

# 免显微物镜的共光路相位显微成像方法

陈映洲<sup>1</sup> 季颖<sup>1\*</sup> 谢铭<sup>1</sup> 徐媛媛<sup>2</sup> 韩豪<sup>1</sup> 卜敏<sup>1</sup> 王亚伟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>江苏大学理学院, 江苏 镇江 212013

<sup>2</sup>江苏大学机械工程学院, 江苏 镇江 212013

**摘要** 相位显微成像技术在生物细胞形态观察和类别识别中有着重要的应用。基于稳定性强的共光路系统,提出了一种利用反射镜将光束一分为二,然后重叠,产生共光路干涉的方法,该方法利用光束的几何放大作用,免加载显微物镜,即可将干涉图像放大在成像屏上,且通过调节反射镜的角度,实现同轴、离轴和微离轴相位显微成像,对图像进行相位恢复处理后,可了解相位样品的形态结构,理论和实验结果表明该方法可行,为生物细胞相位显微成像新技术的开发研究提供了一种方法。

**关键词** 显微; 相位成像; 生物细胞; 共光路;

中图分类号 O436.1

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP52.121702

## Phase Microscopy Imaging Method Based on Common-Path without Micro-Objective

Chen Yingzhou<sup>1</sup> Ji Ying<sup>1</sup> Xie Ming<sup>1</sup> Xu Yuanyuan<sup>2</sup> Han Hao<sup>1</sup> Bu Min<sup>1</sup> Wang Yawei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Science, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

<sup>2</sup>School of Mechanical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

**Abstract** Phase microscopic imaging technology has an important application significance in morphological identification as well as classification of biological cells. An interferometric imaging method is introduced, which is based on a high stability common-path interference system. In this approach, a reflecting mirror is employed to divide one beam into two parts. Then interferogram can be obtained by the overlap of these two beams. It is worth pointing out that, the interferogram can be amplified by means of geometrical magnification of the light instead of microobjective. Furthermore, the on-axis, off-axis and micro off-axis phase microscopy images can be obtained by controlling the angular position of the reflecting mirror. Then the structure of the sample can be acquired by phase retrieval. The method is suggested to be feasible by theoretical analysis and experiment result, which can provide a approach to phase microscopy imaging.

**Key words** microscopy; phase imaging; biological cell; common-path;

**OCIS codes** 170.1080; 170.1530; 110.3175

## 1 引言

生物细胞是生物体的基本结构和功能单位。生物细胞结构形态的检测在各个领域有着广泛的应用,尤其是在临床医学应用方面,许多疾病发病机制的研究、疾病的诊断、治疗效果的观察都依赖于对细胞形态特征的检测<sup>[1]</sup>。如血液常规检查中的血液细胞的大小和形态检测可用于鉴别并诊断多种疾病<sup>[2]</sup>。由于细胞的无色性和微米量级的尺度,因此无法通过肉眼直接观察。但是细胞可看作透明的相位物体,当光线通过细

收稿日期: 2015-06-16; 收到修改稿日期: 2015-07-05; 网络出版日期: 2015-12-03

基金项目: 国家自然科学基金(11374130,11474134,11404145)、江苏省自然科学基金(BK20141296)、中国博士后科学基金(2014M561574)、江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(KYLX\_1017)、江苏省博士后科研资助计划项目(1301148C)、江苏省光子制造科学与技术重点实验室(江苏大学)开放基金课题(GZ201308)

作者简介: 陈映洲(1991—),女,硕士研究生,主要从事光学成像技术方向的研究。E-mail: cyz622724@126.com

导师简介: 王亚伟(1957—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物光学及其成像技术方向的研究。

E-mail: jszjwyw@sina.cn

\*通信联系人。E-mail: jy@ujs.edu.cn

胞时,光程发生变化,产生相移<sup>[3]</sup>。光学相位显微成像方法具有非侵入性、无电离辐射、可实时、可定量等特点,成为细胞检测的主要技术<sup>[4-5]</sup>。

相位物体的光学检测技术主要基于干涉原理。干涉显微从结构上可划分为物光与参考光分离的干涉显微和物光与参考光共路的干涉显微。物、参光分离干涉显微的主要方法有 Michelson 干涉显微、Linnik 干涉显微和 Mach-Zehnder 干涉显微<sup>[6]</sup>等。基于这些显微成像原理,国内外科学家进行了拓展研究,如 B Kemper<sup>[7]</sup>提出的一种基于 Michelson 光路的数字全息显微;基于 Linnik<sup>[8]</sup>干涉光路的全场光学光学层析技术;类 Mach-Zehnder 干涉显微光路的平行同轴二步相移技术<sup>[9]</sup>、希尔伯特相位显微(HPM)<sup>[10]</sup>、异步数字全息<sup>[11]</sup>和双通道干涉显微技术<sup>[12-13]</sup>等。这些装置结构简单,操作方便,但由于光路中物光与参考光经历完全不同的路径,环境的扰动会对物光与参考光造成不同的影响,从而影响两者之间的光程差的稳定性,最终对测量精度产生影响。而物参共光路干涉显微装置中,物光与参考光经历完全相同的路径,环境的扰动对物光和参考光造成完全相同的影响,从而不会影响两者之间的光程差,测量的精度较高。物、参共路干涉显微主要有 Fizeau 干涉显微<sup>[14]</sup>、微分干涉显微<sup>[15]</sup>、相衬干涉显微<sup>[16]</sup>和衍射相位显微技术<sup>[17-18]</sup>等。但是这些干涉显微装置在使用过程中需要较多的光学元器件,特别是显微镜系统,实验成本较高。

本文基于双光束、共光路干涉原理,设计了一种免显微镜器件的相位显微成像系统,该系统利用一反射镜将共光路系统中光束的一半与另一半叠加,从而产生干涉,通过对该反射镜旋转角的调节,可实现离轴、同轴和轻微离轴干涉成像,并且利用光束的几何放大特性实现显微功能。该系统结构简单、成本低廉、实验操作方便,仿真分析和实验验证均表明了其具有很好的相位显微成像功能,可对一般的相位体(如细胞)进行相位显微成像。

## 2 免显微物镜下的共光路干涉成像方法

干涉显微成像的原理主要是利用相位体在其一束光中产生了相移,当两束相干光相遇时,产生干涉条纹,通过显微物镜系统显微放大后,在远处的成像屏面上成像。通过对图像相位信息的恢复和解包裹处理,可以得到相位分布,利用从相位中解耦的折射率和厚度分布参量,可以重建细胞的三维(3D)形态。该方法主要基于共光路双光束干涉原理,其结构如图 1 所示。

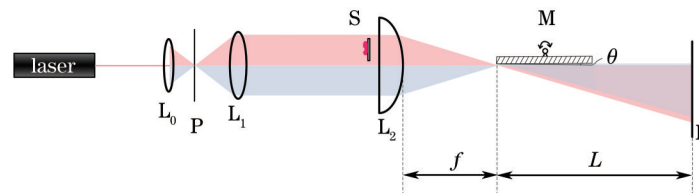


图 1 相位显微成像原理图

Fig.1 Schematic diagram of phase microscopy imaging

图 1 中,光束由一个激光器发出,通过一扩束准直系统,该扩束准直系统由消色差透镜  $L_0$ 、针孔空间滤波器  $P$  和消色差透镜  $L_1$  构成。光束被分成上下两部分(即可看成两束,用红色和蓝色加以区分),其中一束光(红色部分)通过样品,作为物光,另外一束光(蓝色部分)作为参考光。参考光经过可旋转的反射镜  $M$  反射,反射镜与光轴的夹角为  $\theta$ ,参考光与物光束相遇产生干涉。在距  $L_2$  焦点的  $L$  处的屏  $P$  上可得到干涉图像。 $L_2$  为柱状透镜,其焦距为  $f$ ,与反射镜  $M$  组合,产生光束重叠,并兼有几何放大作用。装置中的可旋转反射镜,可以微调实角,从而使得参考光与物光出现不同的夹角  $\theta$ ,即实现同轴干涉,离轴干涉和轻微离轴干涉。

按照双光束干涉理论,在此结构下,整个装置中,光轴上半部分的光束通过样品,作为物光束,共光路强度为  $I_1(x, y)$ ;光轴下半部分则作为参考光束,其光强为  $I_2(x, y)$ 。通过反射镜的作用,两光束相遇发生干涉。在反射镜水平的情况下为同轴干涉,此时其干涉强度  $I_{\text{coaxial}}(x, y)$  可表示为

$$I_{\text{coaxial}}(x, y) = I_1(x, y) + I_2(x, y) + 2\sqrt{I_1(x, y)I_2(x, y)}\cos[\pi + \varphi(x, y)], \quad (1)$$

式中  $\pi$  为反射镜所产生的半波损失,  $\varphi$  为样品产生的相位差,其表达式为

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^h n(x, y, z) dz. \quad (2)$$

为了获取样品的定量相位图样,在同轴干涉下,可放置波片,产生一个新的相移,应用相移相位恢复方

法可以得到样品的相位分布函数。

其放大倍数  $\beta_{\text{coaxial}} = L/f$ , 式中  $L$  为屏到透镜  $L_2$  焦点的距离,  $f$  为透镜  $L_2$  的焦距。

当反射镜与水平面成  $\theta$  夹角时, 视  $\theta$  的大小将产生离轴或微离轴干涉, 如图 1 所示, 在离轴干涉显微成像系统中, 基于双光束干涉原理, 在成像平面其干涉强度  $I_{\text{off-axis}}(x,y)$  可表示为

$$I_{\text{off-axis}}(x,y) = I_0(x,y) + \gamma(x,y)\cos[\varphi(x,y) + kx + \pi], \quad (3)$$

式中  $I_0(x,y)$  为背景光强, 是一低频信号,  $\gamma(x,y)$  为强度调制因子,  $k = 2\pi\sin\theta/\lambda$  为由样品光与参考光之间的倾斜角决定的载波条纹的空间频率,  $\varphi(x,y)$  为由样品产生的相位变化,  $\pi$  为镜面产生的半波损失。

其放大倍数同样有  $\beta_{\text{off-axis}} = L/f$ 。利用离轴干涉显微成像相位恢复方法, 如希尔伯特或者微分方法等可以得到相位分布函数。

### 3 实验结果

#### 3.1 小球离轴相位成像实验

选取聚苯乙烯小球作为相位体样品。该小球直径为  $78 \mu\text{m}$ , 根据图 1 的光路设计原理图所搭建的实验装置, 进行离轴实验,  $f=45 \text{ mm}$ , 成像距离  $L=1800 \text{ mm}$ ,  $\lambda=0.6328 \mu\text{m}$ ,  $\theta=4^\circ$ , 采用数码照相机(数码照相机为索尼 ILCE-6000, 图像分辨率为  $6000 \text{ pixel} \times 4000 \text{ pixel}$ , 感光器件为 Exmor, 自动拍摄模式)对屏上干涉图拍摄。该条件下的离轴相位显微成像实验结果如图 2 所示。图 2(a) 为无样品时的干涉图, 由于光路中存在一个夹角, 所以图中存在光束不重叠区, 该区无干涉条纹, 但是干涉区存在可用的干涉条纹。图 2(b) 为有样品时的干涉图, 图 2(c) 为从图 2(b) 中剪取出的聚苯乙烯小球样品的干涉图。

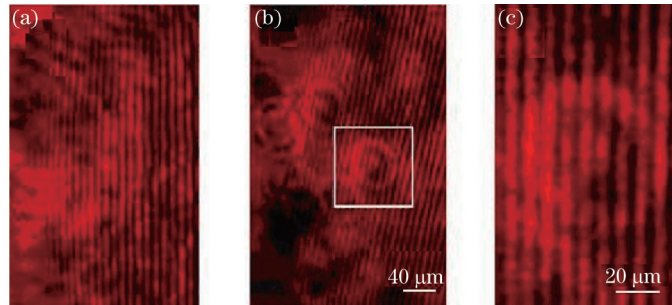


图 2 干涉实验图。(a) 无样品时的干涉图;(b) 有样品时的干涉图;(c) 聚苯乙烯小球干涉图

Fig.2 Interferograms of experiment. (a) Interferogram without samples; (b) interferogram with samples; (c) interferogram of a polystyrene sphere

#### 3.2 相位恢复

根据(3)式所描述的离轴干涉下的光强分布函数, 可以得到

$$I^{(0)} = \gamma \cos[\varphi(x,y) + kx + \pi] = -\gamma \cos[\varphi(x,y) + kx], \quad (4)$$

考虑到实际情况,  $I_0$  和  $\gamma(x,y)$  可以近似认为常数项,  $\varphi$  变化缓慢, 则有

$$\frac{\partial I_0}{\partial x} \approx 0, \frac{\partial \gamma}{\partial x} \approx 0, \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} \approx 0, \quad (5)$$

可以得到

$$I^{(1)} = \frac{\partial I(x,y)}{\partial x} = \gamma\beta \sin[\varphi(x,y) + kx], \quad (6)$$

$$I^{(2)} = \frac{\partial^2 I(x,y)}{\partial x^2} = \gamma\beta^2 \cos[\varphi(x,y) + kx], \quad (7)$$

式中

$$\beta(x,y) = \frac{\partial \varphi(x,y)}{\partial x} + k, \quad (8)$$

最终可以得到相位分布为

$$\varphi(x,y) = \begin{cases} \tan^{-1} \left\{ - \left[ \frac{[I^{(1)}]^2}{I^{(2)} \cdot I^{(0)}} \right]^{1/2} \right\} - kx & [I^{(1)} \cdot I^{(2)} \geq 0] \\ \tan^{-1} \left\{ - \left[ \frac{[I^{(1)}]^2}{I^{(2)} \cdot I^{(0)}} \right]^{1/2} \right\} - kx & [I^{(1)} \cdot I^{(2)} < 0] \end{cases} \quad (9)$$

根据上述计算理论,对图2(c)中样品干涉图进行数值计算,得到其相位二维(2D)和三维分布分别如图3(a)和3(b)所示。

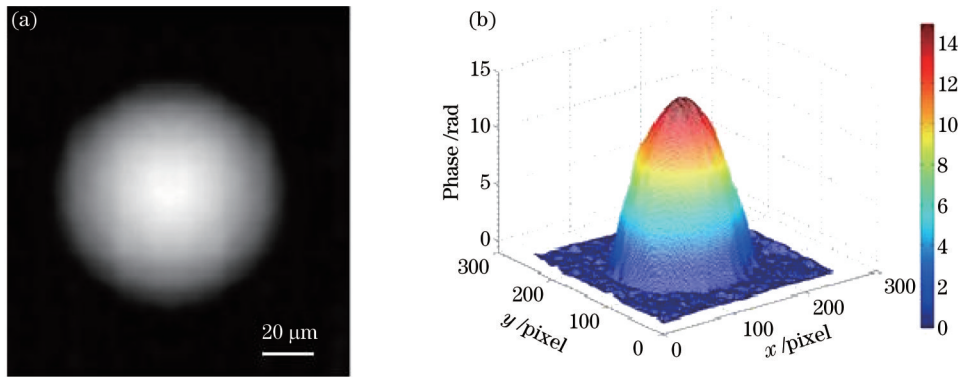


图3 相位恢复分布图。(a) 二维相位分布;(b) 三维相位分布

Fig.3 Phase reconstruction of a polystyrene sphere. (a) 2D phase distribution; (b) 3D phase distribution

### 3.3 结果分析

根据相位恢复方法和计算理论,采用相关实验关联参数为参考值,通过仿真计算,得到结果如图4所示,从图中可以看出,图3(b)与图4(d)的分布特征具有明显的一致性,仿真与实验结果一致。

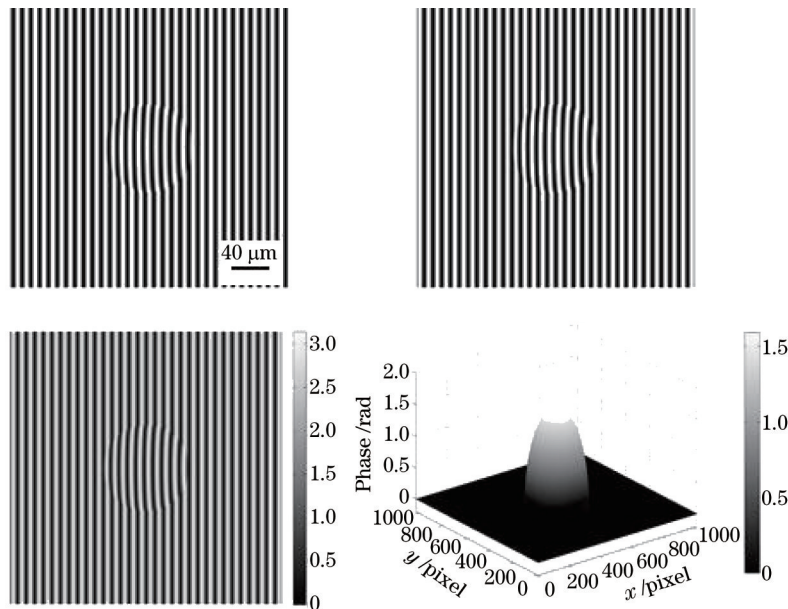


图4 仿真实验结果。(a) 干涉光强分布;(b) 一阶导数分布;(c) 二阶导数分布;(d) 恢复相位三维分布

Fig.4 Simulation results. (a) Distribution of interference intensity; (b) distribution of first derivative;

(c) distribution of second derivative; (d) 3D distribution of phase reconstruction

该方法得到的干涉图像质量不高,图5为Mach-Zehnder干涉显微方法下所得到的同样标准球样品的干涉图,比较图5和图2(c),可以发现,除因空间频率(因角度 $\theta$ 不同)不同外,该方法所得到的图像噪声和畸变比传统方法得到的结果要大,这主要是由于大倍率几何放大,噪声和畸变也被放大;干涉图的基本信息都存在,且信息比较准确,相位恢复的结果也说明了这点。

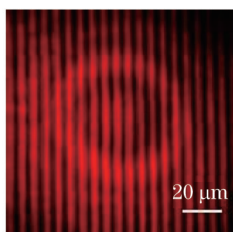


图5 Mach-Zehnder干涉显微实验结果

Fig.5 Interferograms of experiment under Mach-Zehnder method

血细胞的大小一般分布在几微米到几十微米之间,不同类别,大小不同。虽然采用了  $78\ \mu\text{m}$  的样品球,但是不影响方法的应用,因为实际应用中,可观察到细胞基本二维形态的显微镜有 20 倍光学放大率即可。所以提出的方法完全满足细胞的观察。

## 4 结 论

所设计的免物镜相位显微成像系统,其结构简单,不仅充分利用了共光路光学成像系统的稳定特性,而且由于直接利用了光学几何放大的特征,可以将微米量级的相位体清晰成像,从而减除了放大物镜系统所产生的噪声和畸变,在不减弱相位显微成像功能的情况下简化了装置和操作。其仿真与实验结果表明,该方法可行。系统所得到的图像满足相位恢复的技术要求,为相位成像技术的开发研究提供了较好的理论和实验基础。

## 参 考 文 献

- 1 Xu Yuanyuan. A New Method of Phase Extraction, Analysis and Imaging of Blood Cells Based on Optical Holography[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2012.  
徐媛媛. 光全息下血细胞相位提取、分析及其成像的新方法[D]. 镇江: 江苏大学, 2012.
- 2 Xu Yuanyuan, Wang Yawei, Jin Weifeng, *et al.*. Study on phase characteristics of white blood cells and their optical models [J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(5): 0504001.  
徐媛媛, 王亚伟, 金卫凤, 等. 白细胞光学模型及其相位分布特征分析[J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0504001.
- 3 Jin Weifeng, Wang Yawei, Bu Min, *et al.*. Reserch progress in phase microscopy for biological cells[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(3): 417-424.  
金卫凤, 王亚伟, 卜 敏, 等. 生物细胞相位显微技术研究进展[J]. 激光生物学报, 2011, 20(3): 417-424.
- 4 Bu min, Lei Haina, Wang Yawei. New progress on detection of biological cells[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2010, 47(7): 071701.  
卜 敏, 雷海娜, 王亚伟. 生物细胞形态检测光学技术的新进展[J]. 激光与光电子学进展, 2010, 47(7): 071701.
- 5 Xu Yuanyuan, Wang Yawei, Jin Weifeng, *et al.*. New progress on quantitative phase microscopy and phase retrieval for biological cells[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2014, 51(2): 020006.  
徐媛媛, 王亚伟, 金卫凤, 等. 生物细胞定量相位显微技术及相位恢复方法的新进展[J]. 激光与光电子学进展, 2014, 51(2): 020006.
- 6 Gao Peng. Theoretical and Experimental Studies on Commom-Path Interference Microscopy[D]. Beijing: Chinese Academy of Science, 2010.  
部 鹏. 物参共路干涉显微理论和实验研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.
- 7 B Kemper, A Vollmer, C E Rommel, *et al.*. Simplified approach for quantitative phase contrast imaging of living cells[J]. J Biomed Opt, 2011, Chap 6: 215-257.
- 8 Zhu Yue, Gao Wanrong. High-resolution full-field optical coherence tomography for biological tissue[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(8): 0804002.  
朱 越, 高万荣. 全场高分辨生物组织光学层析成像[J]. 中国激光, 2014, 41(8): 0804002.
- 9 N T Shaked, T M Newpher, M D Ehlers, *et al.*. Parallel on-axis holographic phase microscopy of biological cells and unicellular microorganism dynamics[J]. Appl Opt, 2010, 49(15): 2872-2878.
- 10 T Ikeda, G Popescu, R R Dasari, *et al.*. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems[J]. Opt Lett, 2005, 30(10): 1165-1167.
- 11 Kevin J, Chalut, William J Brown, Adam Wax. Quantitative phase microscopy with asynchronous digital holography[J]. Opt

- Express, 2007, 15(6): 3047–3052.
- 12 Natan T Shaked, Matthew T Rinehart, Adam Wax. Dynamic quantitative phase microscopy of biological cells[J]. Conference on Laser and Electro–Optics, 2009: CFA4.
- 13 Natan T Shaked, Matthew T Rinehart, Adam Wax. Dual–interference–channel quantitative–phase microscopy of live cells dynamics[J]. Opt Lett, 2009, 34(6): 767–769.
- 14 J Schwider. Fizeau–type multi–pass Shack–Hartmann–test[J]. Opt Express, 2008, 16(1): 362–372.
- 15 M P Rimmer, J C Wyant. Evaluation of large aberrations using a lateral–shear interferometer having variable shear[J]. Appl Opt, 1975, 14(1): 142–150.
- 16 G Popescu, L P Deflores, J C Vaughan, *et al.*. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics [J]. Opt Lett, 2004, 29(21): 2503–2505.
- 17 G Popescu, T Ikeda, R R Dasari, *et al.*. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics[J]. Opt Lett, 2006, 31(6): 775–778.
- 18 H V Pham, C Edwards, L L Goddard, *et al.*. Fast phase reconstruction in white light diffraction phase microscopy[J]. Appl Opt, 2013, 52(1): A97–A101.

栏目编辑: 张 雁