

螺旋相差生物显微镜的研制及应用

洪煦昊

(南京大学 物理学院, 江苏 南京 210093)

摘要: 径向希尔伯特变换在显像样品边界增强及 3D 浮雕成像效果上有着重大的作用。尤其是可以呈现样品的相位信息。利用这一重要的特点, 一种新型的螺旋相差显微镜被设计研制出来, 用来观测透明样品。有别于传统的 $4f$ 双透镜系统, 阿贝滤波光路被采用来整合螺旋相差显微镜, 使之在生物成像领域发挥重要作用。

关键词: 希尔伯特变换; 螺旋相差显微镜; 边缘增强; 浮雕成像

Development and application of Spiral Phase Contrast Microscope

Hong Xu hao

(Center of nano fabrication and Characterization, School of Physics, Nanjing University, Nanjing, China 210093)

Abstract: The radial Hilbert transform has achieved great success in the edge contrast enhancement in microscopy, and the shadow effect shows ability on relief-like imaging, especially in the reveal of phase profile. These features give us the opportunity to develop a new type microscope with the function of radial Hilbert transform to observe transparent sample. Different from the traditional $4f$ (2 confocal lenses) radial Hilbert transform set-up, Abbe filtering system is adapted to acquire the phase edge enhancement imaging in our microscope. This Spiral phase contrast microscope has the ability on unstained biological sample imaging and inspection of chip defects.

Keywords: Hilbert transform; Spiral Phase Contrast Microscope; edge enhanced imaging; Relief-like imaging

光学显微镜自17世纪发明以来, 一直是观察微小物体的重要科研工具。几百年也并未停止发展的脚步。时至今日显微镜的丰富多样的工作方式及功能模块为科研人员提供了有力的技术支持。

在生物医学领域, 透射式的生物显微镜在样品表征上一直处于垄断地位。但绝大多数的生物样本对于可见光来说, 都是纯相位型的近乎透明状态。也就是说, 这些有机材质、高含水量的试样, 对光子并没有强烈的吸收与散射, 因此在传统的显微镜明场工作模式下, 很难获得较好的样本形貌图片。

目前主流的可以获取此类相位型样品形貌信息的方法有三种。

其一为诺贝尔奖得主Zenike提出的相差显微成像技术。此方案如图1a，利用光源中的透射环与物镜后焦面的暗场相位环相结合，把相位信号转化为振幅信号，突显样本边界相位变化信息，从而观察透明相位型物体。相差显微镜拍摄的生物样品会有较强的边缘增强效果，如图1d所示。

二为1952年Nomarski提出的微分干涉相差成像技术。如图1b，该技术是利用一对特制的渥拉斯顿棱镜来分解和合并光束来凸显样品的相差。具体来说，分裂出来的两束偏振相互垂直、且具有极小的空间位移的光束穿过被检物体，由于标本的厚度和折射率存在梯度变化，从而引起了两束光发生了光程差，因此给两束光添加了不同的相位。此后再利用检偏器和棱镜来重聚两束光并使二者发生干涉。由于两光束的空间位移小于系统分辨率，故不出现重影现象，最终图像呈现出立体的三维感觉。如图1e所示。

第三个方法是1975年Robert Hoffman提出的集成调制对比成像技术。原理如图1c所示。同样也是利用成对的光源狭缝与阶梯灰度滤波片，将样品的相位梯度转变为强度梯度，从而可供拍照测量。该方案最终成像效果如图1f，与微分干涉类似，但扁平度等方面略有差别。其衍生技术的产品有徕卡的整合调制相差IMC，尼康、奥林巴斯的渐变对比方法等

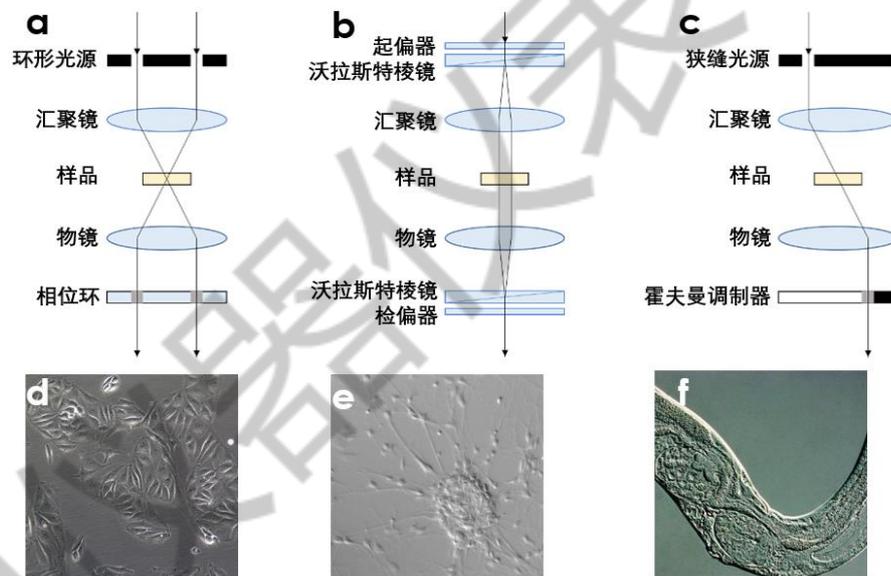


图1 相差、微分干涉、集成调制对比原理图及实验成像图

在 2000 年前后, Khonina , Jaroszewicz , Kolodziejczyk, Swartzlander 等人先后发现, 在 $4f$ 滤波系统中, 插入螺旋型相位片 (SPP) 作为傅里叶滤波器, 可以提升成像的强度及相位衬度 (图 2 所示)。Furhapter 于 2005 年利用空间光调制器实现该功能, 同时发现在螺旋相位片适当偏离光轴的情况下, 可以呈现与微分干涉显微镜类似的三维浮雕效果。但此后对螺旋相位滤波的研究, 并未在传统显微系统中激起波澜, 转而扩散到非线性, X 射线成像等