

绿光液晶光阀的伽马校正及空间干涉显微成像研究

陈大强 郑明杰 李志芳 吴华钦 王由平

福建师范大学光电信息与工程学院, 福建 福州 350007

摘要 近年来,定量相位成像技术在生物组织及细胞成像方面受到广泛的运用。定量成像技术最初采用的光源主要为激光和超发光二极管,如今主要采用白光成像,它可以克服散斑的影响,提高轴向分辨率。介绍了低相干测量技术相关原理,利用16阶二元相位光栅衍射的方法实现了对Holoeye Pluto数字电寻址式液晶空间光调制器(SLM)绿光伽马校正,从而得到了相位与灰度之间的线性关系。搭建实验装置,在同一光路中完成伽马校正与定量成像。计算出奥林巴斯的20×物镜相衬环的实际大小,制作相位分别为 0 , $\pi/2$, π 和 $3\pi/2$ 的相位环光栅。加载相位环光栅到液晶空间光调制器上完成对散射光的相位调制。确认了绿光可运用于空间干涉显微(SLIM)调制,并初步实现了SLIM观察,对今后SLIM研究具有一定的意义。

关键词 测量; 定量成像; 低相干测量; 液晶空间光调制器; 伽马校正; 相位环光栅

中图分类号 O436 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP51.121204

Gamma Correction for Green Light Liquid Crystal Spatial Light Modulator and Spatial Light Interference Microscopy Imaging Study

Chen Daqiang Zheng Mingjie Li Zhifang Wu Huaqin Wang Youping

College of Photonic and Electronic Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China

Abstract In recent years, quantitative phase imaging is widely used in biological tissues and cell imaging. At first, used laser or superluminescent diode is used as the light source in quantitative phase imaging. Now it mainly adopts the white light to image, as it can overcome the influence of speckle and improve the axial resolution. In this paper, the principle of low-coherence interferometry techniques is introduced. Diffractive method with 16 order binary grating is utilized to realize the green light gamma correction of the Holoeye Pluto digital electric-addressed liquid crystal spatial light modulator, and the linear relationship between phase and gray is obtained. An experiment setup is constructed (SLM), the gamma correction and the quantitative phase imaging can be completed in the same setup. The actual size of the phase ring is calculated in the 20× objective of the Olympus, and four phase grating rings are made, their phase corresponding to 0 , $\pi/2$, π and $3\pi/2$. The four phase grating rings are loaded on the liquid crystal SLM to complete the phase modulation of the scattered light. It shows that the green light can be applied to spatical light interference microscopy (SLIM), and realizes the SLIM observation. It has certain significance for the SLIM study in the future.

Key words measurement; quantitative phase imaging; low coherence interferometry; liquid crystal spatial light modulator; gamma correction; phase grating ring

OCIS codes 120.5060; 180.1655; 230.2090

1 引言

相位型物体在生命科学当中广泛存在,如人体细胞及一些生物组织。它们一般不会吸收或散射光线^[1-2],导致使用传统显微镜很难得到高对比度的图像。1935年荷兰科学家Zernike发明了相衬显微镜(PCM),并因此获得1953年诺贝尔物理学奖^[3]。相衬显微镜可以把透明样本的相位分布转化成强度调制,便于实验观

收稿日期: 2014-05-27; 收到修改稿日期: 2014-06-28; 网络出版日期: 2014-11-12

基金项目: 国家自然科学基金(61178089,81201124)。

作者简介: 陈大强(1989—),男,硕士研究生,主要从事光镊方面的研究。E-mail: dq_chan@163.com

导师简介: 郑明杰(1972—),男,副教授,主要从事光镊方面的研究。E-mail: mj.zheng@fjnu.edu.cn(通信联系人)

察。因此相衬显微镜被广泛运用于相位物体的观察,如未经染色的物组织、活体细胞、聚苯乙烯球等。现有的科学研究中,科学家们往往采用相衬法、纹影法、暗场法、刀口法和微分干涉差法来实现对纯相位物体的观察^[4-5],这些方法虽然在生物医学、光学信息处理及科学研究等领域具有广泛的应用。但这些方法都只适用于定性观察,难以实现纯相位物体的定量相位分布测量。

近年来,一种能实现纯相位物体定量相位分布测量的技术进入科学家们的视野,它可以精确地测出由样本结构变化和样本运动引起的光学相位变化,从而得出样本的内在信息^[6-8]。定量成像是一种无接触、无损伤的实时检测细胞或生物组织的方法。现有的定量成像技术有直接零部件标印(DPM),单光子计数(SPC)、空间光干涉法、双点源干涉扫描成像法等^[9-12]。早期定量成像技术采用的照明光源大多时间相干性非常高,生成的图片往往带来一些散斑,影响观察。其图像的对比度并没有相衬等白光技术好。因此,可以预见低相干干涉测量技术^[13]将会是今后的发展方向。

由于液晶空间光调制器(SLM)是一种功能非常强大的衍射光学元件,它能够实现对光波的整形及空间滤波等,使得它在光学显微镜中应用越来越广泛。研究者往往通过利用SLM实现对DPM,SPC暗场等高分辨率显微镜的模拟来完成对相位物体或近相位物体的观察^[14-15]。

本文通过把奥林巴斯IX73相衬显微镜与Holoeye SLM组合成一种低相干定量成像系统。首先,对纯相位型Holoeye Pluto空间光调制器做绿光伽马校正,使得0~255灰度之间,相位呈现线性变化,找出SLM加载不同灰度值时对应的相位值,并利用MATLAB程序生成相位分别为 $0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$ 的相位环光栅,加载到空间光调制器上,实现对直射光的相位调制,完成了空间干涉显微(SLIM)研究的初步工作。

2 原理及方法

2.1 SLIM原理

根据低相干干涉原理^[16],假设用于照明的空间相干光源的振幅分布为:

$$U(x,y) = |U(x,y)| \exp[i\Phi(x,y)], \quad (1)$$

照明光通过样本以后分成两类光,一部分是生成背景图案的背景光(R光),另一部分是带有样本精细结构信息的散射光(S光)。设背景光的场分布为 U_0 ,散射光场为 $U_1(x,y)$ 。设 ϕ_0 是光路中特意添加的一个相位延迟, $\phi_1(x,y)$ 是 U_0 和 $U_1(x,y)$ 之间的相位差,那么互补金属氧化物半导体(CMOS)相机上得到的强度分布函数为:

$$I(x,y,\phi_0) = |U_0|^2 + |U_1(x,y)|^2 + 2|U_0||U_1(x,y)| \cos[\phi_1(x,y) + \phi_0]. \quad (2)$$

在传统的相衬显微镜中, $\phi_0 = \pi/2$,其只能提供样本的一个定量的信息图。然而,该相干成像系统中采用多个相位延迟,分别为: $0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$,因此, ϕ_1 可以得到唯一确定的函数。具体来说 ϕ_1 可以写成以下式子:

$$\phi_1(x,y) = \arctan \left[\frac{I(x,y,-\pi/2) - I(x,y,\pi/2)}{I(x,y,0) - I(x,y,\pi)} \right]. \quad (3)$$

2.2 实验装置

图1为奥林巴斯相衬显微镜与SLM结合的基本原理图。该显微镜采用的光源为卤素灯。卤素灯灯丝的像通过一透镜成到聚光环上,聚光环的位置在聚光镜的前焦面上,因此,通过聚光镜的光线能均匀地照在样本上。在聚光镜前加一奥林巴斯滤色片(43IF550-W45),光透过后中心波长为550 nm。采用它的一主要原因是,在相衬观察条件下,能更好地消除晕轮现象,提高系统的成像质量,同时绿光能给人眼提供一个舒适敏感的观察背景。实验中采用的物镜放大倍率20×,数值孔径 $NA=0.45$ PH1,物镜后焦面自带一相位环,该相位环对透过样本的散射光具有相位延迟及降低光强的作用。为了能使用SLM(Holoeye Pluto)实现对散射光的进一步调制,采用了一个棱镜和两个焦距分别为500 mm的透镜把显微镜中的散射光与直射光导入到SLM上,并在第一个傅里叶透镜的前焦面处放一大小可变的光阑。在SLM上加载不同的相位光栅实现对散射光与非散射光进一步处理。最后用一个焦距为200 mm的傅里叶透镜使光束成像于CMOS相机。

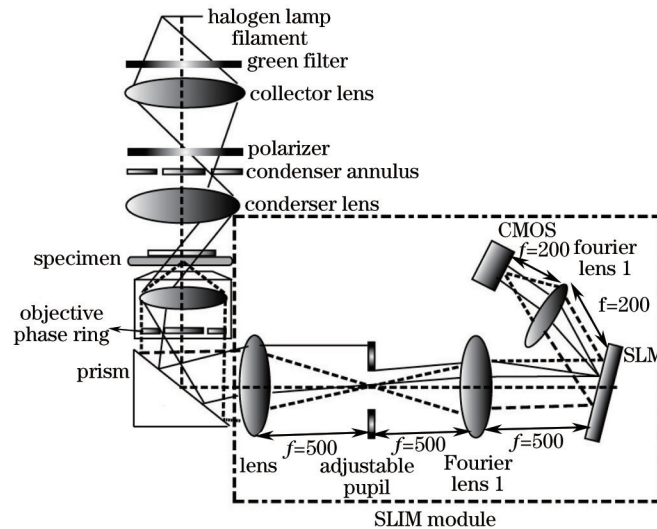


图1 基于SLM的SLIM成像系统示意图

Fig.1 Schematic of SLIM imaging based on SLM

2.3 绿光伽马校正

利用图1可以实现绿光SLM的伽马校正,在照明光路中加显微镜自带的绿色滤光片,采用PerkinElmer的Lambda 950紫外可见分光光度计测出其透过率,如图2(a)所示,卤素灯的色温为3300 K,因此,绿光照明光谱图分布如图2(b)所示,使得照明光中心波长为550 nm的低相干光源。根据(4)式可计算出该照明光的相干长度为 $2.03 \mu\text{m}$,远小于激光,发光二极管等带宽光源的相干长度^[17]:

$$\Delta l_{\text{FWHM}} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \left(\frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \right). \quad (4)$$

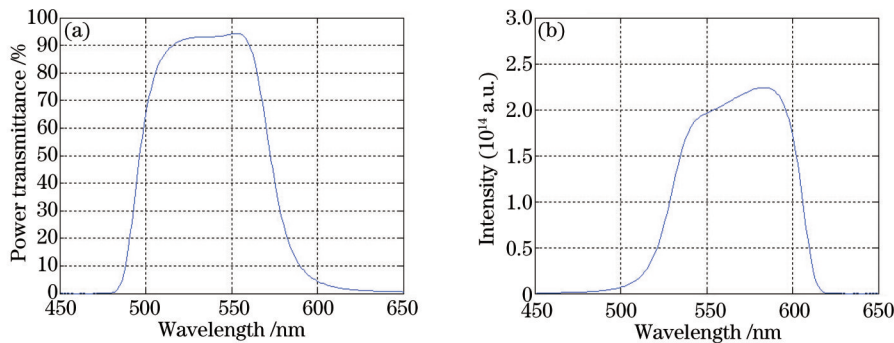


图2 (a) 绿光片透射光谱; (b) 照明光谱图分布

Fig.2 (a) Transmission spectrum of green light; (b) spectrum distribution of the illumination

为了利用SLM实现对绿光准确的调制,需对绿光SLM做伽马校正,使得灰度在0~255对应的相位呈线性变化。物镜用20 \times ,相位环采用PH1,并在照明光之前加一偏振片,通过棱镜及2个焦距为500 mm的透镜把相位环共轭到SLM上。利用焦距为200 mm的透镜使光束成像于CMOS相机上。为了测量一级光的衍射效率,在聚光镜前加一偏振片,适当减小可变光阑的直径,使得在CMOS相机能同时观察到一次光和零次光的图,通过旋转偏振片的角度使偏振片的方向与SLM的水平方向平行,从而使得一次光强最大。在SLM加载一个16阶二元光栅,如图3(a)所示。从0到250每隔5灰度拍一张图片,获得一级光的衍射图片,如图3(b)所示。利用MATLAB程序分别算出每个灰度处的零次光强度与一级光强度,结果如图4(a)所示。

加载二元光栅后的一级衍射光强与相位的关系式为^[18]:

$$I_n = \frac{I_0}{2} (1 - \cos \phi) \left[\text{sinc} \left(\frac{n\pi}{2} \right) \right]^2, \quad (5)$$

式中 I_0 为入射光强, n 为衍射级数, ϕ 为光栅相位。

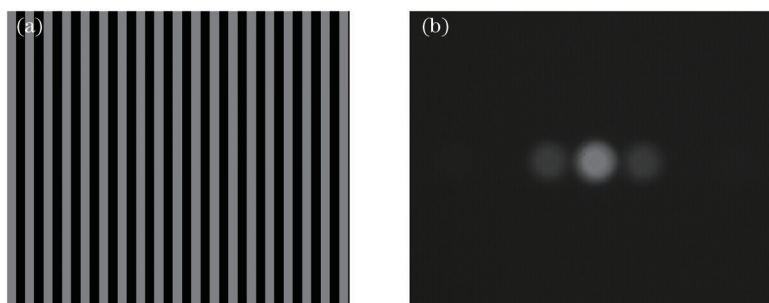


图3 (a) 16阶二元光栅; (b) CMOS相机上得到衍射图案

Fig.3 (a) 16 order binary grating; (b) diffraction pattern on the CMOS camera

利用(1)式将图4(a)的强度关系转换成相位关系,进而利用MATLAB程序的线性插值的方法得到相位灰度的关系,如图4(b)所示。把获得的不同灰度值对应的相位值输入到Holoeye提供的excel文件便可得最终的伽马校正曲线。并最终确定灰度值为0,114,140,161时对应的相位值分别为 $0, \pi/2, \pi$ 和 $3\pi/2$ 。再次利用衍射法完成伽马校正的验证,如图4(b)所示,校正后的相位灰度大致呈线性关系。

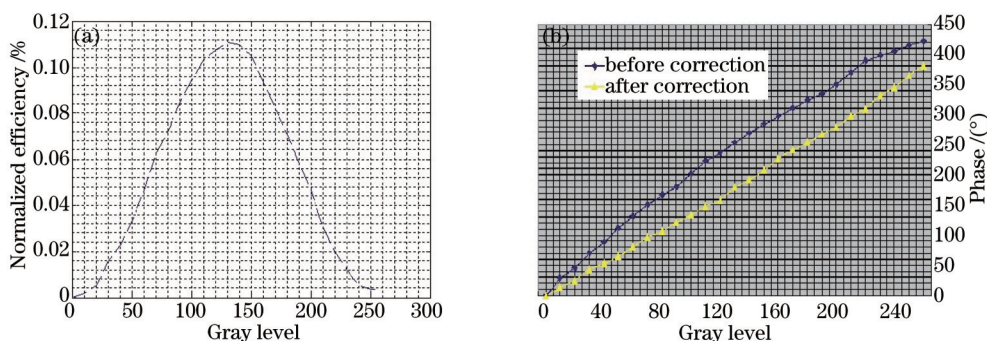


图4 (a) 二进制光栅一次光强衍射效率随灰度值的变化; (b) 相位与灰度值的变化关系

Fig.4 (a) Intensity diffraction efficiency along with the change of gray value by using binary phase grating;

(b) relationship between the phase and the gray value

2.4 SLIM 成像研究

2.4.1 相位环光栅计算及制作

从图1可知,物镜的相位环在其后焦面上,两个 $f=500$ 的透镜组成一个无限系统,把相位环成像到SLM上。该系统利用SLM对透过样本后的散射光再次调制。利用MATLAB制作四个 $0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$ 的相位环光栅来实现对散射光的额外调制。为了能使得相位环光栅能有效地对散射光进行调制,需要对加载在SLM上的相位光栅的内外半径进行准确的计算,使得其大小与PH1环真实值大小对应。首先,物镜采用 $20\times$ 相衬物镜,相衬环为PH1,并移开图1中的可变光阑和傅里叶透镜1,在SLM后400 mm加一焦距为200 mm的透镜,利用CMOS相机在透镜后400 mm处接收,如图5(a)所示,图5(b)为SLM上加载一空屏图像时CMOS相机上看到的相位图像。通过计算可知加载在SLM上的相位环的内外环的半径对应的像素值分别为127和176。图6中(a),(b),(c),(d)是环上灰度值分别为0,114,140,161的相位光栅。

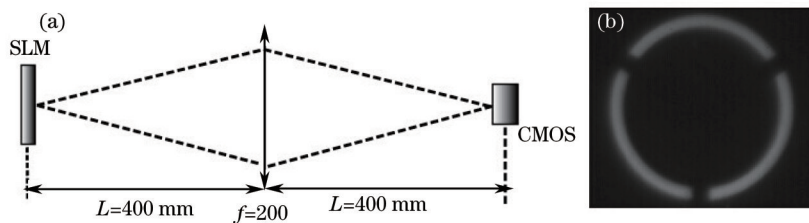


图5 (a) 相位环成像光路; (b) CMOS相机上观察到的相位环

Fig.5 (a) Imaging light path of phase ring; (b) phase ring pattern on the CMOS camera

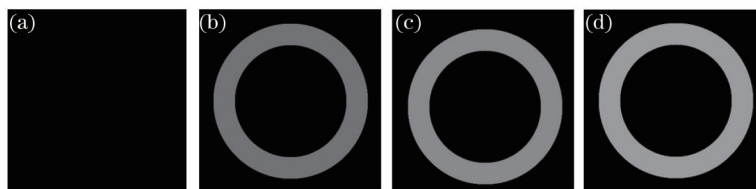


图6 (a), (b), (c), (d)分别是环上灰度值为0, 114, 140, 161的相位光栅

Fig.6 (a), (b), (c), (d) are the phase grating rings when each of the gray value is 0, 114, 140, 161, respectively

2.4.2 光路中心校正

为了使得SLIM成像效果达到最佳,首先,制作一内外半径分别为127和176,灰度为140的二元光栅环,如图7(a)所示。其次,将其加载到SLM上,通过调节固定SLM的大恒五维精密微米台使得相位环中心与SLM中心重合从而得到一级光衍射效率最大的强度图,如图7(b)所示。

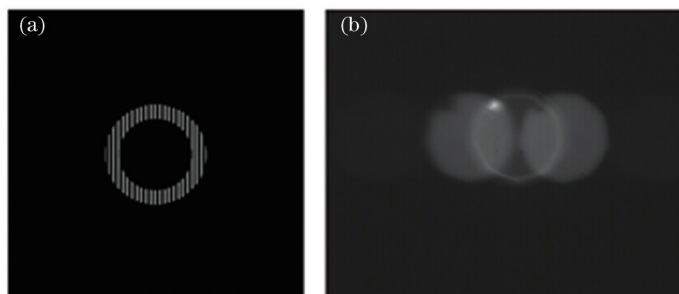


图7 (a) 灰度为140的二元光栅环; (b) CMOS相机上的观察图案

Fig.7 (a) Binary phase grating for the gray level is 140; (b) pattern on the CMOS camera

2.4.3 实验结果

实验时采用的物镜为20 \times , PH1观察。用折射率为1.59,直径为6 μm 聚苯乙烯球和折射率为1.518的油混合作为观察的样本。为了能在COMS相机上得到适当视场的图片,可适当加大可变光阑的孔径。在SLM上分别加载图6的(a), (b), (c), (d)四张光栅图得到一组相位图,如图8所示。从图8中可看出制作的相位光栅对样本产生的调制效果,但其中微球的光场分布不均匀,与奥林巴斯相衬显微镜自带的电耦合图像传感(CCD)相机观察效果有一定差距,这与光路的不对称及采用的CMOS相机成像质量有关,也就是SLIM系统对光路的校正要求高。下一步的主要工作是对整个光路重新调整,并采用更好的CCD相机来采集图像,进而求出准确的样本相位。



图8 (a), (b), (c), (d)对应图6中每一个相位光栅的样本图案

Fig.8 (a), (b), (c), (d) are the sample patterns on the CMOS camera corresponding to Fig.6

3 结 论

定量相位成像技术在生物、医学等领域中分析定量相位物体具有重要的研究意义。本文利用校正后的SLM实现对透过样本后的散射光进行精确调制,初步实现了SLIM成像。

参 考 文 献

- 1 Stephens D J, Allan V J. Light microscopy techniques for live cell imaging[J]. Science, 2003, 300(5616): 82-86.
- 2 Zernike F. How I discovered phase contrast[J]. Science, 1955, 121(3141): 345-349.
- 3 Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II[J]. Physica, 1942, 9(10): 974-986.

- 4 Preza C, Snyder D L, Conchello J A. Theoretical development and experimental evaluation of imaging models for differential–interference–contrast microscopy[J]. *J Opt Soc Am A*, 1999, 16(9): 2185–2199.
- 5 Allen R D, David G B, Nomarski G. The zeiss–Nomarski differential interference equipment for transmitted–light microscopy[J]. *Zeitschrift fur wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*, 1969, 69(4): 193–221.
- 6 Mir M, Wang Z, Shen Z, *et al.*. Optical measurement of cycle–dependent cell growth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(32): 13124–13129.
- 7 Park Y K, Best C A, Auth T, *et al.*. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(4): 1289–1294.
- 8 Park Y K, Diez–Silva M, Fu D, *et al.*. Static and dynamic light scattering of healthy and malaria–parasite invaded red blood cells[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(2): 020506.
- 9 Popescu G, Ikeda T, Dasari R R, *et al.*. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics[J]. *Opt Lett*, 2006, 31(6): 775–777.
- 10 Fürhapter S, Jesacher A, Bernet S, *et al.*. Spiral phase contrast imaging in microscopy[J]. *Optics Express*, 2005, 13(3): 689–694.
- 11 Wang Z, Millet L, Mir M, *et al.*. Spatial light interference microscopy (SLIM)[J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1016–1026.
- 12 Ding H, Popescu G. Instantaneous spatial light interference microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(2): 1569–1575.
- 13 Huang M, Jiang Z, Li B, *et al.*. Evaluation of absolute phase for 3D profile measurement using fringe projection[J]. *Chin Opt Lett*, 2006, 4(6): 320–322.
- 14 Maurer C, Jesacher A, Bernet S, *et al.*. What spatial light modulators can do for optical microscopy[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2011, 5(1): 81–101.
- 15 Nguyen T H, Popescu G. Spatial light interference microscopy (SLIM) using twisted–nematic liquid–crystal modulation [J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(9): 1571–1583.
- 16 Wang Z, Popescu G. Quantitative phase imaging with broadband fields[J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 96(5): 051117.
- 17 Bouchal Z, Chlup V, Čelechovský R, *et al.*. Achromatic correction of diffractive dispersion in white light SLM imaging [J]. *Optics Express*, 2014, 22(10): 12046–12059.
- 18 Zheng Mingjie, Li Zhifang, Chen Daqiang, *et al.*. Phase modulation characteristics of liquid crystal spatial light modulator fast linearized with diffractive method[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2014, 51(6): 061203.
郑明杰, 李志芳, 陈大强, 等. 衍射法快速线性化液晶空间调制器的相位调制关系[J]. *激光与光电子学进展*, 2014, 51(6): 061203.