

基于涡旋光照明的暗场数字全息显微方法研究*

赵应春 张秀英 袁操今 聂守平 朱竹青
王林 李杨 贡丽萍 冯少彤†

(南京师范大学, 江苏省光电技术重点实验室, 南京 210023)

(2014年5月8日收到; 2014年6月25日收到修改稿)

提出了一种基于涡旋光照明的暗场数字全息显微方法. 从理论上阐述了涡旋光环形照明原理和暗场数字全息显微原理, 分析了涡旋光的准无衍射特性对成像的影响; 搭建了相应的数字全息显微成像系统, 采用690 nm的聚苯乙烯小球作为实验样品; 最后通过对小球明暗场下数字全息显微再现像的分析对比, 证明该方法可以有效地提高数字全息系统的分辨率, 同时增强了再现像的对比度.

关键词: 全息, 暗场数字全息显微, 涡旋光, 分辨率

PACS: 42.40.-i, 42.40.Kw, 42.25.-p, 42.40.Lx

DOI: 10.7498/aps.63.224202

1 引言

光学显微镜根据照明方式不同可分为明场显微镜和暗场显微镜等. 由于大多数的活体细胞样品含水量比较高, 组织呈现高透明性, 未经染色的样品很难在明场显微镜下直接观察, 染色后的样品又难免会因损伤而失活, 影响了对活体细胞的观察和研究. 相对于明场显微成像技术而言, 暗场显微成像技术可以对无染色的透明活体细胞进行成像^[1-3]; 暗场显微成像技术不仅可以增强显微成像的对比度, 而且还可以提高成像的分辨率. 因此, 它可以很好地弥补明场显微成像技术的不足.

然而, 传统的暗场显微成像技术只能得到物体的振幅信息, 无法获得物体的相位信息, 而数字全息显微成像技术可以同时记录物体的振幅和相位信息, 但是由于记录介质电荷耦合器件(CCD)的空间分辨率和靶面尺寸的限制, 数字全息显微技术的分辨率相对较低, 因此, 人们在暗场成像技术的基础上提出了一种暗场数字全息显微成像技术. Dubois和Grosfils^[4]从实验角度验证了暗场数字全息显微成像技术可以提高成像的分辨率. 文献

[5—8]在暗场数字全息显微成像技术中引入了变化的散斑场照明, 通过多幅全息再现叠加取均值的方法克服了散斑噪声, 增强了显微成像的对比度, 同样也提高了成像分辨率. 以上几种暗场数字全息显微成像系统中均是通过采用制作特定尺寸的圆形掩膜或者利用环形反射镜, 将扩束后的高斯光整形成环形光作为物体的照明光, 使之匹配暗场显微物镜. 然而, 高斯光束的能量主要集中在光斑中心区域, 上述方法均只保留了其边缘环形部分, 丢失了大部分能量, 致使照明光的强度减弱; 而且, 这些方法产生的照明光在传播过程中衍射产生旁瓣相对较强, 容易受到管镜内壁的反射, 产生杂散光, 使得成像时产生背景噪声; 同时, 在对微小物体成像时产生较强的衍射效应. 上述因素降低了系统成像的对比度和分辨率.

为此, 在暗场数字全息显微成像系统中, 如何设计产生光环尺寸可调节的且传播时衍射效应弱的环形照明光变得尤为关键. 本文提出了一种基于涡旋光照明的暗场数字全息显微成像方法, 该方法利用了涡旋光环形光强的尺寸可调节^[9-13]和准无衍射特性^[14], 将其作为系统照明光源, 并对其进行

* 国家自然科学基金(批准号: 61377003, 61275133)、南京师范大学高层次人才科研启动项目(批准号: 184080H20162)和南京师范大学青年领军人才培养项目(批准号: 184080H20178)资助的课题.

† 通讯作者. E-mail: fengshaotong@njnu.edu.cn

了理论分析和实验研究.

$$\times \exp\left(ikz + i\frac{2z}{k\sigma^2}\frac{\rho_1^2}{\sigma'^2}\right), \quad (2)$$

2 实验原理

2.1 涡旋光环形照明原理

涡旋光是一种具有螺旋型相位分布和确定光子轨道角动量的光波, 它的强度分布为一环形结构. 本文利用其特殊的光强结构作为物光部分的照明光源, 并根据暗场显微物镜的孔径选择合适的涡旋光拓扑电荷数. 实验中所使用的多为拉盖尔高斯涡旋光, 其源平面上的光束表达式为^[10]

$$E(\rho_0, z=0) = E_0 \left(\frac{\rho_0}{\sigma}\right)^{|l|} \exp\left(-\frac{\rho_0^2}{\sigma^2}\right) \exp(il\theta_0), \quad (1)$$

其中, l 是拓扑电荷数, σ 是高斯光斑大小参数, E_0 为常数, ρ_0 和 θ_0 是源平面上的极坐标, $z=0$ 对应于源平面. 在传输一段距离 z 后, 拉盖尔高斯涡旋光可表示为

$$E(\rho_1, z) = (-i)^{l+1} E_0 \left(\frac{\sigma'}{\sigma}\right)^l \left(\frac{\rho_1}{\sigma'}\right)^l \times \exp\left(-\frac{\rho_1^2}{\sigma'^2}\right) \exp(il\theta_1)$$

其中, ρ_1 和 θ_1 为观察面上点的极坐标, 参数 $\sigma'^2 = \sigma^2(1 + 4z^2/k^2\sigma^4)$, 通过与 (1) 式对比可以看出, 参数 σ' 的意义等同于 σ , 可以表征观察面上高斯光斑的尺寸. 然而, 由于涡旋相位奇点的存在, 涡旋光束的光强不再是高斯分布, 而是呈环带结构, 采用传统的光斑半径描述不再适合. 因此, 将其横截面上最亮的圆周半径定义为涡旋光的光斑尺寸^[10], 则通过涡旋光光强表达式对 ρ_1 进行求导, 便可得到涡旋光光斑尺寸表达式:

$$\rho_b = \sqrt{\frac{|l|}{2}} \sigma' = \sqrt{\frac{|l|}{2}} \sqrt{\sigma^2 \left(1 + \frac{4z^2}{k^2\sigma^4}\right)}. \quad (3)$$

由 (3) 式可知, 原始高斯光斑 σ 一定时, 涡旋光的光斑大小与拓扑电荷数和传播距离有关, 会随着传播距离增加而展宽, 而展宽比例与拓扑电荷绝对值的平方根成正比. 实验中当衍射距离固定时, 改变叉形光栅拓扑电荷数, 产生不同尺寸的涡旋光, 如图 1 (a), (b), (c) 分别是拓扑电荷数 l 为 100, 200, 300 的涡旋光, 可以看出涡旋光斑半径随着拓扑电荷数的增加而变大.

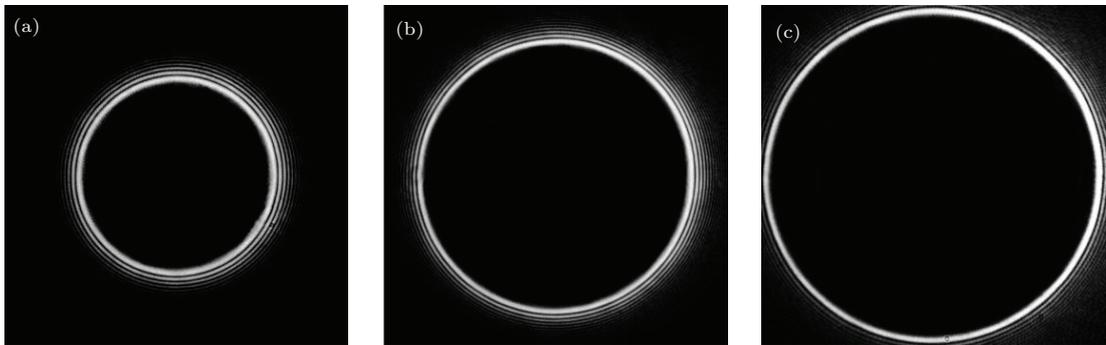


图 1 不同尺寸的涡旋光 (a) 拓扑电荷 $l = 100$; (b) 拓扑电荷 $l = 200$; (c) 拓扑电荷 $l = 300$

根据暗场显微物镜的孔径尺寸, 选择适当的衍射距离和拓扑电荷数, 以保证涡旋光可以完全进入. 如图 2 所示, 涡旋光入射到暗场显微物镜中, 形成中空的光锥; 环形光锥照明物体后, 携带物体低频信息的环形光锥 (实线箭头) 沿着原先的方向斜射出去, 且并未通过成像显微物镜 (成像显微物镜数值孔径小于暗场显微物镜数值孔径); 而物体被照明后产生的高频散射光 (虚线箭头), 被成像显微物镜接收并用于物体的成像, 因此, 可以形成暗背景下的亮物体的像, 从而提高物体成像的对比度. 另外, 由于暗场成像携带信息是物体的高频信

息, 使得物体的成像分辨率得到有效的提高.

2.2 涡旋光的准无衍射特性

拉盖尔高斯涡旋光不仅具有空间光强形状不变特性, 而且具有准无衍射特性^[12]. 如图 3, 利用数值模拟普通高斯光和拉盖尔高斯涡旋光中心通过衍射屏后的衍射光强分布, 横坐标是以主极大值的位置算起的相对距离 R , 实线 (Vortex) 是拉盖尔高斯涡旋光的衍射光强分布, 虚线 (Gaussian) 是普通高斯光的衍射光强分布. 从图中可以看出, 涡旋

光主极大值大于高斯光主极大值的情形下, 涡旋光第一级次极大值却明显小于高斯光第一级次极大值, 并且随着相对距离 R 的变大, 高斯光的其他各级次极大峰值均明显高于涡旋光的. 图3中标出了涡旋光和高斯光相应的主极大值以及第一级次极大值(箭头所示), 通过第一级次极大值与主极大值的比值, 可以近似得到第一级次极大相对于主极大的能量比值, 通过计算可得涡旋光的能量比值约为12.37%, 而高斯光的能量比值约为26.25%. 因此, 相对于高斯光, 涡旋光的第一级次极大相对于主极大的能量比值更少, 从而说明涡旋光的衍射能量主要集中在主极大上, 其他各级次极大的能量较少, 相对于高斯光而言涡旋光的衍射特性较弱, 这样利用涡旋光照明时物体成像衍射条纹较少, 成像的分辨率就能够得到提高.

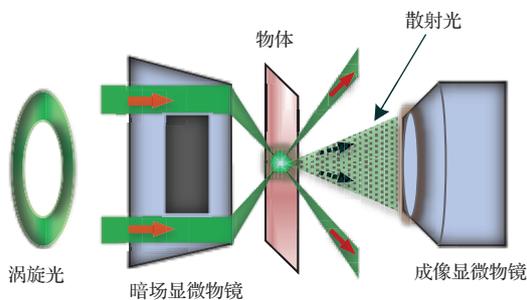


图2 暗场显微成像的原理

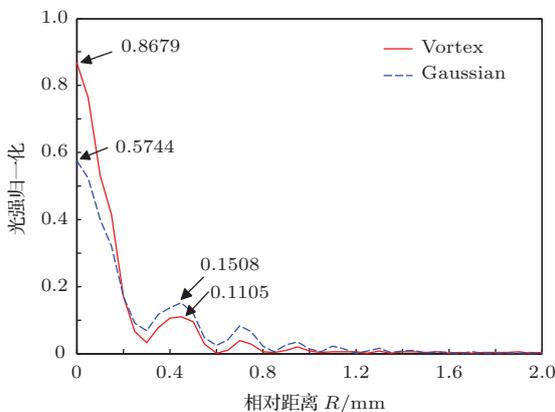


图3 衍射光强分布

2.3 暗场数字全息显微原理

物体经过暗场显微放大后, 像面位于 CCD 的记录面上, 即物光 O ; 利用马赫-曾德尔干涉光路, 在参考光路中用一束球面波作为参考光 R , 与物光 O 于 CCD 处干涉, 生成暗场像面数字全息图. 则全息图的表达为

$$H = |O + R|^2 = |O|^2 + |R|^2 + R^*O + RO^*, \quad (4)$$

由(4)式可见, 前两项是全息图的零级项, 第三、四项则是全息图的正负一级项, 而第三项是正比于物光 O 的实像.

在暗场数字全息再现过程中, 由于物光波直接成像聚集在全息记录面上, 因此再现时, 再现像不需要计算空间衍射传播, 而是直接位于全息面上. 但为了消除零级项和共轭项的干扰, 采用频域滤波的方式提取频域中正一级(或者负一级)频谱, 再对其进行逆傅里叶变换得到物光波的复振幅. 表达式如下:

$$O_1 = FT^{-1}[FT_{fil}(H)], \quad (5)$$

其中, FT 和 FT^{-1} 分别代表傅里叶变换和逆傅里叶变换; 角标“ fil ”表示频谱滤波.

3 实验系统以及实验结果分析

3.1 实验装置

如图4所示, 实验中采用的是基于马赫-曾德尔的干涉装置. 波长为532 nm的激光, 经平面反射镜1反射后由分束镜1分成物光和参考光. 物光经扩束准直系统入射到空间光调制器(SLM)上, 光阑1控制入射到SLM上光斑的有效面积; SLM上加载预先生成的叉形相位光栅产生环状涡旋光, 经分束镜2反射进入暗场显微物镜, 对样品进行照明; 光阑2的作用是使+1级的涡旋光通过, 并去除其他级次的影响; 样品照明后, 物体的散射光经显微物镜成像于CCD面上. 参考光路中使用了平面反射镜2和分束镜3对物光路中分束镜2到SLM间的光程进行了相应的补偿; 经扩束系统将参考光变为球面波, 再通过分束镜4和物光在CCD处进行干涉. CCD用于采集物光和参考光的干涉条纹即全息图.

上述光路中, 半导体抽运固体激光器出射波长 λ 为532 nm的绿光, 输出功率约为400 mW; SLM是德国HOLOEYE公司的PLUTO系列; 暗场显微物镜的放大倍数为20倍($N.A. = 0.45$), 而成像显微物镜的放大倍数是20倍($N.A. = 0.4$), 则根据相干照明时的分辨极限表达式 $D = 0.82\lambda/(N.A.)$ 计算^[15], 该系统的极限分辨距离 D 应为1090.6 nm. 实验中样品采用的是690 nm的聚苯乙烯小球, 则小球大小是低于普通相干照明的极限分辨率的, 实验光路可以分别对小球进行明场数字全息(去除暗场显微物镜用普通光照明)和暗场数字全息的记录.

3.2 实验结果

图 5(a) 是小球的明场全息图, 5(b) 是 5(a) 方框内图像的放大像; 5(c) 是 5(b) 中的明场小球再现像; 5(d) 是小球的暗场全息图, 5(e) 是 5(d) 方框内图像的放大像; 5(f) 是 5(e) 中小球暗场再现像; 其中图 5(a), (d) 方框部分, 表示对应样品中同一位置; 图 5(g) 是小球明场和暗场再现像的强度分布曲线(即沿着 5(c), (f) 虚线方向的强度分布), 通过对比可见在明场下(Bright 曲线), 这组小球由于系统分辨率不够, 未能分开, 而在暗场下(Dark 曲线), 却可以清晰地看出是两个小球, 说明暗场显微全息术的分辨率得到了提高; 同时, 对比图 5(c), (f) 可以看出, 暗场全息再现像中只有物体是明亮

的, 说明暗场数字全息再现像的对比度也得到了提高.

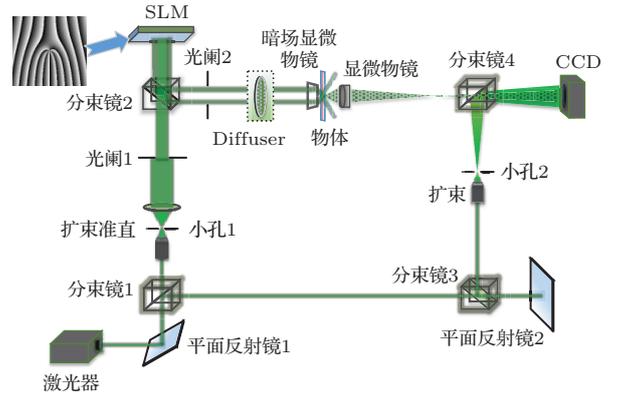


图 4 实验光路图

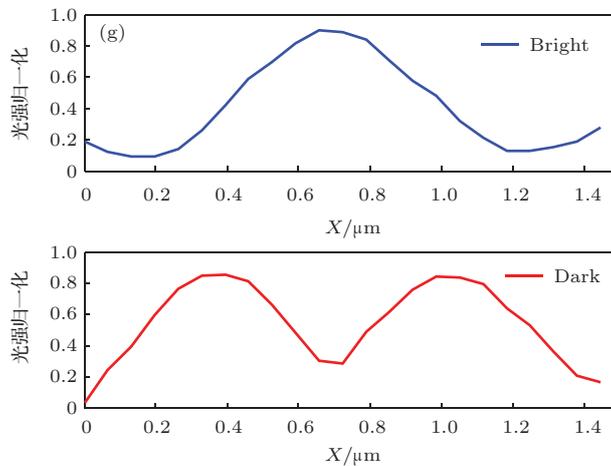
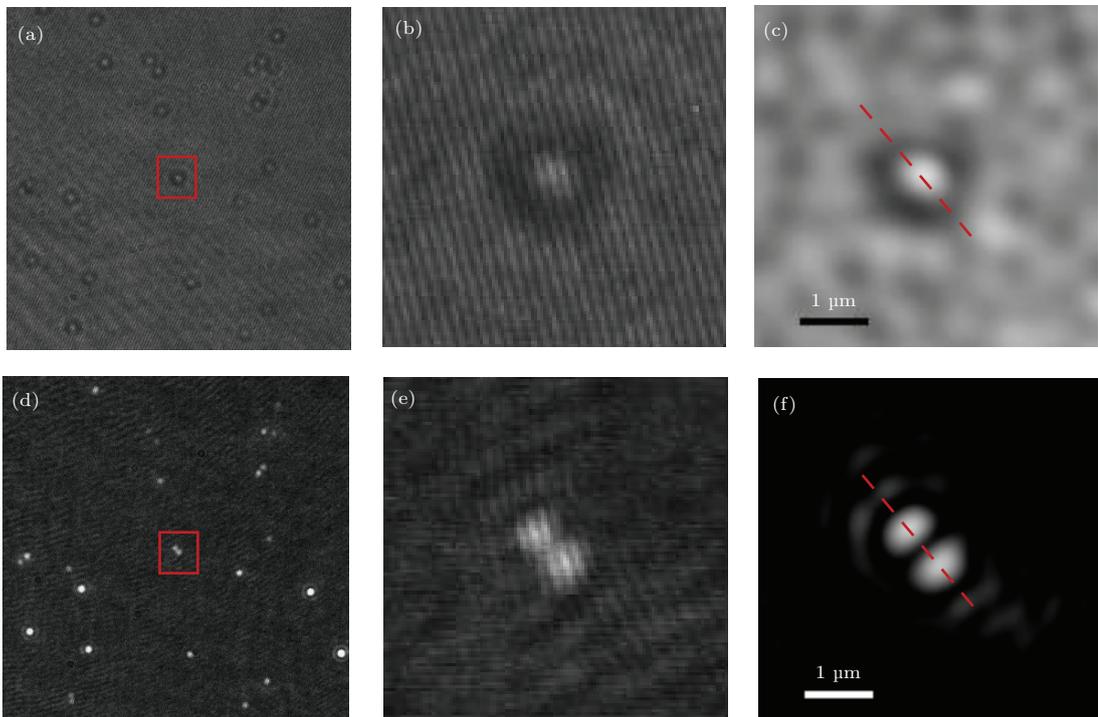


图 5 实验结果 (a) 小球的明场全息图; (b) 明场全息的放大像; (c) 明场小球再现像; (d) 小球的暗场全息图; (e) 暗场全息的放大像; (f) 暗场小球再现像; (g) 强度分布曲线

但是, 对比图 5(e), (f) 可以看出, 小球的暗场全息再现像发生了变形, 而且周围存在一定的噪声, 主要原因是光源的相干性引起的散斑噪声, 从而导致小球的再现像发生变形. 为此, 在图 4 实验光路的物光中, 插入了可旋转的毛玻璃(diffuser, 虚线框)产生散斑场, 利用散斑照明来抑制散斑噪

声. 通过记录多幅全息图, 并单独再现取平均值, 得到抑制散斑后的暗场全息再现像. 图 6(a) 是散斑场下单一的暗场小球全息图, 图 6(b) 是 6(a) 的全息再现图, 图 6(c) 是 60 幅全息再现取平均图. 对比图 6(b), (c) 可以看出, 利用散斑场照明方法可以有效地抑制散斑噪声, 提高小球全息再现像的质量.

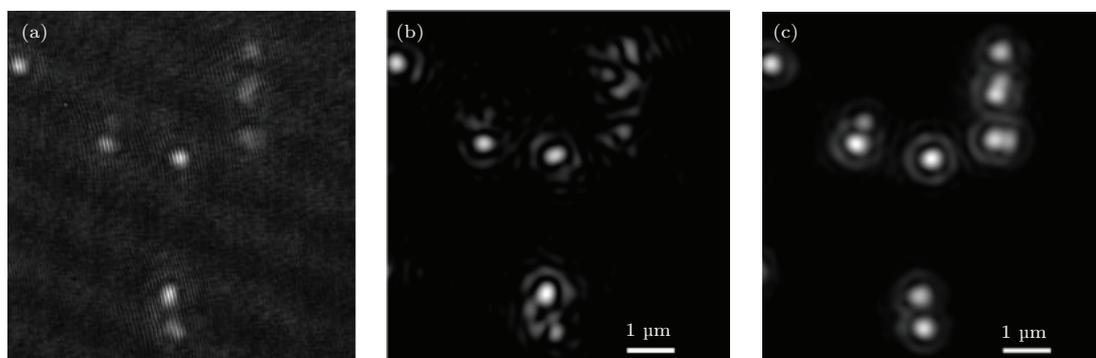


图 6 散斑照明的暗场全息 (a) 单一的暗场全息图; (b) 单一的暗场全息再现; (c) 60 幅暗场全息图再现取平均

4 结 论

本文提出了一种基于涡旋光照明的暗场数字全息显微成像方法, 并对其进行了理论分析和实验证明. 该方法无须制作不同尺寸的环形掩膜, 只需选择适当的衍射距离, 利用空间光调制器加载不同拓扑电荷的相位叉形光栅, 生成不同直径涡旋光, 使之与匹配不同直径的暗场显微物镜匹配. 将涡旋光作为照明光时, 由于涡旋光的能量主要集中在光环上, 与普通的高斯光整形而成的环形光相比, 提高了照明光的有效利用率; 涡旋光的准无衍射特性, 可以减少管镜内壁反射产生的杂散光, 在一定程度上降低了噪声, 增强了成像的对比度; 同时, 将其用于微小物体成像照明时, 成像的衍射效应减弱, 从而提高系统成像的分辨率. 实验结果表明, 该系统的分辨率高于 690 nm, 因此, 相对于传统的明场数字全息显微成像方法, 基于涡旋光照明的暗场数字全息显微成像方法具有高分辨率和高对比度等优势, 使得暗场数字全息显微成像技术在观察微小相位物体方面具有更广泛的应用前景.

参考文献

[1] Villiger M, Pache C, Lasser T 2010 *Opt. Lett.* **35** 3489

- [2] Pfeiffer F, Bech M, Bunk O, Kraft P, Eikenberry E F, Brönnimann C, David C 2008 *Nat. Mater.* **7** 134
- [3] Verebes G S, Melchiorre M, Garcia-Leis A, Ferreri C, Marzetti C, Torreggiani A 2013 *J. Biophoton.* **6** 960
- [4] Dubois F, Grosfils P 2008 *Opt. Lett.* **33** 2605
- [5] Faridian A, Pedrini G, Osten W 2013 *J. Biomed. Opt.* **18** 086009
- [6] Faridian A, Pedrini G, Osten W 2014 *Biomed. Opt. Express* **5** 728
- [7] Park Y, Choi W, Yaqoob Z, Dasari R, Badizadegan K, Feld M S 2009 *Opt. Express* **17** 12285
- [8] Zhi S T, Zhang H J, Zhang D X 2012 *Acta Phys. Sin.* **61** 024207 (in Chinese) [支绍韬, 章海军, 张冬仙 2012 物理学报 **61** 024207]
- [9] Li Y Y, Chen Z Y, Liu H, Pu J X 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 1740 (in Chinese) [李阳月, 陈子阳, 刘辉, 蒲继雄 2010 物理学报 **59** 1740]
- [10] Ding P F, Pu J X 2011 *Acta Phys. Sin.* **60** 094204 (in Chinese) [丁攀峰, 蒲继雄 2011 物理学报 **60** 094204]
- [11] Li Z H, Wu F Q, Chen J, Cui X X, Zhu J K 2013 *J. Optoelectron Laser* **7** 1439 (in Chinese) [李志焕, 吴福全, 陈君, 崔祥霞, 朱久凯 2013 光电子激光 **7** 1439]
- [12] Fang G J, Pu J X 2012 *Chin. Phys. B* **21** 084203
- [13] Chen Z Y, Pu J X 2012 *Chin. Phys. B* **21** 024201
- [14] Porras M A, Borghi R, Santarsiero M 2001 *J. Opt. Soc. Am. A* **18** 177
- [15] Born M, Wolf E 2001 *Principles of Optics* (7th Ed.) (Beijing: World Book Inc) pp467-472

Dark-field digital holographic microscopy by using vortex beam illumination*

Zhao Ying-Chun Zhang Xiu-Ying Yuan Cao-Jin Nie Shou-Ping Zhu Zhu-Qing
Wang Lin Li Yang Gong Li-Ping Feng Shao-Tong[†]

(Key Laboratory for Opto-Electronic Technology of Jiangsu Province, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(Received 8 May 2014; revised manuscript received 25 June 2014)

Abstract

We propose a dark-field digital holographic microscopy (DHM) by using vortex beam illumination. In this paper, the annular illumination of vortex beam and the dark-field DHM imaging system are theoretically analyzed, and the quasi-nondiffracting property of the vortex beam is discussed. A corresponding DHM imaging system is established. The polystyrene spheres each with a size of 690 nm are utilized as objects in the experiment. By comparing the results of reconstructed images under bright-field illumination with those under dark-field illumination DHM, it is proved that the resolution of dark-field DHM under speckle-field illumination is improved and the contrast of its reconstructed image is enhanced accordingly.

Keywords: holography, dark-field digital holographic microscopy, vortex beam, resolution

PACS: 42.40.-i, 42.40.Kw, 42.25.-p, 42.40.Lx

DOI: [10.7498/aps.63.224202](https://doi.org/10.7498/aps.63.224202)

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61377003, 61275133), the Scientific Research Foundation for Advanced Talents, Nanjing Normal University, China (Gran No. 184080H20162), and the Training Programme Foundation for Youth Leader Talents by Nanjing Normal University, China (Gran No. 184080H20178).

[†] Corresponding author. E-mail: fengshaotong@njnu.edu.cn