

基于彩色 CMOS 双波长数字全息显微术的细胞相位定量测量

赵 晖 曾凡创 钟丽云 张道森 范金坪 刘胜德 吕晓旭

华南师范大学广东省微纳光子功能材料与器件重点实验室, 广东 广州 510006

摘要 提出了一种基于彩色 CMOS 的双波长数字全息同轴相移显微系统, 定量分析人体 Jurkat 细胞(人外周血白血病 T 细胞)凋亡过程中的相位变化, 实现了在不进行复杂相位解包裹运算的同时对细胞相位的定量测量。利用 532 nm 和 632.8 nm 两波长的激光, 对人体离体 Jurkat 细胞凋亡过程中的三个状态进行了彩色全息记录, 分别提取出两波长的相位信息, 从而重构细胞相位。实验表明, 该系统下测得的相位与其他方法测得的相位具有较好的一致性, 并且测量量程大, 算法简单, 结果准确。实验结果将为双波长数字全息术用于细胞相位的研究和应用提供参考。

关键词 全息; 双波长数字全息; 同轴相移技术; 相位重构

中图分类号 O436

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP52.070901

Quantitative Measurement of Cell Phase Using Dual-Wavelength Digital Holographic Microscopy with Color CMOS

Zhao Hui Zeng Fanchuang Zhong Liyun Zhang Daosen Fan Jinping

Liu Shengde Lü Xiaoxu

Guangdong Provincial Key Laboratory of Nanophotonic Functional Materials and Devices, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510006, China

Abstract A dual-wavelength on-axis phase-shifting digital holographic microscopy system based on color CMOS is proposed. Phase variations during the apoptosis process of human jurkat cells (human peripheral blood T cell leukemia) are quantitatively measured and analyzed without complex phase unwrapping algorithm. Using laser with wavelengths of 632.8 nm and 532 nm, color holograms at three states during the apoptosis process of jurkat cells *in vitro* are then recorded experimentally. Phase of the cells is reconstructed based on the extracted phase information at each wavelength. The experimental results are consistent with the results obtained by other methods. Moreover, the proposed method described here has wide measurement range and it is simple and accurate. The results indicate that dual-wavelength digital holography is a useful tool for research and application of cell phase.

Key words holography; dual-wavelength digital holography; on-axis phase shifting; phase reconstruction

OCIS codes 090.1995; 170.0180; 100.5088

1 引言

全息干涉测量是一种高精度、非接触、无损伤的光学测量技术, 双波长全息测量术是其中一个重要分支, 早在 1947 年 Forrester 等^[1]就提出可利用两波长的频差形成比原单一波长大的等效波长, 等效波长可达到微米甚至毫米量级。随后, Wyant 等^[2-5]将双波长干涉成功地应用在干涉测量和全息领域。通常在单一波长下, 对于表面起伏大的物体, 现有的相位解包裹算法容易引入误差或者失效。双波长数字全息术测量波长可选, 同时合成波长大于单个波长, 避免了复杂相位解包裹运算, 减少了误差的引入, 具有量程宽、操作简便等优点, 其在表面形貌测量^[6-8]、实时系统测试^[9]、细胞成像^[10-12]、透明介质厚度及折射率测量^[13]等领域都有

收稿日期: 2015-02-02; 收到修改稿日期: 2015-03-22; 网络出版日期: 2015-06-19

基金项目: 国家自然科学基金(61177005, 61275015, 61475048)

作者简介: 赵 晖(1989—), 男, 硕士研究生, 主要从事数字全息和图像处理等方面的研究。E-mail: idzhaohui@qq.com

导师简介: 吕晓旭(1959—), 男, 博士, 教授, 主要从事光学相位测量和数字全息等方面的研究。

E-mail: xiaoxulu48@sina.com(通信联系人)

广阔的应用前景。

在数字全息显微术(DHM)中,干涉全息图通过同轴或离轴的光路系统,被 CCD、CMOS 等图像传感元件采集。为了从全息图中排除背景项和共轭项干扰,离轴系统中采用的是频谱分离法,对获取的全息图做傅里叶变换,提取物光的频谱用于再现其强度和相位,然而此法并不能有效利用探测器空间带宽积,导致物体高频信息可能会丢失^[14]。而同轴系统中干涉角度接近于 0° ,避免了这一问题,使其具有较高的测量精度^[7]。但是,传统双波长同轴数字全息术使用单色 CCD 记录,需要经过多次曝光分别记录两波长全息图,不可避免地会受到振动、气流等因素的影响。随着彩色 CCD、CMOS 性能的提升和发展以及双波长数字全息研究的深入,彩色 CMOS 中存在的色串扰问题也被证明对全息测量系统精度影响不大^[15]。因此,利用彩色相机在同轴光路系统中分别提取多个波长干涉图信息已成为可能^[16-17]。

本文提出一种基于彩色 CMOS 的双波长数字全息显微系统,结合同轴相移术,从彩色全息图中提取两幅单波长全息图,重构物体相位,并实验分析了人体 Jurkat 细胞(外周血白血病 T 细胞)受药物刺激凋亡的三个过程中细胞的相位,结果与单波长下测得的细胞相位具有较好的一致性,同时保留了更多的细胞细节,为生物检测分析提供了一种有效手段。

2 实验原理

在像面数字全息术中,物体通过透镜的成像面正好位于相机的记录面,可以直接通过相机进行全息记录,不需要计算菲涅耳衍射积分就可以重建出物光场的振幅和相位^[18]。得到的光强分布表示为

$$I(x,y) = A + B \cos[\Phi(x,y) + \Delta\varphi], \quad (1)$$

式中 A 为背景光强, B 为调制强度, $\Phi(x,y)$ 为物光场相位, $\Delta\varphi$ 为参考光相位。为了从(1)式中提取出相位信息,运用四步相移技术,控制压电陶瓷产生精确连续的位移,在光路中产生光程的改变,通过调节 $\Delta\varphi$,在相移一个周期内采集 4 幅全息图,每幅图中的参考光相位相差 $\pi/2$,可消除零级衍射光斑和共轭像得到只含有物体信息重构像,从而求得物光场相位为

$$\Phi(x,y) = \arctan \frac{I_4(x,y) - I_2(x,y)}{I_1(x,y) - I_3(x,y)}, \quad (2)$$

式中物光场相位包括了物体相位,背景相位以及其他干扰带来的相位误差。

双波长数字全息术是在单波长数字全息术的基础上多了一个波长进行干涉。由于两波长激光的光强叠加满足非相干叠加的原理,CMOS 采集的光强分布可以表示为

$$I(x,y) = (A_1 + A_2) + B_1 \cos[\Phi_1(x,y) + \varphi_1] + B_2 \cos[\Phi_2(x,y) + \varphi_2]. \quad (3)$$

结合相移技术,从全息图中重构的不同波长的相位进行相减,所得相位可以类比于一个等效波长下的合成相位^[19-20]:

$$\Phi_{\text{eq}} = \Phi_1 - \Phi_2 = 2\pi h \left(\frac{1}{\lambda_1} - \frac{1}{\lambda_2} \right) = \frac{2\pi h}{\Lambda}, \quad (4)$$

式中 h 为光经过物体后产生的光程差(OPD), Λ 为等效波长。

通常情况下,为了消除压电陶瓷的时延和非线性的影响,获得准确的相移,需要使用相移算法从非线性的相移图中提取精确相移量^[21],利用对应相移量的全息图来重构出两波长相位以及合成相位。

Φ_{eq} 存在许多 2π 的相位跳变,因此需要进行相位补偿,以得到等效波长下的正确合成相位:

$$\Phi_{\text{eq}} = \Phi_{\text{eq}} + 2\pi, \quad \Phi_{\text{eq}} < 0. \quad (5)$$

通过选取合适的两波长,使得等效波长大于光经过物体产生的最大光程差,即 $\Lambda > h$,相位图将不再出现包裹。该过程没有复杂的算法,计算量小,可以避免传统解包裹算法在计算物体结构复杂或者表面梯度大时引入的误差,扩展了测量的范围。

3 实验装置及步骤

实验装置如图 1 所示,一个基于马赫-曾德尔光路的双波长共路干涉显微系统,氦氖激光($\lambda_1 = 633 \text{ nm}$)和半导体抽运固体激光($\lambda_2 = 532 \text{ nm}$)作为相干光源,等效波长约为 3340 nm ,光束强度经过中密度滤光片(ND)的衰减,被分光棱镜(BS)分为两束,其中一束经过物体和显微物镜($25\times, NA=0.40$)使物体成像于

CMOS面,另一束作为参考光经过扩束准直(BE)与之干涉,用电脑控制压电陶瓷(PZT)使参考光产生相移,最后被彩色 CMOS 实时记录下来,一次曝光记录两波长信息,从而简化了实验过程以及实验系统带来的人为误差,并且成本低,易于控制。CMOS为市面上摄像头常用的视频录制感光元件,处理芯片为 Vimicro VC0342PLVCE,分辨率为 $640 \text{ pixel} \times 480 \text{ pixel}$,像素尺寸为 $5 \mu\text{m}$ 。由于另一个波长激光的加入,系统结构难免比之前的单波长数字全息结构更加复杂,增加了调节的难度。

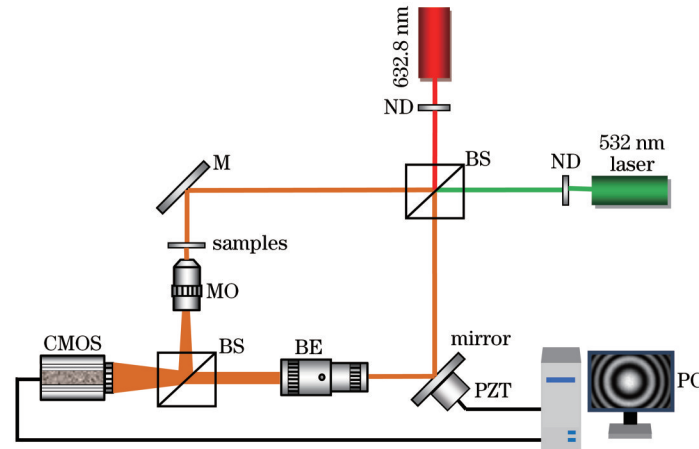


图1 双波长数字全息显微系统装置图

Fig.1 Schematic of dual-wavelength DHM system for quantitative phase measuring

首先用彩色 CMOS 记录一组连续的相移图。通过彩色 CMOS 的不同颜色通道分离 RGB 颜色信息,得到两组分别对应于 632.8 nm (R通道)和 532 nm (G通道)的相移图。随后计算出两组单波长相移图的相移量,进行双波长合成。图 2(a)为实验系统中采集到的一幅包含物体信息的彩色全息图,存储的像素数为 $640 \text{ pixel} \times 480 \text{ pixel}$,每个像素都包含了红、绿、蓝三个颜色通道的灰度信息。图 2(b)为经过 RGB 分离分别得到的 632.8 nm 和 532 nm 波长下一组全息图的其中一张。物体的相位信息(包含物体相位的包裹相位分布)可通过(2)式计算得到,图 2(c)中的包裹相位包含细胞相位、背景相位(显微物镜带来的二次球面相位)以及噪声干扰,用两步补偿法^[22]去除背景相位的干扰,可得到只含物体的包裹相位。

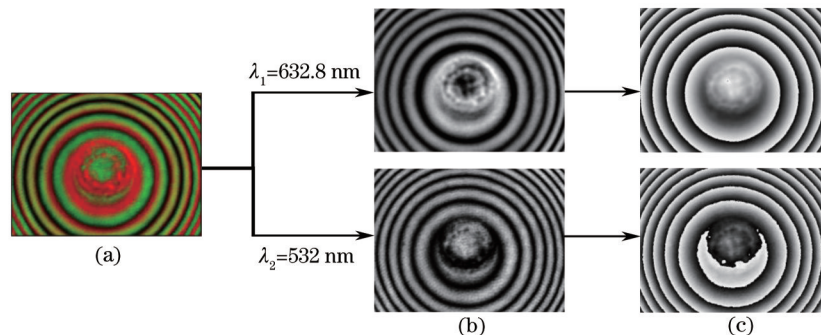


图2 双波长数字全息彩色条纹分析流程。(a)彩色全息图;(b)从图2(a)中分离的全息图;(c)通过四步相移算法重构的包裹相位

Fig.2 Flow chart for dual-wavelength DHM color fringe analysis. (a) Color hologram; (b) holograms separated from Fig.2 (a); (c) wrapped phase map at individual wavelength using 4-step phase shifting algorithm

4 实验结果与分析

鉴于细胞表面形貌测量一直是生物检测领域研究的热点和难点,实验中,正常状态的 Jurkat 细胞用柔红霉素(DNR)进行刺激,诱导其发生凋亡,然后经过磷酸盐缓冲液(PBS)清洗并用多聚甲醛固定细胞形态,制作成正常状态的细胞和用药 48 h 的细胞两个样品。用药 48 h 的样品中既存在正在发生形变的细胞也存在已经凋亡的细胞,因此实验系统可以测量细胞从正常、发生形变到凋亡的多个状态。

实验中标记了三个不同状态下的细胞,记录其全息干涉图样,用于计算细胞相位,并在倒置荧光显微镜(Nikon eclipse Ti-u)下找到这三种细胞用于比较。图 3(a)为从总像素数为 $2560 \text{ pixel} \times 1280 \text{ pixel}$ 的图中截取的细胞显微成像图,其中横向标尺为 $10 \mu\text{m}$,细胞的直径为 $13\sim 18 \mu\text{m}$,显微镜放大倍率为 $60 \times$,像素尺

寸为 $5.2 \mu\text{m}$; 图 3(b) 为 632.8 nm 波长下细胞的包裹相位, 将其与另一波长的包裹相位相减, 处理后可得合成波长下细胞相位如图 3(c) 所示; 图 3(d) 为图 3(c) 对应的三维形貌图, 其中 x, y 轴坐标单位均为像素, z 轴坐标单位为 rad 。从图 3(c)、(d) 中可以看出, 两波长的相位相减会使得合成相位图噪声叠加, 而背景的不平整则是由于激光经过玻片的二次反射及两波长成像位置有略微的偏差带来的, 用小波变换滤波方法来平滑噪声, 保留细节^[23]。以上几组图反映了细胞形貌逐渐变得不规则、细胞破碎、最后细胞发生凋亡的过程。

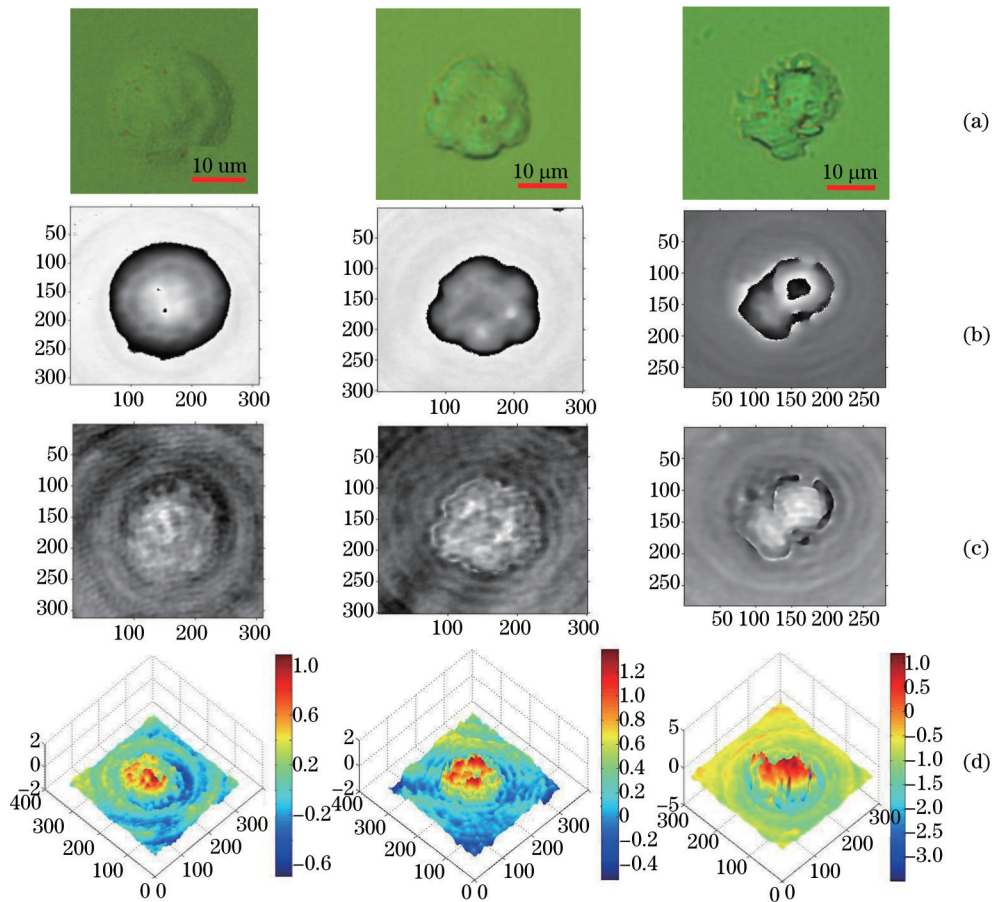


图 3 细胞成像以及系统测量的对应相位。(a) 倒置荧光显微镜拍摄的细胞图; (b) 632.8 nm 下的包裹相位; (c) 双波长合成相位; (d) 细胞三维相位形貌

Fig.3 Cell images and phase maps. (a) Inverted fluorescence microscope images of cells; (b) wrapped phase of cells at 632.8 nm ; (c) dual-wavelength phase; (d) 3D phase maps after median filtering

为说明测量的准确性, 选取第二个状态的细胞做进一步分析, 图 4(a) 对合成波长相位做小波变换滤波处理。图 4(b) 为 632.8 nm 波长下经过最小二乘解包裹方法^[24]得到的细胞相位, 由于细胞相位表面被算法拟合平滑, 细胞表面一些突起的细节已观察不到, 其他解包裹算法对于此类表面起伏大的物体并不能准确进行相位解包裹。根据(8)式将其转换成光程差用于比较, 图 4(c) 为细胞中心截面同一位置的光程差, 三条线分别表示 632.8 nm 、 532 nm 及合成波长下的光程差。

如图 4(c) 所示, 632.8 nm 波长下的 OPD 与 532 nm 下的 OPD 基本吻合, 其均方根差值 RMS 为 46.64 nm , 平均差值为 13.74 nm , OPD 最大值分别为 1253 nm 和 1251 nm , 合成波长与 632.8 nm 的 OPD 均方根差值 RMS 为 232.57 nm , 平均差值为 61.95 nm , 最大高度为 1279 nm 。可以看出, 合成波长细胞相位与单波长下测得的细胞相位具有较好的一致性, 且合成波长细胞相位表面更真实地反映了细胞形貌。

5 结 论

提出了一种基于彩色 CMOS 的双波长相移数字全息显微系统, 从采集的彩色全息图中提取两幅单波长干涉图, 用双波长解包的方法, 对于人体 Jurkat 细胞受药物刺激凋亡过程中的相位变化进行定量测量分析。实验结果表明, 所得细胞相位变化可明显分辨出细胞从受刺激到凋亡破碎的过程, 与单波长下测得的

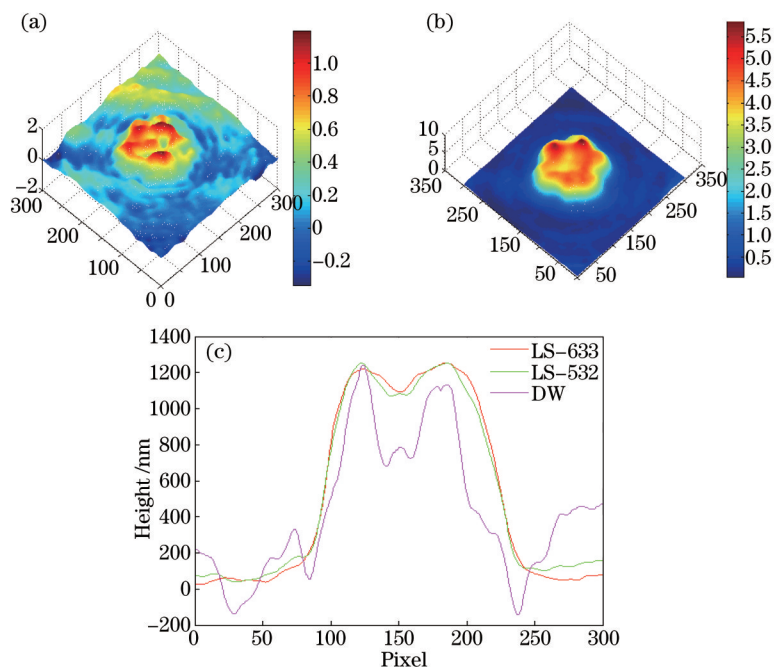


图4 双波长合成相位与单波长相位的比较。(a) 经过小波变换滤波的双波长合成相位;(b) 最小二乘解包的单波长相位;
(c) 光程差截面比较图

Fig.4 Comparison of dual-wavelength and single wavelength phase. (a) Dual-wavelength phase map after wavelet filtering; (b) single wavelength phase map after least-squares phase unwrapping; (c) comparison of OPD cross profile

细胞相位有较好一致性。该系统及方法的主要优点在于保证精度的前提下,增大了全息测量范围,使其能应用于更多的复杂相位对象,为生物检测分析提供了一种有效手段。对于简单物体的相位测量,单波长数字全息仍有更高的测量精度。

参考文献

- 1 A T Forrester, W E Parkins, E Gerjuoy. On the possibility of observing beat frequencies between lines in the visible spectrum[J]. Phys Rev, 1947, 72(8): 728.
- 2 J C Wyant. Testing aspherics using two-wavelength holography[J]. Appl Opt, 1971, 10(9): 2113-2118.
- 3 C Polhemus. Two-wavelength interferometry[J]. Appl Opt, 1973, 12(9): 2071-2074.
- 4 Y Y Cheng, J C Wyant. Multiple-wavelength phase-shifting interferometry[J]. Appl Opt, 1985, 24(6): 804-807.
- 5 C Wagner, W Osten, S Seebacher. Direct shape measurement by digital wavefront reconstruction and multi-wavelength contouring[J]. Opt Eng, 2000, 39(1): 79-85.
- 6 D G Abdelsalam, D Kim. Two-wavelength in-line phase-shifting interferometry based on polarizing separation for accurate surface profiling[J]. Appl Opt, 2011, 50(33): 6153-6161.
- 7 D G Abdelsalam, R Magnusson, D Kim. Single-shot dual-wavelength digital holography based on polarizing separation[J]. Appl Opt, 2011, 50(19): 3360-3368.
- 8 Kou Yunli, Li Enpu, Di Jianglei, *et al.*. Surface morphology measurement of tiny object based on dual wavelength digital holography[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(2): 0209010.
寇云莉, 李恩普, 邸江磊, 等. 利用双波长数字全息术测量微小物体表面形貌[J]. 中国激光, 2014, 41(2): 0209010.
- 9 J Kuhn, T Colomb. Real-time dual-wavelength digital holographic microscopy with a single hologram acquisition[J]. Opt Express, 2007, 15(12): 7231-7242.
- 10 B Rappaz, P Marquet, E Cuche. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy[J]. Opt Express, 2005, 13(23): 9361-9373.
- 11 A Khmaladze, R L Matz, C Zhang. Dual-wavelength linear regression phase unwrapping in three-dimensional microscopic images of cancer cells[J]. Opt Lett, 2011, 36(4): 912-914.
- 12 Wang Yunxin, Wang Dayong, Yang Yishu, *et al.*. Application and analysis in the biomedicine field using digital holographic

- technology[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(2): 0209002.
王云新, 王大勇, 杨怡姝, 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.
- 13 H J Choi, H H Lim. Measurement of refractive index and thickness of transparent plate by dual-wavelength interference [J]. Opt Express, 2010, 18(9): 9429-9434.
- 14 L Xu, X Peng, Z Guo. Imaging analysis of digital holography[J]. Opt Express, 2005, 13(7): 2444-2452.
- 15 M T Rinehart, N T Shaked. Simultaneous two-wavelength transmission quantitative phase microscopy with a color camera [J]. Opt Lett, 2010, 35(15): 2612-2614.
- 16 U P Kumar, N K Mohan, M P Kothiyal. Red-green-blue wavelength interferometry and TV holography for surface metrology [J]. J Opt, 2011, 40(4): 176.
- 17 D S Mehta, V Srivastava. Quantitative phase imaging of human red blood cells using phase-shifting white light interference microscopy with colour fringe analysis[J]. Appl Phys Lett, 2012, 101(20): 203701.
- 18 Zeng Yanan, Wang Fei, Lei Hai, *et al.*. Surface profile measurement of microstructures based on dual-wavelength digital microscopic image-plane holography[J]. Acta Optica Sinica, 2013, 33(10): 1009001.
曾雅楠, 汪飞, 雷海, 等. 双波长数字显微像面全息术测量微结构表面形貌[J]. 光学学报, 2013, 33(10): 1009001.
- 19 D Parshall, M Kim. Digital holographic microscopy with dual-wavelength phase unwrapping[J]. Appl Opt, 2006, 1(2): 451-459.
- 20 Wang Yujia, Jiang Zhuqing, Gao Zhirui, *et al.*. Investigation on phase unwrapping in dual wavelength digital holography[J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(10): 1009001.
王羽佳, 江竹青, 高志瑞, 等. 双波长数字全息相位解包裹方法研究[J]. 光学学报, 2012, 32(10): 1009001.
- 21 Z Y Wang, B T Han. Advanced iterative algorithm for phase extraction of randomly phase-shifted interferograms[J]. Opt Lett, 2004, 29(14): 1671-1673.
- 22 P Ferraro, S De Nicola, A Finizio. Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging[J]. Appl Opt, 2003, 42(11): 1938-1946.
- 23 N Escalante, J Villa, I Rosa. 2-D continuous wavelet transform for ESPI phase-maps denoising[J]. Opt Laser Eng, 2013, 51(9): 1060-1065.
- 24 M D Pritt, J S Shipman. Least-squares two-dimensional phase unwrapping using FFT's[J]. IEEE Trans Geosci Remote Sens, 1994, 32(3): 706-708.

栏目编辑: 吴秀娟