



计算光学相位成像: 从干涉数字全息到光强衍射层析

左超^{1,2,3*}, 陈钱^{3*}

1. 南京理工大学电子工程与光电技术学院, 智能计算成像实验室, 南京 210094;

2. 南京理工大学智能计算成像研究院, 南京 210019;

3. 江苏省光谱成像与智能感知重点实验室, 南京 210094

* 联系人, E-mail: zuochao@njust.edu.cn; chenqian@njust.edu.cn

Computational optical phase imaging: From digital holographic interferometry to intensity diffraction tomography

Chao Zuo^{1,2,3*} & Qian Chen^{3*}

¹ Smart Computational Imaging Laboratory (SCILab), School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science & Technology, Nanjing 210094, China;

² Smart Computational Imaging Research Institute (SCIRI), Nanjing University of Science & Technology, Nanjing 210019, China;

³ Jiangsu Key Laboratory of Spectral Imaging & Intelligent Sense, Nanjing 210094, China

* Corresponding authors, E-mail: zuochao@njust.edu.cn; chenqian@njust.edu.cn

doi: 10.1360/TB-2023-0706

自400多年前问世以来, 光学显微技术经历了不断地革新, 已从Leeuwenhoek时代简单的单透镜装置发展成为一种极为重要且精密的观察与计量科学仪器, 广泛地应用于生物医学、工业生产、材料化工与科学研究等领域。2014年, 诺贝尔化学奖授予了超分辨率荧光显微技术^[1]。该技术突破了光学显微镜衍射极限的限制, 将荧光显微成像的分辨率带入纳米时代, 极大地推动了生命科学和基础医学的发展。

除分辨率外, 光学显微镜面临的另一大挑战是对比度。传统显微镜受强度(振幅)探测机理所限, 对无色透明物体(如细胞)的成像依赖染色标记。而在研究活细胞的生理活动及其长时程动态过程时, 无标记显微是一种最为理想的探测手段。1932年, Zernike发明了相差显微镜: 通过空间滤波原理极大地提高了透明物体在镜下的可分辨性, Zernike也因此获得1953年的诺贝尔物理学奖^[2]。但时至今日, 该技术仍局限于二维定性观测, 无法实现三维定量测量, 发展较荧光显微技术明显滞后。

时至今日, Zernike的思想仍然给人们带来源源不断的感悟和启发, 新型的无标记显微技术不断涌现, 其中定量相位成像可以说是其中最前景的技术之一^[3]。通过将定量相位成像与计算机断层扫描技术相结合, 还可以实现三维衍射层析, 获得样品内部的真三维折射率分布, 这对揭示细胞生物学、病理生理学的本征机制具有重要意义(图1(a))。然而半个多世纪以来, 相位定量测量仍与激光和干涉密不可分。想要

实现衍射层析, 必须借助干涉数字全息技术获取样品不同角度下的相位分布再进行频谱合成。但复杂的干涉与扫描装置、散斑噪声与相干衍射极限等固有缺陷, 长期以来无法从根本上得到解决, 成为干涉全息技术在生物显微成像领域广泛应用的关键阻碍。

10余年来, 本团队在国际上率先开展计算光学相位成像的系列研究工作, 围绕部分相干光场下相位广义定义、相位传递函数、空间带宽积提升以及光强衍射层析等理论与关键技术开展理论与技术攻关, 形成了非干涉定量相位与衍射层析成像创新理论与方法。虽然相位物体无法直接观察得到, 但它们却无时无刻不在强调着自身的存在。夜晚闪烁的星空、雨天车窗外扭曲的视野, 以及晴天游泳池底明暗相间的网络结构, 这些常见的情景都蕴含了相位与光强之间千丝万缕的联系。当照明光场为完全相干时, 传统标量衍射理论足以准确描述光场在自由空间的传输及其在任意平面上的复振幅分布。其对应的逆问题可以由Gerchberg-Saxton(GS)、混合输入输出算法(hybrid input-output, HIO)等相位恢复法迭代求解, 也可以在傍轴近似下通过光强传输方程(transport of intensity equation, TIE)直接求解^[4]。然而, 这些相位恢复技术所依赖的光强正向模型仍基于相干照明假设, 且部分相干光场具有随机涨落的统计性质, 无法仅通过二维复振幅函数完整描述, 因此也就没有明确适定的相位定义。

(1) 从完全相干照明到部分相干照明。针对上述问题, 我

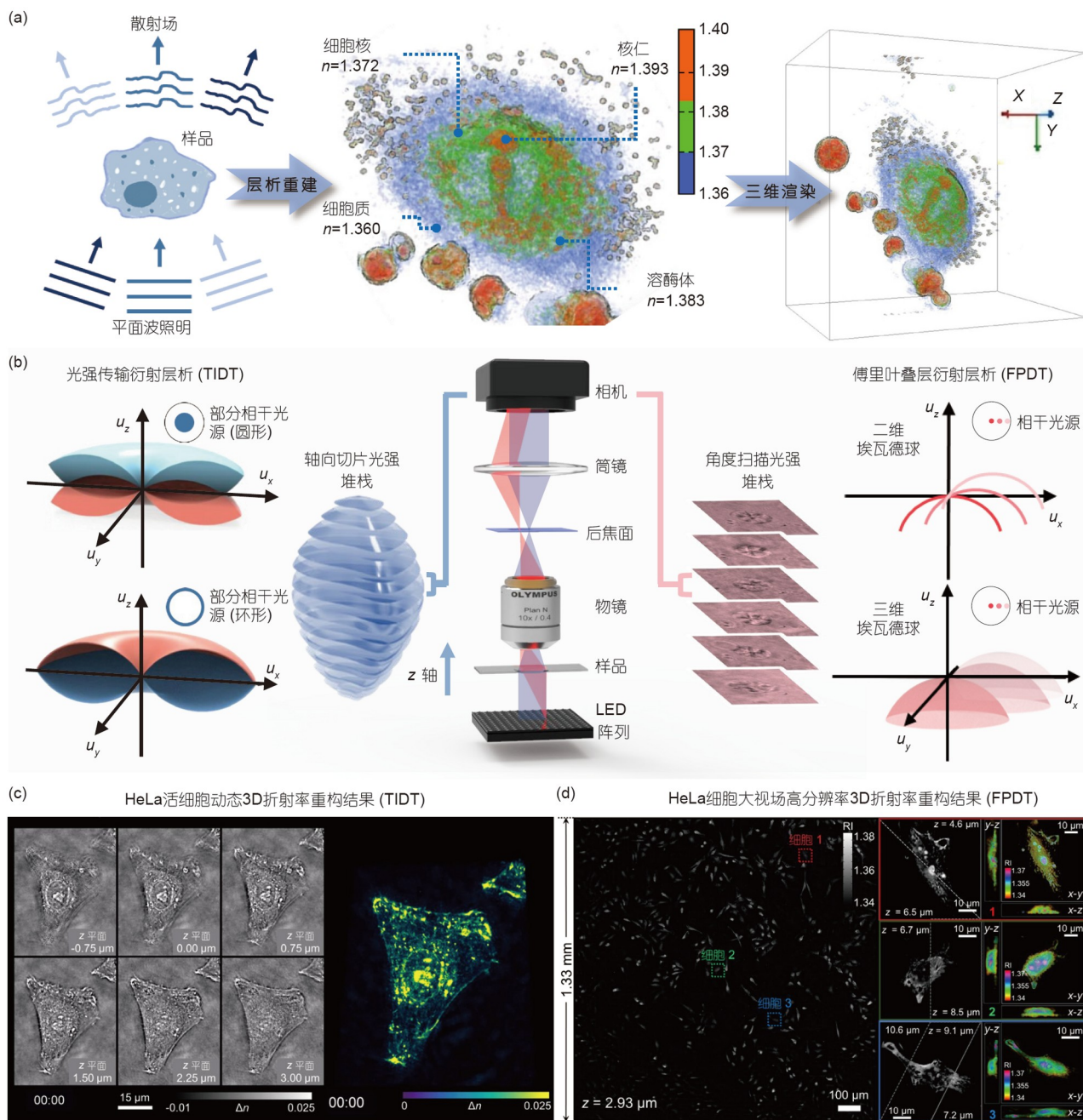


图 1 基于光强衍射层析的无标记三维显微成像。(a) 借助于光学衍射层析, 可重建样品的三维折射率分布, 实现生物样本的非侵入式三维可视化。(b) 光强传输衍射层析(TIDT)和傅里叶叠层衍射层析(FPDT)。(c) 采用TIDT实现HeLa活细胞动态3D折射率成像。(d) 采用FPDT实现HeLa细胞大视场高分辨率3D折射率成像

Figure 1 Label-free 3D microscopy based on intensity diffraction tomography. (a) With the help of optical diffraction tomography, the 3D refractive index (RI) distribution of the sample can be reconstructed, enabling non-invasive 3D visualization of biological samples. (b) Transport of intensity diffraction tomography (TIDT) and Fourier ptychographic diffraction tomography (FPDT). (c) Dynamic 3D RI imaging of HeLa live cells using TIDT. (d) High-resolution, large field-of-view 3D RI imaging of HeLa cells using FPDT

们建立了部分相干光场的广义光强传输方程。基于相空间光学的维格纳分布函数, 给出了部分相干光场广义相位的严格定义^[5]。广义相位为标量势函数, 其梯度为部分相干光场维格纳分布函数的一阶条件空间频率矩, 从而将光强传输方程的

适用性从完全相干光波场拓展到了任意相干态的光波场。基于无界空间中的坡印廷定理, 严格证明了在非齐次Neumann边界条件下方程解的存在性和唯一性^[6], 克服了长期以来光强传输方程难以获得精确解的理论难题^[7]; 为定量相位成像

从干涉走向非干涉,由完全相干照明到部分相干照明奠定了理论基础。

(2) 从相干衍射极限到非相干衍射极限. 将定量相位成像技术由完全相干照明拓展到部分相干照明的另一大优势在于其固有的合成孔径效应所带来的成像分辨率提升. 经典傅里叶光学理论揭示了非相干光学传递函数是相干传递函数(光瞳函数)的归一化自相关,截止频率可达到相干衍射极限的两倍. 然而,该结论无法对介于完全相干与非相干之间的部分相干照明下的相位成像特性进行定量描述. 此外,随着相干性的降低,非相干成像系统退化为光强的线性系统,也就无法对相位物体成像. 针对上述问题,我们发展了部分相干照明下的相位传递函数理论^[8],揭示了传统圆形照明孔径下相位传递函数的截止频率与响应幅度二者间的相互制约关系,验证了匹配物镜数值孔径的环形照明能够在保持最优响应幅度的前提下,有效地将复光学传递函数虚部的支持域拓展到物镜数值孔径对应截止频率的两倍^[9,10]. 基于此,我们提出了基于环形照明孔径的光强传输定量相位成像方法,将定量相位成像的分辨率从相干衍射极限拓展到非相干衍射极限.

(3) 从离焦相位重建到叠层带宽拓展. 光强传输方程与光学传递函数理论的“联姻”赋予了定量相位成像技术更高的自由度. 部分相干照明下的光学传递函数是个复函数,想要实现定量相位成像,必须使传递函数中产生虚部成分. 在光强传输方程中,传递函数的虚部由成像系统的离焦(复瞳函数)所产生. 而打破成像系统的径向对称性,也可采用非对称照明或非对称孔径,例如差分相衬显微成像与傅里叶叠层成像^[11],它们同样可以在传递函数中引入虚部成分. 沿着这个思路,我们推导了非对称照明相位传递函数,揭示了傅里叶叠层成像系统中照明/探测数值孔径比与成像空间带宽积之间的内在关系,将照明光的大数值孔径“转嫁”于低倍率的物镜之上,利用照明数值孔径与物镜数值孔径之间的倍差拓展成像系统的空间带宽积^[12,13],构建了基于高数值孔径可编程聚光镜的傅里叶叠层显微成像系统. 利用油浸聚光镜照明在10×物镜大视野下,实现了等效数值孔径为1.6的超分辨、高通量成像^[12],揭示了傅里叶叠层定量相位成像所依赖的匹配照明条件限制,提出了基于环形照明的高速傅里叶叠层定量相位成像方法,实现了高速、长时程、相差自适应校正的高通量相位成像^[14,15].

(4) 从定量相位成像到三维衍射层析. 光强传输方程与傅里叶叠层成像虽有效克服了定量相位成像的干涉性,但想要实现三维层析,传统方法仍局限于“先相位恢复,再衍射层析”的“分步分治”思想. 近5年来,本团队逐渐将研究的重点由相位成像转到衍射层析,探索出了一类全新的非干涉无标记三维显微成像技术——光强衍射层析. 其将“从强度恢复相位”与“从相位重建折射率”二者有机结合起来,跨越了相位测量这一中间步骤,仅通过照明角度扫描或轴向扫描样品产生的强度信息直接反演物体的三维折射率分布. 因此,从实现方式上,光强衍射层析显微术可以分为基于轴向扫描的光强传输衍射层析(transport of intensity diffraction tomography, TIDT)^[8,16]以及基于照明角度扫描的傅里叶叠层衍射层析(Fourier ptychographic diffraction tomography, FPDt)^[17,18](图1(b)). 前者将光强传输方程的二维面传输拓展为三维体传输,采用部分相干照明实现物体三维散射势频谱的并行化覆盖,实现了横向分辨率为206 nm、轴向分辨率为520 nm的无标记三维成像(图1(c)). 后者将傅里叶叠层成像的孔径二维面叠层拓展为三维体叠层,在一阶Born与Rytov近似下,推导出明场与暗场照明下的光强图像生成模型及其与物体三维散射势间的定量关系,基于高数值孔径暗场照明,在10×物镜的大视野下,实现了横向分辨率为390 nm、轴向分辨率为899 nm、景深范围为~20 μm的高通量、无标记三维衍射层析成像(图1(d)).

计算光学定量相位成像与光强衍射层析技术的出现与发展标志着基于相位检测的无标记显微成像技术已步入一个崭新阶段:严格的相干和干涉测量不再是定量相位成像与光学衍射层析的先决条件. 其有望为传统显微镜打开崭新的视野,为新一代无标记三维显微技术开辟崭新的途径,并在生命科学与生物医学的各个分支领域得到广泛应用. 此外,该项技术未来仍面临一系列问题与挑战亟待进一步探究,例如:TIDT与FPDt相互结合突破匹配照明条件限制^[19],超越Born与Rytov近似下的多层、多次散射样品的正向模型优化^[20],埃瓦德球内的频谱缺失锥与轴向支持域拓展^[21]等. 此外,将光强衍射层析与三维荧光超分辨显微成像技术相结合,有望为单细胞和亚细胞水平上观察活细胞内纳米尺度的细节打开新的窗口,并为单细胞形态学与动力学分析、细胞相互作用、细胞反应、无标记病理诊断等应用领域提供更多的知识与更深的见解.

致谢 感谢国家自然科学基金(62227818, U21B2033)、江苏省基础研究计划前沿引领专项(BK20192003)、江苏省科技计划生物医药竞争类项目(BE2022847)和江苏省科技计划重点国别产业技术研发合作项目(BZ2022039)资助。

推荐阅读文献

- Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 72–84

- 2 Zernike F. How I discovered phase contrast. [Science](#), 1955, 121: 345–349
- 3 Park Y K, Depeursinge C, Popescu G. Quantitative phase imaging in biomedicine. [Nat Photonics](#), 2018, 12: 578–589
- 4 Teague M R. Deterministic phase retrieval: A Green's function solution. [J Opt Soc Am](#), 1983, 73: 1434–1441
- 5 Zuo C, Chen Q, Tian L, et al. Transport of intensity phase retrieval and computational imaging for partially coherent fields: The phase space perspective. [Optics Lasers Eng](#), 2015, 71: 20–32
- 6 Zuo C, Chen Q, Li H, et al. Boundary-artifact-free phase retrieval with the transport of intensity equation II: Applications to microlens characterization. [Opt Express](#), 2014, 22: 18310
- 7 Zhang J, Chen Q, Sun J, et al. On a universal solution to the transport-of-intensity equation. [Opt Lett](#), 2020, 45: 3649–3652
- 8 Zuo C, Li J, Sun J, et al. Transport of intensity equation: A tutorial. [Optics Lasers Eng](#), 2020, 135: 106187
- 9 Zuo C, Sun J, Li J, et al. High-resolution transport-of-intensity quantitative phase microscopy with annular illumination. [Sci Rep](#), 2017, 7: 7654
- 10 Li J, Chen Q, Sun J, et al. Optimal illumination pattern for transport-of-intensity quantitative phase microscopy. [Opt Express](#), 2018, 26: 27599
- 11 Zheng G, Shen C, Jiang S, et al. Concept, implementations and applications of Fourier ptychography. [Nat Rev Phys](#), 2021, 3: 207–223
- 12 Sun J, Zuo C, Zhang L, et al. Resolution-enhanced Fourier ptychographic microscopy based on high-numerical-aperture illuminations. [Sci Rep](#), 2017, 7: 1187
- 13 Lu L, Li J, Shu Y, et al. Hybrid brightfield and darkfield transport of intensity approach for high-throughput quantitative phase microscopy. [Adv Photonics](#), 2022, 4: 056002
- 14 Sun J, Zuo C, Zhang J, et al. High-speed Fourier ptychographic microscopy based on programmable annular illuminations. [Sci Rep](#), 2018, 8: 7669
- 15 Shu Y, Sun J, Lyu J, et al. Adaptive optical quantitative phase imaging based on annular illumination Fourier ptychographic microscopy. [Photonix](#), 2022, 3: 24
- 16 Li J, Zhou N, Sun J, et al. Transport of intensity diffraction tomography with non-interferometric synthetic aperture for three-dimensional label-free microscopy. [Light Sci Appl](#), 2022, 11: 154
- 17 Horstmeyer R, Chung J, Ou X, et al. Diffraction tomography with Fourier ptychography. [Optica](#), 2016, 3: 827–835
- 18 Zuo C, Sun J, Li J, et al. Wide-field high-resolution 3D microscopy with Fourier ptychographic diffraction tomography. [Optics Lasers Eng](#), 2020, 128: 106003
- 19 Zhou S, Li J, Sun J, et al. Transport-of-intensity Fourier ptychographic diffraction tomography: Defying the matched illumination condition. [Optica](#), 2022, 9: 1362–1373
- 20 Chen M, Ren D, Liu H Y, et al. Multi-layer Born multiple-scattering model for 3D phase microscopy. [Optica](#), 2020, 7: 394
- 21 Zhou N, Sun J, Zhang R, et al. Quasi-isotropic high-resolution Fourier ptychographic diffraction tomography with opposite illuminations. [ACS Photonics](#), 2023, 10: 2461–2466