

doi:10.3788/gzxb20184706.0611001

衍射相位显微技术的开发及其对贾第鞭毛虫的定量研究

杨刚^{1,2}, 端木庆铎¹, 李丰², 杨立梅², 黄伟²

(1 长春理工大学 理学院, 长春 130000)

(2 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 江苏 苏州 215600)

摘 要: 基于离轴干涉原理和共光路结构布局, 设计和搭建了以激光作为光源的衍射相位显微成像系统, 在未放样品的情况下, 测得该系统的平均噪声误差仅有 6.70 nm. 利用标称直径为 4.8 μm 的标准聚苯乙烯微球来检验该系统检测的准确性, 测量误差与理论预期结果相比不超过 4%. 用该系统测量 100 只贾第鞭毛虫包囊个体, 并重建贾第鞭毛虫包囊的相位图, 在相位图的基础上, 估算出每个贾第鞭毛虫包囊的干质量. 对测量结果进行统计分析, 结果表明贾第鞭毛虫包囊呈椭圆形状, 长轴范围为 8~15 μm , 短轴范围为 4~7 μm , 包囊的干质量在 42.70~137.07 pg 之间. 该衍射相位显微成像系统采集速度快、准确性高, 可以满足对单个寄生虫形态和干质量进行定量分析的需求.

关键词: 干涉; 衍射相位显微技术; 共光路; 显微镜; 干质量

中图分类号: TH742

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2018)06-0611001-8

Development of Diffraction Phase Microscopy and Its Quantitative Investigation of *Giardia Lamblia*

YANG Gang^{1,2}, DUAN-MU Qing-duo¹, LI Feng², YANG Li-mei², HUANG Wei²

(1 College of Science, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022 China)

(2 Suzhou Institute of Nano-Tech and Nano-Bionics, Chinese Academy of Science, Suzhou, Jiangsu 215600 China)

Abstract: Based on the principles of off-axis interferometry and common-path geometry, a laser diffraction phase microscopy system is designed and built up, and the spatial noise standard deviation of the system without sample is measured as 6.70 nm. Standard polystyrene spheres with diameter of 4.8 μm are used as the calibration samples, the measured phase shift error does not exceed 4% compared to the expected results. 100 *Giardia lamblia* cysts are measured using this system and the unwrapped phase images are reconstructed, the dry mass of each cyst is estimated on the basis of phase image. Statistical analysis results indicate that shape of *Giardia lamblia* cysts appear to be elliptical, the major and minor diameters of cysts range from 8 μm to 15 μm and 4 μm to 7 μm respectively, and the dry mass is calculated to be in the range from 42.70 pg to 137.07 pg. The proposed diffraction phase microscopy has a fast acquisition speed and a high accuracy and can meet the requirements of the quantitative analysis of morphology and dry mass of the single protozoan parasite.

Key words: Interference; Diffraction phase microscopy; Common-path; Microscope; Dry mass

OCIS Codes: 110.0180; 110.3175; 170.0180; 260.3160; 180.3170; 220.2740

基金项目: 国家自然科学基金(No.61505240), 苏州市应用基础研究计划(No. SYG201414)和中国科学院青年创新促进会人才项目(No. 2015258)资助

第一作者: 杨刚(1992-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为激光生物成像. Email: 1712952199@qq.com

导师: 端木庆铎(1956-), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为光电成像器件与系统. Email: duanmu@cust.edu.cn

通讯作者: 黄伟(1983-), 男, 副研究员, 博士, 主要研究方向为激光生物成像. Email: whuang2008@sinano.ac.cn

收稿日期: 2017-12-21; **录用日期:** 2018-03-14

<http://www.photon.ac.cn>

0 引言

贾第虫病是由贾第鞭毛虫引起的在世界范围内广泛流行的一种肠道疾病,主要分布于发展中国家以及卫生条件比较差的区域,老人和小孩是主要的感染人群,近年来,旅游人群的感染率也不断上升^[1].贾第虫病常见的症状有腹泻、腹痛、发热、呕吐等,严重者可致死亡.2004年,世界卫生组织将贾第鞭毛虫列为危害人类健康的主要寄生虫之一;2007年,我国卫生部修订的《生活饮用水卫生标准》首次引入贾第鞭毛虫作为微生物检测指标之一^[2].

为了预防和治愈贾第虫病,需要从源头上对贾第鞭毛虫的形态和生理学特性进行检测研究.荧光显微镜^[3]是一种常见的观测微生物形态的工具,利用样品内部的荧光分子激发出特定波段的光,可以得到样品形态图像,然而荧光试剂的光毒性会对样品造成不可恢复的损伤.干质量表示细胞内部固体物质的重量,对贾第鞭毛虫干质量的测量有助于了解其生理活动特性,比如内部器官胞质运输、细胞膜渗透性以及个体活性等.干质量可以通过透射电子显微镜^[4]、流式细胞术^[5]以及光学干涉^[6]等方法得到,然而透射电子显微镜由于操作复杂及使用条件苛刻,很难应用到单个细胞特别是单个活性细胞的日常检测研究中.流式细胞术是一种便捷、快速和实时的细胞检测与分析技术,依据采集到的前向和侧向散射光信号图案,可以对细胞样品进行分类鉴别,结合荧光染色,可以估算出内部核酸和蛋白总量.流式细胞术操作步骤简单,速度快,所获取信息丰富,能实现对细胞的定量分析和分选.

近年来,结合干涉原理和光学显微镜放大效果的定量相位成像技术发展迅速,已被广泛应用于微观生物内部精细结构以及折射率的定量检测中.衍射相位显微技术是基于共光路布局和离轴干涉的一种定量相位成像方式,其成像光路系统稳定性好,采集速度快,单幅图像就能够实现样品相位的重建,并且无需对样品进行预处理,避免了荧光分子对样品内部的破坏,保证了生物样品的活性^[7].衍射相位显微成像系统不仅能得到振幅图像,还能得到全场样品的定量相位分布,由相位分布可以进一步得到内部结构、折射率和干质量等信息.

自2006年开始,衍射相位显微技术在生物细胞检测领域受到广泛关注与应用. POPESCU G等^[8]将激光衍射相位显微术与荧光成像结合,探测了细胞膜的波动特性与骨架完整性.考虑到细胞内的分子特异性,2009年, PARK Y等^[9]利用低相干光源结合带通滤波片,测量了血红蛋白在三种波长下的色散特性.由于带通滤波片波长选择有限,2012年, PHAM H等^[10]设计了一种空间光过滤针孔,分离可见光波并得到多种波长下的红细胞相位图.而针对白光低光谱密度的缺点,2015年, JUNG J^[11]所在的实验室采用超连续激光作为衍射相位显微成像系统的光源,利用棱镜进行分光,大大提高了光谱分辨率,并测量了样品多种波长下的光散射特性.可以看出,衍射相位显微成像技术在细胞定量表征方面具有很大的应用价值.

本文基于离轴干涉和共光路布局,设计并搭建了衍射相位显微成像系统.在原来的基础上,利用一级闪耀光栅进行分光,调整了参考光与物光的强度比,使两者强度接近,以提高干涉图像的对比度.测试了衍射相位显微成像系统的空间稳定性,并利用直径为 $4.8\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球作为标准样品验证系统测量准确度.用该系统对贾第鞭毛虫包囊进行研究,重建其二维相位分布图像,并对相位图像进行积分,进一步估算出贾第鞭毛虫包囊干质量.

1 系统设计和相关理论

1.1 光路结构

衍射相位显微成像技术结合了希尔伯特相位显微镜^[12]的离轴干涉和傅里叶相位显微镜^[13]的共光路结构优势,利用光栅分光产生参考光和物光并通过相同的光学元件在像面形成干涉图样.图1是衍射相位显微成像系统的光路示意图,一束 He-Ne 激光($\lambda = 633\ \text{nm}$, HNL210L-EC, Thorlabs Inc.)通过透镜 L_1 ($f = 75\ \text{mm}$)和 L_2 ($f = 75\ \text{mm}$)组成的空间滤波系统,被空间滤波器 SF 针孔过滤后反射进入光学显微镜.虚线框内是生物检测常见的倒置显微镜(Ti-U, Nikon Inc.),从上往下依次为聚光镜 CL($f = 75\ \text{mm}$)、样品、物镜 OL(60X, 0.7NA, Nikon Inc.)、反射镜和转接筒镜 RL($f = 200\ \text{mm}$).入射平行光束照射透明的样品后,相位信息被显微物镜收集并放大,而样品对 He-Ne 激光的吸收忽略不计.组合透镜 L_3 ($f = 75\ \text{mm}$)和 L_4 ($f = 75\ \text{mm}$)对从显微镜系统出来的光束进行像差矫正,消除其中球差的影响.矫正后的平行光束入射到一级闪

耀光栅 G(70 grooves/mm, #46067, Edmund optics Inc.)上,发射不同方向的衍射光.透镜 L_5 ($f=40$ mm) 和 L_6 ($f=300$ mm)组成的 4f 放大系统对各个级次的衍射光进行过滤处理,一个双孔滤波器放置在透镜 L_5 的傅里叶面处,双孔大小不一,滤波效果也不一样.系统选择零级衍射光和一级衍射光作为相干光束,一级衍射光通过双孔滤波器的小孔($D=25$ μm)成为参考光,零级衍射光通过双孔滤波器的大孔($D=2.4$ mm)成为物光,物光保留了光线穿过生物样品时产生的相位延迟.物光和参考光夹角很小,在像面形成的干涉条纹被相机(DS-Fi2, Nikon Inc.)采集,而样品本身的相位信息都包含在这干涉条纹中.测量过程中,需要在无样品区域提前拍摄一幅背景图像,将包含样品的图像减去背景图像,得到生物样品的相位延迟或者光程差.

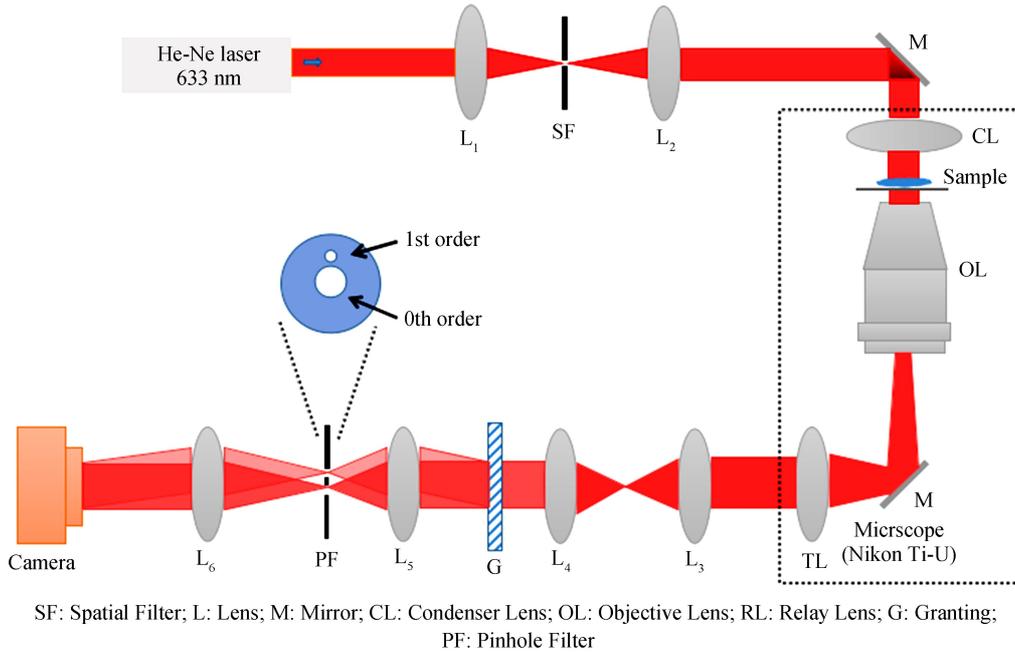


图1 衍射相位显微成像系统示意图
Fig.1 Schematic of diffraction phase microscopy setup

1.2 设计过程

光源在生物成像系统中至关重要,决定了干涉条纹对比度以及成像质量.考虑到检测对象是半透明的生物样品,选择了穿透能力强、吸收率低的 He-Ne 激光作为系统光源.氦氖激光器的输出功率在几毫瓦到十几毫瓦之间,避免影响生物样品的活性.He-Ne 激光具有良好的功率稳定性,经历多透镜组成的光路系统形成的干涉条纹对比度好,明暗清晰.

系统使用倒置光学显微镜,该显微镜配置简单,可外接各种通用的光学部件.显微镜的横向分辨率由聚光镜和物镜决定,横向最小分辨距离为 $0.7 \mu\text{m}$.光栅放置在显微镜的成像面处,用于接收显微镜出射光并产生不同方向上的衍射光.透射式闪耀光栅的一级衍射光强度最大,经小孔过滤之后光强度与零级衍射光相接近,形成的干涉条纹对比清晰.衍射相位显微成像系统中的光栅用作振幅调制,调制频率可以表示为

$$\beta = \frac{2\pi}{\Lambda} M_{\text{obj}} \quad (1)$$

式中, M_{obj} 表示物镜的放大倍率, Λ 表示光栅常数.

将干涉图样经过傅里叶变换后得到其频谱图,频谱图中中央亮斑与旁瓣亮斑的谱宽半径分别为 $2k_0 \text{NA}_{\text{obj}}$ 和 $k_0 \text{NA}_{\text{obj}}$, k_0 表示波矢, NA_{obj} 表示物镜的数值孔径.为了避免频谱信号的混叠,光栅的调制频率需要满足^[14]

$$\beta \geq 3k_0 \text{NA}_{\text{obj}} \quad (2)$$

将式(1)代入式(2)即得到光栅常数 Λ 的限制条件为

$$\Lambda \leq \frac{\lambda M_{\text{obj}}}{3 \text{NA}_{\text{obj}}} \quad (3)$$

为了保证图像采集的准确性,依据奈奎斯特抽样定理,干涉条纹的间距需要大于或等于三个像素的大小^[15],即像素采样频率不小于两倍干涉条纹的最大空间频率.由于组合透镜 L_5 和 L_6 的放大率为 7.5,系统中每个干涉条纹至少占据五个像素.相机的采样条件需满足

$$k_p = \frac{2\pi}{a} M_{\text{obj}} |M_{4f}| \geq 2(\beta + k_0 \text{NA}_{\text{obj}}) \quad (4)$$

式中, k_p 表示相机的最大采样频率, a 为每个像素的物理尺寸, M_{4f} 表示组合透镜 L_5 和 L_6 的放大倍数.

在衍射相位显微成像系统设计过程中,先确定光源及相机的参数,然后根据待检测样品的参数确定显微镜,主要是物镜的选择,考虑经济因素,不需要水浸或者油浸基本可以达到检测寄生虫细胞的要求.在显微镜参数确定之后,就可以依次确定光栅常数以及 4f 组合透镜的参数.本系统中所采用的透镜都是直径 25.4 mm 的双胶合透镜,最大限度地减小了像差.

1.3 相位重建

衍射相位显微成像系统得到的干涉图样中包含了生物样品的相位信息,采集到的干涉图强度可以表示为

$$I_C(x, y) = I_0(x, y) + I_1(x, y) + 2\sqrt{I_0(x, y)I_1} \cdot \cos(\beta x + \Delta\varphi) \quad (5)$$

式中, I_0 和 I_1 分别表示零级和一级衍射光光强, β 为光栅调制频率, $\Delta\varphi$ 为生物样品的相位延迟.

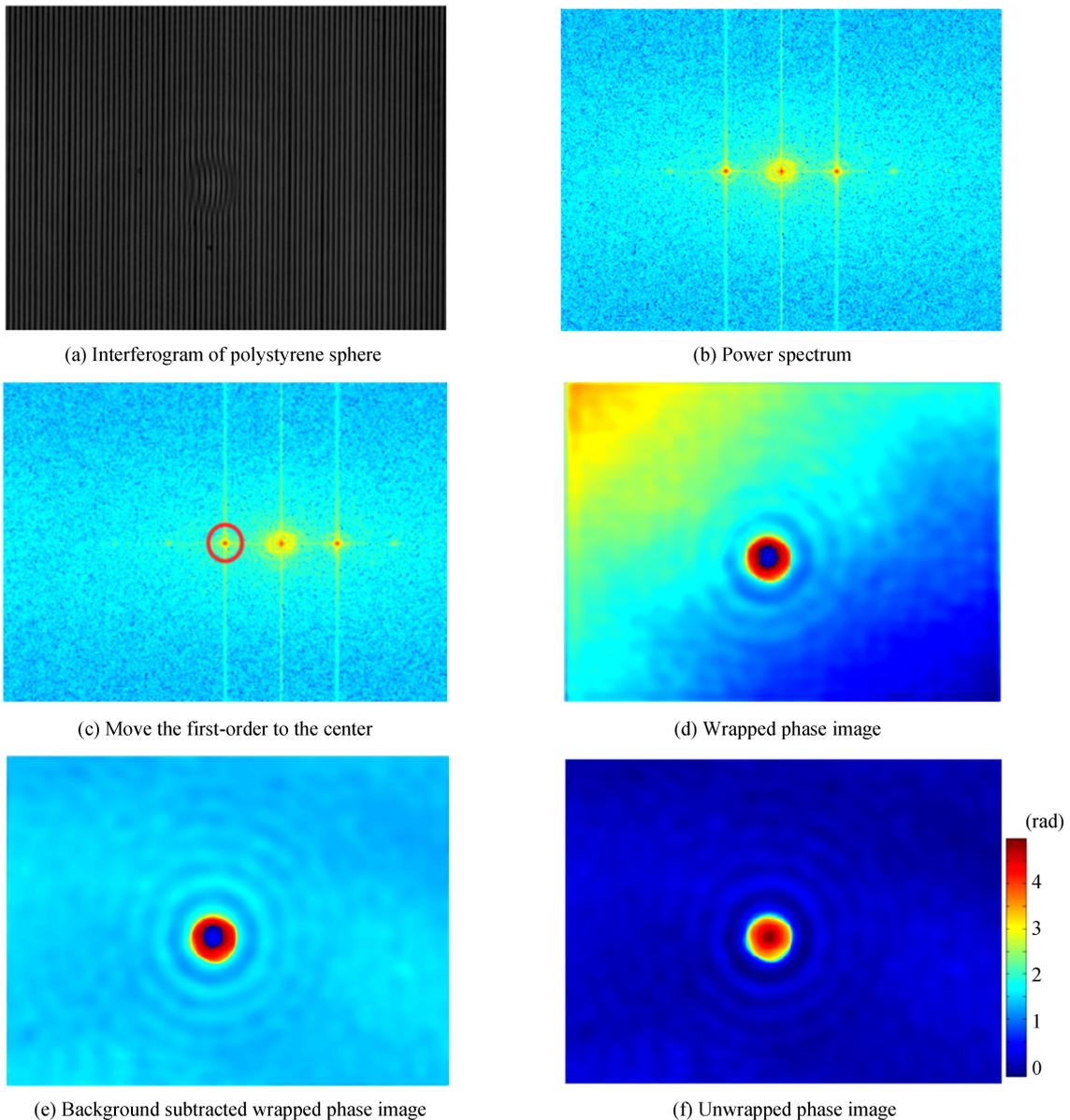


图 2 相位重建过程

Fig.2 Phase reconstruction

相位重建分为相位提取和相位解包两个过程. 为了从干涉图中提取出样品相位延迟 $\Delta\phi$, Hilbert 方法结合傅里叶变换被用于相位提取过程^[16], 而生物样品的相位延迟都大于 2π , 采用速度较快的 Goldstein's 算法^[17]进行相位解包. 图 2 是以聚苯乙烯微球为例, 相位重建的整个过程. 首先获取一幅含有聚苯乙烯微球样品的干涉图(a), 对干涉图进行傅里叶变换得到其频谱图(b), 将一级频谱移到中心位置如图(c), 由于样品信息都在一级频谱内, 因此利用低通滤波器提取出一级频谱并进行反正切操作得到包裹相位图(d), 从包裹相位图中减去经过相同处理步骤的背景图像得到图(e), 对图(e)进行解包处理得到最后的相位延迟分布图(f). 整个处理过程通过 Matlab 软件来实现, 对最后的相位图加上伪彩色之后可以看出聚苯乙烯微球的中心区域相位延迟最大.

1.4 空间噪声性能

衍射相位显微成像系统是通过光线穿透样品产生的光程差来反映样品信息的, 在未放样品的情况下, 由于成像系统机械振动及空间噪声的存在, 背景图像也会有一定的光程波动, 这是系统本身引起的测量误差. 实验中利用高平整度的光学玻璃(#7740, Corning Inc.)来验证系统的空间噪声性能, 玻璃厚度为 0.5 mm, 表面粗糙度小于 1.5 nm, 透光率非常高. 将玻璃片放置在载物台上, 聚焦后记录下视场内随时间变化的 60 幅干涉图像, 时间间隔为 80 ms, 将这 60 幅干涉图像求平均后作为标准的校正背景图像, 然后移动到另一块区域, 再次记录下视场内的一幅干涉图像, 将这一幅干涉图像与校正图像做图像处理. 图 3 所示是相减之后的结果图, 可以看出, 系统本身引起的噪声误差范围在几十纳米之内, 对图像进行均方差处理来量化系统噪声, 得到衍射相位显微成像系统的空间噪声平均误差为 6.70 nm, 与之前报道^[18]的 5.87 nm 的空间噪声在同一个数量级.

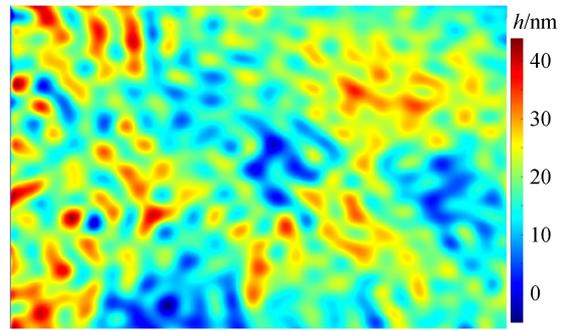


图 3 衍射相位显微成像系统空间噪声稳定性
Fig.3 Spatial noise stability of diffraction phase microscopy

1.5 准确性验证

利用聚苯乙烯微球(4.8 μm , G0500, Thermo Fisher Inc.)作为标准样品来检验衍射相位显微成像系统的测量准确度. 在验证之前用扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)测量了 150 个左右的聚苯乙烯微球的直径, 对测量的数据进行统计分析, 均值为 4.85 μm , 标准差小于 0.02 μm . 聚苯乙烯微球的相位延迟表示为

$$\phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda}(n_p - n_m)h(x, y) \quad (6)$$

式中, n_p 和 n_m 分别为聚苯乙烯微球和其所处液体介质的折射率, $h(x, y)$ 表示不同位置处聚苯乙烯微球的厚度, 理论计算中采用的测量均值为 4.85 μm .

首先将聚苯乙烯微球置于不同折射率的透明液体介质中, 聚苯乙烯微球产生的相位延迟因为折射率差的变化而改变. 由于衍射相位显微系统是全场成像, 得到的结果图是二维分布图像, 始终以聚苯乙烯微球最大光程距离为参考位置, 在确定光源波长、聚苯乙烯微球折射率和直径的情况下, 调整周围介质的折射率, 得到不同的相位延迟. 以去离子水和甘油的混合液体作为浸没聚苯乙烯微球的介质, 调整去离子水和甘油的体积比, 可以得到不同折射率的混合液体^[19]. 去离子水的折射率为 1.33, 甘油的折射率为 1.47, 不同体积比下的混合液体折射率在 1.33~1.47 范围内.

对于配好的混合液体, 利用折射仪(PAL-RL, 测量范围 1.3306~1.5284, ATAGO)对其进行折射率测量, 得到室温下四种混合液的折射率分别为 1.385 0、1.410 4、1.445 9、1.470 0. 将聚苯乙烯微球分别滴入这四种液体, 经超声处理之后, 取出 5 μL 含有微球样品液滴放入载物台上观察.

聚苯乙烯微球在不同混合液中的相位图像如图 4 所示, 从伪彩色图像中可以看出聚苯乙烯微球在二维平面内的相位延迟分布. 四种混合液下的聚苯乙烯微球最大相位延迟如图 5 所示, 每种折射率对应的混合溶液下测量 10 个聚苯乙烯微球. 测量结果表明, 聚苯乙烯微球的相位延迟最大误差不超过 4%, 衍射相位显微成像系统的测量结果与理论结果相一致.

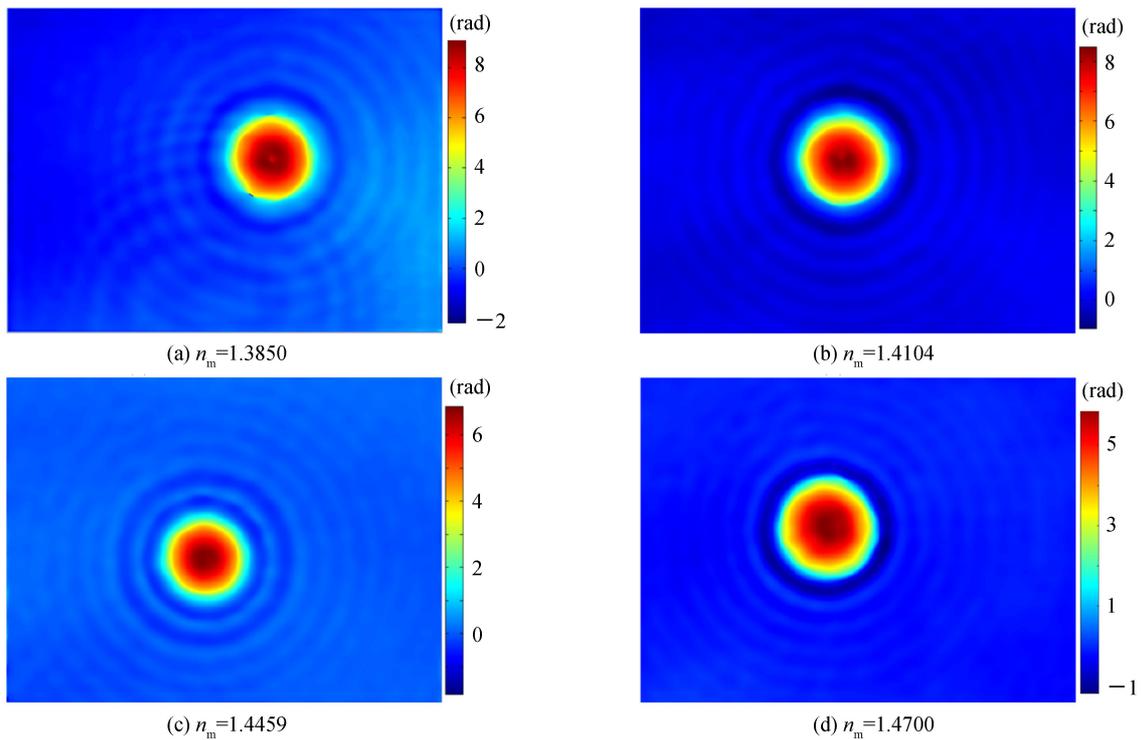


图4 不同折射率混合液下的聚苯乙烯微球相位图

Fig.4 Phase images of polystyrene spheres immersed in different refractive index of mixture solutions

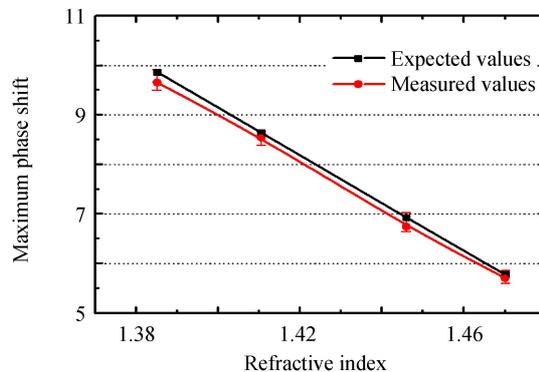


图5 聚苯乙烯微球在不同折射率混合液中产生的相位差

Fig.5 Phase shifts of polystyrene spheres in different refractive index of mixture solutions

2 贾第鞭毛虫检测

贾第鞭毛虫是一种水源性寄生虫,其生活史分为滋养体和包囊两个阶段.滋养体为生长发育阶段,常处于宿主体内,比较脆弱;包囊为休眠阶段,包囊的囊壁很厚,可以有效地保护内部虫体,包囊阶段为贾第鞭毛虫的传播阶段.利用衍射相位显微成像系统对贾第鞭毛虫包囊进行定量研究,得到相位图分布,并从相位图中反演出干质量数据.贾第鞭毛虫属于原生生物^[20],内部结构简单,蛋白质的含量占绝大部分,剩下的是一些酶和糖类,可以忽略不计,因此蛋白质含量即代表干质量大小.购买的贾第鞭毛虫是从沙鼠体内接种培育的,包囊样品(P101, Waterborne Inc.)经过过滤、离心、洗脱之后储存在磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered Saline, PBS)中.

8 mL的试管内有约500万个贾第鞭毛虫包囊,取出一小滴进行稀释并用超声清洗器超声分离.然后从稀溶液中取5 μL 滴在载玻片上.在液滴两侧都粘贴一小段胶带,加上盖玻片构建一个简单的样品池,避免盖玻片对包囊挤压.将处理好的贾第鞭毛虫样品放入载物台上观察.实验过程中所有关于寄生虫的处理过程都遵循相关安全管理规定,并做好相应的隔离工作.

图 6 所示为单个贾第鞭毛虫包裹的干涉图和相位重建图像, 贾第鞭毛虫包裹呈椭圆形结构, 其中一边比较扁平, 另一边相对窄一点, 虫体部分大多集中于窄边. 贾第鞭毛虫包裹的相位延迟为

$$\phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \alpha(\lambda) \cdot C(x, y) \cdot h(x, y) \quad (7)$$

式中, $\alpha(\lambda)$ 是蛋白质的折射率比增量, 与光的波长有关, 这里记为 $0.2 \text{ mL/g}^{[21-22]}$, $C(x, y)$ 为包裹内部的固体质量浓度, 即干质量浓度. 从相位图中可以看出贾第鞭毛虫不同区域内的相位延迟, 对贾第鞭毛虫包裹区域进行积分, 可以得到内部的干质量. 干质量计算公式为^[23]

$$m = C \cdot \int h(x, y) dx dy = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \int \phi(x, y) dx dy \quad (8)$$

在 α 值确定的情况下, 可以从相位图中得到贾第鞭毛虫包裹的干质量数据.

用衍射相位显微成像系统实验测量了 100 只分离的贾第鞭毛虫包裹个体, 从干涉图中提取出相位图, 得到 100 幅相位分布图像, 并根据式(8)分别计算每个包裹个体的干质量. 对数据结果进行统计, 椭圆形的贾第鞭毛虫包裹长轴在 $8 \sim 15 \mu\text{m}$ 之间, 短轴在 $4 \sim 7 \mu\text{m}$ 之间, 干质量的分布如图 7 所示, 范围在 $42.70 \sim 137.07 \text{ pg}$ 之间, 测量的 100 只贾第鞭毛虫包裹平均干质量为 90.87 pg , 均方差为 9.07 pg . 测量结果与之前报道^[24] 的贾第鞭毛虫包裹参数相一致.

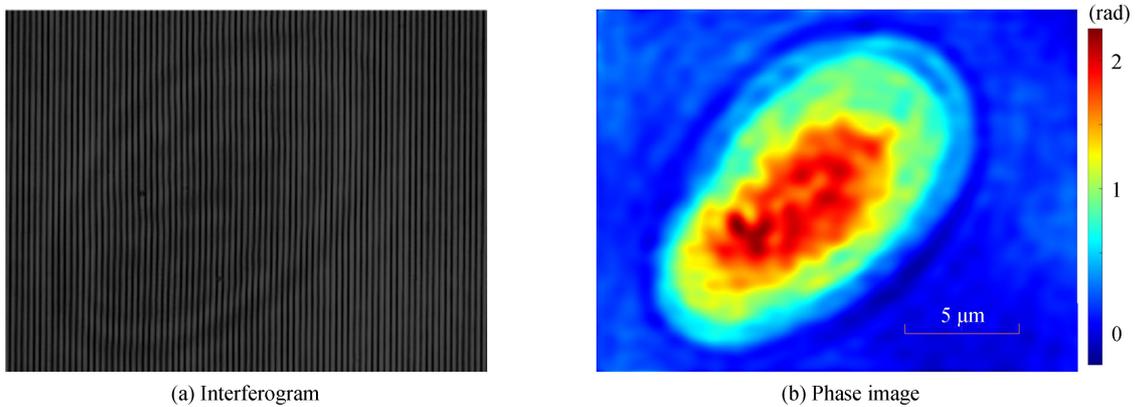


图 6 贾第鞭毛虫包裹
Fig.6 Giardia lamblia cyst

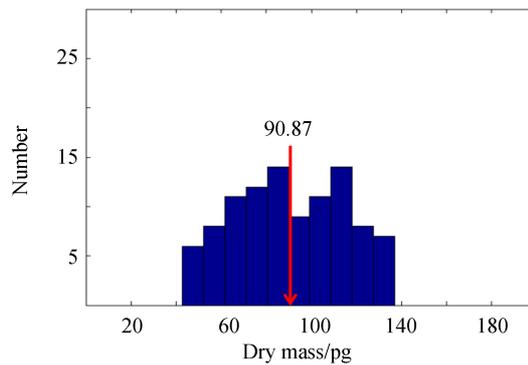


图 7 100 只贾第鞭毛虫干质量分布
Fig.7 Dry mass distribution of 100 Giardia lamblia cysts

3 结论

本文设计并搭建了激光衍射相位显微成像系统, 该系统结合共光路布局和离轴干涉技术, 保证了检测过程中的稳定性和测量速度. 对该系统的平均噪声误差和测量准确性进行了实验验证. 定量研究了 100 只贾第鞭毛虫包裹个体, 得到形态学上的物理尺寸和干质量大小. 实验结果表明: 衍射相位显微成像系统的平均空间噪声误差仅为 6.70 nm , 利用聚苯乙烯微球对该系统的验证结果误差与理论计算结果相比不超过 4% . 贾第鞭毛虫包裹长轴 $8 \sim 15 \mu\text{m}$, 短轴 $4 \sim 7 \mu\text{m}$, 干质量范围在 $42.70 \sim 137.07 \text{ pg}$ 之间. 该系统结构简单, 稳定性

好,噪声低,可以作为定量研究微生物形态和生化特征的一种有效手段。

参考文献

- [1] JELINEK T, NEIFER S. Detection of Giardia lamblia stool samples: a comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays[J]. *F1000 Research*, 2013, **2**: 39-43.
- [2] GB5749-2006, Standards for drinking water quality[S], 2006.
GB5749-2006,生活饮用水卫生标准[S], 2006.
- [3] ZHOU Yong-jun, CHEN De-qiang, HUANG Wen-hao. Development of the scanning system for confocal laser scanning fluorescence microscope[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2002, **10**(6): 582-587.
周拥军, 陈德强, 黄文浩. 共聚焦激光扫描荧光显微镜扫描系统研制[J]. *光学精密工程*, 2002, **10**(6): 582-587.
- [4] LOFERER-KRSSBACHER M, KLIMA J, PSENNER R. Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1998, **64**(2): 688-694.
- [5] ZHAO Shu-tao, WU Xiao-dong, WANG Ce, et al. The principle, application and latest development of flow cytometry [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, **11**(22): 4378-4381.
赵书涛, 武晓东, 王策, 等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. *现代生物医学进展*, 2011, **11**(22): 4378-4381.
- [6] BARER R. Determination of dry mass, thickness, solid and water concentration in living cells[J]. *Nature*, 1953, **172** (4389): 1097-1098.
- [7] POPESCU G, IKEDA T, DASARI R R, et al. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics [J]. *Optics Letters*, 2006, **31**(6): 775-777.
- [8] POPESCU G, BADIZADEGAN K, FELD M S, et al. Diffraction phase and fluorescence microscopy[J]. *Optics Express*, 2006, **14**(18): 8263-8268.
- [9] PARK Y K, YAMAUCHI T, CHOI W, et al. Spectroscopic phase microscopy for quantifying hemoglobin concentrations in intact red blood cells[J]. *Optics Letters*, 2009, **34**(23): 3668-3670.
- [10] PHAM H, BHADURI B, DING H, et al. Spectroscopic diffraction phase microscopy[J]. *Optics Letters*, 2012, **37** (16): 3438-3440.
- [11] JUNG J, PARK Y K. Experimental observations of spectral changes produced by individual microscopic spheres.[J]. *Optics Letters*, 2015, **40**(6): 1093-1096.
- [12] IKEDA T, POPESCU G, DASARI R R, et al. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems[J]. *Optics Letters*, 2005, **30**(10): 1165-1167.
- [13] POPESCU G, IWAI H, VAUGHAN J C, et al. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics[J]. *Optics Letters*, 2004, **29**(21): 2503-2505.
- [14] SHAN M, KANDEL M E, MAJEED H, et al. White-light diffraction phase microscopy at doubled space-bandwidth product.[J]. *Optics Express*, 2016, **24**(25): 29033-29039.
- [15] XUE Liang, Optical microscopy imaging and its application in bio-sample display and measurement[D]. Nanjing: Nanjing University of Science & Technology, 2013.
薛亮. 光学显微成像及在生物样品显示与测量中的应用[D]. 南京:南京理工大学, 2013.
- [16] PHAM H, DING H, SOBH N, et al. Off-axis quantitative phase imaging processing using CUDA: toward real-time applications[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, **2**(7): 1781-1793.
- [17] GOLDSTEIN R M, ZEBKER H A, WERNER C L. Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping [J]. *Radio Science*, 1988, **23**(4): 713-720.
- [18] ZHENG C, ZHOU R, KUANG C, et al. Digital micromirror device-based common-path quantitative phase imaging[J]. *Optics Letters*, 2017, **42**(7): 1448-1451.
- [19] FUJINOTO Y. Sheath liquid for particle analyzer: US, US7824916[P]. 2010-11-02.
- [20] ADAM R D. Biology of Giardia lamblia[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, **14**(3): 447-475.
- [21] SCHURMANN M, SCHOLZE J, MULLER P, et al. Cell nuclei have lower refractive index and mass density than cytoplasm[J]. *Journal of Biophotonics*, 2016, **9**(10): 1068-1076.
- [22] ZHAO H, BROWN P H, SCHUCK P. On the distribution of protein refractive index increments[J]. *Biophysical Journal*, 2011, **100**(9): 2309-2317.
- [23] BHADURI B, KANDEL M, BRUGNARA C, et al. Optical assay of erythrocyte function in banked blood [J]. *Scientific Reports*, 2014, **4**: 6211-6216.
- [24] YIN Bao-guo, XU Xin, ZHANG Bao-hua, et al. Detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum[J]. *City and Town Water Supply*, 2006, **2**: 22-25.
尹宝国, 徐欣, 张宝华, 等. 贾第鞭毛虫和隐孢子虫的检测研究[J]. *城镇供水*, 2006, **2**: 22-25.

Foundation item: The National Natural Science Foundation of China (No.61505240), the Applied Basic Research Programs of Suzhou City (No.SYG201414), and the Youth Innovation Promotion Association of CSA (No.2015258)

引用格式: YANG Gang, DUAN-MU Qing-duo, LI Feng, et al. Development of Diffraction Phase Microscopy and Its Quantitative Investigation of Giardia Lamblia[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2018, **47**(6):0611001

杨刚, 端木庆铎, 李丰, 等. 衍射相位显微技术的开发及其对贾第鞭毛虫的定量研究[J]. *光子学报*, 2018, **47**(6):0611001