

无透镜片上显微成像技术:理论、发展与应用

张佳琳, 陈 钱, 张翔宇, 孙佳嵩, 左 超

(南京理工大学 电子工程与光电技术学院, 江苏 南京 210094)

摘 要: 同时实现大视场、高分辨率成像是光学显微技术发展至今不断追求的永恒目标。传统光学显微镜由于其光学设计原理限制,空间带宽积一般总是限制在百万像素量级,从而无法同时兼顾高分辨率与大视场。另一方面,复杂的光学系统也使显微镜变得日趋昂贵、笨重、复杂且难以维护,极大地限制了其推广和应用。无透镜片上显微成像技术是近年来发展出的一种新概念计算成像技术:其不利用成像透镜聚焦,而直接将所观测的样本紧贴于成像器件光敏面上方记录图像,并结合相应的图像恢复算法实现清晰物像的反演与重构。由于具有视野大、分辨率高、无需标记、成本低、便携性好和可实现三维(3D)成像等优点,无透镜片上显微成像有望拓展传统显微成像技术的疆界,成为一种新型的快捷、便携的就地检验(POCT)工具。文中从无透镜成像基本原理、实验系统、重构方法及其典型应用进行了综述。最后,讨论了无透镜显微成像现存的一些关键问题以及今后可能的发展方向。

关键词: 无透镜; 数字全息显微; 相位恢复; 显微成像

中图分类号: O438.1 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201948.0603009

Lens-free on-chip microscopy: theory, advances, and applications

Zhang Jialin, Chen Qian, Zhang Xiangyu, Sun Jiasong, Zuo Chao

(School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract: Wide field-of-view (FOV) and high-resolution is one of the goals of optical microscopy. However, limited by the optical design in traditional optical microscopes, the space bandwidth product (SBP) is generally in the order of megapixels, and thus, high-resolution and wide FOV cannot be achieved at the same time. On the other hand, complex optical systems have also made microscopes increasingly expensive, cumbersome, complex and difficult to maintain, greatly limiting their promotion and application. Lensfree on-chip microscopy is a new computational imaging technology: without the imaging lens to focus, the sample is directly attached to the imaging sensor to record the diffraction patterns and the object information can be achieved with the corresponding reconstructed method. Due to its wide FOV, high-resolution, label-free detection, low-cost, perfect portability and three-dimensional (3D) imaging, the lensfree on-chip microscope is expected to expand the boundaries of traditional

收稿日期: 2019-01-10; 修订日期: 2019-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(61722506, 11574152); 江苏省杰出青年基金(BK20170034); 江苏省重点研发计划项目(BE2017162); 江苏省“333 工程”科研项目资助计划(BRA2016407); 南京理工大学自主科研基金(30917011204)

作者简介: 张佳琳(1993-), 女, 博士生, 主要从事无透镜显微成像方面的研究。Email: JialinZhang@njust.edu.cn

导师简介: 陈钱(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 博士, 主要从事光谱成像与智能感知等方面的研究。Email: chenqian@njust.edu.cn

通讯作者: 左超(1987-), 男, 教授, 博士生导师, 博士, 主要从事计算光学显微成像与快速三维传感等方面的研究。

Email: zuochao@njust.edu.cn

microscopic imaging technology and becomes a new type of fast, point-of-care testing (POCT) tool. In this paper, a review was given to introduce the basic principles, experimental systems, reconstruction methods and applications of lens-free imaging. Finally, the changeling problems as well as future research directions were also discussed.

Key words: lens-free; digital holographic microscopy; phase retrieval; microscopy

0 引言

2014年,诺贝尔化学奖授予的超分辨率荧光显微镜^[1-3],再一次展现了光学显微技术在人类科学发展历程中以及未来科技发展方向上的重要性。为了在大视场范围内长时间观察生物细胞的亚细胞特征,光学显微镜领域对成像分辨率和对比度的要求不断提高。随着相衬显微镜^[4]以及差分干涉相衬显微镜^[5]的出现,相位信息实现了向高对比强度信息变化的转变。显著的对比度增益使人们能够观察到以前几乎看不见的细胞和组织,这相当于生物成像领域的一场革命。随着绿色荧光蛋白^[6]的发现及其作为荧光生物标记物的应用,显微镜领域迎来了第二次革命。因而,荧光显微镜已成为细胞生物学的另一个主要工具。通过设计荧光标记,可以对细胞内的亚细胞结构进行高特异性的成像。最近,基于荧光标记的超分辨率显微镜方法为纳米亚细胞结构的观察探索出新的方法,为生物显微成像领域带来第三次革命性的影响^[3,7]。超分辨率荧光显微镜可以通过单分子定位(如随机光学重建显微镜(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM))^[8]和光激活定位显微镜(Photoactivated Localization Microscopy, PALM)^[9]或空间调制激发(如受激发射损耗荧光显微镜(Stimulated Emission Depletion Fluorescence Microscopy, STED))^[3]和结构光照明荧光显微镜(Structured Illumination Microscopy, SIM)^[9]实现对远超衍射极限的样品特征的观察。然而,荧光成像技术需要荧光染料和荧光蛋白作为生物标记物,因此不适用于非荧光或不容易被荧光标记的样品。此外,荧光剂的光漂白和光毒性将会影响活细胞的长时间成像^[10]。因此克服上述局限性非常具有挑战性,尤其在一段时间内需要对物体进行大视场成像时,其将会延长样品暴露在激发光下的时间,从而降低样品的活性^[11]。

尽管近年来显微成像技术已经取得了巨大的进步,但其成像系统的成像机制并没有产生根本性的变革,即所见即所得的成像模式^[12]。这种传统成像模式虽然看似简单易行,但仍面临着许多瓶颈问题,对于解决新的应用需求所带来的挑战已显得力不从心。而近几十年来,消费电子行业经历了巨大的变革,即以低成本、小型化的优势带给用户高性能的计算机以及各种远程通信设备。而这个数字时代也为光学显微镜的发展提供了各种新的机遇,近些年来快速发展的计算成像技术就是其中一种高效的解决方法。其不仅可以降低光学硬件的复杂度,而且可以利用新的理论和数值算法进行数字化补偿^[13]。因而发展出一系列新的显微成像方法:数字全息显微^[14-16]、光强传输方程定量相位显微^[17-20]、差分干涉相衬显微、(空域)叠层成像^[21-22]、傅里叶叠层显微成像(Fourier Ptychographic Microscopy, FPM)^[23-25]、计算衍射层析成像^[26-29]等。

以上这些新型的计算光学显微成像方法主要是以同时实现大视场、高分辨率、无标记定量相位测量为发展目标,从而规避常规光学显微系统的分辨率与视场的矛盾以及相位物体直接成像困难的问题。传统显微成像系统通过物镜放大后并能被成像设备采集到的物体的信息量总是有限的,一般由显微镜的空间带宽积(Space Bandwidth Product, SBP)所决定。类似于海森堡不确定性原理,SBP则可以用于衡量显微成像系统的信息承载力,一般而言 $SBP=2FOV/r^2$,其中 FOV 为显微镜的视场大小, $r=0.61\lambda/NA$ 为显微镜在非相干成像条件下的衍射极限分辨率。如表1所示,目前现有的大部分显微物镜的SBP都在千万像素两级,一般随着显微物镜的倍率的提高,成像系统的SBP有所下降。即前述的传统显微镜分辨率与视场大小难以同时兼顾。而这种有限的SBP制约了显微成像系统对复杂生物样品(如细胞集群)的单细胞研究。对于这个问题,其中一个代表性的解决方案是FPM。FPM整合了相位恢复^[30-33]和

合成孔径^[34-35]的概念,其利用空域中记录的光强信息与频域中的固定映射关系来进行交替迭代的。在传统 FPM 系统中,样品被不同角度的平面波照明并通过一个低数值孔径的物镜进行成像。不同角度的入射光可等效为在频谱上不同位置的交叠光瞳函数(子孔径),每次通过不同位置子孔径的频谱在频域上形成叠层,之后再利用相机拍摄到的一系列低分辨率图像在频域里迭代,依次更新对应的子孔径里的频谱信息,子孔径与子孔径交叠着扩展了频域带宽并恢复出超过物镜空间分辨率限制的高频信息(合成孔径),最终同时重构出物体的大视场高分辨率光强和相位图像(相位恢复)^[12]。这样就实现了使用一个低数值孔径、低放大率物镜,获得大视场和高分辨率的成像结果,最终重构的分辨率取决于频域中合成数值孔径的大小^[36]。

表 1 典型的显微物镜的空间带宽积

Tab.1 Spatial bandwidth product of typical microscopic objectives

Objective (Magnification/ numerical aperture/field number)	Resolution (incident wavelength: 532 nm)	SBP/megapixel
1.25x/0.04/26.5	8 113 nm	21.5
2x/0.08/26.5	4 057 nm	33.5
4x/0.16/26.5	2 028 nm	33.5
10x/0.3/26.5	1 082 nm	18.9
20x/0.5/26.5	649 nm	13.1
40x/0.75/26.5	433 nm	7.4
60x/0.9/26.5	361 nm	4.7
100x/1.3/26.5	250 nm	3.5

虽然 FPM 相比于传统的利用高倍物镜结合视场拼接技术^[37],在一定的程度上可以降低显微镜系统的成本、复杂度。但是由于上述的系统中都依赖于传统显微镜结构,体积庞大且成本较高。然而现实中最需要使用显微镜来识别病原体的地区往往资源匮乏,缺乏医院等基础医疗设施。所以在保证其成像质量的前提下,实现显微设备的体积小型化、成本低廉化、操作简便化是光学显微技术的一项发展目标。所以若能够简化照明与成像光路,抛弃昂贵笨重的光学镜头实现无透镜显微成像,必然能够大大降低显微镜的成本,同时为整体系统的小型化、轻量化提供

更多可能性。因此近些年来发展出了一种与传统的透镜显微镜相竞争的成像方式,即无透镜显微成像技术,其也逐渐成为解决传统显微镜 SBP 有限的一种方案。无透镜显微成像技术本质上是利用由物体(基于散射或荧光)产生的衍射图案直接记录在数字图像传感器阵列上,而无需通过任何透镜元件进行光学成像或放大。

在无透镜成像结构中,由于成像器件本身不具备放大能力,成像的分辨率往往较低。为克服这一问题,传统的无透镜全息成像往往采用相干球面波照明,并将待测物体尽可能靠近光源以获得足够的放大率。这种球面波预放大方式虽然简单易行,但也带来了两大矛盾,即放大率与视场大小之间的矛盾(放大率越大,视场越小)以及放大率与数值孔径之间的矛盾(放大率越大,由物距与探测器尺寸所决定的等效数值孔径越小)。前者限制了成像区域的范围,后者则限制了系统可实现的极限分辨率。此外更重要的是,由于部分相干成像所固有的相干门限效应,这种大物距的无透镜成像方式无法直接应用于采用低相干照明的非干涉成像中。因此,近年来的无透镜显微成像都尽可能地待测物体靠近传感器以提高无透镜视场和系统极限分辨率。理论上这种无透镜显微成像系统可以等价于一个放大率为 1,数值孔径为 1 的传统光学显微镜,即相比于传统显微镜的 SBP 提升了 2 个量级。2008 年,Cui 等^[38]和 Ozcan 等^[15,39]在结合微流体通道,利用片上显微镜实现了对不同类型细胞(如 NIH-3T3 成纤维细胞、小鼠胚胎干细胞、AML-12 肝细胞)的无透视镜片上监测。与此同时,Ozcan^[40]等还将无透镜成像技术应用到流式细胞术,实现了红细胞、酵母细胞、大肠杆菌和各种尺寸微粒的混合溶液的高通量自动分选。2009 年,Ozcan^[41]等通过记录的准相干光场照射产生的同轴衍射全息图,以及相位恢复技术实现了微粒和细胞强度和相位的重构。2011 年,Lee 等^[42]实现了对感染恶性疟原虫的红细胞进行彩色成像。同年,Zheng 等^[43]在不采用微流通道的前提下,基于投影式无透镜显微镜实现了细胞生长以及胚胎干细胞分化的跟踪。无透视镜片上显微成像技术除了上述的接触式投影成像技术^[15, 38-40,42-44],还有一大类为基于衍射的无透镜显微成像技术^[45-59]。后一类无透镜显微成

像技术本质上是依赖计算来消除或者部分消除样品和成像面之间的产生的衍射现象。具体地,其在重构物体的聚焦图像时,由于缺少相位信息,所以重构后的聚焦图像往往存在着共轭像,因此相位恢复^[16,31,60-62]是无透镜显微成像过程中的关键因素之一。与此同时,受制于传感器的制造工艺、光源的相干性等一系列因素,无透镜显微成像还迫切地需要提高重构分辨率。在国外关于提高无透镜显微成像分辨率的理论研究已有大批报道,例如,光源/样品/传感器横向位移(光源阵列)^[50,63-66],光源多角度扫描^[67]等。在国内,浙江大学刘旭^[68-69]、上海交通大学吴继刚^[38-39,70]等课题组针对无透镜成像分辨率的提高、相位恢复开展了系统研究。近年来,该课题组也针对此方向开展了持续、系统的研究工作,在无透镜显微成像理论方面的若干关键问题上取得了一定进展,包括:基于光强传输方程的(Transport of Intensity Equation, TIE)相位恢复理论^[17-19,71-74],通过固定物平面、多波长照明的方式实现无透镜、非干涉定量相位的准确恢复^[75];基于轴向多高度扫描的相位恢复方法以及压缩感知建立了无透镜显微成像像素传递函数模型,并考虑自适应松弛系数,实现了无透镜成像横向分辨率的提高以及重构噪声的抑制^[76];借鉴亚像元成像理论,采用主动式微扫描,建立基于时-空信息的无透镜显微成像像素传递函数模型,在提高无透镜成像的横向分辨率的同时实现了单帧动态相位成像^[77];采用二维 LED 阵列多角度照明的方式覆盖物函数三维频谱空间内的支持域,并发展出基于“空域约束,频域填充”的迭代补偿算法,以提高相位层析的轴向分辨率^[75]。时至今日,关于无透镜显微成像领域的新研究与新进展仍不断涌现,越来越多的学者投身其中,相关的研究报道也开始显著地增长。

文中系统地回顾无透镜显微成像的基本理论、研究成果与最新进展。根据无透镜显微成像方法的不同,分别给出了投影式成像(第 1 节)、荧光成像(第 2 节)、数字全息重构成像(第 3 节)、三维层析成像(第 4 节)、彩色成像(第 5 节)、基于深度学习的无透镜显微成像(第 6 节)的基本概念以及实验光路结构与具体应用,其中重点介绍了数字全息重构成像中的像素超分辨以及相位恢复方法。最后给出了无透镜显微成像的典型应用(第 7 节),并总结了全文并对现存问题以及今后的研究方向进行了展望(第 8 节)。

1 投影式成像

投影式成像是最简单的一种无透镜成像方式,它的基本实验光路结构如图 1 所示。整个过程无需图像重构算法。在投影式成像中,样品直接放置于传感器表面,空间相干性有限的光源直接照射相位物体,样品的投影直接由图像传感器采集。这里假设光源到样品的距离为 z_1 ,样品到图像传感器的距离为 z_2 。所以携带样品信息的光场需要传播 z_2 才能被相机捕获,而且由于现在的半导体工艺,传感器的像

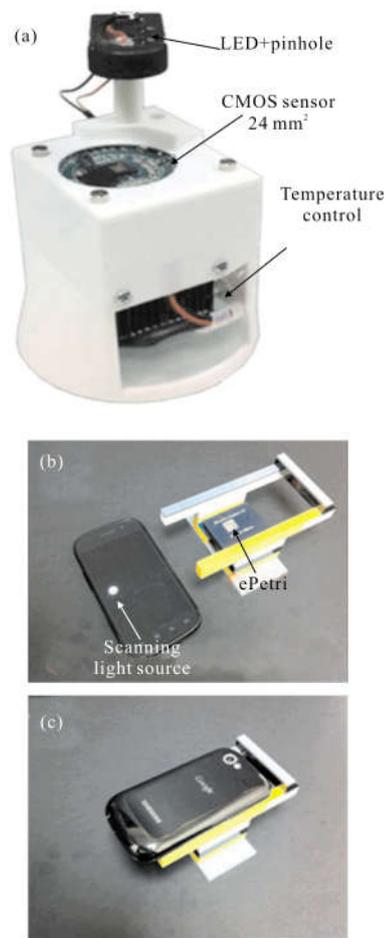


图 1 投影式无透镜显微成像的实验系统图。(a) 具有独立温控的紧凑型无透镜成像装置^[78]; (b)~(c) ePetri 成像系统,手机 LED 屏幕作为扫描光源^[43]

Fig.1 Schematic diagram of the lens-free microscopy based on shadow imaging. (a) Compact lensless imaging device with independent temperature control^[78]; (b)~(c) ePetri imaging platform, with the LED screen of a smartphone as the scanning light source^[43]

素尺寸一般都比较大(目前最小的像素尺寸大概是 $0.8\ \mu\text{m}$),所以投影式成像中传感器采集时存在像素化,而且直接获得的是物体的离焦信息。当光源相干时,采集的图像可能由一系列同心的干涉/衍射条纹图案组成,如图 2(b)、(d)、(g);当光源完全不相干时,采集的图像可能是由模糊点组成,如图 2(a)、(c)、(e)、(f)所示。而光源的相干性取决于光源相对 z_1 的横向尺寸(空间相干性)和光源光谱的带宽(时间相干性)^[79]。需要注意的是,该节主要介绍仅依赖物体的投影信息分析待测物体,而不尝试从采集的欠采样图像中重构出物体的聚焦信息。

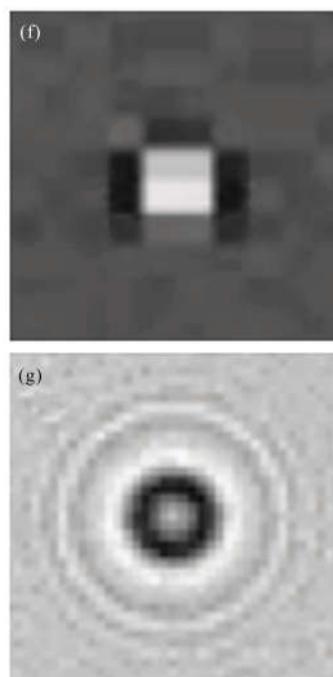
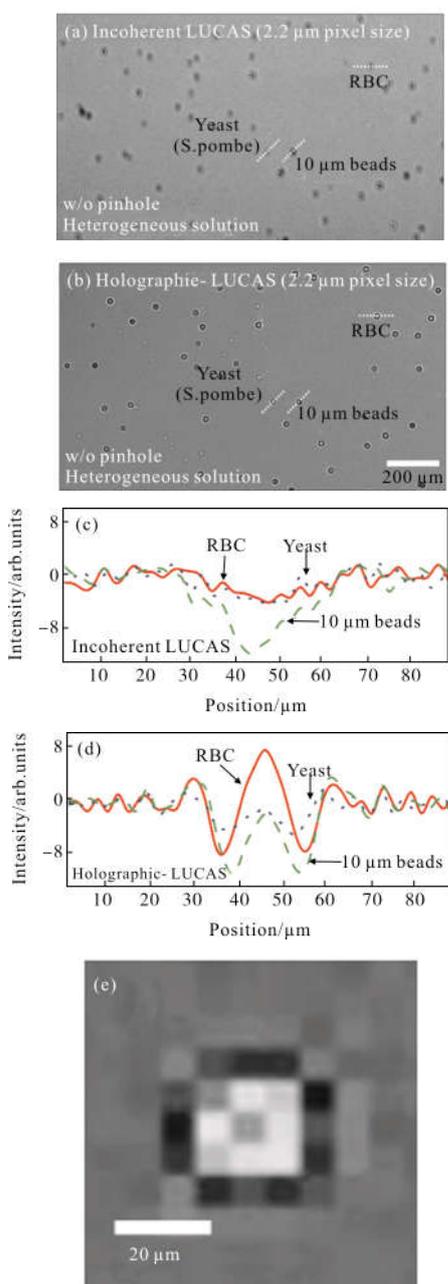


图 2 无透镜投影成像^[40,80]

Fig.2 Lens-free shadow imaging^[40,80]

图 2(a)~(b) 给出了混合溶液的非相干和相干投影成像,其中混合溶液是由红细胞(RBC)、酵母细胞(Yeast)和 $10\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯珠 ($10\ \mu\text{m}$ beads)组成。图 2(c)~(d)分别对应了图 2(a)~(b)中三种微粒的剖面曲线。图 2(e)~(f) 是利用 $9\ \mu\text{m}$ 像素的传感器在分别距离样品 $z_2=650\ \mu\text{m}$ 和 $z_2=300\ \mu\text{m}$ 处获得的聚苯乙烯珠的非相干投影图像。可以看出当使用相同的像素尺寸的传感器时,离焦距离越小,采集的投影越接近待测物体,且越容易定位物体的位置。图 2(g) 则是使用 $2.2\ \mu\text{m}$ 像素的传感器在 $z_2=650\ \mu\text{m}$ 处获得的聚苯乙烯珠的相干投影图像^[40,80]。

在无透镜投影成像模型中,一般测量对象是如图 2 所示的部分透明的物体,因此传感器记录得到的投影图像不是黑白的,而是具有灰度阶的复杂图像。结合图像匹配方法,这些图像可以被用于识别特定类型的粒子。无透镜投影成像最初是用于血细胞(红细胞、白细胞),后来被逐渐应用于成纤维细胞、小鼠胚胎干细胞、肝细胞、人宫颈癌细胞(Hela 细胞)、精子细胞、Hep-G2 细胞等^[43,79-90]。由于这种成像模式无需进行数值重构,所以其不仅可以用于静态物体的成像还可以用于细胞分裂、运动以及其他特性的监测^[79,89,91]。此外,由于整个成像系统体积小,因此还可以置于标准的细胞培养箱中用于长时间细胞

观察(如图 1(a)所示)。

对于识别细胞形态这种应用,一般不需要采集的物体投影与实际物体非常相似性。然而对于测量这种应用,就需要采集到的物体投影与待测物体尽量相似,所以在不使用重构算法时,就必须尽量减小衍射产生的影响,一般是缩小样品和传感器之间的距离(如图 2(e)、(f)所示)。而直接购买的传感器表面一般存在着保护玻璃层,所以 z_2 实际最小值一般在几百微米尺度上。因此,如果需要进一步减小 z_2 ,就需要考虑去除传感器表面的玻璃层^[43]。

当尽量减轻了无透镜投影成像中的衍射问题后,无透镜投影成像结果的另一大问题是分辨率低。一般极限分辨率取决于像素大小,目前传感器的像素大小一般在 $0.8\sim 10\ \mu\text{m}$ 之间变化,这会导致采集到的图像的分辨率远低于实际需要。因此,有学者考虑通过在样品正下方放置一组小孔来改善,简而言之,在传感器上涂一层不透明的金属层,在金属层上排列一个亚微米的小孔阵列,其中每个小孔对应传感器上的一个像素点(如图 3(a)所示),即相邻小孔之间的间隔等于传感器像素长度。假设样品是一个薄物体,当样品位置相对于小孔阵列发生位移时,它将会改变通过每个小孔的光的透射率,这近似地对应于该时刻样品的局部透射率,因此,通过每个小孔的随时间变化的透射率可以看作样品的线扫描。因而,小孔阵列的功能就类似于扫描探针阵列,例如近场扫描光学显微镜(Near-field Scanning Optical Microscope, NSOM)。其中对于无透镜投影成像,最常用的扫描方法是通过在小孔阵列顶部制造微流体

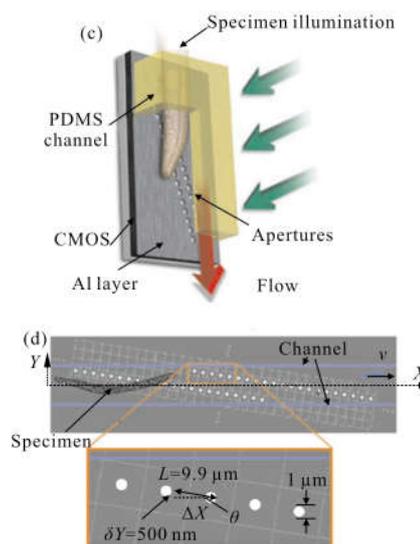
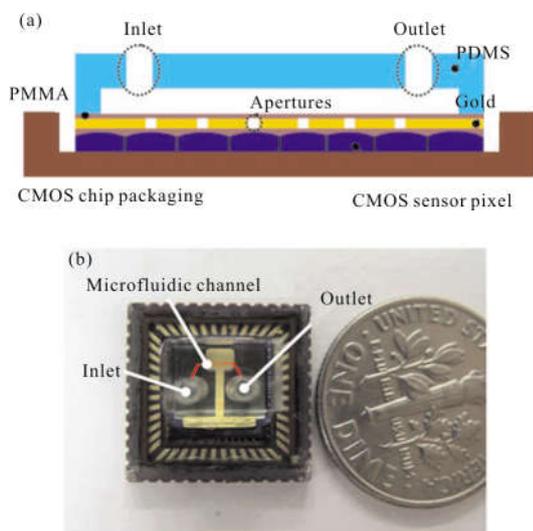


图 3 (a) 无透镜光流体显微镜的横截面示意图;(b) 无透镜光流体显微镜实物图(红线代表微流体通道);(c) 操作方式示意图;(d) 实验装置顶视图。白色圆圈为小孔,浅灰色虚线网格为镀铝的二维 CMOS 图像传感器,蓝线为微流体通道^[38,92]

Fig.3 (a) Cross-sectional scheme of the optofluidic microscopy; (b) photo of the lens-free optofluidic microscopy. (The red line represents the microfluidic channel); (c) schematic diagram of operation mode; (d) top view of the device. The white circles are apertures. The light gray dashed grid is the CMOS image sensor coated with the Al, and the blue lines represents the whole microfluidic channel^[38,92]

通道,让待测物体实现流动,从而形成光流体显微镜,其实验装置和操作过程如图 3(b)、(c)所示。这种无透镜投影式成像方法在有效地减小成像系统体积的同时提高了成像的分辨率^[38,92]。对于一个二维物体,这种方法的成像分辨率一般受限制于小孔大小和相对于小孔扫描样品的精度(即微流通道与小孔阵列的夹角 θ),如图 3(d)所示。需要注意的是,该方法所基于的假设是当物体通过倾斜微流通道时不产生形变,从而才能实现精确高分辨率成像。这对于动态物体的成像施加了一定的限制条件。

2 荧光成像

无透镜成像中类似于上述的投影成像的简单成像方法还有一类叫荧光成像,主要区别在于荧光成像利用样品发射的非相干荧光取代散射中的部分相干或相干信号^[93-94]。但是考虑到样品发射荧光需要一个激发光源,而激发光和发生光的波长一般是不

同的,因此,在搭建实验装置时一般需要在样品和传感器之间放置一个滤波器来滤除激发光^[95]。

然而即使使用了滤波器,仍然可能有部分激发光泄露到传感器平面,因此有时需要其他方法来减少这种情况的发生,例如,增加全内反射的几何结构(典型的系统结构如图 4 所示,整个成像系统的放大率 ~ 1 ,全反射发生在玻璃-空气界面,位于玻璃层的底部。其中为了避免检测到散射激发光,在玻璃层下面添加了塑料的吸收滤光片(图像是根据参考文献[93-94]修改而来)^[93-94,96-97];使用集成了滤波片的传感器^[98-99]。

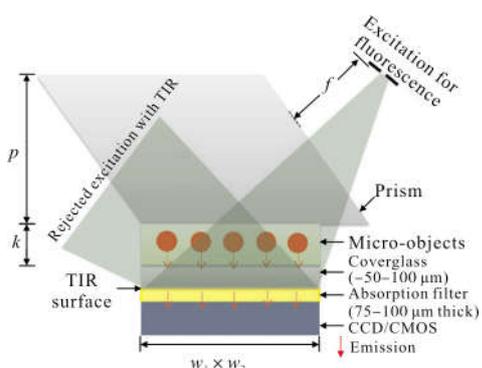


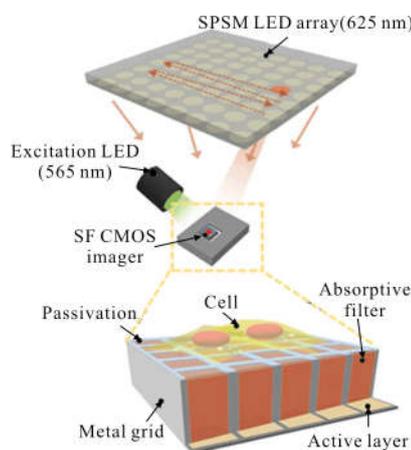
图 4 无透镜荧光成像的原理图

Fig.4 Schematic diagram of the lens-free fluorescent imaging

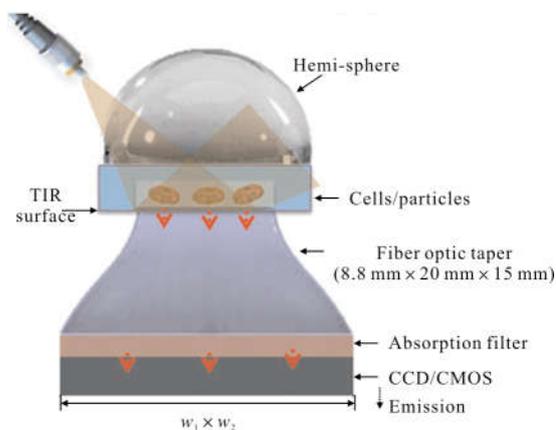
与其他成像方法一样,无透镜荧光成像的分辨率通常受制于系统的点扩散函数(Point Spread Function, PSF),该函数可以通过记录从样品平面的单个荧光点发出的光到图像传感器平面上光斑大小来确定^[92]。因此,可以看出样品到传感器平面 z_2 将会影响该点扩散函数,例如,当 z_2 为 $\sim 200 \mu\text{m}$,PSF限制了分辨率为 $\sim 200 \mu\text{m}$ ^[94-95]。而远比大多数基于透镜的显微镜系统的分辨率要差得多。因此,尽管在成本、便携性和视野方面,无透镜荧光成像装置有明显的优势,但这种方法获得的空间带宽积并不比传统的有透镜成像具有优越性^[100]。

因此,为了提高无透镜荧光成像的分辨率,可以从硬件和计算方法两方面来考虑如何提高成像分辨率。这里给出四种常见的硬件方法:(1)将滤波器直接放置在传感器上,使滤波器每个元素与传感器像元一一对应,使得 z_2 可以最小化(如图 5(a)所示)。采用这种方法,可以让空间分辨率提高到 $\sim 13 \mu\text{m}$ ^[99];(2)使用紧密排列的光纤阵列来中继荧光激发光^[96]

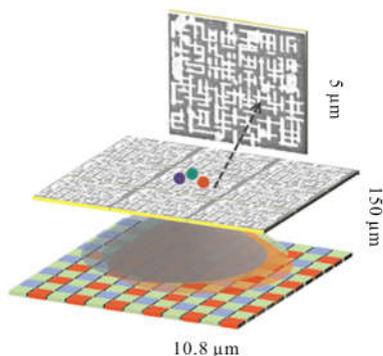
(如图 5(b)所示)。原理上,当这些光纤将光线传递到图像传感器时,光纤光束会放大,从而为无透镜成像提供了一定程度的放大率。采用这种方法,可以使分辨率提高到 $\sim 4 \mu\text{m}$ (像素尺寸为 $9 \mu\text{m}$),这种方法的分辨率主要是由接触样品的光纤的锥形程度决定^[96];(3)将纳米结构的掩模放在靠近待测物体的地方,如图 5(c)所示,此时系统的 PSF 不再具有空间不变性,而将依赖于纳米结构。通过这种方法,最高可以实现 $2\sim 4 \mu\text{m}$ 的亚像素级分辨率(像素尺寸为 $5.4 \mu\text{m}$)^[101-102];(4)利用位置精确且紧密排列的激发点来提高分辨率,例如,利用塔尔博特效应,实现了分辨率为 $1.2 \mu\text{m}$ 的荧光成像^[103](像素尺寸为 $5.2 \mu\text{m}$),其实验结构图如图 5(d)所示。



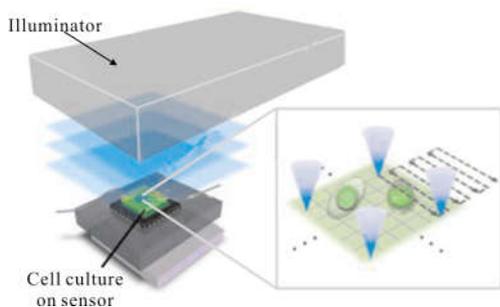
(a) 基于滤波器点阵成像传感器的无透镜荧光显微成像示意图
(a) Lens-free fluorescent microscopic imaging based on the CMOS image sensor with a silo-filter (SF) lattice



(b) 基于锥形光纤中继的无透镜荧光显微成像示意图
(b) Lens-free fluorescent microscopic imaging based on a tapered fiber-optic faceplate



(c) 基于纳米结构掩模的无透镜荧光显微成像示意图
(c) Lens-free fluorescent microscopic imaging based on the nanostructured substrates



(d) 基于均匀激光照射以及微透镜阵列的无透镜荧光显微成像示意图

(d) Lens-free fluorescent microscopic imaging based on a uniformly laser-illuminated lenslet grid

图 5 无透镜荧光成像分辨率硬件补偿示意图

(图像是根据参考文献[96,99,101-103]修改而来)

Fig.5 Schematic diagram of the lens-free fluorescent imaging platform for resolution improvement

除了物理补偿的方法，还可以利用计算补偿的方法来提高成像分辨率，常用的方法有：(1) 反卷积，例如，使用 Lucy - Richardson 算法^[94,104-105]，可获得高达 40~50 μm 的分辨率^[94]。(2) 基于压缩解码，可获得~10 μm 分辨率^[93]，但该方法非常依赖于荧光物体的自然稀疏性，例如，可以用于转基因荧光线虫的成像^[97]。

3 数字全息重构成像

当照明光源的空间相干性和时间相干性足够好时，其照射样品后，相机采集的条纹可以看作是干涉条纹。不同于无透镜投影成像，基于数字全息重构的无透镜成像是利用这些干涉条纹通过计算获得物体在聚焦平面的强度和相位信息。通常情况下，基于数字全息重构的无透镜成像本质上是同轴

数字全息重构，原理上，采集的图像是由样品上的物体散射的光 $U_o(x, y)$ 与未受干扰直接通过透明基板的参考光 $U_R(x, y)$ 之间产生干涉：

$$U(x, y) = U_R(x, y) + U_o(x, y) = A_R + A_o(x, y)\exp[i\phi_o(x, y)] \quad (1)$$

式中： A_R 和 A_o 分别为参考光和物光(物体)的振幅信息； ϕ_o 为物光(物体)的相位信息，而数字全息重构的目标就是通过直接采集的光强信息 $I(x, y)$ 恢复物光的振幅和相位信息，整个过程可以简化地看作：

$$U_c(x, y) = \mathcal{F}^{-1} \{ \mathcal{F}[U_I(x, y)] \times H_{-z_2}(x, y) \} \quad (2)$$

式中： $U_I(x, y)$ 为采集的全息图的复振幅，一般地 $U_I(x, y) = \sqrt{I(x, y)}$ ； $U_c(x, y)$ 为重构的物体的复振幅； $H_{-z_2}(x, y)$ 为角谱传播，反传播了 z_2 的距离：

$$H_{z_2}(x, y) = \begin{cases} \exp\left(ikz_2 \sqrt{1 - \lambda^2 f_x^2 - \lambda^2 f_y^2}\right) & f_x^2 + f_y^2 < 1/\lambda^2 \\ 0 & f_x^2 + f_y^2 \geq 1/\lambda^2 \end{cases} \quad (3)$$

式中： λ 为照明光源的波长； f_x 和 f_y 为空间频域坐标； z_2 为样品到传感器平面的距离。在实际情况中， z_2 的值往往是无法直接精确地测量，因此，经常需要一些重聚焦的算法来获得 z_2 值^[106-107]。对于基于数字全息重构的无透镜显微成像来说，重构主要可以分为两大部分：(1) 相位恢复^[30]或共轭像消除算法^[108]，主要用于消除由于样品和传感器之间的间距产生的衍射的效应；(2) 像素超分辨率^[109-111]，主要用于克服相机像元尺寸引起的分辨率降低，从而实现无透镜亚像素分辨率^[50,63,65,76,112]。

对于传统的无透镜重构来说，超分辨率成像和相位恢复是按序进行的。此后也发展出可以同时实现像素超分辨率和相位恢复的方法，Luo 等^[52]还将这两个方面统一到一个数学框架中，称之为相量传播方法，该数学框架有效地分析不同参数对全息图像重构方法消除共轭像以及像素混叠的影响，从而提高数据利用效率。

由于无透镜的结构简单，其原理结构图如图 6 所示，对于无透镜成像来说，可控参数主要包括照明角度(θ_k 和 φ_k)、波长 λ_k 、样品到传感器距离 z_2 以及样品相对于图像传感器的横向位移($x_{\text{shift}, k}$ 和 $y_{\text{shift}, k}$)。而这些主要参量对共轭像以及像素混叠的影响如图 7

所示。图 8 给出了几种比较典型的无透镜显微成像装置。该节主要讨论传统的基于数字全息重构成像方法,而最新的结合机器学习(深度学习)实现图像重构的方法将在第 7 节中讨论。

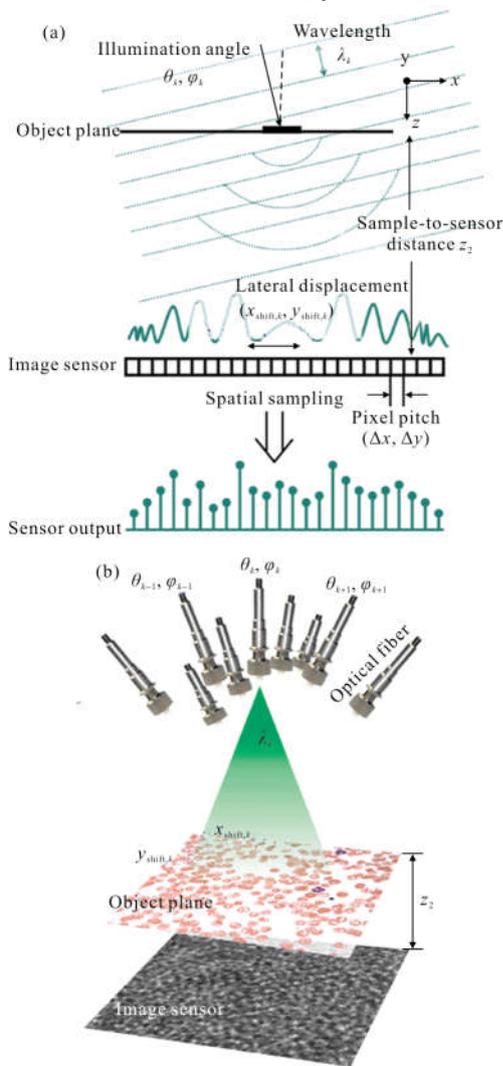
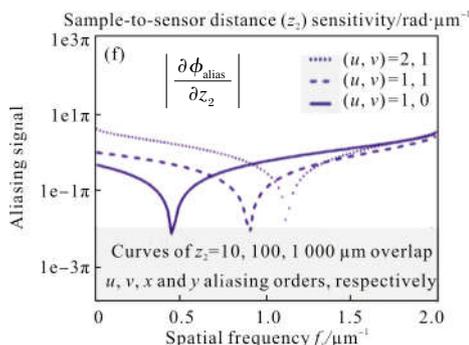
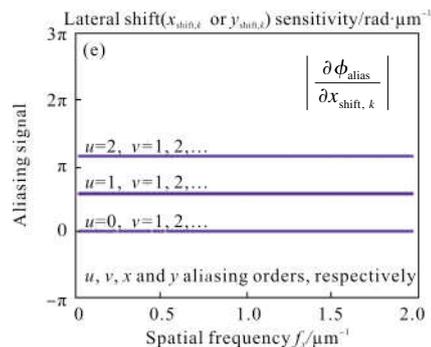
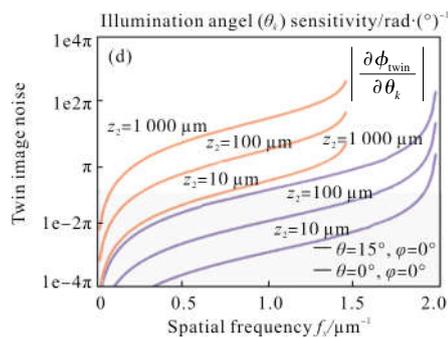
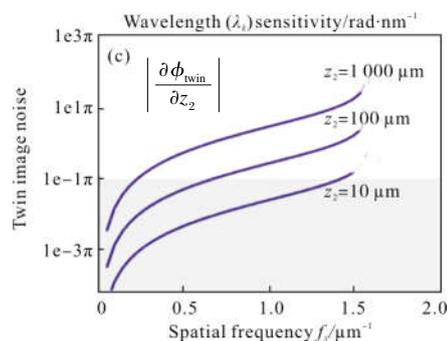
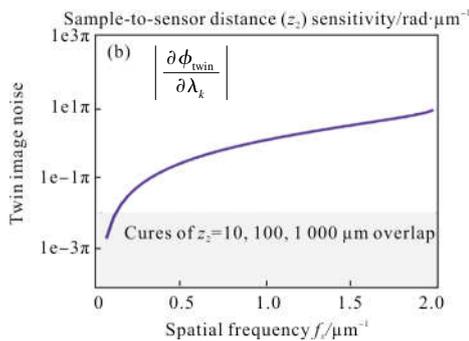
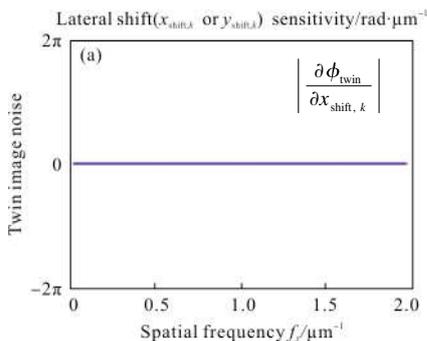


图 6 (a) 同轴全息成像系统原理图;(b) 无透镜片上全息显微镜的光学装置示意图(图像修改自参考文献[52])

Fig.6 (a) Configuration of an in-line holographic imaging system;
(b) Schematic of the optical setup of a lensfree on-chip holographic microscope



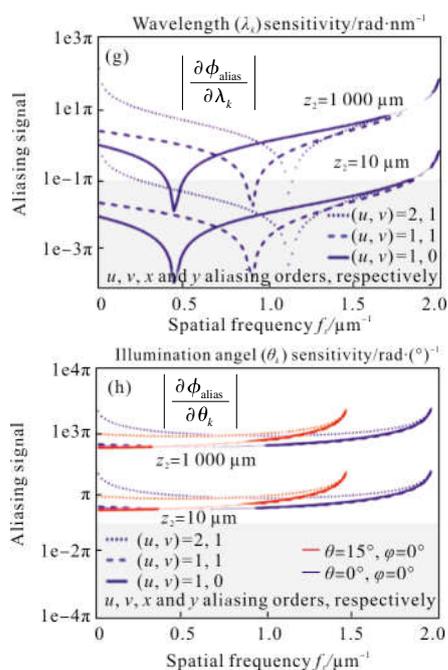


图 7 传播相量对应各成像参数的变化曲线。共轭像相量的相位 (ϕ_{win})相对于(a)横向位移 $x_{\text{shift},k}$ 和 $y_{\text{shift},k}$, (b) 样本到传感器距离 z_2 , (c) 照明波长 λ_k 以及(d) 照明角度 θ_k 的偏导数。像素混叠相量的相位 (ϕ_{alias})相对于(e) $x_{\text{shift},k}$ 和 $y_{\text{shift},k}$, (f) z_2 , (g) λ_k 以及 (h) θ_k 的偏导数^[52]

Fig.7 Sensitivity of propagation phasors to various imaging parameters. (a) Partial derivatives of the twin image phasor's angle (ϕ_{win}) with respect to (a) the lateral shifts $x_{\text{shift},k}$ and $y_{\text{shift},k}$, (b) sample-to-sensor distance z_2 , partial derivatives of (c) the illumination wavelength λ_k , and (d) the illumination angle θ_k . Partial derivatives of the spatial aliasing phasor's angle (ϕ_{alias}) with respect to (e) $x_{\text{shift},k}$ and $y_{\text{shift},k}$, (f) z_2 , (g) λ_k , and (h) θ_k ^[52]

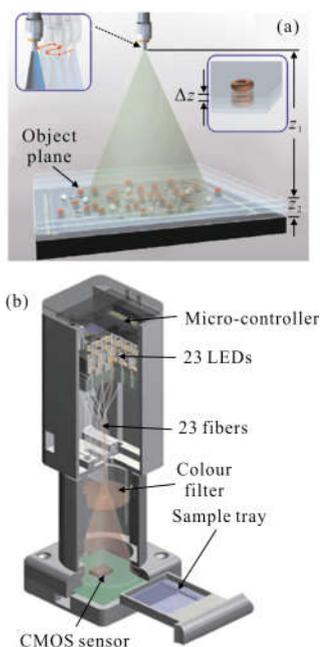


图 8 基于像素超分辨的无透镜显微成像装置示意图。光源到物体平面的距离远大于物体到传感器平面的距离 ($z_1 \gg z_2$)。 (a) 基于多样品-传感器间距^[60]、(b) 光纤阵列^[63](质量大约为~95 g)、(c) 多角度照明^[113]以及(d) 基于平行平板扫描(旋转角度的范围约为 $-50^\circ \sim 50^\circ$)^[77]的无透镜超分辨率显微镜系统原理图

Fig.8 Schematic diagram of the pixel super-resolution based the lens-free microscopic imaging set-up. The source to object distance is much larger than the object to detector distance ($z_1 \gg z_2$). Schematic diagram of the lens-free super-resolution microscope based on (a) multi sample-to-sensor distances^[60], (b) fiber-optic array^[63] (weighing ~95 g), (c) multi illumination angles^[113], (d) parallel plate scanning^[77]. The range of rotation angle is about $-50^\circ \sim 50^\circ$

3.1 相位恢复

3.1.1 基于单帧的相位恢复

该小节中的无透镜全息显微成像作为同轴全息成像的一个特例,本质上共轭像是不可避免的^[144],而最简单的单帧相位恢复方法是基于支持域约束的迭代相位恢复方法。这种方法的关键是预先知道成像视场范围内物体平面的支持域/掩模,例如,采用简单的阈值或分割算法来自动估计物体的位置(即创

建了与对象相关的支持域/掩模^[115-116], 采用塔尔博特光栅照明创建了新的掩模^[59,70]。其基本的流程图如图 9 所示, 采集到的单帧物体图像作为初始化物体复振幅 U_2^0 的振幅信息, 以任意值作为相位。将该复振幅 U_2^{k+1} (初次记为 U_2^0 , k 为复振幅被限制更新的次数) 利用角谱传播到物平面, 利用预知的支持域信息对传播到该平面的光强信息进行更新, 相位保持不变, 获得新的复振幅 U_1^{k+1} , 该复振幅反传播回像平面, 同样地利用直接采集到的像平面的全息图对此复振幅 U_2^k 光强信息进行更新, 获得新的 U_2^{k+1} , 然后循环迭代, 获得最终的复振幅信息。

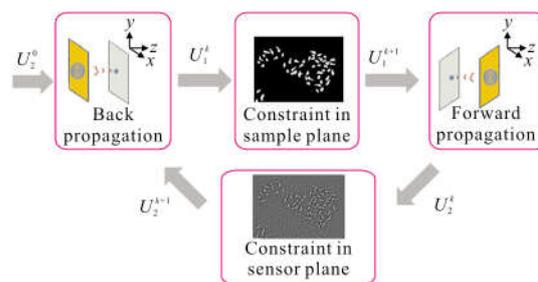


图 9 基于支持域的单帧迭代相位恢复方法

Fig.9 Flow chart of iterative phase retrieval based on support domain

例如 Feng 等^[59,70]利用 Ronchi 光栅(如图 10(b)所示)实现塔尔博特光栅照明, 其实验装置原理图如图 10(a)所示, 像面直接采集到的图像如图 10(d)、(e)

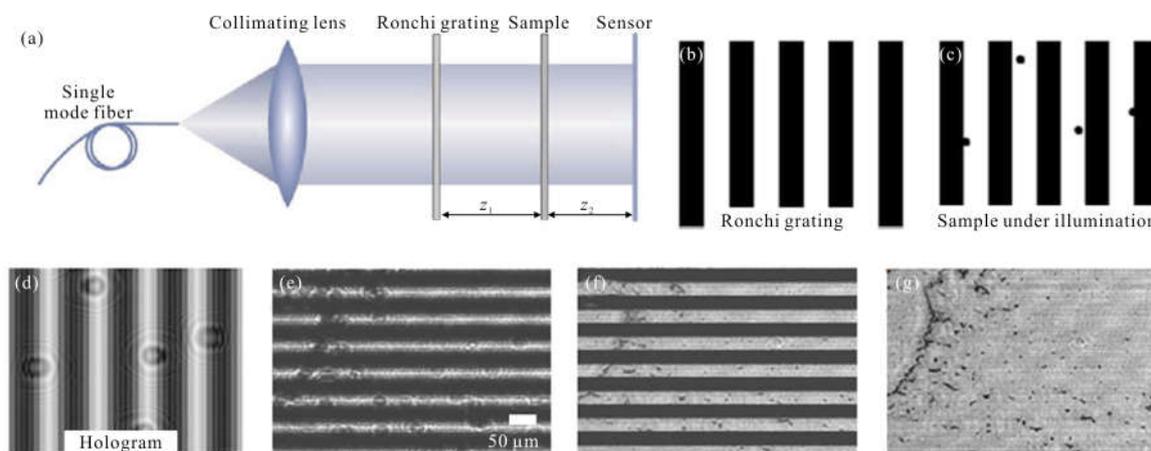


图 10 基于塔尔博特光栅照明的重构结果图(图像是根据参考文献[59]修改而来)

Fig.10 Reconstructed results based on Talbot grating illumination

所示, 然后由于光栅在物面的暗条纹光强为 0, 因此将此作为物面的支持域, 通过迭代最后获得聚焦面的光强如图 10(f)所示。类似地, 横向位移塔尔博特光栅照明, 可以获得其他部分的物体的信息, 最终可以获得如图 10(g)的结果。利用支持域进行单帧迭代的方法, 可以有效地(部分)消除共轭像对结果的影响。

然而上述的这种物面支持域的方法一般要求是稀疏样品(密度较大的样本难以估计内部物体的位置), 或者需要外部在物面构建出支持域(如光栅)。而当需要重构的物体是类似于未染色细胞这样的相位物体时, 可以利用相位物体在聚焦面上光强近似均匀这一限制进行约束, 从而避免了上述的这个问题。因此, Zhang 等^[69]基于这一性质提出了主动微扫描亚像元成像数据获取体制与重构方法的研究, 其装置

原理图如图 8(d)所示。此外, 由于该方法是单帧相位恢复方法, 利用时间轴上相邻帧的信息, 可以实现超像素超分辨率的动态成像。具体来说是利用时间递归(IIR)低通滤波器理论, 选取合适的松弛系数(在时间轴上控制控制滤波器先前的估计对当前的影响量), 建立了无透镜显微成像的图像退化以及像素传递函数模型, 最终在低成本系统中, 不仅实现了物体的像素超分辨成像, 同时还实现了对缓变物体(Hela)的实时动态相位成像, 如图 11 所示。

这种基于单帧的无透镜显微成像方式一般结构简单, 因此系统紧凑, 因此广泛地用于诸如水质监测^[107]之类的对于成像质量要求不高、便携性要求高的场所。此外配合一些额外的器件(可能会稍微增加系统的体积)可以实现细胞的运动监测^[77]。

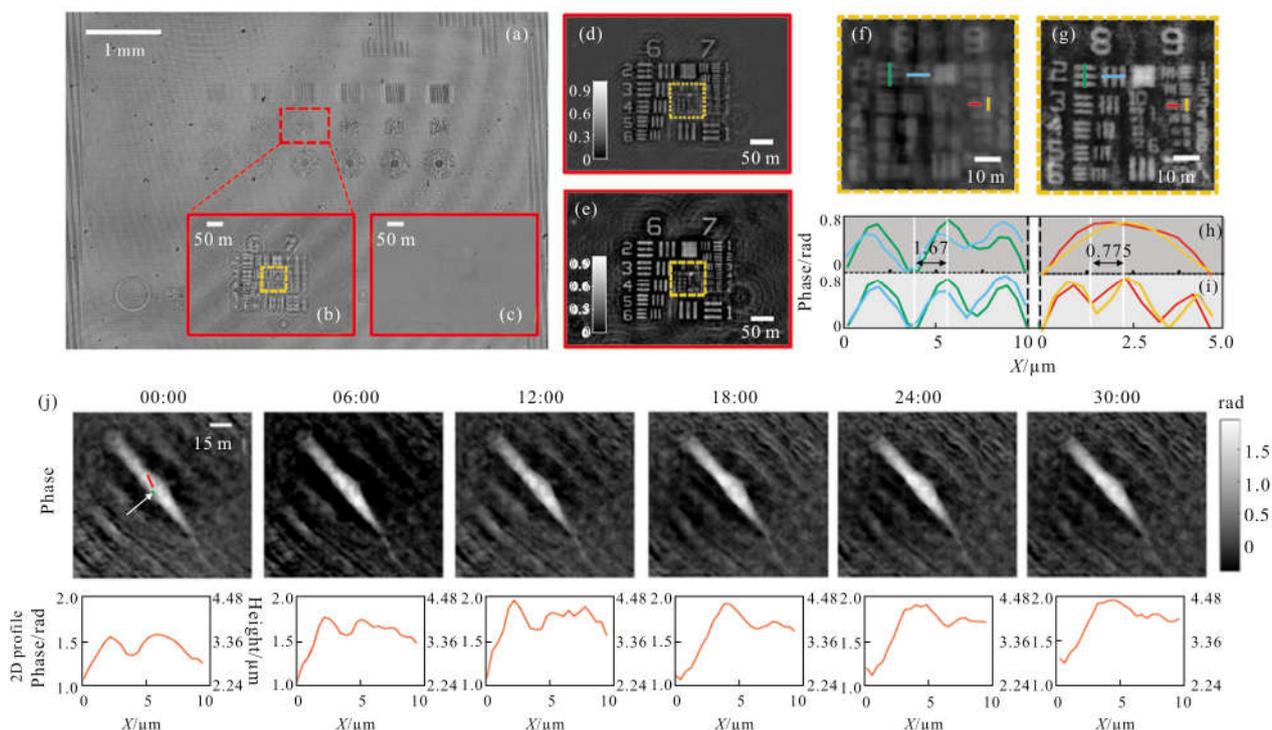


图 11 (a) 相机直接采集的原始图像;(b) 为(a)中虚线框区域的放大图;(c) 奥林巴斯物镜直接拍摄到的全视场图像;(d)、(f)、(h) 是单帧直接重构的结果;(e)、(g)、(i) 是基于时间递归(IIR)低通滤波器理论和均匀光强约束重构的结果;(j) HeLa 细胞的动态相位成像^[17]

Fig.11 (a) Raw image obtained in a single shot; (b) enlargement of the boxed area in (a); (c) full FOV image captured with an Olympus Plan objective lens; (d),(f),(h) reconstructed results with the single frame algorithm; (e),(g),(i) reconstructed results based on the Infinite Impulse Response (IIR) low pass filter theory and uniform intensity constraint; (j) dynamic phase imaging of HeLa cell

3.1.2 基于多帧的相位恢复

基于单帧相位恢复的方法本质上需要在物面上提供约束条件,然而,在许多情况下,这种约束条件往往是难以获得,所以还有一类是基于多帧的相位恢复,避免了对重构物体/光源的要求(如稀疏性、相位物体、光栅照明)。基于多帧的相位恢复方法可以根据多帧图像的产生分为基于多样品-传感器间距、波长照明、多角度照明(详述见 3.2.2 小节)的相位恢复。

典型的基于多样品-传感器间距的相位恢复本质上是 Gerchberg-Saxton(GS)的迭代相位恢复法^[60]。其典型的实验装置图如图 8(a)所示,光源直接照射样品,样品沿着 z 轴进行轴向扫描,在不同的样品-传感器间距平面上直接采集全息图作为 GS 迭代相位恢复法的限制条件(支持域)。具体过程(如图 12 所示),将各平面采集到的全息图进行配准,#1 平面采集到图像(相位初始化为 0)传播到 #2 平面,相位保持不变,强度利用配准后的该平面的高分辨全息图进行限制,合成新的复振幅,接着进行传播,一直传

播到 # M 平面,完成一轮迭代。完成多次迭代后,将重构的复振幅传播到聚焦面,从而实现物体的相位恢复,即可以获得物体在物平面的高分辨率复振幅信息(样品的振幅和相位图像)。

这种基于多平面的相位恢复方法需要采集不同离焦面上的光强图,因此一般需要机械位移装置,而这除了会增加系统的成本外,还增加了整个系统的体积。为了避免这种问题,Zuo 等^[75]提出了基于多波长照明的方法实现了物体的相位恢复。其整个重构过程为:采集不同波长光照明下的光强图,如 RGB 三色照明产生 I_R, I_G, I_B ,首先初始化物体的相位(可以是任意值)。这里假设绿光照明下采集的图像为聚焦面,利用 TIE 求解出初值,从而获得绿光照明下的物体复振幅。根据衍射积分,波长 λ 和传播距离 z 总是成对出现,即波长的变化对场传播的影响与传播距离的变化是相当。因此,对于非散射样品,如果照明波长从 λ 改为 $\lambda + \Delta\lambda$,则采集的衍射图案可以等效地看成传播距离的变化 $\Delta z = z\Delta\lambda/\lambda$ 。因此, I_R, I_G, I_B 可以

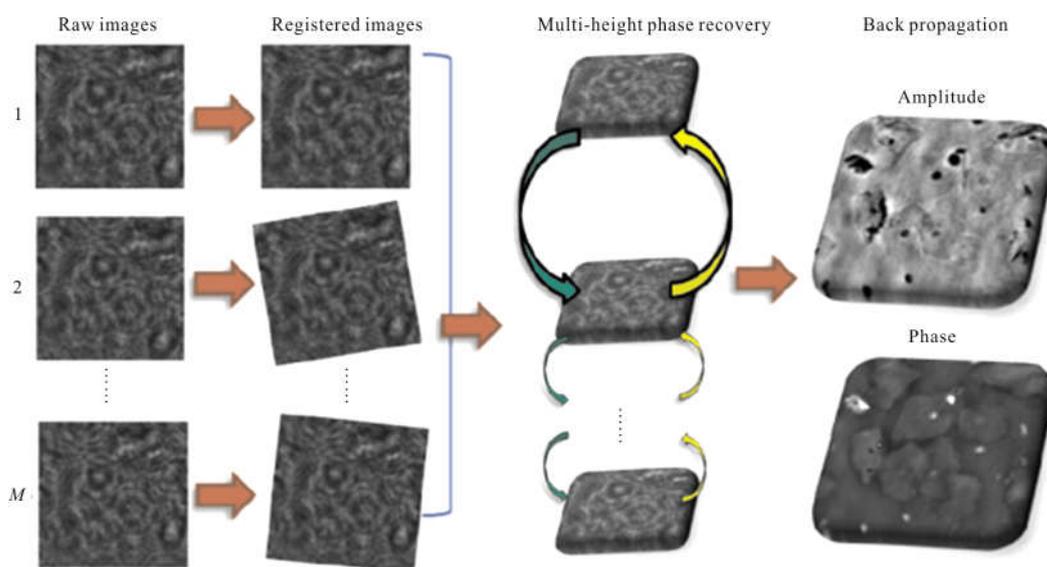


图 12 基于 Gerchberg-Saxton 的迭代相位恢复法^[60]

Fig.12 Iterative phase retrieval based on Gerchberg-Saxton^[60]

看成同一种照明光下不同离焦面上采集的图像, 相邻离焦面之间的距离可以通过 $\Delta z = z\Delta\lambda/\lambda$ 获得。因此

可以利用上述的 GS 迭代方法重构出最终的结果。其流程图和重构结果如图 13 所示。

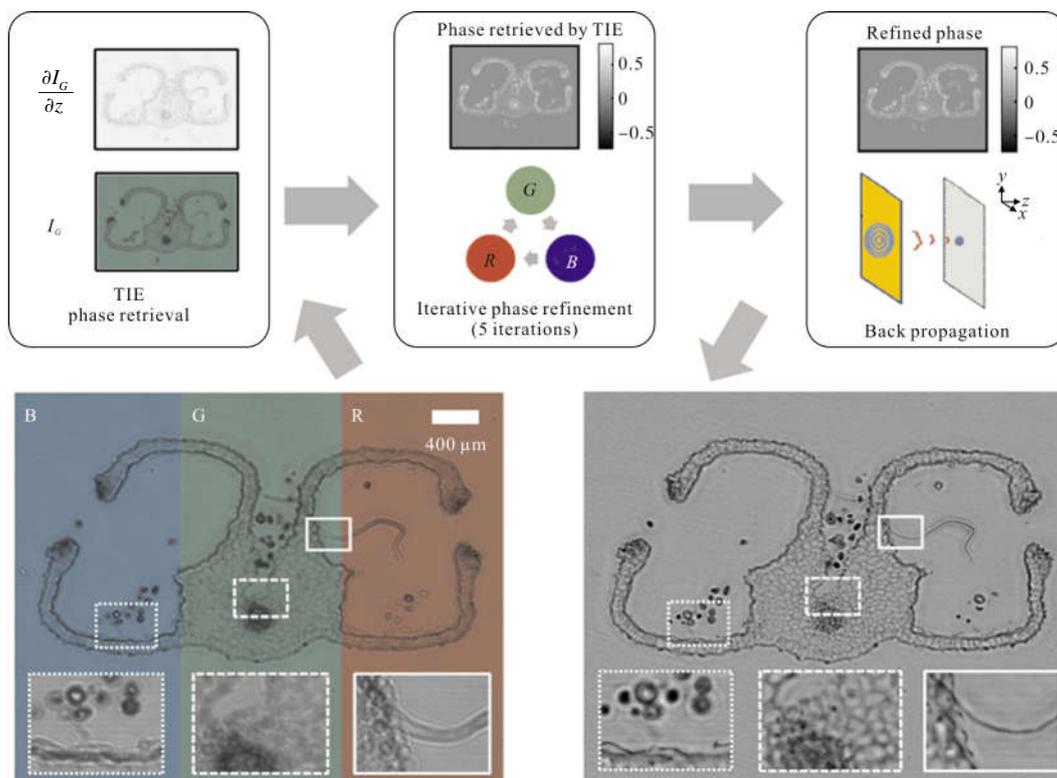


图 13 基于多波长照明的相位恢复及图像重构原理图^[75]

Fig.13 Schematic diagram of the multi-wavelength phase retrieval and image reconstruction^[75]

3.2 像素超分辨方法

3.2.1 基于亚像素位移的像素超分辨方法

首先传统实现超分辨的方法是, 利用机械横向位

移, 实现样品平面相对于相机平面的亚像素位移^[50], 即横向位移光源或者位移样品/相机。当位移样品/相机, 位移的精度必须是亚像素级别, 即亚微米级别

的,这将会急剧地增加系统的成本,因此,大多数情况是利用横向位移光源的方法获得亚像素位移的图像^[50,60,77,117-118],如图 8(a)、(c)、(d)所示。在单位放大倍率的无透镜显微系统下, $z_1 \gg z_2$,因此,通过简单的几何关系,可以推导出光源的横向位移量与其对应的引起的物体在相机平面的位移量的比值为 z_1/z_2 ,所以使用位移光源的方法可以降低成像系统对机械位移装置精度的要求。因此这种利用光源机械位移实现的分辨率的提高的方法被广泛应用在无透镜相位成像中,例如,在基于多平面的无透镜显微成像系统中(如图 8(a))所示,光源进行横向位移,从而在每个平面上获得高分辨率的全息图像^[60],然后这些高分辨的图像结合多平面相位恢复方法(第 3.1.2 节),最终实现高分辨相位恢复。

这种移动光源的方法虽然比位移相机/样品对位移台精度要求低,但是仍然需要进行机械位移的操作,所以为了减少出现这种机械位移,Waheb Bishara 等^[63]利用光纤将 LED 阵列中单颗灯珠发出的光耦合后作为照明光源,实现像素超分辨(如图 8(b)所示)。原始 LED 阵列相邻两颗灯珠之间的间隔比较大,所以直接将 LED 阵列依次点亮,采集到的相邻两帧的全息图的横向位移可能超过了一个像素的尺寸,即并不能提供像素超分辨的信息。此外,光源面积较大,所以光源的空间相干性比较差。利用光纤耦合后,并将这些光纤精确地装配到一个小区域内,

这样不仅实现了类似横向位移光源的功能,还提高了光源的空间相干性。

3.2.2 基于多角度照明的像素超分辨方法

类似地,在基于多角度照明的无透镜显微成像中,光源安装在旋转臂上,实现了两个正交轴(如图 8(c)中红色和蓝色轨迹)的倾斜照明,在每一个角度,光源都被多次横向移动,获得多幅低分辨率全息图,最终在每一个角度下,利用亚像素超分辨率算法^[16,110,117]产生高分辨率的全息图像^[113]。

不同角度的照明光照射样品结合交叠孔径重构方法,即与有透镜的傅里叶叠层成像(FPM)技术类似,重构过程在空域和频域来回切换,不仅可以重构出物体在聚焦面的复振幅分布,还可以进一步提高物体的重构分辨率。在空域中,拍摄到的不同角度下的光强图(这里是利用同一个角度下的低分辨率全息图堆栈合成一幅高分辨率全息图)被当作解的振幅约束;在频域中,受限的相干传递函数被作为解的支持域约束。不同的是在空域和频域来回切换的过程中需要加入光场自由空间传播和像素合并的过程^[12,113]。当恢复了传感器平面的高分辨率复振幅信息后,然后经过数值衍射计算,将该信息传播回物面,从而得到物体的高分辨率光强和相位分布。重构过程如图 14 所示,这里需要注意的是频域孔径交叠率必须足够充足,才能准确重构出物体的高分辨率复振幅信息。

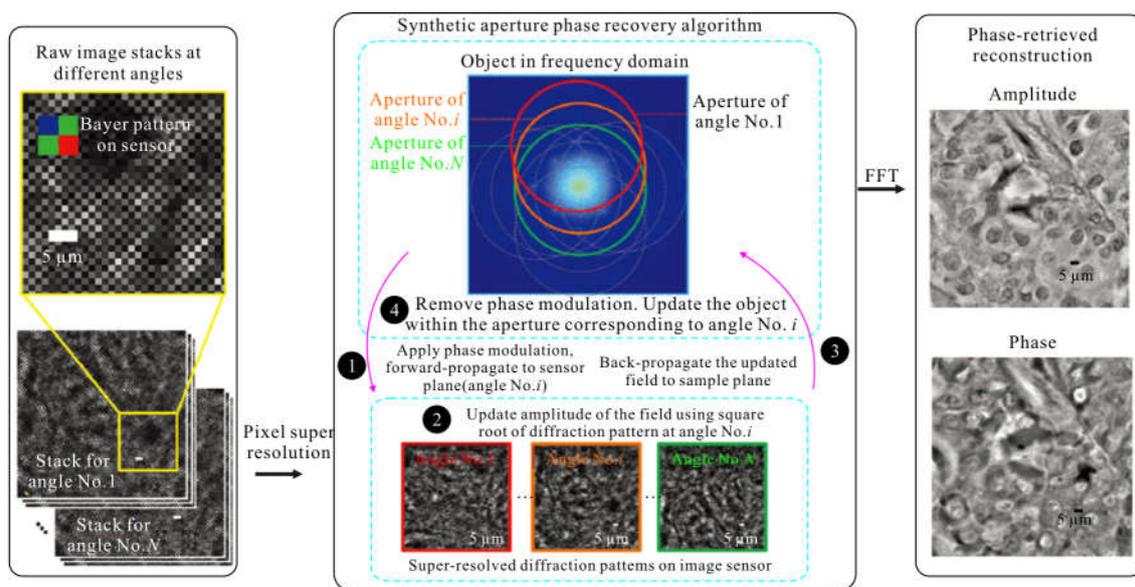


图 14 基于交叠孔径的相位恢复方法^[113]

Fig.14 Phase retrieval based on the synthetic aperture^[113]

3.2.3 基于轴向扫描的像素超分辨率方法

一般情况下, 利用轴向扫描即多样品-传感器间距的方法, 采集样品多个离焦平面上的全息图像, 结合传统的 Gerchberg-Saxton(GS)的迭代相位恢复法^[60], 可以实现相位恢复(详述见 3.1.2 节)。但是这种传统迭代相位恢复法需要结合亚像素位移才能实现分辨率的提高(第 3.2.2 节)。

Zhang 等^[76]在传统迭代相位恢复法中引入像素传递函数, 只利用轴向扫描(多样品-传感器面间距), 采集不同离焦面上的低分辨率的光强图, 同时实现了像素超分辨率和相位恢复。整个重构过程如图 15

所示。提出的基于 GS 的自适应松弛系数顺序迭代相位恢复成像算法可以看作是一种增量梯度下降优化算法, 其与传统梯度下降算法的最大区别在于前者需要在迭代过程中逐步缩小迭代步长以保证算法能够收敛到全局最优解。整个算法是在基础的 GS 迭代算法中引入自适应松弛系数以及高分辨校正矩阵, 不但保持了增量梯度法初始迭代时的快速收敛, 而且显著提升了算法对噪声的稳健性。为了提高迭代重构的速度, 利用 TIE 求解相位, 作为迭代重构的初值。整个过程中高分辨校正矩阵是通过计算低分辨校正矩阵和像素传递函数的克罗内克积, 计算低

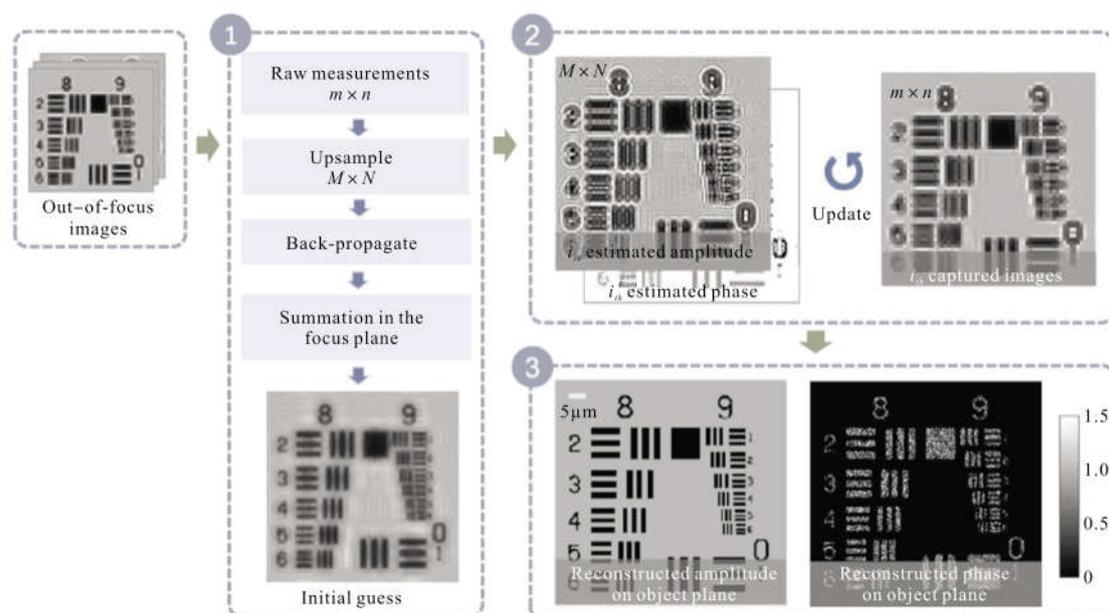


图 15 基于自适应步长和轴向扫描的无透镜超分辨率显微成像重构流程图^[76]

Fig.15 Flowchart of the pixel-super-resolved lens-free imaging based on the adaptive relaxation factor and the axial scanning^[76]

分辨校正矩阵主要分为两个过程, 首先数值计算得到的高分辨率光强信息与像素传递函数卷积获得低分辨率的光强信息, 然后计算该平面直接采集得到光强信息与第一步计算得到的光强信息的比值, 该比值矩阵则为低分辨校正矩阵。最终在 1.67 μm 的相机的像元尺寸上实现了 0.77 μm 的半宽分辨率(共采集 10 幅不同离焦平面的图像)。

3.2.4 基于波长扫描的像素超分辨率方法

然而采用上述的这几种提高分辨率的方式不是需要机械位移台/旋转臂就是需要光纤耦合(这两种方式在实际实验中操作难度都比较大/精度要求高, 尤其是后者需要在一个小区域内精确地对微米级的

光纤进行装配)。

2016 年, Luo^[67] 等利用波长可调谐激光器产生 498~510 nm 的波长(间隔为 3 nm), 对应每个波长的谱宽大约为 2 nm, 此外, 在实验过程中额外增加多角度照明以及多高度扫描, 算法上在基于交叠孔径的相位恢复方法中加入了计算限制光强的高分辨校正矩阵过程。其装置原理图如图 16(a)所示。需要注意的是, 此时在物体频域上的迭代更新的区域的位置由照明波长和照明角度两者共同决定。最终在 1.12 μm 的相机的像元尺寸上实现了 0.5 μm 的分辨率(5 个角度照明, 每个角度下 12 种波长照明, 即 60 幅图像)。

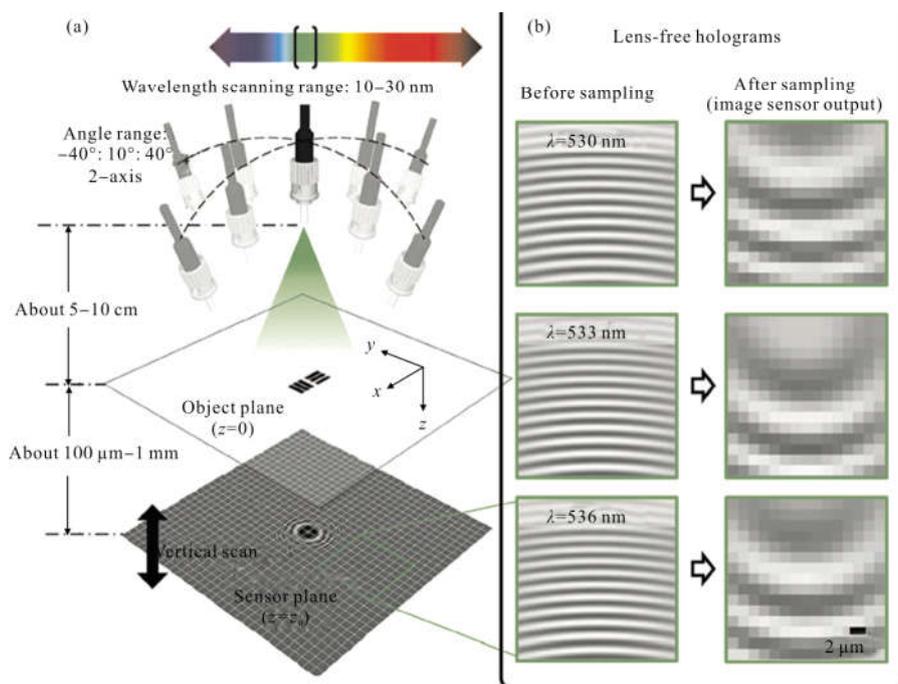


图 16 (a) 基于波长扫描的无透镜像素超分辨率显微成像的光学原理图。样品上方放置光纤耦合可调谐光源。在 10~30 nm 光谱范围内进行波长扫描。多样品-传感器间距和合成孔径成像也集成到该装置中,以实现相位恢复。(b) 不同波长的无透镜全息图在图像传感器平面上进行数字采样前后的对比图(图像是根据参考文献[67]修改而来)

Fig.16 (a) Optical setup of the pixel-super-resolution lens-free microscopic imaging based on the wavelength-scanning. A fiber-coupled tunable light source is placed above the object. The wavelength is scanned within a spectral range of 10~30 nm. Multiple sample-to-sensor distances and synthetic aperture imaging configurations are also integrated into this setup to enable phase retrieval. (b) Lens-free holograms at different wavelengths before and after digital sampling at the image sensor plane

为了实现高分辨率和大视场成像(提高空间带宽积),无透镜显微成像需要解决的两个主要问题是相位恢复和空间欠采样(重构分辨率低)。表 2 总结了各成像方法对消除共轭像(相位恢复)和像素混叠(即像素超分辨)的影响。从表 2 以及图 7(a)可以看出:亚像素平移对于共轭像的消除没有作用,只对分

辨率的提高有作用;此外,从表 2 和图 7 中可以看出,除了横向亚像素平移以外,其他系统参数(样品到传感器的距离,照明波长、角度)的改变均可以用于同时实现相位恢复(消除共轭像)和分辨率的提高(消除像素混叠),具体方法例如,基于多角度照明的超分辨相位恢复方法^[113](3.2.2 节)。

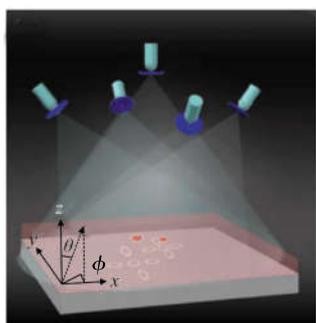
表 2 无透镜显微成像中共轭像以及像素混叠的消除方法归纳^[52]

Tab.2 Summary of the methods used for the elimination of twin image noise and spatial aliasing signal terms in lens-free microscopy^[52]

	Lateral shifts($x_{\text{shift},k}, y_{\text{shift},k}$)	Sample-to-sensor distance z_2	Illumination wavelength λ_k	Illumination angle θ_k, φ_k
Twin image noise elimination	Method: lateral shift-based pixel super-resolution (e.g., Refs [16,50,60,63,64,113,117-120])	Multi-height based pixel super-resolution (e.g., Refs [52,70,76])	Method: wavelength scanning pixel super-resolution (e.g., Ref [67])	Multi-angle based pixel super-resolution (e.g., Ref [52])
Aliasing signal elimination	Not applicable	Method: multi-height based phase retrieval (e.g., Refs [19,30,60-62,64-65,70,115,118])	Method: multi-wavelength based phase retrieval (e.g., Refs [56,67,75,121-122])	Method: synthetic aperture (e.g., Ref [113])

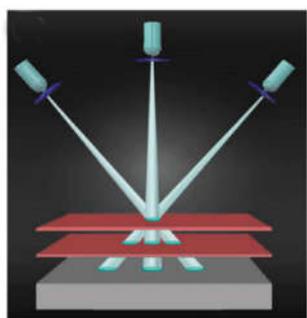
4 三维层析成像

生物细胞以及微粒的结构信息为细胞的形态可以提供更加深入的了解。而共聚焦显微镜和光学相干断层扫描等多种方法都可以用于获取样品的三维信息,但是,这些技术都需要复杂装置,而在生物研究领域急需快速且紧凑的三维结构分析系统。考虑到无透镜显微成像技术,其重构过程中的重构距离 z_2 可以改变 (即公式中的 z_2 可以改变),从而可以很容易地计算出不同深度的图像,可以获得一定程度的三维剖分。但是这种方法的轴向分辨率非常低,且还与物体的尺寸有关^[123-125](一般还需要样品是稀疏的)。为了物体的提高轴向分辨率,那就需要通过使用至少两个光源进行三角测量^[126],其原理结构图如图 17 所示。



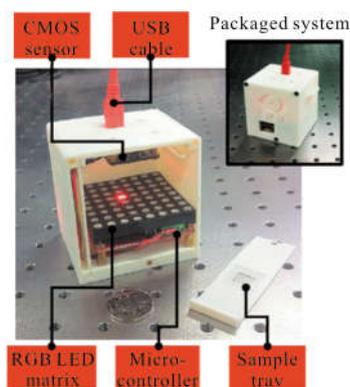
(a) 样品在相机平面成像的横向位移可以作为非相干源照明角度的函数,也是其轴向位置的编码^[126]

(a) Shadow of each sample shifts laterally on the sensor plane as a function of the illumination angle of the incoherent source, encoding its axial position^[126]



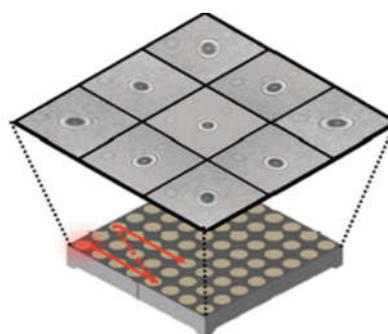
(b) 借助几何光学关系,实现样品在相机平面的成像与照明角度的匹配^[126]

(b) Based on the geometrical optics, the matching of the samples' shadows and the corresponding illumination angle can be achieved^[126]



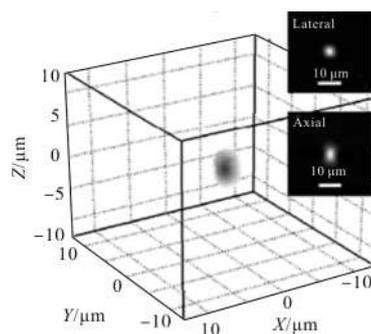
(c) 无透镜三维层析显微镜实物图^[75]

(c) Photograph of the lens-free three-dimensional tomographic microscope^[75]



(d) 无透镜层析显微镜图像采集过程示意图。其中 LED 阵列上的灯珠依次点亮照射样品^[75]

(d) Diagrammatic sketch of the image acquisition in lens-free tomographic microscope. An LED array sequentially illuminates the sample with different LED elements^[75]



(e) 三维逆傅里叶变换后重构出的珠子的三维层析结果^[75]

(e) 3D inverse Fourier transform yields 3D tomogram of the bead^[75]

图 17 基于多角度照明的无透镜三维层析成像原理示意图
Fig.17 Schematic diagram of the lens-free three-dimensional tomographic imaging based on the multi-angle illumination

在基于多角度照明的无透镜三维层析的方法中,通过计算物体全息图的横向位移作为照明角度

的函数来确定微物体的高度。具体地,根据傅里叶衍射投影理论,沿着某一方向用照射弱散射物体得到的前向散射场的复振幅分布,经傅里叶变换就可得到物函数频域空间中相应 Ewald 球冠上的采样值。例如 Zuo 等^[75]在 2015 年利用 LED 阵列提供的多角度以及多波长照明实现了马蛔虫子宫切片的三维层析成像,其实验装置及原理示意图如图 17(c)~(e)所示。具体过程为:利用 LED 面阵,在每个照明角度下,通过多波长照明、亚像元重构实现高分辨率定量相位信息的获取;然后将散射场通过数值反衍射,传播到物体本身所在的平面,实现数字重聚焦(实现单个照明方向下的散射场的复振幅分布重构)。根据傅里叶衍射投影理论,在 Born 或 Rytov 近似下将每个角度散射场的复振幅分布映射到物函数三维频谱空间中(借助几何光学关系结合点源法实测得到各 LED 照明的角度)。其物空间频谱映射、空域约束、频域填充的原理图如图 18 所示。其实验结果如图 19(a)~(b)所示。

利用此类技术在约为 15 mm^3 的大体积内,在 x 、 y 和 z 方向上实现了 $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ 空间分辨率。样品直接放置在数字传感器阵列上,部分相干光源置于距离传感器约 70 mm 处,并从不同角度($\pm 50^\circ$)照射样品,获得不同视角下的无透镜同轴全息图。此外,在每个角度下,光源都进行了亚像素位移(如图 8(c)所示),利用采集到的这些低分辨率的全息图像,通过像素超分辨率算法,重构出物体每个角度投影的高分辨率全息图。与传统断层层析不同的是,为了减小由于倾斜照明角度范围有限而产生的伪影,采用了一种双轴层析成像方案,即光源沿两个正交轴旋转。这些超分辨全息图进行反向投影,计算出样品的三维层析图。

这些基于无透镜显微成像的三维层析系统可以以最低的成本实现对微观世界的三维成像。这种类型的三维层析系统的最大优势在于可以在不牺牲视场大小的情况下,提高空间分辨率。而在基于透镜的显微系统中,这两者之间则需要权衡。

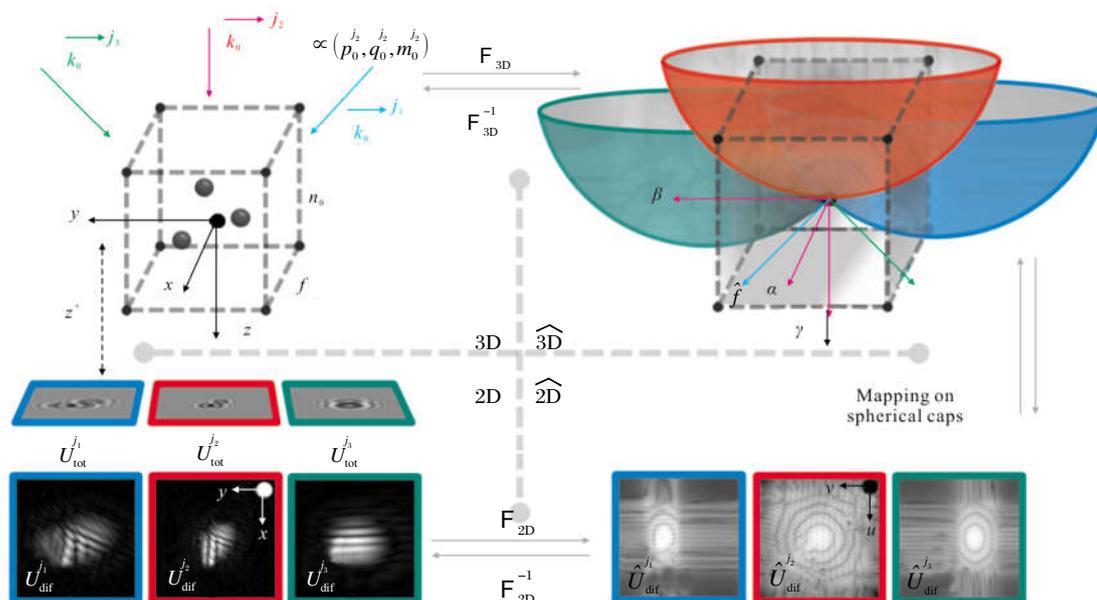


图 18 傅里叶衍射投影理论的几何解释图解。三维傅里叶变换将散射场 f 的三维空间和频域联系起来。对于每个照明情况 j , 二维傅里叶变换将衍射波 U_{dif} 的二维空间和频域联系起来。球冠上的映射将衍射波的二维频域和物体的三维频域联系在一起。这些球冠的方向和半径直接取决于照明方向 $\vec{k}_0^j \propto (p_0^j, q_0^j, m_0^j)$ 以及相关波长 λ^j ^[127]

Fig.18 Illustration of the geometrical interpretation of the Fourier diffraction theorem. A 3D Fourier transform links the 3D spatial and frequency domains of the scattering potential f . A 2D Fourier transform links the 2D spatial and frequency domains of the diffracted wave U_{dif} for each lighting situation j . A mapping on spherical caps link the 2D frequency domain of the diffracted wave and the 3D frequency domain of the object. The orientation and radius of these caps directly depend on the illumination directions $\vec{k}_0^j \propto (p_0^j, q_0^j, m_0^j)$ and the associated wavelengths λ^j ^[127]

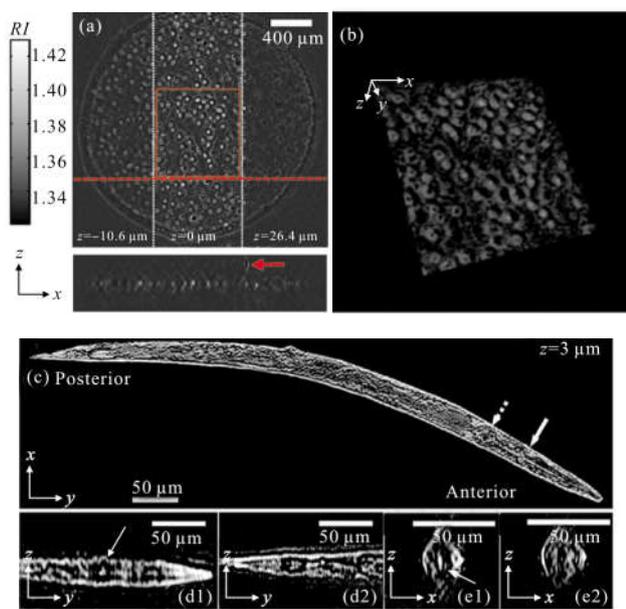


图 19 基于多角度照明的无透镜三维层析成像结果。(a) 马蛔虫子宫切片的折射率重构结果^[75];(b) (a)中红色矩形框中折射率的三维渲染^[75];(c) 在秀丽线虫中间上方 $z=3 \mu\text{m}$ 位置处,整个线虫的层析图^[125];(d1~d2) 分别为线虫的前部和后部在 $y-z$ 平面的成像结果^[125];(e1~e2) 分别为沿着(c)中实心箭头和虚线箭头方向的 $x-z$ 平面的成像结果^[125]。(图像是根据参考文献[75,125]修改而来)

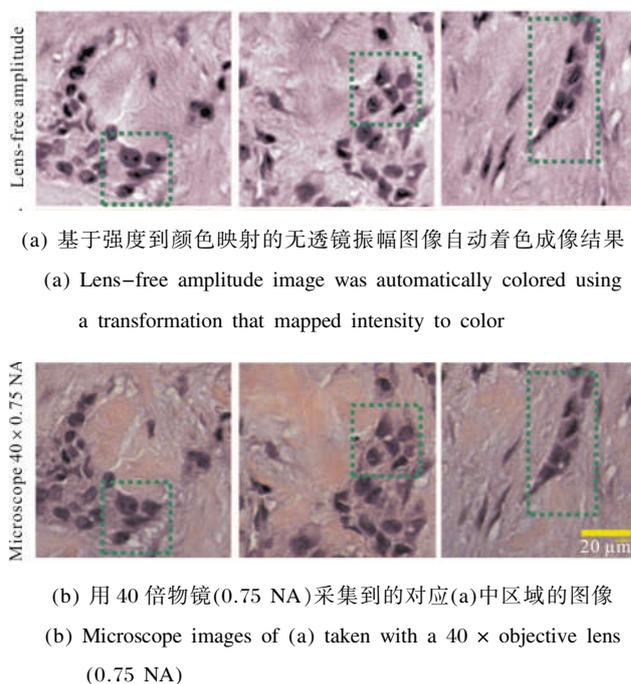
Fig.19 Three-dimensional tomographic reconstructions based on multi-angle illumination lens-free microscope. (a) Recovered refractive index depth sections of a slice of the uterus of *Parascaris equorum*^[75]; (b) 3D renderings of the refractive index for the boxed area in (a)^[75]; (c) tomogram for the entire worm corresponding to a plane that is $z=3 \mu\text{m}$ above the center of *elegans*^[125]; (d1-d2) $y-z$ ortho slices from the anterior and posterior regions of the worm, respectively^[125]; (e1-e2) $x-z$ ortho slices along the direction of the solid and dashed arrow in (c), respectively^[125]

5 彩色显微成像

第 3~4 节中描述的高分辨率成像技术基本都依赖于物体在传感器上衍射条纹的采集。而当照明光源完全不相干时,则分辨率将会相对较差,如第 1~2 节中的结果。因此为了提高照明光源的相干性,一般选择单色光进行照明(即一般选择窄带光源),对应的一般选择单色相机进行成像,从而规避相机拜尔编码带来的影响。而这就导致了重构的图像一般是灰度图像,这对于人眼来说是不太理想的图像。而且在许多情况

下,生物样本上有价值的信息一般是利用特定的染色剂染色,所以医护人员更偏向于在传统显微镜下利用彩色图像进行诊断。因此,研究学者们提出了多种方法,用于实现无透镜的彩色成像^[42,44,64,128-132]。

最简单的一种方法是基于统计的颜色映射。主要是利用预先校准的颜色图将重构的光强信息进行颜色映射。这种颜色映射方法首先需要在一组显微镜图像中找到每个强度值对应的平均颜色,然后将无透镜图像的直方图与平均颜色集匹配,并将每个灰度值映射到唯一的颜色。该方法中由于所有无透镜图像的照明光源都是同一个波长,因此,对于特定的染色组织,这种灰度值映射标定步骤只需进行一次,使用相同的映射函数可以快速地对新样本着色。Alon Greenbaum^[118]等就利用这种方法实现了人乳腺癌、巴氏涂片等的彩色成像,其中乳腺癌的彩色成像及其与传统显微镜下的图像对比如图 20 所示。



(a) 基于强度到颜色映射的无透镜振幅图像自动着色成像结果
(a) Lens-free amplitude image was automatically colored using a transformation that mapped intensity to color
(b) 用 40 倍物镜(0.75 NA)采集到的对应(a)中区域的图像
(b) Microscope images of (a) taken with a $40 \times$ objective lens (0.75 NA)

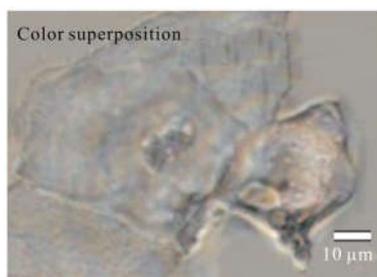
图 20 乳腺癌无晶状体假彩色图像

Fig.20 Lens-free pseudocolor image of human breast carcinoma

图 20 中绿色虚线框内的细胞是侵袭性癌细胞,与正常细胞相比,细胞核与细胞质比率增加,着色过深,核轮廓不规则,细胞质不足。虽然与传统的有透镜显微镜采集的图像相比颜色有轻微偏差,但基本都在可接受范围。

另一种相对简单的着色方法是, 首先用单色的红、绿和蓝光源照射物体, 依次采集三幅图像, 在三种照明波长下的重构结果利用数字叠加得到最后的彩色重构图像。其实验结果如图 21(a)所示, 但是, 从图中也可以看出物体周围出现了彩色伪影, 一般由于重构结果存在共轭像^[100,133]。因此这种方法需要额外的辅助手段用于这些彩色伪影的消除, 最常见的两种是 YUV 空间颜色平均法^[134]和 Dijkstra 最短路径法^[128]。第一种方法是通过在 YUV 颜色空间中利用颜色平均来减轻彩色伪影 (其结果如图 21 (b)所示), 其中 Y 通道表示亮度信息, U 和 V 通道表示颜色信息^[129]。在这种方法中, 首先使用像素超分辨率获得单色高分辨率图像(此处确定了 Y 通道)。然后, 通过在红绿蓝三种颜色的照明光源下分别采集了三个低分辨率图像来获取颜色信息(UV 通道), 这些图像最初在 RGB 颜色空间, 然后转换为 YUV 颜色空间。得到的低分辨率图像的 UV 通道随后用一个空域窗进行平均, 这样就可以减轻彩色伪影, 而 Y 通道替换为像素超分辨率后的图像。在最后一步中, 将生成的“混合”YUV 图像转换回成 RGB 图像。第二种消除这些彩色伪影的方法是一种图像搜索算法, 主要是要找到从给定节点到其余节点的最短路径。这种方法也可以被用于无透镜彩色成像, 其结果与上面讨论的 YUV 空间颜色平均方法非常相似, 其重构结果如图 21(c)所示^[64,128]。

无透镜彩色成像有助于习惯于传统显微镜成像的医护人员、生物学家等能够更加容易接受无透镜显微成像的重构结果, 更有利于他们对结果的分析, 促进现场即时诊断的发展。

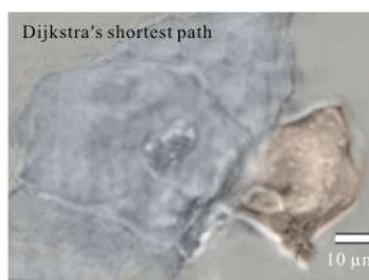


(a) 采用多颜色直接叠加的彩色成像, 其可能导致水洗色和彩虹状伪影

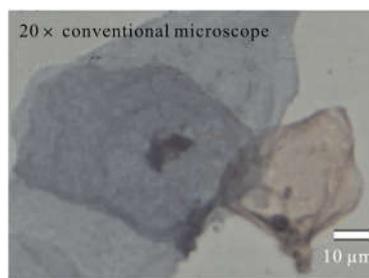
(a) Direct superposition of reconstructions from multiple color channels which may result in washed-out colors and rainbow-like artifacts



(b) 采用 YUV 空间颜色平均方法生成的彩色成像
(b) Color images with the method of averaging image colors in the YUV color space



(c) 采用 Dijkstra 的最短路径方法生成的彩色成像
(c) Color images with the Dijkstra's shortest path method



(d) 采用常规 20x 显微镜物镜获得的彩色成像
(d) Color images acquired using a conventional 20x microscope objective

图 21 无透镜彩色成像结果(图像是根据参考文献[64]修改而来)

Fig.21 Lens-free color imaging

6 基于深度学习的无透镜显微成像

随着电子产业的发展以及高性能计算设备的出现, 以数据为驱动的机器学习类算法, 近年来在各个领域都得到了广泛的关注与应用。其中, 深度学习由于其特有的反向传播算法以及可以使用通用流程进行特征学习的能力, 其在图像分割、图像识别、自然语言处理等领域取得了远超传统机器学习算法的成果。相比于传统的人工设计特征层的方法, 深度学习

算法能够有效组合低层特征，从而形成更加抽象的高层表示属性类别或特征，并对数据的分布式特征做出更精确的表示。和传统的机器学习算法一样，深度学习算法也可大致分为监督学习算法和无监督学习算法。其中，有监督学习算法大致包括数据预处理、神经网络搭建以及网络训练并保存最优解的过程。在光学成像领域由于系统中光源相干性、传感器的收光能力（微透镜阵列的存在虽然可以有效地提高相机的收光能力，但是有些角度的光照信息仍然难以采集）等各种因素，因而系统的正向精确建模往往难以实现。而深度学习通过大量的数据集进行训练，可以实现大量特征值的提取等过程，从而避免对整个成像过程中的每个步骤的精确建模。此外，其在求解“逆问题”方面也有着独特的优势，尤其是在求

解非线性问题方面。近些年来，其在光学成像领域得到了广泛关注，例如在数字全息^[135-138]、像差校正^[139]、低光强相位恢复^[140]、散射介质成像^[141]、鬼成像^[142]、图像超分辨^[143-146]等领域，也给无透镜成像领域带来了新的前景。

相比于第 4 节中提到的传统相位重构算法，基于深度学习的无透镜全息相位恢复算法则仅需要拍摄到的样品离焦全息图即可将样品相位恢复出来，而无需迭代优化的过程^[147-148]，并且 Horisaki^[149]等还利用深度学习算法摆脱了单帧复振幅测量对于干涉光照明的需求，其使用的网络结构如图 22 所示。传统的单帧复振幅测量通常需要干涉光的参与，而这种基于深度学习的方法则对干涉光并无要求，其通过在空间光调制器上显示 MNIST 数据集并利用

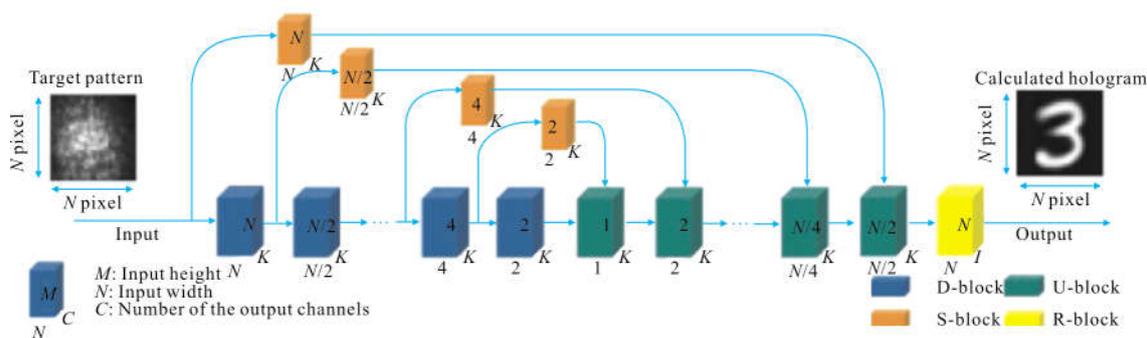


图 22 基于深度学习的单帧复振幅重构的网络结构

Fig.22 Network structure of deep learning based single-frame complex amplitude reconstruction

CCD 拍摄衍射图像的方式获取了训练集，而经过训练后的神经网络则可以根据输入的衍射图像恢复出相应的物体复振幅。

此外，基于深度学习的成像技术结合无透镜显微成像，可以在大视场下实现细胞识别、分割和计数等，例如血细胞、被金属粒子标记的细胞等的高精度探测和识别^[120,150-154]，与流式细胞仪结合，实现了对水样的实时观测^[155]，以及对细胞的探测与识别^[156]。如 DaeHan Ahn^[150]等在 2018 年利用显微镜和微流通道实现了血细胞计数(如图 23 所示)，其主要过程是首先基于无透镜显微镜采集血细胞的同轴全息图像，然后利用预知的细胞库，计算出该全息图像归一化的互相关值(NCC)，并根据计算的 NCC 值标记候选点，提取候选点周围的裁切图像。最后将剪切后的图像输入预先训练过的卷积神经网络(CNN)模型中，

以区分细胞实现最终计算细胞数。

基于深度学习的无透镜显微成像可以有效地规避/部分消除传统无透镜重构算法(相位恢复、像素超分辨)中的一些关键问题，例如共轭像的消除、重构时长的减少。从而有助于无透镜显微镜在生物医疗等方面的应用。此外，其还有助于去除传统全息显微成像中由于灰尘或光学原件不完美导致的寄生干涉效应，生成高质量重构图像。

虽然到目前为止深度学习可以在大视场下实现相位恢复、像素超分辨、细胞识别、分割和计数等，但是深度学习中卷积神经网络的训练需要大量的真值数据，而无透镜显微成像高分辨真值数据的获取机制有待进一步改进。此外整个训练过程耗时长，而且目前卷积神经网络训练过程中特征值的提取过程仍是一个黑箱，如何对训练集、目标函数、损失函数、学

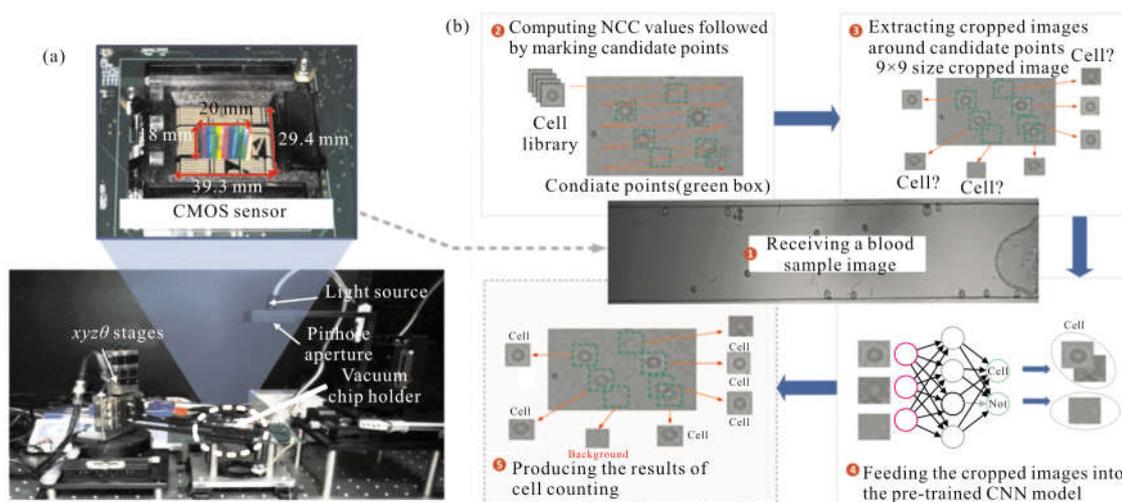


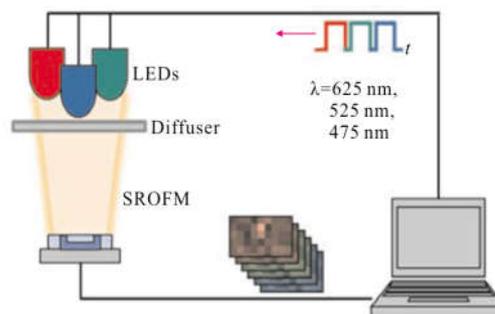
图 23 (a) 基于无透镜显微成像的血细胞计数仪; (b) 基于卷积神经网络(CNN)的细胞计数流程图(图像是根据参考文献[150]修改而来)
Fig.23 (a) Cytometry based on the lensfree microscope; (b) Flow chart of the cell counting based on convolutional neural network (CNN)

习率、训练次数、以及初始卷积核进行优化,都是有待解决的问题。

示),感染了恶性疟原虫的红细胞在每个细胞内有一个明显的紫色斑点,即在绿色通道中呈暗斑(如图 24(e)所示)。

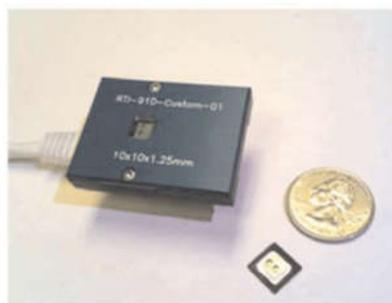
7 无透镜片上显微成像的典型应用

不同于传统光学显微镜往往仅存在于基础设施条件尚佳的医疗机构,且需要专业的医疗人员操作,无透镜片上显微成像系统在缺乏医院等基础医疗设施的地区有着迫切且庞大的市场需求。无透镜片上显微镜由于其高通量成像(大视场高分辨成像)的特点,可以用于现代临床医学中,许多疾病与传染病,如疟疾、镰状细胞病等的筛查与确诊。此外,在环境监测方面,其可以用于水质监测等。另一方面,无透镜片上显微镜可以进行相位成像,因此在观察生物样本时无需事先对其进行染色(提高成像的特异性和衬度),因而可以用于生物样品的观察,例如细胞生长、马精子运动轨迹的追踪。此外,结合可以捕获或操纵细胞的特殊基质,无透镜成像技术可以用于实现许多应用涉及细胞的检测和监测,例如结合抗体的微阵列捕获特定细胞。



(a) 彩色 SROFM 系统示意图, 其中 SROFM 设备和 RGB LED 的按序照明均由计算机控制

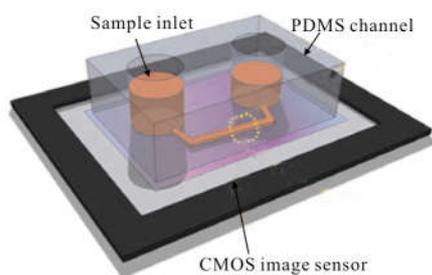
(a) Schematics of color SROFM system showing sequential RGB LED illumination and SROFM device controlled by a computer



(b) 由基于成像传感器的 SROFM 芯片和摄像头组成的 SROFM 器件

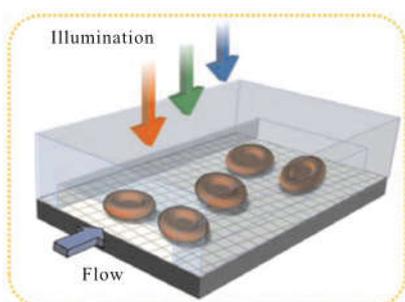
(b) SROFM device composed of the CMOS sensor-based SROFM chip and camera head

恶性疟原虫是一种特别有害的疟疾寄生虫,也是发展中国家国民致死的主要原因之一。因此,这些地方急需可以快速筛查与确诊的便携仪器,而利用无透镜显微成像结合了微流体(如图 24(a)~(d)),可以实现疟疾感染的确诊以及疟原虫种类的鉴别,最终成功地实现了 $0.66 \mu\text{m}$ 的高对比度、高分辨彩色成像^[42]。相较于未感染疟疾的红细胞(如图 24(f)所



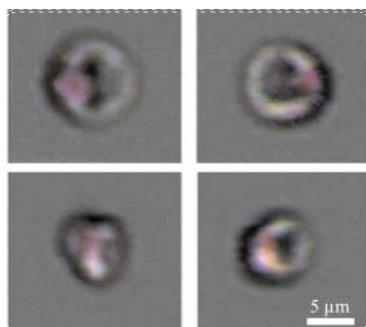
(c) 由 PDMS 微流体通道和 CMOS 图像传感器组成的单 SROFM 芯片的示意图

(c) Schematics of a single SROFM chip composed of a PDMS microfluidic channel and a CMOS image sensor



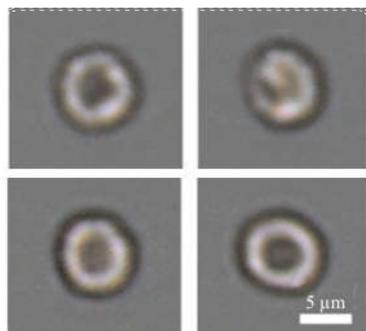
(d) 图(c)中局部区域的详细原理视图

(d) Detailed view of color imaging area in Fig.(c)



(e) 用甲苯胺蓝染色的受恶性疟原虫(裂殖期)感染的红细胞彩色图像

(e) Color images of *P. falciparum* schizont-stage RBCs stained with Toluidine blue



(f) 未受感染的红细胞的彩色图像(以甲苯胺蓝染色)

(f) Color images of naïve RBCs (stained with toluidine blue)



(g) 用甲苯胺蓝染色的受恶性疟原虫(裂殖期)感染和未感染的红细胞在 100 倍物镜下的成像

(g) 100× bright field microscope images of *P. falciparum* schizont-stage and naïve RBCs stained with toluidine blue

图 24 亚像素分辨光电流显微镜(SROFM)装置的原理图和原型 (图像是根据参考文献[42]修改而来)

Fig.24 Schematics and prototypes of sub-pixel resolving optofluidic microscope(SROFM) device

在研究活细胞的动态过程及各项生理活动时,无标记显微成像是一种最为理想的探测手段。然而一般情况下,需要对样本进行染色,从而达到细胞成像的目的。然而染料染色和荧光标记染色方法,都不可避免地对细胞的正常生理过程产生不利影响,并且还存在着光漂白问题,影响对细胞的长时间观察。此外,许多重要的物质,如细胞内的小分子和脂类等很难或者无法被荧光标记。利用无透镜显微成像非聚焦成像,可以实现在大视场下(6 mm×4 mm)的高分辨率(660 nm)成像以及胚胎干细胞、宫颈癌(Hela)细胞的分化追踪,如图 25 所示。将 Hela 细胞直接接种到智能培养平台上,然后将整个成像平台(如图 25(b)所示)放入培养箱中,接着利用以太网电缆将数据传输到电脑中。以 15 min 的间隔拍摄了一组完整的图像(整个生长时间为 48 h)。在此期间,细胞数量从 40+ 增长到数百,如图 25(a)所示。基于此,实现了对每个细胞的追踪,并获得了相应的谱系树,如图 25(c)所示。

因此基于无透镜显微成像的智能培养平台,不仅可以实现活细胞的动态监测,还能通过减少人工劳动和污染风险,显著简化和改进细胞培养实验。而其小型的体积、低廉的成本、便捷的操作有望为资源匮乏地区的临床级细胞培养提供一种新型的自动

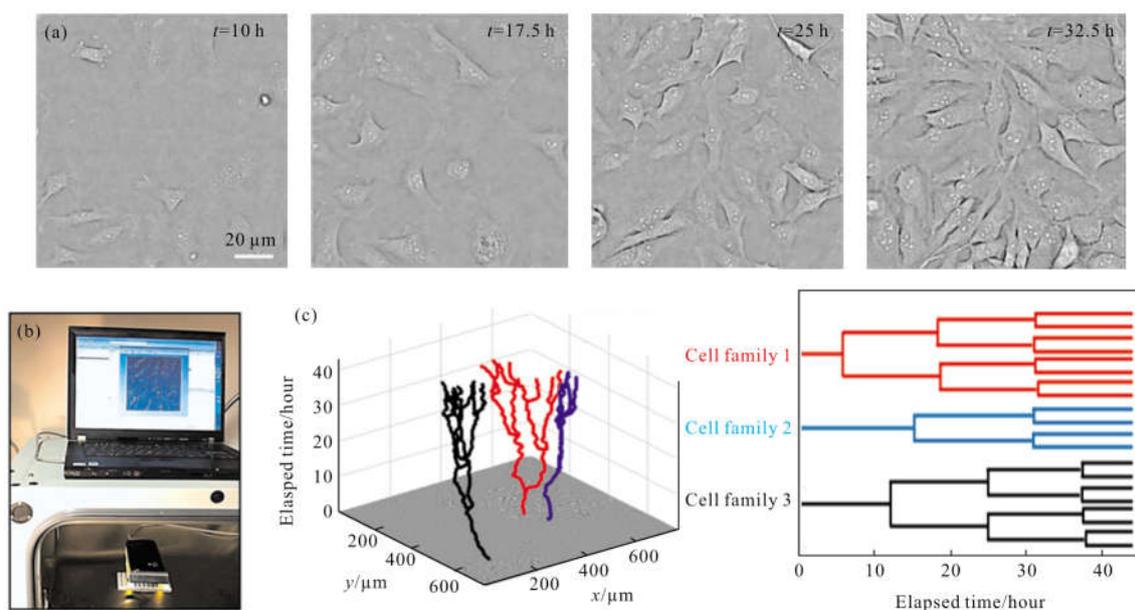


图 25 (a) 基于智能培养平台, 宫颈癌(Hela)细胞培养的长时间成像; (b) 实验装置图; (c) 三个 HeLa 细胞增殖轨迹追踪以及相应的细胞谱系树(图像是根据参考文献[43]修改而来)

Fig.25 (a) Time-lapse imaging of HeLa cell culture on the smart Petri dish (ePetri) platforms; (b) experimental setup; (c) tracking trajectories of three cell families and the corresponding lineage trees for these cell families

化、大视场高分辨的观察设备。

在生物成像学领域中, 由于相位延迟其实是样品三维折射率在一个二维平面上的投影, 为了准确获取细胞的三维结构信息, 显微系统还需具备类似于共聚焦显微成像的光学层析能力。这种具备亚细胞成像能力的横/轴向分辨率可以为准确可靠的病理诊断、生物研究提供根本保证。利用无透镜显微成像, 基于多角度照明实现了在体积约为 $5.0\text{ mm} \times 3.5\text{ mm} \times 0.5\text{ mm}$ 的空间中精子的三维轨迹跟踪和精细解析^[157], 其结果如图 26 所示。受益于无透镜成像的大视场的优点, 对数千个精子的大数据统计, 发

现在体外以螺旋路径游动的人类精子中, 约 90% 以右手螺旋而不是左手螺旋游动, 并且识别出人类和动物精子中罕见和独特的游动模式。

这种“手性带状”的游动模式, 精子头部的平面摆动发生在密切接触的平面上, 在某些情况下形成螺旋带状, 在某些情况下形成扭曲的带状。后者, 即扭曲的带状轨迹定义了最小曲面, 其曲面上所有点的平均曲率均为零。这些“手性带状”游动模式不能用已知的精子或其他微型游动模式来理解。并通过统计, 只有的人类精子呈现出“手性带状”, 而这种游动模式在马精子中的比例则增加到 27.3%。

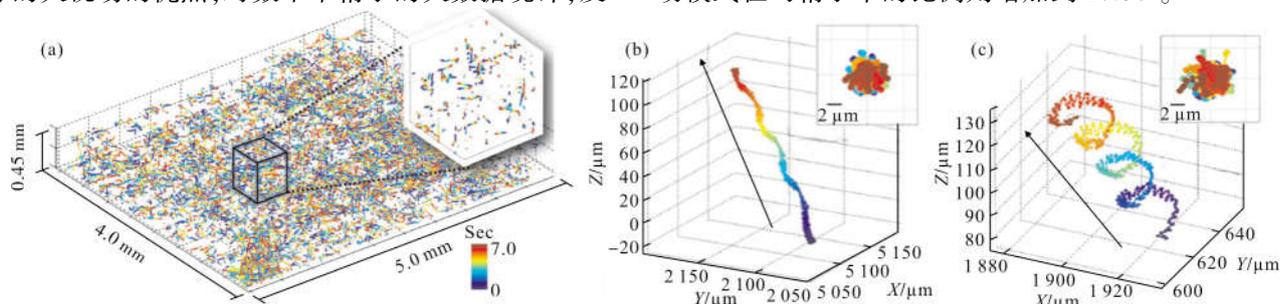


图 26 基于多角度照明的无透镜三维层析成像结果。(a) 以 143 FPS 的帧速率在 $\sim 9.0\text{ mL}$ 的体积内跟踪 998 个马精子的三维轨迹; (b)~(c) 是在 4.6 s 的时间内记录的两个手性带状轨迹(图像是根据参考文献[157]修改而来)

Fig.26 Three-dimensional(3D) tomographic reconstructions based on multi-angle illumination lens-free on-chip microscope. (a) Reconstructed 3D spatio-temporal trajectories of 998 horse sperms that were tracked inside a volume of $\sim 9.0\text{ mL}$ at a frame rate of 143 FPS; (b)~(c) are two chiral ribbon trajectories recorded over a duration of 4.6 s

因此基于无透镜的三维显微成像技术,可以实现生物样品的动态三维监测。此外,得益于无透镜显微成像系统的超大成像视场,其可以对大量样品同时进行成像,从而有助于样品的生物特异性的观察以及生物(三维运动)特征的统计,从而可能对生物物理学产生影响。

除了在生物医学领域,无透镜显微成像因其能够实现高通量成像以及良好的便携,因此其在环境监测等方面也有着重要的作用。环境污染已成为人类和环境健康的一个严重问题,而工业和农业活动暴露在污染物中的可能性不断增加。Ozcan^[107]课题组

利用一个发光二极管和一个直径为 50 μm 的小孔,如图 27(a)~(b)所示,在 46 g 整机下实现了 24 mm² 大视场数值孔径达 0.1~0.2 的成像。其可以在不均匀混合液体中自动检测水传播的寄生虫(贾第鞭毛虫囊肿和小孢子囊)。基于该装置采集的无透镜全息图的重构结果如图 27(d)所示。整个过程使用图形处理单元(GPU)进行数字重构,耗时不到一秒钟。此外,Cheng^[90]等基于生物发光全细胞传感器阵列,集成温度控制、16个子传感器阵列以及一个简单但高效的发光收集装置,实现了 15 到 45 分钟内,检测到由模拟污染事件引起的生物发光,其实验装置图如图 27(c)所示。因

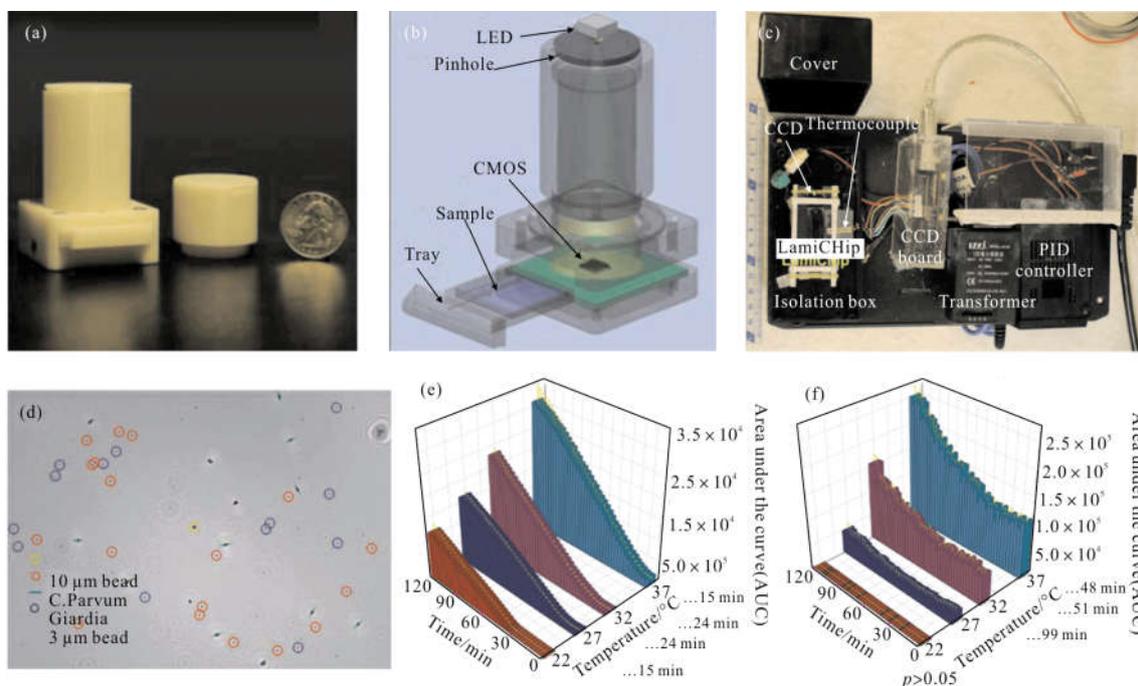


图 27 (a)~(b) 无透镜全息显微镜;(c) 基于生物发光全细胞传感器阵列生物芯片的强大毒物检测平台;(d) 不均匀混合液体中水传播的寄生虫(贾第鞭毛虫囊肿和小孢子囊)的自动检测;(e) 在 22、27、32、37 $^{\circ}\text{C}$ 不同温度下,受对苯二酚诱导的 yqjFB2A1:luc 的发光反应;(f) 在 22、27、32、37 $^{\circ}\text{C}$ 不同温度下,受茶啉酸影响的 recA:luc 的发光反应(图像是根据参考文献[90,107]修改而来)

Fig.27 (a)~(b) The lens-free holographic microscope; (c) a robust toxicant detection platform based on a bioluminescence whole cell sensor array biochip; (d) automated detection of water-borne parasites (Giardia Lamblia Cyst and C. Parvum) within a heterogeneous mixture is demonstrated; (e) bioluminescence response of yqjFB2A1:luc induced by 200 $\mu\text{g}/\text{m}$ hydroquinone at 22,27, 32 and 37 $^{\circ}\text{C}$; (f) bioluminescence response of recA:luc stimulated by at 22, 27, 32 and 37 $^{\circ}\text{C}$

此,线阵 CCD 与微型发光芯片相结合的便携式发光检测系统为有毒污染物现场环境监测提供了一个平台。

8 总结与展望

文中系统地分析总结了无透镜片上成像方法,并给出了其典型应用。总的来说,与传统的显微成像

系统相比,无透镜显微成像在成本、体积、空间带宽积等方面具有其特有的优势。由于无透镜显微成像可以在一个成本低廉的小型化平台上实现大视场高分辨率成像,因此其在血细胞感染检查、细胞生长等方面有着广泛的应用。

但其仍有许多问题有待进一步改进,例如,分辨

率达不到理论值、获取的相位空间频率具有选择性、离焦距离难以准确确定、成像速度、系统的信噪比。

(1) 分辨率达不到理想衍射极限($NA=1$)

主要原因有光源时空相干性、传感器的结构设计、甚至是重构区域。在基于数字全息重构的无透镜显微成像系统中,当需要获得较好的重构结果时,一般需要选择时间、空间相干性都比较好的激光作为光源。一般而言,光源的空间相干性对重构分辨率的影响,可以通过增加光源与样品之间的间距,来增大等效的相干面积;或者是利用数值反卷积来部分消除空间相干性对重构分辨率的影响。光源的时间相干性对重构分辨率的影响可以通过在系统中增加滤色片来缩小照明光源的谱宽,然而在实际操作中可能会出现照明光强度较弱的情况。

此外,考虑到无透镜显微成像的分辨率很大一部分受制于相机的像素尺寸。虽然目前随着半导体工业的发展,传感器像素尺寸最小能够达到 $\sim 0.8 \mu\text{m}$ (由于光能收集效率等问题,探测器像元尺寸不可能无限缩减)。且现有 CMOS 工艺为了实现 100% 等效像素填充因子,都在传感器表面覆盖了一层微透镜层。利用微透镜将入射光聚焦到探测器像元表面以提升单个像素的光子收集效率。然而,由于受微透镜有限的数值孔径所限,有些大角度(对应于高空间频率)散射物光可能会无法被微透镜有效收集。采用多角度照明频移的方法可以在一定的程度上缓解此问题。因此,传感器本身的物理构造也是无透镜成像分辨率达不到理想衍射极限的一大因素。

另一方面,由于传感器表面保护玻璃层的存在,因此携带样品信息的光场一般需要经过一段距离(一般在 $500 \mu\text{m}$ 左右)的衍射才能在传感器上成像。因此,对于物体高频细节所产生的大角度衍射光可能会“飞出”物体本身所在的区间,从而极大扩展了衍射场所覆盖的空间范围。此时,成像的分辨率由所选择的重构子区间的大小(假设边长为 L)和传播距离所共同限制:即等效数值孔径为 $L/\sqrt{L^2+4z_2^2}$ 。因此,最后选择重构子区域时,需要将待重构物体置于整个区域的正中央,且尽可能选择较大的重构区域(根据极限分辨率获得最小的重构区域边长 L)以保证囊括物体的高频衍射光场。

此外,虽然目前研究者已经获得了与 1.4 NA 显

微镜物镜相当的分辨率^[13]。由于是计算成像的方法,分辨率与信噪比的关系比系统的任何物理参数都更加密切。因此通过更高的信噪比系统和新算法,应该可以进一步提高分辨率,例如,高折射率介质(如,油)填充样品和传感器之间的空隙,高灵敏度传感器。

(2) 相位重构算法具有空间频率选择性

完全相干光波场下,小离焦下,相位低频部分相衬度较低,难以实现高精度、高信噪比的准确重构。尽管增加离焦量可缓解此问题,但是采用大的离焦距离会使高频部分的相衬度减弱,陷入两头为难的尴尬境地。因此,从目前众多的实验结果中可以看出,大物体(低频成分多)的无透镜显微相位成像结果的低频恢复都不太理想,主要是因为,改变离焦量,相位部分低频(主要是接近于零频的部分)相衬度基本为 0。为了获得低噪声、高分辨率的相位重构结果,目前除了尽可能多地采集不同离焦距离处的光强图进行重构外,还没有更有效的方法。

(3) 离焦距离难以准确确定

无透镜显微成像系统与传统显微系统最大的区别是其没有聚焦透镜,因此其重构过程需要将获得的复振幅信息反传播到聚焦面上。对于类似于分辨率板这样的完全二维的重构对象来说,可以通过手动聚焦/自动聚焦算法(例如,计算反传播后不同距离光强图像的梯度值,梯度最大时,该距离则是离焦距离)获取其离焦距离。然而实际的样品,例如,血细胞、组织切片、巴氏涂片,可能具有一定的厚度,即整个样品平面不能同时聚焦,对这类样品的离焦距离的精确获取目前仍没有一个有效的方法,这是实际应用中制约着测量精度的关键问题。此外,如何快速获取离焦距离也是一个值得研究的问题。

(4) 全视场成像速度仍然较慢

在第 4 节中讨论的像素超分辨率和多高度相位恢复等方法一般都需要采集多幅图像,加上单幅图像的像素数较多,一般全视场重构所需要的数据量是十分庞大的。这为后续的图像的快速重构带来了很大的挑战。截止目前,尚未发现快速动态全视场无透镜成像的结果报道。提高图像采集的速度(更高速的相机)、图像处理重构的速度(如用 GPU 进行计算)

等是提高成像速度的关键因素^[125]。此外,减少算法中所需的原始数据或者计算(迭代)步骤,也将有助于加快处理和图像重构,例如利用 TIE 作为迭代重构的初值,从而有效加快算法收敛,降低迭代次数。

(5) 成像结果的保真度仍无法保证

基于计算成像的无透镜显微成像方法为了获得更准确的成像结果,需要对整个成像过程进行精确的建模。然而通过已有的实验结果,可以发现,目前的无透镜成像结果和基于透镜的成像结果仍然有一些差距,主要是因为实际的成像过程会受到各种环境因素的影响,从而导致成像模型不准确。

此外,目前基于深度学习的成像方式虽然可以利用提取的大量特征值降低对实际成像过程精确建模的需求,然而深度学习对于“罕见样本”的重构结果的准确性仍然有待验证。更为值得注意的是,一般的病灶筛查都是基于样本的特异性,因此基于深度学习的成像结果是否可以用于医学成像需要更多的研究。

综上所述,无透镜显微成像技术是一个极具发展前景的大视场高分辨率计算成像方法。它把高分辨率显微成像中对光学系统较高的硬件需求转化为一个可以通过计算解决的问题,因此,可以极大地缩小系统体积、降低系统成本。可以预见,该技术将为实现面向床旁检验应用的高分辨率、小型化、低成本、简便化的显微设备奠定理论基础、提供技术支持。后续的仪器研制及相关产业化将有助于解决贫困地区疾病早期诊断困难的问题,降低患病死亡率,改善医疗健康。

参考文献:

- [1] Leung B O, Chou K C. Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology [J]. *Applied Spectroscopy*, 2011, 65(9): 967-980.
- [2] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [3] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [4] Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects [J]. *Physica*, 1942, 9(7): 686-698.
- [5] Nomarski G M. Differential microinterferometer with polarized waves [J]. *J Phys Radium Paris*, 1955, 16: 9S.
- [6] Tsien R Y. The green fluorescent protein [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67(1): 509-544.
- [7] Betzig E. Single molecules, cells, and super-resolution optics (nobel lecture) [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(28): 8034-8053.
- [8] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [9] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [10] Stephens D J, Allan V J. Light microscopy techniques for live cell imaging [J]. *Science*, 2003, 300(5616): 82-86.
- [11] Schneckenburger H, Weber P, Wagner M, et al. Light exposure and cell viability in fluorescence microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2012, 245(3): 311-318.
- [12] Sun Jiasong, Zhang Yuzhen, Chen Qian, et al. Fourier ptychographic microscopy: theory, advances, and applications [J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(10): 1011005. (in Chinese)
- [13] Coskun A F, Ozcan A. Computational imaging, sensing and diagnostics for global health applications [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 25: 8-16.
- [14] Brady D J, Choi K, Marks D L, et al. Compressive holography [J]. *Optics Express*, 2009, 17(15): 13040-13049.
- [15] Xu W, Jericho M H, Meinertzhagen I A, et al. Digital in-line holography for biological applications [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(20): 11301-11305.
- [16] Greenbaum A, Luo W, Su T-W, et al. Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(9): 889-895.
- [17] Zuo C, Chen Q, Yu Y, et al. Transport-of-intensity phase imaging using Savitzky-Golay differentiation filter - theory and applications [J]. *Optics Express*, 2013, 21(5): 5346-5362.
- [18] Kou S S, Waller L, Barbastathis G, et al. Transport-of-intensity approach to differential interference contrast (TI-DIC) microscopy for quantitative phase imaging [J]. *Optics Letters*, 2010, 35(3): 447-449.
- [19] Zuo C, Chen Q, Asundi A. Boundary-artifact-free phase

- retrieval with the transport of intensity equation: fast solution with use of discrete cosine transform [J]. *Optics Express*, 2014, 22(8): 9220–9244.
- [20] Zuo C, Sun J, Li J, et al. High-resolution transport-of-intensity quantitative phase microscopy with annular illumination[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 7654.
- [21] Faulkner H M L, Rodenburg J M. Movable aperture lensless transmission microscopy: a novel phase retrieval algorithm [J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(2): 023903.
- [22] Rodenburg J M. Ptychography and related diffractive imaging methods. *Advances in Imaging and Electron Physics* [M]. Burlington: Elsevier, 2008: 87–184.
- [23] Zheng G, Horstmeyer R, Yang C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy [J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(9): 739–745.
- [24] Sun J, Chen Q, Zhang Y, et al. Efficient positional misalignment correction method for Fourier ptychographic microscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(4): 1336–1350.
- [25] Zuo C, Sun J, Chen Q. Adaptive step-size strategy for noise-robust Fourier ptychographic microscopy [J]. *Optics Express*, 2016, 24(18): 20724–20744.
- [26] Wang L V. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography [J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(9): 503–509.
- [27] Li J, Chen Q, Sun J, et al. Three-dimensional tomographic microscopy technique with multi-frequency combination with partially coherent illuminations [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(6): 2526–2542.
- [28] Javid B, Ponce-Díaz R, Hong S-H. Three-dimensional recognition of occluded objects by using computational integral imaging[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(8): 1106–1108.
- [29] Choi W, Fang-Yen C, Badizadegan K, et al. Tomographic phase microscopy[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(9): 717.
- [30] Fienup J R. Phase retrieval algorithms: a comparison [J]. *Applied Optics*, 1982, 21(15): 2758–2769.
- [31] Elser V. Phase retrieval by iterated projections [J]. *JOSA A*, 2003, 20(1): 40–55.
- [32] Gonsalves R A. Phase retrieval from modulus data[J]. *JOSA*, 1976, 66(9): 961–964.
- [33] Candès E, Eldar Y, Strohmer T, et al. Phase retrieval via matrix completion[J]. *SIAM Review*, 2015, 57(2): 225–251.
- [34] Meinel A B. Aperture synthesis using independent telescopes [J]. *Applied Optics*, 1970, 9(11): 2501–2504.
- [35] Mico V, Zalevsky Z, García-Martínez P, et al. Synthetic aperture superresolution with multiple off-axis holograms[J]. *JOSA A*, 2006, 23(12): 3162–3170.
- [36] Pacheco S, Salahieh B, Milster T, et al. Transfer function analysis in epi-illumination Fourier ptychography [J]. *Optics Letters*, 2015, 40(22): 5343–5346.
- [37] Ma B, Zimmermann T, Rohde M, et al. Use of Autostitch for automatic stitching of microscope images [J]. *Micron*, 2007, 38(5): 492–499.
- [38] Cui X, Lee L M, Heng X, et al. Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for *Caenorhabditis elegans* and cell imaging [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(31): 10670–10675.
- [39] Su T, Seo S, Erlinger A, et al. Towards wireless health: lensless on-chip cytometry [J]. *Optics and Photonics News*, 2008, 19(12): 24–24.
- [40] Seo S, Su T-W, Tseng K D, et al. Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(6): 777–787.
- [41] Isikman S, Seo S, Sencan I, et al. Lensfree cell holography on a chip: from holographic cell signatures to microscopic reconstruction [C]//2009 IEEE LEOS Annual Meeting Conference Proceedings, 2009: 404–405.
- [42] Lee S A, Leitao R, Zheng G, et al. Color capable sub-pixel resolving optofluidic microscope and its application to blood cell imaging for malaria diagnosis [J]. *PLOS ONE*, 2011, 6(10): e26127.
- [43] Zheng G, Lee S A, Antebi Y, et al. The ePetri dish, an on-chip cell imaging platform based on subpixel perspective sweeping microscopy (SPSM) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(41): 16889–16894.
- [44] Pang S, Cui X, DeModena J, et al. Implementation of a color-capable optofluidic microscope on a RGB CMOS color sensor chip substrate[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(4): 411–414.
- [45] Garcia-Sucerquia J, Xu W, Jericho S K, et al. Digital in-line holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2006, 45(5): 836–850.
- [46] Garcia-Sucerquia J, Xu W, Jericho M H, et al. Immersion digital in-line holographic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(9): 1211–1213.
- [47] Kanka M, Riesenberger R, Kreuzer H J. Reconstruction of high-resolution holographic microscopic images [J]. *Optics Letters*, 2009, 34(8): 1162–1164.

- [48] Kanka M, Riesenberger R, Petruck P, et al. High resolution ($NA=0.8$) in lensless in-line holographic microscopy with glass sample carriers[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(18): 3651–3653.
- [49] Mudanyali O, Tseng D, Oh C, et al. Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications [J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(11): 1417–1428.
- [50] Bishara W, Su T-W, Coskun A F, et al. Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution[J]. *Optics Express*, 2010, 18(11): 11181–11191.
- [51] Hahn J, Lim S, Choi K, et al. Video-rate compressive holographic microscopic tomography [J]. *Optics Express*, 2011, 19(8): 7289–7298.
- [52] Luo W, Zhang Y, Göröcs Z, et al. Propagation phasor approach for holographic image reconstruction [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22738.
- [53] Xiong Z, Melzer J E, Garan J, et al. Optimized sensing of sparse and small targets using lens-free holographic microscopy[J]. *Optics Express*, 2018, 26(20): 25676.
- [54] Agbana T E, Gong H, Amoah A S, et al. Aliasing, coherence, and resolution in a lensless holographic microscope[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(12): 2271–2274.
- [55] Zhang W, Cao L, Jin G, et al. Full field-of-view digital lens-free holography for weak-scattering objects based on grating modulation[J]. *Applied Optics*, 2018, 57(1): A164.
- [56] Allier C, Morel S, Vincent R, et al. Imaging of dense cell cultures by multiwavelength lens-free video microscopy: cell cultures by lens-free microscopy [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5): 433–442.
- [57] Serabyn E, Liewer K, Wallace J K. Resolution optimization of an off-axis lensless digital holographic microscope [J]. *Applied Optics*, 2018, 57(1): A172.
- [58] Feng S, Wu J. Resolution enhancement method for lensless in-line holographic microscope with spatially-extended light source[J]. *Optics Express*, 2017, 25(20): 24735.
- [59] Feng S, Wang M, Wu J. Lensless in-line holographic microscope with Talbot grating illumination [J]. *Optics Letters*, 2016, 41(14): 3157.
- [60] Greenbaum A, Ozcan A. Maskless imaging of dense samples using pixel super-resolution based multi-height lensfree on-chip microscopy[J]. *Optics Express*, 2012, 20(3): 3129–3143.
- [61] Allen L J, Oxley M P. Phase retrieval from series of images obtained by defocus variation [J]. *Optics Communications*, 2001, 199(1): 65–75.
- [62] Zhang Y, Pedrini G, Osten W, et al. Whole optical wave field reconstruction from double or multi in-line holograms by phase retrieval algorithm [J]. *Optics Express*, 2003, 11(24): 3234–3241.
- [63] Bishara W, Sikora U, Mudanyali O, et al. Holographic pixel super-resolution in portable lensless on-chip microscopy using a fiber-optic array [J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(7): 1276–1279.
- [64] Greenbaum A, Feizi A, Akbari N, et al. Wide-field computational color imaging using pixel super-resolved on-chip microscopy[J]. *Optics Express*, 2013, 21(10): 12469–12483.
- [65] Greenbaum A, Sikora U, Ozcan A. Field-portable wide-field microscopy of dense samples using multi-height pixel super-resolution based lensfree imaging [J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(7): 1242–1245.
- [66] Zheng G, Ah Lee S, Yang S, et al. Sub-pixel resolving optofluidic microscope for on-chip cell imaging [J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(22): 3125–3129.
- [67] Luo W, Zhang Y, Feizi A, et al. Pixel super-resolution using wavelength scanning [J]. *Light: Science & Applications*, 2016, 5(4): e16060.
- [68] Hussain A, Li Y, Liu D, et al. Lensless imaging through multiple phase patterns illumination [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(11): 110502.
- [69] Hussain A, Li Y, Liu D, et al. On-chip microscopy using random phase mask scheme [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 14768.
- [70] Feng S, Wang M, Wu J. Enhanced resolution in lensless in-line holographic microscope by data interpolation and iterative reconstruction [J]. *Optics Communications*, 2017, 402: 104–108.
- [71] Zuo C, Chen Q, Sun J, et al. Non-interferometric phase retrieval and quantitative phase microscopy based on transport of intensity equation: a review [J]. *Chinese J Lasers*, 2016, 43(6): 0609002.
- [72] Gorthi S S, Schonbrun E. Phase imaging flow cytometry using a focus-stack collecting microscope[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(4): 707–709.
- [73] Cheng H, Zhang Q, Wei S, et al. Phase retrieval based on transport-of-intensity equation [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, 40(10): 1566–1570.
- [74] Zuo C, Chen Q, Huang L, et al. Phase discrepancy analysis

- and compensation for fast Fourier transform based solution of the transport of intensity equation [J]. *Optics Express*, 2014, 22(14): 17172–17186.
- [75] Zuo C, Sun J, Zhang J, et al. Lensless phase microscopy and diffraction tomography with multi-angle and multi-wavelength illuminations using a LED matrix [J]. *Optics Express*, 2015, 23(11): 14314–14328.
- [76] Zhang J, Sun J, Chen Q, et al. Adaptive pixel-super-resolved lensfree in-line digital holography for wide-field on-chip microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11777.
- [77] Zhang J, Chen Q, Li J, et al. Lensfree dynamic super-resolved phase imaging based on active micro-scanning [J]. *Optics Letters*, 2018, 43(15): 3714–3717.
- [78] Kesavan S V, Momey F, Cioni O, et al. High-throughput monitoring of major cell functions by means of lensfree video microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5942.
- [79] Goodman J W. *Statistical Optics* [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015.
- [80] Su T-W, Seo S, Erlinger A, et al. High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(3): 856–868.
- [81] Ozcan A, Demirci U. Ultra wide-field lens-free monitoring of cells on-chip [J]. *Lab on a Chip*, 2008, 8(1): 98–106.
- [82] Zhang X, Khimji I, Atakan Gurkan U, et al. Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting [J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(15): 2535–2540.
- [83] Moscelli N, van den Driesche S, Witarski W, et al. An imaging system for real-time monitoring of adherently grown cells [J]. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2011, 172(1): 175–180.
- [84] Bok Kim S, Bae H, Min Cha J, et al. A cell-based biosensor for real-time detection of cardiotoxicity using lensfree imaging [J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(10): 1801–1807.
- [85] Jin G, Yoo I-H, Pack S P, et al. Lens-free shadow image based high-throughput continuous cell monitoring technique [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 38(1): 126–131.
- [86] Dolega M E, Allier C, Kesavan S V, et al. Label-free analysis of prostate acini-like 3D structures by lensfree imaging [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49: 176–183.
- [87] Kwak Y H, Lee J, Lee J, et al. A simple and low-cost biofilm quantification method using LED and CMOS image sensor [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 107: 150–156.
- [88] Penwill L A, Batten G E, Castagnetti S, et al. Growth phenotype screening of *Schizosaccharomyces pombe* using a Lensless microscope [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 54: 345–350.
- [89] Pushkarsky I, Liu Y, Weaver W, et al. Automated single-cell motility analysis on a chip using lensfree microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4717.
- [90] Tsai H F, Tsai Y C, Yagur Kroll S, et al. Water pollutant monitoring by a whole cell array through lens-free detection on CCD [J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(6): 1472–1480.
- [91] Kesavan S V, Garcia F P N Y, Menneveau M, et al. Real-time label-free detection of dividing cells by means of lensfree video-microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(3): 036004.
- [92] Lee L M, Cui X, Yang C. The application of on-chip optofluidic microscopy for imaging *Giardia lamblia* trophozoites and cysts [J]. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(5): 951.
- [93] Coskun A F, Sencan I, Su T W, et al. Lensless wide-field fluorescent imaging on a chip using compressive decoding of sparse objects [J]. *Optics Express*, 2010, 18(10): 10510–10523.
- [94] Coskun A F, Su T W, Ozcan A. Wide field-of-view lens-free fluorescent imaging on a chip [J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(7): 824–827.
- [95] Shanmugam A, Salthouse C D. Lensless fluorescence imaging with height calculation [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(1): 016002.
- [96] Coskun A F, Sencan I, Su T W, et al. Wide-field lensless fluorescent microscopy using a tapered fiber-optic faceplate on a chip [J]. *Analyst*, 2011, 136(17): 3512–3518.
- [97] Coskun A F, Sencan I, Su T W, et al. Lensfree fluorescent on-chip imaging of transgenic *Caenorhabditis elegans* over an ultra-wide field-of-view [J]. *PLOS ONE*, 2011, 6(1): e15955.
- [98] Martinelli L, Choumane H, Ha K N, et al. Sensor-integrated fluorescent microarray for ultrahigh sensitivity direct-imaging bioassays: Role of a high rejection of excitation light [J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 91(8): 083901.
- [99] Lee S A, Ou X, Lee J E, et al. Chip-scale fluorescence microscope based on a silo-filter complementary metal-

- oxide semiconductor image sensor [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(11): 1817–1819.
- [100] Ozcan A, McLeod E. Lensless imaging and sensing [J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2016, 18 (1): 77–102.
- [101] Khademhosseini B, Sencan I, Biener G, et al. Lensfree on-chip imaging using nanostructured surfaces [J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 96(17): 171106.
- [102] Khademhosseini B, Biener G, Sencan I, et al. Lensfree color imaging on a nanostructured chip using compressive decoding[J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 97(21): 211112.
- [103] Han C, Pang S, Bower D V, et al. Wide field-of-view on-chip talbot fluorescence microscopy for longitudinal cell culture monitoring from within the incubator [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(4): 2356–2360.
- [104] Richardson W H. Bayesian-based iterative method of image restoration[J]. *JOSA*, 1972, 62(1): 55–59.
- [105] Lucy L B. An iterative technique for the rectification of observed distributions [J]. *The Astronomical Journal*, 1974, 79: 745.
- [106] Pech-Pacheco J L, Cristobal G, Chamorro-Martinez J, et al. Diatom autofocusing in brightfield microscopy: a comparative study [C]//Proceedings of 15th International Conference on Pattern Recognition, 2000, 3: 314–31.
- [107] Mudanyali O, Oztoprak C, Tseng D, et al. Detection of waterborne parasites using field-portable and cost-effective lensfree microscopy[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(18): 2419–2423.
- [108] Denis L, Fournier C, Fournel T, et al. Numerical suppression of the twin image in in-line holography of a volume of micro-objects [J]. *Measurement Science and Technology*, 2008, 19(7): 074004.
- [109] Hardie R C, Barnard K J, Bognar J G, et al. High-resolution image reconstruction from a sequence of rotated and translated frames and its application to an infrared imaging system[J]. *Optical Engineering*, 1998, 37(1): 247–261.
- [110] Park S C, Park M K, Kang M G. Super-resolution image reconstruction: a technical overview [J]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2003, 20(3): 21–36.
- [111] Elad M, Hel-Or Y. A fast super-resolution reconstruction algorithm for pure translational motion and common space-invariant blur [J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2001, 10(8): 1187–1193.
- [112] Mudanyali O, Bishara W, Ozcan A. Lensfree super-resolution holographic microscopy using wetting films on a chip[J]. *Optics Express*, 2011, 19(18): 17378–17389.
- [113] Luo W, Greenbaum A, Zhang Y, et al. Synthetic aperture-based on-chip microscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2015, 4(3): e261.
- [114] Goodman J W. Introduction to Fourier Optics[M]. Colorado: Roberts and Company Publishers, 2005.
- [115] Fienup J R. Reconstruction of an object from the modulus of its Fourier transform[J]. *Optics Letters*, 1978, 3(1): 27–29.
- [116] Koren G, Polack F, Joyeux D. Iterative algorithms for twin-image elimination in in-line holography using finite-support constraints[J]. *JOSA A*, 1993, 10(3): 423–433.
- [117] Mudanyali O, McLeod E, Luo W, et al. Wide-field optical detection of nanoparticles using on-chip microscopy and self-assembled nanolenses[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(3): 247–254.
- [118] Greenbaum A, Zhang Y, Feizi A, et al. Wide-field computational imaging of pathology slides using lens-free on-chip microscopy [J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(267): 267ra175.
- [119] Greenbaum A, Luo W, Khademhosseini B, et al. Increased space-bandwidth product in pixel super-resolved lensfree on-chip microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1717.
- [120] Wei Q, McLeod E, Qi H, et al. On-chip cytometry using plasmonic nanoparticle enhanced lensfree holography [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1699.
- [121] Min J, Yao B, Zhou M, et al. Phase retrieval without unwrapping by single-shot dual-wavelength digital holography[J]. *Journal of Optics*, 2014, 16(12): 125409.
- [122] Bao P, Situ G, Pedrini G, et al. Lensless phase microscopy using phase retrieval with multiple illumination wavelengths [J]. *Applied Optics*, 2012, 51(22): 5486–5494.
- [123] Meng H, Hussain F. In-line recording and off-axis viewing technique for holographic particle velocimetry [J]. *Applied Optics*, 1995, 34(11): 1827–1840.
- [124] Isikman S O, Bishara W, Ozcan A. Partially coherent lensfree tomographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2011, 50(34): H253–H264.
- [125] Isikman S O, Bishara W, Mavandadi S, et al. Lens-free optical tomographic microscope with a large imaging volume on a chip [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(18): 7296–7301.
- [126] Su T-W, Isikman S O, Bishara W, et al. Multi-angle

- lensless digital holography for depth resolved imaging on a chip[J]. *Optics Express*, 2010, 18(9): 9690–9711.
- [127] Berdeu A, Momey F, Laperrousaz B, et al. Comparative study of fully three-dimensional reconstruction algorithms for lens-free microscopy [J]. *Applied Optics*, 2017, 56(13): 3939.
- [128] Dijkstra E W. A note on two problems in connexion with graphs[J]. *Numerische Mathematik*, 1959, 1(1): 269–271.
- [129] Greenbaum A, Akbari N, Feizi A, et al. Field-portable pixel super-resolution colour microscope [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(9): e76475.
- [130] Kim D S, Choi J H, Nam M H, et al. LED and CMOS image sensor based hemoglobin concentration measurement technique[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 157(1): 103–109.
- [131] Lee J, Kwak Y H, Paek S H, et al. CMOS image sensor-based ELISA detector using lens-free shadow imaging platform[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 196: 511–517.
- [132] Tanaka T, Saeki T, Sunaga Y, et al. High-content analysis of single cells directly assembled on CMOS sensor based on color imaging [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26(4): 1460–1465.
- [133] Göröcs Z, Orzó L, Kiss M, et al. In-line color digital holographic microscope for water quality measurements[C]// Laser Applications in Life Sciences. International Society for Optics and Photonics, 2010, 7376: 737614.
- [134] Jack K. Video Demystified: a Handbook for the Digital Engineer[M]. Burlington: Elsevier, 2011.
- [135] Ren Z, Xu Z, Lam E Y. Autofocusing in digital holography using deep learning[C]//Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXV. International Society for Optics and Photonics, 2013, 10499: 104991V.
- [136] Ren Z, Xu Z, Lam E Y. Learning-based nonparametric autofocusing for digital holography [J]. *Optica*, 2018, 5(4): 337–344.
- [137] Zhang G, Guan T, Shen Z, et al. Fast phase retrieval in off-axis digital holographic microscopy through deep learning[J]. *Optics Express*, 2018, 26(15): 19388–19405.
- [138] Wang H, Lyu M, Situ G. eHoloNet: a learning-based end-to-end approach for in-line digital holographic reconstruction [J]. *Optics Express*, 2018, 26(18): 22603–22614.
- [139] Nguyen T, Bui V, Lam V, et al. Automatic phase aberration compensation for digital holographic microscopy based on deep learning background detection[J]. *Optics Express*, 2017, 25(13): 15043–15057.
- [140] Goy A, Arthur K, Li S, et al. Low photon count phase retrieval using deep learning [J]. *Physical Review Letters*, 2018, 121(24): 243902.
- [141] Li S, Deng M, Lee J, et al. Imaging through glass diffusers using densely connected convolutional networks [J]. *Optica*, 2018, 5(7): 803–813.
- [142] Lyu M, Wang W, Wang H, et al. Deep-learning-based ghost imaging[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17865.
- [143] Rivenson Y, Göröcs Z, Günaydin H, et al. Deep learning microscopy[J]. *Optica*, 2017, 4(11): 1437–1443.
- [144] Wang H, Rivenson Y, Jin Y, et al. Deep learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(1): 103.
- [145] Nehme E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning[J]. *Optica*, 2018, 5(4): 458–464.
- [146] Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 460–468.
- [147] Rivenson Y, Zhang Y, Günaydin H, et al. Phase recovery and holographic image reconstruction using deep learning in neural networks [J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7(2): 17141.
- [148] Horisaki R, Fujii K, Tanida J. Single-shot and lensless complex-amplitude imaging with incoherent light based on machine learning[J]. *Optical Review*, 2018, 25(5): 593–597.
- [149] Sinha A, Lee J, Li S, et al. Lensless computational imaging through deep learning[J]. *Optica*, 2017, 4(9): 1117.
- [150] Ahn D, Lee J, Moon S, et al. Human-level blood cell counting on lens-free shadow images exploiting deep neural networks[J]. *The Analyst*, 2018, 143(22): 5380–5387.
- [151] Flaccavento G, Lempitsky V, Pope I, et al. Learning to count cells: applications to lens-free imaging of large fields [J]. *Microscopic Image Analysis with Applications in Biology*, 2011, 1: 3.
- [152] Feizi A, Zhang Y, Greenbaum A, et al. Rapid, portable and cost-effective yeast cell viability and concentration analysis using lensfree on-chip microscopy and machine learning[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(22): 4350–4358.
- [153] Huang X, Guo J, Wang X, et al. A contact-imaging based microfluidic cytometer with machine-learning for single-

- frame super-resolution processing [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9 (8): e104539.
- [154] Rempfler M, Kumar S, Stierle V, et al. Cell lineage tracing in lens-free microscopy videos [C]//International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, 2017: 3-11.
- [155] Göröcs Z, Tamamitsu M, Bianco V, et al. A deep learning-enabled portable imaging flow cytometer for cost-effective, high-throughput, and label-free analysis of natural water samples[J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7(1): 66.
- [156] Huang X, Wang X, Yan M, et al. A robust recognition error recovery for micro-flow cytometer by machine-learning enhanced single-frame super-resolution processing [J]. *Integration, the VLSI Journal*, 2015, 51: 208-218.
- [157] Su T-W, Choi I, Feng J, et al. Sperm trajectories form chiral ribbons[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1664.