

定量相位显微中分辨率增强技术综述

郜 鹏¹, 温 凯^{1,2,3}, 孙雪莹¹, 姚保利², 郑娟娟¹

- (1. 西安电子科技大学 物理与光电工程学院, 陕西 西安 710171;
2. 中国科学院西安光学精密机械研究所 瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 陕西 西安 710119;
3. 陕西师范大学 物理学与信息技术学院, 陕西 西安 710119)

摘要: 定量相位显微(Quantitative Phase Microscopy, QPM)将相位成像和光学显微技术相结合,为微观物体的三维形貌、透明物体的厚度/折射率分布提供了一种快速、无损、高分辨率测量手段。然而,传统 QPM 成像系统依然是一个衍射受限系统,高分辨率与大视场难以同时兼顾。因此,如何在保持大视场的前提下提高成像空间分辨率是 QPM 亟需解决的问题之一。近年来,国内外学者采用离轴照明、散斑照明、结构照明、以及亚像元技术形成“合成数值孔径”,实现了 QPM 的大视场、高分辨成像。文中对以上 QPM 的分辨率增强技术进行了综述,并对不同方法的优缺点进行了分析。

关键词: 相位成像; 分辨率增强; 调制照明; 合成孔径; 亚像元技术

中图分类号: O436.1 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201948.0603007

Review of resolution enhancement technologies in quantitative phase microscopy

Gao Peng¹, Wen Kai^{1,2,3}, Sun Xueying¹, Yao Baoli², Zheng Juanjuan¹

- (1. School of Physics and Optoelectronic Engineering, Xidian University, Xi'an 710171, China;
2. State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, China;
3. College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: Quantitative Phase Microscopy (QPM), which combines phase imaging and optical microscopy, has been acting as a fast, non-destructive, and high-resolution methodology to measure the 3D morphology of reflective samples, as well as the inner structure or the refractive index of transparent samples. Similar to other diffraction-limited imaging systems, QPM suffers from the contradiction between spatial resolution and field of view (FOV). Therefore, how to achieve high spatial resolution in a large FOV has attracted a lot of attentions in the field of optical microscopy. In recent years, people utilized off-axis illumination, speckle illumination, structural illumination, and sub-pixel technology to synthesize a larger numerical aperture (SNA), and consequently enhanced the resolution of QPM. The resolution enhancement technologies of QPM were reviewed in this paper. The advantages and limitations of different methods were analyzed.

Key words: phase imaging; resolution enhancement; modulated illumination; synthetic aperture; sub-pixel technology

收稿日期: 2019-04-05; 修订日期: 2019-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(61605150, 61475187, 6140524); 国家“千人计划”基金; 高等学校学科创新引智计划(B17035)

作者简介: 郜鹏(1983-), 男, 教授, 硕/博士生导师, 主要从事相位显微及超分辨光学显微技术方面的研究。Email: peng.gao@xidian.edu.cn

通讯作者: 温凯(1995-), 男, 硕士生, 主要从事相位显微成像方面的研究。Email: thinker_wk@163.com

0 引言

自从 17 世纪光学显微镜出现以来,光学显微成像已经成为人们认识和研究微观世界的重要手段。然而,传统的光学显微只能获取样品的强度信息,无法对相位进行直接成像或测量。而相位分布往往能反映物体三维形貌、内部结构与折射率分布等信息,因而研究一种新型的成像技术,能够对样品的相位分布进行可视化或定量测量具有重要意义。定量相位显微(Quantitative Phase Microscopy, QPM)技术便是在此背景下发展起来的。该技术将相位成像和光学显微技术相结合,能够定量测量待测样品引起的空间上的相位变化。与其他成像技术相比,该技术无需标记、具有对样品损伤小、可对透明样品进行高衬度成像等优点。常见的相位成像技术主要有基于折射或衍射元件的波前传感技术(Shack-Hartmann、PhasicsSID4)^[1-2]、微分相衬干涉显微(Differential Phase Contrast Interference Microscopy, DIC)^[3]、数字全息显微(Digital Holographic Microscopy, DHM)^[4]、单光束相位显微^[5]等。QPM 技术广泛应用于基础科学、工业应用、生物医学领域等方面。在生物医学领域, QPM 被用于测量红细胞膜形态变化^[6]、纳米级别电生理现象^[7]、单细胞体积和质量^[8]、硫矿物质颗粒中的病毒和分析浮游生物的尺寸^[9]等。同时,还被用来观测正常细胞与病变细胞之间的相互作用^[10]、血液筛选^[11]、试管受精观测^[12]、测量红细胞和白细胞信息^[13]等。然而,传统的 QPM 采用平行光照明,其空间

分辨率受到物镜数值孔径的限制,不能完全满足微观领域研究观测的需求。相位成像的分辨率提高对于理解光的相位特性,尤其是光通过散射介质传播的特性,具有重要意义。同时,高分辨定量相位显微技术在生物医学等领域有着很好的应用前景,能为观测透明样品的细微结构提供有力手段。为了提高 QPM 空间分辨率,则需使用高数值孔径的显微物镜,但与此同时成像视场会减少。因此,如何解决空间分辨率与视场两者之间的矛盾,实现对微小物体的超分辨成像是目前定量相位显微领域研究的重要方向之一。

根据是否需要参考光, QPM 可以分为双光束 QPM(需要参考光)和单光束 QPM(无需参考光)两种。文中分别介绍这两种 QPM 分辨率增强技术的最新研究进展。

1 双光束相位成像方式

数字全息显微技术是将光学干涉和光学显微技术相结合的新型相位成像方法,其基本成像原理如图 1 所示,照明光被非偏振分光棱镜 NPBS₁ 分成物光(O)和参考光(R)。透过样品后的物光被显微物镜 MO 放大,再通过透镜 L 准直为平行光;参考光在非偏振分光棱镜 NPBS₂ 的作用下与物光汇合并发生干涉,干涉图样被 CCD 相机记录;经过数字化后,全息图被存入计算机中;然后通过相应的数值再现算法,从记录的干涉图样(单幅离轴干涉图或多幅相移干涉图)中再现出被测物体的相位和振幅信息,还原被测样品的三维形貌或折射率的空间分布。

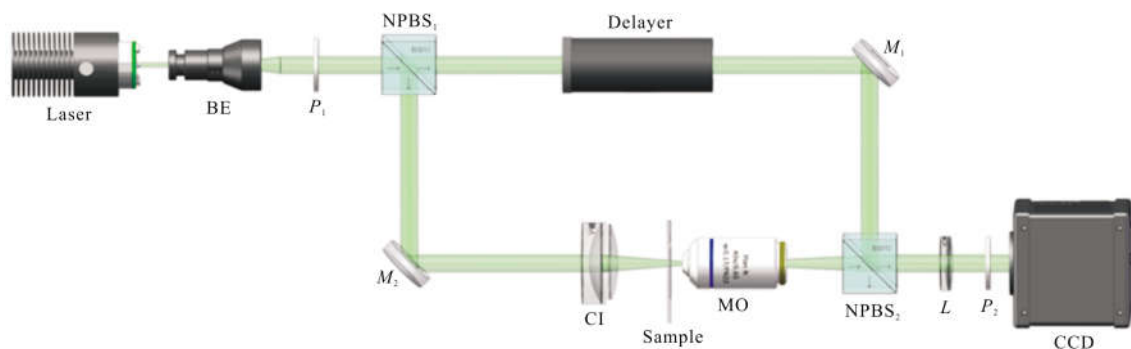


图 1 传统 DHM 光路示意图

Fig.1 Schematic diagram of traditional DHM optical path

近年来,多种提高 DHM 分辨率的技术不断涌现,为待测样品的信息精确恢复提供了有利途径。下面将介绍以 DHM 为基础的离轴照明、散斑照明、结构光照明的双光束相位成像方式的研究进展。

1.1 基于离轴照明的数字全息显微

如上文所述,传统数字全息显微技术一般采用平行光照明样品,经过样品后的光束被由物镜放大后成像到 CCD 上,CCD 面上物光的最大空间频率受到物镜数值孔径(Numerical Aperture, NA)的限制;超出物镜有限数值孔径的高空间频率成分不能被物镜所接收,如图 2(a)所示。若使用离轴照明方式,物光

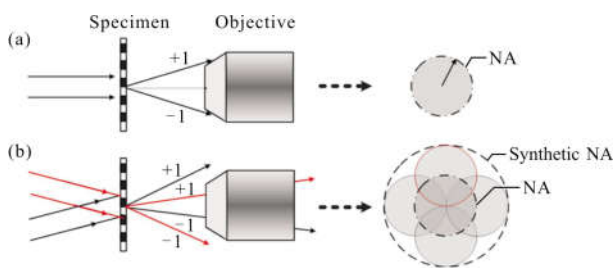


图 2 离轴照明和合成孔径原理示意图

Fig.2 Schematic diagram of off-axis illumination and synthetic aperture

的部分高频分量会被平移向低频分量,从而进入物镜的数值孔径范围。如图 2(b)所示,通过采用不同的照明方向,可以得到一系列互补的空间频率成分,即添加 4 个额外的孔径,最后合成了一个较大的“合成孔径”(Synthesized Aperture, SA)。

实验中,不同照明方向下物光的频谱合成是通过计算机来实现的。从每幅全息图中再现出的频谱分布被移动到它们在物光频谱中原有的位置,形成大于物镜固有孔径的“合成孔径”;最后对拼接的频谱进行傅里叶逆变换可以得到超分辨率的再现图像。需要注意的是,不同照明方向下物光的频谱合成是一个相干叠加的过程,这要求不同照明方向下物光之间不能存在相位差(相位畸变)。因此,在合成孔径之前,有必要对获得的物光进行畸变补偿,以便提供高质量的重建图像。为了保证每次离轴照明下再现的物光波具有相同的相位分布,可采取一下步骤:首先,计算每次离轴照明相对于沿轴向照明物光波之间的相位差,并采用低次二维多项式函数对其进行拟合,产生 $\varphi_{\text{abber}}(x, y)$ 。然后,将第 i 个物光波的复振幅乘以 $\exp(-i\varphi_{\text{abber}})$ 来补偿偏差。图 3 展示了合成孔径中相位补偿的重要性,图 3(a)为 QPM 中不同照明

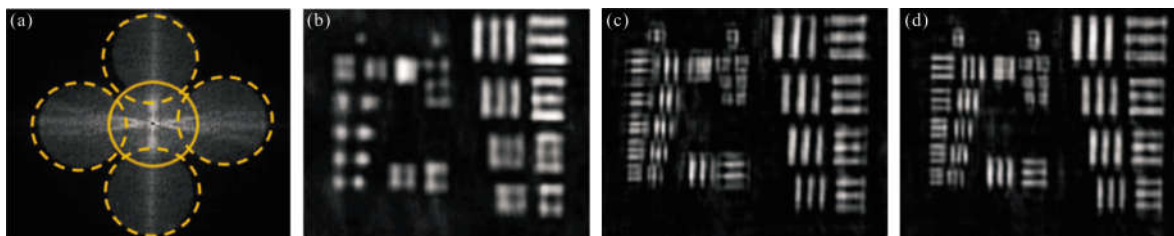


图 3 基于离轴照明 DHM 的合成孔径和数字在线

Fig.3 Synthetic aperture and numerical reconstruction of the DHM based on off-axis illumination

方向下的频谱分布;实线圆圈为采用轴向照明对应的物光波的频谱分布;4 个黄色虚线圆圈为不同离轴照明下物光波的频谱分布;图 3(b)为传统平行光照明 DHM 再现的低分辨率图像;图 3(c)为未进行相位匹配情况下合成孔径后得到的结果,图 3(d)为进行相位匹配情况下合成孔径得到的结果。通过对比发现只有消除了不同照明方向下物光波之间的相位偏移才可以得到高质量图像。

事实上,利用离轴照明并未改变成像系统本身的 NA,而是利用倾斜照明使得来自常规有限孔径之外的空间频率能够被物镜所接收。基于平行光照明

的 DHM 分辨率极限为 $0.82\lambda/\text{NA}$,当离轴照明对应的数值孔径为 NA_{illum} 时,最终的分辨率可提高到 $0.82\lambda/(\text{NA}+\text{NA}_{\text{illum}})$ 。图 4 展示了采用离轴照明提高相位成像空间分辨率的结果^[14],图 4(a)为传统低分辨率图像;图 4(b)为超分辨图像;图 4(c)为与传统图像相比的合成孔径图像;图 4(d)~(e)分别为不同照明条件下红细胞的定量相位信息三维分布。实验中,采用数值孔径 $\text{NA}=0.1$ 的显微物镜对样品进行成像,通过利用 $\text{NA}_{\text{illum}}=0.17$ 的离轴照明最终得到了覆盖物光频谱的二维全空间的合成孔径 $\text{NA}_{\text{syn}}=0.27$ 。平行光照明下,空间分辨率为 $6.97 \mu\text{m}$ (图 4(d)),采用

离轴照明后空间分辨率约为 $2.58 \mu\text{m}$ (图 4(e)),对比图 4(d)和(e),可以看出:离轴照明下红细胞的相位图像比在传统平行光照明下的图像更加清晰、具有更多细节。自离轴照明被首次应用于 QPM 的分辨率提高以来,涌现了许多关于合成孔径的文献报道^[15-18]。Schwarz^[16]等人利用离轴照明将物光频谱转化为低频频谱,在再现光束中引入具有相同倾斜

角度的参考光束,将图像的频谱移动至原有位置,利用合成孔径效应实现了分辨率的提高。原操今^[17]等人采用偏振复用的方法实现了两个离轴方向的同时照明和成像。Mico^[18]等人提出利用垂直腔面发射激光器阵列作为照明光源,通过将不同发光元对应的再现像进行频谱拼接,将 QPM 的空间分辨率提高了 5 倍。此外,通过照明光束扫描旋转样品来实现离轴照明的方

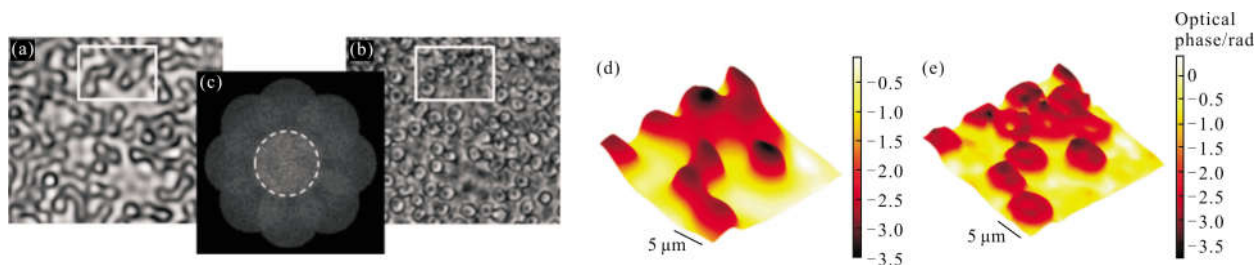


图 4 利用基于离轴照明 QPM 得到的人类红细胞的实验结果

Fig.4 Experimental results of human erythrocytes obtained by QPM with off-axis illumination

法也有相继报道^[19]。

1.2 基于结构照明的数字全息显微

结构光照明显微 (Structured Illumination Microscopy, SIM) 技术,在被测样品上投影一组具有周期性分布的条纹,通过记录和处理样品和照明条纹之间形成的摩尔条纹,可以实现超分辨显微成像。为了提高各个方向上的空间分辨率,需要在样品上投影不同方向的条纹来实现^[20-21]。美中不足的是,传统 SIM 只能提高强度型物体的成像分辨率,对于透

明相位型物体的成像则无能为力。

为了提高对透明样品的成像分辨率,提出将结构照明和 DHM 相结合,实现对微小透镜物体的超分辨相位成像^[22]。利用空间光调制器 (Spatial Light Modulator, SLM) 产生结构光照明,在该结构照明下的物光和参考光进行干涉,形成的全息图样被 CCD 所记录。通过对不同照明方向下全息图进行数字再现,并将不同照明下的物光频谱进行合成,可实现对微小物体的相位和振幅的超分辨成像。笔者提出的

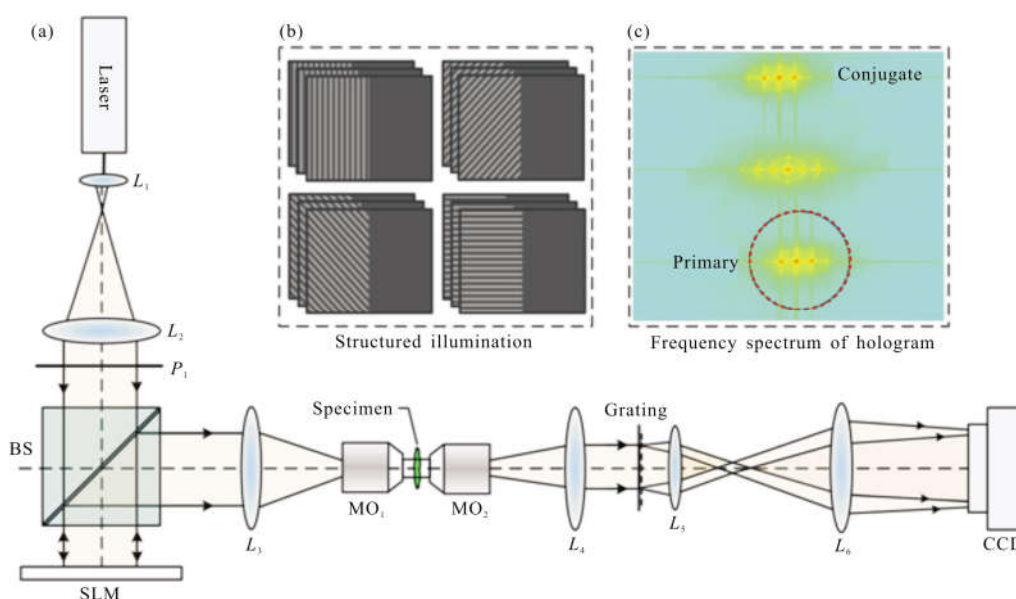


图 5 基于结构照明的 DHM 光路

Fig.5 DHM optical path based on structured illumination

基于结构照明的 DHM 装置如图 5 所示。

He-Ne 激光器发出的激光($\lambda=632.8\text{ nm}$)经由透镜 L_1 和 L_2 组成的望远镜系统扩束准直成平行光,然后通过偏振片 P_1 变为水平线偏振光,经过非偏振分光棱镜 BS 正入射到一个反射式纯相位空间光调制器(SLM)上。通过在 SLM 上加载不同的结构灰度图样(条纹)可以方便地调制入射光场生成相应的结构照明光。结构照明光经望远镜系统(L_3 - MO_1)缩束后成像到样品表面。位于物镜 MO_2 ($NA=0.25$)物平面的上半部分样品被该调制光照明后形成物光,下半部分的调制光保持不变被用作参考光。物光和参考光由物镜 MO_2 和透镜 L_4 组成的成像系统所收集。经过二维光栅 G 的衍射和透镜 L_5 和 L_6 组成的望远镜系统放大成像后,物光和参考光干涉产生离轴全息图并被 CCD 记录,如图 6(a)所示。图 6(b)是结构光照

明下再现的样品相位分布,对比图 6(c)中平面光照明下的再现结果可以清楚的看出,结构照明下的成像分辨率明显提高。图 6(d)为两种照明方式成像分辨率的比较。通过定量分析得知基于平行光照明和基于结构照明的 DHM 的空间分辨率分别为 $1.55\text{ }\mu\text{m}$ 和 $0.90\text{ }\mu\text{m}$ 。事实上,结构光可以看成是两个沿不同方向传播的平行光的组合(分别沿结构光的 ± 1 级衍射方向)。在再现过程中,其相移操作可以分离出沿着不同衍射级的物光复振幅,通过将不同的物光在频谱内对接,形成“合成数值孔径”,最后通过傅里叶变换提高了成像空间分辨率。因此,结构照明与离轴照明异曲同工。利用空间光调制器产生结构照明,不但可以实现不同结构照明的快速切换,并且避免了传统切换带来的机械运动。此外,利用该结构照明 DHM 装置,在提高 DHM 的空间分辨率的同

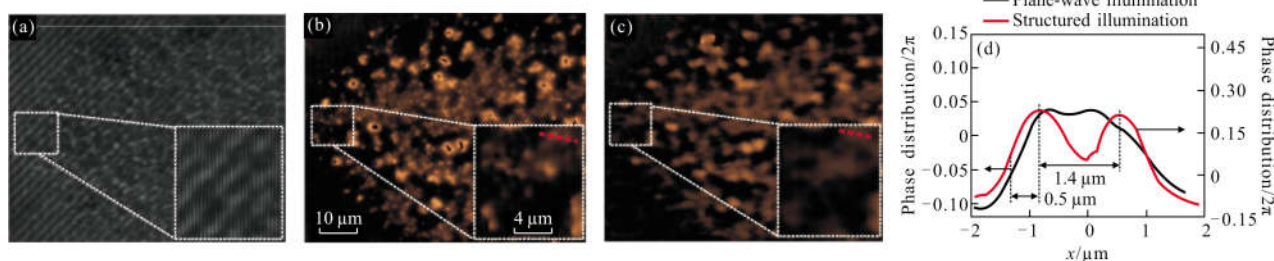


图 6 基于结构照明的 DHM 成像结果

Fig.6 Imaging results of DHM based on structural illumination

时还可以实现自动对焦功能^[23]。

1.3 基于散斑照明的数字全息显微

1960 年,激光出现以后,散斑就成为了光学显微成像中一种常见的现象^[24]。散斑照明技术(包括散斑摄影术、数字散斑相关方法和电子散斑干涉测量等)可以用于研究样品位移和变形、振动和应力分析等方面^[25]。尽管通过对不同散斑照明下得到的图像进行平均可以减少相干噪声、但是这种方式也会造成相位信息的丢失。

近年来,散斑照明也会被用来提高 QPM 的空间分辨率,并减少 DHM 的相干噪声^[26-27]。基于散斑照明的 DHM 实验装置如图 7(a)所示,一个全息散射板被放置在物光光路中,用于产生散斑照明。在该散射板之前放置一个压电扫描振镜,用来控制/改变激光束入射到散射板上的角度。利用声光调制器(AMO₁

和 AMO₂)在物光与参考光之间引入相位,来重构含有和未含有样品信息的两种物光波,分别记为 $O_0(x, y)$ 和 $O_s(x, y)$ 。然后,再将这两个复振幅相除可以得到样品的复透过率分布 $O_i=O_0/O_s$ 。然而,由于散斑照明中存在强度为零的区域,导致每次重构的 O_i 的振幅和相位图中都存在一些噪点。为了解决这个问题,需要记录数百幅散斑图像,再对这些散斑照明下重建的 O_i 进行平均来达到抑制噪声的目的。这种方法集成了非相干成像高分辨率和图像清晰度方面的优点,以及可再现相位分布的优点。图 7(b)、(c)和图 7(d)、(e)分别为基于平行光照明和散斑照明 DHM 对聚苯乙烯微球相位成像的结果。对比这两张图,可以看出散斑照明明显提高了相位成像的分辨能力。同时,通过对分辨率进行定量分析,基于平行光照明的点扩展函数的分辨率(以点扩散函数的半高全宽为衡量

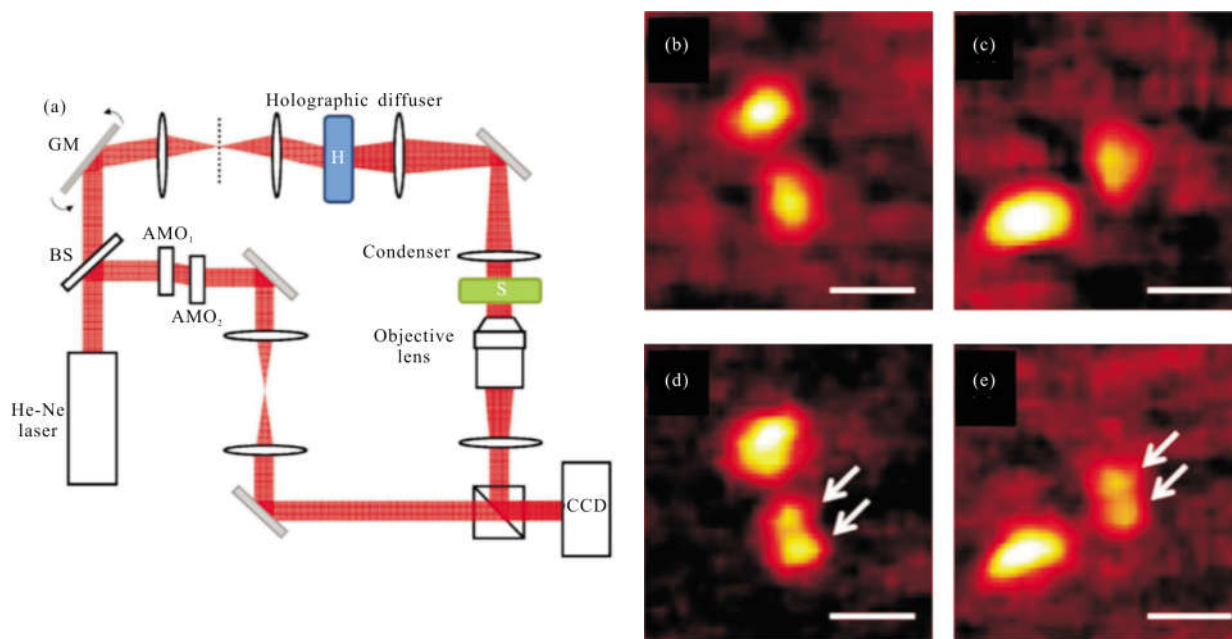


图 7 基于散斑照明的数字全息成像示意图

Fig.7 Schematic diagram of DHM with speckle illumination

标准)为 516 nm,而基于散斑照明 DHM 的分辨率为 305 nm,两者非常接近理论预期。

需要注意的是,该方法在重建过程中采用平均的思路来获得超出物镜数值孔径的高频分量。但是,

该平均算法使得最终得到的物光的低频分量具有更高的比重,不利于成像分辨率的提高。为了解决这一弊端,提出了一种迭代的重建方法^[23]。如图 8 所示,该方法利用 SLM 来产生散斑照明,提高了切换散斑

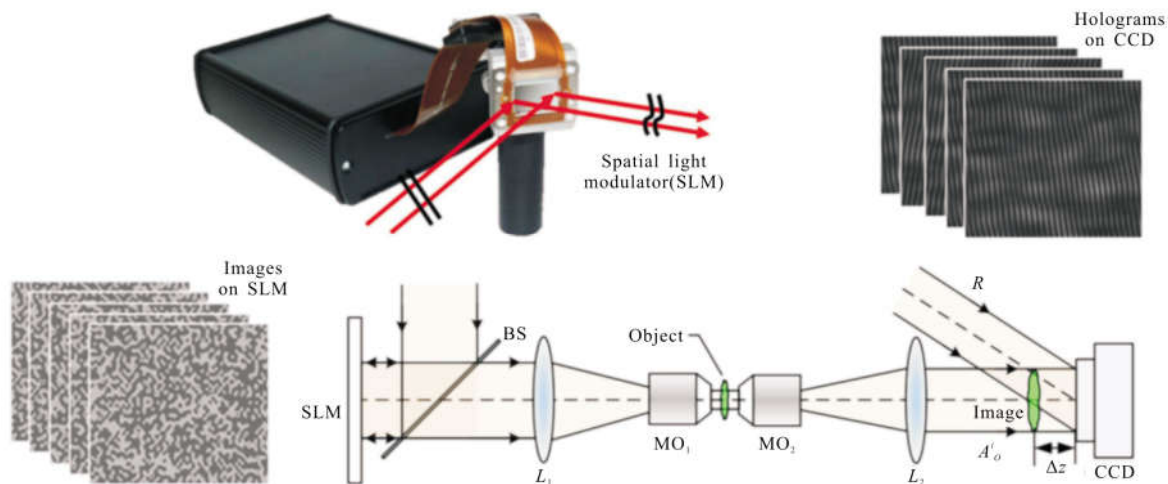


图 8 基于散斑照明的数字全息装置示意图

Fig.8 Schematic diagram of DHM based on speckle illumination

照明的速度和重复性。利用迭代算法,使得照明光中低频和高频分量的比重不影响再现结果。

事实上,散斑场可以认为是不同方向平行光照射的组合。图 9 展示了一种基于迭代的再现方法。不

同角度的倾斜照明会使物光在共轭面的频谱产生位移,进而获得额外的空间频率,如图 9(a)所示,这些额外的信息通过迭代积分,可以合成一个更大的 NA。该迭代再现过程如图 9(b)所示,需要说明的是:

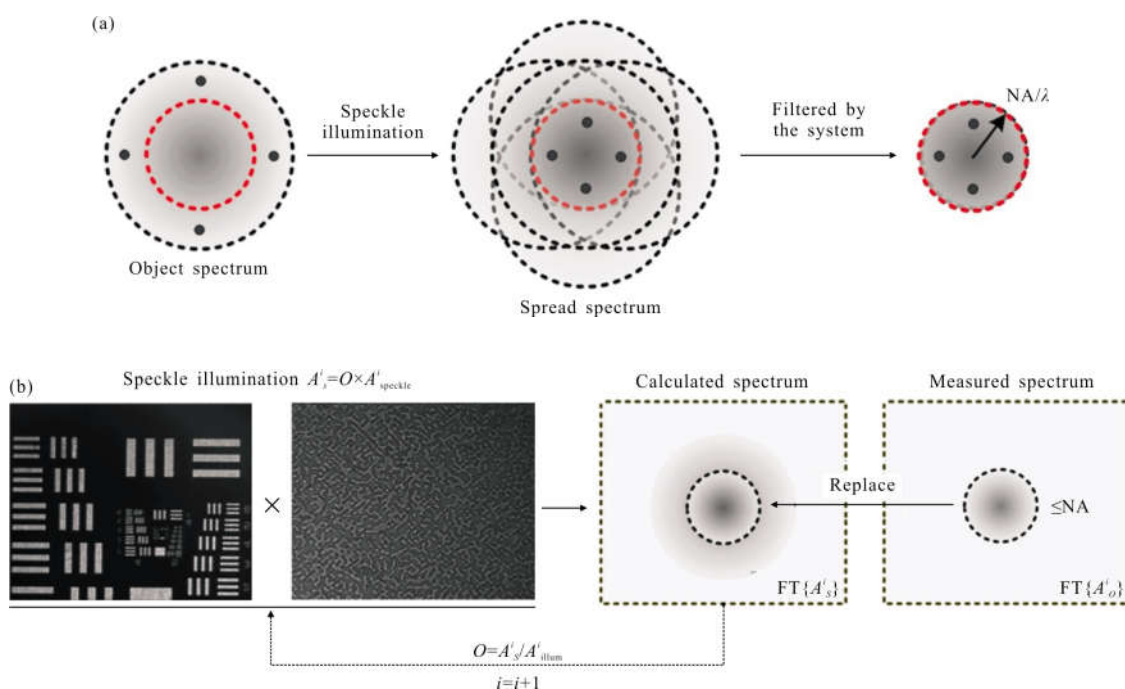


图 9 基于散斑照明的 DHM 的迭代重建过程

Fig.9 Iterative reconstruction process of DHM with speckle illumination

改进的迭代方式不仅提高了分辨率，而且通过对不同迭代次序得到的物光复振幅进行平均还可以提高再现像的信噪比(Signal to Noise Ratio, SNR)。

2 单光束相位成像方式

传统的 DHM 具有很高的相位测量精度,但是它需要使用参考光,故成像装置较为复杂,且抗环境干扰性差。近年来,单光束相位成像技术异军突起,逐渐成为 QPM 的重要技术之一。单光束相位成像技术在研究特殊光束本身的相位分布、成像系统畸变补偿、自适应成像等方面发挥着越来越重要的作用,下面着重介绍单光束相位显微成像中分辨率增强技术。

2.1 傅里叶叠层显微成像

傅里叶叠层显微成像 (Fourier Ptychography Microscopy, FPM)^[29] 是以空域叠层成像技术^[30] (Ptychography)为基础发展起来的单光束相位成像技术。Ptychography 这个词最早是由 Walter Hoppe 等人^[31]在 1969 年构造用来表示通过卷积定理实现相位恢复目的所提出的。Ptychography^[30]通过移动一聚焦光束照明样品的不同部位,同时记录所得的衍射图像,最终利用迭代算法从这一系列衍射图像中恢

复样品的复振幅信息(相位信息)。与 Ptychography 相比,FPM 引入了“角度复用”的概念(与离轴照明 DHM 类似),不同角度的照明光束扩大了成像系统对物光频谱的收集能力^[32-33];因此 FPM 可以通过记录不同照明角度下的低分辨率图像,最后结合迭代算法恢复出高分辨率和高空间带宽积的振幅和相位图像。

FPM 成像装置^[29]如图 10 所示,样品放置于物镜的前焦平面处,通过控制 LED 阵列中不同位置处 LED 的“开”与“关”来实现不同方向的照明。图 10(a) FPM 成像示意图;图 10(b)使用不同照明角度合成频谱分布,中央红色圆域是垂直照明时频谱分布,白色圆域是倾斜照明时频谱分布,绿色圆域是最终合成的频谱范围;图 10(c1)实验所用样品;图 10(c2)利用 20X 显微物镜拍摄的图像(与图 10(b)中红色区域内频谱相对应)。每两个相邻光源之间的距离需要设置的足够接近,以保证两次相邻照明所得的衍射图像具有 60%的覆盖率。不同位置处的 LED 照射样品后记录的一系列低分辨率的衍射图像如图 10(c3)、(c4)所示;随后,利用一迭代算法最终可以获得高分辨率图像,如图 10(c5)所示。对比图 10(c5)和(c2),可以清晰地看

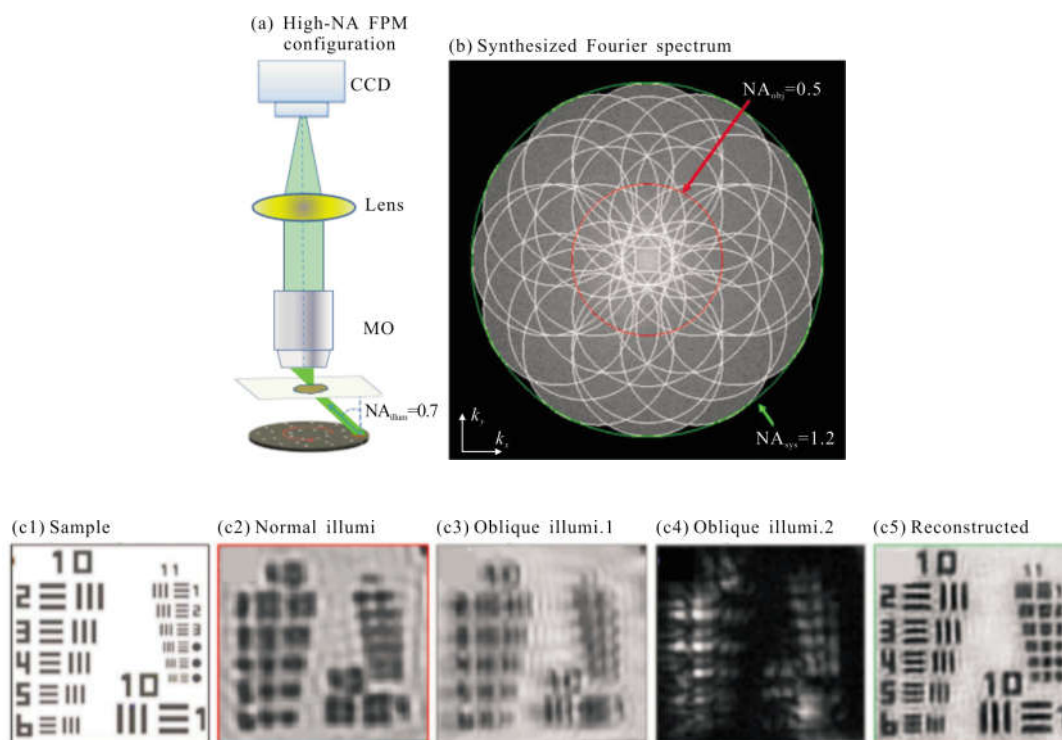


图 10 傅里叶叠层显微成像原理

Fig.10 Theory of FPM

出 FPM(采用多角度倾斜照明)提高了成像分辨率。

需要注意的是, FPM 通过记录一系列低分辨率的衍射图样来实现空间带宽积的增加, 获取时间通常是以分钟为单位的, 在此过程中牺牲了时间分辨率。为了能够研究动态样品, 则需要更快的捕获时间^[34]。为了达到这种目的, 国外学者可以利用声控/电控光栅^[35]、源编码 LED 阵列来提高图像的获取速度; 同时, 利用一种改进的迭代算法^[34-36]来提高图像重构速度。此外, 为了更多程度的提高成像分辨率, 还可以采用浸油聚光镜来增大照明角度^[37]。除了使用 LED 阵列外, 也可以通过固定光束照射横向平移的样品来提高相位成像的分辨率^[38]。与不同 LED 产生的离轴照明类似, 汇聚光束在不同位置处具有相同的相位梯度, 可以将样品的高频分量移向低频分量, 最终产生合成数值孔径。近年来, 人们还将 FPM 与荧光显微相结合来实现多模式显微成像^[39]。

与 FPM 较为类似, 相干衍射成像 (Coherent Diffraction Imaging, CDI)^[40-42] 也是一种用迭代算法, 直接从所记录的物体散射斑恢复物体强度和相位的成像技术。不同的是, CDI 不使用物镜, 直接利用一

发散或聚焦的光束照明样品的局部。通过移动样品得到不同的衍射强度图像, 再利用一迭代算法再现出样品的相位分布。此外, CDI 和 X 射线相结合在材料学和生物学方面得到了广泛应用。

2.2 基于结构照明的单光束相位成像技术

基于结构照明的单光束相位成像^[43]利用不同的调制图像(复振幅分布已知)照明样品, 通过记录样品在不同散斑照明下的衍射图像, 不但可以再现出样品的复振幅分布, 还可以实现分辨率的提高。其光路示意图如图 11 所示: 从半导体激光器发出的激光经由透镜 L_1 和透镜 L_2 组成的望远镜系统扩束准直成平面波, 然后通过偏振片 P 变为水平线偏振光。水平线偏振的平面波经过分光棱镜 BS 后正入射在一个纯相位 SLM 上。通过在空间光调制器上加载不同的灰度图样(条纹结构图样、随机结构图样)可以调制入射光场生成相应的结构照明光。结构照明光经望远镜系统(L_3 - MO_1)缩束后成像到样品表面。在该调制光照明下, 样品被由物镜 MO_2 和透镜 L_4 组成的望远镜系统放大成像。CCD 在偏离像面的位置记录样品在不同结构照明条件下的衍射光斑。该技术再

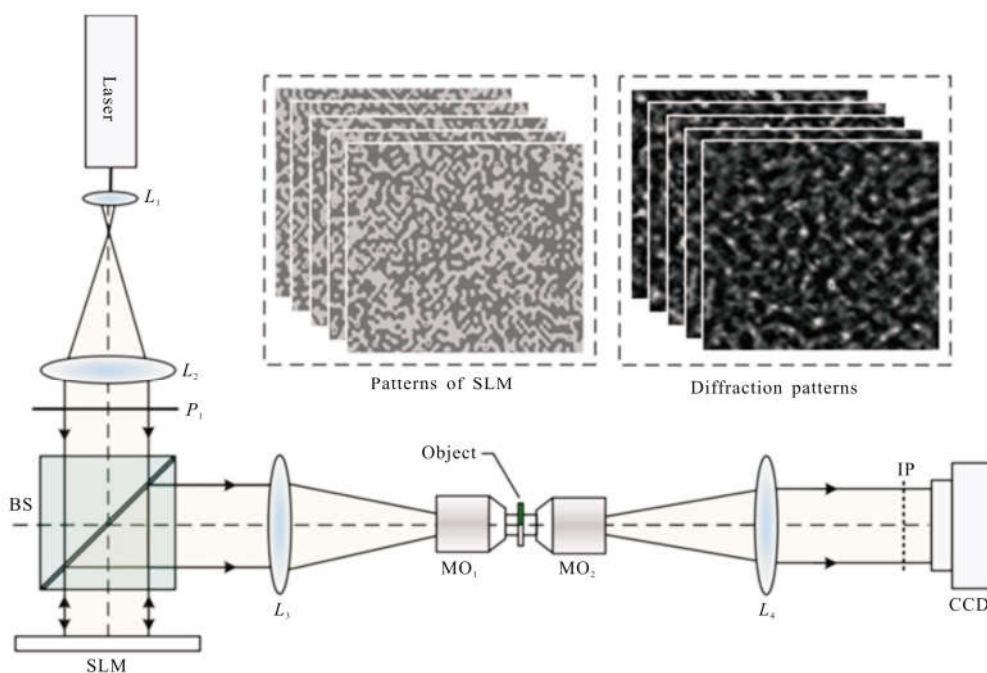


图 11 基于结构照明的单光束相位成像光路

Fig.11 Single-beam phase microscopy with structured illumination

现出被测样品的相位分布的同时，也提高了相位成像的空间分辨率。

实验上采用蚊子翅膀作为相位物体，记录了 8 幅随机结构照明下的衍射图样，其中 5 幅图样如图 12(b) 所示。利用迭代方法，再现出蚊子翅膀的相位分布图 12(c) 所示。实验结果表明，该方法不仅可以对连

续相位物体进行成像，还可以对跃变相位物体(如相位台阶)成像。此外，随机结构照明光可以看作无数个不同方向的平面波相干叠加而成。在随机结构照明下，不同方向的平面波将物光的高频分量向零频方向移动，并通过系统的有效数值孔径。因此，基于结构照明的单光束相位成像技术可以提高相位成像

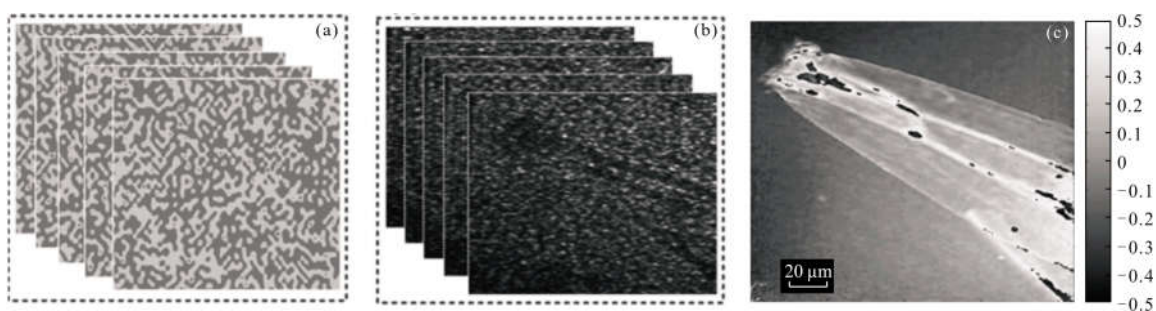


图 12 基于调制照明的单光束相位显微成像。(a) 在 SLM 上加载的随机结构图样；(b) 在不同随机结构照明下的衍射图样；(c) 再现相位分布

Fig.12 Single-beam phase microscopy with modulated illumination. (a) Random illumination patterns loaded on SLM; (b) Diffraction patterns under different illumination patterns; (c) Reproduction phase distribution

的空间分辨率。

2.3 合成孔径片上相位显微技术

片上相位显微(Phase microscopy on chip)技术将待测样品会放置在 CCD/CMOS 芯片前的保护玻璃

上(距离成像芯片的距离 ≤ 1 mm), 通过记录样品在不同照明方向下的衍射图样可以实现相位成像。由于不存在额外的成像系统，片上相位显微的空间分辨率直接取决于 CCD/CMOS 的像素大小(一个或几

个微米)。因此,片上相位显微技术对应的空间分辨率接近于采用 0.25 NA 物镜的对应的空间分辨率。虽然通过减小像素尺寸可以提高空间分辨率,但也会降低信噪比。为了解决分辨率和信噪比之间的矛盾,海内外学者提出了亚像素成像技术,并被成功的应用到片上显微^[44-45]。

亚像素技术是通过沿水平方向和垂直方向移动样品或 CCD,在每次横向移动量小于一个像素的多小(如 1/2 pixel)。通过记录每次横向移动样品/CCD 时样品的衍射图像,最后将全部所得图形组合起来可以得到一幅具有亚像素分辨率的图像。值得注意的是,在基于卷积的重建算法中,除了移动待测样品

和相机以外,还可以通过移动照明来减少有效像素大小^[47-48]。

合成孔径片上显微的装置如图 13 所示^[46],该装置利用声光可调谐滤波器对宽频带光源(WhiteLase-Micro; Fianium Ltd, Southampton, UK) 进行滤波,滤波后的光谱带宽约为 2.5 nm。该光源发出的光被耦合为单模光纤,光纤的另一端被安装在旋转臂上,旋转臂的旋转轴与数字传感器芯片的平面严格对准,用来提供像素超分辨的横向光源位移,同时,也会将 CMOS(color sensor, Sony Corp, Tokyo, Japan, 像素大小为 1.2 μm) 安装在旋转座上来实现横向平面内旋转。光纤与 CMOS 之间的距离为 7~11 cm,且样品放

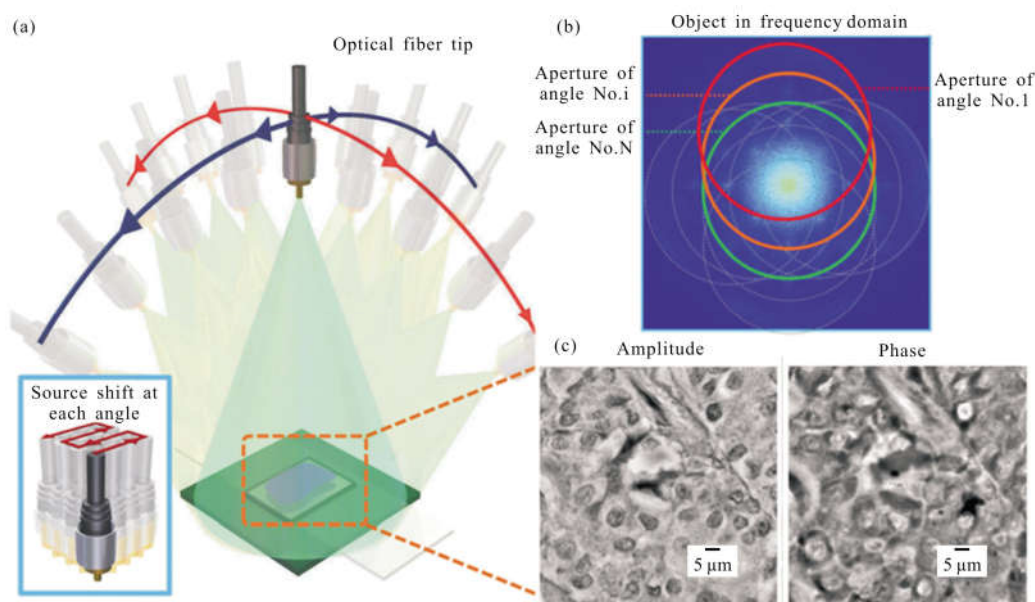


图 13 合成孔径片上相位显微成像原理。(a)片上相位显微成像装置示意图;(b)利用合成孔径相位恢复算法得到的频域范围,不同颜色的圆域是指不同角度对应的频域大小;(c)最终恢复待测样品的振幅和相位

Fig.13 Principle of on-chip microscopy with synthetic aperture. (a) Set-up of on-chip microscopy; (b) Frequency domain range obtained by using the synthetic aperture phase recovery algorithm, and the circle domain of different colors refers to the frequency domain size corresponding to different angles; (c) Recovered amplitude and phase of sample

置在图像传感器上方 100~500 μm 处。通过电动装置控制机械臂使得光源依次发生 0.1~0.2 mm 的横向位移量,同时记录每个光源位置所对应的衍射图像。通过以 10°为增量不断重复这一过程,使得光纤照明在两个正交方向上具有-50°~50°的视场角。然而,通过迭代可以恢复被测样品的相位分布。

实验中,利用片上相位显微技术对苏木精和伊

红染色的乳腺癌细胞进行成像。所用图像传感器的整个可探测区域为 20.5 mm^2 (视场范围);实验上利用 22 个不同的光照角度来照明样品(以 10°为增量,沿着两个正交的方向覆盖-50°~50°)。通过 5~10 个迭代过程,恢复出来的振幅和相位分布如图 13(c)所示。与之前提到的数字全息显微结构相似,片上相位显微也采用了合成孔径的方式来提高分辨率。通过光

源的亚像素移动来提高 CCD/CMOS 的空间采样能力, 或利用改变照明角度实现合成孔径来提高分辨率。在这种情况下, 需要记录 16~64 幅衍射图样(x 和 y 方向上各有 11 个角度)来实现超分辨成像。由于片上相位显微成像技术具有结构简单、实用性强等优点, 到目前为止已经被广泛应用于多个方面, 其中包括荧光成像^[49], 结构光照明成像^[50]、彩色全息成像^[45], 同时结合深度学习作为细胞培养和水性寄生虫的观察工具^[51], 以及基于提高轴向分辨率的精子细胞三维轨迹跟踪技术^[52]。

3 结 论

文中综述了相位成像中分辨率增强方式的研究现状, 重点介绍了对微观物体的相位成像方式。相位成像技术一般包括: (1) 基于干涉方法的双光束定量相位显微(QPM); (2) 基于衍射的单光束相位显微技术。后

者可以通过采用不同的约束条件将物光的相位分布转换为强度变化, 通过记录这些强度分布来重构物光相位分布。这两种相位显微技术的分辨率增强是通过利用一个扩大的等效数值孔径的方法来实现的。具体而言, 可以通过移动样品和 CCD、采用离轴照明、结构光照明、散斑照明、或在成像装置中使用光栅来实现。

在表 1 中粗浅地比较了不同相位显微分辨率增强技术在相位精度、速度、成像信噪比、空间分辨率、和成像视场上的优劣。基于光学干涉的 DHM, 相比于其他三种单光束相位显微技术, 具有更高的相位精度, 为此付出了光路复杂、对环境要求高等代价。基于离轴照明和结构光照明的 DHM 可通过采用稀疏的、对称的照明, 在 4 个或 9 个方向进行频谱拼接得到超分辨的相位成像, 具有较快的成像速度。后面四种相位成像技术需要更多次照明来实现相位成像和各个方向上的分辨率增强, 与此同时, 具有较低的散斑噪

表 1 不同分辨率增强相位成像技术的比较

Tab.1 Comparison of different resolution-enhanced QPM approaches

Technologies	Phase accuracy	Velocity	SNR	Resolution	FOV
DHM with off-axis illumination	***	***	*	***	*
DHM with structured illumination	***	***	*	***	*
DHM with speckle illumination	***	*	***	***	*
Fourier phychography microscopy	*	*	***	***	*
Single-beam QPM with structured illumination	*	*	***	***	*
On-chip phase microscopy	*	*	***	*	***

声或更高的信噪比。此外, 相对于片上相位显微技术, 前五种相位显微技术利用物镜来对样品进行放大成像, 具有更高的分辨率和更小的成像视场。

不同相位显微分辨率增强技术的共同点在于: 大视场下增加分辨率确实增加了成像系统的空间带宽积, 是以牺牲其时间分辨率为代价的。而随着场调制技术(强度和相位调制)和成像设备(例如该用 CMOS/CCD 相机)的快速发展, 以及多路复用的发展, 时间分辨率有得到显著的提高。

参考文献:

[1] Platt B C, Shack R. History and principles of Shack – Hartmann wavefront sensing [J]. *Journal of Refractive*

Surgery, 2001, 17(5): S573–S580.
 [2] Bon P, Maucort G, Wattellier B, et al. Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells [J]. *Optics Express*, 2009, 17(15): 13080–13094.
 [3] Wei Q, Li Y, Vargas J, et al. Principal component analysis-based quantitative differential interference contrast microscopy [J]. *Optics Letters*, 2019, 44(1): 45–48.
 [4] Cuhe E, Bevilacqua F, Depeursinge C. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging [J]. *Optics Letters*, 1999, 24(5): 291–293.
 [5] Waheb B, Ting-Wei S, 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.
 [6] Kyoohyun K, Hyeok Y, Monica D S, et al. High-resolution

- three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(1): 011005–011018.
- [7] Marquet P, Depeursinge C, Magistretti P J. Review of quantitative phase-digital holographic microscopy: promising novel imaging technique to resolve neuronal network activity and identify cellular biomarkers of psychiatric disorders [J]. *Neurophotonics*, 2014, 1(2): 020901–020915.
- [8] Mitchison J M. Single cell studies of the cell cycle and some models [J]. *Theoretical Biology & Medical Modelling*, 2005, 2(1): 4–9.
- [9] Bedrossian M, Lindensmith C, Nadeau J L. Digital holographic microscopy, a method for detection of microorganisms in plume samples from enceladus and other icy worlds [J]. *Astrobiology*, 2017, 17(9): 913–925.
- [10] Hsu W C, Su J W, Chang C C, et al. Investigating the backscattering characteristics of individual normal and cancerous cells based on experimentally determined three-dimensional refractive index distributions [C]//SPIE, 2012, 8553: 85531O.
- [11] Lee S Y, Park H J, Kim K, et al. Refractive index tomograms and dynamic membrane fluctuations of red blood cells from patients with diabetes mellitus [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1039.
- [12] Haifler M, Girshovitz P, Dardikman G, et al. Interferometric phase microscopy for label-free morphological evaluation of sperm cells [J]. *Fertility and Sterility*, 2015, 104(1): 43–47.
- [13] Shaked N T, Satterwhite L L, Telen M J, et al. Quantitative microscopy and nanoscopy of sickle red blood cells performed by wide field digital interferometry [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(3): 030506.
- [14] Mico V, Zalevsky Z, García J. Common-path phase-shifting digital holographic microscopy: A way to quantitative phase imaging and superresolution [J]. *Optics Communications*, 2008, 281(17): 4273–4281.
- [15] Jiang H Z, Zhao J L, Di J L, et al. Numerically correcting the joint misplacement of the sub-holograms in spatial synthetic aperture digital Fresnel holography [J]. *Optics Express*, 2009, 17(21): 18836–18842.
- [16] Schwarz C J, Kuznetsova Y, Brueck S R J. Imaging interferometric microscopy [J]. *Optics Letters*, 2003, 28(16): 1424–1426.
- [17] Yuan C, Situ G, Pedrini G, et al. Resolution improvement in digital holography by angular and polarization multiplexing [J]. *Applied Optics*, 2011, 50(7): B6–B11.
- [18] Mico V, Zalevsky Z, Garcia-Martinez P, et al. Single-step superresolution by interferometric imaging [J]. *Optics Express*, 2004, 12(12): 2589–2596.
- [19] Hillman T R, Gutzler T, Alexandrov S A, et al. High-resolution, wide-field object reconstruction with synthetic aperture Fourier holographic optical microscopy [J]. *Optics Express*, 2009, 17(10): 7873–7892.
- [20] Micó V, Zalevsky Z, Ferreira C, et al. Superresolution digital holographic microscopy for three-dimensional samples [J]. *Optics Express*, 2008, 16(23): 19260–19270.
- [21] Chowdhury S, Izatt J. Structured illumination quantitative phase microscopy for enhanced resolution amplitude and phase imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(10): 1795–1805.
- [22] Gao P, Pedrini G, Osten W. Structured illumination for resolution enhancement and autofocusing in digital holographic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(8): 1328–1330.
- [23] Gao P, Yao B L, Min J W, et al. Autofocusing of digital holographic microscopy based on off-axis illuminations [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(17): 3630–3632.
- [24] Goodman J. *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications* [M]. American: Roberts & Company, 2006.
- [25] Tiziani H J, Pedrini G. From speckle pattern photography to digital holographic interferometry [Invited] [J]. *Applied Optics*, 2013, 52(1): 30–44.
- [26] García J, Zalevsky Z, Fixler D. Synthetic aperture superresolution by speckle pattern projection [J]. *Optics Express*, 2005, 13(16): 6073–6078.
- [27] Park Y, Choi W, Yaqoob Z, et al. Speckle-field digital holographic microscopy [J]. *Optics Express*, 2009, 17(15): 12285–12292.
- [28] Zheng J J, Gao P, Yao B L, et al. Digital holographic microscopy with phase-shift-free structured illumination [J]. *Photonics Research*, 2014, 2(3): 87–91.
- [29] Ou X, Horstmeyer R, Zheng G, et al. High numerical aperture Fourier ptychography: Principle, implementation and characterization [J]. *Optics Express*, 2015, 23(3): 3472–3491.
- [30] Faulkner H M L, Rodenburg J. Movable aperture lensless transmission microscopy: A novel phase retrieval algorithm [J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(2): 023903.
- [31] Hoppe W. Beugung im inhomogenen Primärstrahlwellenfeld. I.

- Prinzip einer phasenmessung von elektronenbeugungsinterferenzen[J]. *Acta Crystallographica*, 1969, 25(4): 495–501.
- [32] Ou X, Horstmeyer R, Yang C, et al. Quantitative phase imaging via Fourier ptychographic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(22): 4845–4848.
- [33] Zheng G A, Horstmeyer R, Yang C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy [J]. *Nature Photonics*, 2013, 7: 739–745.
- [34] Tian L, Liu Z, Yeh L–H, et al. Computational illumination for high-speed in vitro Fourier ptychographic microscopy [J]. *Optica*, 2015, 2(10): 904–911.
- [35] He X, Liu C, Zhu J. Single-shot Fourier ptychography based on diffractive beam splitting [J]. *Optics Letters*, 2018, 43(2): 214–217.
- [36] Tian L, Li X, Ramchandran K, et al. Multiplexed coded illumination for Fourier ptychography with an LED array microscope [J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(7): 2376–2389.
- [37] Sun J S, Zuo C, Zhang L, et al. Resolution-enhanced Fourier ptychographic microscopy based on high-numerical-aperture illuminations [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:1187.
- [38] Maiden A M, Humphry M J, Zhang F, et al. Superresolution imaging via ptychography [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2011, 28(4): 604–612.
- [39] Thibault P, Menzel A. Reconstructing state mixtures from diffraction measurements [J]. *Nature*, 2013, 494:68.
- [40] Fienup J R. Reconstruction of an object from the modulus of its Fourier transform [J]. *Optics Letters*, 1978, 3(1): 27–29.
- [41] Liu Cheng, Pan Xingchen. Coherent diffractive imaging based on the multiple beam illumination with cross grating[J]. *Acta Physica Sinica*, 2013, 62(18): 184204.
- [42] Fan Jiadong, Jiang Huaidong. Coherent X–ray diffraction imaging and its applications in materials science and biology [J]. *Acta Physica Sinica*, 2012, 61(21): 218702.
- [43] Gao P, Pedrini G, Zuo C, et al. Phase retrieval using spatially modulated illumination [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(12): 3615–3618.
- [44] Zhang Jianlin, Sun Jiasong, Chen Qian, et al. Adaptive pixel-super-resolved lensfree in-line digital holography for wide-field on-chip microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11777. (in Chinese)
- [45] Wu Y, Zhang Y, Luo W, et al. Demosaiced pixel super-resolution for multiplexed holographic color imaging [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28601.
- [46] Luo W, Greenbaum A, Zhang Y, et al. Synthetic aperture-based on-chip microscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2015, 4: e261.
- [47] Stockmar M, Cloetens P, Zanette I, et al. Near-field ptychography: phase retrieval for inline holography using a structured illumination [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1927.
- [48] Claus D, Rodenburg J M. Pixel size adjustment in coherent diffractive imaging within the Rayleigh-Sommerfeld regime [J]. *Applied Optics*, 2015, 54(8): 1936–1944.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] Rivenson Y, Göröcs Z, Günaydin H, et al. Deep learning microscopy [J]. *Optica*, 2017, 4(11): 1437–1443.
- [52] Su T, Xue L, Ozcan A. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories 2012[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7: 739–745.