



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102539382 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201110374950. 7

审查员 张娟

(22) 申请日 2006. 03. 24

(30) 优先权数据

60/665, 118 2005. 03. 25 US

(62) 分案原申请数据

200680009723. 1 2006. 03. 24

(73) 专利权人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 加布里埃尔·波普斯克

拉曼查德·戴萨瑞

迈克尔·S·费尔德 池田高宏

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

G01N 21/45(2006. 01)

G01N 15/14(2006. 01)

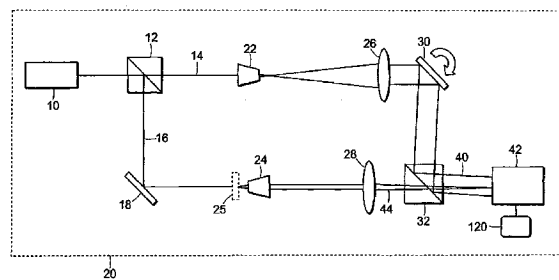
权利要求书2页 说明书7页 附图11页

(54) 发明名称

用于希耳伯特相位成像的系统和方法

(57) 摘要

希耳伯特相位显微技术 (HPM) 作为一种用于测量与光可穿透物体有关的高横向分辨率的定量相位图像的光学技术。由于其单次拍摄的特性, HPM 适用于透明结构 (例如, 生物细胞) 中发生的快速现象的研究。优选的实施方案用于测量生物系统, 包括对红血球的测量, 而且能够对毫秒范围内的动态过程进行量化, 例如, 可以用于举例说明对于蒸发的微米大小的水滴的测量。



1. 一种量化相位成像系统,该成像系统包括:

光源、样品光程路径、参考光程路径和相对于所述样品光程路径和参考光程路径定位的数字成像检测器;

光束分离器,其分离来自所述光源的光以形成干涉仪的两条光路,分别包括参考光束和样品光束;

样品,该样品相对于样品光程路径被定位,以至于所述的样品光束被传递到所述样品上使来自样品的光穿过第一透镜,所述的参考光束沿着所述的参考光程路径被引导穿过第二透镜,从而使样品光程路径的一部分相对于参考光程路径以一个角度被定位从而形成条纹图案,该条纹图案用数字成像检测器来检测;以及

数据处理器,该数据处理器执行一种由所述数字成像检测器对图像数据进行检测的希尔伯特变换操作以提供样品的量化空间相位图像数据。

2. 根据权利要求 1 的系统,其中所述数据处理器展开数据。

3. 根据权利要求 1 的系统,进一步包括旋转反射镜,其对参考光程路径的光进行调节。

4. 根据权利要求 1 的系统,其中所述数字成像检测器具有至少 200000 像素并以至少 10 帧/秒的全场速度进行收集。

5. 根据权利要求 1 的系统,其中数据处理器进一步对图像数据进行傅立叶变换。

6. 根据权利要求 1 的系统,包括干涉仪。

7. 根据权利要求 1 的系统,包括显微镜。

8. 根据权利要求 1 的系统,其中数据处理器测量图像数据的连续的帧的杂波。

9. 根据权利要求 1 的系统,其中该系统在被检测的图像数据的多个点测量空间相位。

10. 根据权利要求 1 的系统,其中所述数字成像检测器检测样品的单一相位图像来提供样品的量化相位分布。

11. 一种用于物体成像的方法,该方法包括:

用光束分离器分离来自光源的光,形成干涉仪的两条光路,分别包括参考光束和样品光束;

用所述的样品光束对物体进行照明,照明光沿着样品路径被引导穿过待被成像的物体和第一透镜从而形成样品场,所述的参考光束沿着参考路径被引导穿过第二透镜形成参考场,以至于样品场的一部分相对于参考场以一个角度被定位,从而形成条纹光图案;

用数字成像检测器检测条纹光图案的图像,从而提供检测后的图像数据;以及

用数据处理器处理所述的检测后的图像数据,所述的数据处理器操作用于将希尔伯特变换供给所述的图像数据以获得量化相位图像数据。

12. 根据权利要求 11 的方法,进一步包括以对于数字成像检测器的正交轴 45 度的角度来确定条纹图案的方向。

13. 根据权利要求 11 的方法,进一步包括对生物学材料进行成像。

14. 根据权利要求 11 的方法,进一步包括对组织进行成像。

15. 根据权利要求 11 的方法,进一步包括在样品路径的傅立叶平面和检测图像的参考路径上提供激光源和电荷耦合设备。

16. 根据权利要求 11 的方法,进一步包括从单一检测图像获取物体的定量空间相位图像。

17. 根据权利要求 16 的方法,进一步包括获取物体的空间相位图像是通过:  
对测量得到的空间数据进行傅立叶变换和高通滤波以获取复解析信号的实正弦曲线信号的部分;  
获取与正弦曲线信号有关的复解析信号和通过使用希耳伯特变换来压缩负频率;  
进行逆傅立叶变换以获取提供关于物体的相位信息的复二维信号;以及  
通过减去线性相位来获取定量的空间相位图像。
18. 根据权利要求 11 的方法,进一步包括为测量从哺乳动物身体上移除组织或血样品。
19. 根据权利要求 11 的方法,进一步包括确定来自物体的图像数据的物体内部结构的大小。
20. 根据权利要求 11 的方法,进一步包括对血细胞进行成像。

## 用于希耳伯特相位成像的系统和方法

[0001] 本申请是 2006 年 3 月 24 日递交的申请号为 200680009723.1, 发明名称为“用于希耳伯特相位成像的系统和方法”的分案申请。

### 背景技术

[0002] 光学显微技术是一种在生物学和医药学中常用的研究方法。众多的生物学样品（包括活细胞）在可见光的照度下是完全透明的而且本质上表现为相位物体。通过将相位信息变换为明暗度的分布, 相衬技术和 Nomarski 显微技术为几乎看不见的样品提供了对比, 并显现出生物系统的结构上的细节。然而, 通过上述技术获得的关于照明场的相位移动的信息只是用于定量分析的。来自具有高精确度和低杂波的透明物体的恢复定量分析相位信息允许测量生物学的研究中的结构和动态。用干涉仪测量和非用干涉仪测量的技术都已经被建议在生物样品的定量相位成像中使用。同样, 傅立叶相位显微技术 (FPM) 也已经被研发为一种超低杂波的相位成像方法。由于时间周期的延长中的次纳米相位的稳定性, FPM 适用于从秒数到细胞的生命周期的时间量程内的生物系统的动态研究。

### 发明内容

[0003] 细胞级中的大多数过程, 包括细胞溶质动力学、细胞膜变异、神经系统的活动, 出现在下至毫秒范围的较短的时间内。因此, 允许以 kHz 帧频俘获全场的定量相位图像的显微技术能够对生物系统进行量化。

[0004] 已经发现时间变化域中的复解析信号的形式在光学领域有着广泛的应用。尤其是, 复解析信号中的实虚部之间的希耳伯特变换关系已经被用于从单一的时间干涉图中恢复相位移动。本发明涉及用于定量的相位成像的系统和方法, 参考希耳伯特相位显微技术 (HPM), 其允许来自单一的空间干涉图的全场相位图像的恢复。

[0005] 在 HPM 中, 单次拍摄的相位成像通过记录设备 (例如, 成像传感器) 仅被限制在帧俘获率的范围内。成像传感器的实施例包括数字成像检测器, 例如, 电荷耦合设备 (CCD) 或者 COMS 成像阵列。这与相位移动技术形成对比, 其中用于恢复单一的相位图像需要众多的录像。此外, HPM 为相位展开提供准备, 其使得相位物体的研究远远大于光的波长研究。优选的是, 成像设备具有至少 200,000 像素, 其可以以至少 10 帧/秒的速度进行收集, 而且优选的是, 超过 100 帧/秒。

[0006] 优选的实施方案中将来自单一光源的光沿着参考路径和样品路径分解。沿着样品路径的光被引导通过被测量的样品或物体, 和沿着参考路径的光通过调制装置进行调制, 以致当来自样品的光与调制参考光结合时, 能被成像传感器所检测的干涉图案就会产生。调制装置可以是, 例如, 旋转反射镜或活动透镜。本发明的优选的实施方案可以包括纤维光学器件以将光连接到物体上 (例如, 组织) 从而成像。可以使用激光或不同波长的其他的高相关光源。计算机或其他数据处理器或图像处理器可以被连接到成像设备的输出上以处理图像数据。在优选的实施方案中, 数据处理器与软件程序编程以处理图像, 这是利用视场中的选定点作为参考点来首先滤除杂波实现的。然后, 图像进行希耳伯特变换以获取处理

后的图像。对使用了滤波器之后得到的干涉图中进行傅立叶变换以获取被过滤后的图像数据。其后是适用逆傅立叶变换以获取交迭的和展开的相位图像。这提供了关注物体的定量相位图像。

[0007] 本发明优选的实施方案可以包括根据本发明的希耳伯特相位成像的配置,其中光学几何条件被设置为透射或反射的成像。在优选的实施方案中,倒置的显微几何条件可以与用于结合参照物图像和样品图像的光束分解器一并使用。反射测量可以通过贴上反射材料来进行,例如,将聚苯乙烯珠粒附着到细胞膜上。然后,相干光可以被反射出所述材料以获取干涉图。这可以用于测量隔膜的机械性能,例如,剪切模量或弯曲系数。本文所描述的过程可以在,例如,人体外部或哺乳动物的组织或体液或者人眼外部的其他组织中使用。

[0008] 本发明为非生物应用以及生物应用而提供;例如,本发明可以为对于光纤和/或其他的透明或半透明的物体或材料(包括晶体结构)的相位轮廓的研究提供准备。

## 附图说明

[0009] 附图 1 举例说明根据本发明的成像系统的优选实施方案。

[0010] 附图 2a-2h 举例说明获取的图像,包括 a) 透射亮度图像;b) 干涉图;c) 正弦曲线信号;和 d) 从 a) 中显示的矩形区域中测量得到的交迭相位;e) 全场的展开相位;f) 全场的定量相位图像;g) 通过 f 中的相位图像和指示模拟配合的连续线条的横向轮廓;h) 全血涂片(放大倍率为 40)的 HPM 图像;显示出 5 $\mu$ m 的度量杆;灰色的度量杆显示 a-c 的亮度级别,和 d-h 的相位弧度。

[0011] 附图 3a-3d 显示的是获取的图像,包括 a) 水滴的 HPM 图像;色彩杆显示微米范围内的厚度和度量杆为 10 $\mu$ m;b) 附图 3a 的点 0 的路径长度波动;显示出标准偏差;c) 蒸发过程中的滴液质量(毫微微克为单位)的时间变化;d) 蒸发过程中滴液的混合厚度;在 3.4s 的时间间隔和连续帧之间的 10.3ms 内收集的数据。

[0012] 附图 4 举例说明根据本发明的成像系统的优选的实施方案。

[0013] 附图 5a-5c 举例说明获取的图像和数据,包括 a) 全血涂片的定量相位图像;RBCs(红血球)的体积用毫微微升表示和色彩杆为弧度,和 b) 与区域 0 相关的空间标准偏差的时间波动,和 c) 作为平均帧的函数的时间平均数  $\sigma_{sub}$ 。

[0014] 附图 6a-6d 举例说明在 10 秒周期中与红血球有关的外形变化的定量评定。

[0015] 附图 7a-7i 举例说明获取的图像和数据,包括 a-e) 4 秒周期中的溶血作用的各个阶段;和 f-h) 正如显示出的那样,对应  $t = 0.5s, 1.0s$  和  $1.5s$  的从细胞中分离的血色素的相位图像;i) 在 4 秒的周期中与细胞(附图 7f 中用箭头表示)外的点有关的细胞体积变化和光路径长度移动。

[0016] 附图 8 是根据本发明的优选实施方案的使用软件程序以处理图像数据的处理流程。

## 具体实施方式

[0017] 附图 1 中举例说明了本发明的优选的实施方案。在该实施方案中,氦氖激光被用作 Mach-Zender 成像干涉仪 20 的光源 10。第一光束分离器 12 分离来自光源 10 的光以形成干涉仪的两条光路,分别包括参考光束 14 和样品光束 16。反射镜 18 将样品光束 16 反

射到样品或物体 25 上。干涉仪 20 的每条光路都有两套放大倍率为  $M = 20$  的望远镜系统，每套望远镜系统包括物镜 22, 24 和透镜 26, 28。第二反射镜 30 将参考场反射到第二光束分离器 32 上。参考场 40 的方向是可以调节的，例如，通过反射镜 30 的可旋转的移动以倾斜参考场 40。图像传感器 42，例如，CCD，可以在透镜 26, 28 的共有的傅立叶平面上定位，在此形成样品场 44 的精确（放大）复制。为了产生相对于 CCD 图像传感器 42 的 x 轴和 y 轴成 45 度角定位的统一条纹结构，参考场 40（通过光束分离器 32 反射到 CCD 图像传感器 42 上）稍微倾斜于样品光束 44。在所述实施方案中使用的 CCD (C770, Hamamatsu 光子学) 具有在  $480 \times 640$  像素的全分辨率上的 291 帧 / 秒的俘获率。也可以使用更高的分辨率和俘获率。图像数据从传感器 42 中传送到处理器或计算机 120 中以分析和显示。

[0018] 对于给定的样品 25，图像平面上越过 x 轴或 y 轴的空间上变化的辐射度具有以下形式：

$$I(x) = I_R + I_S(x) + 2\sqrt{I_R I_S(x)} \cos[qx + \phi(x)] \quad (1)$$

[0020] 其中  $I_R$ ,  $I_S$  分别是参考的和样品的辐射度分布， $q$  是条纹的空间频率，和  $\phi$  是与物体 25 有关的空间上变化的相位，关注的数量。方程式 (1) 类似于 Michelson 中的时间干涉和其他的干涉仪的描述，其中  $q$  对应于由声光调制器或移动的反射镜所导致的频率变化。对于此处关注的透明物体， $I_S$  被认为是  $x$  的弱相关。通过调节系统的放大倍率，可以选择空间频率  $q$  以匹配或超过仪器的数字孔径所允许的最大频率，以保护衍射极限的分辨率。正弦曲线项  $u(x) = 2\sqrt{I_R I_S} \cos[qx + \phi(x)]$  可以通过傅立叶高通滤波独立出来。其跟随复解析信号， $z(x)$ ，相关的实函数  $u(x)$  可以从以下公示中获得：

$$z(x) = \frac{1}{2}u(x) + i \frac{P}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{u(x')}{x-x'} dx' \quad (2)$$

[0022] 方程式 (2) 中，右边的虚部代表理论值 ( $p$ ) 的整数，可以确认为  $u(x)$  的希耳伯特变换。因此，相位光谱， $\Phi(x)$ ，相关的复解析信号  $z(x)$  可以通过以下方程式计算：

$$\Phi(x) = \tan^{-1}\{\text{Im}[z(x)]/\text{Re}[z(x)]\} \quad (3)$$

[0024] 请注意  $z(x)$  显示频率为  $q$  快速相位调制，因此， $\Phi$  是强交迭的。然而，由于  $q$  高于物体的空间频率部分，展开的程序有效地工作。最后，与物体有关的相位， $\phi(x)$  求根简化为

$$\phi(x) = \Phi(x) - qx. \quad (4)$$

[0026] 所述程序可以用于恢复例如光纤维的相位轮廓。在优选的实施方案中，本发明为用于恢复具有直径为 100um，折射指数为 1.457 的纤维核子的光纤维的相位轮廓的仪器和方法作准备，金属包裹层的外径为 110um，折射指数为 1.452。在该实施例中，纤维被沉浸到丙三醇中以更好地模拟相位物体。样品（附图 2a）的传输亮度图像显示出低的对比度，其是样品透明度的表征。附图 2b-d 代表再现次序中的中间步骤并对应于附图 2a 中的矩形区域。该区域包括丙三醇 / 金属包裹层和金属包裹层 / 核子界面。被 CCD（附图 2b）记录的干涉图是经过傅立叶变换和高通滤波的，以致可以获取正弦曲线信号（附图 2c）。为了获取与实信号有关的复解析信号，二维的傅立叶变换被计算和负空间频率被压缩。根据逆傅立叶变换的实施，可以获取仅提供关于物体相位的信息的复二维信号，正如方程式 2 所描述的那样。强交迭和展开的相位图像分别显示在附图 2d 和附图 2e 中。光纤维的定量相位图像可以通过减去线性相位来获取，而且在附图 2f 中有所描述，横截面显示在附图 2g 中。连

续的直线代表的是模拟配合,丙三醇的折射指数作为可变参数。对于最好的配合来说,丙三醇的折射指数的值为  $n = 1.467$ ,其近似于已知的值。

[0027] 本发明优选的实施方案在生物测量中使用 HPM,例如,组织或体液(例如,来自全血涂片的红血球)的相位图像的量化参数。附图 2h 显示的是所述图像的实施例,其中个别细胞和细胞的凝块很容易被识别。缺乏核子以及主要的细胞器官的红血球可以被模拟为光均质物体。因此,来自 HPM 图像的相位信息可以转换为厚度信息,该厚度信息直接提供,例如,细胞形状和体积的参数。在该实施例中,数据的记录时间为 10.3ms 和样品通过在两片叠层中夹入全血滴来准备。

[0028] 因此,根据本发明的优选实施方案,HPM 可以提供透明样品的定量相位图像。此外,该方法可以测量相位物体,所述相位物体的相位轮廓远远大于用于举例说明的光的波长。上述重要特征源于强加在图像上高空间调制,其在相位图像中产生好的限定交迭点,从而推进展开程序。因此,HPM 获取来自单次拍摄测量的定量相位图像的性能允许监测透明的或可传输系统中的快速动态过程。

[0029] 本发明的又一个优选实施方案为透明介质中的快速过程的研究而提供,例如,分析微米大小的液滴的蒸发。附图 3a 显示的是喷溅在显微镜载物片上的水滴的 FPM 图像。z 轴的信息表明水滴的厚度明显小于其横向大小。为了监测蒸发现象,333 幅相位图像的系列以 10.3ms 的时间间隔进行记录。由于每一个相位图像都是从一个 CCD 记录中获取的,这对于消除两条干涉仪光路之间的杂波不是必需的,其提供的显著优势超过相位移动技术。在连续的帧之间的杂波并没有使相位图像模糊,相位图像可以通过每一幅图像在视场范围内的固定点上得到方便地显示。参考点在附图 2a 中用“R”表示。为了量化出现在相位图像系列中的剩余的横向杂波,与附图 3a 中指示的点 0 有关的时间路径长度的波动被记录。上述波动被均分在对应于成像光学系统 ( $0.45 \times 0.45 \mu\text{m}^2$ ) 的衍射极限斑点的区域上。上述波动的标准偏差的值为 1.32nm,正如所示,其表明纳米路径长度的灵敏度可以在毫秒时间范围内获得。附图 3c 显示的是在记录过程中的滴液质量的变化,从 HPM 图像中计算出来。对于衍射极限的横向分辨率和当前相位的灵敏度,HPM 对非常微小的水蒸发体积很敏感,在  $10^{18}$  公升的阶次上。此外,定量的相位图像提供有关均质结构的详细的三维信息。因此,与蒸发的滴液有关的最大厚度的时间相关可以被容易地评估(附图 3d)。与质量的时间变化相比,这些曲线明显地表现出不规则(有时是无变化的),其表示出在蒸发的过程中形状上的变化的间断特性。

[0030] 本发明的优选实施方案提供了各种优势。例如,根据本发明的希耳伯特相位显微技术可以恢复来自具有纳米级灵敏度的单次拍摄测量的高横向分辨率定量的相位图像。复解析信号适用到空间域中是以模拟为基础的,其存在于描述电磁场的时间和空间波动的方程式中。HPM 提供用于测量透明介质中的快速现象的方法,包括生物系统和活细胞的动态过程。

[0031] 现在回到附图 4,本发明的又一个实施方案在倒转的几何条件中使用希耳伯特相位显微技术的原理以提供高速和高灵敏度的定量的相位显微技术 60。倒转的几何条件尤其适用于活细胞的研究。用于定量的生物显微技术的方法的可能性已经通过以量化毫秒时间范围内的具有纳米路径长度灵敏度的红血球的外形和波动得到证明。

[0032] 参考附图 4,优选的实施方案在通过与倒转的显微技术 60 结合来扩展 HPM。光源

50, 例如, 氩氦激光 ( $\lambda = 632\text{nm}$ ) 通过第一反射镜 52 和第二反射镜 54 连接到  $1 \times 2$  的单模式中, 纤维光学耦合器 56 和通过纤维分离器 58 分离到参考光路 64, 包括第一纤维耦合器输出 66 和瞄准仪 68, 以及分离到样品光路 62 中, 包括第二纤维耦合器输出 72 和瞄准仪 74。提供通过的样品光路的第一输出场起到为装备有 100X 物镜 88 的倒置显微镜 80 照亮场的作用。管状的透镜 90 是这样的, 以致样品 85 的图像通过光束分离器体 92 在图像传感器 CCD 100 的平面上形成。第二纤维耦合器输出 66 被瞄准仪 68 所瞄准并通过望远镜系统扩展, 包括第二显微镜的物镜 70 和管状透镜 90。参考场光束可以通过平面波接近, 其与样品图像场 96 相干涉。参考场 94 相对于样品场 96 倾斜 (例如, 通过调整瞄准仪 68), 以致可以以相对于 CCD 100 的 x 轴和 y 轴的 45 度的角度获得统一的条纹。使用的 CCD (C7770, Hamamatsu 光子学) 具有在  $640 \times 480$  像素中全分辨率的 291 帧/秒的俘获率, 而且 CCD 100 被连接到计算机 120 上或由计算机 120 控制。在该实施例中, 参考光路中的物镜 3 和管状透镜 90 之间的焦距,  $f$ , 为 250mm。

[0033] 与一个方向上的干涉图有关的空间辐射度通过上述的方程式 1 给出, 其中  $I_R$ ,  $I_s(x)$  分别是参考辐射度分布和样品辐射度分布,  $q$  是条纹的空间频率, 和  $\phi(x)$  是与物体 85 有关的空间上变化的相位, 在解析中  $\phi(x)$  是重要的关注数量。如上所述, 使用高通空间滤波以得出正弦曲线项  $u(x) = 2\sqrt{I_R I_s} \cos[qx + \phi(x)]$ , 以及如上所述, 通过适用方程式 2 中的希耳伯特变换以获取复解析信号,  $z(x)$ , (从而相位光谱,  $\Phi(x)$  通过方程式 3), 再次, 通过方程式 4, 量化  $\phi(x)$  可以对单次曝光的图像进行恢复。

[0034] 由于倒转的几何条件, 新的 HPM 显微技术尤其适用于活细胞的定量研究。为了证明新的仪器具有在毫秒和纳米量级内量化细胞结构的性能, 红血球 (RBCs) 的计时决断的 HPM 图像可以获得。全血滴被夹入夹层中, 而没有额外的准备。附图 5 显示的是活的血细胞的定量相位图像。独立的血红细胞和凝块血红细胞很容易被识别。白血球 (WBC) 也可以出现在视场中。利用折射指数分布为 1.40 和 1.34 的细胞和周围血浆, 与 RBCs 有关的相位信息可以容易地被转化为细胞解剖图的纳米图像。此外, 个别的细胞体积可以评估; 在附图 5 中, 测量的体积 (单位为毫微微升) 被显示在个别的红血球下。

[0035] 为了消除连续帧之间的纵向杂波, 每一幅相位图像被参考为没有包含细胞的视场区域 (由 R 标出) 中的平均值。为了量化仪器的稳定性和对细胞解剖图的动态变化灵敏度, 1000 幅图像集被记录, 以每 10.3ms 的时间进行俘获和杂波的分析在视场的第二空区域中进行。所述区域中 (附图 5a 中用 0 标识) 路径长度波动的空间标准偏差,  $\sigma_s$ , 具有时间内确定的波动, 依次以时间均值  $\langle \sigma_s \rangle$  为特性。 $\sigma_s$  的时间相关在附图 5b 中有所描绘, 平均值  $\langle \sigma_s \rangle$  与平均帧的数量的对比显示在附图 5c 中。明显的是, 仅通过对 2 个连续帧进行平均,  $\langle \sigma_s \rangle$  就被降低以少于 1nm。杂波评估证明根据本发明的优选实施方案的倒置的 HPM 仪器能够在次纳米量级的范围内提供关于生物系统的结构和动态的定量的信息, 例如, RBCs。

[0036] 活的红血球的显著的动态变化的实施例显示在附图 6a 和附图 6c 中。对应于红血球的相位图像显示在附图 5a 中并以 10.3ms 的间隔俘获, 而且表示 1,000 帧数据集中的第一帧和最后帧。附图 6b 和附图 6d 显示的是细胞在两个阶段中的水平和垂直的厚度轮廓, 精确度为纳米级。令人感兴趣的是, 细胞外形的显著变化是由于与临近的白细胞的快速的相互作用, 在图像的较低的左侧 (正如附图 5a 中的 WBC)。这将导致容易被 HPM 量化的快速不对称形状变化。这一显著的结果不能通过例如原子力或电子显微技术进行定量分析。

[0037] 溶血作用 (RBC “细胞溶解”) 是一种现象, 其中血红细胞的隔膜破裂而且细胞失去其血色素成分。所述过程最近在光透明的背景中得到研究。利用 HPM 仪器, 以 10.3 毫秒的俘获时间, 1,000 幅相位图像序列可以用于动态量化作为细胞的自发溶解结果的细胞中的变化。附图 7a-7e 描述的是在溶血作用的各个阶段中细胞体积的减少。请注意细胞不同寻常的扁平外形。由于分离的血色素的相位移动可以在附图 7f-7h 中观察到, 其中只有细胞周围的区域被表示, 以避免灰度的饱和度。隔膜破裂是高度定位的, 正如附图 7f-7h 中所表示的不对称那样, 而且血色素从细胞的点源明显扩散。RBC 体积在过程中被评估而且其时间相关在附图 7i 中被描绘。在高速动态过程中, 细胞的体积在小于 4 秒的时间内减少 50% (信号在 2 幅帧中进行平均)。从另一方面来说, 与非常接近细胞的点有关的相位移动达到大约 1 秒内的 9nm 的稳定状态的最大程度。为了改进信号为超灵敏测量的杂波, 信号在 11x11 像素的空间和时间超过 10 帧内进行平均。这些数据的作为结果的标准偏差达到非常低的值, 0.09nm。测量的相位移动与血色素的局部浓度成线性比例; 因此, 在大约 1500ms 之后达到的大致衡定的路径长度移动可以解释为来自细胞和扩散过程的分子的产生之间均衡的结果。

[0038] 进行希耳伯特相位显微技术的优选方法显示在附图 8 的流程图 200 中。上述过程可以通过在计算机上运行软件来进行。首先, 校准步骤 202 可以选择性地通过获取已知的样品图像来进行, 然后可以用于去除系统中的背景杂波。步骤 204 中, 将被测量的样品被放置到载物台上和一个或更多的样品的干涉图像被收集。步骤 206 中, 将傅立叶变换适用到每一幅图像上, 然后在步骤 208 中过滤图像。然后, 在步骤 210 中, 适用逆傅立叶变换, 其后是在步骤 212 中去除杂波。步骤 214 是相位展开和步骤 216 是获取样品的其他定量特性的确定。

[0039] 本发明的优选的实施方案包括根据本发明的希耳伯特相位成像的配置, 其中光学的几何条件被设定为传输和 / 或反射模式。

[0040] 本发明为非生物应用和生物应用而提供; 例如, 本发明为研究光学纤维和 / 或其他的透明或半透明的物体或材料的相位轮廓而提供。本发明的优选实施方案可以采用激光或其他的相干光源作为光源的光学仪器的一部分。可以使用来自电磁光谱的紫外线可视范围或红外线区域的波长。

[0041] 本发明的优势包括快速和简单地获取定量的图像数据。倒置的希耳伯特相位显微技术能够在次纳米级和毫秒范围内测量细胞的定量相位图像。倒置的几何条件使得新的仪器尤其适用于量化细胞生物体, 例如, 没有限制, 血红细胞隔膜装置的非接触特征。

[0042] 例如活细胞的生物结构在明视场照明下被控制为是透明的。相位差 (PC) 和微分干涉差 (DIC) 显微技术已被广泛用于推测细胞的形态特征, 而没有对外源性对比剂的需求。上述技术将编码在成像场中的相位的信息转化为最终图像的亮度分布。因此, 通过给定的样品的光相位移动被看作是强内源性对比剂, 由于其包含关于样品的厚度和折射指数的信息。从视场的点可以看到, 成熟的红血细胞 (红血球, 或 RBCs) 代表了结构中缺乏核子和主要的细胞器官的非常特别的类型。因此, RBCs 可以模拟为光学的均质物体, 即, 它们产生局部的, 光学的与其厚度成比例的相位移动。因此, 红血球的定量相位图像的测量提供细胞厚度轮廓和对应于光波长的非常小的片断的精确度。所述的纳米量级的形态信息提供关于生物物理特性和细胞的健康状态的洞察。具有核子或光不可透的部分的细胞可以使用上

文描述的反射过程进行测量。

[0043] 根据本发明的又一个优选实施方案提供了用于量化快速的生物现象的方法,例如,毫秒级的 RBC 隔膜波动,使用希耳伯特相位显微技术 (HPM) 作为傅立叶相位显微技术 (FPM) 的技术补充。HPM 将复解析信号的概念扩展到空间域中,并测量来自一个空间干涉图记录的定量相位图像。由于单次拍摄的特性,HPM 俘获时间仅被记录设备所限制,并因此可以被用于精确地以毫微秒时间或更少的时间来量化纳米级的路径长度移动,在上述范围内发生很多相关的生物现象。优选的是,图像在小于 1 秒的时间周期内获取而且最常用的是小于 100 毫秒。作为结果的是,动态事件的视频记录可以在细胞级的范围内被记录下来。

[0044] 尽管本发明结合特定的方法和装置已经得到描述,但是人们将会理解以上描述是作为等价的设备和方法的实施例而并非是对本发明范围的限制,本发明的范围由以下的权利要求所限定。

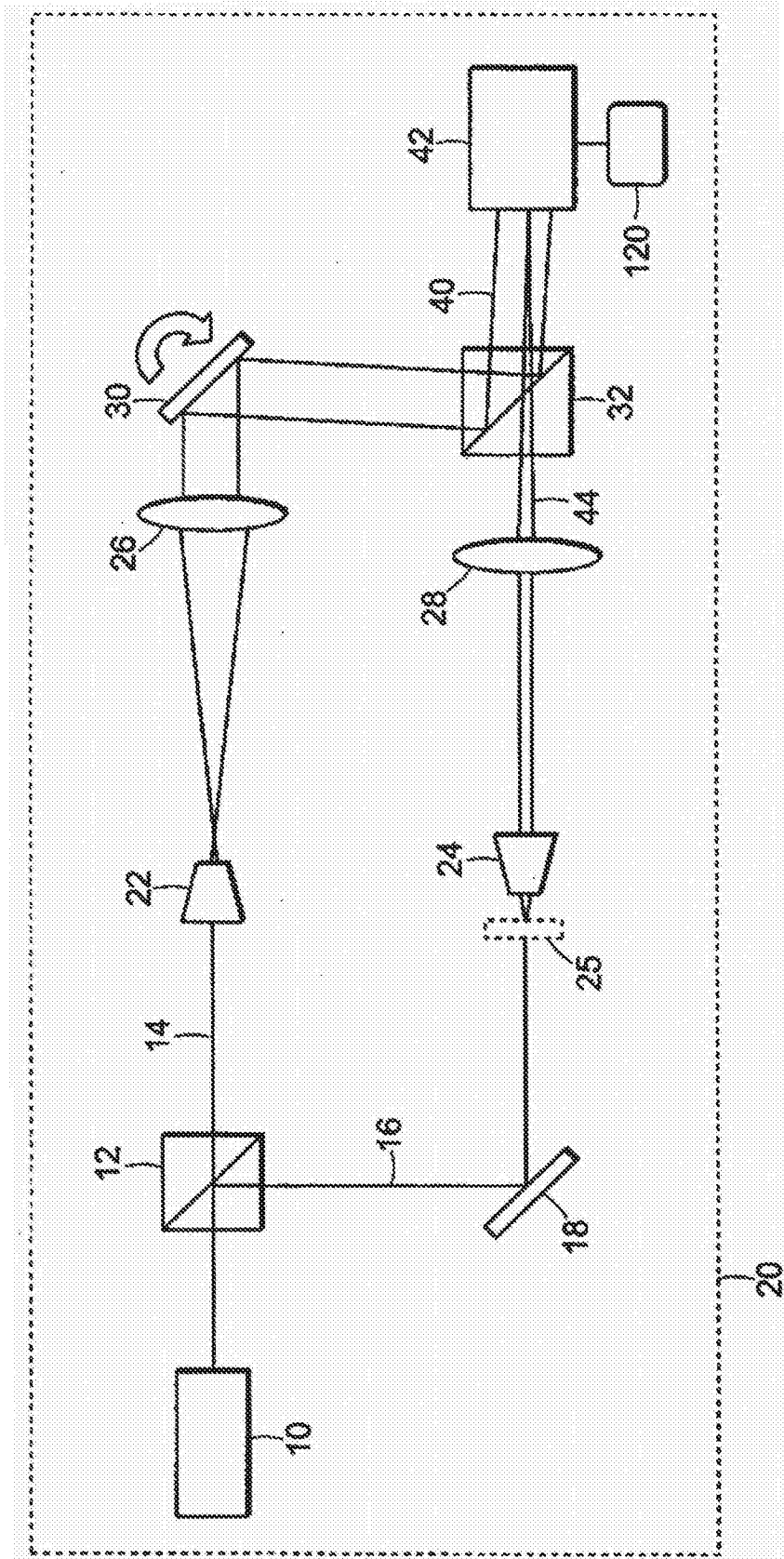


图 1

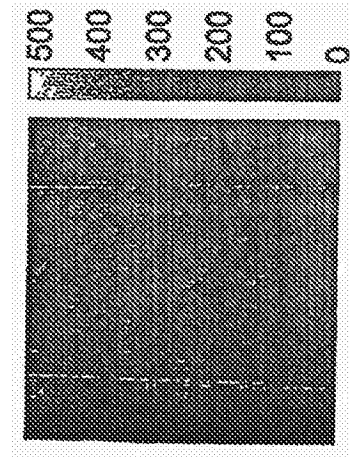


图 2(a)

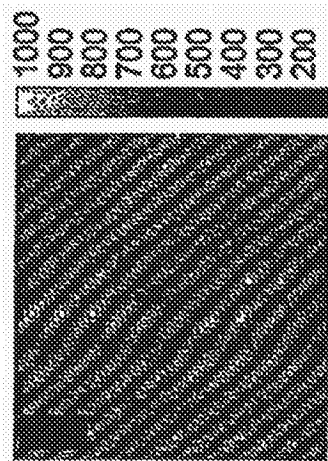


图 2(b)

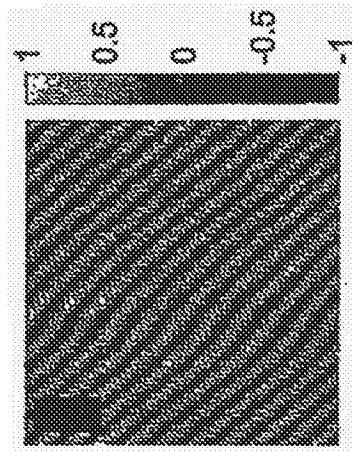


图 2(c)

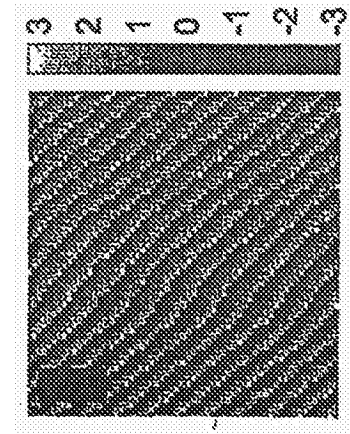


图 2(d)

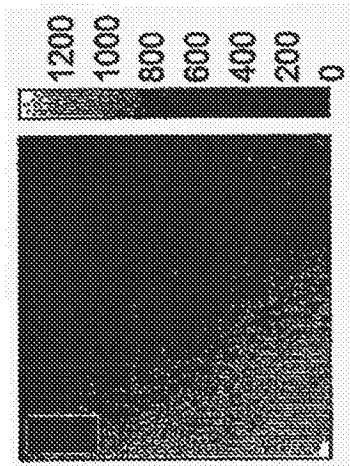


图 2(e)

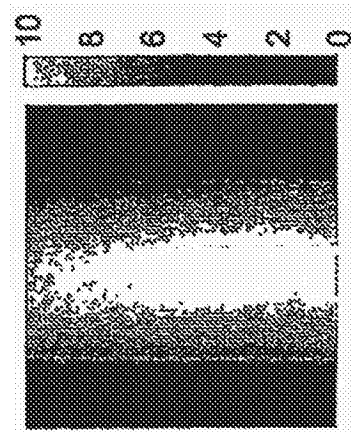


图 2(f)

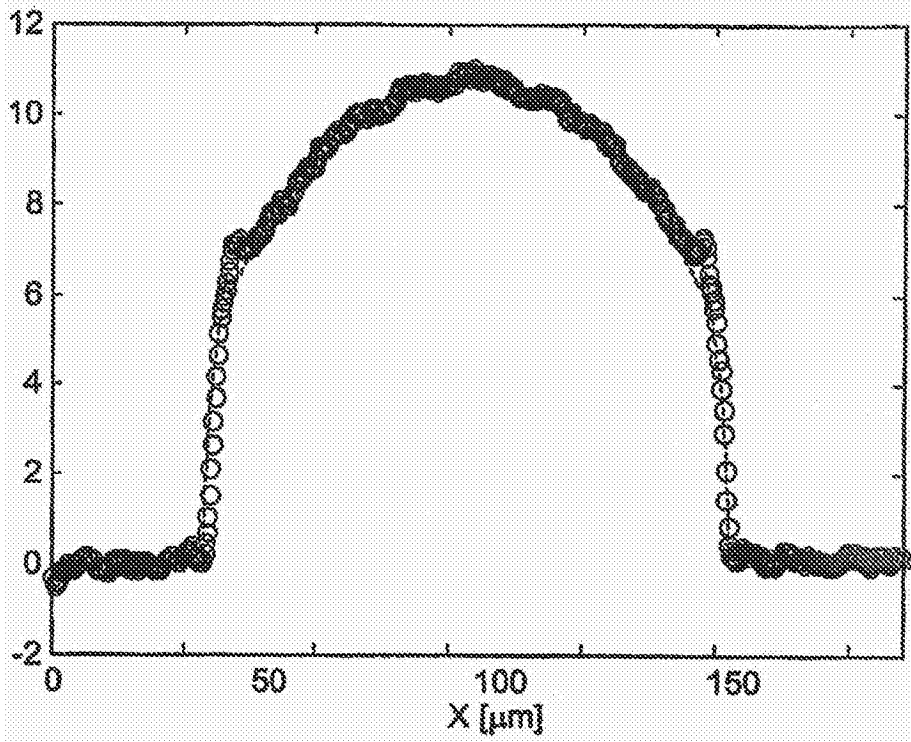


图 2(g)

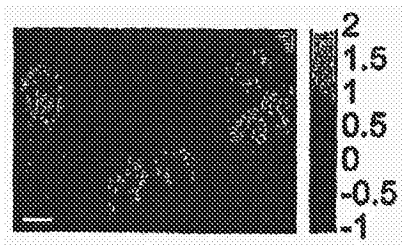


图 2(h)

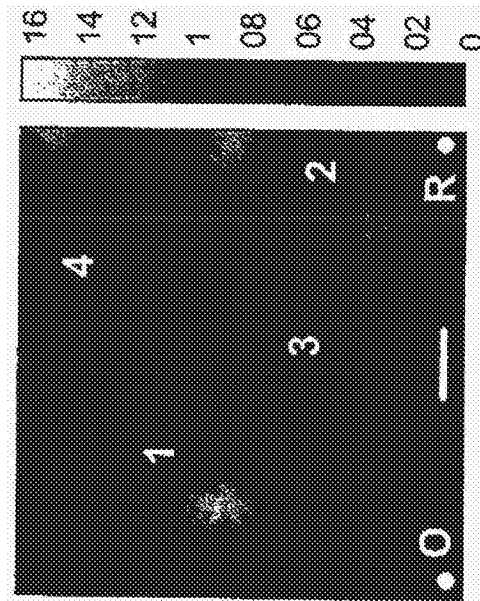


图 3(a)

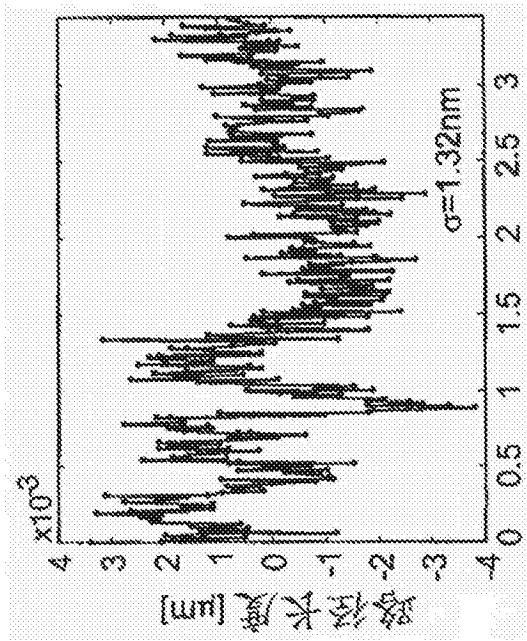


图 3(b)

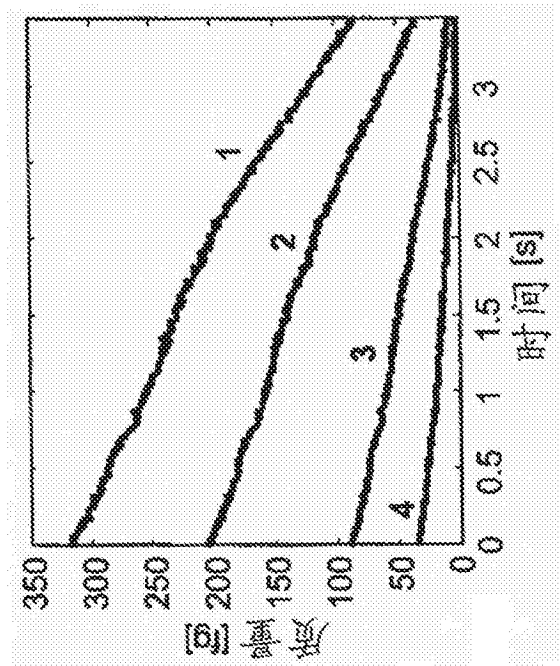


图 3(c)

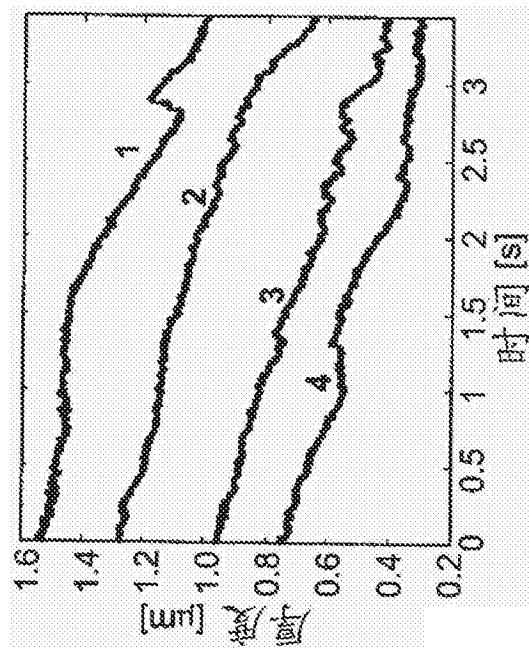


图 3(d)

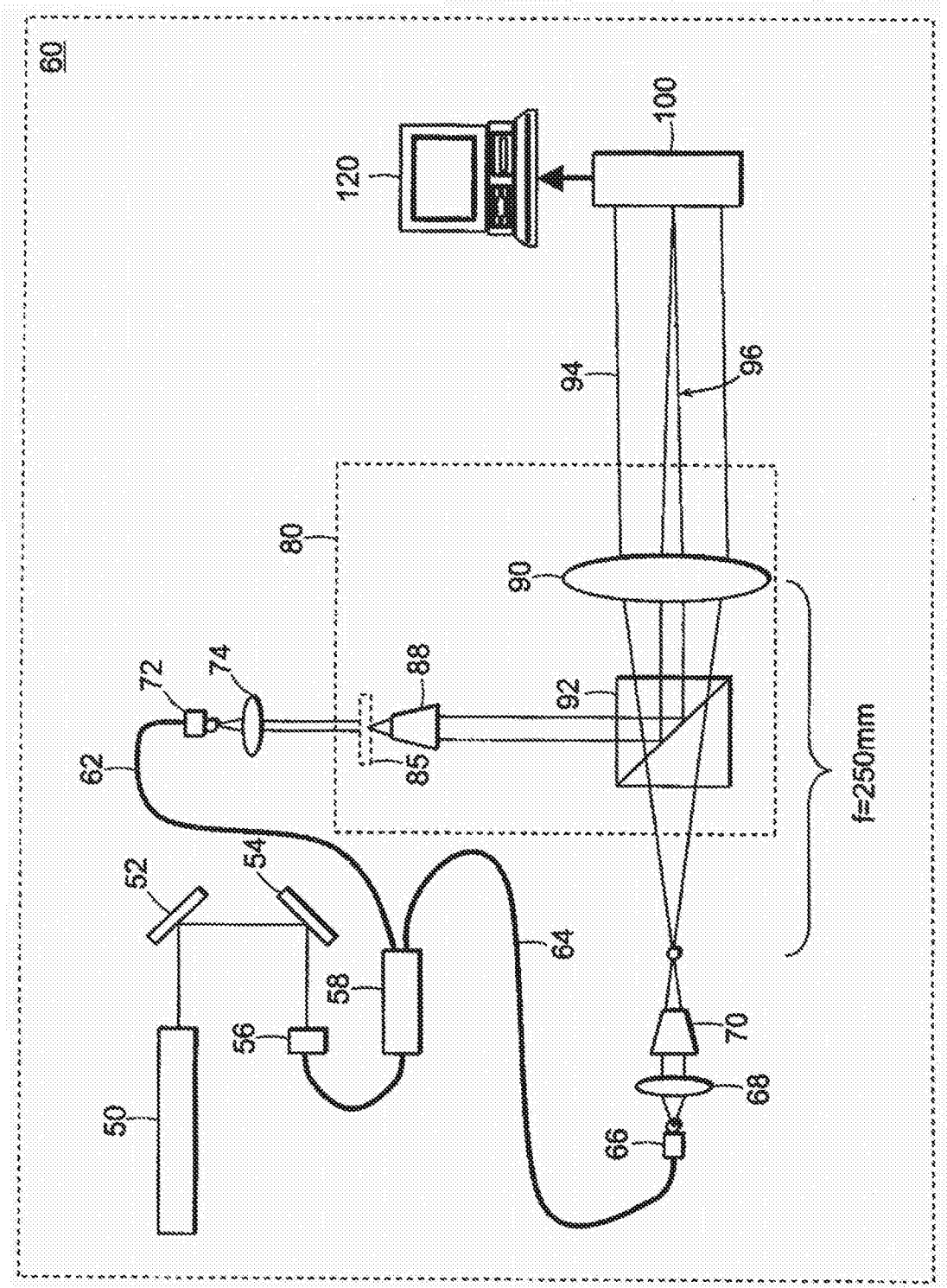


图 4

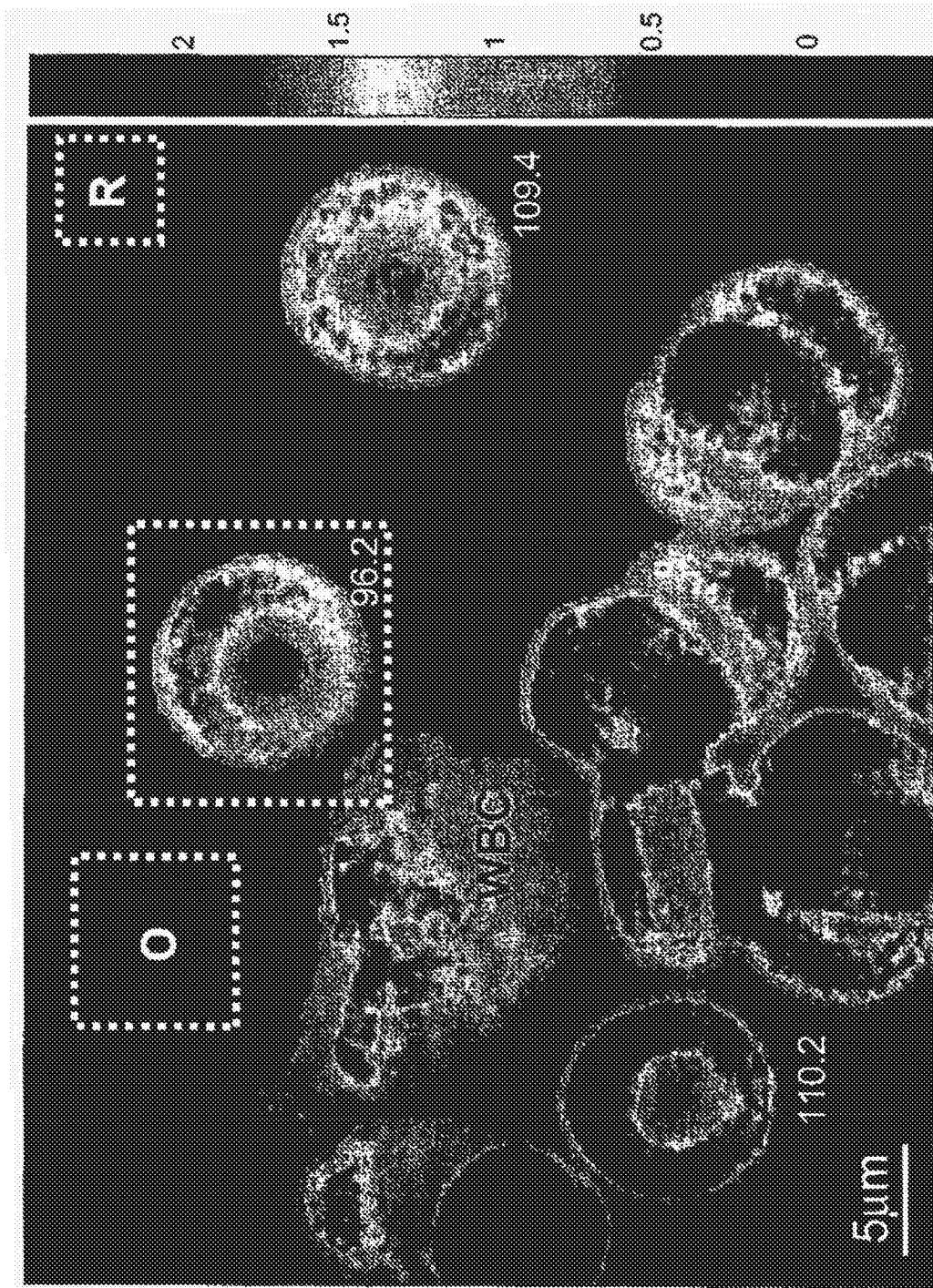


图 5(a)

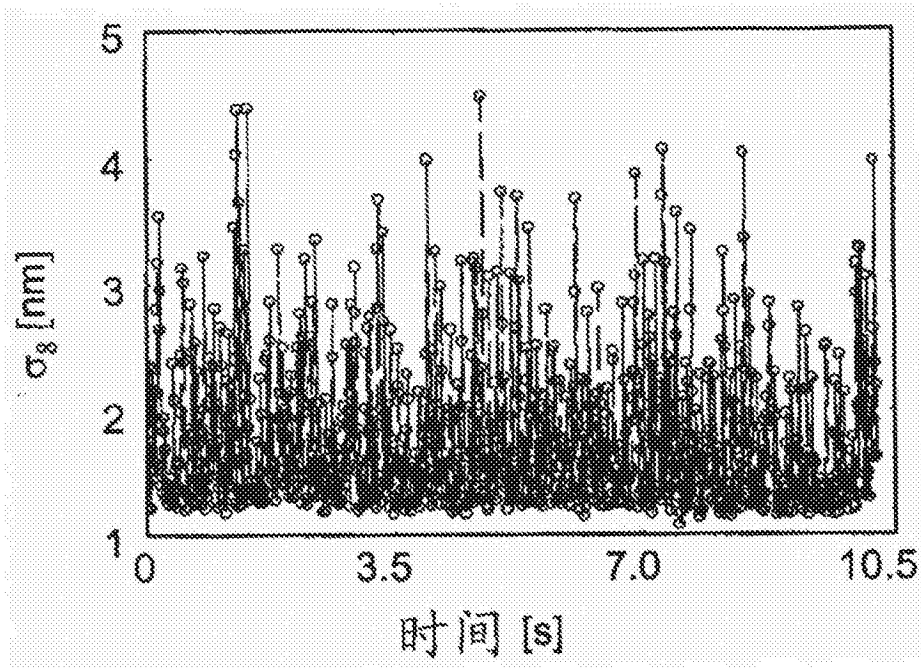


图 5(b)

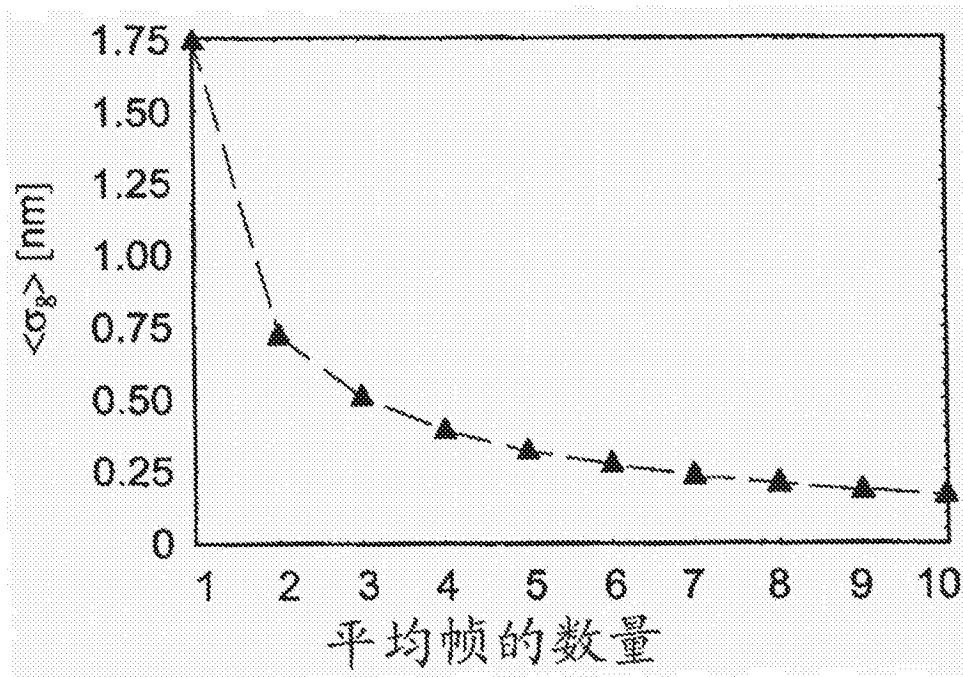


图 5(c)

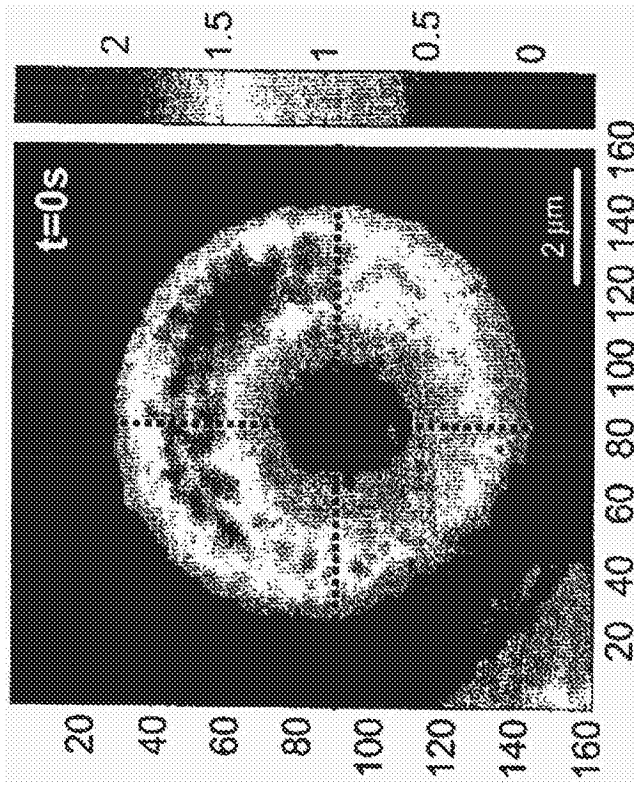


图 6(a)

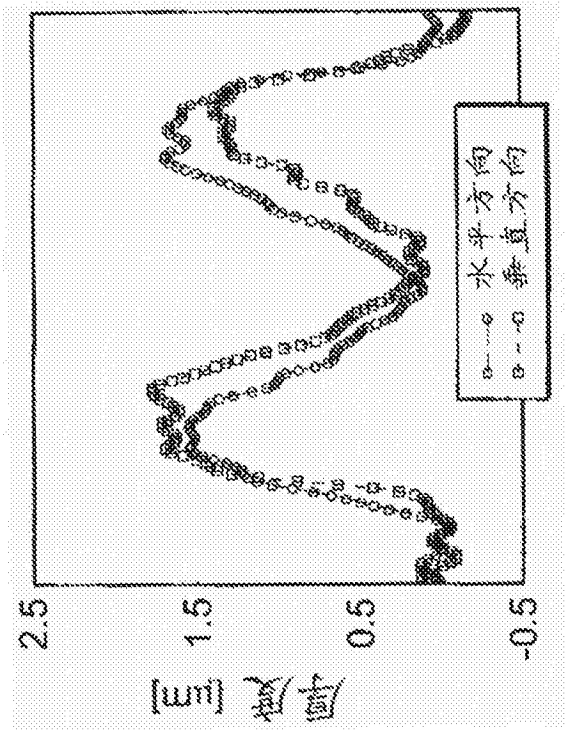


图 6(b)

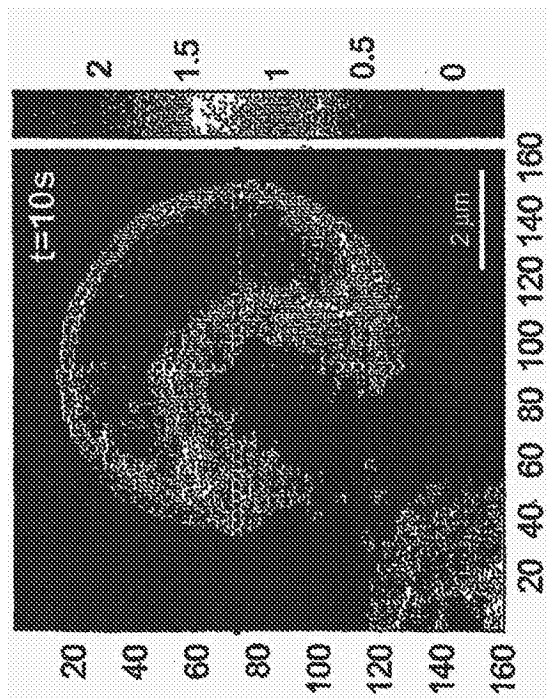


图 6(c)

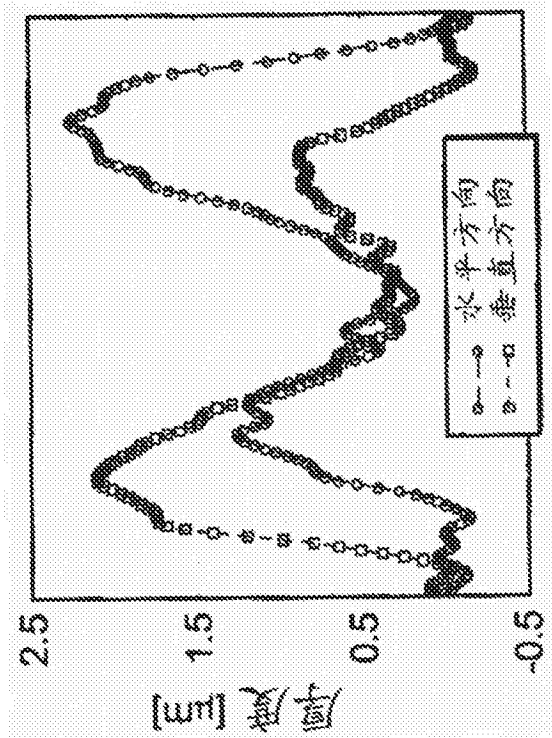


图 6(d)

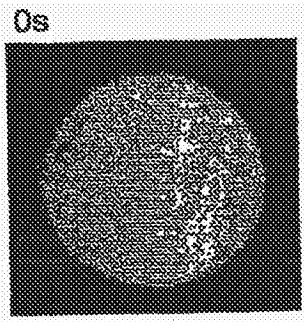


图 7(a)

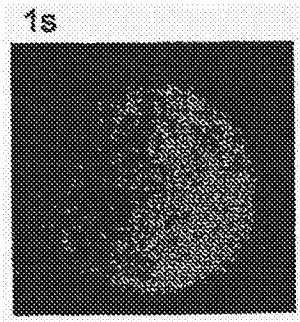


图 7(b)

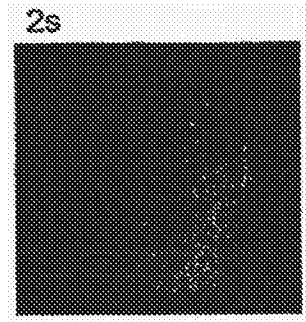


图 7(c)

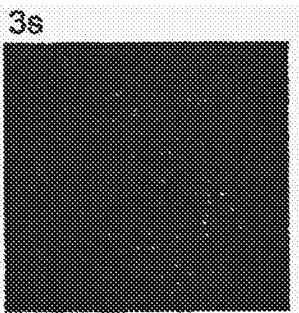


图 7(d)

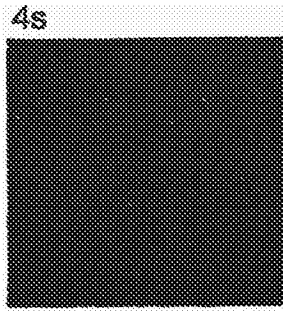


图 7(e)

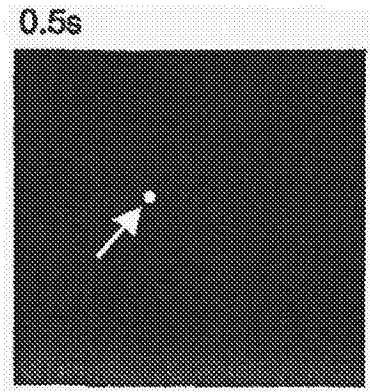


图 7(f)

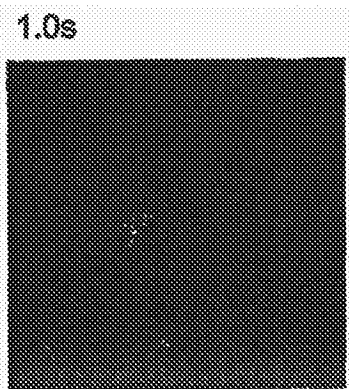


图 7(g)

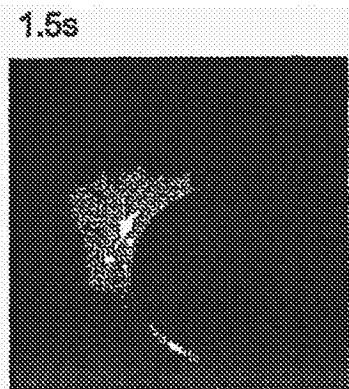


图 7(h)

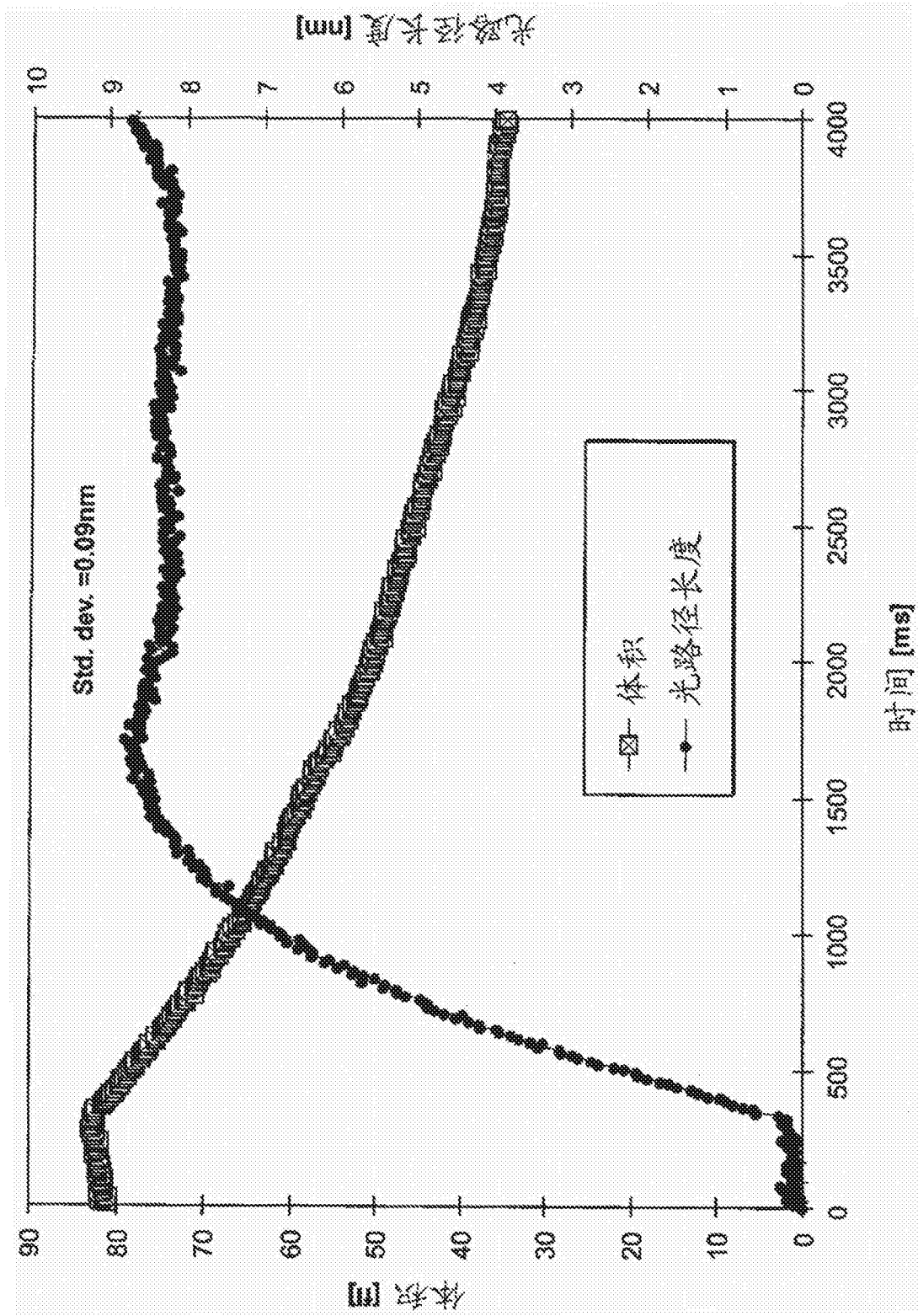


图 7(i)

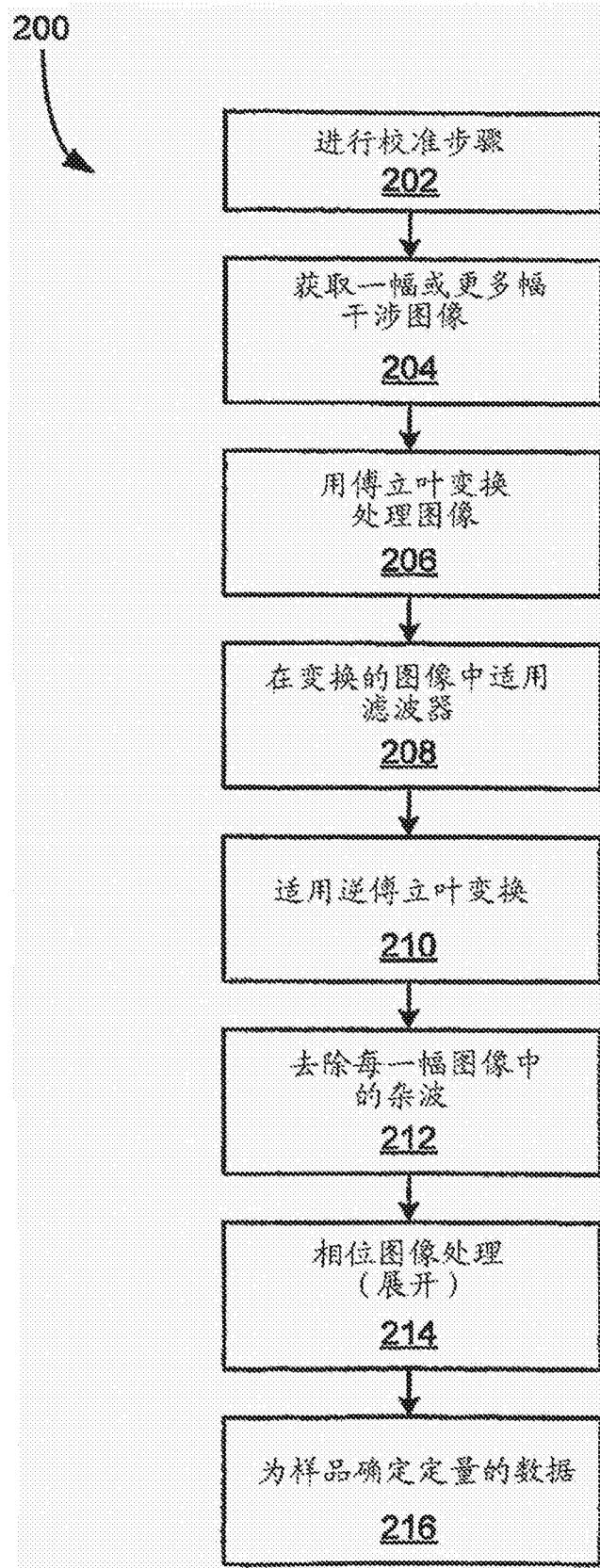


图 8