

小型化无透镜微流控片上生物成像检测

陈津, 黄汐威, 李阳波, 刘季璇, 孙玲玲

(杭州电子科技大学射频电路与系统教育部重点实验室, 浙江 杭州 310018)

摘要: 用于生物医疗成像的传统高分辨率光学显微镜由于复杂的光学透镜系统导致高成本、不便携。为了实现小型化成像检测, 基于 CMOS 图像传感芯片与微流控集成的无透镜微流控片上成像系统近年来发展迅速, 是解决小型化显微成像检测的重要方法。综述了无透镜微流控片上成像系统的结构、成像原理、存在的问题与改进的方法, 主要包括阴影成像系统、全息成像系统、荧光成像系统以及彩色成像系统等, 分析了无透镜微流控片上成像系统的不足和可能的发展方向。

关键词: 片上成像; 无透镜; 微流控; CMOS 图像传感器; 小型化

中图分类号: TP391

文献标识码: A

doi: 10.11959/j.issn.2096-3750.2019.00111

Miniaturized lensless microfluidic on-chip bio-imaging detection

CHEN Jin, HUANG Xiwei, LI Yangbo, LIU Jixuan, SUN Lingling

Ministry of Education Key Lab of RF Circuits and Systems, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, China

Abstract: The conventional high-resolution optical microscopy for biomedical imaging has high cost and low portability due to bulky optical lenses system. To realize miniaturized imaging, the recent advance of lensless microfluidic on-chip imaging technique based on the integration of CMOS image sensor and microfluidics has provided one promising solution. Therefore, the architecture, principle, problems and improvement solutions for different miniaturized lensless microfluidic on-chip bio-imaging, including shadow imaging, holographic imaging, fluorescent imaging and color imaging were reviewed. And the deficiencies and possible development directions were discussed.

Key words: on-chip imaging, lensless, microfluidic, CMOS image sensor, miniaturization

1 引言

当前生物医疗检测研究领域, 由于光学显微镜能够观察微小生物样本如细胞、细菌、荧光粒子等, 并且能直观地将其图像信息反馈给检测人员, 因此, 光学显微成像技术扮演着极其重要的角色。传统的高分辨率光学显微镜往往因光学系统(如物镜与目镜)复杂、体积庞大、价格昂贵、需要专业的操作人员, 使其只适用于医疗单位或研究机构等资源非受限区域。为了克服传统光学显微成像的缺

点, 实现小型化成像, 基于 CMOS 图像传感芯片与微流控集成的无透镜微流控片上成像系统被提出^[1]。一方面, CMOS 集成电路技术能批量制造小型化、低成本的图像传感芯片, 片上集成大量传感像素单元。由于每个微小的传感像素比生物样本(如细胞)具有相近或更小的尺度, 可实现高灵敏度、高分辨率、并行化检测。另一方面, 作为生物芯片基石的微流控技术能在微纳米尺度空间中对流体进行操控, 其基本特征和最大优势是多种单元技术在整体可控的微小平台上能够灵活组合、规模

收稿日期: 2019-03-03; 修回日期: 2019-06-02

通信作者: 黄汐威, huangxiwei@hdu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.61827806, No.61501156); 浙江省钱江人才计划 D 类项目 (No.QJD1802021); 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (No.2017C31064)

Foundation Items: The National Natural Science Foundation of China (No.61827806, No.61501156), Qianjiang Talent Project Type-D of Zhejiang (No.QJD1802021), Public Welfare Technology Application Research Project of Zhejiang (No.2017C31064)

集成。由于生物医疗检测样本如细胞、细菌、蛋白质、DNA 等生物分子通常处于液体环境中，意味着 CMOS 集成传感器需要与流体样品靠近或接触式检测，因此，基于微流控芯片的高通量、自动化和集成化优点，微流控片上实验室能在微米尺度范围内实现生物样本的加载、制备、操控与处理，从而将样本贴近于 CMOS 传感芯片的检测区域，实现整体系统的微型化、低成本、便携式发展。与传统显微镜相比，无透镜微流控片上成像系统不仅没有复杂的光学透镜，而且具有体积小、视野大、性价比高等特点，近年来发展迅速，已经成功地实现了水质检测^[2]、空气质量检测^[3]、细胞检测^[4]和药物筛选^[5-7]等应用，适合资源受限地区和现场即时检测。

近些年，无透镜片上显微成像领域的研究取得了众多成果^[8-10]，原因如下：1) CMOS 图像传感器代替 CCD 图像传感器作为图像捕获元件，使得在 20~30 mm² 的硅基上的像素密度越来越高，如索尼 IMX586 彩色像素单元尺寸已达 0.8 μm，减弱了像素单元尺寸对成像空间分辨率的影响。2) 处理芯片（如 CPU、GPU、DSP、FPGA 等）的计算能力不断提高，但价格和功耗却不断降低，有利于高效率、低成本、便携式的系统集成。3) 提升图像分辨率的算法如压缩解压算法^[11]、图像综合算法^[12-13]以及机器学习算法^[14-16]等成功地应用在无透镜显微镜系统中。因此，本文综述了无透镜微流控片上成像系

统的结构、成像原理、存在的问题与改进的方法，包括阴影成像系统、全息成像系统、荧光成像系统以及彩色成像系统等，在此基础上总结了无透镜微流控片上成像系统的不足和可能的发展方向。虽然有些片上成像系统并未直接集成微流控管道作为生物样本的检测区域，但其对样本的检测仍然依赖微流控或液滴处理，因此，广义地称其为无透镜微流控片上成像。

2 无透镜微流控片上成像原理

无透镜微流控片上成像不是通过透镜放大显微样本，而是依靠高密度的像素阵列捕获样本的影像，然后通过数字图像处理技术恢复图像。实际上，不同的应用场景对样本的影像要求不同，导致无透镜微流控片上成像系统的结构也不同。

2.1 阴影成像检测

无透镜阴影成像的结构与成像效果如图 1 所示，无透镜阴影成像系统的结构如图 1(a)所示，由于其不需要相干光源和滤光片，因此，可以用廉价的 LED 作为光源，待测样本可直接放置在图像传感器上，所获取图像的视野约为图像传感器的有效像素面积。成像原理：在光源的照射下，未被样本遮挡的光线在像素阵列上形成亮区域，而被遮挡的区域在图像上形成泊松亮斑（中央亮点的颗粒衍射现象）。图像传感器把像素阵列上的光信息转换成数字信号，并传给数据处理单元。

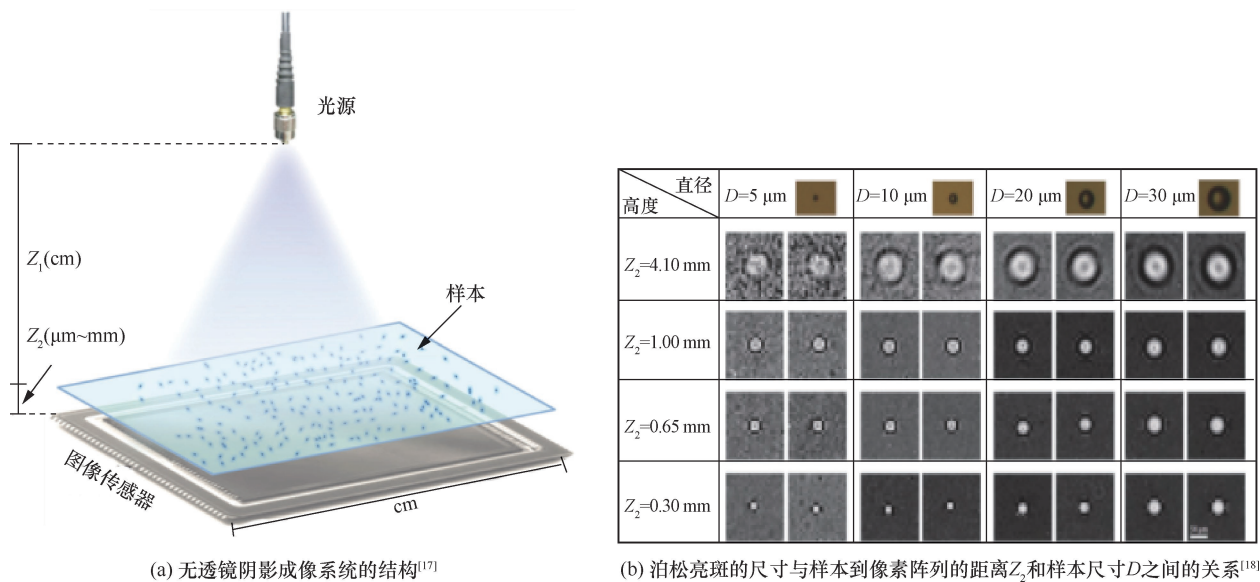


图 1 无透镜阴影成像的结构与成像效果

在无透镜阴影图像系统的结构中，由于没有使用相干光源，导致传感器捕获的图案是宽频带的衍射图案，不能通过衍射积分算法获得样本的结构信息，然而，泊松亮斑的尺寸与样本到像素阵列的距离 Z_2 和样本尺寸 D 之间的关系如图 1(b)所示，说明了样本到图像传感器之间的距离 Z_2 不变时，样本直径越大，在图像传感器表面形成的阴影面积也越大；当样本的大小不变时，由样本引起的阴影面积随 Z_2 的减小而减小。在确定的系统参数下，通过区分阴影的面积实现样本识别^[18-19]。本团队将无透镜系统与微流管道相结合，通过移动检测算法处理，实现了对流动细胞的成像检测与识别计数^[20-21]。

如果样本具有一定的透明度并且面积远大于单个像素点的面积，由于光线通过不同的介质到达图像传感器表面的光强不同，所形成的灰度图像也不同，这样就能够获取具有一定透明度的样本的结构特征。基于这一特性与图像分辨率提升算法，Zheng 等^[22]提出了 SPSM (subpixel perspective sweeping microscope)。SPSM 成像如图 2 所示，图 2(a)中，将屏幕作为光源，由内部 APP 控制光源

的位置。通过改变光源的位置得到一系列两两略微差别的图像，不同角度的光源在传感器上阴影的区别如图 2(b)所示，最后通过合成方法将原本单个像素的空间划分成多个更小的空间，实现了 $6\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 的视野和 660 nm 的分辨率^[22]。虽然 SPSM 既保留了无透镜系统的优点，又得到了高分辨率，但是这种结构对焦距敏感，如果细胞偏离焦点，分辨率会急剧下降，通过 SPSM 观测到的细胞分裂情况如图 2(c)所示。

同样是对具有一定透明度的样本进行结构还原，OFM (optofluidic microscope)^[23]的结构被提出，OFM 成像如图 3 所示。在图像传感器表面镀上不透明的金属层，然后在金属层上沿微流管道的对角线方向打小孔阵列，如图 3(a)所示，每个小孔对应像素点的中心，如图 3(b)所示。用直流电场驱动贾第鞭毛虫滋养体或囊肿溶液^[24]从金属镀层的小孔上方流过，实现对样本的扫描。获得的多份原始低分辨率图像与分辨率提升算法相结合，最终图像的分辨率达 800 nm ，且能够观察到贾第鞭毛虫滋养体或囊肿的结构信息，如图 3(c)所示。由于通光

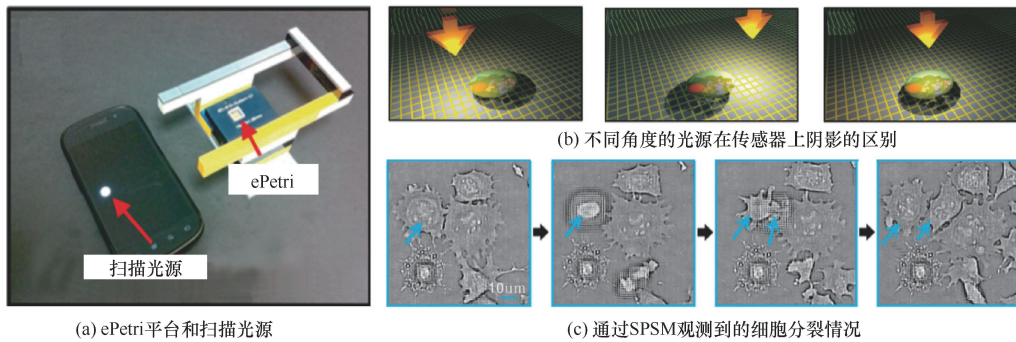


图 2 SPSM 成像^[22]

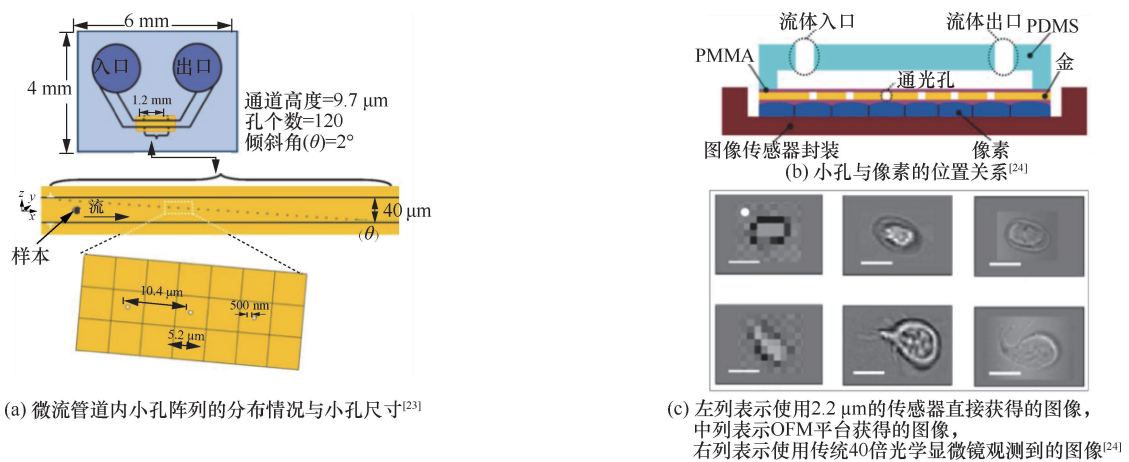


图 3 OFM 成像

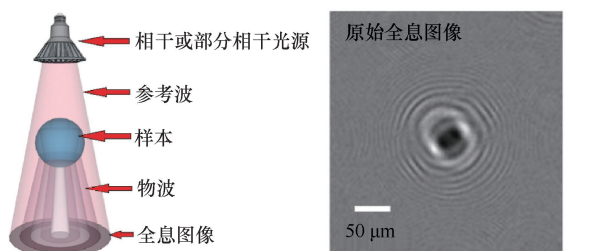
小孔只分布在微流管道内，成像的有效面积也被限制在微流管道的区域，所以 OFM 的视野变小。

2.2 全息成像检测

无透镜全息成像可以在无污染、不接触样本、不移动样本的情况下还原样本的形态信息，全息图像形成原理如图 4 所示。全息投影的典型结构如图 4(a)所示，与阴影成像不同的是，照射的光源需要相干光或部分相干光。成像原理：当相干光即参考波 $R(x, y, z)$ 照射样本时，光在样本表面发生散射形成物波 $O(x, y, z)$ ，参考波与物波在传感器阵面上叠加，形成干涉图，也被称为全息图，物波的幅度信息与相位信息被记录在全息图中，数字全息成像系统捕获的影像如图 4(b)所示。同时，参考波与参考波之间、物波与物波之间也会形成干涉图，计算式如下

$$|R+O|^2 = |R^2| + |O^2| + R^*O + RO^* \quad (1)$$

在式(1)中， R 表示参考波， O 表示物波， $*$ 表示共轭。等号右侧的第一项表示参考波与参考波之间的干涉，没有包含被测样本的信息，可认为是背景噪声与无样本时的全息图相减，可去除背景噪声；第二项表示物波与物波之间的干涉，由于物波的能量比参考波的能量弱得多 ($|O| < |R|$)，所以与最后两项相比可以被忽略；最后两项用于物像恢复。



(a) 全息投影的典型结构^[25] (b) 数字全息成像系统捕获的影像^[26]

图 4 全息图像形成原理

通过上述分析可知，在全息系统中，传感器记录的只是干涉条纹，不能直接观察到样本的形态信息。在模拟域内，用同样的参考波照射在全息图案上就能够还原出物像，模拟还原方法不作为本文的关注点。在数字重建中，用数学公式表示参考波的波前量，再用它模拟光路传播，在样本平面（与传感器的距离 Z_2 处的平面）形成的光影即重建的图像。常用的数字重建算法是基于菲涅尔（Fresnel）的衍射积分

$$E_2(x_2, y_2, z_2) = \frac{i}{\lambda z_2} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda} z_2} \quad (2)$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} E_1(x_1, y_1, 0) \cdot e^{-i\frac{\pi}{\lambda z_2} ((x_2-x_1)^2 + (y_2-y_1)^2)} dx_1 dy_1$$

其中， E_1 表示在全息平面上的标量电场， x_1 、 y_1 表示全息平面上的坐标轴， E_2 表示样本所在平面的标量电场， x_2 、 y_2 表示样本平面上的坐标轴， z_2 表示全息平面与样本平面之间的距离， λ 表示参考波的波长。

如果直接使用衍射积分算法获取高精度的图像，要付出巨大的计算量，所以不适用于重建大面积高分辨率的图像。实际中可使用角谱法（angular spectrum approach）来计算衍射积分函数，其表达式为

$$E_r = F^{-1} \{ F(E_i(x, y)) \cdot H_{z_2}(x, y) \} \quad (3)$$

其中， F 表示傅里叶变换， F^{-1} 表示傅里叶逆变换， E_r 表示重建后的物像， $E_i(x, y)$ 表示全息图像数据， $H_{z_2}(x, y)$ 表示图像传感器到样本之间的介质的传输函数，其中， z_2 表示图像传感器到样本的距离。

数字重建算法的优点：不需要庞大的光路空间；使用数字掩膜减弱孪生图像效应（twin imaging artifact）^[27]，提升重建物像的信噪比；重建的图像能够直接用于后期的数据分析中^[28]。

由式(2)可知，重建图像的结构信息与垂直于光轴的距离 z_2 有紧密的关系，为了还原样本的边界信息， z_2 要等于实际的样本与传感器之间的间隔，实际应用中的偏差不能超过 $\pm 10 \mu\text{m}$ 。然而，如果以扫描的方式改变 z_2 的值并重建物像，理论上能够获取不同高度的二维样本影像，通过合成这些影像，得到三维影像^[29]。

2.2.1 基于球面波的同轴数字全息显微镜

球面波全息成像与重建如图 5 所示，基于球面波的全息成像系统结构如图 5(a)所示， L 表示相干光源， P 表示与波长可比拟的小孔， O 表示样本， C 表示波阵面，实线表示参考波，虚线表示物波，最早由 Gabor 提出^[1]。获取的全息图像如图 5(b)所示，通过全息重建算法重建的物像如图 5(c)所示。其特点是：样本离点光源的距离 z_1 远小于样本离像素平面的距离 z_2 。由光的直线传播特性可知，与样本原本的边缘尺寸相比，在传感器上形成的干涉图案的边缘被放大了 M 倍。由几何关系可知 $M = 1 + z_2 / z_1$ ，典型的放大倍数在 10~35。球面波

全息的结构克服了因传感器像素尺寸大而造成分辨率低的问题，已获得了微米级的分辨率^[30]，此结构也能用于跟踪样本移动^[31]，进而实现流体的检测或细胞活性的检测。

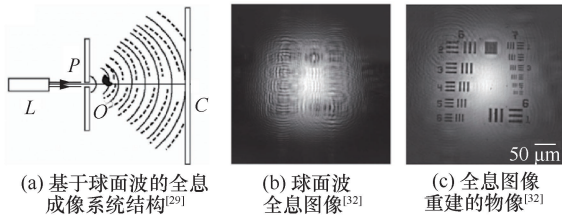


图 5 球面波全息成像与重建

通过一些物理方法或计算方法，可进一步提升重建图像的分辨率。在计算方法上，可以通过对衍射积分算法进行改进^[33]，也可以通过多波长的相干光与相位迭代算法^[34]相结合^[32]，或通过移动点光源与相位迭代算法相结合^[35]获取高信噪比的全息图像。在物理方法上，通过在样本与传感器之间填充高折射率的介质（如油），利用折射现象，以减小粒子阴影重合，数值孔径（NA, numerical aperture）从 0.4 增加到 0.55^[36]。

通过上述案例分析可知，基于球面波的全息成像系统能够有效地克服受像素直径限制的分辨率问题，其代价是牺牲了观测的视野。随着半导体工艺的进步与 CMOS 图像传感器的出现，像素直径大造成的影响已经减小，基于平面波的同轴数字全息显微镜得以应用。

2.2.2 基于平面波的同轴数字全息显微镜

平面波全息成像与重建如图 6 所示，基于平面波的同轴全息显微镜的结构与球面波的结构相比，显著的不同点是样本到点光源的距离 z_1 远大于样本到像素平面的距离 z_2 ($z_2 < 5 \text{ mm}$)，所以在样本平面与像素平面之间的光近似平行光，如图 6(a)所示。由点光源、样本和传感器的空间位置的几何关系可知，其边缘放大倍率 $M \approx 1$ ，因此，能够观察到样本的视野约为图像传感器的有效面积。全息成像需要相干光源或部分相干光源，已经证明 LED+小孔或 LED+多模光纤的组合能够产生有效的部分相干光^[38]。这种点光源结构既能够减少系统的成本，也减弱了相干光和其在内壁上反射后在像素平面上形成的干扰图像。图 6(c)列举了全息影像经过相位重建或幅度重建的影像，与 40 倍传统光学显微镜相比，全息重建的物像能够观察到样本的形态。

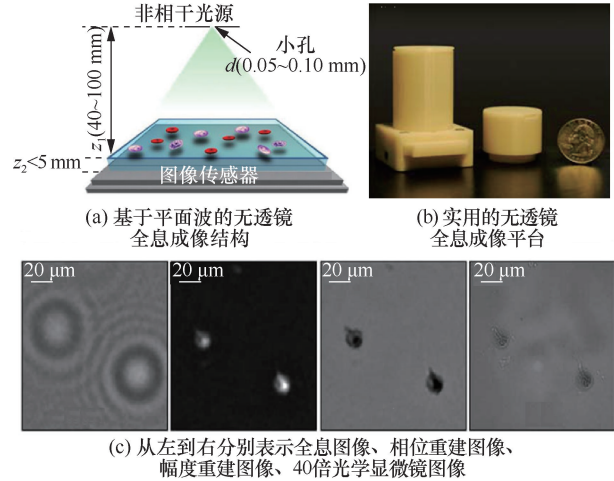


图 6 平面波全息成像与重建

由于图像传感器只能记录光的强度信息，没有完整的相位信息。如果直接用一个原始的全息图重建物像，会导致重建的物像分辨率低，并且有显著的孪生图像，在多数应用场景下都不能满足要求。为了克服这一问题，相位迭代的方法和合成孔径^[13,39]的方法被提出，用于恢复全息图像的相位信息，并成功应用在无透镜全息图像系统中。这些方法需要获取同一样本的多张原始低分辨率的全息图像，并且这些全息图像两两之间存在细微差别。在基于平面波的同轴全息图像系统中，通过改变光源的位置^[40]、改变样本与传感器之间的距离 z_2 ^[41]或改变照射光源的波长^[42]来获取原始低分辨率下两两之间存在细微差异的全息图像集合。

基于平面波的同轴数字全息显微镜系统已经得到成功应用，Mudanyali 等^[2]实现了对水质中的 *G. Lamblia Cyst*、*C. Parvum* 和 *Giardia Lamblia Trophozoites* 微生物的检测，获取的视野面积达 24 mm^2 ，最低的检测浓度约为 380 parasites/ml 。在参考文献[43]实现的酵母细胞活性和浓度检测中，活性检测的正确率约为 97.6%，浓度检测范围为 $1.4 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 。在参考文献[44-46]中，实现了精子的活性检测与运动轨迹跟踪。Li 等^[47]对全息图像提出了一种新的应用：不需要重建物像，根据活细胞与死细胞的形态不同导致的全息图像第一亮条纹和第一暗条纹的差异，实现细胞活性检测，与标准设备测试结果相似度高达 98.37%。

由上述可知，无透镜全息显微镜的两种结构各有特点，球面波的结构可以提高图像的分辨率，但

缩小了观察视野。而平面波的结构可以获得更广的视野，但原始的图像分辨率却降低了。Sanz 小组^[48]在每个像素前添加一个波长选择通道，实现一个像素只对一种波长的光有效，双模全息系统如图 7 所示，每个像素前添加一个波长选择通道如图 7(a)所示。然后利用透镜聚焦的原理对光源进行调制，平面波与球面波的光路如图 7(b)所示，可知绿光经透镜调试后平行地照射在物体上，实现了平面波成像；洋红色的光经透镜调试后在样本上方聚焦，使得照射到样本上的洋红色的光是球面波。因此，图像传感器一次成像可以同时捕获球面波全息图像和平面波全息图像。经过图像重建后，球面波的全息图像观测到的样本面积约为 $300\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ ，图像分辨率达 $1.7\ \mu\text{m}$ ，而平面波成像实现了 $4.6\ \text{mm} \times 6.1\ \text{mm}$ 的视野和 $7.8\ \mu\text{m}$ 的分辨率。

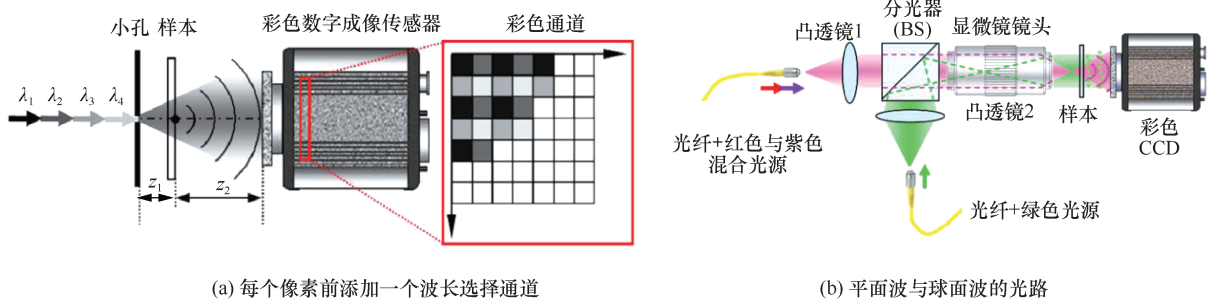
2.3 荧光成像检测

荧光标记方法利用荧光物质在特定波长的激励下会发出荧光，能够从众多观测对象中发现期望的目标，在诸多领域中都是非常有效的观测方法，如共焦显微镜（CLSM, confocal laser scanning microscope）。无透镜荧光成像原理如图 8 所示，无透镜荧光显微镜与传统显微镜的不同点在于观测

面积大且结构简单，其结构如图 8(a)所示。当激励光源照射在含荧光物质的样本上，样本会激发出荧光。向传感器方向传播的荧光经过滤光片到传感器表面，并被传感器捕获，通过后期的数据处理，实现荧光分子的统计。因为激励光与荧光的波长不同，所以滤光片可以隔离激励光到达传感器表面，提升原始图像的信噪比。

通常情况下，激励光与荧光的波长相差不大，为了保证原始图像的信噪比，需要使用高性能的滤光片，导致系统的成本增加。在传统荧光显微镜中基于入射光的全反射技术^[49]也在无透镜荧光成像系统中得以应用，如图 8(b)所示。根据介质的折射率不同，激励光在棱镜与载玻片的交界处发生全反射，这样使用廉价的滤光片就能很好地消除激励光对成像的干扰^[50-51]。

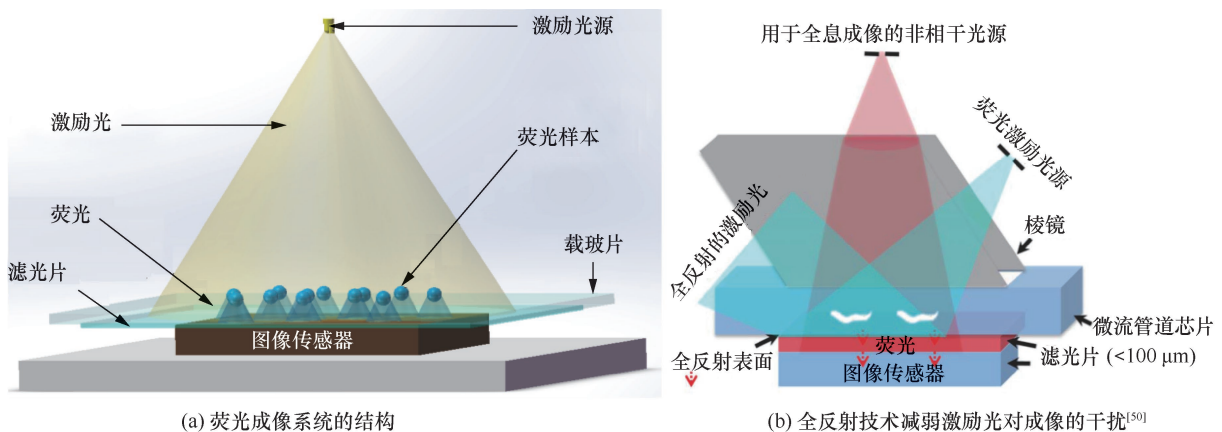
在无透镜荧光成像系统中，由于荧光分子在激励后变为发光体，且样本不能紧贴着像素平面，所以存在点扩散函数（PSF, point spread function），造成传感器记录的亮域面积远大于荧光分子的截面积，限制了样本的分布密度。为了解决这一问题，改进的系统结构和分辨率提升算法被提出，无透镜荧光成像在算法与结构上的改进如图 9 所示。在算



(a) 每个像素前添加一个波长选择通道

(b) 平面波与球面波的光路

图 7 双模全息系统^[48]



(a) 荧光成像系统的结构

(b) 全反射技术减弱激励光对成像的干扰^[50]

图 8 无透镜荧光成像原理

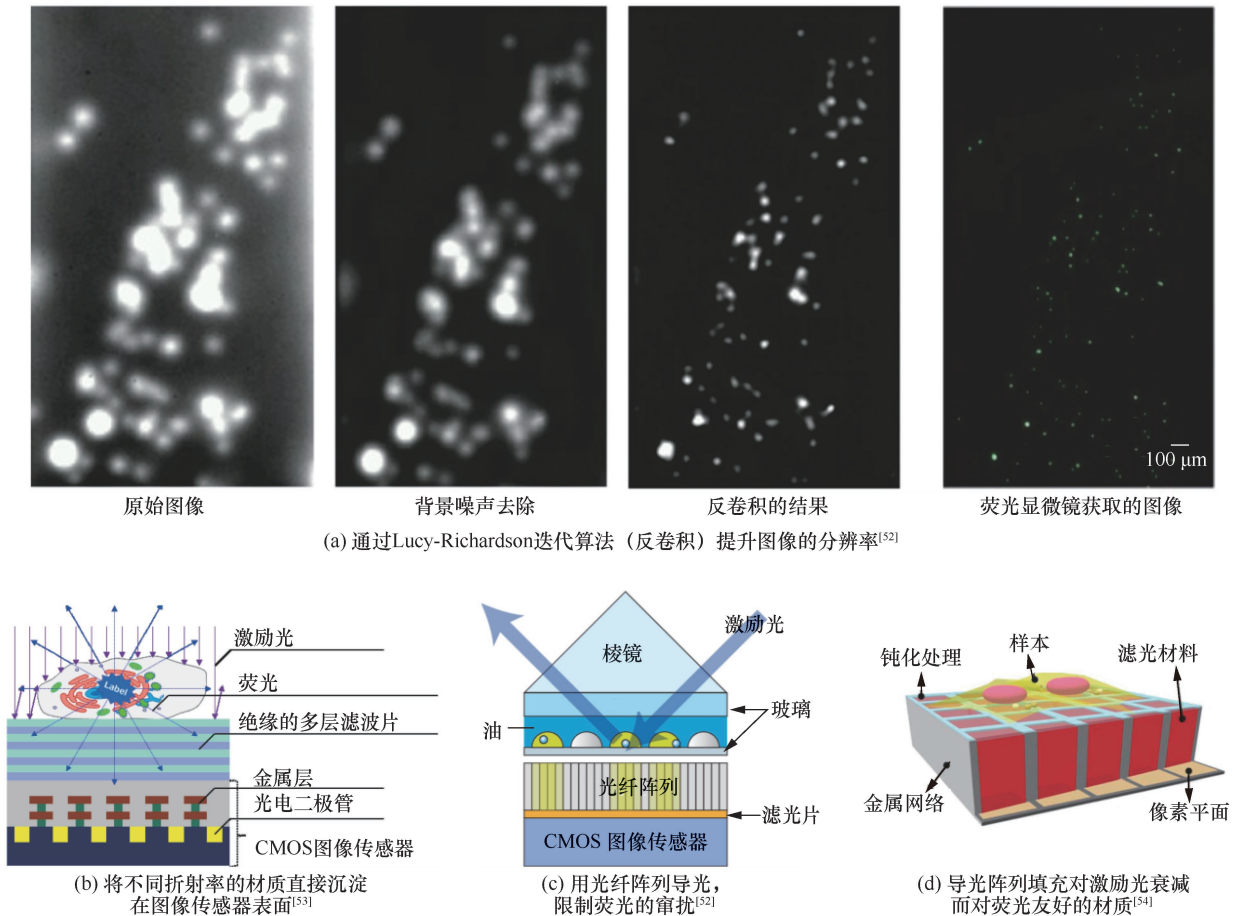


图 9 无透镜荧光成像在算法与结构上的改进

法上有 Lucy-Richardson 反卷积法^[55-56], 如图 9(a) 所示, 通过背景干扰去除和反卷积后, PSF 效应得到了改善, 参考文献[57]中, 实现了 40 μm 的分辨率、压缩解压算法^[50]和 Talbot Illumination Scanning 法^[58]。在结构上, 减小样本与像素平面之间距离的方法包括直接法和间接法。直接法: 去掉载玻片, 压缩滤光片的厚度, 最后将样本直接置于滤光片上。如参考文献[54]中, 在像素平面上直接沉淀不同折射率的材质, 使其具有良好的滤波性, 同时将厚度减小到 4 μm , 实现了小于 10 μm 的分辨率, 如图 9(b)所示。间接法: 将图 8(a)中的载玻片与滤光片之间的空隙用导光介质阵列填充, 如图 9(c)所示的光纤阵列, 进一步地可以将导光阵列中的介质换成对激励光衰减而对荧光友好的材料^[54,59], 如图 9(d)所示, 这样可以不使用滤光片和载玻片。

2.4 彩色成像检测

前面所述的阴影、全息、荧光的无透镜显微镜系统, 最终的成像都是灰度图像。现实中, 彩色图像能够更充分地反映被测样本的信息, 有利于使用

者缩短从传统显微镜到无透镜显微镜的过渡时间。

目前, 在无透镜平台上获取样本的彩色信息主要有两种方法。一种是由 R、G、B 光源合成彩色图像, 如图 10 所示; 另一种是通过小波图像融合算法^[60], 将无色彩的高分辨率图像与彩色的低分辨率图像合成高分辨率的彩色图像。

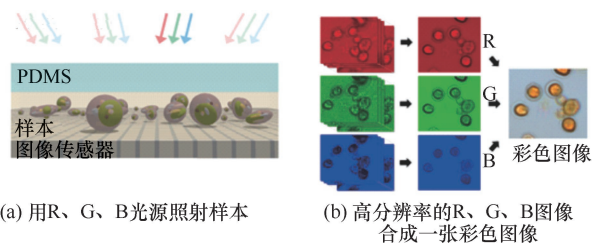


图 10 由 R、G、B 光源合成彩色图像^[61]

基于阴影图像平台的 RGB 合成方法^[62], 依靠彩色图像传感器上的彩色滤波片来实现 R、G、B 光源分量的获取, 如在图 3(b)所示的 OFM 平台上进行改进: 由原来斜对角的一排小孔平行增加一排, 将传感器换成彩色图像传感器, 使用白光照射,

然后分别恢复 R、G、B 图像，最后合成彩色图像。通过前文分析可知，OFM 平台通过扫描的原理能够有效地还原样本的结构信息，所以合成的彩色图像既能看到结构信息，也能看到彩色信息。但受限于结构，观测视野依然很小。

基于全息图像平台的 RGB 合成方法^[63-65]，分别使用 R、G、B 部分相干光源照射样本，通过分辨率提升算法与图像重建算法恢复对应光源的物像，最后合成彩色图像。这种方法既能保证大视野，又能直接观察到被测物体的结构信息和色彩信息。

RGB 合成方法简单且易于实现，但其结果伴随着彩色虹光影像，彩色虹光干扰和减弱虹光的方法如图 11 所示，幅度组合和相位组合的彩色图像如图 11(a)和图 11(b)所示，可以通过 YUV 色域平均法或 Dijkstra 最短路径法减弱彩色虹光的影响^[63]，如图 11(c)和图 11(d)所示，通过传统 20 倍光学显微镜观察的结果如图 11(e)所示。

虽然白光能够通过 R、G、B 三基色合成，但是 3 种颜色的比例不同，最终的白平衡效果也不同，能否很好地还原出被测物体的色彩并不确定。为了解决这个问题，Zhang 等^[66]提出了 DCFM (digital color fusion microscopy)，在无透镜成像系统平台上获取一张高分辨率的灰度图像，然后将样本放置在附件与智能手机组合的平台上，利用智能手机的相机或其他能够正确记录样品色彩的平台获取一张低分辨率的彩色图像，再用小波图像融合算法 (wavelet-based image fusion algorithm) ^[60]实现高分

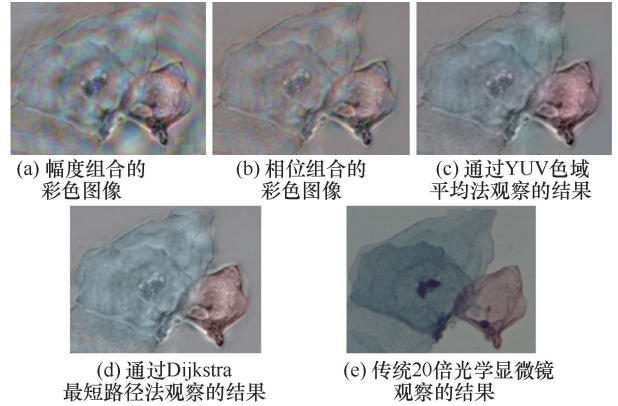


图 11 彩色虹光干扰和减弱虹光的方法^[63]

辨率的彩色图像，小波图像融合算法获取高分辨率彩色图像如图 12 所示。

3 结束语

本文探讨并总结了基于阴影、全息、荧光、彩色等的小型化无透镜微流控片上成像，无透镜成像技术比较如表 1 所示。无透镜阴影成像使用普通的光源照射样本，基于阴影的大小实现对样本的计数，可以通过增加系统的复杂度和计算量如 OFM 和 SPSM，实现对样本的形态观测。无透镜全息成像根据光源、样本和像素平面之间的距离关系，分为球面波全息成像和平面波全息成像，球面波全息成像能够放大样本的全息图，减小像素尺寸对分辨率的影响，但是其观测的视野也会减小；平面波全息成像凭借对样本形态的呈现和大视野，得到越来越广泛的应用。无透镜荧光成像需要特定波长的激

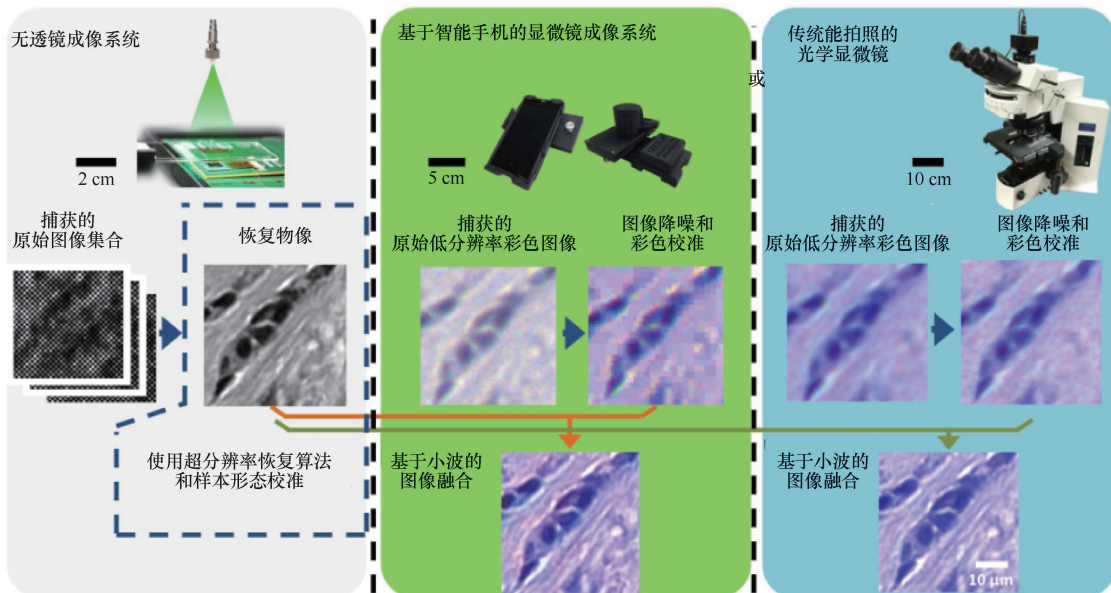


图 12 小波图像融合算法获取高分辨率彩色图像^[66]

励光源和滤光片, 能够识别特殊标记的样本, 也得到了广泛应用。在无透镜彩色成像方法中, 除了荧光成像外, 阴影成像和全息成像都能通过 RGB 合成法或小波融合法得到具有样本形态信息的彩色图像。

表 1 无透镜成像技术比较

系统	阴影	全息	荧光
光源	单色光或白光	相干或部分相干	特定波长
结构特征	样本靠近像素平面	LED+小孔	滤光片
样本属性	不透光或部分透光	不透光或部分透光	荧光标记
计算量	中等	极大	中等
恢复彩色细节	可以	可以	不能

虽然无透镜成像系统已经得到一定的成功应用, 但仍然存在一些问题, 阻碍了无透镜成像系统的普及, 主要包括样本的预处理、分辨率提升和数据处理。

目前的无透镜成像系统不能直接检测高密度的样本, 如未稀释的全血血液。对于无透镜阴影成像, 高密度导致样本紧挨在一起, 阴影重合, 不能区分。对于无透镜全息成像, 高密度的样本使得更多的参考光在样本边缘形成散射, 导致参考波能量减弱, 在像素平面上形成假的、物波自干涉的全息图像。常用的方法是对高密度的样本溶液进行稀释, 然而稀释需要特定的试剂和操作规范, 导致预处理工作复杂, 操作不当会直接影响检测效果。将无透镜成像系统与微流控样本前处理技术相结合成为一种发展趋势, 如声泳、电泳等, 能够在物理上实现样本的提纯和分类, 将原本的静态样本转换成流动的流体, 实现连续检测。

无透镜成像系统可实现微米到数百纳米的分辨率, 对于 POC (point of care) 的应用, 可以有效地检测细胞。但是对于生物病毒而言, 由于它们的尺寸大多在 100 nm 以下, 需要对病毒样本进行预处理, 如通过蒸汽沉淀法^[67]为样本套上聚乙二醇 (PEG), 增大样本的体积和折射率, 或者通过免疫结合的标记方法实现对抗原抗体的检测。然而这些检测具有较高的成本和复杂的操作过程, 因此, 为了实现更简便的应用, 无标记检测技术将成为发展方向。

如何快速、准确地分析图像, 并给出结论性的信息是研究的重点。无论是传统的光学显微镜还是无透镜成像系统, 要给出结论的前提是能对观察到的样本进行分类与识别。传统的方法常用人工方

法, 不仅效率低, 还会受操作者的主观意识影响。现在先进的机器学习与深度学习的方法能够通过建立数学模型, 用标准的已标记样本图像集合训练与校准模型, 获取待分析图像的特征矢量, 并输入到训练好的模型中, 实现对样本的快速识别与分类, 在无透镜成像平台上已实现细胞活性检测^[43,68]、流体样本检测^[15,69]和空气质量检测^[3], 是未来的发展趋势。

无透镜成像平台的低成本、易操作、适合大规模分布等优点, 与大数据^[70]和通信网络相结合, 创建统一数据格式和远程网络服务站点的方法, 服务于社会, 将有利于实现远程医疗的普及, 特别是对资源受限区域和全球范围内疾病的监控。

参考文献:

- [1] GABOR D. A new microscopic principle[J]. *Nature*, 1948, 161(4098): 777.
- [2] MUDANYALI O, OZTOPRAK C, TSENG D, et al. Detection of waterborne parasites using field-portable and cost-effective lensfree microscopy[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(18): 2419-2423.
- [3] WU Y C, SHILEDAR A, LI Y C, et al. Air quality monitoring using mobile microscopy and machine learning[J]. *Light-Science & Applications*, 2017, 6: 12.
- [4] BALAKRISHNAN P, DUNNE M, KUMARASAMY N, et al. An inexpensive, simple, and manual method of CD4 T-cell quantitation in HIV-infected individuals for use in developing countries[J]. *JAIDS—Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2004, 36(5): 1006-1010.
- [5] DITTRICH P S, MANZ A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(3): 210-218.
- [6] LEE S, ONCESCU V, MANCUSO M, et al. A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(8): 1437-1442.
- [7] STARKUVIENE V, PEPPERKOK R. The potential of high-content high-throughput microscopy in drug discovery[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2007, 152(1): 62-71.
- [8] GREENBAUM A, LUO W, SU T W, et al. Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(9): 889-895.
- [9] GOROCS Z, OZCAN A. On-chip biomedical imaging[J]. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 2013, 6: 29-46.
- [10] ISIKMAN S O, BISHARA W, MUDANYALI O, et al. Lensfree on-chip microscopy and tomography for biomedical applications[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2012, 18(3): 1059-1072.
- [11] YUAN X, PU Y C. Parallel lensless compressive imaging via deep convolutional neural networks[J]. *Optics Express*, 2018, 26(2): 1962-1977.
- [12] LUO W, GREENBAUM A, ZHANG Y B, et al. Synthetic aperture-based on-chip microscopy[J]. *Light-Science & Applications*, 2015,

- 4: 9.
- [13] ALEXANDROV S A, HILLMAN T R, GUTZLER T, et al. Synthetic aperture fourier holographic optical microscopy[J]. *Physical Review Letters*, 2006, 97(16): 4.
- [14] WEI Q S, MCLEOD E, QI H F, et al. Lensfree holographic cytometry using plasmonic nanoparticles[C]//2013 IEEE Photonics Conference. IEEE, 2013: 3-4.
- [15] HUANG X W, GUO J H, WANG X L, et al. A contact-imaging based microfluidic cytometer with machine-learning for single-frame super-resolution processing[J]. *Plos One*, 2014, 9(8): 10.
- [16] DELACROIX R, MOREL S N A, HERVE L, et al. Cerebrospinal fluid lens-free microscopy: a new tool for the laboratory diagnosis of meningitis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 8.
- [17] OZCAN A, MCLEOD E. Lensless imaging and sensing[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2016, 18: 77-102.
- [18] SU T W, SEO S, ERLINGER A, et al. High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(3): 856-868.
- [19] SU T W, SEO S, EDINGER A, et al. High-throughput cell imaging, counting and characterization on a chip[M]. New York: Amer Soc Mechanical Engineers, 2009.
- [20] HUANG X, FAROOQ U, CHEN J, et al. A surface acoustic wave pumped lensless microfluidic imaging system for flowing cell detection and counting[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 2017, 11(6): 1478-1487.
- [21] 黄沙威, 程涛, 丁诚翔, 等. 无透镜微流控成像流动细胞检测与计数系统[J]. *传感器与微系统*, 2017, 36(5): 94-98.
- HUANG X W, CHENG T, DING C X, et al. Lensless microfluidic imaging flow cell detection and counting system[J]. *Transducer and Microsystem Technologies*, 2017, 36(5): 94-98.
- [22] ZHENG G A, LEE S A, ANTEBI Y, et al. The ePetri dish, an on-chip cell imaging platform based on subpixel perspective sweeping microscopy(SPSM)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(41): 16889-16894.
- [23] HENG X, ERICKSON D, BAUGH L R, et al. Optofluidic microscopy—a method for implementing a high resolution optical microscope on a chip[J]. *Lab on a Chip*, 2006, 6(10): 1274-1276.
- [24] LEE L M, CUI X Q, YANG C H. The application of on-chip optofluidic microscopy for imaging *Giardia lamblia* trophozoites and cysts[J]. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(5): 951-958.
- [25] ROY M, SEO D, OH S, et al. A review of recent progress in lens-free imaging and sensing[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 88: 130-143.
- [26] BISHARA W, SIKORA U, MUDANYALI O, et al. Holographic pixel super-resolution in portable lensless on-chip microscopy using a fiber-optic array[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(7): 1276-1279.
- [27] CHO C, CHOI B, KANG H, et al. Numerical twin image suppression by nonlinear segmentation mask in digital holography[J]. *Optics Express*, 2012, 20(20): 22454-22464.
- [28] SEO D, OH S, LEE M, et al. A field-portable cell analyzer without a microscope and reagents[J]. *Sensors*, 2018, 18(1): 14.
- [29] XU W, JERICHO M H, MEINERTZHAGEN I A, et al. Digital in-line holography for biological applications[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(20): 11301-11305.
- [30] XU W, JERICHO M H, MEINERTZHAGEN I A, et al. Digital in-line holography of microspheres[J]. *Applied Optics*, 2002, 41(25): 5367-5375.
- [31] GARCIA-SUCERQUIA J, XU W B, JERICHO S K, et al. Digital in-line holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2006, 45(5): 836-850.
- [32] NOOM D W E, EIKEMA K S E, WITTE S. Lensless phase contrast microscopy based on multiwavelength Fresnel diffraction[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(2): 193-196.
- [33] BANYASZ I, KORNIS J. High-resolution lensless Fourier-transform digital holography[J]. *International Society for Optical Engineering*, 2005, 5856: 71-79.
- [34] FIENUP J R. Phase retrieval algorithms: a comparison[J]. *Applied Optics*, 1982, 21(15): 2758-2769.
- [35] FAULKNER H M L, RODENBURG J M. Movable aperture lensless transmission microscopy: a novel phase retrieval algorithm[J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(2): 4.
- [36] GARCIA-SUCERQUIA J, XU W B, JERICHO M H, et al. Immersion digital in-line holographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(9): 1211-1213.
- [37] SEO S, SU T W, TSENG D K, et al. Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(6): 777-787.
- [38] GARCIA-SUCERQUIA J. Color digital lensless holographic microscopy: laser versus LED illumination[J]. *Applied Optics*, 2016, 55(24): 6649-6655.
- [39] LUO W, GREENBAUM A, ZHANG Y B, et al. High-resolution on-chip imaging using synthetic aperture[C]//2015 Conference on Lasers and Electro-Optics. IEEE, 2015.
- [40] ISIKMAN S O, BISHARA W, SIKORA U, et al. Field-portable lensfree tomographic microscope[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(13): 2222-2230.
- [41] GREENBAUM A, SIKORA U, OZCAN A. Field-portable wide-field microscopy of dense samples using multi-height pixel super-resolution based lensfree imaging[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(7): 1242-1245.
- [42] GRANERO L, FERREIRA C, ZALEVSKY Z, et al. Single-exposure super-resolved interferometric microscopy by RGB multiplexing in lensless configuration[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2016, 82: 104-112.
- [43] FEIZI A, ZHANG Y B, GREENBAUM A, et al. Yeast viability and concentration analysis using lens-free computational microscopy and machine learning[C]//Optics and Biophotonics in Low-Resource Settings III Spie-Int Soc Optical Engineering, 2017.
- [44] DALOGLU M U, OZCAN A. Computational imaging of sperm locomotion[J]. *Biology of Reproduction*, 2017, 97(2): 182-188.
- [45] DI CAPRIO G, GIOFFRE M A, SAFFIOTI N, et al. Quantitative label-free animal sperm imaging by means of digital holographic microscopy[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2010, 16(4): 833-840.
- [46] SOLER C, PICAZO-BUENO J A, MICO V, et al. Effect of counting chamber depth on the accuracy of lensless microscopy for the assessment of boar sperm motility[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2018, 30(6): 924-934.
- [47] LI G X, ZHANG R B, YANG N, et al. An approach for cell viability online detection based on the characteristics of lensfree cell diffraction fingerprint[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 107: 163-169.
- [48] SANZ M, PICAZO-BUENO J A, GARCIA J, et al. Dual-mode holographic microscopy imaging platform[J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(7): 1105-1112.
- [49] AXELROD D. Total internal reflection fluorescence microscopy in

- cell biology[J]. Traffic (Copenhagen, Denmark), 2001, 2(11): 764-774.
- [50] COSKUN A F, SENCAN I, SU T W, et al. Lensfree fluorescent on-chip imaging of transgenic caenorhabditis elegans over an ultra-wide field-of-view[J]. Plos One, 2011, 6(1): 9.
- [51] GREENBAUM A, ZHANG Y B, FEIZI A, et al. Wide-field computational imaging of pathology slides using lens-free on-chip microscopy[J]. Science Translational Medicine, 2014, 6(267): 10.
- [52] SASAGAWA K, KIM S H, MIYAZAWA K, et al. Dual-mode lensless imaging device for digital enzyme linked immunosorbent assay[C]// Frontiers in Biological Detection: From Nanosensors to Systems Vi Spie-Int Soc Optical Engineering, 2014.
- [53] IMAI K, NISHIGAKI M, ONOZUKA Y, et al. A lens-free single-shot fluorescent imaging system using CMOS image sensors with dielectric multilayer filter[M]. Piscataway: IEEE Press, 2017.
- [54] LEE S A, OU X Z, LEE J E, et al. Chip-scale fluorescence microscope based on a silo-filter complementary metal-oxide semiconductor image sensor[J]. Optics Letters, 2013, 38(11): 1817-1819.
- [55] MUDRABOYINA A K, BLOCKSTEIN L, LUK C C, et al. A novel lensless miniature contact imaging system for monitoring calcium changes in live neurons[J]. IEEE Photonics Journal, 2014, 6(1): 15.
- [56] BIGGS D S, ANDREWS M. Acceleration of iterative image restoration algorithms[J]. Applied Optics, 1997, 36(8): 1766-1775.
- [57] COSKUN A F, SU T W, OZCAN A. Wide field-of-view lens-free fluorescent imaging on a chip[J]. Lab on a Chip, 2010, 10(7): 824-827.
- [58] HAN C, PANG S, BOWER D V, et al. Wide field-of-view on-chip talbot fluorescence microscopy for longitudinal cell culture monitoring from within the incubator[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(4): 2356-2360.
- [59] TAKEHARA H, NAGASAKI M, SASAGAWA K, et al. Micro-light-pipe array with an excitation attenuation filter for lensless digital enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Japanese Journal of Applied Physics, 2016, 55(3): 9.
- [60] AMOLINS K, ZHANG Y, DARE P. Wavelet based image fusion techniques-an introduction, review and comparison[J]. ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing, 2007, 62(4): 249-263.
- [61] LEE S A, ERATH J, ZHENG G A, et al. Imaging and identification of waterborne parasites using a chip-scale microscope[J]. Plos One, 2014, 9(2): 5.
- [62] PANG S, CUI X Q, DEMODENA J, et al. Implementation of a color-capable optofluidic microscope on a RGB CMOS color sensor chip substrate[J]. Lab on a Chip, 2010, 10(4): 411-414.
- [63] GREENBAUM A, FEIZI A, AKBARI N, et al. Wide-field computational color imaging using pixel super-resolved on-chip microscopy[J]. Optics Express, 2013, 21(10): 12469-12483.
- [64] GREENBAUM A, AKBARI N, FEIZI A, et al. Field-portable pixel super-resolution colour microscope[J]. Plos One, 2013, 8(9): 9.
- [65] WU Y C, ZHANG Y B, LUO W, et al. Demosaiced pixel super-resolution for multiplexed holographic color imaging[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 9.
- [66] ZHANG Y B, WU Y C, ZHANG Y, et al. Fusion of lens-free microscopy and mobile-phone microscopy images for high-color-accuracy and high-resolution pathology imaging[C]//Optics and Biophotonics in Low-Resource Settings III Spie-Int Soc Optical Engineering, 2017.
- [67] MCLEOD E, NGUYEN C, HUANG P, et al. Tunable vapor-condensed nanolenses[J]. ACS Nano, 2014, 8(7): 7340-7349.
- [68] FEIZI A, ZHANG Y B, GREENBAUM A, et al. Rapid, portable and cost-effective yeast cell viability and concentration analysis using

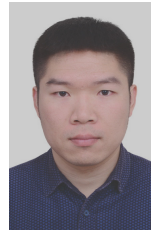
lensfree on-chip microscopy and machine learning[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(22): 4350-4358.

- [69] HUANG X W, WANG X L, YAN M, et al. A robust recognition error recovery for micro-flow cytometer by machine-learning enhanced single-frame super-resolution processing[J]. Integration — The VLSI Journal, 2015, 51: 208-218.
- [70] COSTA F F. Big data in biomedicine[J]. Drug Discovery Today, 2014, 19(4): 433-440.

[作者简介]



陈津(1992-),男,福建三明人,杭州电子科技大学硕士生,主要研究方向为微流控片上成像电路与系统设计和声表面波传感检测。



黄汐威(1987-),男,江西上饶人,博士,杭州电子科技大学副教授,主要研究方向为CMOS集成传感器和微流控分析系统。



李阳波(1994-),男,山西朔州人,杭州电子科技大学硕士生,主要研究方向为CMOS图像传感检测和无透镜全息成像。



刘季璇(1996-),女,黑龙江齐齐哈尔人,杭州电子科技大学硕士生,主要研究方向为基于深度学习的片上细胞成像智能处理。



孙玲玲(1956-),女,山东泗水人,杭州电子科技大学射频电路与系统教育部重点实验室主任、教授,主要研究方向为微波毫米波集成电路与智能系统设计。