DOI:10.19789/j.1004-9398.2019.02.005

基于高倍物镜的相位显微成像方法*

杨 颖 张 岩

(首都师范大学物理系,北京 100048)

摘 要

当前基于干涉技术的相位显微成像方法已经被广泛研究,但基于非干涉方法(相位恢复)的相位显微成像研究还很少. 本文将相位恢复与显微成像技术相结合,提出并论证了一种基于高倍物镜的相位显微成像方法,适用于微米级相位型物体的显微成像. 该方法简单有效,针对高倍物镜显微系统的特性,采用同时移动CCD及显微物镜的拍摄方法,解决了传统拍摄模式下,高倍物镜的采样距离无法满足成像关系的问题. 通过CCD采集物面在不同传播的距离衍射放大像,利用测得的强度信息重建物体相位信息. 采用直径5 μm的聚苯乙烯微球作为待重建样品,使用100×物镜进行显微成像实验. 相位分布重建结果反映了样品真实高度的分布变化,证明了该方法的有效性. 与基于干涉技术的相位显微方法相比,该方法所使用的实验装置更加简单,易于操作且成本更低. 对于生物细胞或组织等相位型样品的厚度或折射率分布测量具有实际应用意义.

关键词: 相位恢复; 显微成像; 物像关系; 菲涅尔衍射; 高倍物镜

中图分类号: O438

0 引 言

显微成像技术在光学测量领域中有着广泛的应用. 传统的成像器件只对强度敏感,采集的图像中只包含振幅信息,忽略了相位信息. 对于相位型样品,相位信息通常包含更多的细节特征. 通过相位信息的测量,可以观测到传统方式无法检测到的信息. 在一些特定的应用领域,如显微成像[1-2]、图像加密解密[3-4]、精密元件检测[5]、生物医学研究[6]等具有重要的意义.

目前在显微成像领域大多采用干涉方法. 干涉方法主要通过记录、解析物光与参考光的干涉信息,得到样品的相位信息. 激光技术及电耦合元件CCD(charge coupled device)的相继发明,促进了数字全息等基于干涉方法的相位成像技术发展,很快应用于相位显微成像领域[7]. 随着技术及硬件的不断发展,新兴的干涉技术已经实现了细胞级别的相位显微成像. 2007年Choi等[8]利用层析相位显微术技术定量测定活体组织中三维折射率的分布情况,并展示了细胞结构随时间的演变情况. 2017年,Chowdhury等[9]提出了一种基于结构照明的显微成像方法,通过标准衍射层析计算,重建乳腺细胞三维折射率分布. 这些基于干涉技术的相位成像方法,相位测量结果精度很高,然而对参考光有较强依赖,测量光路复杂光学器件成本高昂. 迄今为止,如何实现既简单又高效的相位显微成像仍然是一个挑战.

相位恢复方法作为一种非干涉相位测量技术,克服了干涉法的弊端,无需参考光束,光路简单. 相位恢复方法直接测量强度分布,经反复迭代计算得出相位信息. Gerchberg-Saxton(GS)算法开创了双强度面迭代相位恢复方法的先河[10]. 杨顾算法是继GS算法后又一经典迭代类相位恢复算法,扩大了GS算法的适用范围[11]. 这两种迭代类型的经典相位恢复算法,计算过程依赖于初始采集的两个或单个强度面数据进行反复迭代. 如果这两个强度面给予的已知信息不够充分,容易导致计算陷入局部极小停滞. 并且这两个面的测量数据伴随整个迭代过程,如果初始采集存在实验误差,会制约重建结果的精度. 因此继GS算法和杨顾算法之后,一些研究提出了多强度面重构完整波场的方法[12]. 这种方法

收稿日期: 2018-04-11

* 国家自然科学基金(91233202)资助课题

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

增加了测量面的个数. 每增加一个测量面的数据都增加了计算时的已知信息,可以迅速高精度地逼近重建目标,从而可以不经迭代[13]或仅迭代有限的次数[14],即可得到良好的重建结果. 相位恢复方法广泛用于相位测量、图像处理和图像加密. 然而,相位恢复方法在显微成像领域应用尚且不多.

本文将相位恢复方法与显微成像相结合,通过光场强度测量,由相位恢复算法重构物体相位信息. 显微系统采用高倍大数值孔径物镜,提出了一种同步移动 CCD 和显微物镜的拍摄方式,改变了传统相位恢复方法单纯移动 CCD 位置的拍摄方法. 解决了高数值孔径物镜的焦距值小,传播面间采样距离无法满足成像关系的问题. 本文所提出的显微方法,重建过程无需迭代处理. 与其它相位显微方法相比,它具有非干涉、无迭代,实验结构不复杂,成本低,操作方便等优点. 可以应用于微米量级尺寸样品的三维相位显微成像研究.

1　高倍物镜显微成像原理

本文用普通光学高倍显微物镜构建显微系统,实现相位显微成像. 用显微系统拍摄样品成像最清晰位置及两个不同传播距离的放大强度像,利用相位恢复算法重建物体的相位信息. 采样定理对传播面的间隔距离有要求,如果间隔距离小于采样要求,则可能无法恢复相位[15].

1.1　采样定理及成像关系对传播面间距的要求

基于高倍物镜的显微系统,实现相位显微成像的关键是如何保证各物面位置满足成像关系的同时,使它们之间距离满足采样公式的要求. 显微系统的成像关系与凸透镜的成像规律一致. 如果 CCD 能采集到放大实像,样品所在平面(O_0)及其衍射物面 O_1、O_2 应位于显微系统 2 倍焦距与焦距之间(图 1)[16]. 且 3 个采样面间的距离应满足采样条件的要求. 传统的拍摄方法是移动 CCD 位置采集 O_0、O_1、O_2 的衍射放大像,以便进行相位重建. 高倍物镜数值孔径较大焦距较短,物距(W_0)大小与焦距(f)非常接近,二者差值应满足采样公式要求,以便能容纳 3 个衍射物面. 根据采样关系,当入射波长(λ)一定时,相邻衍射面间传播距离(z)的取值,与衍射面像素数 M、N 以及采样面上的采样间隔 Δx、$\Delta\xi$ 相关,如图 2 所示. z 需至少满足采样公式的最低距离要求 $z \geqslant \dfrac{N\Delta\xi\Delta x}{\lambda}$,才能恢复相位[15].

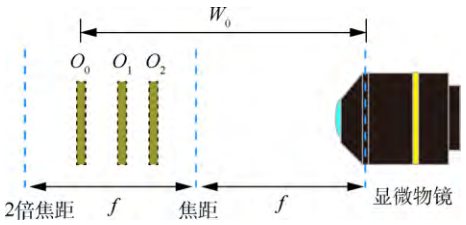


图 1　显微成像关系示意图

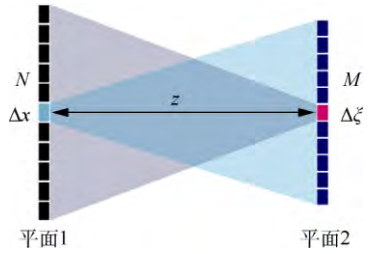


图 2　采样关系示意图

如果 λ = 632.8 nm,相邻衍射物面间像素大小 $\Delta\xi = \Delta x$ = 0.1 μm,像素数目(N) = 512,那么 z 至少需大于 29 μm. 本文使用高倍物镜(100×,数值孔径(NA) = 0.9)搭建显微系统,f = 2.149 8 mm,虽然理论上 2 倍焦距与 f 之间的距离足够容纳多个衍射物面,但是由于高倍物镜焦距很小,且物镜镜头表面在物镜套筒内,实验中不容易测量物距,因而很难控制这一距离. 2.2 节的实验中,由物像变换关系实际得到物距 w_0 = 2.178 6 mm,算得样品与焦距间的距离为29.1 μm. 显微成像关系要求物面位于系统 2 倍焦距与焦距之间,若第一个衍射物面 O_1 与样品 O_0 间的距离满足了采样公式要求,则第二个物面 O_2 的位置不会处于样品 O_0 与焦距之间,而是位于焦距与透镜之间,对应像面为虚像,因此导致无法恢复相位.

1.2　同时移动显微物镜与 CCD 的拍摄方法

为了使衍射物面间距既能满足菲涅尔近似又能满足采样定理及成像位置的要求,本文提出一种固定像距,同步移动显微物镜及 CCD 的拍摄方式,可以更方便地满足上述采样距离的要求. 拍摄方法如图 3 所示.

显微系统的入射光源为相干平面波,照射样品后,样品的衍射花样经显微系统放大,由 CCD 相机记录物体放大衍射图样. O_0 面为样品所在平面,首先用 CCD 记录其成像最清晰平面 I_0 的强度信息. 像面与显微物镜间的距离(Z)为像距,对应物面到显微物镜的距离(W)为物距. 保持 Z 不变,将显微物

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

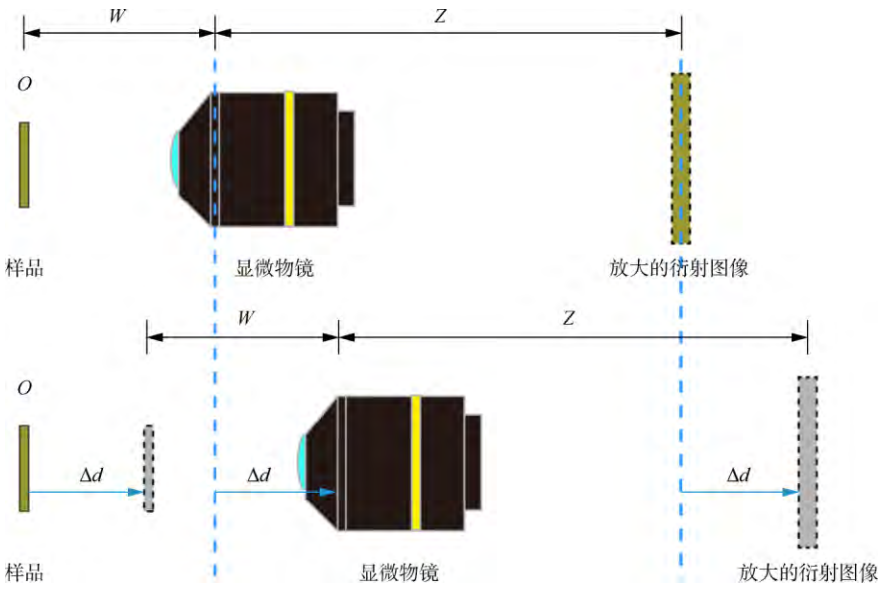


图 3 拍摄方法示意图

镜与 CCD 沿光场传播方向同步向后移动 Δd 距离，采集第一个衍射物面 O_1 的放大像面信息. 拍摄完毕后，再次将显微物镜与 CCD 同步向后移动 Δd 距离，记录样品的第二个衍射面 O_2 面的放大像. O_1、O_2、O_0 三个衍射面间的距离为 Δd. 本文的目标是由 O_1、O_2 面的强度分布重建 O_0 面的相位分布.

CCD 拍摄的衍射像是物面 O_1、O_2 的放大像，由于显微系统的 Z 是固定不变的，因此拍摄的三个放大像相对于物面 O_0、O_1、O_2 的放大倍率相同. 原物面与其放大像的强度分布情况相同，但原衍射物面的像素大小需由物像面间的放大关系计算得出. 将放大像面的像素尺寸除以显微系统的放大倍率，就得到 O_0、O_1、O_2 面的实际像素大小. 显微系统的放大倍率可利用已知尺寸的样品来计算. 拍摄样品成像最清晰位置的放大图像，将拍摄的样品尺寸与实际尺寸相比，得到系统放大倍率 (M). $M = L_1/L_0$，其中 L_1 为拍摄尺寸，L_0 为样品实际尺寸. 拍摄尺寸 $L_1 = N\Delta\xi$，其中 N 表示样品所占像素数量，$\Delta\xi$ 表示 CCD 单个像素尺寸. 由放大像的像素大小 $\Delta\xi$ 及系统放大倍率 M，可计算出样品所在平面 O_0 及其衍射物面 O_1、O_2 面的像素大小 $\Delta x = \Delta\xi/M$.

1.3 相位恢复方法

已知相邻衍射面间隔距离 Δd，计算出衍射物面 O_1、O_2 的像素大小 Δx，得到振幅分布 $(I_{01})^{\frac{1}{2}}$、$(I_{02})^{\frac{1}{2}}$，即可由相位恢复方法重建 O_0 面的相位分布. 重建过程既可沿光场传播方向由物体所在 O_0 平面向 O_1、O_2 面传播计算，也可由远离物体的 O_2 面向物体所在面 O_0 反向传播计算. 物面 O_0 与衍射面 O_1、O_2 间的传播满足菲涅尔近似条件. 如果已知 O_2 面的复振幅分布 $U_2(\xi,\eta)$，那么 O_1 面的复振幅分布可由菲涅尔变换表示为[17]：

$$U_1(x,y) = \frac{e^{jkz}}{j\lambda z}\iint U_2(\xi,\eta)\exp\left\{j\frac{k}{2z}\left[(x-\xi)^2+(y-\eta)^2\right]\right\}d\xi d\eta. \quad (1)$$

O_1、O_0 面的传播过程也可同样计算. 公式(1)中 $U_2(\xi,\eta)$ 为 O_2 面的复振幅分布，$U_1(x,y)$ 为 O_1 面的复振幅分布；z 为传播面间的距离；k 为波数，$k = 2\pi/\lambda$；脉冲函数为 $h(x,y) = \frac{e^{jkz}}{j\lambda z}\exp\left[\frac{jk}{2z}(x^2+y^2)\right]$. 公式(1)也可写作卷积形式[15]：

$$U_{n-1}(x,y) = U_n(\xi,\eta)\otimes h(x,y) = F^{-1}\{F\{U_n(x,y)\}F\{h(x,y)\}\}. \quad (2)$$

重建过程从衍射面 O_2 开始，步骤如下：赋予 O_2 面 $(-\pi,\pi)$ 区间初始随机相位分布 φ_2，与振幅值 $(I_{02})^{1/2}$ 结合，得到面的复振幅分布 $U_2 = (I_{02})^{1/2}\exp(j\varphi_2)$. 将复振幅 U_2 从面传播到 O_1 面，由公式(2)计算得到面的复振幅 $A_1\exp(j\varphi_1)$. 将振幅 A_1 替换为 $(I_{01})^{1/2}$，保留相位分布 φ_1，合成新的复振幅 $U_1 = (I_{01})^{1/2}\exp(j\varphi_1)$. 将 U_1 传播至 O_0 面，同样由公式(2)得到样品所在平面的复振幅 $U_0 = A_0\exp(j\varphi_0)$，其中相位 φ_0 即为样品的重建相位

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分布.

重建过程也可以由衍射面 O_0 开始,由菲涅尔衍射依次计算光场传播到 O_1、O_2 面的复振幅分布,并将计算振幅替换为测量振幅,最终将 O_2 面的复振幅分布逆向传播至 O_0 面,提取相位信息得到重建相位分布.

2　相位显微成像实验

使用直径 5 μm 的单分散聚苯乙烯微球作为成像实验的样品. 用移液枪吸取 20 μL 样本移入清洁的离心管中,加入 2 mL 酒精试剂与样本混合均匀,然后放入超声波清洗器中超声分散 1 min. 用滴管从离心管中吸取样本,滴一滴在洁净的载玻片上,用镊子小心夹住盖玻片边缘轻轻盖在样品上,将盖玻片与载玻片接触的边缘均匀的滴上密封胶隔绝空气,制作好样品装片.

2.1　实验过程及结果

搭建显微系统,图 4 为系统光路图. 激光器输出波长 632.8 nm,使用奥林巴斯物镜(100×,NA = 0.9),CCD(MV1-D2080-160-CL-12,photon focus)所拍图像像素数 2 080 × 2 080,像素大小 8 μm. 由电动平移台控制 CCD 的移动过程,平移台可移动的最大距离为 15 cm,每步最小可移动0.1 μm. 物镜可以沿光场传播方向调整前后位置,控制与样品的距离. 首先将 CCD 调至成像最清晰的位置,采集此处的图像. 此时样品与成像面间的距离约为 150 mm. 按照 1.2 节所述拍摄方式,每次将 CCD 和物镜均沿传播方向移动 Δd = 50 μm 的距离,采集另外两张衍射放大像. 截取图像 512 × 512 大小的部分,见图 5(a) 和 5(b).

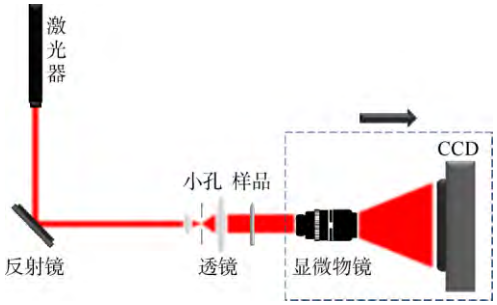


图 4　显微系统光路图

采集完毕后,测量 3 个微球直径,计算出成像最清晰处图像放大倍数为 M = 80. 物面的像素大小为 8 μm/M = 0.1 μm,利用 O_1 和 O_2 面的强度分布,由 1.3 节所述相位恢复方法重建物体完整光场信息,结果见图 6(a) 和 6(b).

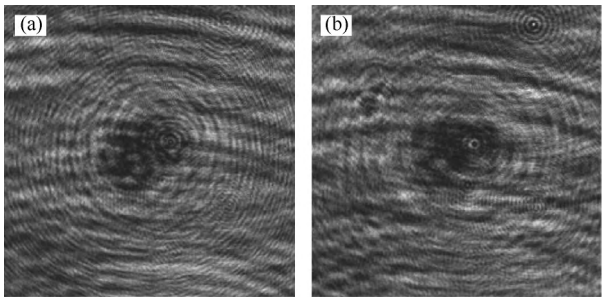


图 5　拍摄的像面. (a) CCD 从焦面移动 50 μm 所拍图像; (b) CCD 从焦面移动 100 μm 所拍图像

图 6(a) 为重建的样品相位信息,从相位分布情况可以清晰地看出微球厚度从中心到边缘是径向变化的. 如果仅从图 6(c) 样品的强度分布上则无法观测出有厚度分布变化的情况. 如果得知样品的折射信息,结合相位去包裹算法,可以应用于计算样品的真实厚度值.

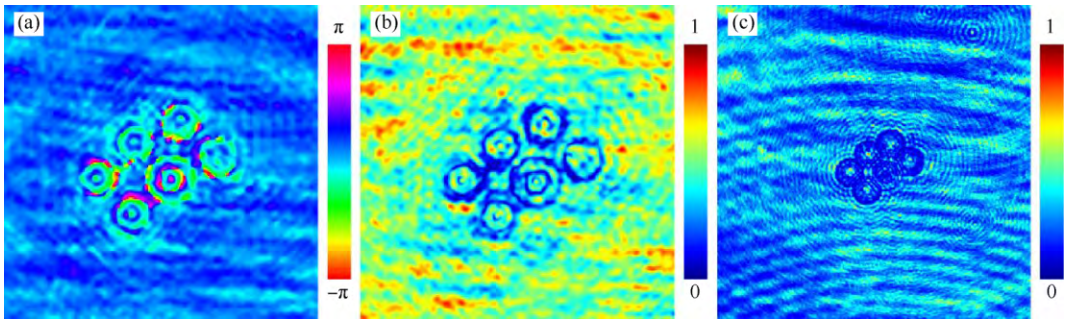


图 6　重建结果. (a) 重建物体 O 处的相位; (b) 重建物体 O 处的振幅; (c) CCD 在成像最清晰位置的成像

2.2　与只移动 CCD 拍摄的成像结果对比

为了进一步佐证本文提出方法的有效性,对比了只移动 CCD 拍摄成像的实验结果,所用物像关系如图 7 所示. 拍摄焦面 I_0 及与其相距 20 mm 及 140 mm的放大像面 I_1、I_2 面,见图 8(a) 和 8(b). Z_0、Z_1、Z_2 为 3 个放大像面到物镜的距离, W_0、W_1、

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

W_2 为样品及其衍射物面到物镜的距离. 像面与物面间的放大关系为 $M_i = Z_i/W_i$ ($i = 0,1,2$) . 物像关系 $\frac{1}{W_i} + \frac{1}{Z_i} = \frac{1}{f}$ ($i = 0,1,2,$) . 测出焦面放大倍率 $M_0 = Z_0/W_0 = 74$,样品与焦面距离约为 $W_0 + Z_0 = 165$ mm. 解得 $W_0 = 2.178\ 6$ mm, $Z_0 = 162.8214$ mm,焦距 $f = 2.1498$ mm. 由物像关系计算每个物面与物镜的距离 $W_1 = 2.172\ 8$ mm、$W_2 = 2.164\ 5$ mm. 三个物面的像素大小为 8 μm/ $M_0 = 0.1$ μm. O_1、O_2 面间的距离为 $W_1 - W_2 = 8.3$ μm, O_0 与 O_1 面的距离约为 $W_0 - W_1 = 5.8$ μm. 解出 M_1、M_2, 算出 I_1、I_2 面与 I_0 面的放大率比值 $X_i = M_i/M_0$ ($i = 1,2$) , I_1、I_2 面按照 $1/X_i$ 缩放比例进行缩小,得到物面 O_1、O_2 的强度分布. 由强度分布对物体进行相位恢复,重建结果如图 9 所示.

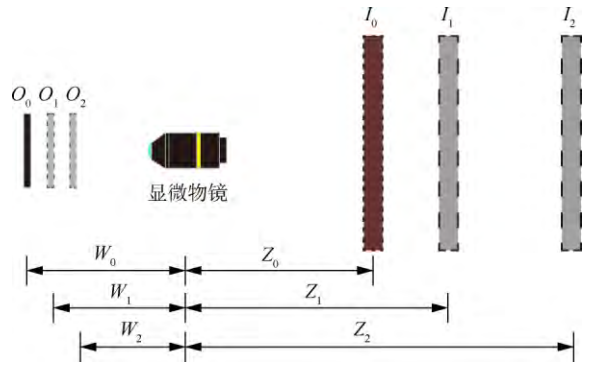


图 7 移动 CCD 拍摄方法的物像关系示意图

结果显示,只移动 CCD 拍摄的成像方法,由 1.1 节所述原因,在高倍大数值孔径的显微系统中并不能重建相位结果. 结合 2.1 及 2.2 节的成像结果,证实了本文所提出显微成像方法,应用于高倍大数值孔径物镜系统的有效性. 本文所提出的拍摄方式, CCD 采集的三个放大像,因为像距相同,放大倍率是相同的. 因此不必由物像关系计算每个物面与样品的距离,省去了物像面缩放转换的过程,与传统移动 CCD 的拍摄方式相比,计算过程更加简洁.

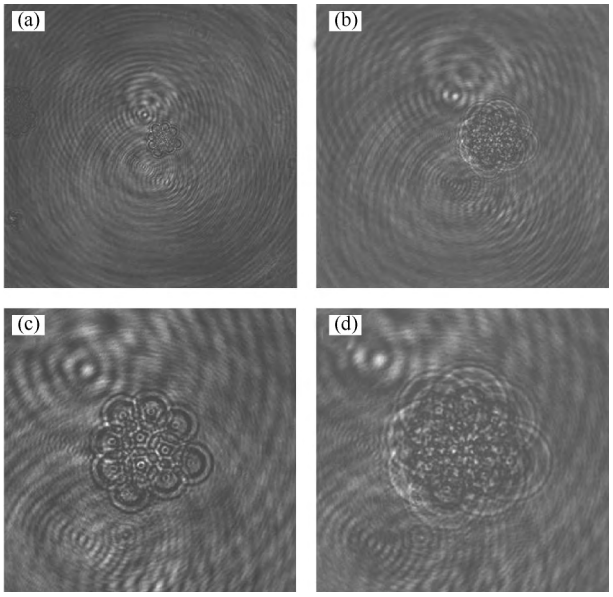


图 8 拍摄的像面与转换后的物面.
(a) 像面 I_1; (b) 像面 I_2; (c) 物面 O_1; (d) 物面 O_2

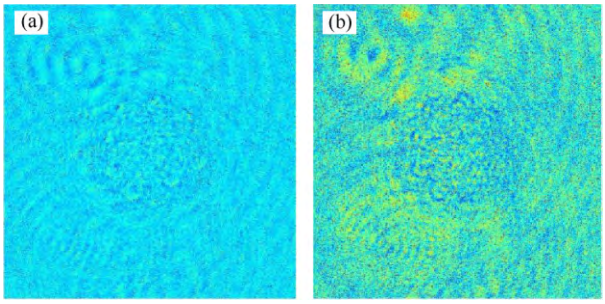


图 9 仅移动 CCD 拍摄成像的重建结果.
(a) 重建相位; (b) 重建振幅

3 结 论

本文通过将相位恢复与显微成像相合,提出了一种适用于高倍物镜显微系统的相位显微方法. 由 100 × 显微系统,成功重建了 5 μm 直径微球样品的相位分布,证实了所提出的相位显微方法的有效性. 该方法相对于干涉方法的显微方法优势在于光路及计算过程均更加简便. 本工作对于生物医学样品折射率或厚度分布计算具有实际应用意义.

参 考 文 献

[1] GRJASNOW A, WUTTIG A, RIESENBERG R. Phase resolving microscopy by multi-plane diffraction detection [J]. Journal of Microscopy, 2008, 231(1): 115 – 123.

[2] LUE N Y, CHOI W, POPESCU G, et al. Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy [J]. Applied Optics, 2007, 46(10): 1836 – 1842.

[3] RAJPUT S K, NISHCHAL N K. Fresnel domain nonlinear optical image encryption scheme based on Gerchberg-Saxton phase-retrieval algorithm [J]. Applied Optics, 2014, 53(3): 418 – 425.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[4] GUO C, WEI C, TAN J, et al. A review of iterative phase retrieval for measurement and encryption [J]. Optics & Lasers in Engineering, 2016, 89: 2 – 12.
[5] TAN Q F, PEDRINI G, OSTEN W. Phase retrieval of complex optical fields by binary amplitude modulation [J]. Applied Optics, 2008, 47(22): 4077 – 4084.
[6] DI J, ZHOU R J, YAQOOB Z, et al. Tomographic phase microscopy: principles and applications in bioimaging [J]. Journal of the Optical Society of America B-optical Physics, 2017, 34(5): B64.
[7] MIN J W, YAO B L, KETELHUT S, et al. Simple and fast spectral domain algorithm for quantitative phase imaging of living cells with digital holographic microscopy [J]. Optics Letters, 2017, 42(2): 227 – 230.
[8] CHOI W, FANG-YEN C, BADIZADEGAN K, et al. Tomographic phase microscopy [J]. Nature Method, 2007, 4(9): 717 – 719.
[9] CHOWDHURY S, ELDRIDGE W J, WAX A, et al. Refractive index tomography with structured illumination [J]. Optica, 2017, 4(5): 537 – 545.
[10] GERCHBERG R W, SAXTON W O. A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction phase pictures [J]. Optik, 1972, 35(2): 237 – 246.
[11] YANG G Z, DONG B Z, GU B Y, et al. Gerchbeg-Saxton and Yang-Gu algorithms for phase retrieval in a nonunitary transform system: a comparison [J]. Applied Optics, 1994, 33(2): 209 – 218.
[12] 郭澄. 基于多强度图像相位恢复的光场重构理论研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
[13] PEDRINI G, OSTEN W, ZHANG Y. Wave-front reconstruction from a sequence of interferograms recorded at different planes [J]. Optics Letters, 2005, 30(8): 833 – 835.
[14] ALMORO P, PEDRINI G, OSTEN W. Complete wavefront reconstruction using sequential intensity measurements of a volume speckle field [J]. Applied Optics, 2006, 45(34): 8596 – 8605.
[15] VOELZ D. Computational Fourier optics: a MATLAB tutorial [M]. Bellingham Washington USA: Spie Press, 2011.
[16] 光学显微镜原理及应用. http://www.microimage.com.cn/xwjs/2010/0727/article_2805.html.
[17] GOODMAN J W. 傅里叶光学导论 [M]. 3 版. 秦克诚, 刘培森, 陈家壁, 等译. 北京: 电子工业出版社, 2006.

Phase Microscopy Using High Magnification Objective Lens

YANG Ying　ZHANG Yan

(Department of Physics, Capital Normal University, Beijing　100048)

Abstract

Phase microscopy based on interference technology has been widely studied, while phase microscopy based on non-interference method(phase retrieval) has rarely been studied. A phase micro-imaging technique based on phase retrieval method was proposed and demonstrated, which was applicable for micron-scale phase objects imaging with a high magnification objective lens. The proposed high magnification imaging system had a problem that the sampling distance cannot satisfy the imaging formula. The problem was solved by moving the CCD and objective lens simultaneously. The phase distribution was reconstructed by the magnified intensity information measured at different diffraction planes. Phase imaging experiment with a 100 × magnification lens was presented using the polystyrene microspheres with 5 μm diameter as the sample. The phase reconstruction results reflected the height distributions of the specimen, which proved the effectiveness of the proposed method. The proposed microscopy technique had advantages in less complexity, easier in operation and lower in cost, comparing with the experiment setup used in the interferometry method. This approach was applicable for refractive index or thickness measurements of biological cells or tissue.

Keywords: phase retrieval; microscopy; object-image relation; Fresnel diffraction; high magnification objective lens

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net