

## 一种大视野快速光学衍射层析成像技术

魏婉雪<sup>1,2</sup>, 何苗<sup>3</sup>, 徐坚<sup>1,2</sup>, 董大山<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>北京大学物理学院人工微结构和介观物理国家重点实验室, 北京 100871;<sup>2</sup>山西大学极端光学协同创新中心, 山西 太原 030006;<sup>3</sup>北京大学医学部医学技术研究院, 北京 100871

**摘要** 光学衍射层析成像技术是一种新兴的对细胞和组织进行非侵入、无创伤、无标记快速三维成像的技术,在细胞代谢、病理和肿瘤诊断等方面都有很大的应用前景。传统的光学衍射层析成像技术视场范围较小,视野内仅有单个或数个细胞,难以直接观察到细胞间的相互作用,无法对散射较强的厚、大细胞进行成像,这在一定程度上限制了其进一步应用。针对视场范围较小的不足,提出了一种用满采集物镜的视场数的大视野光学衍射层析成像技术,可以获得更高的散射光子通量,提高成像质量,减弱伪影、振铃等边缘效应,视野内可以观测到多种状态的细胞和细胞间相互作用。结果表明,大视野光学衍射层析成像技术在兼具亚细胞分辨率和无标记活细胞长时程三维观测能力的同时,具有更大的视野、更小的边缘效应,生物应用前景更加广泛。

**关键词** 生物光学; 光学显微成像; 光学衍射层析成像; 大视野

**中图分类号** O436 **文献标志码** A

**DOI:** 10.3788/CJL221373

## 1 引言

细胞是生物体结构和功能的基本单元,所有的生命活动都离不开细胞。细胞成像,尤其是活细胞成像,是当前细胞生物学的核心手段之一。由于活细胞光学透明的特性,唯有光学显微镜可以实现对活细胞的非侵入成像<sup>[1]</sup>。也正因为活细胞无色,传统的显微镜对其成像的对比度差、分辨率低、观察亚细胞尺度的生物活动较为困难<sup>[2]</sup>。荧光成像技术的出现极大地提高了细胞成像的对比度<sup>[3-6]</sup>,尤其是超分辨荧光显微镜<sup>[7-10]</sup>,使得动态观察细胞器活动成为了可能。然而,荧光成像需要外源标记,难以对多种细胞器全景式成像,甚至可能损伤细胞;染料分子的光漂白效应也使得荧光成像难以对活细胞进行长时程观测。这些缺陷阻碍了荧光成像对活细胞进行长时程高速成像。

细胞内不同的细胞器表现出不同的折射率<sup>[11-12]</sup>,折射率本身就是一种天然的“造影剂”。入射光的波前通过细胞时,由于细胞内部不同的折射率产生相位畸变,这些畸变蕴含着细胞的折射率信息,对畸变进行探测和分析便可对细胞进行无标记成像。传统的相衬显微镜和微分干涉显微镜将样品的折射率信息转化为图像对比度,但这种方法难以对折射率进行定量的表征。进入 21 世纪以来,以数字全息技术为代表的定量相位

成像技术<sup>[13-16]</sup>逐渐开始发挥重要作用,但定量相位成像技术大多针对薄样品,且无法对细胞进行三维观测。近年来,人们将计算层析技术<sup>[17]</sup>与定量相位成像技术结合,提出了各种类型的光学衍射层析成像(ODT)技术<sup>[18]</sup>,将定量相位成像扩展到三维折射率分布的测定<sup>[18-22]</sup>。ODT 通过数字全息显微记录多个不同角度照明下样品散射光场的复振幅信息,实现对空间频域连续采样,最终基于逆散射算法重建出物体的三维折射率分布。

由于其非侵入、无标记、超分辨、长时程三维成像等特点<sup>[23-24]</sup>,ODT 已应用于对有丝分裂<sup>[20]</sup>、神经元树突小棘<sup>[23]</sup>、被疟原虫感染的红细胞<sup>[25]</sup>、活体内的大肠杆菌<sup>[26]</sup>等多种活细胞及细胞尺度的生物活动进行三维观测。然而,对密集生长的胚胎细胞的观测、对比常规细胞更大的鼠或人卵母细胞的研究、对细胞与细胞之间相互作用的动态研究,在保持亚细胞尺度分辨率的同时,要求较大的视野(FOV)。当前各种定量相位成像技术往往要求较高的空间带宽积<sup>[27]</sup>,如离轴全息成像中条纹采集需要强度成像三倍以上的采样率,在相机像素数量一定的情况下,只能采集较小的视野。要进行大视野的定量相位成像,单张图像像素数目倍增,成像数据通量过大,使得图像采集、存储更加困难,解算算法复杂度加剧,增加后续解算时间。实现大视野的

收稿日期: 2022-10-31; 修回日期: 2022-11-21; 录用日期: 2022-11-25; 网络首发日期: 2023-01-04

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0712500, 2022YFC3401103)、国家自然科学基金(12004013, 92150301)、中国博士后科学基金(2020M680220, 2021M700207)、北京大学临床医学+X 青年专项、中央高校基本科研业务费(7100603969)

通信作者: \*dongdasha@pku.edu.cn

常规方法是分区域依次扫描后拼接<sup>[28-29]</sup>,但由于活细胞不断运动的特性,该方法不适合用于活细胞样品。

针对活细胞大视野三维高分辨长时程成像的问题,本文提出一种可以用满物镜视场数的大视野 ODT 成像方法,解决了传统 ODT 的 FOV 仅有 40~80  $\mu\text{m}$ , 只用到物镜 1/5~1/3 满野的问题。首先采用 5  $\mu\text{m}$  的聚苯乙烯微球验证了方法的可行性,然后采用该系统对 HeLa 细胞进行成像,验证了该方法对较密集的组织细胞和活细胞具有三维长时程观测能力。实验结果表明,相较于传统的 ODT 技术,本文提出的 ODT 系统可以将对活细胞成像的范围扩大至原来的 3 倍,同时兼具亚细胞的分辨率和三维长时程成像能力,可以获得样品更全面的信息,在一个视野内直接研究多个细胞间的相互作用,在临床研究中具有重要的应用价值。

## 2 原理与方法

### 2.1 实验原理

ODT 是一种从一组全息图中获取物体的振幅和相位,将不同照明角度下的复振幅在频域进行层析叠加,得到物体的三维频谱信息,最终转化到空域得到物体的三维折射率的技术。由于样品体积内折射率的不均匀分布,穿过生物样品的光会产生散射。在衍射光学中,折射率的空间分布  $n(\mathbf{r})$  可以定量地与散射势  $f(\mathbf{r})$  相关,经过样品散射后的光场由非均匀介质中的 Helmholtz 方程描述:

$$(\nabla^2 + k_m^2)u(\mathbf{r}) = -4\pi f(\mathbf{r})u(\mathbf{r}), \quad (1)$$

式中:  $u(\mathbf{r})$  为光场的分布;  $f(\mathbf{r}) = \frac{k_m^2}{4\pi} \left\{ \left[ \frac{n(\mathbf{r})}{n_m} \right]^2 - 1 \right\}$  称

作散射势,与折射率分布直接相关;介质置于折射率为  $n_m$  的环境中,  $\epsilon_n(\mathbf{r})$  为介质折射率对环境折射率的变

化,  $\lambda$  为真空中的波长,则  $k_m = \frac{2\pi n_m}{\lambda}$ ,  $n(\mathbf{r}) = n_m + \epsilon_n(\mathbf{r})$ 。

对于式(1)所示的非齐次方程,可以使用格林函数来求解:

$$(\nabla^2 + k_m^2)G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = -4\pi\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'), \quad (2)$$

式中:  $G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \frac{e^{ik_m|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}$  为求解非均匀介质下

Helmholtz 方程所定义的标量格林函数;  $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$  为狄拉克函数。

考虑狄拉克函数的平移性再代入式(1),可得薛定谔方程:

$$u(\mathbf{r}) = \int G(\mathbf{r} - \mathbf{r}')f(\mathbf{r}')u(\mathbf{r}')d^3\mathbf{r}'. \quad (3)$$

式(3)代表光场的精确解,但无法直接求得,需要通过适当的近似来求出光场的解。因此可以先将光场  $u(\mathbf{r})$  分解为两个部分,由入射平面波  $u_0(\mathbf{r})$  和散射成分  $u_s(\mathbf{r})$  叠加而成,即  $u(\mathbf{r}) = u_0(\mathbf{r}) + u_s(\mathbf{r})$ 。

通常使用两种近似求解式(1)中的散射场: Born 近似<sup>[30-31]</sup>和 Rytov 近似<sup>[19]</sup>。当散射场远远小于入射场  $u_0(\mathbf{r}) \gg u_s(\mathbf{r})$ , 相位变化小于  $2\pi$  时<sup>[31]</sup>时, Born 近似是可取的;而 Rytov 近似的有效性与样品引入的相位变化无关,仅由局域的折射率变化量限制了相位梯度的上限<sup>[32]</sup>,因此 Rytov 近似比 Born 近似更适于细胞成像。本文所采用的近似方法是 Rytov 近似。该近似下光场由复相位表示,即  $u(\mathbf{r}) = e^{\varphi(\mathbf{r})}$ ,  $\varphi(\mathbf{r}) = \ln[A(\mathbf{r})] + i\phi(\mathbf{r})$ , 其中  $A(\mathbf{r})$  为振幅,  $\phi(\mathbf{r})$  为相位分布。将上述定义代入式(1),可得:

$$(\nabla^2 + k_m^2)u_0(\mathbf{r})\varphi_s(\mathbf{r}) = -u_0(\mathbf{r}) \left\{ [\nabla\varphi_s(\mathbf{r})]^2 + 4\pi f(\mathbf{r}) \right\}. \quad (4)$$

此时, Rytov 近似下散射场复振幅可以表示为

$$\varphi_R(\mathbf{r}) = \ln \frac{u_R(\mathbf{r}) + u_0(\mathbf{r})}{u_0(\mathbf{r})} = \ln \frac{u(\mathbf{r})}{u_0(\mathbf{r})} = \ln \frac{a(\mathbf{r})}{a_0(\mathbf{r})} + i \cdot [\phi(\mathbf{r}) - \phi_0(\mathbf{r})]. \quad (5)$$

由于 Rytov 近似需要满足  $|\nabla\varphi_s(\mathbf{r})|^2 \ll 4\pi f(\mathbf{r})$ , 同样忽略光透明样品的振幅调制,即  $\varphi_s(\mathbf{r}) = i\phi(\mathbf{r})$ , 可得 Rytov 近似条件为  $|\nabla\varphi_s(\mathbf{r})|/2\pi \ll \left( \sqrt{2n_m|\Delta n(\mathbf{r})|/\lambda} \right) \cdot |\mathbf{dr}|$ 。此时式(4)可化为

$$(\nabla^2 + k_m^2)u_0(\mathbf{r})\varphi_R(\mathbf{r}) = -u_0(\mathbf{r}) \cdot 4\pi f(\mathbf{r}). \quad (6)$$

由此可知 Rytov 近似下的样品相位变化梯度仅与样品局部折射率变化有关,不同于 Born 近似还与样品厚度有关<sup>[33]</sup>。对比可知 Rytov 近似条件更宽松,更适于对活细胞成像<sup>[34-35]</sup>。

根据式(5)可得,实际实验中仅需测两组数据,即包含样品的总光场和不包含样品的背景光,将解算全息所得的振幅和解缠绕所得的相位代入其中就可以得到散射光场的散射势,进而得到样品的三维折射率分布。

Rytov 近似下,对式(6)左右两边同时进行傅里叶

变换,可推得在 Rytov 近似下的傅里叶衍射定理为:

$$F(K_x, K_y, K_z) = 2ik_z U_{z=z_0}(K_x, K_y) e^{i(k_{0z} - k_z)z_0}, \quad (7)$$

式中:  $K_x = k_x - k_{0x}$ ;  $K_y = k_y - k_{0y}$ ;  $K_z = k_z - k_{0z}$ ;  $k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 = k_m^2$ ;  $k_{0x}^2 + k_{0y}^2 + k_{0z}^2 = k_m^2$ ;  $F(K_x, K_y, K_z)$  是 Rytov 近似下散射势的三维傅里叶变换;  $U_{z=z_0}(K_x, K_y)$  为收集的二维散射场  $\varphi_R(\mathbf{r})$  的傅里叶变换;  $K_x, K_y, K_z$  是散射势的空间频谱分量;  $k_x, k_y$  和  $k_z = \sqrt{k_0^2 - k_x^2 - k_y^2}$  是测量的散射光场的波矢量;  $(k_{0x}, k_{0y}, k_{0z})$  是入射平面波的波矢量。

在实际测量中,需要考虑到成像系统的低通滤波特性,因此在第  $j$  个照明角度下测量得到的散射势的空间频谱分量  $F_{\text{measure}}(K_x^j, K_y^j, K_z^j)$  为实际的空间频谱分量  $F_{\text{real}}(K_x^j, K_y^j, K_z^j)$  乘上复相干传递函数(CTF)滤波而得。

Rytov 近似下二维散射场的每次测量都可以映射

到傅里叶域中的 Ewald 球面上,对于不同的入射场方向,此球面会沿着  $-k_m \mathbf{s}_0 = (-k_{0x}, -k_{0y}, -k_{0z})$  平移,形成经过原点的 Ewald 球盖。因此,通过记录不同入射方向  $\mathbf{s}_0$  下的散射场,不同方向的 Ewald 球盖可以实现对散射势的傅里叶变换  $F(K_x, K_y, K_z)$  最大截止频率为  $-k_m \mathbf{s}_0 = (-k_{0x}, -k_{0y}, -k_{0z})$  的连续频率采样。

$$f(\mathbf{r}) = F^{-1} \left[ \frac{\sum_j 2i(K_z^j + k_{0z}^j) U_{\text{Rytov}}^j(K_x^j, K_y^j, K_z^j) C(K_x^j + k_{0x}^j, K_y^j + k_{0y}^j, K_z^j + k_{0z}^j)}{\sum_j |C(K_x^j + k_{0x}^j, K_y^j + k_{0y}^j, K_z^j + k_{0z}^j)|^2 + \alpha^2} \right], \quad (8)$$

式中:  $U_{\text{Rytov}}^j(K_x^j, K_y^j, K_z^j)$  为二维散射场在三维空间频域中重构的场;  $C(K_x^j + k_{0x}^j, K_y^j + k_{0y}^j, K_z^j + k_{0z}^j)$  为在第  $j$  个照明角度下三维频域中重构的 CTF;  $\alpha$  为校正伪影的 Wiener 滤波因子<sup>[36]</sup>。

### 2.2 大视野光学衍射层析显微成像系统设计

如 2.1 节所述,为了解算样品的三维折射率分布,需要采集样品的总光场和不包含样品的背景光光场两组数据。为得到两组全息光场,本文提出了一套大视野光学衍射层析显微成像系统,如图 1 所示。

为了保证全息图的相干性,采用波长 473 nm 的单纵模激光器作为离轴干涉系统的光源,其声光调制器(AOM)调制频率为 1 MHz,经调制后 +1 级衍射光过 1/2 波片后被偏振分束器(PBS)分为两路,并分别通过准直器耦合进入保偏单模光纤。一路作为信号光束照亮样品,另一路用作记录全息的参考光束。旋转 1/2 波片可以调节物光和参考光的分光比。参考光的保偏光纤比物光光纤长 1 m,用以补偿两边的光程差,使得物光和参考光可以同时到达相机。总体来说,本文系统可以分为三个模块:照明系统,样品放置系统,干涉系统。由于大视野的光斑尺寸明显大于传统 ODT 系统,本文成像系统重新设计,所用的振镜和光学元件均重新选型,以确保光路中不存在孔径限制。

在照明系统中,物光从光纤输出后,被双胶合透镜进行准直,后经过一对  $x$ - $y$  二轴扫描振镜,两者存在  $\pi/2$  的相移,从而实现物光对样品的圆形扫描。出振镜后物光被透镜  $L_1$  聚焦在照明浸水物镜(60 $\times$ , 数值孔径  $NA=1.0$ )的后焦面上,以实现不同角度的平行光照明。为了实现大视野,本文照明光路系统选择更小的放大率,使用了与之前系统不同孔径及焦距的透镜,实现了大  $NA$  下的大视野倾斜平面光照明。在样品放置系统中,为减少系统抖动对成像质量带来的影响,选择使用倒置显微镜镜架(舜宇光学)承载和移动样品,并设计定制满足本系统光斑需求的反射式滤色块模块以实现满视野的成像范围。

在干涉系统中,透过样品的物光被成像油浸式物镜(100 $\times$ ,  $NA=1.40$ )收集后,依次经过一个  $4f$  系统和准直透镜  $L_7$ 。同时参考光从光纤输出后,经过透镜准直后到偏振无关分光棱镜,与物光合束照射到相机。

最终通过对 Ewald 极限球内的频谱信息进行逆滤波,即可解算散射势  $f(\mathbf{r})$ ,即可得到折射率的三维分布  $n(\mathbf{r})$ 。

为了避免在频谱拼接过程中重复计算重叠频谱分量,我们在对所有照明角度进行积分之前添加了 Wiener 滤波的步骤:

物光和参考光存在一定的离轴角,摆放于透镜  $L_2$  焦面处的相机接收离轴全息条纹。在本模块,除系统放大率和干涉系统的光斑孔径是依据本文系统重新计算外,还在全息合束中采用了全新的光学设计。传统 ODT 系统为了避免合束时的多次反射问题,通常采用分束立方棱镜进行合束,会损失至少 50% 的光强,样品的散射光得不到充分利用;同时,对立方棱镜各个表面的平行度及镀膜有较高要求,以免反射光在相机上形成弱的干涉背景。若采用同样的方案进行大视野成像,合束需要的立方棱镜尺寸将大大增加,难以采购到满足要求的分束立方棱镜。本文提出了如图 1(b) 所示的无损瞳面全息合束方案,一方面使得参考光不再受分束立方棱镜尺寸大小的限制,满足大视野成像光斑尺寸的要求,另一方面可减少不必要的光子损耗,大大缩短系统的曝光时间。

值得注意的是,考虑到大视野 ODT 系统会带来庞

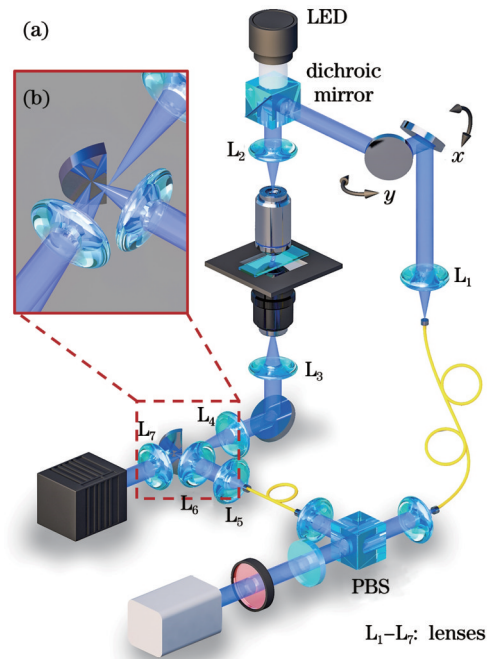


图 1 大视野光学衍射层析显微成像系统示意图。(a)成像系统方案设计图;(b)D形镜区域放大图  
Fig. 1 Schematic of large-FOV optical diffraction tomography microscopy. (a) Schematic of imaging system; (b) structure of D-shaped mirror

大的数据量,我们改进了系统的图像采集系统。本文换用了 2100 万像素 ( $2.1 \times 10^7$  pixel) 的高速相机,以实现大视野高速成像。其成像数据流量激增,数据采集量近 40 Gbit/s,传统的 USB 接口和 GIGE 接口传输速度分别约为 400 Mbit/s 和 800 Mbit/s,均不能满足系统的数据传输需求。本文对所需数据量进行理论计算后选取了传输速度更快的 CoaXPress-12 的数据采集卡(海康, Gsprint4521)和 GenTL 传输协议,其最高传输速度为 12.5 Gbit/s,系统使用四根传输线实现了 50 Gbit/s 的数据流量。

最后,本文还改进了数据处理程序,以适应大视野成像高通量数据处理。大视野 ODT 系统单组图像数据量为 7.6 GB,已超过 32 位系统 4 GB 的内存地址索引上限。本文对图像采集和存储软件进行了底层重构,以绕过第三方依赖库 32 位限制,实现高速图像采集存储。另外,针对单组数据量 15.2 GB(样品+背景)的三维重构,重新编写了一套基于 64 位系统的 C 语言多线程 ODT 恢复软件,可以对所有采集到的数据同步进行自动恢复处理,本文所采集的 100 个时间点 HeLa 细胞数据可在 70 min 内处理完毕,满足高通量活细胞成像需求。

### 2.3 大视场 ODT 的优势

本文所提出的 ODT 系统的成像范围为  $196 \mu\text{m} \times 196 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ ,用满了采集物镜的视场数。使用大视野 ODT 会带来以下优势。

一方面,大视野可减少三维重构产生的边缘伪影。对于视野边界附近的区域,旋转倾斜照明下只有一部分角度的散射光信号可以被收集到,而另一部分照明角度下的散射光则进入了相机以外的区域。逆散射过程中,这些光对应的散射源无法被正确重构,在边缘产生噪声和伪影。此外,逆散射重构算法中采用的离散

傅里叶变换隐含了周期性的边界条件,会使得在视野边缘附近的细胞结构产生较强的振铃效应,在重建图像的边缘产生振荡。大视野 ODT 系统可以在更大视野上避免以上边缘效应的影响,有利于研究细胞间的相互作用、密集生长胚胎细胞的生长过程等,具有更广泛的生物应用。

另一方面,大视野可以对更厚、更大的样品进行成像。由于厚样品对光的散射能力较强,传统 ODT 只能捕获一部分散射的光子,无法对厚样品整体进行重建。大视野 ODT 系统像面较大,对厚样品成像时捕获的光子数远远多于传统 ODT 系统,有利于研究卵母细胞等巨大细胞的生命活动。

由于大视野 ODT 系统具有以上优势,它可以更好地应用于细胞成像。大视野和传统视野系统照明示意图如图 2 所示,其中图 2(a)和图 2(c)是大视野,图 2(b)和图 2(d)是传统视野,图中的正方体代表系统的成像范围。将图 2(a)与图 2(b)对比,可以看出传统 ODT 系统虽然可以对正常大小的细胞进行成像,但视野内仅有一个或数个细胞,很难探究细胞与细胞之间的相互作用。且细胞的状态具有偶然性,难以保证恰好是视野内的某个细胞发生病变,对于传统 ODT 系统,需要对多个可能有病变的细胞区域进行采集以求观察到细胞病变。但对于本文提出的大视野系统,成像范围内有数十个甚至几百个细胞,可以轻易地观察到细胞间的相互作用,且视野内的细胞发生病变被观察到的概率更大。将图 2(c)与图 2(d)对比,可以看到对于卵母细胞等较大的复杂生物样品,光在经过样品多次散射后,携带物体结构信息的单次散射光子数会大幅减少,传统 ODT 系统难以收集到所有的散射光<sup>[37]</sup>,只能对细胞的局部进行重建,难以观察到整个细胞的状态,且由于振铃现象视野范围边缘区域的细胞成像质量不

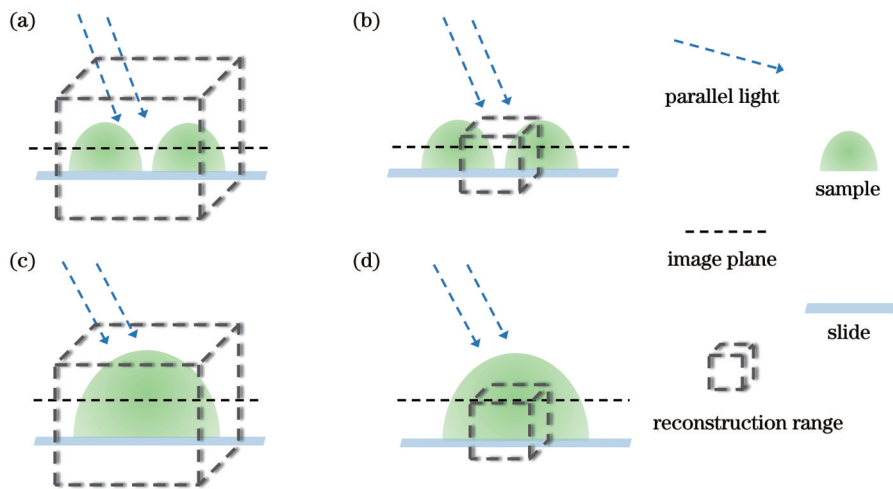


图 2 不同 FOV 系统对复杂生物样品成像示意图。(a)大视野系统对正常细胞成像;(b)传统 ODT 系统对正常细胞成像;(c)大视野系统对巨大细胞成像;(d)传统 ODT 系统对巨大细胞成像

Fig. 2 Schematic of traditional system and large-FOV system imaging in complex biological samples. (a) Normal cell imaging by large-FOV system; (b) normal cell imaging by traditional ODT system; (c) giant cell imaging by large-FOV system; (d) giant cell imaging by traditional ODT system

好;而大视野 ODT 系统可以获得足量的散射光子,实现对整个巨大细胞的重建。

### 3 结果与分析

#### 3.1 聚苯乙烯微球结果分析

对于干涉成像,实验环境和仪器参数都会影响系统的重建灵敏度<sup>[32,38]</sup>,因此本文定义了系统的信噪比(SNR)<sup>[37]</sup>:

$$R_{SN} = \frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{background}}}{\sigma_{\text{background}}}, \quad (9)$$

式中: $R_{\text{sample}}$ 为计算出的样品区域中的折射率分布; $R_{\text{background}}$ 为测量的背景折射率; $\sigma_{\text{background}}$ 为背景区域的标准偏差。

为了验证大视野 ODT 系统的成像效果,我们首先对聚苯乙烯微球的折射率进行了测量。实验中所用的聚苯乙烯微球在波长为 473 nm 条件下折射率真值为 1.608,直径为 5  $\mu\text{m}$ ,用紫外固化胶(折射率为 1.574)将微球固定在载玻片与盖玻片之间,并通过挤压确保小球近似为单层。假设背景折射率均匀。

图 3 所示为不同成像深度下大视野 ODT 和传统 ODT 对聚苯乙烯微球的成像效果,其中图 3(a)显示了 5  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯微球在大视野 ODT 系统下的采集恢复

结果,图 3(b)为图 3(a)红色方框区域的放大图,图 3(c)为与图 3(b)区域对应的传统小视野 ODT 系统下的采集恢复结果,在图 3(b)和图 3(c)图像下方列出了图像整体和边缘的 SNR。图 3(a)的总成像范围为 196  $\mu\text{m} \times 196 \mu\text{m}$ ,而图 3(c)的成像范围仅为 50  $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ,可见大视野 ODT 系统的成像范围远大于传统 ODT 系统。图 3(b1)和图 3(c1)为焦面处聚苯乙烯微球的成像结果;图 3(b2)和图 3(c2)为离焦 1  $\mu\text{m}$  处聚苯乙烯微球的成像结果;图 3(b3)和图 3(c3)为离焦 2  $\mu\text{m}$  处聚苯乙烯微球的成像结果。分别对比同一深度的大视野 ODT 和传统 ODT 结果,可以看出图 3(c1)图像的边缘明显有一圈圈振荡,这是传统 ODT 重建时由于傅里叶变换边界条件不连续导致的振铃效应,且和图 3(b2)、图 3(c2)、图 3(b3)、图 3(c3)图像边缘和 SNR 值对比可以看出,振铃效应会随着离焦深度的加深而越发明显。若将多张不同区域的传统 ODT 恢复结果[图 3(c)]拼接在一起,会出现图像拼接边缘不连续,进而影响成像效果。除振铃效应之外,对比图像整体 SNR,可以看出图 3(b)的成像效果比图 3(c)好,这是因为相较于传统 ODT 系统,大视野 ODT 系统对同一个样品采集图像时捕获到的光子数更多,重建质量更好。

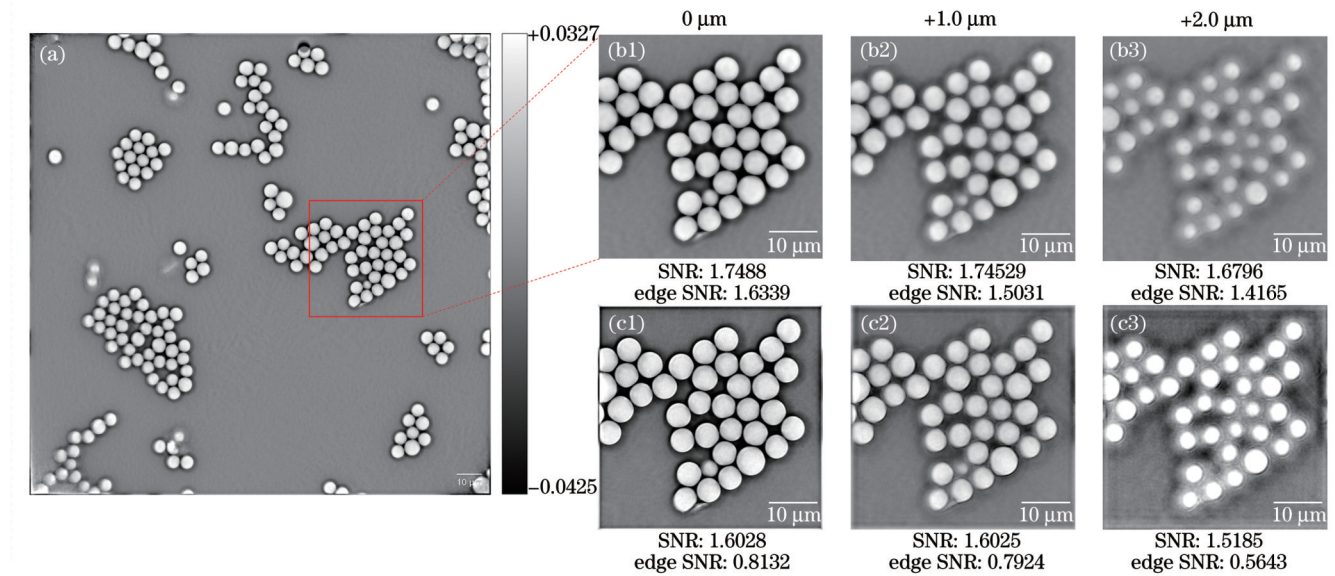


图 3 5  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯微球不同成像深度下在大视野 ODT 系统和传统 ODT 系统的重建结果。(a)5  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯微球在大视野 ODT 系统下的采集恢复结果;(b)对应(a)中红色方框区域的聚苯乙烯微球不同焦面恢复结果放大图;(c)与(b)对应的传统 ODT 系统下的采集恢复结果

Fig. 3 Reconstruction results of 5  $\mu\text{m}$  polystyrene microspheres at different imaging depths in large-FOV and traditional ODT systems. (a) Recovery results of 5  $\mu\text{m}$  polystyrene microspheres in large-FOV system; (b) magnification of polystyrene microsphere imaging results at different defocusing depths for area in red square in (a); (c) recovery results in traditional system corresponding to (b)

图 4 为大视野 ODT 系统和传统 ODT 系统图像[即图 3(b)和图 3(c)]的 SNR 对比,其中蓝色为图 3(b)的整体 SNR 对比,红色为图 3(c)的整体 SNR 对比,绿色为图 3(b)的图像边缘 SNR 对比,黄色为图 3(c)的图像

边缘 SNR 对比。从图 4 中可以看出大视野 ODT 整体图像 SNR 优于传统 ODT 系统,图像边缘 SNR 大视野系统更是具有明显优势,说明大视野 ODT 系统对图像质量、尤其是图像边缘质量有明显提升。这与 2.3 节

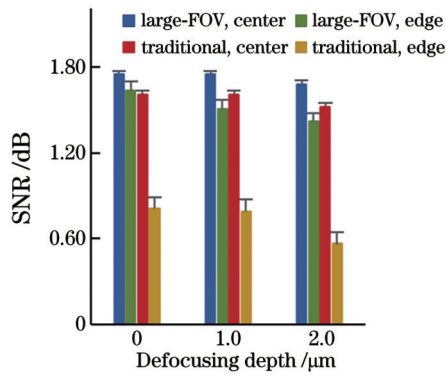


图4 大视野ODT系统和传统ODT系统图像的SNR对比  
Fig. 4 Comparison of image SNR between large-FOV and traditional ODT systems

中的分析一致。

### 3.2 HeLa活细胞结果分析

由于ODT无需对细胞进行染色,因此对细胞光毒性低,适用于对活细胞进行长时程成像。为了进一步验证大视野ODT系统在复杂生物样品成像中的优势,本文对HeLa活细胞进行了活细胞长时程三维成像,总成像时间为100 min,每组数据采集时间间隔为1 min,相机采集帧率为150 frame/s,每次采集共240个角度,单组数据采集时间为1.6 s。

图5所示为在不同成像深度下大视野ODT和传

统ODT对HeLa活细胞的成像效果,其中图5(a)显示了HeLa活细胞在大视野ODT系统下的采集恢复结果,图5(b)为图5(a)红色方框区域的放大图,图5(c)为与图5(b)区域对应的传统ODT系统下的采集恢复结果。图5(a)的总成像范围为 $196\ \mu\text{m} \times 196\ \mu\text{m}$ ,图5(c)的成像范围仅为 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ 。

图5(a)中显示了密集分布的HeLa细胞,可以清晰看出正常的HeLa细胞形态(细长形)和快凋亡的HeLa细胞形态——HeLa细胞凋亡时骨架坍塌,逐渐缩成团,贴壁能力减弱,代谢更旺盛。从支撑材料视频中也可以看出细胞逐渐塌缩凋亡的过程。

图5(a)红色方框区域内是一个正常形态的HeLa细胞。采用大视野ODT系统和传统ODT系统恢复该细胞的图像,如图5(b)和图5(c)所示。对比发现传统ODT系统恢复的图像边缘会出现振铃效应,并且对比图5(c1)~图5(c3)可以看出随着离焦深度的加大,振铃效应越发明显,这会影响到恢复图像边缘处的细胞形态的判断,难以实现多张图像的拼接从而对百微米量级的细胞状态进行判断。此外,对比图5(b1)和图5(c1)也可以看出,由于捕获到了更多的光子,在较复杂生物样品中大视野ODT系统重建图像效果优于传统ODT系统。

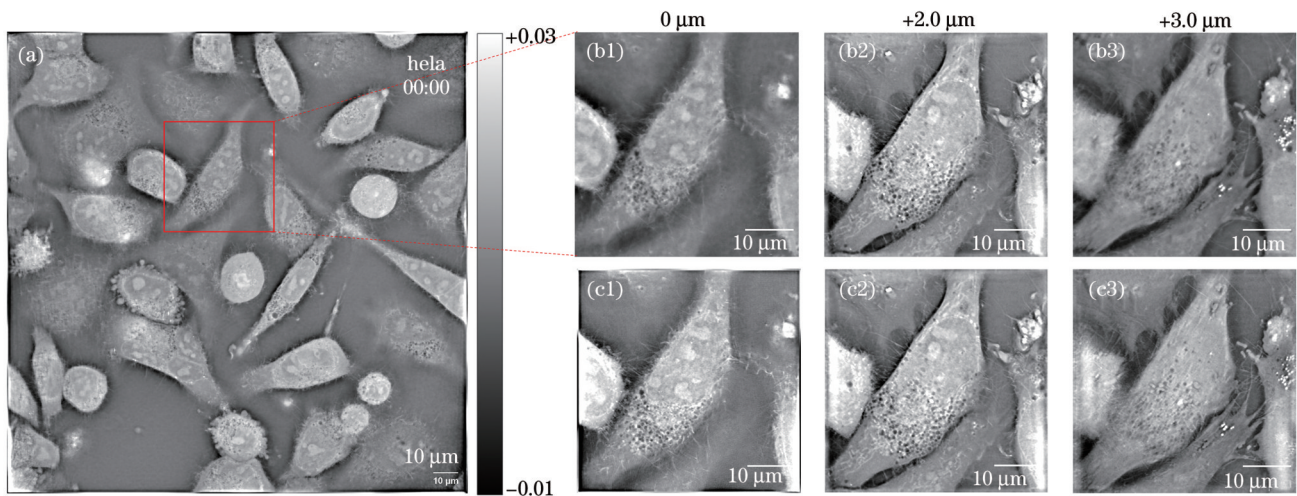


图5 HeLa活细胞于不同成像深度下在大视野ODT和传统ODT系统的重建结果。(a) HeLa活细胞在大视野ODT系统下的采集恢复结果;(b)对应(a)中红色方框区域的HeLa活细胞不同焦面恢复结果放大图;(c)与(b)对应的传统ODT系统下的采集恢复结果

Fig. 5 Reconstruction results of living HeLa cells at different imaging depths in large-FOV and traditional ODT systems. (a) Recovery results of HeLa cells in large-FOV system; (b) magnification of living HeLa cell imaging results at different defocusing depths for red square area in (a); (c) results in traditional system corresponding to (b)

图6为HeLa活细胞于不同时间点在大视野ODT系统下的重建结果,其中图6(a)~图6(d)依次是94:00、96:00、97:00、99:00时刻的细胞恢复图像。数据总成像时间为100 min,这里仅给出四个时刻的HeLa活细胞大视场结果对比,其余恢复结果见支撑材料视频。由图6可见,视野中有近50个HeLa细胞,而传统ODT

视野内仅有一个或数个HeLa细胞,更多的细胞数目有利于观察细胞间的相互作用。从图6(a)~图6(d)可以看到视野边缘一个HeLa细胞的快速塌缩过程(红色椭圆内细胞)。传统ODT只能针对一种细胞进行观测,其余状态的细胞均在视野外,无法观测,而从图6可以看出在视野内存在多种细胞,如快速塌缩的细胞

(红色椭圆内细胞)、将要凋亡的细胞(黄色椭圆内细胞)和正常细胞。大视野 ODT 系统可以同时观测更多的细胞,避免错失细胞的活跃过程,有助于提高实验效率,更适于细胞研究应用。

图 7 为图 6 中黄色椭圆圈出的细胞于不同时间点在大视野 ODT 系统下的重建结果,可以看到其细胞形

态与其余细胞不同,为椭圆形,其细胞骨架塌陷缩成球状,细胞周围物质非常活跃,且细胞体积明显小于旁边的细胞,均说明该细胞正处于凋亡状态。从图 7 可以看出,除同时观测多种细胞状态、研究细胞间相互作用外,本系统还具有对某种细胞状态开展单独分析的能力。

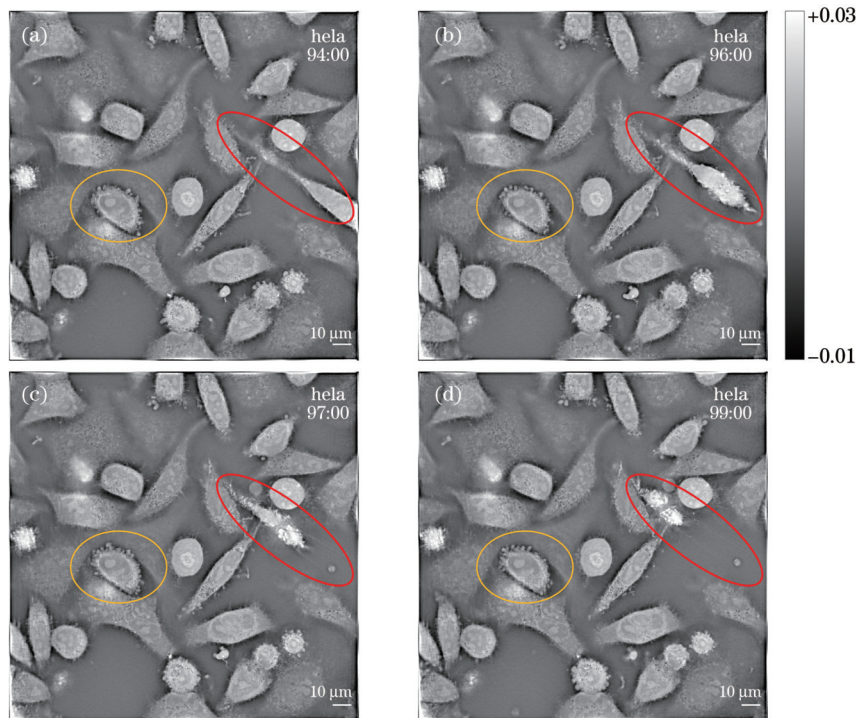


图 6 HeLa 活细胞于不同时间点在大视野 ODT 系统下的重建结果。(a) 94:00; (b) 96:00; (c) 97:00; (d) 99:00

Fig. 6 Reconstruction results of living HeLa cells at different time points in large-FOV system. (a) 94:00; (b) 96:00; (c) 97:00; (d) 99:00

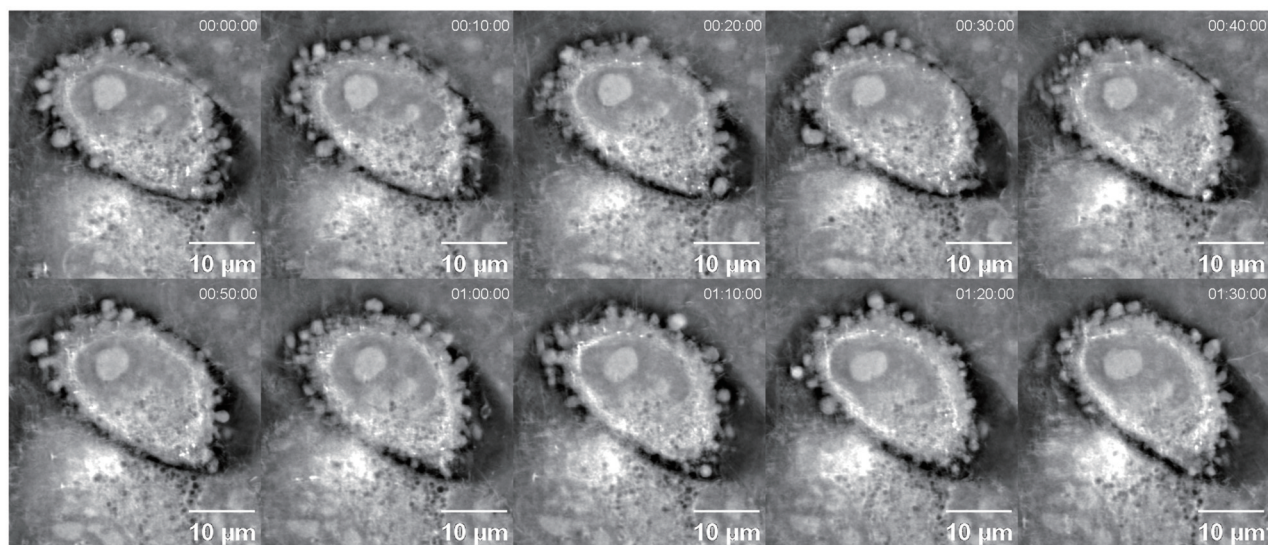


图 7 图 6 中黄色椭圆内细胞于不同时间点在大视野 ODT 系统下的重建结果

Fig. 7 Reconstruction results of the cell in yellow ellipse area in Fig. 6 at different time points in large-FOV system

综合图 5~图 7,可以看出大视野 ODT 系统可以更好地对复杂无标记的活细胞样品进行长时程观测,且成像效果明显优于传统 ODT 系统。大视野 ODT 系统获得了更多的散射光子数,可以减弱边缘效应,较大的视野有利于观察细胞间的相互作用和同时观测多

种细胞的实时状态。实验结果进一步验证了大视野 ODT 系统在复杂生物样品中的可行性和必要性。

## 4 结 论

本文提出了一种适用于复杂生物样品的大视野快

速光学衍射层析成像技术的新方法,用满了物镜视场数,达到物镜的成像范围极限,同时兼具以亚细胞超分辨率对活细胞进行三维长时程成像的能力。先对 5  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯小球进行成像,证明了大视野 ODT 系统的可行性,然后对广泛应用于生物实验的 HeLa 活细胞进行了无标记 100 min 长时程成像,验证了大视野系统的优势。与传统 ODT 系统相比,本文的大视野 ODT 系统成像范围更大,在物光被复杂样品散射后获取的光子数更多,边缘的振铃和伪影更小,可以在一个视野内直接研究细胞间的相互作用和同时观测多种不同状态的细胞。此外,大视野有助于实现对卵母细胞等巨大细胞进行观测。总之,大视野 ODT 系统为光学衍射层析成像技术应用于病理和临床的精准诊断提供了新的方法。

**备注:**本文针对图 5 和图 6 有支撑材料。支撑材料请见期刊官网,网址 [https://www.opticsjournal.net/richHtml/zgig/2023/50/3/0307109/SupplementalData/0307109\\_1.mp4](https://www.opticsjournal.net/richHtml/zgig/2023/50/3/0307109/SupplementalData/0307109_1.mp4)

### 参 考 文 献

- [1] Evanko D, Heinrichs A, Rosenthal C K. Milestones in optical microscopy[J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11: S6-S22.
- [2] Hell S W. Far-field optical nanoscopy[J]. *Science*, 2007, 316(5828): 1153-1158.
- [3] Axelrod D. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1981, 89(1): 141-145.
- [4] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [5] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263(5148): 802-805.
- [6] Shaner N C, Campbell R E, Steinbach P A, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(12): 1567-1572.
- [7] Berning S, Willig K I, Steffens H, et al. Nanoscopy in a living mouse brain[J]. *Science*, 2012, 335(6068): 551.
- [8] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [9] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [10] Curd A, Cleasby A, Makowska K, et al. Construction of an instant structured illumination microscope[J]. *Methods*, 2015, 88: 37-47.
- [11] Johnsen S, Widder E A. The physical basis of transparency in biological tissue: ultrastructure and the minimization of light scattering[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1999, 199(2): 181-198.
- [12] 杨泽文, 张璐, 吕宁, 等. 生物折射率三维无标记定量成像研究进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507201.  
Yang Z W, Zhang L, Lü N, et al. Progress of three-dimensional, label-free quantitative imaging of refractive index in biological samples[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507201.
- [13] 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.
- [14] Zheng G A, Shen C, Jiang S W, et al. Concept, implementations and applications of Fourier ptychography[J]. *Nature Reviews Physics*, 2021, 3(3): 207-223.
- [15] Schnars U, Jüptner W P. Digital recording and reconstruction of holograms in hologram interferometry and shearography[J]. *Applied Optics*, 1994, 33(20): 4373-4377.
- [16] Shapiro D A, Yu Y S, Tyliczszak T, et al. Chemical composition mapping with nanometre resolution by soft X-ray microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(10): 765-769.
- [17] Ginat D T, Gupta R. Advances in computed tomography imaging technology[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2014, 16: 431-453.
- [18] Lauer V. New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope[J]. *Journal of Microscopy*, 2002, 205(2): 165-176.
- [19] Sung Y, Choi W, Fang-Yen C, et al. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging[J]. *Optics Express*, 2009, 17(1): 266-277.
- [20] Dong D S, Huang X S, Li L J, et al. Super-resolution fluorescence assisted diffraction computational tomography reveals the three-dimensional landscape of cellular organelle interactome[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9(1): 11.
- [21] Momey F, Berdeu A, Bordy T, et al. Lensfree diffractive tomography for the imaging of 3D cell cultures[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(3): 949-962.
- [22] Descloux A, Großmayer K S, Bostan E, et al. Combined multi-plane phase retrieval and super-resolution optical fluctuation imaging for 4D cell microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(3): 165-172.
- [23] Cotte Y, Toy F, Jourdain P, et al. Marker-free phase nanoscopy[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(2): 113-117.
- [24] Wang Z, Millet L, Mir M, et al. Spatial light interference microscopy (SLIM)[J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1016-1026.
- [25] Kim Y, Shim H, Kim K, et al. Common-path diffraction optical tomography for investigation of three-dimensional structures and dynamics of biological cells[J]. *Optics Express*, 2015, 23(15): 18996.
- [26] Kim T, Zhou R J, Mir M, et al. White-light diffraction tomography of unlabelled live cells[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(3): 256-263.
- [27] Tahara T, Takahashi Y, Arai Y. Image-quality improvement in space-bandwidth capacity-enhanced digital holography[J]. *Optical Engineering*, 2014, 53(11): 112313.
- [28] Hugonnet H, Kim Y W, Lee M, et al. Multiscale label-free volumetric holographic histopathology of thick-tissue slides with subcellular resolution[J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(2): 026004.
- [29] Nie L, Lin C Y, Liao K, et al. Unsupervised deep image stitching: reconstructing stitched features to images[J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2021, 30: 6184-6197.
- [30] Debailleul M, Georges V, Simon B, et al. High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(1): 79-81.
- [31] Kamilov U S, Liu D H, Mansour H, et al. A recursive Born approach to nonlinear inverse scattering[J]. *IEEE Signal Processing Letters*, 2016, 23(8): 1052-1056.
- [32] Sung Y, Choi W, Lue N, et al. Stain-free quantification of chromosomes in live cells using regularized tomographic phase microscopy[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49502.
- [33] Kim K, Yoon H, Díez-Silva M, et al. High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *in situ* hemozoin crystals using optical diffraction tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(1): 011005.
- [34] Slaney M, Kak A C, Larsen L E. Limitations of imaging with first-



- order diffraction tomography[J]. IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques, 1984, 32(8): 860-874.
- [35] Bailleul J, Simon B, Debailleul M, et al. Tomographic diffractive microscopy: towards high-resolution 3-D real-time data acquisition, image reconstruction and display of unlabeled samples [J]. Optics Communications, 2018, 422: 28-37.
- [36] Kailath T, Sayed A H, Hassibi B. Linear estimation[M]. London: Prentice Hall, 2000.
- [37] Mu S Q, Yang Y, Li J H, et al. Three dimension refractive index characterization for photonic waveguides[J]. Journal of Lightwave Technology, 2022, 40(8): 2474-2480.
- [38] 穆书奇, 董大山, 施可彬. 无标记光学成像技术[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(12): 1200001.
- Mu S Q, Dong D S, Shi K B. Label-free optical imaging technology[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(12): 1200001.

## Large Field-of-View Fast Optical Diffractive Tomographic Microscopy

Wei Wanxue<sup>1,2</sup>, He Miao<sup>3</sup>, Xu Jian<sup>1,2</sup>, Dong Dashan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory for Artificial Microstructure and Mesoscopic Physics, School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China;

<sup>2</sup>Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China;

<sup>3</sup>Institute of Medical Technology, Peking University Health Science Center, Beijing 100871, China

### Abstract

**Objective** Optical diffractive tomographic microscopy is a new wide-field, non-invasive and label-free three-dimensional (3D) imaging technology for cells and tissues, which has great application prospects in cell metabolism, pathology and tumor diagnosis. However, with the continuous development of modern biological research, the field-of-view (FOV) of traditional optical diffractive tomography (ODT) cannot meet the needs of observation any more. The invention of large field-of-view ODT technology, while maintaining subcellular resolution, is in an increasingly urgent need.

At present, various quantitative phase imaging technologies require higher spatial-bandwidth product. For example, the sampling rate of interference streaks acquisition in off-axis holographic imaging is more than three times that of intensity imaging. In the condition of a certain number of camera pixels, only a small FOV can be acquired. In order to conduct large-FOV quantitative phase imaging, the number of pixels in the single image is doubled, and the data flux of images is too large. It leads to the facts that the image storage becomes more difficult, the complexity of recovery algorithm is aggravated, and the time of settlement increases.

**Methods** The traditional method to realize large FOV is to scan different areas and then splice the images. However, the method is not suitable for living cells since they constantly move, which limits the further application of the traditional ODT method in biology. To solve the problem, we propose a new ODT technology which can realize the large FOV.

Based on the Mach-Zehnder transmission holographic imaging system, we make some unique designs for large-FOV imaging requirements. The main innovations are described here.

Firstly, we design a non-destructive pupil holographic beam binding scheme. We use the D-shaped mirror instead of beam splitters for beam combining. It can achieve zero loss of intensity and unlimited size. Secondly, we achieve large-FOV oblique plane illumination under the large numerical aperture (NA). Finally, we improve the image acquisition system. We choose a 21 megapixels camera and the faster CoaXPress-12 card as the data acquisition card, and achieve the 50 Gbit/s data flux. The optical elements and galvanometer of the system are re-selected to ensure that there is no aperture limitation.

In addition, we rewrite the data processing program, considering the large amount of data in the large-FOV ODT system. We reconstruct the software of images acquisition to realize the high-speed image acquisition and storage. Then, we edit the new multithread ODT recovery algorithm based on C++ for 64-bit system, which can automatically recover all the collected data synchronously. Using the above system and algorithm, we image 5  $\mu\text{m}$  polystyrene microspheres to verify the feasibility of the system. Then, HeLa cells are imaged, which verifies that the method has long-term 3D observation ability for dense tissue cells and living cells.

**Results and Discussions** In this paper, a large-FOV optical diffraction tomography technique is proposed. The large-FOV ODT uses all the FOV of the objective lens to reach the limit of the imaging range. At the same time, it has both high resolution and long-term 3D imaging capability for living cells. Compared with the traditional ODT system, the imaging range of the proposed system is larger [Figs. 3(a) and 5(a)]; more photons scattered by complex samples can be obtained, so that the signal-to-noise ratio (SNR) is better [Figs. 3(b) and 3(c)]. Moreover, the ringing and artifacts effects of the edge are smaller [Figs. 3(b), 3(c), 5(b), and 5(c)]. The interaction between cells, as well as more cells in different states, can be observed simultaneously in a FOV (Figs. 5 and 6).

**Conclusions** The results show that the large-FOV optical diffraction tomography technology has both subcellular resolution and long-term 3D observation ability of label-free living cells. Compared with the traditional system, the large-FOV ODT system has smaller edge effects and obtains more information of cells, so it is beneficial to observing the interaction between cells, and is helpful to realizing the long-term 3D observation of huge living cells such as oocytes. It will have more biological applications.

**Key words** bio-optics; optical microscopy imaging; optical diffraction tomography; large field-of-view