doi:10.3788/gzxb20184707.0718001

基于四波前剪切干涉的显微定量相位成像实验研究

崔博川1,2,王建立1,姚凯男1,陈涛1

(1中国科学院长春光学精密机械与物理研究所,长春 130000)(2中国科学院大学,北京 100000)

摘 要:提出一种基于四波前剪切干涉的显微定量相位成像方法,使用棋盘型位相光栅获得生物样品的 干涉图,采用快速傅里叶法解得相位信息.实验测量可变形镜产生的随机波前,与 ZYGO 干涉仪的对照 结果表明相位测量误差不超过 3%,验证了四波前剪切干涉仪的相位探测精度.建立了一套基于四波前 剪切干涉技术的显微定量相位成像系统,以小鼠肝癌活体细胞为样品,获得了清晰的强度图像和相位图 像.实验结果表明基于四波前剪切干涉技术的系统可以实现高精度的定量相位成像,适用于生物活体细 胞的相位显微成像研究.

文章编号:1004-4213(2018)07-0718001-8

Experimental Study on Micro Quantitative Phase Imaging by Quadriwave Shearing Interferometry

CUI Bo-chuan^{1,2}, WANG Jian-li¹, YAO Kai-nan¹, CHEN Tao¹ (1 Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130000, China) (2 Universite of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100000 China)

Abstract: A micro quantitative phase imaging method based on quadriwave shearing interferometry is proposed. A chessboard phase grating is used to get the interferogram of biological samples, and the phase information is obtained by the fast Fourier transform method. A pack of wavefront produced by the micro-electromechanical systems is measured, and the ZYGO interferometer is used for comparision. The error of phase measurement is not more than 3%, which verifies phase detection accuracy of the quadriwave shearing interferometer. A quantitative phase imaging system based on the quadriwave shearing interferometry is established, and a clear quantitative phase image is obtained from murine hepatoma cell. The experimental results show that the system based on the quadriwave shearing interferometry can achieve high-precision quantitative phase imaging, and is suitable for phase imaging of biological living cells.

Key words: Interferometry; Interferometers; Phase measurement; Phase modulation; Wavefronts OCIS Codes: 050.1950; 050.1970; 060.5060; 120.5050; 050.5080

0 引言

活体生物细胞的透明特性导致其难以使用传统的光学显微技术进行测量,而各种细胞染色法又会杀死 细胞,破坏其原有的形态,无法对细胞的运动模式进行观测.细胞内部细胞器的折射率不同导致相位分布的 变化,因此定量相位成像技术成为研究重点.按照基本原理,定量相位成像技术可以分为干涉法和非干涉法,

导师(通讯作者):王建立(1977-),男,研究员,博士,主要研究方向为地基高分辨率成像望远镜总体技术等. Email:wangjianli@ciomp.ac.cn 收稿日期:2018-01-29;录用日期:2018-04-12

基金项目:国家自然科学基金(No.11603024)资助

第一作者:崔博川(1992-),男,博士研究生,主要研究方向为多波前剪切干涉技术. Email:icysmart@mail.ustc.edu.cn

干涉法利用光的干涉原理获得目标相位图像,比较有代表性的是数字全息技术.2012年,马利红等^[1]使用数字全息技术进行了显微定量相位成像的实验研究.然而数字全息需要高相干性激光光源,会带来散斑噪声,对实验装置的要求也比较高,具有一定的局限性.近些年来,国内外学者对非干涉方法进行了一系列深入的研究,其中2004年,FAULKNERM等^[2]使用空域叠层成像(Ptychographical Iterative Engine, PIE)技术实现了显微定量相位成像;2016年,姚玉东等^[3]对 PIE 技术细节和发展趋势进行了详细的介绍;2013年,郑国安等^[4]提出了傅里叶叠层成像(Fourier Ptychographic Microscopy, FPM)技术,该方法采用了合成孔径的思想,可以获得大视场和高分辨率的成像结果.2016年,孙佳嵩^[5]等对 FPM 技术的理论、发展和应用进行了总结.光强传输方程(Transport of Intensity, TIE)技术也是一类具有代表性的非干涉相位成像法,2016年, 左超^[6]等综述了 TIE 方法的研究现状与最新进展.基于非干涉法的定量相位成像对实验设备要求较低,但是都需要进行复杂的计算来获得物体的高分辨率复振幅最优解.

作为干涉法的一种,四波前剪切干涉(Quadriwave Shearing Interference, QWSI)技术是一种新型的波 前探测手段,在多波段面型测试^[7]、激光光束分析^[8]和纳米结构热成像^[9]等多种相位测量领域均有应用. QWSI使入射光分成四份使其自相干涉,不需要复杂的干涉光路和高相干性光源,具有结构简单、调整方便、 空间分辨率高的优点,可从单幅干涉图中解得强度和相位信息.基于四波前剪切干涉技术的显微定量成像方 法无需对生物细胞进行标记、染色和固定等处理手段,保证了细胞的生物活性,可以实现无损伤的全场测量. 而且此方法还可以对细胞进行真实环境下的动态测量,继而获取细胞的动态特性,细胞间的相互作用以及细 胞对试剂的反应等信息,具有重大研究意义.

本文阐述了四波前剪切干涉的干涉原理和波前相位的解调方法;进行了波前探测的对比实验,测量可变 形镜(Deformable Mirror, DM)反射平行光产生的一系列波前,并且使用 ZYGO 干涉仪进行对照,验证了四 波前剪切干涉仪的相位探测精度;建立了一套基于四波前剪切干涉技术的显微定量相位成像系统,以小鼠肝 癌活体细胞(Hepal-6)为样品,获得了清晰的强度图像和相位图像.

1 基本原理

1.1 剪切干涉原理

四波前剪切干涉技术使用了一种特殊的相位光 栅将待测光分成四支衍射光束,进而产生自相干涉 的效果^[10].该光栅由哈特曼光阑和棋盘型相位光栅 两部分叠加组成,其中,相位光栅的相位差为半个波 长.两者组合后的效果如图1所示.

该相位光栅的干涉原理如图 2,其中 $k_{i,j}$ 为 4 支 参与干涉的波矢, $R_{i,j}$ 为波矢在观测屏产生的光场. 相位光栅可以使 $k_{i,j}(i,j = \{-1,1\})$ 4 支衍射光束 最大达到 90%的衍射效率^[11].



图 1 相位光栅结构 Fig.1 Structure of the phase grating



图 2 四波前剪切干涉原理 Fig.2 Principle of quadriwave shearing interference

如果只考虑(±1,±1)级衍射光束,相位光栅的振幅透射率为

$$t(x,y) = \cos\left(\frac{\pi x}{p}\right) \cdot \cos\left(\frac{\pi y}{p}\right)$$
(1)

式中,(x,y)为空间坐标,p为光阑周期.那么对应的光强透射率为

$$T(x,y) = |t(x,y)|^2 = \frac{1}{4} \left\{ 1 + \left[\cos\left(\frac{2\pi}{p}x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{p}y\right) \right] + \frac{1}{2} \left[\cos\left(\frac{2\pi}{p}(x+y)\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{p}(x-y)\right) \right] \right\}$$
(2)

光在空间中的传播可以用复振幅来表示,即

$$A(\mathbf{r}) = \sqrt{I(\mathbf{r})} \exp\left(i\left[\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \varphi(\mathbf{r})\right]\right)$$
(3)

式中,r 是空间方位矢量,k 为波矢,I 为光场强度, φ 为相位.

每支衍射级次都沿着其波矢方向传播,光场在沿 z 轴方向传播距离 z 之后,由于其自由空间衍射在近轴 传播的前提下可以忽略不计,故 z 处的光场为所有衍射级次的叠加,光场强度为

$$I(r,x) = I_0 \left\{ 1 + \left[\cos\left(\frac{2\pi}{p}x + \frac{\lambda}{p}z \; \frac{\partial\varphi(r)}{\partial x}\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{p}y + \frac{\lambda}{p}z \; \frac{\partial\varphi(r)}{\partial y}\right) \right] + \frac{1}{2} \left\{ \cos\left[\frac{2\pi}{p}(x+y) + \frac{\lambda}{p}z \; \frac{\partial\varphi(r)}{\partial(x+y)}\right] + \cos\left[\frac{2\pi}{p}(x-y) + \frac{\lambda}{p}z \; \frac{\partial\varphi(r)}{\partial(x-y)}\right] \right\}$$
(4)

式中, I_0 为z=0时干涉图强度的最大值; φ 为入射光相位; λ 为入射光波长.干涉条纹的强度分布如图 3 所示,其中干涉仪的精度由p与z的比值决定^[12].

	٠					
					٥	
	٥					
	ē					

图 3 干涉条纹强度分布 Fig.3 Intensity distribution of interference fringes

1.2 解调原理

获得干涉图之后,便可以解调出波前相位信息.快速傅里叶分析法^[13]在保证结果准确的前提下,计算相 对简便,通过对一幅干涉图进行快速傅里叶变换进行分析,便可解调出波前相位信息.

式(4)的傅里叶频谱为

$$\begin{split} U(f_{x},f_{y}) &= 2\pi I_{0} \left\{ \delta\left(f_{x},f_{y}\right) + \frac{1}{2} \left[\delta\left(f_{x} + \frac{1}{p},f_{y}\right) \mathscr{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p^{z}}\frac{\partial\varphi(r)}{\partial x}}\right\} - \delta\left(f_{x} - \frac{1}{p},f_{y}\right) \mathscr{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p^{z}}\frac{\partial\varphi(r)}{\partial x}}\right\} \right] + \\ & \frac{1}{2} \left[\delta\left(f_{x},f_{y} + \frac{1}{p}\right) \mathscr{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p^{z}}\frac{\partial\varphi(r)}{\partial y}}\right\} - \delta\left(f_{x},f_{y} - \frac{1}{p}\right) \mathscr{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p^{z}}\frac{\partial\varphi(r)}{\partial y}}\right\} \right] + \\ & \frac{1}{4} \left[\delta\left(f_{x} + \frac{1}{p},f_{y} + \frac{1}{p}\right) \mathscr{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p^{z}}\frac{\partial\varphi(r)}{\partial(x+y)}}\right\} - \delta\left(f_{x} - \frac{1}{p},f_{y} - \frac{1}{p}\right) \mathscr{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p^{z}}\frac{\partial\varphi(r)}{\partial(x+y)}}\right\} \right] + \\ & \frac{1}{4} \left[\delta\left(f_{x} - \frac{1}{p},f_{y} + \frac{1}{p}\right) \mathscr{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p^{z}}\frac{\partial\varphi(r)}{\partial(x-y)}}\right\} - \delta\left(f_{x} + \frac{1}{p},f_{y} - \frac{1}{p}\right) \mathscr{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p^{z}}\frac{\partial\varphi(r)}{\partial(x-y)}}\right\} \right] \end{split}$$
(5)

式中δ为狄拉克函数,牙为傅里叶变换.

通过式(5)可以看出,此时干涉图频谱按中心频率的不同可以分成9个部分,与图3中的9个区域分别 对应,其中位于中心点(0,0)的零级频谱对应入射光光强的变化信息,理想情况下,入射光光强是常数,谱宽 为0.其余8个部分为线性载频干涉图的一级频谱信息,中心分别位于(±1/p,±1/p)、(0,±1/p)和(±1/ *p*,0),干涉图的一级频谱对应干涉条纹的调制信息,其中包含了入射光波前的相位梯度.使用频域滤波窗提取出中心位于(1/*p*,0)的一级频谱,将其移至中心位置(0,0),再进行逆傅里叶变换,得

$$A(x,y) = \mathcal{F}^{-1}\left\{\delta(f_x,f_y)\mathcal{F}\left\{e^{-j\frac{\lambda}{p}z\frac{\partial \varphi(r)}{\partial x}}\right\}\right\} = e^{-j\frac{\lambda}{p}z\frac{\partial \varphi(r)}{\partial x}}$$
(6)

式中, 新 表示逆傅里叶变换.

A(x,y)带有相位梯度信息,取其相位角便可得到 x 方向的相位梯度,即

$$\frac{\partial \varphi(r)}{\partial x} = -\frac{p}{\lambda z} \text{angle} \left[A(x, y) \right] = -\frac{p}{\lambda z} \arctan \left\{ \frac{\text{Im} \left[A(x, y) \right]}{\text{Re} \left[A(x, y) \right]} \right\}$$
(7)

式中,angle[A(x,y)]表示取A(x,y)的复数相角,Im[A(x,y)]和 Re [A(x,y)]分别表示取A(x,y)的实 部和虚部.



图 4 干涉图傅里叶频谱中的衍射级次 Fig.4 Diffraction gradation in Fourier spectrum of interferogram

采用同样的方法提取出中心位于(0,1/p)的一级频谱也可以得到 y 方向的相位梯度 $\frac{\partial \varphi(r)}{\partial y}$.得到 x 和 y 方向的相位梯度后,便可通过傅里叶积分的方法得到最终的波前相位,重建方程为

$$\varphi(r) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \frac{\mathscr{F}\left(\frac{\partial\varphi(r)}{\partial x}\right) + i\mathscr{F}\left(\frac{\partial\varphi(r)}{\partial y}\right)}{f_x + if_y} \right\}$$
(8)

需要注意的是,在工程应用中,剪切量的大小会影响波前测量结果的分辨率^[14],假设剪切量为S,则式 (4)中 $\frac{\partial \varphi(r)}{\partial x}$ 在实际测量中为 $\frac{\varphi(r)-\varphi(r-S)}{S}$,即相位微分的差分近似,所以剪切量S越小,对 $\frac{\partial \varphi(r)}{\partial x}$ 的近似 误差越小,测量结果的分辨率越高.对于不同的原始相位 $\varphi(r)$,其差分近似的误差取决于原始相位值,因此 从提高稳定性的角度来说,应尽可能减小剪切量S.此外,剪切量的大小也会影响到有效测量口径.假设原始 波前数据维数(即 CCD 靶面上有衍射部分)为 $N \times N$,那么四波前剪切干涉区域数据维数仅为(N-S)× (N-S),即数据行数和列数都减少,有效测量口径也因此减小,所以剪切量越小,有效测量口径越大.

2 相位探测对比实验

2.1 实验装置

图 5 为用于显微定量相位成像的四波前剪切干涉仪,由棋盘型相位光栅和 CCD 组成.其中棋盘型相位 光栅采用了德国 Heidelberg 公司的 DWL4000 型激光直写系统与美国 Trion 公司的 Phantom III RIE 型反 应离子束刻蚀设备制成.首先使用激光直写工艺将相位光栅图样刻蚀在光刻胶层,然后采用反应离子束刻蚀 技术将光刻胶层上的图案转印到玻璃基底.相位光栅的周期为 11 μm,位于相位光栅后方的 CCD 像元尺寸 5.5 μm,分辨率则是 2 048×2 048,可以得到分辨率最高为 512×512 的波前相位图像.



图 5 用于定量相位成像实验的四波前剪切干涉仪 Fig.5 Quadriwave shearing interferometer for quantitative phase imaging experiment

随机波前使用 632.8 nm 光纤光源配合 Iris AO 公司的型号为 PT111-5 的 37 单元分段式微机电(Micro-Electromechanical Systems, MEMS)可变形镜生成,其反射镜单元的最大行程为 8 μ m,最大帧频 6.5 kHz. 可变形镜的面型为正六边形,其中每个六边形均为单个 4 自由度反射镜单元.为了验证测得波前的正确性, 采用法国 ZYGO 索菲型干涉仪作为对照,实验光路如图 6.其中,L₀:波长 632.8 nm 的光纤光源、S₁:20 mm 分光棱镜、S₂:6 mm 分光棱镜、L₁:10 mm 透镜、L₂:7 mm 透镜、L₃:5 mm 透镜、A₁:光瞳直径为 5 mm 的小 孔光阑、M₀:MEMS 可变形镜、C₁:ZYGO 干涉仪、C₂:四波前剪切干涉仪.



图 6 四波前剪切干涉实验光路 Fig.6 Optical path of quadriwave shearing interference experiment

2.2 实验结果

首先,使用 MEMS 可变形镜产生了均方根误差 (Root Mean Square, RMS)从 0.02~0.8 的一系列 离焦波前,图 7 为四波前剪切干涉仪探测到的波前 RMS 与可变形镜 RMS(标准参考值)的对比,基本 满足线性关系.由此可见,四波前剪切干涉仪可以得 到准确的相位测量结果.

接下来,使用可变形镜产生一系列随机的波前, 并且将四波前剪切干涉仪测量结果与 ZYGO 干涉 仪进行比对,图 8显示了其中一幅对照结果.表 1 为 可变形镜(原始像差)、ZYGO 干涉仪与四波前剪切 干涉仪的三次不同随机波前测量结果的 RMS 比较,可知四波前剪切干涉仪的相位测量误差不超过





3%,考虑到存在一定的非共光路像差,此即为理想的波前测量结果.



图 8 四波前剪切干涉仪测量结果与 ZYGO 干涉仪的对比 Fig.8 Comparison between the measurement results of QWSI and ZYGO

		쿳	長1 洌	则量随	比		
Tabl	e 1	RMS	compa	rison o	f random	wavefrom	nt measurements
	ME	MS	Z	YGO	Q	WSI	Error
	0.7	4λ	().74λ	0.	76λ	2.7%

1.26λ

1.83λ

0.8%

2.1%

1.25λ

1.87λ

3 显微定量相位成像实验

1.26*\lambda*

1.85λ

3.1 实验装置

使用小鼠肝癌活体细胞作为待测样本,进行了显微定量相位成像实验.实验系统使用尼康 TE2000-U 倒置显微镜,将四波前剪切干涉仪接入显微镜的前端口,光路如图 9 所示.实验装置使用 100 W 卤素灯、视场光



图 9 四波前剪切干涉显微定量相位成像实验光路 Fig.9 Optical path of microscopic quantitative phase imaging

阑、孔径光阑和聚光镜组成的科勒照明系统作为平面波参考,平面波前穿透细胞样本之后,光程差由于细胞 内部折射率不同而发生改变,从而产生含有细胞折射率分布信息的畸变波前,经过40×物镜和镜筒透镜后 进入四波前剪切干涉仪干涉成像,最终获得了同时含有待测细胞强度信息和相位信息的干涉图像.

3.2 实验结果

获得干涉条纹图像之后,首先对干涉图进行傅里叶变换获得频谱图,用滤波窗提取零级衍射频谱,进行 逆傅里叶变换,得到细胞的强度图像.然后用滤波窗分别提取出 x 和 y 方向的次级衍射频谱,进行逆傅里叶 变换,并且用取相位角运算求得相位梯度,用傅里叶积分法得到小鼠肝癌细胞的相位图像,并且通过第 2 节 的可变形镜标定方法获得具体的相位数值,最终获得的小鼠肝癌细胞的强度图像和相位图像如图 10 所示. 从图 10(a)中可以看出细胞的外形轮廓,而从图 10(b)中可以分辨出细胞内部的不同组分,细胞的强度和相 位图像清晰度都比较高,与文献[15]中描述的 Hepal-6 细胞形态一致.实验结果表明,四波前剪切干涉技术 可以定量测出细胞的相位信息.



(a) Intensity of mouse hepatoma cells

(b) Phase of mouse hepatoma cells



4 结论

本文分析了四波前剪切干涉的原理和波前相位的解调方法,从理论角度论证了使用四波前剪切干涉技术进行显微定量相位成像的可行性.通过波前探测实验测量可变形镜产生的随机波前,使用 ZYGO 干涉仪进行对照,结果表明四波前剪切干涉仪可以得到准确的相位测量结果.最后建立了一套基于四波前剪切干涉技术的显微定量相位成像系统,以小鼠肝癌活体细胞为样品,获得了清晰的强度图像和相位图像.实验结果表明,基于四波前剪切干涉技术的系统结构简单、操作方便,并且可以同时实现高精度的强度成像和定量相位成像.

参考文献

[1] MA Li-hong, WANG Hui, JIN Hong-zhen, *et al.* Experimental study on quantitative phase imaging by digital holographic microscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2012, **39**(3): 209-215.

马利红,王辉,金洪震,等.数字全息显微定量相位成像的实验研究[J].中国激光,2012,39(3):209-215.

- [2] FAULKNER M, RODENBURG M. Movable aperture lensless transmission microscopy: a novel phase retrieval algorithm[J]. *Physical Review Letters*, 2004, **93**(2): 023903.
- [3] YAO Yu-dong, LIU Cheng, PAN Xing-chen, et al. Research status and development trend of PIE imaging method[J]. Chinese Journal of Lasers, 2016, 43(6): 0609001.

姚玉东,刘诚,潘兴臣,等.PIE 成像方法技术现状及发展趋势[J]. 中国激光,2016,43(6):0609001.

- [4] ZHENG G, HORSMEYER R, YANG C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy [J]. *Nature Photonics*, 2013, **7**(9): 739-745.
- [5] SUN Jia-song, ZHANG Yu-zhen, CHEN Qian, et al. Fourier ptychographic microscopy: theory, advances, and applications[J]. Acta Optica Sinica, 2016, 36(10): 1011005.

孙佳嵩,张玉珍,陈钱,等.傅里叶叠层显微成像技术:理论、发展和应用[J].光学学报,2016,36(10):1011005.

[6] ZUO Chao, CHEN Qian, SUN Jia-song, *et al.* Non-iterferometric phase retrieval and quantitative phase microscopy based on transport of intensity equation: a review[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2016, **43**(6): 0609002.

左超,陈钱,孙佳嵩,等.基于光强传输方程的非干涉相位恢复与定量相位显微成像:文献综述与最新进展[J].中国激

光,2016,43(6):0609002.

- [7] VELGHE S, PRIMOT J, GUERINEAU N, *et al.* Visible and infrared wave-front metrology by quadri-wave lateral shearing interferometry[C]. SPIE, 2005, **5965**: 596512.
- [8] MOUSSET S, ROUYER C, MARRE G, et al. Piston measurement by quadriwave lateral shearing interferometry[J]. Optics Letters, 2006, **31**(17): 2634-2637.
- [9] BAFFOU G, BON P, SAVATIER J, et al. Thermal imaging of nanostructures using quantitative optical phase analysis [J]. ACS Nano, 2012, 6(3): 2452-2458.
- [10] PRIMOT J, GUERINEAU N. Extended Hartmann test based on the pseudoguiding property of a Hartmann mask completed by a phase chessboard[J]. *Applied Optics*, 2000, **39**(31): 5715-5721.
- [11] CHANTELOUP J. Multiple-wave lateral shearing interferometry for wave-front sensing[J]. Applied Optics, 2005, 44 (9): 1559-1615.
- [12] BON P, MONNERET S, WATTELLIER B. Noniterative boundary-artifact-free wavefront reconstruction from its derivatives[J]. Applied Optics, 2012, 51(23): 5698-5705.
- [13] LI J, BAI C, SHEN Y, et al. Optical path squeezing interferometry: boosting the resolution for Fourier transform imaging spectrometers[J]. Optics Letters, 2016, 41(22): 5329-5332.
- [14] DAI X, SHAO X, LI L, et al. Shape measurement with modified phase-shift lateral shearing interferometry illumination and radial basis function[J]. Applied Optics, 2017, 56(21): 5954-5960.
- [15] QIN D, BING H, HONG A, et al. Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncology Reports, 2013, 29: 1851-1858.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.11603024)

引用格式:CUI Bo-chuan. WANG Jian-li, YAO Kai-nan, *et al.* Experimental Study on Micro Quantitative Phase Imaging by Quadriwave Shearing Interferometry[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2018, **47**(7): 0718001 崔博川,王建立,姚凯男,等.基于四波前剪切干涉的显微定量相位成像实验研究[J].光子学报,2018,**47**(7):0718001