基于两步相移的非相干数字全息显微技术

李滢滢^{1,2},秦 琬³,高 志³,彭 翔¹

1深圳大学光电工程学院教育部/广东省光电子器件与系统重点实验室,广东 深圳 518060;

2深圳职业技术学院电子与通信工程学院,广东深圳 518055;

3美国克莱姆森大学生物工程系,南卡罗来纳州 克莱姆森 29634,美国

摘要 基于小波变换抑制偏置量,并利用初始图像消除噪声,进行非相干全息两步相移重现。给出了全息图重现 及抑制偏置量计算的具体表达式。实验搭建了基于空间光调制器的非相干数字全息显微系统,给出基于三步相移 技术和两步相移技术的数字全息图和重现结果,并对比了两种不同方法的两步相移重现结果。对荧光显微颗粒拍 摄了两张全息图,并在不同平面实现了数字重聚焦。两步相移相比三步相移成像速度大大提高,为活体细胞动态 三维成像提供可能。实验结果表明利用小波变换及初始图像能够更有效地抑制偏置量并消除噪声,在不增加相移 次数的前提下,提高两步相移的再现像质量。

关键词 全息;非相干全息;小波变换;两步相移;荧光全息显微 中图分类号 O438 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP54.040901

Two-Step Phase-Shifting Based Incoherent Digital Holographic Microscopy

Li Yingying^{1,2}, Qin Wan³, Gao Zhi³, Peng Xiang¹

¹Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronics Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China;

 $^{\rm 2}$ School of Communication Engineering, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

³ Department of Bioengineering, Clemson University, Clemson, South Carolina 29634, USA

Abstract Two-step phase-shifting based on wavelet transform to suppress bias term is reported, and the initial image is used to eliminate background noise. Specific forms of reconstructing hologram and suppressing bias term are given. An incoherent digital holographic microscopy system based on spatial light modulator is built and the holograms and reconstruction results of both three-step phase-shifting and two-step phase-shifting are given. Reconstruction results of the two methods are compared. Experiment captures two holograms of the microscopic fluorescent beads which realize digital reconstruction in different planes using the method presented in this paper. Two-step phase-shifting significantly enhances imaging speed compared to three-step phase-shifting, and provides the possibility to image 3D living cells dynamically. The result shows that wavelet transform can suppress bias term more effectively. We improve the quality of reconstructed image by two-step phase-shifting without increasing the phase-shifting step.

Key words holography; incoherent holography; wavelet transform; two-step phase-shifting; fluorescent holographic microscopy

OCIS codes 090.1995; 180.2520; 110.6880; 070.2025; 210.4770

收稿日期: 2016-11-30; 收到修改稿日期: 2016-12-21

基金项目:国家自然科学基金(61377017,61201355)

作者简介:李滢滢(1985-),女,博士研究生,讲师,主要从事全息显微镜、三维数字成像方面的研究。

E-mail: coolwind85@szpt.edu.cn

导师简介:彭 翔(1955—),男,教授,博士生导师,主要从事三维成像与造型、光学成像与测量、光学信息安全等方面的 研究。E-mail: xpeng@szu.edu.cn(通信联系人)

1 引 言

由于全息技术可以记录物体的三维结构,因此在很多领域得到了广泛的应用^[1+9]。传统的全息技术一般 使用相干光源以获得全息图,而荧光属于非相干光源,因此全息技术往往很难应用于荧光物体的三维成像。 近年来,随着计算机、高分辨率 CCD 和空间光调制器(SLM)的发展,数字全息术受到越来越多的关注^[2+14]。 Rosen 等^[3+4]于 2007 年提出利用空间光调制器分光的菲涅耳非相干相关数字全息术(FINCH)。FINCH 可 以用于记录非相干光源的三维信息,其基本思想是非相干光源照明下的物体表面可看作无数空间非相干点 源的集合,每个点发出的球面波经分光系统分成两束自相干光,干涉图案为点源全息图,所有点源全息图的 非相干叠加形成物体的全息图。空间光调制器作为系统的分光元件和相移元件,将来自于物体表面的光分 成两束传播方向相同但曲率半径不同的光,用 CCD 拍摄三张不同相移的全息图,然后在计算机中进行数值 处理并模拟菲涅耳衍射实现物光场的三维再现。通过这种方法可以搭建一个非相干数字全息显微镜,可以 用来记录荧光样品的高分辨率的三维信息,而不需要进行扫描。目前 FINCH 系统广泛应用于 3D 荧光物体 的多色全息成像^[4+17-19]、3D 显微成像^[5+8]和基于菲涅耳元件的合成孔径系统^[9-11]。

FINCH显微镜一般采用三步相移以消除共轭像和偏置量,这种方式需要采集三幅不同相位的全息图, 限制了对活细胞等运动物体进行动态三维成像的可能性。Wan等^[13]于 2014 年提出采用汉宁滤波器抑制偏 置量的两步相移重现方法^[15-16],仅采集两幅全息图便可进行全息重现。但这种方法噪声抑制效果较差,再现 像质量相比传统的三步相移大大降低。小波变换可以逐层分离图像高频和低频信息,是处理数字全息图的 最佳工具^[20-25]。因此,本文提出了基于小波变换计算偏置量,并利用初始图像消除噪声,在不增加相移次数 的前提下,提高两步相移的再现像质量。搭建了非相干数字全息显微系统,给出了基于三步相移技术和两步 相移技术的数字全息图和重现结果,并对比了文献[13]方法与本文方法的重现结果。实验对荧光显微颗粒 拍摄了两张全息图,并基于本文方法在不同平面实现了数字重聚焦。结果表明利用小波变换及初始图像能 够更有效地抑制偏置量并消除噪声,进一步提高两步相移技术的再现像质量。

2 原 理

基于相移的 FINCH 显微镜实现目前有多种方法,包括平面波叠加球面波的方式^[3],不同曲率的双球面 波叠加方式^[7]和偏振的方式^[8]。提出的两步相移技术适用于以上任何一种 FINCH 显微镜。以平面波叠加 球面波的方式为例,说明如何仅记录两幅全息图即可重现三维荧光物体的信息。

SLM 的理想反射方程的数学表达式为

$$R(x,y) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2}Q(-1/f_{d})\exp(i\theta) , \qquad (1)$$

式中 $Q(-1/f_d) = \exp[-i\pi(x^2 + y^2)/(\lambda f_d)]$ 表示波长为 λ 时焦距为 f_d 的菲涅耳透镜,常数1/2表示平面 波的调制, θ 是相移参数。SLM 加载的相位模板如图1(a)所示。

假定有一个三维荧光物体 $p(x_p, y_p, z_p)$ 在物镜的工作距离 f_0 处。 CCD 记录的全息图为

$$H(x,y) = A_{0} \left\{ D + \exp(\mathrm{i}\theta) \iiint p(x_{p}, y_{p}, z_{p}) \times \exp\left\{ \frac{\mathrm{i}\pi}{\lambda z_{r}} \left[(x - x_{r})^{2} + (y - y_{r})^{2} \right] \right\} dx_{p} dy_{p} dz_{p} + \exp(-\mathrm{i}\theta) \iiint p(x_{p}, y_{p}, z_{p}) \times \exp\left\{ \frac{-\mathrm{i}\pi}{\lambda z_{r}} \left[(x - x_{r})^{2} + (y - y_{r})^{2} \right] \right\} dx_{p} dy_{p} dz_{p} \right\},$$
(2)

式中 A₀为常数,在重建过程中可被忽略,D 是由 SLM 反射后的两束曲率不同的物光强度之和,(x_r,y_r)是 重现像的横坐标,z_r是重现距离,与物体的深度信息相关。(2)式可以分为偏置量,共轭像和物像三部分。 其中后两部分分别代表了三维物体的实像和虚像。

在 SLM 加载相位模板之前,先采集一幅初始图像。SLM 未加载相位模板时,其作用相当于平面反射镜,将未经聚焦的物光波直接反射至 CCD 上。然后在 SLM 上加载两次相位不同的相位模板,分别采集两幅 全息图。具体全息重现由以下三个步骤完成:

1)将记录的全息图减去初始图像,假设相减后的全息图为 $H_{s}(x,y)$;

2) 采用小波变换抑制 $H_s(x,y)$ 的偏置量。假设抑制偏置量后的全息图为 $H'_s(x,y)$;

3) 将抑制偏置量后的全息图 $H'_{1s}(x,y)$ 和 $H'_{2s}(x,y)$ 进行两步相移计算,得到重现结果。

采用二维离散小波变换抑制全息图中的低频偏置量,对相减后的全息图 H_s(x,y)进行适当层次的小波分解。

$$H_{LL}^{l}[i,j] = \sum_{x,y} h(x)h(y)H^{l-1}(2i-x,2j-y), \qquad (3)$$

$$D_{\rm LH}^{l}[i,j] = \sum_{x,y} h(x)g(y)H^{l-1}(2i-x,2j-y), \qquad (4)$$

$$D_{\rm HL}^{l}[i,j] = \sum_{x,y} g(x)h(y)H^{l-1}(2i-x,2j-y), \qquad (5)$$

$$D_{\rm HH}^{l}[i,j] = \sum_{x,y} g(x)g(y)H^{l-1}(2i-x,2j-y), \qquad (6)$$

式中 h(x)相当于低通滤波器,g(x)相当于高通滤波器,l=1,2,3,…,N 表示小波分解层数。H⁽⁻¹表示上一层的小波分解图像;H_{LL}表示水平低通且垂直低通的子图像,D_{LH}表示水平低通且垂直高通的子图像,D_{HL}表示水平高通且垂直低通的子图像,D_{HH}表示水平高通且垂直高通的子图像。分解一次可得到一个近似子带和若干细节子带,分解多次后再有选择性地进行小波重构即可抑制偏置量。所谓有选择性地重构,即在重构中仅用细节子带中的系数重构而舍去最高层次分解后得到的近似子带,这样可以很好地滤除低频成分而保留高频成分,从而得到去除偏置量后的全息图。

在两步相移中,记录两幅相位不同的全息图 θ_1 和 θ_2 , θ_1 可以任意选择, $\theta_2 = \pi/2 + \theta_1$ 。根据文献[13]的 两步相移方法可以得到消除偏置量和共轭像之后的复值全息图:

$$H_{\mathrm{F}}(x,y) = H'_{1\mathrm{s}}(x,y) + \mathrm{i}H'_{2\mathrm{s}}(x,y) \cong$$

$$\iint p(x_{\mathrm{p}},y_{\mathrm{p}},z_{\mathrm{p}}) \times \exp\left\{\frac{\mathrm{i}\pi}{\lambda z_{\mathrm{r}}}\left[(x-x_{\mathrm{r}})^{2} + (y-y_{\mathrm{r}})^{2}\right]\right\} \mathrm{d}x_{\mathrm{p}}\mathrm{d}y_{\mathrm{p}}\mathrm{d}z_{\mathrm{p}}.$$
(7)

物体的三维信息重建公式为

$$p'(x_{\rm p}, y_{\rm p}, z_{\rm p}) = H_{\rm F}(x, y) * \exp\left[\pm \frac{i\pi}{\lambda z_{\rm r}} (x^2 - y^2)\right],$$
(8)

式中*表示二维卷积运算。

3 实 验

荧光全息显微系统如图 1 所示。荧光全息显微系统由物镜,滤光片组,水银弧光灯,SLM 和 CCD 组成。 激发光源采用宽场荧光显微镜激发光源系统(X-Cite 120Q),样品采用荧光聚合体显微颗粒(48 μ m,最大激 发波长 468 nm,最大发射波长 508 nm,Duke Scientific 公司)。激发滤光片(MDF-FITC,475/35,Thorlabs 公 司)被用于选择激发波长 475 nm,激发样品荧光的中心波长为 508 nm。样品荧光经过一个远心显微物镜 (Motic EF-N Plan,10×,NA=0.25),再经过二向色分光镜(MDF-FITC,470~490 nm/508~675 nm,Thorlabs 公司)和发射滤光片(MDF-FITC,530/43,Thorlabs 公司),到达 SLM (PLUTO NIR2,1080 pixel×1920 pixel, Holoeye 公司)上,再经由 SLM 反射到达 EMCCD 相机(AndoriXon+,14 bit,1024 pixel×1024 pixel,13 μ m²)。

FINCH显微镜的工作流程简述如下,FINCH显微镜原理请参考文献[5]。SLM上加载一个相位模板, 该相位模板包含两种不同曲率的衍射透镜,其中一个无穷远聚焦。物体上每个点发出的波面,经 SLM 反射 后被分成了两个自相干但曲率不同的波面。这两个波面沿着相同的方向传播到相机上,并且在 CCD 上相干 成像。每一点产生的相干图样都是一个菲涅耳全息图。物点的深度信息通过菲涅耳全息图的条纹密度来体 现,横向信息通过条纹图样的横向位置直接体现,因此在不使用任何扫描装置和移动部件的条件下即可获取 样品的三维信息。不同物点产生的多个菲涅耳全息图非相干叠加在一起。为了消除每一个菲涅耳全息图的 共轭像和偏置量,需要在 SLM 上加载不同相位的模板,然后记录多幅相移全息图。

为了利用荧光显微系统观测样品,如图 1(b)所示,将荧光聚合体显微颗粒加入液体的聚二甲基硅氧烷 (PDMS)基底中,并混合均匀,然后加入固化剂(比例 10:1)。当 PDMS 混合物固化之后,荧光显微颗粒被随 机固定在 PDMS 的任意位置任意深度中。



图 1 荧光全息显微系统。(a)SLM 上加载的相位模板;(b)荧光样品

Fig. 1 Fluorescent holographic microscopy system. (a) Phase map loaded on SLM; (b) fluorescent sample

3.1 两步相移及三步相移的全息记录与重现

为对比两步相移与三步相移的重现结果,首先采用传统的三步相移的方法对样品进行全息记录。分别 在相位常数 θ 为 0°,120°,240°时采集样品全息图并进行基于三步相移的全息重现。对于同一样品,先在 SLM 加载相位模板之前,采集一幅初始图像,再分别于相位常数 θ 为 0°,90°时采集样品全息图,并采用文献 [13]的方法进行基于两步相移的全息重现,如图 2 所示。其中图 2(a)为 SLM 加载相位模板之前采集的初 始图像,图 2(b)是 SLM 加载相位常数 θ 为 0°的相位模板时采集的全息图,图 2(c)为常规的荧光显微镜观察



图 2 三步相移和两步相移重现结果对比。(a)初始图像;(b) θ=0°时的全息图;(c)常规荧光显微镜的观测结果; (d)传统的三步相移重现结果;(e)文献[13]方法的两步相移重现结果;(f)本文方法的两步相移重现结果 Fig. 2 Result comparison between three-step phase-shifting and two-step phase-shifting. (a) Initial image;
(b) hologram captured when θ=0°; (c) regular fluorescence image under microscope; (d) three-step phase-shifting reconstructed result; (e) reconstruction result of two-step phase-shifting using method in Ref. [13]; (f) reconstruction result of two-step phase-shifting using method presented in this paper 的样品,图 2(d)是三步相移的重现结果,图 2(e)是采用文献[13]方法的两步相移重现结果。

从图 2 可以看到,由于文献[13]的方法仅使用汉宁滤波器来滤除全息图中的低频偏置量,对全息图频率 划分过于粗糙,无法对采集到的全息图像进行细分。估计偏置量时,若滤波器窗口选择过大,则容易损失再 现像中部分物体的信息,若滤波器窗口选择过小,则容易保留过多的偏置量未消除,最终变成再现像中的背 景噪声。同时,除了偏置量,由于实验环境及光学系统中的灰尘等影响,采集的全息图像中还存有部分高频 背景噪声,这些高频噪声仅用汉宁滤波器也无法去除。小波变换对高频成分采用由粗到细渐进的时空域上 的取样间隔,可以逐层分离图像高频和低频信息,对全息图像的频率划分更为细致,可以根据实验噪声情况 及被测物特征有选择性地进行小波重构,能够更有效地分离偏置量和被测物信息。

按照本文的两步相移方法,首先用采集的全息图减去初始图像,然后采用小波变换对相减后的全息图进 行逐层分解。重构时选择性地采用细节子带中的系数重构而舍去最高层次分解的近似子带中的系数,可以 很好地滤除低频成分而保留高频成分,从而对偏置量进行有效抑制。最后将抑制偏置量后的两幅全息图进 行两步相移计算,得到重现结果,如图 2(f)所示。可以看到,采用本文方法可以更有效地抑制偏置量并消除 背景噪声,大大提高了两步相移的再现像质量。

3.2 基于两步相移技术在不同距离的聚焦重现

为了验证本文方法的有效性,实验时采集两幅样品全息图,并采用本文方法在不同平面上重现三维荧光 样品信息,实现了样品不同部分的数字重聚焦,如图 3 所示。图 3(a)是常规荧光显微镜下观察到的荧光颗 粒,图 3(b)、(c)分别为不同衍射距离的重现图。可以看到,在不同衍射距离上进行重现,可以对不同深度的 荧光颗粒聚焦。图中箭头所指的位置即聚焦的荧光显微颗粒。实验证明本文方法可有效记录物体的三维信 息并予以重现。



图 3 不同衍射距离的重现结果(箭头标明当前聚焦的荧光颗粒的位置)。(a)常规荧光显微镜的观测结果; (b)(c)不同衍射距离上的重现结果

Fig. 3 Reconstructed images with different diffraction distances (arrows indicate locations of different fluorescent beads in focus). (a) Regular fluorescence image under microscope; (b)(c) reconstructed images for different diffraction distances

4 结 论

基于小波变换抑制偏置量,并利用初始图像消除噪声,进行非相干全息两步相移重现。相对于使用汉宁 滤波器来估计全息图中的低频偏置量,小波变换可以逐层分离图像高频和低频信息,对全息图像的频率划分 更为细致,能够更有效地分离偏置量和被测物信息。同时,由实验环境和光学系统中的灰尘所带来的高频噪 声,利用初始图像也在一定程度上有所消除。值得注意的是,尽管小波变换抑制偏置量已经较为理想,但是 始终无法完全滤除包括干扰、杂质在内的所有背景噪声。由于两步相移仅采集两幅全息图,因此两步相移的 再现像信噪比相对于三步相移有所降低。两步相移相比三步相移成像速度大大提高,为活体细胞动态三维 成像提供可能。实验结果表明利用小波变换及初始图像能够更有效地抑制偏置量并消除噪声,在不增加相 移次数的前提下,提高两步相移的再现像质量。

参考文献

[1] Gabor D. A new microscopic principle[J]. Nature, 1948, 161(4098): 777.

- [2] Garcia-Sucerquia J, Xu W, Jericho S K, et al. Digital in-line holographic microscopy [J]. Applied Optics, 2006, 45 (5): 836-850.
- [3] Rosen J, Brooker G. Digital spatially incoherent Fresnel holography[J]. Optics Letters, 2007, 32(8): 912-914.
- [4] Rosen J, Brooker G. Fluorescence incoherent color holography[J]. Optics Express, 2007, 15(5): 2244-2250.
- [5] Rosen J, Brooker G. Non-scanning motionless fluorescence three-dimensional holographic microscopy [J]. Nature Photonics, 2008, 2(3): 190-195.
- [6] Rosen J, Katz B, Brooker G. Fresnel incoherent correlation hologram a review[J]. Chinese Optics Letters, 2009, 7 (12): 1134-1141.
- [7] Katz B, Rosen J, Kelner R, et al. Enhanced resolution and throughput of Fresnel incoherent correlation holography (FINCH) using dual diffractive lenses on a spatial light modulator (SLM)[J]. Optics Express, 2012, 20(8): 9109-9121.
- [8] Brooker G, Siegel N, Wang V, et al. Optimal resolution in Fresnel incoherent correlation holographic fluorescence microscopy[J]. Optics Express, 2011, 19(6): 5047-5062.
- [9] Katz B, Rosen J. Could SAFE concept be applied for designing a new synthetic aperture telescope[J]. Optics Express, 2011, 19(6): 4924-4936.
- [10] Kashter Y, Rosen J. Enhanced-resolution using modified configuration of Fresnel incoherent holographic recorder with synthetic aperture[J]. Optics Express, 2014, 22(17): 20551-20565.
- [11] Katz B, Rosen J, Kelner R, *et al*. Enhanced resolution and throughput of Fresnel incoherent correlation holography (FINCH) using dual diffractive lenses on a spatial light modulator (SLM)[J]. Optics Express, 2012, 20(8): 9109-9121.
- [12] Yamaguchi I, Zhang T. Phase-shifting digital holography[J]. Optics Letters, 1997, 22(16): 1268-1270.
- [13] Qin W, Yang X Q, Li Y Y, et al. Two-step phase-shifting fluorescence incoherent holographic microscopy[J]. Journal of Biomedical Optics, 2014, 19(6): 0605003.
- [14] Wan Q, Yang X Q, Wang Y R, et al. Fast fluorescence holographic microscopy[C]. SPIE, 2014, 8949: 89491W.
- [15] Meng X F, Cai L Z, Xu X F, et al. Wavefront reconstruction by two-step generalized phase-shifting interferometry[J]. Optics Communications, 2008, 281(23): 5701-5705.
- [16] Meng X F, Cai L Z, Xu X F, et al. Two-step phase-shifting interferometry and its application in image encryption[J]. Optics Letters, 2006, 31(10): 1414-1416.
- [17] Wan Yuhong, Man Tianlong, Tao Shiquan. Imaging characteristics and research progress of incoherent holography[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(2): 0209004.
 万玉红,满天龙,陶世荃.非相干全息术成像特性及研究进展[J].中国激光, 2014, 41(2): 0209004.
- [18] Liu Yingchen, Fan Jinping, Zeng Fanchuang, et al. Recording, reconstruction and realization of white-light Fresnel incoherent digital holography[J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(10): 1009002.
 刘英臣,范金坪,曾凡创,等. 白光菲涅耳非相干数字全息的记录、再现及实现[J]. 中国激光, 2013, 40(10): 1009002.
- [19] Shi Xia, Zhu Wufeng, Yuan Bin, et al. Experimental study of the incoherent digital holography[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(12): 1209003.

石 侠,朱五凤,袁 斌,等.非相干光照明数字全息实验研究[J].中国激光,2015,42(12):1209003.

[20] Huang Jingjing, Chen Wenjing, Su Xianyu, et al. Application of wavelet transform in modulation measurement profilometry[J]. Acta Optica Sinica, 2016, 36(7): 0707001.

黄静静,陈文静,苏显渝,等.小波变换在调制度测量轮廓术中的应用[J].光学学报,2016,36(7):0707001.

 [21] Li Qingzhong, Liu Qing. Adaptive enhancement algorithm for low illumination images based on wavelet transform[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(2): 0209001.

李庆忠,刘 清.基于小波变换的低照度图像自适应增强算法[J].中国激光,2015,42(2):0209001.

[22] Wang Cunshuai, Zhang Yinke, Hao Jinbo, *et al*. Improving reconstruction image quality of digital holography using median filter and intensity subtraction[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2011, 48(12): 120901.
 王存帅,张引科,郝劲波,等. 用中值滤波和光强相减法改善数字全息再现像质量[J]. 激光与光电子学进展, 2011, 48(12): 120901.

- [23] Wang Liang, Feng Shaotong, Nie Shouping, *et al*. Improving the reconstructed image quality of the digital holography through multiscale transform[J]. Journal of Optoelectronics Laser, 2007, 18(5): 625-628.
 王 亮, 冯少形, 聂守平, 等.利用多尺度变换提高三维物体数字全息再现像质量[J].光电子 激光, 2007, 18(5): 625-628.
- [24] Zeng Taiying, Shao Xue, Wang Zuhui, *et al*. No-reference blur image quality assessment based on local discrete wavelet transform[J]. Journal of Optoelectronics Laser, 2016, 12(7): 754-760.
 曾台英,邵 雪,汪祖辉,等.基于局部离散小波变换的无参考模糊图像质量评价方法[J].光电子 激光, 2016, 12 (7): 754-760.
- [25] Xu Dongying, Li Sikun, Wang Xiangzhao, *et al*. Wavelet ridge extraction method employing a cost function in two-dimensional wavelet transform profilometry[J]. Acta Optica Sinica, 2016, 36(4): 0412006.
 徐东瀛,李思坤,王向朝,等. 基于评价函数的二维小波变换轮廓术小波脊提取方法[J]. 光学学报, 2016, 36(4): 0412006.