

文章编号:1007-2780(2023)04-0456-06

基于四象限液晶器件的差分相衬成像系统

吴沛霖^{1,2}, 彭增辉¹, 穆全全¹, 宣丽¹, 张世冬³, 李大禹^{1*}

(1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 中科聚研(吉林)干细胞科技有限公司, 吉林 吉林 132000)

摘要:在显微成像领域中,高成像质量图像的获取与良好的照明方式息息相关。传统显微镜使用聚光透镜来提供均匀强度的照明,调节聚光透镜的光阑匹配不同放大倍率的物镜。然而无色生物细胞的光学吸收系数低,在传统显微镜下难以观测到其细节信息。为了突破传统显微镜的成像功能,本文设计了一种可调控的显微镜聚光镜模块,通过将小型扭曲液晶器件嵌入聚光透镜的后焦面处,调控液晶器件的对光的透过效果可以实现明场成像以及差分相衬成像。系统由一款商用显微镜改装而成,液晶器件尺寸为 22 mm×18 mm,实现了系统的高度集成化。通过实验验证了系统的成像性能,实现了对微凸透镜样品的定量相位重建,实验与理论曲线的互相关系数达到 0.994 9,并且通过胚胎干细胞的重建展示了系统在实际应用中的效果。

关键词:显微镜;计算成像;差分相衬成像

中图分类号:O438 文献标识码:A doi:10.37188/CJLCD.2022-0367

Differential phase contrast imaging system based four quadrants liquid crystal device

WU Pei-lin^{1,2}, PENG Zeng-hui¹, MU Quan-quan¹, XUAN Li¹, ZHANG Shi-dong³, LI Da-yu^{1*}

(1. *Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;*

2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*

3. *Zhongke Juyan Stem Cell Technology Co., Ltd., Jilin 132000, China*)

Abstract: In the field of microscopic imaging, the acquisition of high-quality images is closely related to good illumination mode. Traditional microscopes use a condensing lens to provide illumination with uniform intensity and adjust the aperture of the condensing lens to match the objective lenses with different magnification. However, it is difficult to observe the details of colorless biological cells which optical absorption coefficient

收稿日期:2022-11-04;修订日期:2022-12-04.

基金项目:国家重点研发计划(No. 2021YFB3600300);国家自然科学基金(No. 11974345, No. 61975202, No. U2241224);吉林省与中国科学院科技合作高新技术产业化专项(No. 2023SYHZ0039)

Supported by National Key R&D Program of China (No. 2021YFB3600300); National Natural Science Foundation of China (No. 11974345, No. 61975202, No. U2241224); High Technology Industrialization Project of Science and Technology Cooperation between Jilin Province and Chinese Academy of Sciences (No. 2023SYHZ0039)

*通信联系人, E-mail: lidayu20@ciomp. ac. cn

is low under the traditional microscope. In order to improve the imaging capacity of traditional microscopes, this paper designs a kind of adjustable microscope condenser module. Bright field imaging and differential phase contrast imaging can be achieved by embedding a small twisted liquid crystal device in the back focal plane of the condenser lens to regulate the light transmission effect of the liquid crystal device. The system is refitted from a commercial microscope. The size of the liquid crystal device is $22\text{ mm} \times 18\text{ mm}$, which realizes the high integration of the system. The imaging performance of the system is verified through experiments and the correlation coefficient between experimental and theoretical curves reaches 0.994 9. The reconstruction of embryonic stem cells shows the effect of the system in practical application.

Key words: microscopy; computational imaging; differential phase contrast imaging

1 引言

在显微成像领域中,由于无色生物样本的振幅吸收率低,常规显微镜观测下,成像对比度很低,传统方法多采用对其染色的方法使其在显微镜下被观测。然而对于生物样本,化学染色方式使得生物样本失活,对生物样本进行荧光染色时,所采用的激光照明的方式又会不可避免地产生光毒性^[1],对生物样本有损伤,难以对活体细胞进行长时间的观测。因此,无标记的相位成像方法成为了生物观测中逐渐采用的方式,并在近年来蓬勃发展^[2-3]。相衬显微镜和微干涉显微镜^[4]的出现为人们观测细胞提供了新的方式。根据光的干涉以及衍射将样品的折射率信息即相位差转换为振幅差,实现了无需标记的无色透明样品观测。为了更进一步提升成像性能,1984年Hamilton首次提出了差分相衬成像方法^[5],通过将分离式探测器与扫描式显微成像系统相结合,实现了对样品三维信息的定性观察。2014年Guo等人提出使用液晶显示器件作为空间光调制器^[6],实现了显微镜的多模态成像功能。2015年,Tian等^[7]通过将LED阵列作为照明调控模块,提出了定量的差分相衬成像方法。同年Zuo等人^[8]通过对现有倒置显微镜进行优化,在显微成像系统中外接一个4F系统,在4F系统中两透镜的共焦平面放置一款商用LCD显示屏进行调控,实现了差分相衬成像等多种成像模式。然而在实际场景下,商用LCD的显示器尺寸大,对于一般的显微镜成像系统,聚光镜后焦面位于机械可调光阑处,难以将商用LCD器件放在聚光镜后焦面处。并且商用LCD因其结构存在黑矩阵遮光膜,导致其对光的透过率低,其彩色滤光膜也会进一步影响透过率。对于差分相衬成像系统来说,这几种因素

会影响系统成像性能的进一步提升。

为了实现活体细胞观测系统的小型化、集成化、高对比度、低成本需求,贴近差分相衬成像的应用场景,本文提出了一种可调控的显微镜聚光镜模块,目前在商用显微镜OLYMPUS CX23上进行优化改装,所设计使用的四象限液晶器件尺寸仅为 $22\text{ mm} \times 18\text{ mm}$,可嵌入于显微镜聚光透镜的前焦平面处。

2 成像模型与理论

2.1 成像系统的构成

图1为基于四象限液晶器件的差分相衬成像系统结构图。它由相机、成像透镜、物镜、载物平面、聚光镜、四象限液晶器件以及光源组成。系统由一款商用显微镜OLYMPUS CX23改装而成,将小型的四象限液晶器件嵌入放置在聚光透镜的前焦平面处。

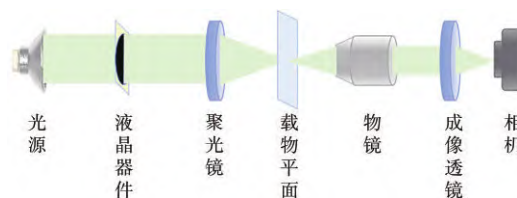


图1 液晶差分相衬成像系统结构图

Fig. 1 Structure diagram of liquid crystal differential phase contrast imaging system

2.2 定量差分相衬成像算法原理

定义薄样品为一个纯相位物体:

$$o(r) = e^{i\phi(r)}, \quad (1)$$

其中: $r=(x,y)$ 为样品平面的空间坐标, $\phi(r)$ 为样品的相位。采用弱相位近似下^[9-10],

$$o(r) \approx 1 + i\phi(r). \quad (2)$$

在某一角度的照明下,样品平面上的复函数为照明函数 $S_j(r)$ 与样品的透过率函数 $o(r)$ 的乘积,其中 j 代表某个方向的照明,系统的光瞳函数 $P(u)$ 由显微物镜的数值孔径(NA)决定, $P(u) = \text{NA}/\lambda$ 。当系统的光瞳函数 $P(u)$ 已知时,相机上采集到的强度谱为:

$$I(u_j) = S(u_j) \delta(u) |P(u_j)|^2 + iS(u_j) \phi(u) \times [P^*(u_j)P(u+u_j) - P(u_j)P^*(u-u_j)]. \quad (3)$$

为了线性化地恢复样品的相位信息,忽略计算过程中的二次交叉项^[11]。在正常照明情况下,照射到样品平面上的光源是空间部分相干光,那么强度谱 $I(u)$ 为多个角度照明下采集到的强度谱的和:

$$I(u) = B\delta(u) + i\Phi(u)PTF(u), \quad (4)$$

式中 B 代表背景项:

$$B = \iint S(u_j) |P(u_j)|^2 d^2 u_j. \quad (5)$$

系统的相位传递函数 PTF 为:

$$PTF(u) = \iint S(u_j) [P^*(u_j)P(u+u_j) - P(u_j)P^*(u-u_j)] d^2 u_j. \quad (6)$$

我们使用两个正交轴上的 4 张非对称照明下采集到的图像,计算样本的相位对比图像^[5,12]:

$$I_{lr}^{\text{DPC}} = \frac{I_l - I_r}{I_l + I_r}. \quad (7)$$

I_l 和 I_r 代表左半圆和右半圆照明时采集到的图像, I_{lr}^{DPC} 为样品在上下方向上的相位对比图,此时相位传递函数为:

$$F(I_l - I_r) = i\Phi(u) [PTF_{lr}(u) - PTF_r(u)], \quad (8)$$

$$F(I_l + I_r) = (B_l + B_r) \delta(u). \quad (9)$$

对式(7)傅里叶变换,结合式(8)、(9)得到差分情况下其强度谱为:

$$I_{lr}^{\text{DPC}}(u) = i\Phi(u) \frac{PTF_{lr}(u)}{B_l + B_r}. \quad (10)$$

更新后差分情况下的相位传递函数整合为:

$$PTF_{lr}^{\text{DPC}}(u) = \frac{\iint S_{lr}(u_j) [P^*(u_j)P(u+u_j) - P(u_j)P^*(u-u_j)] d^2 u_j}{\iint S_{lr}(u_j) |P(u_j)|^2 d^2 u_j}. \quad (11)$$

这里的 $S_{lr}(u_j)$ 是左半圆照明减去右半圆照明后的照明强度分布。最后通过反卷积和 Tikhonov 正则化,解算出样品的定量相位^[10]:

$$\phi(r) = F^{-1} \left\{ \frac{\sum_k [PTF_k^{\text{DPC}}(u) \cdot I_k^{\text{DPC}}(u)]}{\sum_k |PTF_k^{\text{DPC}}(u)|^2 + \alpha} \right\}. \quad (12)$$

式中: $PTF_k^{\text{DPC}}(u)$ 为相位传递函数在不同轴向上的共轭, k 代表水平方向或者竖直方向的轴向, α 为稳定卷积和防止噪声放大的正则化参数。

2.3 液晶器件的设计

图 2(a) 给出了四象限液晶器件的实物图,中间小型的为所制作的液晶器件,通过外侧转接件固定到聚光镜上,红框中器件显示的是两个象限透光,两个象限不通光的效果。图 2(b) 所示为所制作的液晶器件被均分为 4 个象限。四象限液晶器件在本文搭建的系统中相当于一个开关作用,每一次获取图像时仅有半圆形状的两个象限透光如图 2(c) 所示。

根据差分相衬成像的照明调制需求,研究扭曲液晶器件的透过率特性以及响应速度特性,设计并制作扭曲液晶器件。扭曲液晶器件的透过率 T 与器件的调制量 u 的关系式如式(13)所示^[13]:

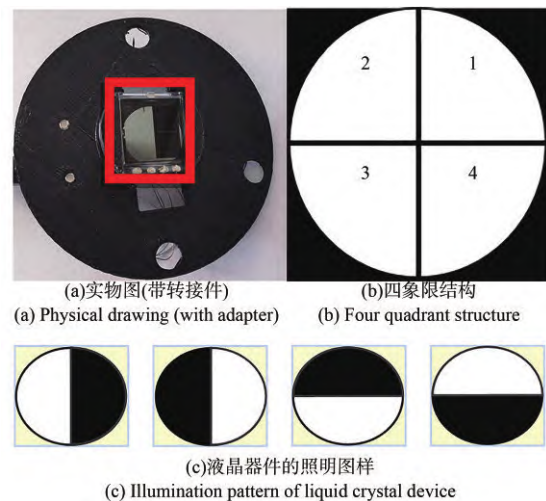


图 2 本研究使用的液晶器件

Fig. 2 Liquid crystal devices used in this study

$$T = 1 - \frac{\sin^2[\theta \sqrt{1 + u^2}]}{1 + u^2}, \quad (13)$$

式中: T 为液晶器件的透过率, θ 为扭曲角度, $u = 2\Delta n d/\lambda$, Δn 为液晶的折射率各向异性, d 为液晶器件的液晶层厚度, λ 为照明光波长,对于本文使用的TN型液晶器件, $\theta = 90^\circ$ 。透过率曲线如图3所示,定义第一个使得透过率 T 为1时的调制量为第一极值点, m 代表第几极值点, m 与调制量 u 的关系式如式(14)所示:

$$u = \sqrt{4m^2 - 1}, \quad (14)$$

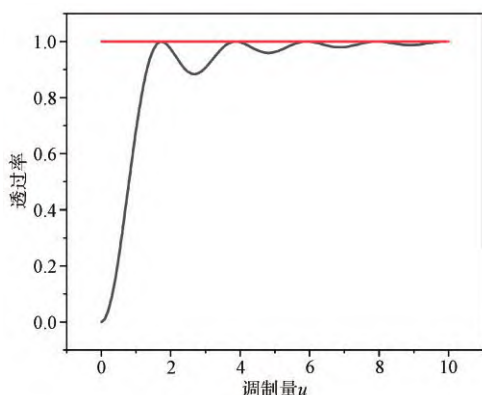


图3 液晶器件透过率与调制量关系图

Fig. 3 Relationship between transmissivity and modulation of liquid crystal device

液晶器件的响应时间定义为加电时和断电时透光率变化10%所需要的时间,前者为上升时间,后者为下降时间,分别用 τ_{on} 和 τ_{off} 来表示^[13]:

$$\tau_{on} = \frac{\eta \cdot d^2}{\Delta \epsilon V^2 - \pi^2 k}, \quad (15)$$

$$\tau_{off} = \frac{\eta \cdot d^2}{\pi^2 k}, \quad (16)$$

式中: η 为黏度, k 为弹性系数, d 为液晶器件厚度, $\Delta \epsilon$ 为介电各向异性, V 为外加电压。响应时间主要与液晶器件的厚度有关,结合器件的透过率特性进行参数设计,本文设计的扭曲液晶器件根据透过率为1时的第一极值点进行设计,即 $m = 1$ 。当采用第二或者第三极值点时,所需要的调制量 u 也增大,液晶盒厚 d 增加,使液晶器件的响应时间变长。在照明光波长为550 nm的情况下,计算得到液晶器件的 Δn 为0.11,器件厚度为4 μm 。

图4为实验测得的相对光透过率和时间的曲

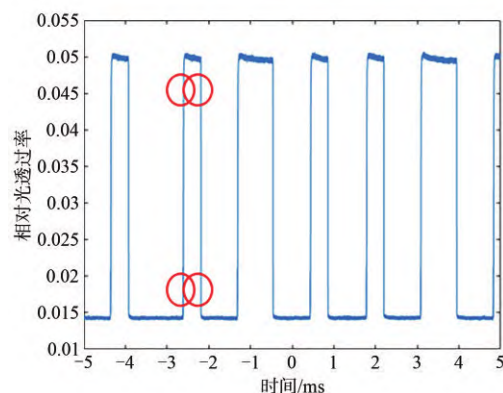


图4 实验测得相对透过率与时间曲线

Fig. 4 Relative transmittance versus time curve measured experimentally

线,经计算得到实测的器件的总响应时间为21 ms。测量器件亮态和暗态的消光比达到350:1。

液晶器件嵌入显微镜聚光镜模块的前焦平面处,由于聚光镜模块的空间限制,前焦平面的空余区域为直径为30 mm的圆形区域,液晶器件通过转接嵌入聚光镜前焦平面镜处,因此液晶器件的尺寸定为22 mm \times 18 mm,其中通光区域的大小为16 mm \times 16 mm,可以提供匹配40x物镜的照明NA。

3 实验结果与分析

实验系统搭建在商用显微镜OLYMPUS CX23上,将设计制作的小型扭曲液晶器件通过转接件安置于显微镜聚光透镜的后焦面处。

3.1 微凸透镜阵列成像实验

为了验证所搭建系统的成像性能,我们对微凸透镜阵列进行成像实验。物镜放大倍率为20 \times ,0.4 NA。使用微透镜阵列的参数为单个截面尺寸为288 μm ,曲率半径为9 764 μm ,根据几何关系计算出微透镜阵列的厚度约为1 061 μm 。空气介质的折射率参数 $n_d = 1$,微透镜阵列的折射率为 $n_m = 1.46$ 。

对微凸透镜阵列进行定量相位重建实验,解算获得的定量相位图像如图5所示。

为了量化相位重建的效果,我们绘制了单个微透镜某一方向上的相位变化曲线并与理论曲线进行对比,如图6所示。

理论计算经过微透镜阵列的相位差为^[14]:

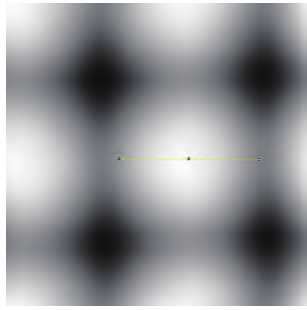


图5 解算出的微透镜阵列相位图

Fig. 5 Calculated phase diagram of microlens array

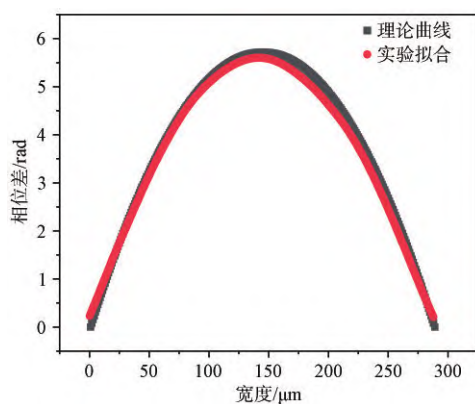


图6 理论曲线与实验测得曲线对比

Fig. 6 Comparison between theoretical curve and experimental curve

$$\Delta\phi = \frac{2\pi d(n_m - n_d)}{\lambda}. \quad (17)$$

理论计算经过微透镜阵列的最大相位差为 5.71 rad, 实验测得为 5.60 rad, 与理论值差 2%, 结果展现了 98% 的准确率。

皮尔逊相关系数是衡量曲线相似度的一种方式, 输出范围为 $-1 \sim +1$, 其中 0 代表无相关性, 负值代表负相关, 正值代表正相关。

Pearson 相关系数计算方式如式 (18) 所示:

$$\rho(A, B) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\frac{A_i - \mu_A}{\sigma_A} \right) \left(\frac{B_i - \mu_B}{\sigma_B} \right). \quad (18)$$

我们对实验解得的微透镜阵列的相位图像中单个微透镜的某一方向上的相位差值曲线与理

论曲线进行相关性计算, 得到相关系数为 0.994 7, 结果表明了系统定量相位成像的高精确度。

3.2 胚胎干细胞成像实验

验证了系统的定量相位成像能力后, 我们对胚胎干细胞进行了定量相位重建实验, 成像效果如图 7 所示。在普通明场显微镜情况下, 未染色的生物细胞的光学吸收系数低, 我们难以观测到胚胎干细胞的有效信息, 但在相位图像中, 可以清楚看到胚胎干细胞的细胞结构以及其中的线粒体等微观结构。

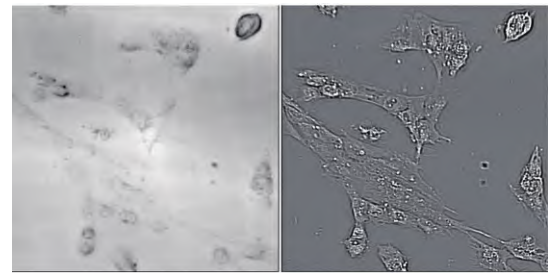


图7 胚胎干细胞明场图像和重建相位图像

Fig. 7 Embryonic stem cell bright field image and reconstruction phase image

4 结 论

本文提出了一种可调控的显微镜聚光镜模块, 根据差分相衬成像的照明调制需求设计了聚光镜模块中的小型液晶器件进行调控, 所设计的器件尺寸为 $22 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$, 对比度达到 350:1, 响应速度为 21 ms。通过微凸透镜阵列的实验验证了根据该模块搭建的系统的定量相位成像性能, 胚胎干细胞成像效果进一步体现了本文在实际场景中的应用效果。本文所设计的液晶器件只是初步的应用尝试, 未来可以通过选择其他参数液晶材料进行设计, 如快速响应液晶, 制作出对比度更高, 响应速度更快的液晶器件, 为未来实现高成像速度的实时活体成像系统打下良好的基础。

参 考 文 献:

- [1] ICHA J, WEBER M, WATERS J C, *et al.* Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it [J]. *BioEssays*, 2017, 39(8): 1700003.
- [2] LI J J, ZHOU N, SUN J S, *et al.* Transport of intensity diffraction tomography with non-interferometric synthetic

- aperture for three-dimensional label-free microscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2022, 11(1): 154
- [3] LUO Y, ZHAO Y F, LI J X, *et al.* Computational imaging without a computer: seeing through random diffusers at the speed of light [J]. *eLight*, 2022, 2: 4.
- [4] ARNISON M R, LARKIN K G, SHEPPARD C J R, *et al.* Linear phase imaging using differential interference contrast microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2004, 214(1): 7-12.
- [5] HAMILTON D K, SHEPPARD C J R. Differential phase contrast in scanning optical microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 1984, 133(1): 27-39.
- [6] GUO K K, BIAN Z C, DONG S Y, *et al.* Microscopy illumination engineering using a low-cost liquid crystal display [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(2): 574-579.
- [7] TIAN L, WALLER L. Quantitative differential phase contrast imaging in an LED array microscope [J]. *Optics Express*, 2015, 23(9): 11394-11403.
- [8] ZUO C, SUN J S, FENG S J, *et al.* Programmable aperture microscopy: a computational method for multi-modal phase contrast and light field imaging [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2016, 80: 24-31.
- [9] HAMILTON D K, SHEPPARD C J R, WILSON T. Improved imaging of phase gradients in scanning optical microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 1984, 135(3): 275-286.
- [10] STREIBL N. Three-dimensional imaging by a microscope [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1985, 2(2): 121-127.
- [11] BORN M. Principles of optics-electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light [J]. *Diffraction Theory*, 1975: 568-574.
- [12] MEHTA S B, SHEPPARD C J R. Quantitative phase-gradient imaging at high resolution with asymmetric illumination-based differential phase contrast [J]. *Optics Letters*, 2009, 34(13): 1924-1926.
- [13] 黄子强. 液晶显示原理[M]. 2版. 北京:国防工业出版社,2013.
HUANG Z Q. *Principle of Liquid Crystal Display* [M]. 2nd ed. Beijing: National Defense Industry Press, 2013. (in Chinese)
- [14] CHEN Y J, LIN Y Z, VYAS S, *et al.* Time-lapse imaging using dual-color coded quantitative differential phase contrast microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2022, 27(5): 056002.

作者简介:



吴沛霖(1997—),男,吉林长春人,硕士研究生,2020年于吉林大学获得学士学位,主要从事计算显微成像方面的研究。E-mail: wupeilin20@mails.ucas.ac.cn



李大禹(1979—),男,吉林长春人,博士,副研究员,2007年于中国科学院长春光学精密机械与物理研究所获得博士学位,主要从事智能光学与计算显微成像的研究。E-mail: lidayu20@ciomp.ac.cn