

基于相移技术的显微数字全息重构细胞相位*

钱晓凡 张 磊 董可平

(昆明理工大学理学院, 昆明 650051)

摘 要 介绍了用显微镜物镜、压电陶瓷和 CCD 建立的一套测量细胞相位的显微数字全息光路, 基于相移技术, 给出了重构相位的理论分析, 并用洋葱磷片叶细胞作为测试样品, 完成了测量细胞相位的实验. 结果表明: 该系统可以完成细胞相位重构, 系统分辨率不低于 $1 \mu\text{m}$.

关键词 显微数字全息; 相位重构; 细胞; 相移技术

中图分类号 O436.1 **文献标识码** A

0 引言

光学显微镜是观察生物组织最常用的观测仪器, 但只能得到光强分布, 且光学显微镜的成像焦深短, 每次聚焦只能获取物体的二维图像, 对样品的厚度、位置以及多层细胞的观测非常困难; 光学断面显微镜和激光扫描共焦显微镜可以进行三维观测^[1~4], 但由于是采用机械调节光学系统或样品来调焦, 致使观测系统非常复杂, 且对样品厚度和位置的测量麻烦费时; 电子显微镜由于价格昂贵、不能观测活细胞、样品制作困难、测量过程比较麻烦等原因, 限制了它的应用. 因此, 寻找一种高分辨率、能同时测量细胞相位、位置和数量的显微观测方法, 对生物组织的观测、研究是非常有意义的.

目前获得细胞相位信息主要的方法有相衬显微

镜和数字全息技术^[1~4], 本文基于相移技术设计了一套显微数字全息细胞相位测量系统, 可以很好地去除共轭像和零级像^[12~14], 最终测量细胞的相位变化, 希望待弄清相位变化与生物体组织结构和形貌关系后, 获得建立测量细胞三维形貌的新方法.

1 测量系统光路

图 1 是测量系统图. 考虑到生物组织一般透明度较高, 因此将光路设计为透射型的. He-Ne 激光束(波长 $\lambda = 632.8 \text{ nm}$)经分束镜 BS_1 后分成两束, 其中一束经反射镜 M 照射到样品上, 显微物镜(焦距为 f , 放大倍数为 m)将透射光投射到光电耦合器 CCD 上; 另一束通过扩束透镜 BE 和针孔滤波器 h 后, 经准直透镜 L 变为平行光束, 由压电陶瓷管驱动的反光镜 $PZT M$ 和分束镜 BS_2 反射到 CCD 上,

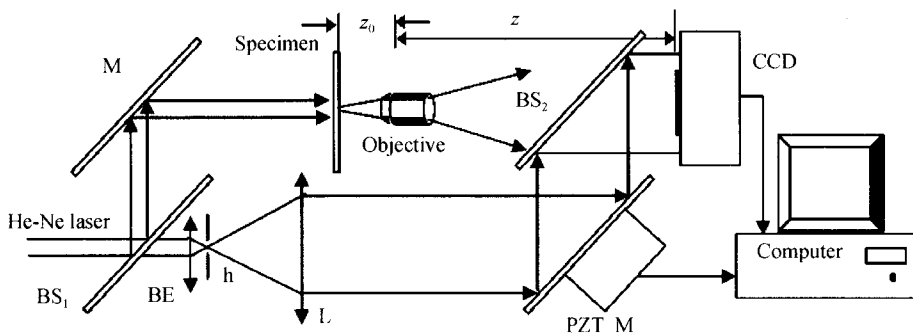


图 1 数字显微全息光路
Fig. 1 Schematic of digital holographic microscope

作为记录参考光.

2 光场记录理论分析

图 2 是全息记录坐标. (x_0, y_0) 是物平面, (p, q) 是孔径平面(物镜), 用 $p(p, q)$ 表示其孔径函数, (x, y) 是全息面, 用 CCD 记录. z_0 和 z 分别对应物到透镜、透镜到全息面的距离. He-Ne 激光的波长和波数分别记为 λ 和 k , $R(x, y)$ 是记录参考光场.

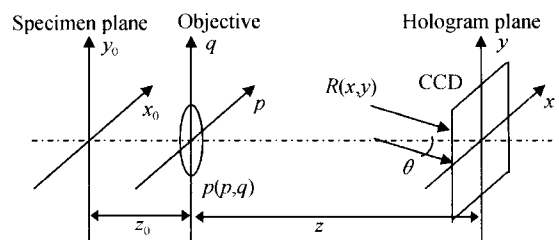


图 2 全息记录坐标
Fig. 2 Schematic of holographic recording coordinates

设透明样品的折射率为 n , 样品在坐标 (x_0, y_0) 处的厚度为 $h(x_0, y_0)$, 透射率为 $\gamma(x_0, y_0)$, 则光线通过样品后的位相将延迟

* 云南省教育厅科研基金(03Y225A)资助
Tel: 0871-3112036 Email: qianxiaofan1@sina.com
收稿日期: 2006-02-21

$$\Delta\phi(x_0, y_0) = (2\pi/\lambda)(n-1)h(x_0, y_0) \quad (1)$$

设平行光垂直投射到达样品时的复振幅为:

$A_0 \exp(j\phi_0)$, 于是, 从样品出射的光场可以表示为

$$U_0(x_0, y_0) = A_0 \gamma(x_0, y_0) \exp[j\phi_0 + j\Delta\phi(x_0, y_0)] \quad (2)$$

到达物镜前表面时的光场分布为

$$U(p, q) = [\exp(jkz_0)/j\lambda z_0] U_0(x_0, y_0) \cdot$$

$$\exp[jk \frac{(p-x_0)^2 + (q-y_0)^2}{2z_0}] dx_0 dy_0 \quad (3)$$

经物镜变换后, 在物镜后表面的光场分布为

$$U'(p, q) = U(p, q) p(p, q) \exp(-jk \frac{p^2 + q^2}{2f}) \quad (4)$$

最后, 光场经衍射在全息面 CCD 上的光场分布为(为方便而不失合理性, 取 $p(p, q) = 1$)

$$U(x, y) = \frac{\exp(jkz)}{j\lambda z} \iint U'(p, q) \exp[jk \frac{(x-p)^2 + (y-q)^2}{2z}] dpdq = -\frac{\exp[jk(z+z_0)]}{\lambda^2 z z_0} \iint U_0(x_0, y_0) \cdot \exp(-jk \frac{p^2 + q^2}{2f}) \exp[jk \frac{(p-x_0)^2 + (q-y_0)^2}{2z_0}] \exp[jk \frac{(x-p)^2 + (y-q)^2}{2z}] dpdq dx_0 dy_0 \quad (5)$$

如果满足成像共轭条件: $z_0^{-1} + z^{-1} = f^{-1}$, 则式(5)变为

$$U(x, y) = \frac{\exp[jk(z+z_0)]}{m} \exp(-jk \frac{x^2 + y^2}{2mf}) U_0(\frac{x}{m}, \frac{y}{m}) \quad (6)$$

这就是 CCD 平面上光场的复振幅分布, 其中放大倍数 $m = -z/z_0$.

从式(6)可以看出, 在满足成像共轭条件的情况下, 像面上光场的分布与物面上的光场分布总体上是一样的, 除坐标缩放外, 只是新叠加上了两个相位, 其中第一个相位是常量, 可以不考虑. 而第二项是球面波的相位, 由于 $mf = -fz/z_0 = z - f$, 所以这个球面波是从焦点上发出的, 这与阿贝成像原理是吻合的. 在实际测量物光场的相位时, 该球面波的相位必须从总的相位中扣除.

3 四步相移法计算相位

设全息面上的物光场和参考光场分别为 $U(x, y)$ 和 $R(x, y) = R_0(x, y) \exp[j\delta_0(x, y)]$, 则记录的总光强 $I(x, y)$ 为

$$I(x, y) = |R(x, y) + U(x, y)|^2 = a(x, y) + b(x, y) \cos[\phi(x, y) - \delta_0(x, y)] \quad (7)$$

式中 $\phi(x, y)$ 和 $\delta_0(x, y)$ 分别是物光场和参考光场在 x, y 处的相位. 当采用四步相移法(参考光每次相位改变 $\pi/2$)时, 四个参考光场分别为

$$R_i = \exp[(i-1)\pi/2] R_0(x, y) \quad (i=1, 2, 3, 4) \quad (8)$$

相应地记录下的四幅全息图光强分别为: $I_i(x, y)$ ($i=1, 2, 3, 4$). 物光场和参考光场在 x, y 处的相位之差 $\phi(x, y) - \delta_0(x, y)$ 可以由式(9)求出

$$\phi(x, y) - \delta_0(x, y) = \arctan(\frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3}) \quad (9)$$

通过相位去包裹运算, 可以得到物光场正确的相位, 本文采用的是最小二乘去包裹方法^[5].

4 实验结果及分析

用普通洋葱切片作为测试样品. 显微镜物镜的放大倍数为 25 倍, 焦距为 5.917 mm. CCD 的像素为 512×512 , 有效记录尺寸为 $5.12 \times 5.12 \text{ mm}^2$, 视场大小为 $0.135 \times 0.135 \text{ mm}^2$, CCD 到样品的距离为 236 mm, 参考光为平行光, 与 z 轴的夹角 θ 为 0.4° . 图 3(a) 和图 3(b) 分别是 CCD 上记录的洋葱磷片叶细胞实像和四幅全息图中的一幅(放大倍数为 38 倍).

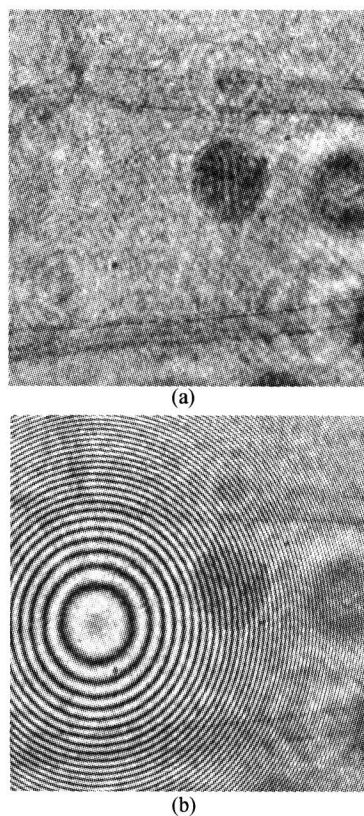


图 3 单个洋葱细胞的实像(a)和全息图(b)
Fig. 3 Images of a single onionskin cell and hologram

图 4(a) 是细胞的相位包裹图, 图 4(b) 是解相位包裹后得到的相位图(已经去除了球面波的相位).

像素 512×512 , 注意看图 4(b) 的右边, 有明显的相位变化, 但其实这并不是实际的细胞相位变化, 而是用 CCD 记录全息图时, 由于 CCD 的分辨率有限, 而该区域内干涉条纹变化太快, 导致不满足抽样定理后的叠频失真^[6~10], 所以解出的相位在该区域也是失真的. 另外在叠频失真区相位会虚假凸起(或下凹), 从图 4(a) 的右边可以很容易看到这一点.

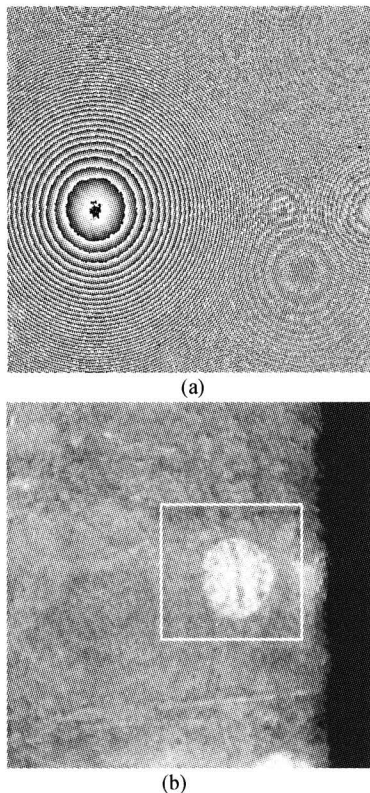


图 4 细胞的相位包裹图(a)和重构相位图(b)

Fig. 4 Reconstructed phase of cell wrapped phase and unwrapped phase

相位包裹图解包裹后首先要去除球面波的相位, 方法可以用曲面多项式拟合, 或直接从式(6)计算出球面波的相位后减除. 两者相比较, 考虑到在叠频失真区相位会虚假凸起(或下凹), 以及实际参考光总与理想平面光波有出入, 用曲面多项式拟合要方便些, 但操作不当会去除有用相位. 本文使用的是直接从式(6)计算出球面波的相位后减除的方法, 有用相位损失较少.

从图 4(b) 可以看到洋葱鳞片叶细胞的相位, 在细胞壁处有变化, 上方下陷, 下放突起, 但变化都不大, 除细胞核外, 其他地方的相位变化很小, 这与样品不是活体细胞有关.

图 5 是细胞核(图 4(b) 中矩形框内部分)相位图的 3 维显示, 像素 180×180 , 细胞核的直径约 $30 \mu\text{m}$, 中间有一个相位明显低于其它部分的条带, 宽度约 $5 \mu\text{m}$, 相位最大和相位最小处相差约 2.5 rad . 由于细胞核中间相位明显低于其它部分的条带可以分辨

得很清楚(宽度约有 20 个像素), 因此认为判定系统的分辨率高于 $1 \mu\text{m}$ 应该是合理的.

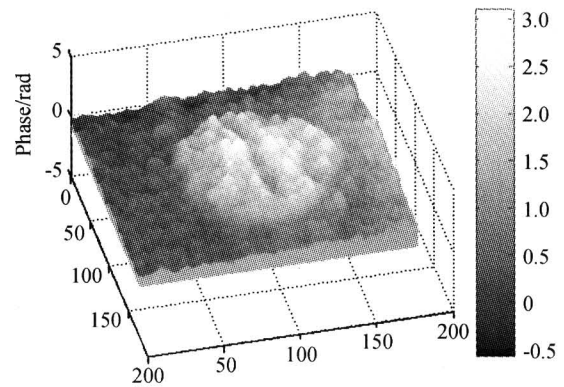


图 5 细胞核相位重构图的 3 维图, 对应图 4(b) 的矩形框部分

Fig. 5 The 3D figure of reconstructed phase of nucleus

5 结论

本文用显微镜物镜、压电陶瓷和 CCD 建立了一套测量细胞相位的显微数字全息光路, 给出了重构相位的理论分析, 并用洋葱鳞片叶细胞作为测试样品, 完成了测量细胞相位的实验. 结果证明: 该系统可以完成细胞相位重构, 系统分辨率不低于 $1 \mu\text{m}$. 另外, 由于物光场本身叠加有一个球面波, 无论是用同轴或离轴全息, 只要参考光与该球面光波的相位差比较大, 都容易造成 CCD 采样不满足采样定理, 导致叠频失真, 所以在 CCD 各项参量不变的情况下, 选择合适的球面光波作为参考光是提高分辨率的重要途径^[11].

参考文献

- 1 Yamaguchi I, Zhang T. Phase-shifting digital holography. *Opt Lett*, 1997, **22**(16): 1268~1270
- 2 Zhang T, Yamaguchi I. Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography. *Opt Lett*, 1998, **23**(15): 1222
- 3 Cuhe E, Marquet P, Depeursinge Ch. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Applied Optics*, 1999, **38**(34): 6994~7001
- 4 Christopher J, Mann, Yu L F, et al. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography. *Optics Express*, 2005, **13**(22): 8693~8698
- 5 Pritt M D, Shipman J. Least-squares two-dimensional phase unwrapping using FFT's. *IEEE trans on GRS*, 1994, **32**(3): 706~708
- 6 钟丽云, 张以谟. 数字全息中的一些基本问题分析. *光学学报*, 2004, **24**(4): 570~574
Zhong L Y, Zhang Y M. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(4): 570~574

- 7 吕晓旭,钟丽云. 全息相移技术用于物体的三维面形测量. 激光技术,2002,**26**(1):51~52
Lü X X,Zhong L Y. *Laser Technology*,2002,**26**(1):51~52
- 8 钟丽云,张以谟. 数字全息图再现像的分析计算. 中国激光,2004,**31**(5):570~574
Zhong L Y, Zhang Y M. *Chinese Journal of Lasers*, 2004,**31**(5):570~574
- 9 袁操今,钟丽云. 预放大相移无透镜傅里叶变换显微数字全息术的研究. 激光杂志,2004,**25**(6):51~53
Yuan C J, Zhong L Y, Zhu Y. *Laser Journal*, 2004, **25**(6):51~53
- 10 蔡晓鸥,王辉. 数字全息图变频采样研究. 光子学报, 2004,**33**(4):522~526
Cai X O,Wang H. *Acta Photonica Sinica*,2004,**33**(4): 522~526
- 11 范琦,赵建林. 改善数字全息显微术分辨率的几种方法. 光电子·激光,2005,**16**(2):226~230
Fan Q,Zhao J L. *Journal of Optoelectronics · Laser*, 2005,**16**(2):226~230
- 12 曾然,赵海发,刘树田. 数字全息再现像中零级干扰噪声消除及图像增强研究. 光子学报,2004,**33**(10):1229~1232
Zeng R,Zhao H F,Liu Sh T. *Acta Photonica Sinica*, 2004,**33**(10):1229~1232
- 13 吕且妮,葛宝臻,张以谟. 一种消除数字离轴全息零级像的实验方法. 光子学报,2004,**33**(8):1014~1017
Lü Q N,Ge B Zh,Zhang Y M. *Acta Photonica Sinica*, 2004,**33**(8):1014~1017
- 14 周灿林,亢一澜. 数字全息干涉法用于变形测量. 光子学报,2004,**33**(2):171~173
Zhou C L,Kang Y L. *Acta Photonica Sinica*,2004, **33**(2):171~173

Phase Reconstruction of Cells with Microscopy Digital Holography Based on Phase Shifting Technique

Qian Xiaofan,Zhang Lei,Dong Keping

The Faculty of science, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650051

Received date:2006-02-21

Abstract An optical device designed to measure the phases of cells was introduced, which was made up of objective, PZT, CCD and computer. The phase reconstruction method and related analysis were presented, which was based on the phase shifting technique. The experiment of phase reconstruction of cells using this optical system was done. The results prove that the resolution of this system is higher than $1 \mu\text{m}$ and reconstructed phase of cells is well.

Keywords Microscopy digital holography; Phase reconstruction; Cells; Phase shifting technique



Qian Xiaofan was born in Yunnan province in 1963. He graduated from the Physics Department of Yunnan University in 1984. At present, he works in the faculty of science, Kunming University of Science and Technology. His research interests are optical information processing and digital holography.