成像;
(c)透射式数字全息无透镜显微成像;(d)反射式数字全息无透镜显微成像

Fig. 1 Schematic of lensless imaging technology^[27-29]. (a) Shadow lensless microscopic imaging; (b) fluorescence lensless microscopic imaging; (c) transmission digital holography lensless microscopic imaging; (d) reflective digital holography lensless microscopic imaging

不清晰^[30]。为了得到清晰的图片、获得样品更细节的信息,需要采集更高分辨率的图像。提高分辨率最直接的方法是增加单位面积像素的数量,即减小像素点的尺寸。但随着像素尺寸的减小,传感器单位像素所接受到的光照度减小,使整个图像变暗,对比度下降;同时减小像素尺寸会使散粒噪声增大,而散粒噪声的存在从工艺上限制了像素尺寸的进一步减小。另外,高分辨率的光检测器价格昂贵,不适用于即时检测。因此,除了直接增加光检测器的分辨率外,人们还通过信号处理等方法从软件和算法方面提高图像分辨率^[30]。例如,首先通过平移样品、多点采集图像及采集不同时间的图像获取包含不同信息的多幅低分辨率(LR)图像,然后使用超分辨率(SR)图像重建算法提取多幅低分辨率图像中的有效信息,并将其整合成一张含有更多信息的高分辨率图像,见图 2。

假设光电传感元件捕获的低分辨率图像尺寸为 $N_1 \times N_2$, 将其表示为向量 $\mathbf{y} = [y_{k,1}, y_{k,2}, \dots, y_{k,M}]^T$, 其中 $M = N_1 \times N_2$; 理想的经采样、退化的

超分辨率图像尺寸为 $L_1 N_1 \times L_2 N_2$, 可将其表示为向量 $\mathbf{x} = [x_1, x_2, \dots, x_N]^T$, 其中 $N = L_1 N_1 \times L_2 N_2$,

$$\mathbf{y}_k = \mathbf{D}\mathbf{B}_k\mathbf{M}_k\mathbf{x} + \mathbf{n}_k, 1 \leq k \leq p, \quad (1)$$

式中 \mathbf{M}_k 为运动矩阵, 尺寸为 $L_1 N_1 L_2 N_2 \times L_1 N_1 L_2 N_2$; \mathbf{B}_k 为模糊矩阵, 尺寸为 $L_1 N_1 L_2 N_2 \times L_1 N_1 L_2 N_2$; \mathbf{D} 为欠采样矩阵, 尺寸为 $(N_1 N_2)^2 \times L_1 N_1 \times L_2 N_2$; \mathbf{n}_k 为噪声矩阵。(1)式描述了高分辨率图像与低分辨率图像间的关系, 低分辨率图像可能存在运动伪影、模糊信号、噪声信号, 以及数字欠采样造成的信息缺失。因此, 在已知低分辨率图像信息、运动情况、模糊情况、噪声类型时, 可反演出超分辨率图像^[31]。

2.2 荧光无透镜成像

荧光成像技术主要基于外源型荧光探针与某些生物分子的特异性结合, 具有灵敏度高、特异性强等特点。在生物医学中, 利用荧光成像技术观察生物分子是探索生命过程的重要方法^[32]。荧光成像过程中, 激发光与辐射光是波长不同的光。为了排除

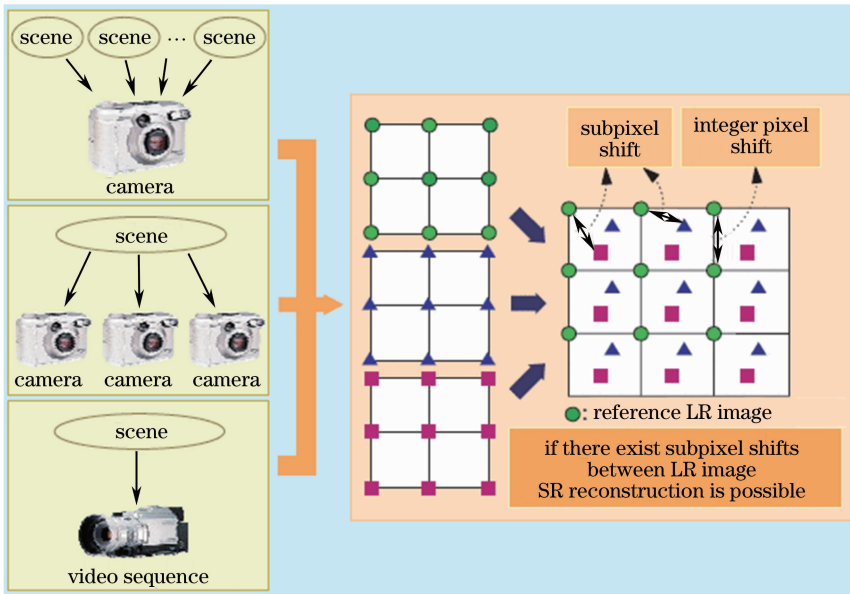


图 2 超分辨率算法原理^[30]

Fig. 2 Principle of super-resolution algorithm

背景光对荧光信号的影响,常使用多种透镜和滤光片来滤除背景光,从而大大增加了荧光显微镜的复杂程度。对于无透镜显微技术的荧光成像,为了更好地滤除背景光并获取有效信息,需要对传统荧光显微镜结构进行调整。图 1(b)所示为常用的无透镜荧光成像系统。该结构中,光源必须是特定波长的激发光,因此常用谱带较窄的 LED 光源作为激发光源。不同于荧光显微镜,无透镜荧光成像技术将激发光源放置于样品斜上方,激发光经棱镜传播至样品表面激发出荧光,于样品下方的玻璃基板表面发生全内反射(TIR)。这种结构设计将背景激发光通过全反射的方式滤除,简化了滤光的结构和过程,缩小了设备的体积和成本。激发出的荧光信号通过光纤面板收集,经带通滤光片过滤后至光检测器被捕获,且全反射结构及带通滤波片的作用极大减小了激发光对荧光检测的干扰^[29]。无透镜荧光成像过程由于不存在透镜聚焦,所采集图像往往因为 CMOS 不在其成像共轭面而产生模糊,因此需要通过压缩采样^[33]等方法来提高其图像的空间分辨率。目前,无透镜荧光成像技术已被应用于转基因的秀丽隐杆线虫的检测^[34]、荧光标记的白细胞计数^[35]、肉毒杆菌毒性检测^[36]及荧光微孔分析^[37]等诸多领域。

2.3 数字全息无透镜成像

对于细胞等透明或半透明的样品,其透射率分布相对均匀,光透过样品后强度信息变化较小,因此仅通过光强的检测很难获得高质量的样品图像。然而,样品折射率的改变影响了光穿过样品时的光程,

使光的相位信息发生了明显变化,因此可通过检测光的相位信息直接准确地反映样品性质^[38]。但阴影无透镜成像技术只能检测强度信息,不能检测相位信息,因此对细胞等生物样品成像轮廓并不清晰,且对细胞等样品的三维形貌的观测相对困难。利用光的波动性发展起来的全息术可以将相位信息转换为强度,从而记录样品的相位和深度信息^[39]。全息术中,参考光波和物体反射的光波发生相干叠加产生干涉条纹,这些干涉条纹被记录成为全息图。

透明物体被准直相干光源照明后,投影至离物体距离为 z_0 处的光强 I 是参考光强 R 与衍射光强 O 的叠加:

$$I(x, y) = |R(x, y) + O(x, y)|^2 = |O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2 + R^*(x, y)O(x, y) + R(x, y)O^*(x, y) \quad (2)$$

$I(x, y)$ 被全息干板或光电传感元件记录,参考光强 R 为固定信息,衍射光强 O 体现了待测样品的光学信息,通过再现的方式可还原待测样品。数字全息再现与光学再现过程不同,光学全息是用实际光源照明再现的,只需适当的再现光,在空间中可形成再现像的光场分布;而数字全息的再现光是模拟的,由无透镜数字全息成像得到的干涉图样 $I(x, y)$,通过计算机模拟光学衍射过程来实现物光再现,经过图像重建得到平常的样品形貌图像。常用于图像重建过程的算法包括:相位复原迭代法^[40-41]、孪生像消除法^[42]和角谱法^[43]等,这些算法源于全息成像,同样适用于无透镜全息显微成像。

通过这些重建算法分析,强度信息和相位信息被提取,尤其是相位信息,对于散射能力较弱的透明物质的成像十分重要。如今数字全息成像技术已广泛应用于生物医学研究中,例如,王云新等^[44]利用数字全息术实现对活细胞培养状态的无损检测,文献^[21,45]将全息成像技术应用于无透镜显微镜中。根据结构差异,无透镜全息显微成像系统又可分为透射型和反射型两类。

1) 透射型全息无透镜成像技术。生物样品检测中,由于细胞透光性强,参考光可在无需增加额外光路的条件下直接到达 CCD,实现与细胞散射光的叠加干涉。正是由于生物样品的这种透光特性,透射型无透镜数字全息显微成像应运而生,极大地简化了全息成像的结构。该成像方法结构如图 1(c)所示,其与阴影成像方法的主要区别在于:所用光源为相干光源,且样品与光检测器间的距离增大,这为干涉图样的获取提供了可能性。当来自样品本身的散射光与光源自身发射的光线发生干涉时,光检测器可以捕获到最终的干涉图样,该图样记录了样品

不同高度处的影像信息,最后通过图像处理和三维图像的重建算法可获得样品的三维图像。

2) 反射型全息无透镜成像技术。反射型无透镜成像^[46]是对传统数字全息成像系统的集成,整个结构被压缩在一个很小的空间中。由于该结构易于集成在即时诊断装置中,因此在即时诊断领域有良好的应用前景。如图 1(d)所示,激光通过小孔经分束镜分为两路,一束光线透射至样品后经分束镜反射至光检测器,一束光线反射至反射镜后经分束镜透射至光检测器,两路光线叠加形成干涉图样。由数字全息无透镜成像得到的干涉图样还需经过图像重建才能得到平常的样品形貌图像。

上述三种无透镜显微技术分别实现了阴影成像、荧光成像和全息成像,其比较如表 1 所示。相比于传统的成像模式,无透镜显微技术极大简化了仪器结构,降低了仪器成本。目前,无透镜成像技术已成功应用于即时检测中,同时在生物医学领域也得到广泛应用。下面将具体阐述无透镜成像技术在即时检测中的应用。

表 1 三种无透镜成像技术比较

Table 1 Comparison of three types of lensless imaging technology

System	Light source	Structure requirement	Reconstruction	Range of field
Shadow imaging	Monochrome or white light LED	Sample must be close to CCD	Super-resolution ^[47-50]	Semitransparent or opaque samples
Fluorescence imaging	Monochrome LED or laser	Filters	Super-resolution ^[47-50] , compressive sampling ^[33]	Fluorescent samples
Holographic imaging	Laser	Pinhole	Phase retrieval ^[40-41] , twin image elimination ^[42] , angular spectrum ^[43]	Transparent or semitransparent samples

3 无透镜成像技术在即时检测中的应用

按照被检测物的尺度,无透镜成像技术可分别对微小组织、细胞、细菌等生命体进行检测。

3.1 微小组织结构检测

微小组织结构的检测对多种疾病的诊断具有重要意义。例如,在严重威胁到男性身体健康且致死率极高的前列腺癌中^[51],由分泌薄壁细胞组成的腺泡,其完整性受到其顶部与底部极性的影响。若腺泡极性被破坏,腺泡转化为球体是癌变的一个重要标志。无透镜显微技术的出现为微小组织结构的即时检测提供了可能。另一方面,多年来实验人员将细胞培养于硬质的二维环境的塑料基底上,但细胞在体内处于三维环境,这种二维培养环境并不能真

实反映细胞在体内的情况,细胞三维微环境概念^[52]的提出很好地解决了这一问题。因此出现了腺泡体外的三维环境培养方法,并应用无透镜成像技术观察到腺泡的极化现象。例如,Monika 等^[53]利用无透镜数字全息显微成像方法实现了对腺泡图像的提取,并利用算法还原了其结构,用以判断其极性的变化。图 3(a)为其所使用装置的示意图,图 3(b)表征了正常腺泡结构,图 3(c)为腺泡失去极性的球体结构。从成像的图片中可以很清晰地分辨出这两种结构,从而为癌变诊断提供了有效依据。

3.2 细胞计数及形态分析

心脏病的发生和发展一直是科研工作者的研究热点。随着各类药物的不断出现和发展,药源性心脏病的发病率不断增高。例如,阿霉素是一种有效的抗肿瘤药物,但若应用于心脏病患者将导致其扩

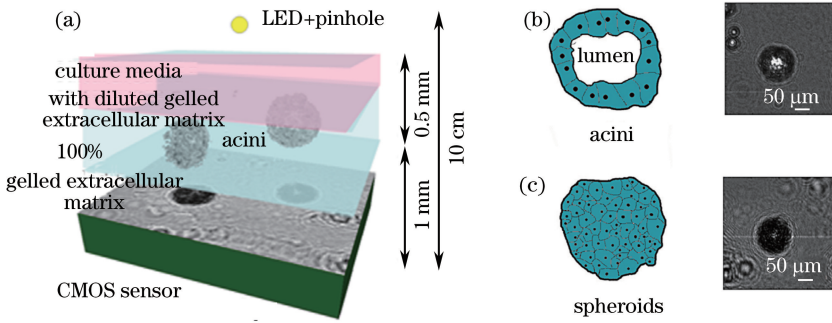


图 3 无透镜数字全息显微成像技术分析腺泡 3D 结构^[53]。(a)腺泡形态的检测装置示意图；(b)正常腺泡；(c)失去极性的腺泡^[53]

Fig. 3 3D structures of acini analyzed by lensless digital holography microscopic imaging technology.

(a) Schematic of the device for the detection of acinar morphology; (b) normal acini; (c) acini lack of polarity

张性的心肌病或心力衰竭^[54]。细胞计数及形态分析是非常重要的生化检测方法,某些特定细胞的数量及形态结构的变化可为判断疾病是否发生或估算其发生概率的大小提供有效信息。因此,Sang等^[55]利用无透镜成像技术研发出一种检测心脏中毒的装置,如图 4(a)所示。他们首先提取小鼠胚胎干细胞,将其培养在腔室内诱导分化为心肌细胞,在不同腔室内分别加入阿霉素与异丙肾上腺素。在无透镜显微镜下检测并记录了腔室内心肌细胞的蠕动,再通过算法模拟心肌细胞的搏动,计算出心率及逐拍间的差异,据此来分析不同药物作用下心脏中毒情况^[55]。

除心脏病外,日益增高的艾滋病发病率也成为近年来科研工作者重点关注的领域。在不发达的非洲等地区,艾滋病患者在进行诊断时常遇到由于医疗资源匮乏造成的就诊和治疗延后问题。Moon等^[56]将微流体技术与无透镜成像技术相结合,利用

无透镜成像技术实现了对荧光标记的 CD4⁺ T 淋巴细胞的计数,通过 CD4⁺ T 淋巴细胞含量的多少评估了患病的可能性,从而实现了对于艾滋病的即时诊断。

近年来,由于社会压力增大、环境变化等问题,越来越多的家庭饱受不孕不育的困扰,因此对男性精子质量的检测显得尤为重要。目前主要通过对精子数量和活性的分析评估精子的质量。微流体系统在精子检测及追踪方面展现出了巨大的应用潜力。张晓慧等^[57]研究了一种利用无透镜成像技术监测和筛选精子的方法。如图 4(b)所示,首先用双面胶(DSA)将聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)贴合成微流体芯片,在其通道内注入混有牛血清白蛋白(BSA)的新鲜输卵管培养液,再将预处理过的精液放入枪头中,放置于芯片孔上,由于毛细作用精子将充满微流体通道,利用无透镜成像技术采集图像,得到如图 4(b)下方所示精子图像^[57]。

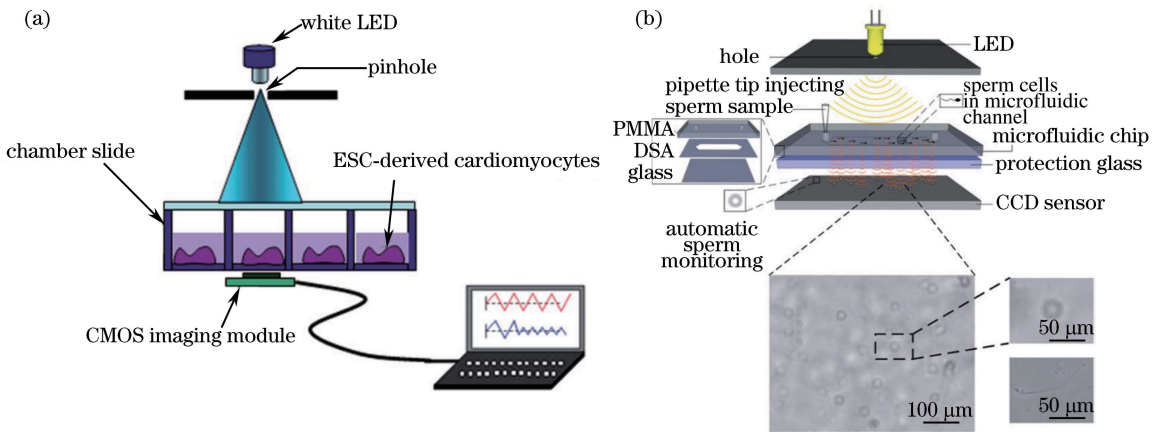


图 4 无透镜成像技术应用于(a)心脏中毒检测；(b)精子形态分析^[57]

Fig. 4 Application of lensless imaging technology for (a) cardiotoxicity detection; (b) sperm shape analysis^[57]

传统追踪精子运动轨迹的方法(例如显微镜观察法和上面描述的方法)追踪到的均为精子的二维

运动轨迹,而实际精子的运动处于三维空间之中。因此,为了反映精子在体外更为真实的运动方式,

Su 等^[58]设计了一种无透镜数字全息成像技术装置对精子进行高通量的三维运动轨迹追踪。在其设计的无透镜成像技术装置中,采用了双光源双视野的设计思路,通过对图像的重建得到精子三维追踪的图像。该装置可以在 $8\sim 17\text{ mm}^3$ 的空间范围内,实现至少对 1500 个精子亚微米级的动态追踪。

3.2 细菌检测

以上例子已证实无透镜成像技术在观测细胞等样品方面的优越性。不仅如此,该技术还可用于检测样品尺度小于细胞的细菌等。如图 5(a)所示,Allier 等^[59]将细菌及其缓冲液滴在数微米厚的润湿薄膜上,进行脱水后利用无透镜显微系统进行了观测,发现该薄膜有一定的透镜放大作用,相较于直接观测具有更高的信噪比。之后,基于 Allier 等^[59]的

研究,Poher 等^[60]又报道了一种基于润湿的薄膜的无透镜数字同轴全息显微观测细菌的方法。

除了上述直接观测细菌的方法外,利用间接的方法也可观测到细菌。应急(SOS)反应是细菌脱氧核糖核酸(DNA)修复和重新启动停滞的复制叉的一种诱导途径^[61]。Daniel 等^[62]利用基因工程的方法合成了一种携带 *recA:lucCDABE* 融合体的水毒性检测大肠杆菌。该大肠杆菌在毒素刺激下发生 SOS 反应,产生生物体发光,此光学信号可在盖革模式下使用单光子雪崩光电二极管进行检测。Tsai 等^[63]利用这一原理,发明了一种基于生物体发光的全细胞传感器生物芯片,并通过无透镜成像技术对生物体光学信号进行了检测,实现了水中污染物的即时检测。图 5(b)为全细胞传感器生物芯片结构示意图。

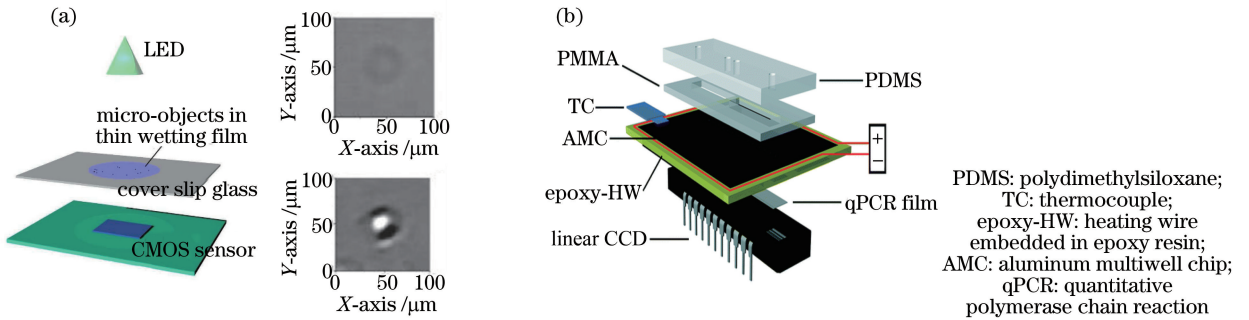


图 5 应用无透镜成像技术观测细菌。(a)基于润湿的薄膜的无透镜数字同轴全息显微细菌观测装置^[59];
(b)基于生物体发光的全细胞传感器生物芯片^[63]

Fig. 5 Application of lensless imaging technology for bacteria detection. (a) Bacteria detection device of lensless digital coaxial holography microscopy based on wetting thin film^[59]; (b) whole cell biosensor biochip based on biological luminescence^[63]

4 总结及展望

综上所述,无透镜成像技术相较于传统成像技术显示出诸多优势。首先,无透镜显微系统轻便、小巧,操作简便;其次,其主要单元是光源和光检测器,不存在光学透镜,极大降低了制造成本;另外,不同于传统成像技术通过逐层扫描的方法组建三维模型,无透镜成像技术通过全息技术获得样品的三维信息,可实现三维信息的实时显示。这些优点使无透镜成像技术适用于资源匮乏和落后地区的即时检测,为即时检测装置提供了光学检测方法,已广泛应用于微小组织、细胞、细菌等样品的光学检测中。

但是,无透镜成像技术的发展也遇到一些挑战。成像质量方面:传统光学显微镜的技术相对成熟,成像质量较好,而无透镜显微系统中样品与光检测器间的距离不易控制,不可避免产生衍射,且使用过程

中多涉及不同类型、不同材质的多种芯片,参数的改变会影响成像的质量;分辨率方面:超高分辨率显微镜通过宽场和共聚焦等技术可大大提高样品的光学分辨率,而无透镜显微成像难以捕获尺寸小于光电检测器单位像素尺寸的样品,提高分辨率依赖于光检测器分辨率的提高及重建算法的创新,而复杂算法不易集成于处理能力较弱的微型化处理器中;显微镜功能方面:由于无透镜显微系统中略去了很多光学元件,所以很多现代显微镜可实现的成像方法(如激光扫描共聚焦成像技术、受激发射损耗成像技术和光激活定位成像技术等)不能很好地移植到无透镜显微系统中。

无透镜显微成像技术的发展机遇与挑战并存。首先,光电传感技术的迅速发展使图像采集速度不断加快、分辨率日益提高,无透镜显微成像的检测极限随之不断减小;其次,新的图像处理算法的研究,

使图像重建效果更为真实;另外,其他领域新技术的出现为无透镜成像技术的发展提供了新的思路。例如,相关研究利用具有溶胀特性的高分子材料实现了对于细胞、微小组织等物理结构的放大^[20,64],这种放大方式有望弥补无透镜成像技术中受限的光学放大,提高最小检测极限。总体来说,随着相关技术的革新和发展,相信不久的将来,无透镜成像技术会出现在家庭或边远地区,为人们提供便捷快速的检测诊断。

参 考 文 献

- [1] Pai N P, Vadnais C, Denkinger C, *et al.* Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries [J]. *PLOS Medicine*, 2012, 9 (9): e1001306.
- [2] Setty M, Hewlett I K. Point of care technologies for HIV [J]. *AIDS Research and Treatment*, 2014: 497046.
- [3] Srey S, Jahid I K, Ha S D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern[J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 572-585.
- [4] Techer C, Baron F, Delbrassinne L, *et al.* Global overview of the risk linked to the bacillus cereus group in the egg product industry: identification of food safety and food spoilage markers[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(5): 1344-1358.
- [5] Henihan G, Schulze H, Corrigan D K, *et al.* Label- and amplification-free electrochemical detection of bacterial ribosomal RNA [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 81:487-494.
- [6] Vasudevan S, Oturan M A. Electrochemistry: as cause and cure in water pollution—an overview[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2014, 12(1): 97-108.
- [7] Hu J, Wang S, Wang L, *et al.* Advances in paper-based point-of-care diagnostics [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 54: 585-597.
- [8] Mcnerney R, Daley P. Towards a point-of-care test for active tuberculosis: obstacles and opportunities [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9 (3): 204-213.
- [9] Xie H, Mire J, Kong Y, *et al.* Rapid point-of-care detection of the tuberculosis pathogen using a BlaC-specific fluorogenic probe [J]. *Nature Chemistry*, 2012, 4(10) :802-809.
- [10] Wang S, Tasoglu S, Chen P Z, *et al.* Micro-fluidics ELISA for rapid CD4 cell count at the point-of-care[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 3796.
- [11] Gialamas A, St John A, Laurence C O, *et al.* Point-of-care testing for patients with diabetes, hyperlipidaemia or coagulation disorders in the general practice setting: a systematic review [J]. *Family Practice*, 2010, 27(1): 17-24.
- [12] Kesavan S V, Navarro F P, Menneteau M, *et al.* Real-time label-free detection of dividing cells by means of lensfree video-microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(3): 036004.
- [13] Safavieh M, Ahmed M U, Sokullu E, *et al.* A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection [J]. *Analyst*, 2014, 139(2): 482-487.
- [14] Choi J R, Liu Z, Hu J, *et al.* Polydimethylsiloxane-paper hybrid lateral flow assay for highly sensitive point-of-care nucleic acid testing [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(12): 6254-6264.
- [15] Choi J R, Hu J, Wang S, *et al.* Paper-based point-of-care testing for diagnosis of dengue infections[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 37 (1) : 100-111.
- [16] Forcucci A, Pawlowski M E, Majors C, *et al.* All-plastic, miniature, digital fluorescence microscope for three part white blood cell differential measurements at the point of care[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(11): 4433-4446.
- [17] Greenbaum A, Luo W, Su T W, *et al.* Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(9): 889-895.
- [18] Roy M, Seo D, Oh C H, *et al.* Low-cost telemedicine device performing cell and particle size measurement based on lens-free shadow imaging technology[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 67(5): 715-723.
- [19] Coskun A F, Su T W, Ozcan A. Wide field-of-view lens-free fluorescent imaging on a chip[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(7): 824-827.
- [20] Chozinski T J, Halpern A R, Okawa H, *et al.* Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(6): 485-488.
- [21] Mudanyali O, Tseng D, Oh C, *et al.* Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications [J]. *Lab on A Chip*, 2010, 10 (11): 1417-1428.
- [22] Sobieranski A C, Inci F, Tekin H C, *et al.* Portable digital in-line holography platform for sperm cell visualization and quantification[C]. 27th SIBGRAPI Conference on Graphics, Patterns and Images, 2014:

- 274-281.
- [23] Hell S W. Far-field optical nanoscopy[J]. *Science*, 2007, 316(5828): 1153-1158.
- [24] Bishara W, Sikora U, Mudanyali O, *et al.* Holographic pixel super-resolution in portable lensless on-chip microscopy using a fiber-optic array[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(7): 1276-1279.
- [25] Greenbaum A, Sikora U, Ozcan A. Field-portable wide-field microscopy of dense samples using multi-height pixel super-resolution based lensfree imaging[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(7): 1242-1245.
- [26] 米本和也. CCD/CMOS 图像传感器基础与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [27] Lee M, Yaglidere O, Ozcan A. Field-portable reflection and transmission microscopy based on lensless holography[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(9): 2721-2730.
- [28] Roy M, Junhee L, Geonsoo J, *et al.* An automated cell detection algorithm for lensfree shadow imaging platform[C]. *International Conference on Emerging Trends in Communication, Control, Signal Processing & Computing Applications*, 2014: 1-3.
- [29] Coskun A F, Sencan I, Su T W, *et al.* Lensless wide-field fluorescent imaging on a chip using compressive decoding of sparse objects[J]. *Optics Express*, 2010, 18(10): 10510-10523.
- [30] Park S C, Park M K, Kang M G. Super-resolution image reconstruction: a technical overview[J]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2003, 20(4): 21-36.
- [31] Ng M K, Bose N K. Mathematical analysis of super-resolution methodology[J]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2003, 20(3): 62-74.
- [32] Zhang Z X. Biomedical photonics new technology and application[M]. Beijing: Science Press, 2008.
张镇西. 生物医学光子学新技术及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [33] Coskun A F, Sencan I, Su T W, *et al.* Wide-field lensless fluorescent microscopy using a tapered fiber-optic faceplate on a chip[J]. *Analyst*, 2011, 136(17): 3512-3518.
- [34] Coskun A F, Sencan I, Su T W, *et al.* Lensfree fluorescent on-chip imaging of transgenic *Caenorhabditis elegans* over an ultra-wide field-of-view[J]. *Plos One*, 2011, 6(1): e15955.
- [35] Coskun A F, Su T W, Ozcan A. Wide field-of-view lens-free fluorescent imaging on a chip[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(7): 824-827.
- [36] Balsam J, Ossandon M, Kostov Y, *et al.* Lensless CCD-based fluorometer using a micromachined optical Söller collimator[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(5): 941-949.
- [37] Martinelli L, Choumane H, Ha K N, *et al.* Sensor-integrated fluorescent microarray for ultrahigh sensitivity direct-imaging bioassays: role of a high rejection of excitation light[J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 91(8): 083901.
- [38] 黄妙娜, 黄佐华. 相位物体的相位检测分析方法[J]. *大学物理*, 2009, 28(4): 6-10.
- [39] Wang Y X, Wang D Y, Yang Y S, *et al.* Application and analysis in the biomedicine field using digital holographic technology[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2014, 41(2): 0209002.
王云新, 王大勇, 杨怡妹, 等. 数字全息技术在生物医学成像和分析中的应用[J]. *中国激光*, 2014, 41(2): 0209002.
- [40] Allen L J, Oxley M P. Phase retrieval from series of images obtained by defocus variation[J]. *Optics Communications*, 2001, 199(1): 65-75.
- [41] Fienup J R. Phase retrieval algorithms: a comparison[J]. *Applied Optics*, 1982, 21(15): 2758-2769.
- [42] Denis L, Fournier C, Fournel T, *et al.* Numerical suppression of the twin image in in-line holography of a volume of micro-objects[J]. *Measurement Science and Technology*, 2008, 19(7): 074004.
- [43] Li J C. FFT computation of angular spectrum diffraction formula and its application in wavefront reconstruction of digital holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, 29(5): 1163-1167.
李俊昌. 角谱衍射公式的快速傅里叶变换计算及在数字全息波面重建中的应用[J]. *光学学报*, 2009, 29(5): 1163-1167.
- [44] Wang Y X, Wang D Y, Zhao J, *et al.* Non-invasive monitoring of living cell culture by lensless digital holography imaging[J]. *Chinese Optics Letters*, 2011, 9(3): 25-28.
王云新, 王大勇, 赵洁, 等. 基于无透镜数字全息成像的活体细胞培养状态无损监测[J]. *中国光学快报*, 2011, 9(3): 25-28.
- [45] Pushkarsky I, Liu Y, Weaver W, *et al.* Automated single-cell motility analysis on a chip using lensfree microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4717.
- [46] Liu Y F, Zhang W B, Xu T X, *et al.* Study on in-line incoherent digital holographic microscopy in reflection configuration[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2016, 43(11): 1109002.
刘亚飞, 张文斌, 许天旭, 等. 反射式同轴非相干数字全息显微成像系统研究[J]. *中国激光*, 2016, 43(11): 1109002.
- [47] Granero L, Micó V, Zalevsky Z, *et al.* Superresolution imaging method using phase-shifting digital lensless Fourier holography[J]. *Optics Express*, 2009, 17(17): 15008-150022.

- [48] Huang B, Bates M, Zhuang X. Super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(1): 993-1016.
- [49] Schroder G F, Levitt M, Brunger A T. Super-resolution biomolecular crystallography with low-resolution data[J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1218-1222.
- [50] Chen J, Gao H B, Wang W G, *et al.* Methods and applications of image super-resolution restoration[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2015, 52(2): 020004.
陈健, 高慧斌, 王伟国, 等. 图像超分辨率复原方法及应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2015, 52(2): 020004.
- [51] Polascik T J, Oesterling J E, Partin A W. Prostate specific antigen: a decade of discovery—what we have learned and where are we going: a review article[J]. *Journal of Urology*, 1999, 162(2): 293-306.
- [52] Mailleux A A, Michael O, Brugge J S. Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis: insights from in vitro and in vivo models[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(1): 57-62.
- [53] Dolega M E, Allier C, Kesavan S V, *et al.* Label-free analysis of prostate acini-like 3D structures by lensfree imaging[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49(45):176-183.
- [54] An J, Li P J, Dietz R, *et al.* ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2009, 87(4): 401-410.
- [55] Sang B K, Bae H, Cha J M, *et al.* A cell-based biosensor for real-time detection of cardiotoxicity using lensfree imaging[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(10): 1801-1807.
- [56] Moon S, Keles H O, Ozcan A, *et al.* Integrating microfluidics and lensless imaging for point-of-care testing[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(11): 3208-3214.
- [57] Zhang X, Khimji I, Gurkan U A, *et al.* Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(15): 2535-2540.
- [58] Su T W, Xue L, Ozcan A. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(40): 16018-16022.
- [59] Allier C P, Hiernard G, Poher V, *et al.* Bacteria detection with thin wetting film lensless imaging[J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(3): 762-770.
- [60] Poher V, Allier C P, Coutard J G, *et al.* Lensfree in-line holographic detection of bacteria [C]. *European Conferences on Biomedical Optics*, 2011, 8086(15): 808619.
- [61] Van Der Veen S, Abee T. Bacterial SOS response: a food safety perspective [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(2): 136-142.
- [62] Daniel R, Almog R, Ron A, *et al.* Modeling and measurement of a whole-cell bioluminescent biosensor based on a single photon avalanche diode [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24(4): 882-887.
- [63] Tsai H F, Tsai Y C, Yagur-Kroll S, *et al.* Water pollutant monitoring by a whole cell array through lens-free detection on CCD[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(6): 1472-1480.
- [64] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy[J]. *Science*, 2015, 347(6221): 543-548.