

基于光强传输方程的双相机动态相位成像的视场校正

张璐¹, 汤其剑¹, 邓定南³, 陶明², 刘晓利^{1*}, 彭翔¹

¹深圳大学物理与光电工程学院, 广东 深圳 518060;

²深圳大学海洋生物资源与生态环境科学重点实验室, 广东 深圳 518060;

³嘉应学院物理与光信息科技学院, 广东 梅州 514000

摘要 在显微成像中, 基于光强传输方程的双相机动态相位成像是定量观测活细胞运动的一种有效方法。但是相机安装带来的误差使得两个相机的视场之间存在一定差异, 导致利用光强传输方程求解获取的相位不准确。为此, 提出了一种基于棋盘格标定的双相机图像校正方法, 以消除相机间视场的不匹配问题, 校正后的匹配精度可达到亚像素级, 大大提高了相位成像的正确率。首先对标准微透镜阵列进行定量成像测量, 验证所提方法的准确性和可行性, 再对游动的雨生红球藻细胞进行动态相位成像, 成像结果表明该方法在动态生物成像领域具有一定的应用前景。

关键词 测量; 相位恢复; 视场校正; 动态成像; 光强传输方程

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201946.0804005

Field-of-View Correction for Dual-Camera Dynamic Phase Imaging Based on Transport of Intensity Equation

Zhang Lu¹, Tang Qijian¹, Deng Dingnan³, Tao Ming², Liu Xiaoli^{1*}, Peng Xiang¹

¹College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China;

²Key Laboratory of Marine Bioresource and Eco-Environmental Science, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China;

³School of Physics and Optical Information Sciences, Jiaying University, Meizhou, Guangdong 514000, China

Abstract In microscopic imaging, dual-camera dynamic phase imaging based on the transport of intensity equation (TIE) is an effective method for the quantitative observation of phase imaging of living cells. However, camera installation errors cause the difference in field-of-views of two cameras. Consequently, the phase obtained using TIE is inaccurate. This study proposes a correction method based on checkerboard calibration to eliminate the mismatch with the sub-pixel aligning accuracy. The feasibility and accuracy of the proposed method are verified by quantitatively imaging measurement for a standard microlens array. The dynamic phase imaging of the living *Haematococcus pluvialis* cells is successfully realized, indicating that the method has the potential for wide applications in the field of dynamic bio-microscopy imaging.

Key words measurement; phase recovery; field-of-view correction; dynamic imaging; transport of intensity equation

OCIS codes 120.5050; 110.1758; 100.2000

1 引 言

光强传输方程(TIE)在 1983 年首次被提出^[1],

它是一种定量恢复相位的非干涉相位成像方法, 由亥姆霍兹方程在傍轴近似条件下推导得出。该方法无需干涉, 受噪声影响小, 且无需复杂的光路结构和

收稿日期: 2019-03-07; 修回日期: 2019-04-04; 录用日期: 2019-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(61875137, 61701321)

* E-mail: lxl@szu.edu.cn

相位展开计算。光强传输方程通过移动 CCD 来获取与光轴垂直的平面上的光强变化,但是该移动操作会引入额外的误差,并会降低采集速度。为了提高采集速度,避免图像采集过程中的机械移动,有诸多基于光强传输方程的动态定量相位成像方法被提出,如:通过色差和颜色通道复用实现单次曝光获得离焦图的方法^[2];利用空间光调制器、变形光栅或 Retroreflector 等特殊光学器件实现单次曝光获得离焦图的方法^[3-7];利用体全息显微术实现单次曝光获得离焦图的方法^[8];在显微镜双目镜筒处安装双相机实现单次曝光,进而获得离焦图的方法^[9];利用流式细胞仪实现自动离焦的方法^[10]。其中,利用目镜双相机的方法具有结构简单紧凑和成本低的特点,可以在不丢失空间分辨率的情况下同时获得负离焦和正离焦图像,但是由于两个相机的安装误差及目镜加工误差,两相机采集到的图像视场不完全匹配。为此,基于相位相关的数字视场校正方法^[11-12]被提出,用以补偿负离焦和正离焦图像之间的缩放、旋转和平移变换。

本文提出了一种改进的双相机视场校正方法,利用标准棋盘格作为标定基准,双相机分别采集棋盘格的负离焦和正离焦图像,提取图像中的棋盘格角点作为对应点,采用最小二乘优化求解对应点间的单应矩阵,用该矩阵表示两相机视场之间的变换关系。利用该单应矩阵校正图像可以实现视场的亚像素匹配,保证光强传输方程相位成像系统的精度。实验用标准微透镜阵列对测量精度进行验证,并用雨生红球藻细胞来验证动态生物相位成像的有效性。

2 基本原理

2.1 光强传输方程

光强传输方程表示光轴方向上光强的变化量与光轴垂直平面上光波相位之间的关系,即

$$-k \frac{\partial I(x, y)}{\partial z} = \nabla_{\perp} \cdot [I(x, y) \nabla_{\perp} \varphi(x, y)], \quad (1)$$

式中: k 为波数,且 $k=2\pi/\lambda$, λ 为光波的波长; $I(x, y)$ 为垂直于光轴方向上聚焦处的光强; ∇_{\perp} 为二维梯度算子; z 为传输方向; $\varphi(x, y)$ 为物体的相位分布。

为了求解这个二阶椭圆偏微分方程,引入一个辅助函数 ψ ,其表达式为

$$\nabla \psi(x, y) = I(x, y) \nabla_{\perp} \varphi(x, y), \quad (2)$$

将(2)式代入(1)式可将光强传输方程转换为泊松方程:

$$-k \frac{\partial I(x, y)}{\partial z} = \nabla_{\perp} \psi^2(x, y), \quad (3)$$

其中,

$$\nabla_{\perp} \psi^2(x, y) = \nabla \cdot [I(x, y)^{-1} \nabla \psi(x, y)]. \quad (4)$$

若已知光强沿轴向的微分,则利用傅里叶变换法求解泊松方程可得相位 $\varphi(x, y)$ ^[13-15],通常用沿光轴方向采集两幅正负离焦的光强图像作数值差分来近似代替光强沿轴向的微分。

2.2 视场校正

图 1 是实现基于光强传输方程的双相机动态相位成像系统的原理。物光经过物镜和中继镜组,通过分束镜分束后的两束光由不同的镜面反射,最终分别到达目镜筒,因两束光所走的光程是一样的,所以双相机可同时采集聚焦图像。通过在目镜筒与相机之间安装固定尺寸的铜环可实现离焦。

用图 1 所示的系统对棋盘格成像后,利用外部硬件触发双相机同步单帧采集负离焦和正离焦图像,结果如图 2 所示。由此可看出,两个相机采集到的图像的视场不完全一致,这种不一致会严重影响光强传输方程相位恢复的准确度,因此需要对其中一个相机获得的视场图像进行校正。

为求取视场的变换关系,利用 Harris 算子提取图 2 中负离焦图像和正离焦图像中的角点(黑色和白色格子顶点相交的位置),并将提取的角点作为不同视场下对应的特征点。Harris 算子提取角点位置的准确程度可以达到亚像素级别^[16]。

在计算机视觉中,平面的单应性变换定义为从一个平面到另一个平面的投影映射,因此,本文将正离焦图像平面上的角点对应到负离焦图像平面上的角点的映射关系用单应矩阵 \mathbf{H} 来表示, $\mathbf{H} =$

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{bmatrix}。将 a_{33} 归一化为 1 后, \mathbf{H} 有 8 个$$

未知量。为了求 \mathbf{H} ,至少需要 4 对对应角点。

在齐次坐标系下,将 $\mathbf{X}_i^{(1)} = \begin{bmatrix} x_i^{(1)} \\ y_i^{(1)} \\ 1 \end{bmatrix}$ 记为负离焦

图像中角点的坐标位置, $\mathbf{X}_i^{(2)} = \begin{bmatrix} x_i^{(2)} \\ y_i^{(2)} \\ 1 \end{bmatrix}$ 记为正离焦

图像中对应负离焦图像的角点的坐标位置。其中, $i=1, 2, \dots, N$, N 为角点的数目。

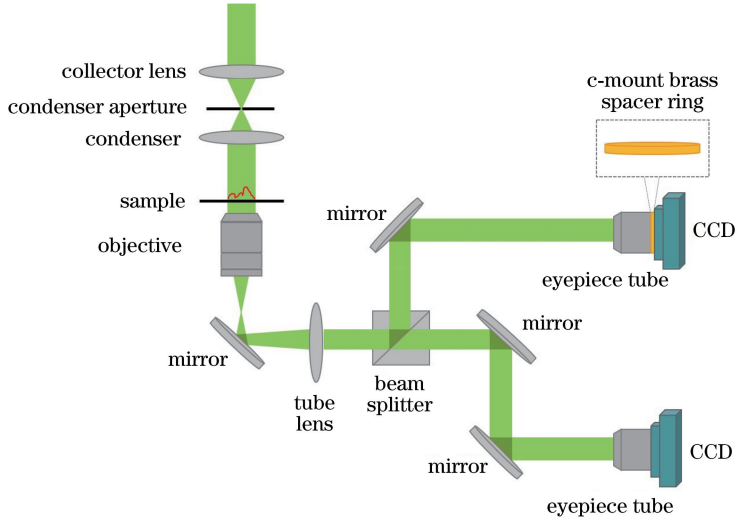


图 1 基于光强传输方程的双相机动态相位成像系统原理

Fig. 1 System schematic of dual-camera dynamic phase imaging system based on TIE

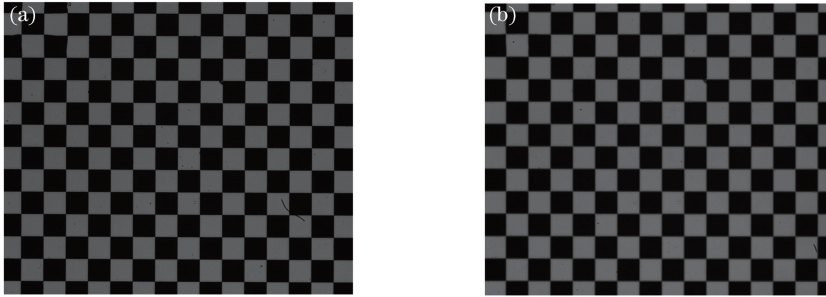


图 2 棋盘格的负离焦图和正离焦图。(a)负离焦图；(b)正离焦图

Fig. 2 Under focus and over focus images of checkerboard. (a) Under focus image; (b) over focus image

通常情况下,实验采集的角点数目大于 4。通过最小化一个误差函数 E 来求解单应矩阵 \mathbf{H} ,即

$$\min E(\mathbf{H}) = \min \sum_{i=1}^N \|\mathbf{X}_i^{(1)} - \mathbf{H}\mathbf{X}_i^{(2)}\|^2. \quad (5)$$

(5)式可以使用奇异值分解(SVD)求解^[17]。

用求得的单应矩阵对正离焦图像进行变换。由于正离焦图像中整像素点的坐标经过变换后会出现在亚像素位置点,为避免误差,该点的灰度大小可用双线性插值方法计算,其主要思想是通过该亚像素点周围的 4 个整像素点对应的灰度值来计算亚像素点处的灰度值。假设亚像素点位置为 (x, y) ,其周围 4 个整像素点位置为 (x_1, y_1) 、 (x_1, y_2) 、 (x_2, y_1) 、 (x_2, y_2) ,对应的灰度值分别为 $f(x_1, y_1)$ 、 $f(x_1, y_2)$ 、 $f(x_2, y_1)$ 、 $f(x_2, y_2)$,则亚像素点处的灰度值 $f(x, y)$ 可表示为

$$f(x, y) \approx \frac{f(x_1, y_1)}{(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)}(x_2 - x)(y_2 - y) + \frac{f(x_2, y_1)}{(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)}(x - x_1)(y_2 - y) +$$

$$\frac{f(x_1, y_2)}{(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)}(x_2 - x)(y - y_1) + \frac{f(x_2, y_2)}{(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)}(x - x_1)(y - y_1). \quad (6)$$

经过提取角点、计算单应矩阵、变换图像视场、双线性插值等操作后,实现了基于光强传输方程的双相机动态成像系统的数字视场校正,且校正后图像的匹配精度可以达亚像素级。

3 实验与分析

采用图 3 所示装置进行实验。显微系统为 Olympus IX73 倒置显微系统,物镜为 Olympus 10×0.3NA (NA 为数值孔径),照明光源为卤钨灯白光经中性滤波片(中心波长 550 nm,带宽 45 nm)后产生的准单色光。两个相机(Basler piA2400-17gm,分辨率为 2456 pixel×2058 pixel,像元大小为 3.45 μm)分别安装在显微目镜筒上,将固定高度的 c 接口黄铜隔圈(Edmund Optics)安装在相机与目镜筒之间,实现正负 1 mm 的离焦。图 4 给出了

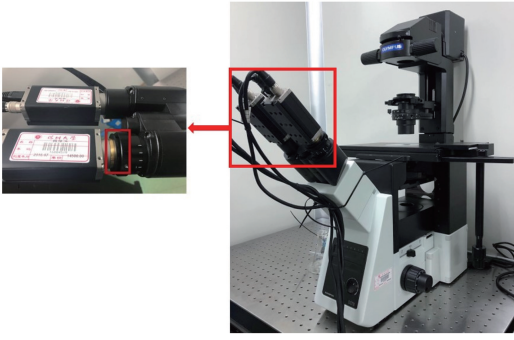


图 3 基于光强传输的双相机动态相位成像系统实验装置

Fig. 3 Experimental device of dual-camera dynamic phase imaging system based on TIE

用定制的棋盘格(单个格子的尺寸为 $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$)

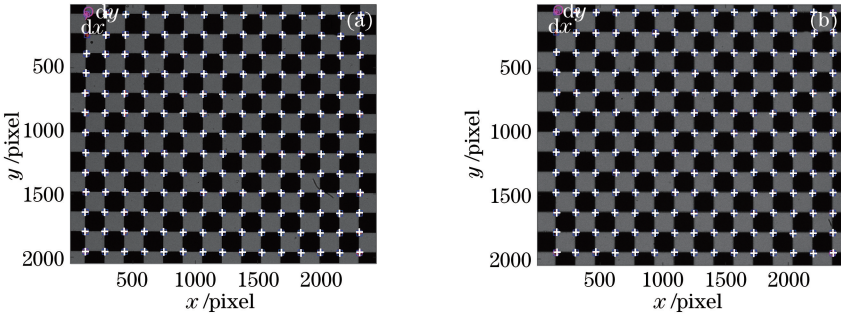


图 4 棋盘格负离焦和正离焦图像中角点的位置。(a) 负离焦图像中的角点位置;(b) 正离焦图像中的角点位置

Fig. 4 Corner points of under focus and over focus images. (a) Corner points of under focus image; (b) corner points of over focus image

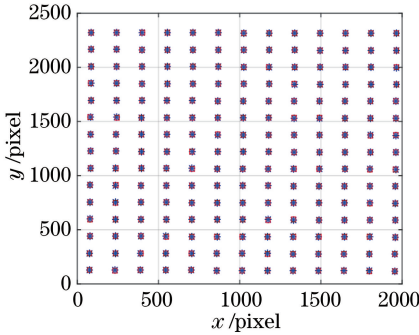


图 5 变换到同一坐标系下的对应角点

Fig. 5 Corresponding corner points transformed in the same coordinate system

提取角点的结果,图中的“+”表示角点的位置,图 4(a)表示棋盘格负离焦图像中角点的位置,图 4(b)表示棋盘格正离焦图像中角点的位置。

利用(5)式获得的单应矩阵 H 为

$$H = \begin{bmatrix} 1.0056 & 0.0032 & 21.9366 \\ -0.0031 & 1.0051 & -16.5436 \\ 1.6614 \times 10^{-7} & -3.0174 \times 10^{-8} & 1 \end{bmatrix}. \quad (7)$$

根据 H 将正离焦图像的角点位置变换到与负离焦图像相同的坐标系中,图 5 表示两组对应角点在同一坐标系中的一致程度,计算可得两者的相对均方根误差为 0.8681 pixel。

为测试所提方法重建相位的准确性,测量一个已知尺寸的微透镜阵列(SUSS MicroOptics),测量结果如图 6 所示。

图 6(a)和图 6(b)为该系系统单帧同步采集获得的负离焦图像和正离焦图像,图 6(c)为采用本文方法校正后的正离焦图像。根据校正的正离焦图像和负离焦图像,利用光强传输方程可求解得到微透镜阵列的相位信息,进而根据(8)式计算出微透镜的高度分布,即

$$h = \frac{\lambda}{n_m - n} \frac{\varphi(x, y)}{2\pi}, \quad (8)$$

式中: n 为周围介质的折射率,在实验中介质为空气

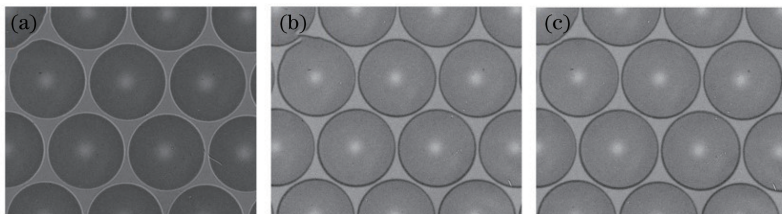


图 6 微透镜阵列图。(a) 负离焦图像;(b) 正离焦图像;(c) 校正后的正离焦图像

Fig. 6 Micro-lens array images. (a) Under focus image; (b) over focus image; (c) corrected over focus image

气,所以 $n = 1$; n_m 为微透镜阵列的折射率, $n_m = 1.458$ 。计算得到的高度分布如图 7(a)所示,从单个微透镜最高处截下的截面轮廓与真实截面轮廓的高度分布对比如图 7(b)所示,计算所得截面最高处的高度 $h = 22.9 \mu\text{m}$,利用(8)式可计算得到微透镜的曲率半径 R_{oc} ,表达式为

$$R_{oc} = \frac{h}{2} + \frac{D^2}{8h}, \quad (9)$$

式中: D 为微透镜的直径, $D = 246 \mu\text{m}$ 。根据(9)式计算得到单个微透镜的曲率半径为 $342.6 \mu\text{m}$,而厂家参考值为 $(350 \pm 17.5) \mu\text{m}$ 。可见,采用本文方法校正后的图像可正确恢复出相位信息。

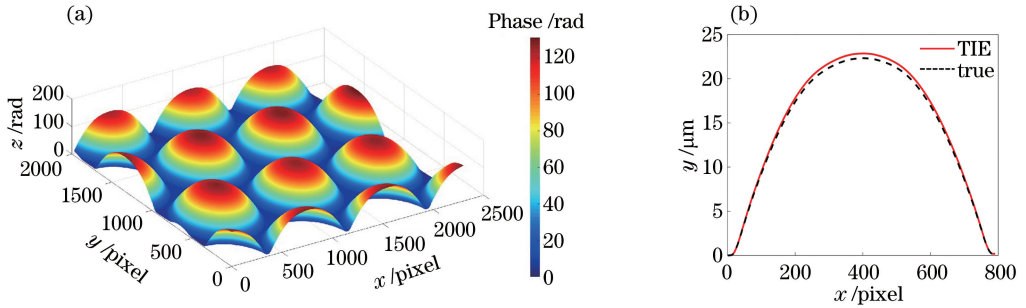


图 7 微透镜阵列。(a)本文方法恢复的微透镜阵列 3D 形貌;(b)单个微透镜的真实截面轮廓与计算所得截面轮廓
Fig. 7 Micro-lens array. (a) 3D morphology of micro-lens array recovered by proposed method;
(b) true and calculated section profiles of single micro-lens

利用本文方法对雨生红球藻细胞的游动实现动态成像。雨生红球藻细胞是产生天然抗氧化物虾青素的最好生物之一,怎样利用雨生红球藻细胞更好更多地生产虾青素是相关领域的研究热点。在室温 $26 \text{ }^\circ\text{C}$ 的环境下观察藻细胞在生理盐水中的游动状态,采用物镜为 Olympus $20 \times 0.4\text{NA}$ 的双相机快速采集单个藻细胞在 200 ms 内运动的图像序列。图 8 为抽取的不同时刻下藻细胞的形态变化,结果显示,具有鞭毛的藻细胞在不停地游动,且每一时刻藻细胞

的相位分布都不同,本文方法可以定量观测到游动阶段的藻细胞轮廓形态的变化。根据(8)式可知相位变化与体积变化有直接关系,当藻细胞开始积累虾青素时,其体积会变大,且藻细胞的生长环境(高盐度、高光强、营养枯竭等)变化会影响虾青素的产量,通过定量动态探测相位的变化就可以分析外界环境变化对虾青素产量的影响。因此,利用基于光强传输方程的双相机动态相位成像系统探究雨生红球藻细胞的相位信息具有一定的研究意义和应用前景。

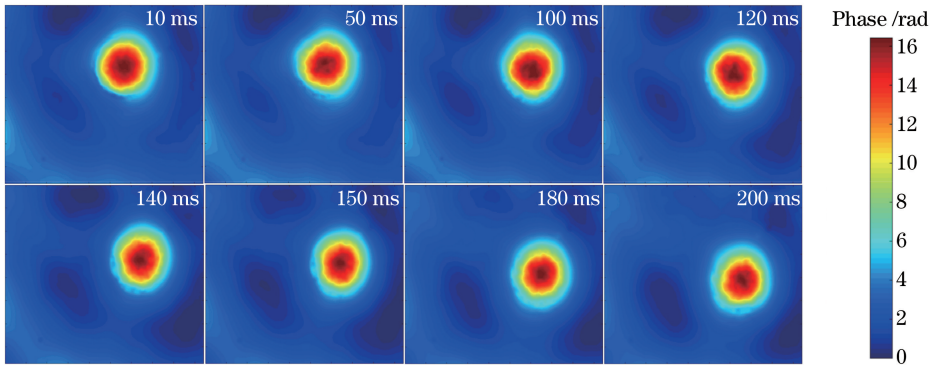


图 8 不同时刻雨生红球藻细胞的形态
Fig. 8 Morphologies of *Haematococcus pluvialis* cell at different time

4 结 论

针对基于光强传输方程的双相机动态相位成像中双相机视场不一致的问题,提出了一种基于单应矩阵的视场校正方法,该方法能够将正离焦图像的视场变换到与负离焦图像的视场,精度可达到亚像素级

别。标准件微透镜阵列和雨生红球藻细胞的准确定量成像表明了该方法是一种有效、动态的定量相位成像方法,通过获得雨生红球藻细胞的相位信息可以定量研究藻细胞内虾青素含量的变化情况,这将对雨生红球藻细胞的相关研究提供一定帮助,也表明本文方法在生物显微成像领域具有一定的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Teague M R. Deterministic phase retrieval: a Green's function solution[J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1983, 73(11): 1434-1441.
- [2] Waller L, Kou S S, Sheppard C J R, *et al.* Phase from chromatic aberrations [J]. *Optics Express*, 2010, 18(22): 22817-22825.
- [3] Zuo C, Chen Q, Qu W J, *et al.* Noninterferometric single-shot quantitative phase microscopy[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(18): 3538-3541.
- [4] Zuo C, Chen Q, Qu W J, *et al.* High-speed transport-of-intensity phase microscopy with an electrically tunable lens [J]. *Optics Express*, 2013, 21(20): 24060-24075.
- [5] Blanchard P M, Greenaway A H. Simultaneous multiplane imaging with a distorted diffraction grating[J]. *Applied Optics*, 1999, 38(32): 6692-6699.
- [6] Li Y, Di J L, Ma C J, *et al.* Quantitative phase microscopy for cellular dynamics based on transport of intensity equation [J]. *Optics Express*, 2018, 26(1): 586-593.
- [7] Yu W, Tian X L, He X L, *et al.* Real time quantitative phase microscopy based on single-shot transport of intensity equation (ssTIE) method [J]. *Applied Physics Letters*, 2016, 109(7): 071112.
- [8] Waller L, Luo Y, Yang S Y, *et al.* Transport of intensity phase imaging in a volume holographic microscope[J]. *Optics Letters*, 2010, 35(17): 2961-2963.
- [9] Tian X L, Yu W, Meng X, *et al.* Real-time quantitative phase imaging based on transport of intensity equation with dual simultaneously recorded field of view[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(7): 1427-1430.
- [10] Gorthi S S, Schonbrun E. Phase imaging flow cytometry using a focus-stack collecting microscope [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(4): 707-709.
- [11] Gong Q T, Wei Q, Xu J, *et al.* Digital field of view correction combined dual-view transport of intensity equation method for real-time quantitative imaging [J]. *Optical Engineering*, 2018, 57(6): 063102.
- [12] Hu J B, Kong Y, Jiang Z L, *et al.* Adaptive dual-exposure fusion-based transport of intensity phase microscopy [J]. *Applied Optics*, 2018, 57(25): 7249-7258.
- [13] Ichikawa K, Lohmann A W, Takeda M. Phase retrieval based on the irradiance transport equation and the Fourier transform method: experiments [J]. *Applied Optics*, 1988, 27(16): 3433-3436.
- [14] Zuo C, Chen Q, Sun J S, *et al.* Non-interferometric phase retrieval and quantitative phase microscopy based on transport of intensity equation: a review [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2016, 43(6): 0609002.
左超, 陈钱, 孙佳嵩, 等. 基于光强传输方程的非干涉相位恢复与定量相位显微成像: 文献综述与最新进展 [J]. *中国激光*, 2016, 43(6): 0609002.
- [15] Guo Y M, Zhang F, Song Q, *et al.* Application of hybrid iterative algorithm in TIE phase retrieval with large defocusing distance [J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(9): 0912001.
郭怡明, 张方, 宋强, 等. 一种混合迭代算法在大离焦距离 TIE 相位恢复中的应用 [J]. *光学学报*, 2016, 36(9): 0912001.
- [16] Harris C, Stephens M. A combined corner and edge detector [C] // *Proceedings of the 4th Alvey Vision Conference*, August 31-September, 1988, Alvey, UK. Manchester: University of Manchester, 1988: 147-151.
- [17] Shapiro J H, Stockman G C. *Computer vision* [M]. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2001: 357-402.