



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108496070 A

(43)申请公布日 2018.09.04

(21)申请号 201680079063.8

(22)申请日 2016.12.22

(30)优先权数据

1563320 2015.12.24 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2016/053648 2016.12.22

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/109428 FR 2017.06.29

(71)申请人 原子能和替代能源委员会

地址 法国巴黎

(72)发明人 皮埃尔·布朗丹

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

代理人 侯丽英 刘继富

(51)Int.Cl.

G01N 15/14(2006.01)

G01N 15/02(2006.01)

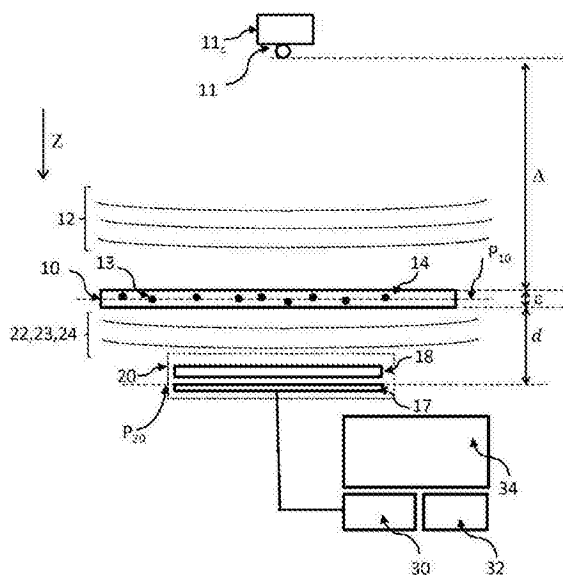
权利要求书2页 说明书9页 附图9页

(54)发明名称

通过无透镜成像观察样本的方法

(57)摘要

一种用于通过无透镜成像观察样本(10)的方法,其中样本(10)设置在激光二极管(11)和图像传感器(20)之间,所述激光二极管(11)被供应有强度(i)小于或等于临界值(i_C)的电源电流。在预备步骤期间确定该临界强度(i_C),在此期间强度(i)初始大于称为二极管(11)的激光阈值的阈值(i_S)。通过观察在图像传感器(20)处形成的图像(25),强度(i)降低直到在所形成的图像(25)上观察到干涉图像的衰减,对应于该衰减处的强度的临界强度(i_C)是最佳的。



1. 一种观察样本 (10) 的方法, 包括以下步骤:

a) 使用激光二极管 (11) 照射所述样本, 所述激光二极管能够发射朝向所述样本传播的入射光波 (12), 所述激光二极管被供应有电源电流, 使得当所述电源电流 (i) 超过所谓的阈值强度 (i_s) 时获得激光效应;

b) 使用图像传感器 (20) 获取所述样本的图像 (25), 所述样本位于所述激光二极管 (11) 和所述图像传感器 (20) 之间, 每个图像表示在所述照射的作用下经所述样本透射的光波 (24);

所述方法的特征在于, 所述激光二极管的电源电流的强度 (i) 小于或等于所谓的临界强度 (i_c), 在步骤a) 之前根据以下预备步骤来确定所述临界强度:

i) 将所述激光二极管 (11) 定位成使其发射的入射光波 (12) 传播至所述图像传感器 (20);

ii) 向所述激光二极管 (11) 供应所谓的初始电源电流, 所述初始电源电流的强度大于或等于所述阈值强度 (i_s), 并且使用所述图像传感器获取称为初始图像的图像, 所述初始图像具有横向干涉条纹;

iii) 改变所述电源电流的强度并且使用所述图像传感器 (20) 获取图像, 重复该步骤直到获取具有与所述初始图像相比衰减的横向干涉条纹的图像, 所述电源电流的强度则对应于所述临界强度 (i_c)。

2. 根据权利要求1所述的用于观察样本 (10) 的方法, 其中, 所述临界强度 (i_c) 小于所述阈值强度 (i_s)。

3. 根据权利要求2所述的用于观察样本 (10) 的方法, 其中, 所述临界强度在所述阈值强度 (i_s) 的0.7倍和所述阈值强度 (i_s) 之间, 或者在所述阈值强度 (i_s) 的0.8倍和所述阈值强度 (i_s) 之间。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的用于观察样本的方法, 其中, 在所述初始图像上, 两个相邻的横向干涉条纹由对比度指标 (ind) 来表征, 所述对比度指标表示所述干涉条纹之间的对比度, 所述临界强度对应于所述对比度指标降低超过25%。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的用于观察样本 (10) 的方法, 其中, 在预备步骤i) 至iii) 中, 表示所观察的样本的参考样本位于所述图像传感器 (20) 和所述激光二极管 (11) 之间。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的用于观察样本 (10) 的方法, 其中, 在预备步骤i) 至iii) 中, 没有样本位于所述图像传感器 (20) 和所述激光二极管 (11) 之间。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的用于观察样本 (10) 的方法, 其中, 所述样本 (10) 包括衍射元素 (13), 所述衍射元素能够在所述光波 (12) 照射的作用下形成衍射波 (23), 使得所述图像传感器暴露于称为曝光波 (24) 的波, 所述称为曝光波 (24) 的波包括经所述样本透射的所述入射光波 (12) 以及所述衍射波 (23)。

8. 根据权利要求1所述的用于观察样本 (10) 的方法, 其中, 在步骤b) 中, 所述电源电流 (i) 的强度在所述阈值强度的0.5倍和所述阈值强度 (i_s) 之间, 或者在所述阈值强度的0.7倍和所述阈值强度之间。

9. 根据权利要求1所述的用于观察样本 (10) 的方法, 其中, 在步骤b) 中, 所述电源电流 (i) 的强度在所述阈值强度 (i_s) 的0.5倍和所述阈值强度的0.9倍之间, 或者在所述阈值强

度的0.7倍和所述阈值强度的0.9倍之间。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的用于观察样本(10)的方法,其中,没有放大光学器件在所述样本和所述图像传感器(20)之间延伸。

通过无透镜成像观察样本的方法

技术领域

[0001] 本发明的技术领域涉及通过无透镜成像观察样本,特别是生物样本。

背景技术

[0002] 通过无透镜成像观察样本、特别是生物样本,在近十年中得到了显著的进步。该技术允许通过将样本设置在光源和图像传感器之间来观察样本,而无需在样本和图像传感器之间设置光学放大镜。图像传感器因此收集经样本透射的光波的图像。

[0003] 该图像是由光波和衍射波之间的干涉图案形成的,其中光波是由光源发射并经样本透射的,衍射波是由光源发射的光波经样本的衍射而产生的。有时用术语“衍射图案”来指代这些干涉图案。在图像传感器上形成的图像可以通过数字传播算法来进行处理,以估计样本的光学特性。这种算法在全息重建领域是众所周知的。为此,在样本与图像传感器之间的距离已知的情况下,应用考虑了该距离的全息重建算法。

[0004] Garcia-Sucerquia J.出版的“数字同轴全息显微术”(Digital in-line holographic microscopy),应用光学,卷45(5),2006年2月10日描述了使用激光束观察颗粒(例如生物颗粒),以及将重建算法应用于形成在CCD传感器上的图像。

[0005] 文献W0 2008090330已经示出,通过用发光二极管代替激光光源,利用空间滤波,可以通过无透镜成像获得生物样本(在这种情况下是细胞)的可用图像。该文献中描述的装置使得可以将每个细胞与干涉图案相关联,其中干涉图案的形态使得可以识别细胞的类型。接下来其他出版物证实了这种技术的益处,例如申请US 2012/0218379。

[0006] 目前,无透镜成像似乎是传统显微镜的简单且廉价的替代品。而且,其观察范围显著地大于显微镜的可能的观察范围。可以理解,与该技术相关的应用前景非常广阔。

[0007] 发明人提出了一种与上述方法相比得到改进的用于观察样本的方法,使得可以获得与现有技术相比其信噪比得到改善的图像。

发明内容

[0008] 本发明的第一主题是一种用于观察样本的方法,其包括以下步骤:

[0009] a) 使用激光二极管照射样本,激光二极管能够发射入射光波,所述激光二极管被供应有电源电流,使得当所述电源电流超过称为阈值强度的强度时获得激光效应;

[0010] b) 使用图像传感器获取样本的图像,样本位于激光二极管和图像传感器之间,每个图像表示在所述照射的作用下经样本透射的光波;

[0011] 该方法的特征在于,激光二极管的电源电流的强度小于或等于所谓的临界强度,在步骤a)之前根据以下预备步骤来确定所述临界强度:

[0012] i) 将所述激光二极管定位成使其发射的入射光波传播至图像传感器;

[0013] ii) 向所述激光二极管供应所谓的初始电源电流,所述初始电源电流的强度大于或等于所述阈值强度,并且使用所述图像传感器获取称为初始图像的图像,所述初始图像包括延伸穿过图像的横向干涉条纹;

[0014] iii) 改变所述电源电流的强度并且使用图像传感器获取图像,重复该步骤直到获取具有与所述初始图像相比衰减的横向干涉条纹的图像,电流的强度则对应于所述临界强度。

[0015] 衰减的干涉条纹被理解是指这些干涉条纹是不可见的,或者当它们可见时,与初始图像的干涉条纹相比是衰减的。在初始图像上的两个相邻的横向干涉条纹的特征可以由表示所述干涉条纹之间的对比度的对比度指标来表征。衰减对应于所述对比度指标降低至少25%,或甚至更多。

[0016] 该方法可以包括以下特征中的任何一个,单独地或以技术上可行的组合:

[0017] -所述临界强度小于所述阈值强度。临界强度可以在阈值强度的0.5倍和阈值强度之间,并且优选地在阈值强度的0.7倍或0.8倍和阈值强度之间。

[0018] -在预备步骤i)至iii)中,表示所观察的样本的参考样本位于图像传感器和激光二极管之间。作为替代方案,在预备步骤i)至iii)中,没有样本位于图像传感器和激光二极管之间。

[0019] -样本包括衍射元素,衍射元素能够在所述光波照射的作用下形成衍射波,使得图像传感器暴露于称为曝光波的波,所述称为曝光波的波包括经样本透射的入射光波以及衍射波。样本可以特别地包括液体,例如其中悬浮有颗粒的生物液体,样本的厚度例如在50 μm 和2cm之间。样本也可以是厚度小于50 μm 的组织切片。

[0020] -在步骤b)中,电源电流的强度在阈值强度的0.5倍和所述阈值强度之间,或者甚至在阈值强度的0.5倍和阈值强度的0.9倍之间。优选地,该强度在阈值强度的0.7和0.9倍至阈值强度的0.95或1倍之间。

[0021] -激光二极管在可见光谱范围内发射。

[0022] 本发明的另一主题是一种用于观察样本的方法,其包括以下步骤:

[0023] a) 使用能够产生朝向样本传播的光波(称为入射光波)的激光二极管照射所述样本;

[0024] b) 使用图像传感器获取样本在检测平面中形成的图像,样本位于激光二极管和图像传感器之间,每个图像表示在所述照射的作用下经样本透射的光波;

[0025] 该方法的特征在于,所述激光二极管具有与其相关联的阈值强度,该阈值强度对应于二极管的电源电流的强度,超过该强度则获得激光效应,并且当样本被照射时,向激光二极管供应强度严格小于阈值强度(例如在阈值强度的0.5倍和所述阈值强度之间)的电源电流。

[0026] 优选地,该强度在阈值强度的0.7倍和阈值强度的0.9到0.95倍之间。

[0027] 从以下通过非限制性示例给出且在附图中示出的本发明的特定实施例的描述中,其他优点和特征将变得更加显而易见,其中:

附图说明

[0028] 图1示出了用于观察样本的示例性装置。

[0029] 图2A示出了由激光二极管发射的光功率随所述激光二极管的电源电流的强度的变化。图2B示出了激光二极管的光谱随激光二极管的电源电流的强度的变化。图2C示出了由所述激光二极管发射的光波的相干长度随激光二极管的电源电流的强度的变化。

[0030] 图3A、3B、3C、3D、3E和3F示出了使用参照图1所描述的装置获得的样本的图像,考虑了用于照射样本的激光二极管的电源电流的各种强度。

[0031] 图4A示出了图3A、3B、3C、3D、3E和3F中存在的衍射图案的径向轮廓随激光二极管的电源电流的强度的变化。

[0032] 图4B示出了图4A所示的轮廓的标准偏差随激光二极管的电源电流的强度的变化。

[0033] 图5A和5B示出了使用图1所示的装置获得的图像,其中没有在激光二极管和样本之间插入样本,激光二极管的电源电流的强度分别为两个不同的值,分别低于和高于所谓的阈值强度。

[0034] 图5C示出了表示在填充有液体的流体室插入在激光二极管和样本之间的情况下,使用图1所示的装置获得的图像的背景的变异系数的变化,该变异系数随激光二极管的电源电流的强度变化。

[0035] 图6A、6B、6C、6D、6E和6F示出了随重建距离变化的、沿着重建图像中的线延伸的像素的强度,所述图像是通过分别对由图像传感器获取的两个珠的图像应用全息重建算法来获得的,其中所述两个珠的图像是利用激光二极管的电源电流的各种强度来获得的。

[0036] 图7A示出了使用现有技术装置获得的样本图像,其中光源是发光二极管。图7B示出了使用根据本发明的装置产生的样本图像,其中适当地调整激光二极管的强度。

具体实施方式

[0037] 图1示出了本发明的一个主题的示例性装置。激光二极管11能够沿着传播轴Z在样本10的方向上产生称为入射光波的光波12。在该示例中,激光二极管是以Civillaser销售的二极管,其以接近405nm的波长发射。激光二极管因此在可见光谱范围内发射。

[0038] 样本10可以是期望表征的生物样本。样本10还可以包括含有待表征的颗粒13的固体或液体介质14。这可能涉及例如培养基或体液中的生物颗粒。生物颗粒被理解是指细胞、细菌或其他微生物,真菌、孢子等。术语颗粒还可以指生物学方案中常用的微珠,例如金属微珠、玻璃微珠或有机微珠。这也可能涉及悬浮在液体介质中的不溶性液滴,例如水包油乳液中的脂滴。因此,术语颗粒既指最初存在于被检样本中的内源性颗粒,也指分析前添加到该样本中的外源性颗粒。通常,颗粒的尺寸有利地小于1mm,或者甚至小于500 μm ,并且优选地在0.5 μm 和500 μm 之间。样本10的厚度 ϵ 允许入射光12中的一部分透射到图像传感器20,形成所谓的透射光波22。当样本是含有颗粒的液体时,取决于样本对入射光的衰减,厚度 ϵ 可以在几十微米到几毫米或甚至几厘米之间。

[0039] 根据另一示例,样本可以是薄组织切片或解剖病理切片,包括沉积在透明载玻片上的厚度薄的组织。薄的厚度理解为指优选小于100 μm ,并且优选小于10 μm ,通常为几微米的厚度。

[0040] 激光二极管与样本之间的距离 Δ 优选大于1cm。所述距离优选在2cm到30cm之间。优选地,从样本处看,激光二极管被认为是点状的。这意味着激光二极管的直径(或其对角线)优选地小于样本和激光二极管之间的距离的十分之一,并且最好为百分之一。因此,光优选地以平面波的形式或者以可以被认为是平面波的波的形式到达样本。

[0041] 装置包括能够在检测平面 P_{20} 中形成图像的图像传感器20。在所示的示例中,这是一个包括CCD型或CMOS的像素矩阵阵列的矩阵阵列光电检测器。CMOS是优选的图像传感器,

因为像素的尺寸较小,从而允许获得空间分辨率更好的图像。图像传感器包括像素矩阵阵列17,在该矩阵阵列上方设置有透明保护窗18。在该示例中,透明保护窗18设置在距离像素矩阵阵列17 125 μm 处,并且其厚度达到400 μm 。像素矩阵阵列17与保护窗18之间的距离通常在几十 μm 到150或200 μm 之间。在该示例中,检测器是一个8位CMOS传感器,包括3884x 2764像素,像素间距为1.67 μm 。检测平面P₂₀优选垂直于入射光波12的传播轴Z延伸。像素间距小于3 μm 的图像传感器是优选的,以改善图像的空间分辨率。

[0042] 在该示例中,样本10和图像传感器20的像素矩阵阵列17之间的距离d小于2cm,并且优选小于1cm。例如大约为5mm。样本10和图像传感器20的接近使得可以获得宽的观察范围。可替代地,可以移动样本使其更靠近激光二极管,在这种情况下观察范围会减小。然而,这样的配置使得可以获得关于样本的更详细的信息。

[0043] 要注意的是,没有成像光学器件,例如图像传感器20和样本10之间的放大光学器件。这并不排除在图像传感器20的每个像素处存在聚焦微透镜的可能性,这些微透镜不具有图像放大功能。

[0044] 在入射光波12的作用下,样本10可以产生在检测平面P₂₀中易于产生干涉(特别是与经样本透射的光波22的干涉)的衍射波23。该干涉在由图像传感器20获取的图像25上产生多个基本衍射图案26,每个基本衍射图案包括中心区域和多个同心衍射环,每个环构成圆形干涉条纹。每个基本衍射图案都是由样本中的衍射对象13引起的,在这种情况下是颗粒。图像传感器20所暴露于的光波24包括:

[0045] -由入射光波12经样本的衍射产生的分量23;

[0046] -由入射光波12经样本的透射产生的分量22。

[0047] 这两个分量在由图像传感器获取的图像25上产生干涉,该干涉为基本衍射图案26的形式。稍后将参照图3A至3F或7A和7B来示出基本衍射图案的示例。通常,基本衍射图案26可以与样本中的每个衍射元素相关联。样本10越靠近激光二极管11,基本衍射图案26就越详细,图像传感器上可识别的环的数量就越多。样本10越靠近图像传感器20,观察范围就越大,导致在同一个图像25上观察到更多数量的基本衍射图案26。

[0048] 处理器30,例如微处理器,能够处理由图像传感器20获取的每个图像25。特别地,处理器是连接到可编程存储器32的微处理器,在可编程存储器32中存储有用于执行本说明书中描述的图像处理 and 计算操作的一系列指令。处理器30也可以连接到屏幕34。

[0049] 图像处理的一个示例是全息重建算法的应用,其使得可以根据由图像传感器获取的图像25来重建称为重建图像的图像28。这种类型的算法是常规的,并且稍后将在说明书中参照图6A至6F来进行讨论。

[0050] 激光二极管11连接到电路11c,从而允许向激光二极管供应电流。激光二极管11包括由半导体材料制成的有源区。超过一定的强度值(称为激光阈值强度*i_s*),可以观察到激光发射。该激光阈值强度*i_s*对应于足以在激光二极管的有源区中获得激光效应的电子注入。

[0051] 旨在向所使用的激光二极管供应额定强度*i_n*等于150mA的电源电流。发明人使用光功率计测量随电源电流的强度*i*变化的由激光二极管传输的光功率。通过在额定强度两侧在15mA和170mA之间改变电源电流的强度*i*,在三个不同的时刻1、2和3进行三次测量。图2A中示出了所获得的曲线。观察到的是激光二极管的光功率特征的变化。每条曲线具有:

[0052] -第一部分,其中电荷到有源区的注入是不充足的。在第一操作状态I中,激光二极管的光发射被认为是自发的,并且发射的光功率与注入到有源区的电荷载流子的密度成比例,也就是说与电源电流的强度*i*成比例;

[0053] -第二部分,其中电荷的注入足以显著地增加激光二极管的输出,反映在所谓的受激光发射的现象中。在第二操作状态II,或激光操作状态中,获得了激光效应,并且光功率随着强度*i*,随着反映在曲线梯度的增加中的放大效应而线性增加。激光二极管的额定强度*i_n*等于150mA,对应于该操作状态。

[0054] 第一和第二操作状态之间的转换发生在125mA和135mA之间,但是不能够建立精确的值。具体地,激光二极管的性能发生波动,特别是随着温度波动。此外,在上面概述的两种操作状态之间存在所谓的瞬态操作状态,其中二极管的发射是受激的从而不会补偿二极管的某些损耗。由于所述损耗,光功率随着强度的变化不再是线性的。在所示的曲线中,该瞬态状态在120和135mA之间的电源电流强度*i*之间延伸。然后可以认为对应于二极管的电源电流的、被称为激光阈值电流的阈值强度值*i_s*为140mA。

[0055] 在本说明书中,阈值强度*i_s*表示这样的强度,在超过该强度时,会发生受激光的放大,这对应于上述激光操作状态(状态II)的最小强度。如在图2A中可以看出的,该阈值强度*i_s*是这样的强度,当超过该强度时,由激光效应引起的光功率随着激光二极管的电源电流的强度线性增加。

[0056] 在强度*i*的每个值处,还使用光谱仪确定由激光二极管11产生的光波12的发射光谱。在图2B中描绘了各种光谱。每个光谱具有以401nm的中心波长*λ_c*为中心的发射峰。如所预期的那样,只要电源电流的强度*i*低于阈值*i_s*,就会观察到发射峰的放大。

[0057] 可以使用以下表达式来确定由激光二极管11产生的光波12的相干长度*L_c*:

[0058]
$$L_c = \frac{2\ln(2)}{\pi} \times \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \quad (1)$$
 其中,*λ*表示波长,并且 $\Delta\lambda$ 表示发射峰的宽度。

[0059] 该表达式适用于发射光谱的峰值类似于高斯分布的条件,这是本示例中所采用的假设。

[0060] 相干长度*L_c*反映了这样的事实:如果作为辅助光源的两个对象(例如反射或衍射对象)间隔开比相干长度短的距离,则由这些对象发射的光波会形成干涉。

[0061] 图2C示出了由激光二极管发射的光波12的相干长度*L_c*随电源电流的强度*i*的变化。当电源电流的强度*i*小于阈值强度*i_s*时,该相干长度很短,大约几十微米,并且小于50微米或甚至20微米。超过强度阈值*i_s*时,相干长度达到或甚至超过100μm,并且由于所使用的光谱仪的光谱分辨率而无法被高精度地确定。

[0062] 相干长度*L_c*是确定观察样本形成能够被检测到的干涉的能力的参数。在图1所示的示例中,样本包括透明液体14或能够被认为是其中悬浮有颗粒13的液体。这些颗粒是衍射的,并且引起在由图像传感器20形成的图像25上的衍射图案26的出现。

[0063] 发明人研究了改变激光二极管11的电源电流的强度*i*对由图像传感器20获取的图像的影响。图3A、3B、3C、3D、3E和3F分别表示样本的图像,其中激光二极管的电源电流的强度*i*分别等于41mA、67mA、92mA、110mA、126mA和135mA。在这些图中出现基本衍射图案26,这些图案的大部分能够与存在于样本10中的颗粒13相关联。在该示例中,样本由直径为3μm和6μm的乳胶珠混合物组成,所述乳胶珠位于PBS(phosphate buffered saline(磷酸盐缓冲

盐水)的首字母缩写)类型的盐水缓冲液中。在这些图像中的每一个上,调整曝光时间使得每个图像的平均灰度是相似的,使得不管照射功率如何变化,这些图像是相当的。可以看出,当电源电流的强度增加时,形成每个衍射图案的环的数量趋于增加,这是所预期的,因为这些环对应于圆形干涉条纹。因此,图像中存在的信息更加丰富。此外,如参考现有技术所表明的,这样的衍射图案可以经历全息重建,并且公认的是,当衍射环的数量和对比度增加时,这种重建的结果会得到改善。

[0064] 另一个观察结果是横向干涉条纹29的出现,当电源电流的强度大于或接近阈值强度 i_s 时,横向干涉条纹29基本上是直线的并且延伸穿过图像。这些横向干涉条纹的出现显著地损害了图像的信噪比。与位于由图像传感器20形成的图像25的一些部分中的形成基本衍射图案26的同心干涉条纹相比,横向干涉条纹29延伸穿过整个图像。它们构成了既影响具有基本衍射图案26的图像区域,又影响形成图像背景的、不具有基本衍射图案的图像区域的噪声。这些横向条纹可以是直线的、椭圆的或圆形的。术语“横向”表示它们影响整个图像25,从该图像的一个边缘延伸到另一个边缘。

[0065] 在每个图像25上已经选择了一个基本衍射图案26,对于该图案已经建立了平均径向轮廓。平均径向轮廓被理解是指通过确定各种基本轮廓的平均值而获得的幅度轮廓,每个基本轮廓沿着在所选的衍射图案的中心和所述图的端部之间延伸的轴线27来截取。对于同一个衍射图案26,如图3A所示可以考虑几个轴线27,其中轴线27以白点的形式示出。每个图像上所选的基本图案26都由一个白点框构成。图4A示出了在图像3A至3F中的每一个上获得的平均径向轮廓。可以看出, i 强度增加地越多,环的数量就越多。

[0066] 已经确定了图4A中所示的每个径向轮廓的标准偏差。图4B示出了该标准偏差随激光二极管11的电源电流的强度 i 的变化。该指标表示所选的衍射图案的对比度,考虑了所有可识别的衍射环。其在 $i=121\text{mA}$ 时达到最大值,然后在强度超过该值时减小。衍射图案的对比度越高,该图案越能够被识别,并且基于该衍射图案重建的图像的质量将越好。图3A至3F以及图4A和4B示出了二极管的电源电流的最佳强度范围为60mA至125mA之间,在该范围中衍射图案26的对比度较高。它们还示出了在超过130mA时,出现了干涉条纹,影响了整个图像25,大大增加了图像的噪声水平。而且,这种噪声不是固定的,使得难以消除。因此,重要的是通过调节其电源电流来使用激光二极管,使得其强度 i 足够高以使衍射图案具有一定对比度并且具有足够数量的衍射环,同时其强度低于称为临界强度 i_c 的强度,超过该临界强度会出现延伸穿过由图像传感器20获取的图像25的干涉条纹。可以看出,在这个示例中,电源电流的强度的最佳范围在60mA和135mA之间,即在阈值强度 i_s 的大约0.5倍和所述阈值强度 i_s 之间,并且似乎特别优选在80mA和120mA之间,即在所述阈值强度 i_s 的0.6倍和0.9倍之间。

[0067] 图5A和5B示出了在图像传感器20和激光二极管11之间没有插入样本10的情况下由图像传感器20获得的图像,电源电流的强度 i 分别等于120mA(即低于阈值强度 i_s)和140mA(即大于或等于阈值强度)。当强度超过临界值 i_c 时可以观察到干涉条纹的出现,临界值小于或等于阈值强度 i_s 。看起来过长的相干长度对于传感器获取的图像的质量是有害的。因此,优选调整激光二极管的电源电流的强度 i ,使得由激光二极管发射的光波12的相干长度小于 $100\mu\text{m}$,或甚至小于 $80\mu\text{m}$ 或 $50\mu\text{m}$ 。发明人将这种干涉条纹的出现降低至在像素矩阵阵列17和检测器的距离所述像素矩阵阵列约 $100\mu\text{m}$ 的保护窗口18之间发生的杂散反射。

当样本具有相隔这个量级的两个平行界面时,这些干涉条纹也可能出现。通常,所观察的样本的厚度 ε 在 $20\mu\text{m}$ 和 $200\mu\text{m}$ 之间,或者甚至 $500\mu\text{m}$ 。

[0068] 发明人通过在 70mA 和 150mA 之间改变激光二极管11的电源电流的强度 i 来评估由图像传感器25获取的图像的变异系数 CV 的变化,样本10包括厚度 $\varepsilon = 100\mu\text{m}$,填充有其中没有衍射颗粒的盐水缓冲液的流体室。图像的变异系数 CV 被理解为是指图像的标准偏差除以所述图像的平均值。调整每个图像的曝光时间,使得每个图像的平均强度是恒定的,以补偿二极管的照射功率的变化。通过排除具有杂散衍射图案的某些图像部分来计算该变异系数。因此,其表示了每个图像的“背景”,即表示了不具有可能的衍射图案的区域。图5C示出了该变异系数 CV 随激光二极管的电源电流的强度 i 的变化。观察到在 70mA 和 120mA 之间是稳定的,随后显著增加,该显著增加反映了在图像中出现图案,即以上参照图3F和图5B概述的干涉条纹。

[0069] 发明人观察到,通过将样本设置在图像传感器和激光二极管之间,临界强度变化了。因此看起来干涉条纹的出现还取决于位于激光二极管11和图像传感器20之间的样本10。

[0070] 由此,激光二极管11的电源电流的强度 i 优选地通过执行以下步骤(称为预备步骤)来根据具体情况进行调整:

[0071] -在激光二极管的额定使用工况下获取初始图像,即通过采用大于阈值强度 i_s 的电源电流的强度 i ,使得通过激光效应获得由激光二极管发射的光波12。该图像具有横向干涉条纹,使得其不适于全息重建;

[0072] -改变激光二极管的电源电流的强度 i ,特别是降低该强度,并使用图像传感器获取图像,重复该步骤,直到观察到横向干涉条纹的显著衰减。当观察到这种衰减时,则认为激光二极管的电源电流的强度对应于所述临界强度 i_c 。

[0073] 然后,根据该临界强度 i_c 确定激光二极管11的电源电流的强度 i ,该强度 i 有助于通过无透镜成像观察样本。它可以等于该临界强度,或者稍微低于该临界强度,例如在 $0.8i_c$ 和 i_c 之间。具体地,认为该强度 i 应该优选地接近临界强度。在临界强度以上,出现干涉条纹。在临界强度以下,光功率降低。通过低于临界强度,例如低于 $0.9i_c$ 或 $0.95i_c$,克服了临界强度的可能的波动,例如在激光二极管的漂移(例如热漂移)的影响下。这样的“安全边际”可能被证明是有用的。

[0074] 上述步骤被认为是预备步骤,因为它们是在观察样本之前实施的。它们优选通过定位所谓的参考样本 10_{ref} 来执行,参考样本 10_{ref} 表示下文中要观察的样本。它们也可以在没有样本的情况下实施,图像传感器20在没有插入样本的情况下直接面向激光二极管11定位。

[0075] 两个连续的干涉条纹可以由对比度指标 ind 来表征,该对比度指标 ind 代表表示亮条纹的最大强度水平 S_{max} 和表示邻近所述亮条纹的暗条纹的最小强度水平 S_{min} 之间的差。对比度指标可以通过简单的减法 $S_{\text{max}} - S_{\text{min}}$ 来获得,或者通过加法 $S_{\text{max}} + S_{\text{min}}$ 标准化该差值来获得。因此,对比度指标可以如下表示:

$$[0076] \quad \text{ind} = S_{\text{max}} - S_{\text{min}} \quad (2) \quad \text{或} \quad \text{ind} = \frac{S_{\text{max}} - S_{\text{min}}}{S_{\text{max}} + S_{\text{min}}} \quad (3)$$

[0077] 表达式(3)对应于对比度的常规定义。

[0078] 当干涉条纹不再显著地出现在由图像传感器获取的图像上,或者当它们充分显著地衰减时,则达到临界强度 i_c 。因此,所述显著的衰减对应于初始图像和在临界强度下获得的图像之间的对比度指标ind相对于横向干涉条纹降低25%,或者甚至50%,或者甚至80%或更多。

[0079] 如上所述,由图像传感器获取的每个图像25可以经历全息重建,旨在使用传播算子 $h(x, y, z)$ 来对所述图像进行卷积运算。传播算子 $h(x, y, z)$ 的作用是描述图像传感器20和坐标点 (x, y, z) 之间的光传播。例如在Ryle等人的出版物“生物标本的数字同轴全息(Digital in-line holography of biological specimens)”,国际光学工程学会会议(SPIE),第6311卷(2006)中描述了全息重建的原理。全息重建使得可以确定光波24的复数表达式 $U(x, y, z)$,其中检测器在空间中(特别是在距离图像传感器的距离 $|z|$ 处的平面中的)的任何坐标点 (x, y, z) 处暴露于光波24。然后可以使用以下表达式来确定该光波的幅度 $u(x, y, z)$ 和相位 $\phi(x, y, z)$:

[0080] $u(x, y, z) = \text{abs}[U(x, y, z)]$ (4), 或者 $\phi(x, y, z) = \text{arg}[U(x, y, z)]$ (5)。

[0081] 运算abs和arg分别返回模和幅角。

[0082] 数字重建特别可以基于菲涅耳衍射模型。在该示例中,传播算子是菲涅耳-亥姆霍兹方程,如下所示:

$$[0083] \quad h(x, y, z) = \frac{1}{j\lambda z} e^{j2\pi \frac{z}{\lambda}} \exp(j\pi \frac{x^2 + y^2}{\lambda z}) \quad (6)$$

[0084] 其中 λ 表示波长。

$$[0085] \quad \text{由此, } U(x, y, z) = \frac{1}{j\lambda z} e^{j2\pi \frac{z}{\lambda}} \iint \sqrt{S(x', y')} \exp(j\pi \frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{\lambda z}) dx' dy' \quad (7)$$

[0086] 其中

[0087] $-x'$ 和 y' 表示图像传感器的平面中的坐标;

[0088] $-S(x', y')$ 表示图像传感器在坐标 x' 和 y' 处获取的图像的强度;

[0089] $-x$ 和 y 表示重建平面中的坐标,该重建平面位于距图像传感器的距离 $|z|$ 处;

[0090] $-z$ 表示重建图像沿着入射光波的传播轴 Z 的坐标。

[0091] 发明人使用图1所示的装置,通过将两个边到边直径为 $6\mu\text{m}$ 的乳胶珠定位在厚度为 $100\mu\text{m}$ 的、填充有上述定义的PBS盐水缓冲液的流体室的底部来获得图像25。使用图像传感器20通过在41mA和135mA之间调制激光二极管11的电源电流的强度 i 来获取图像25。

[0092] 根据上述原理,考虑等于图像传感器和所述珠之间的距离的 z 值,该图像经历全息重建。图像6A、6B、6C、6D、6E和6F示出了随重建距离 $|z|$ 变化的重建图像28的像素的强度。更准确地说,每个图像表示随着重建距离 $|z|$ 变化的位于穿过两个珠的线上的像素的强度分布,激光二极管11的电源电流的强度 i 分别达到41mA、67mA、92mA、110mA、126mA和135mA。虚线对应于等于检测器和珠之间的距离的重建距离。可以看到对应于 $i=126\text{mA}$ 的图6E是最佳的,并且看到图像6D($i=110\text{mA}$)或6C($i=92\text{mA}$)也能够清楚地呈现出重建图像28上的珠的分离。图6F($i=135\text{mA}$)实现了满意的分离,但是由于存在上述横向干涉条纹,在图像的其余部分中受到高背景噪声的影响。

[0093] 图7A和图7B示出了当光源分别是蓝色发光二极管和激光二极管时使用图像传感器获取的图像,其中光源的强度等于临界强度 i_c ,在这种情况下为125mA。图7B中形成的衍

射图案包括比图7A中形成的更多的可识别的衍射环。

[0094] 在调节其电源电流的强度的条件下使用激光二极管使得可以获得样本的更精确的观察。

[0095] 可以在体液分析中实施本发明,以实现检测和/或识别形成所述体液的颗粒的目的。本发明也可以允许表征生物组织薄片。除生物学以外,本发明可以应用于检测和/或识别工业流体中、农产品中或固体基质中的颗粒。

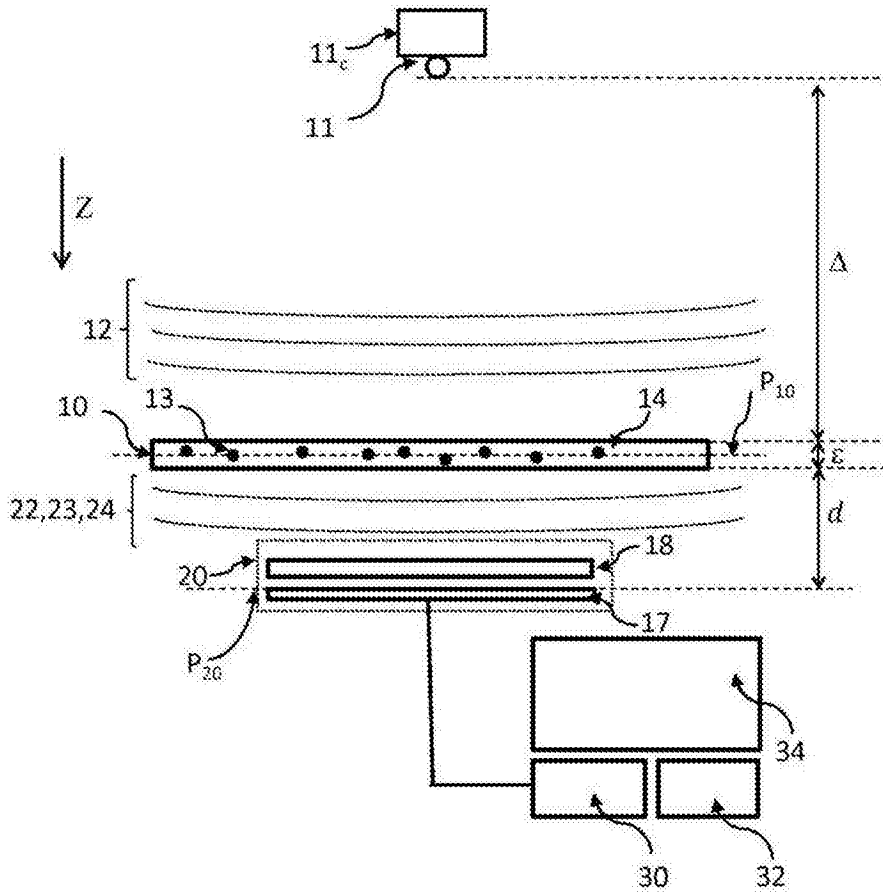


图1

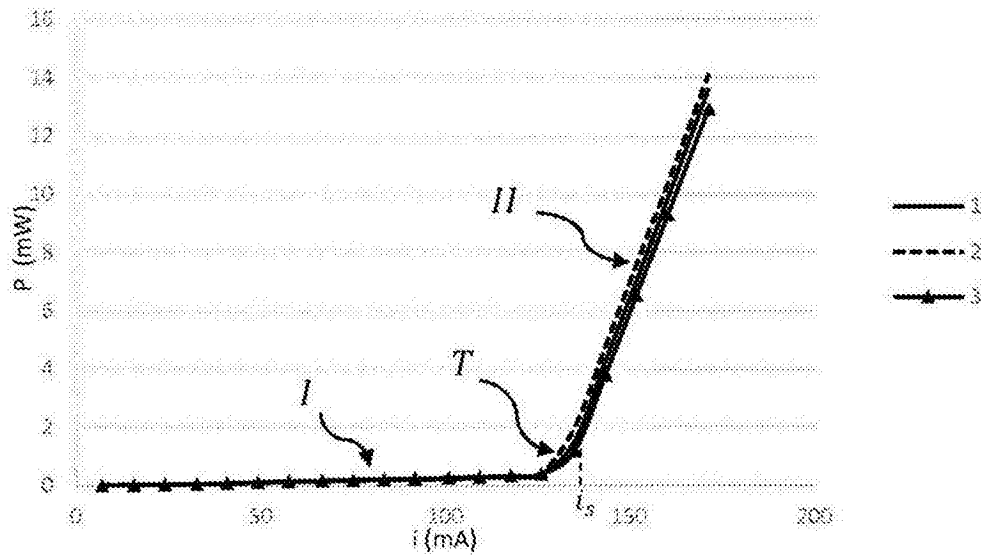


图2A

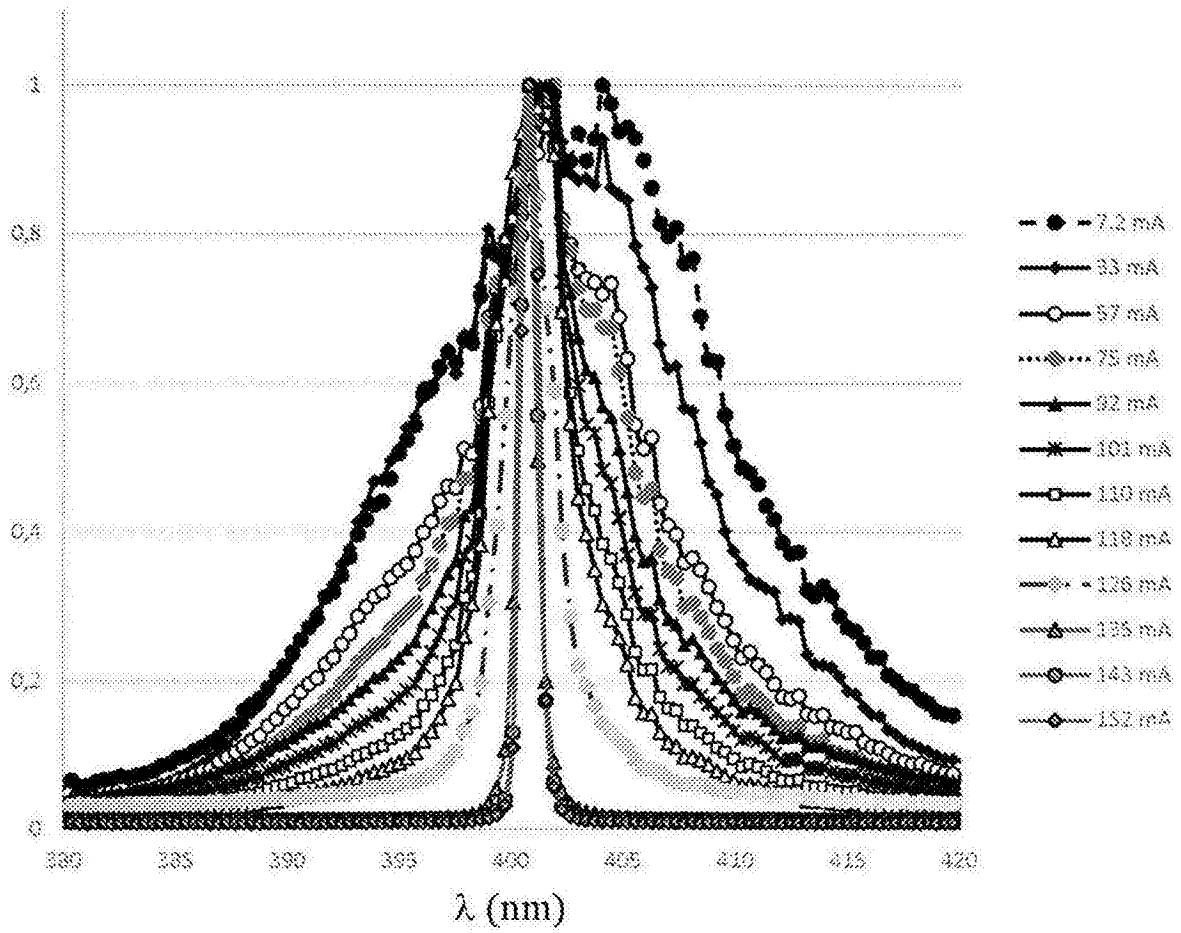


图2B

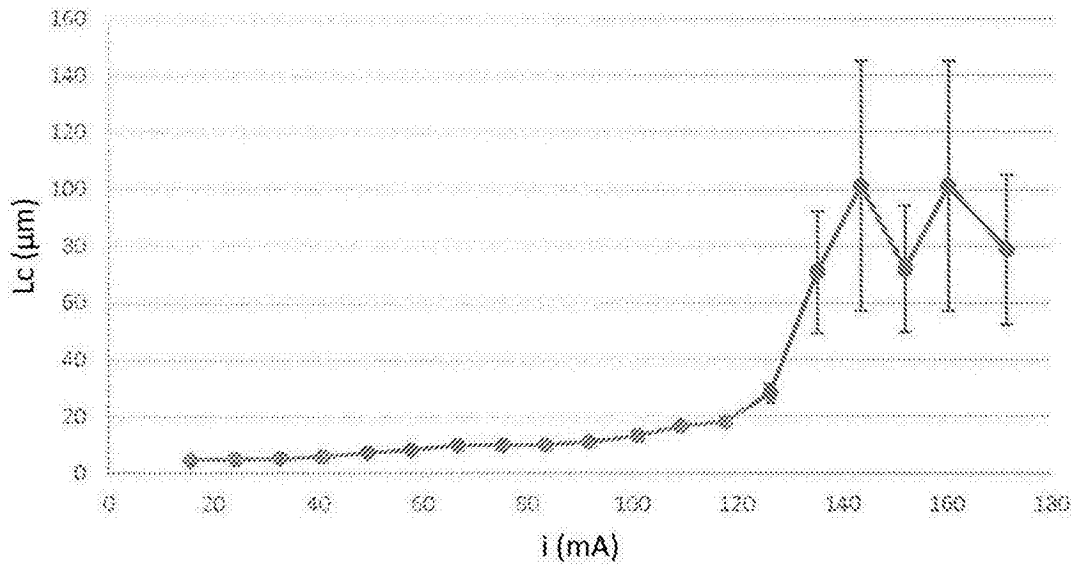


图2C

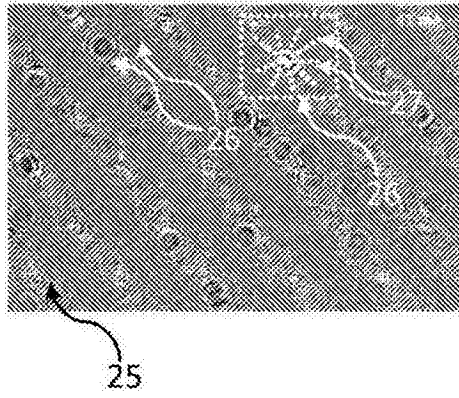


图3A

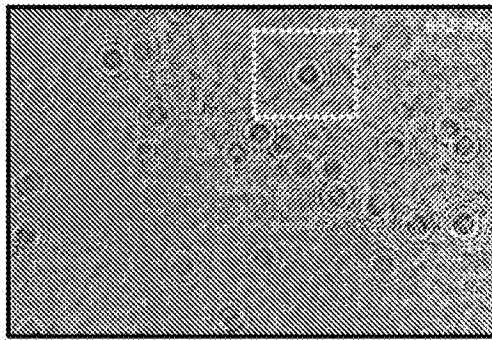


图3B

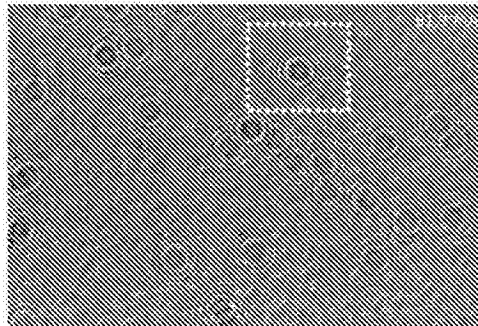


图3C

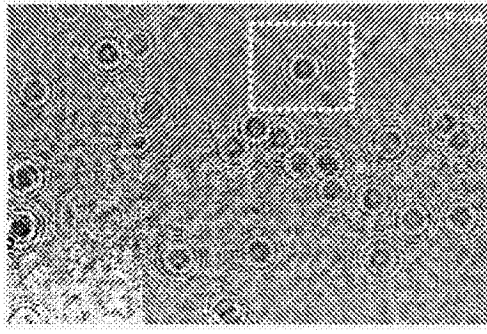


图3D

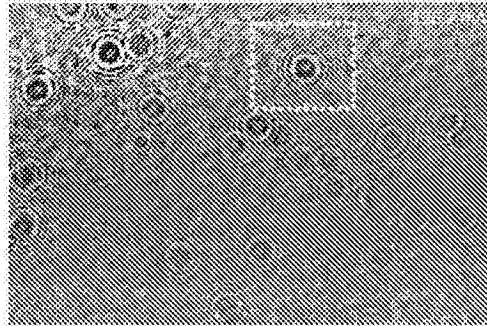


图3E

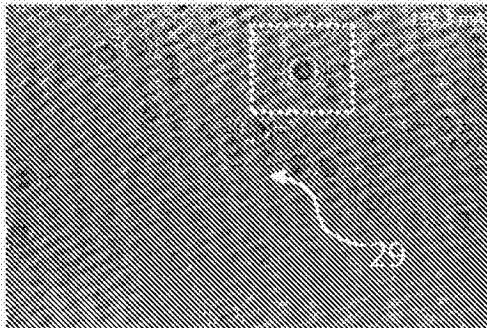


图3F

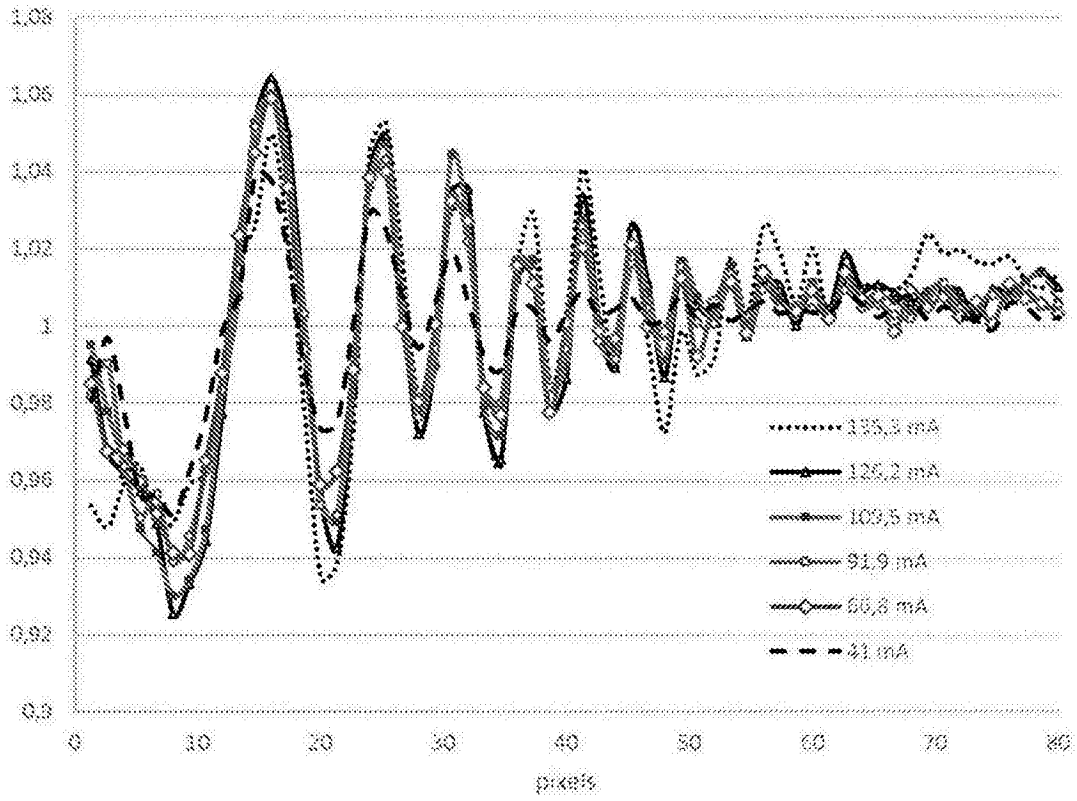


图4A

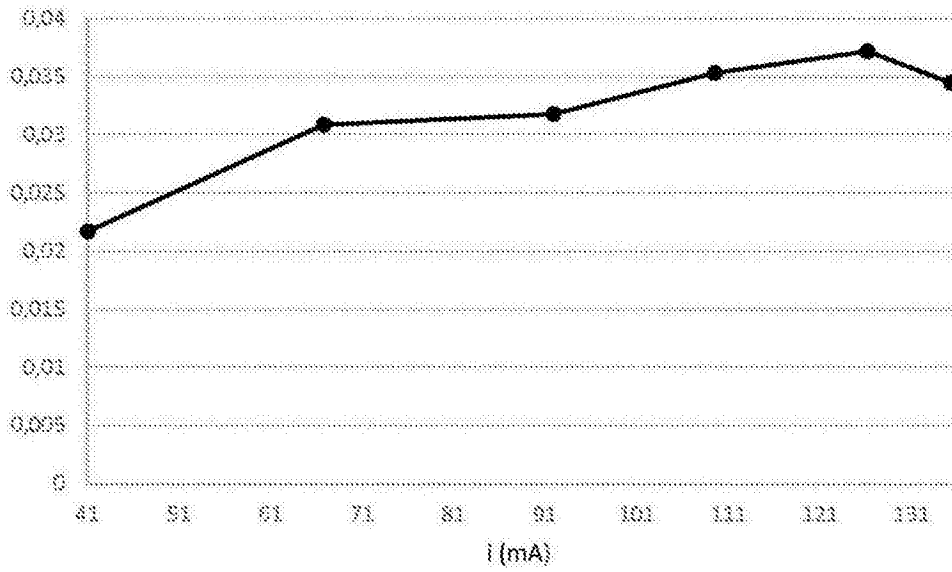


图4B

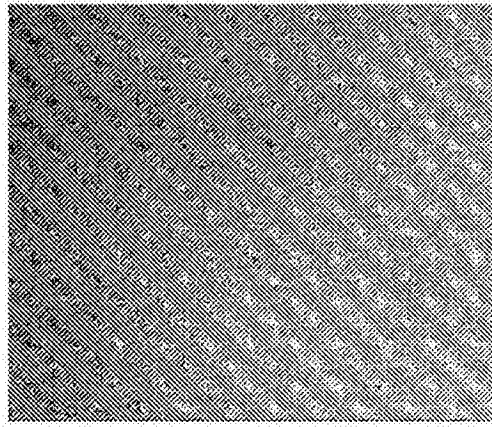


图5A

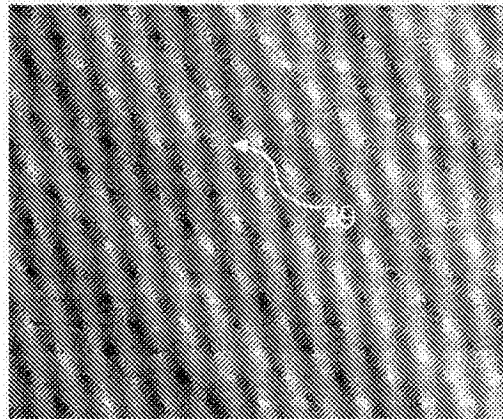


图5B

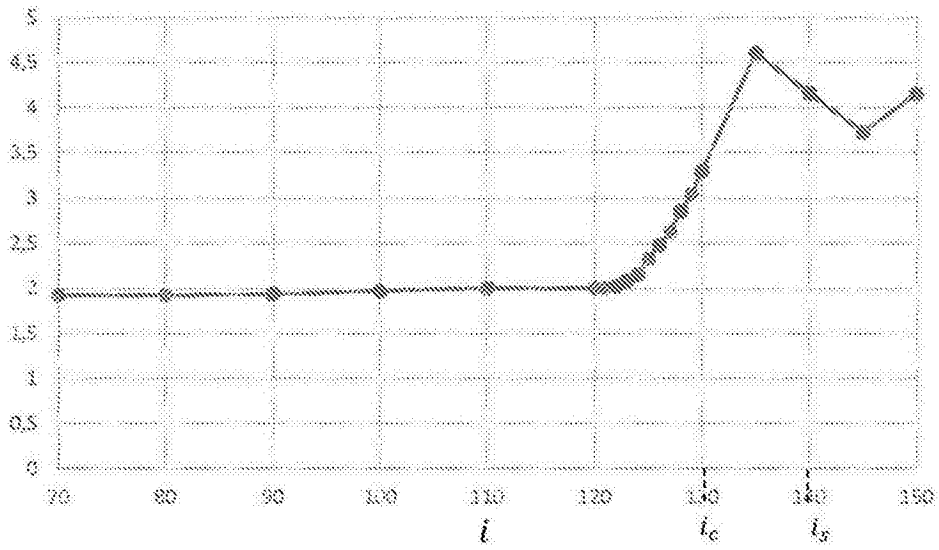


图5C

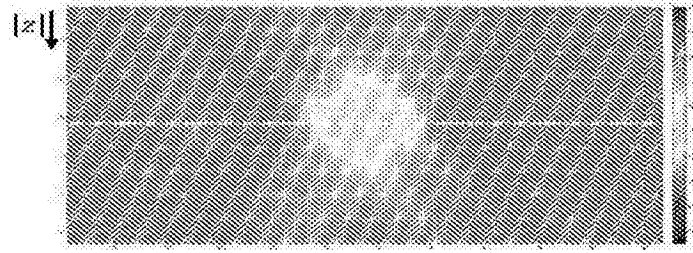


图6A

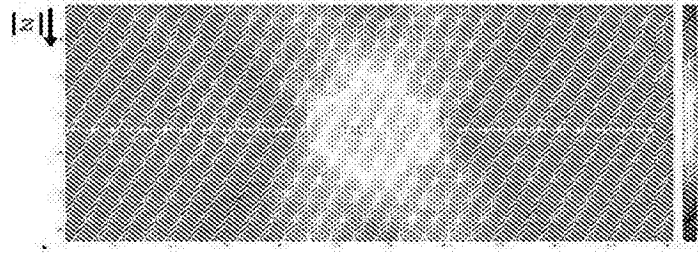


图6B

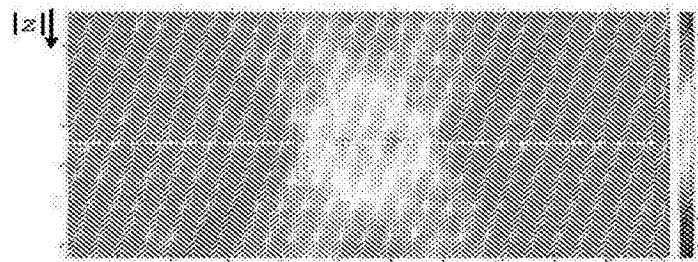


图6C

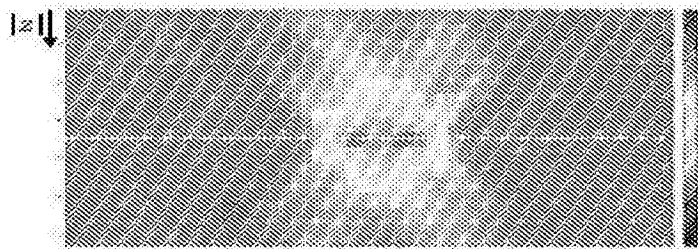


图6D

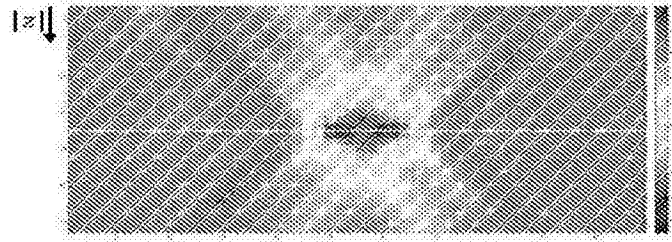


图6E

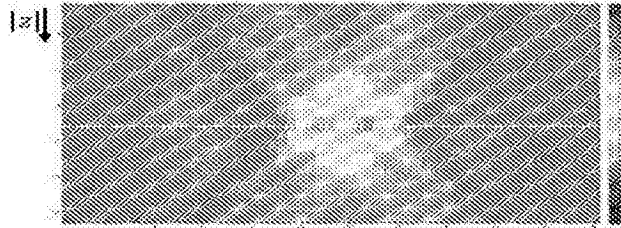


图6F

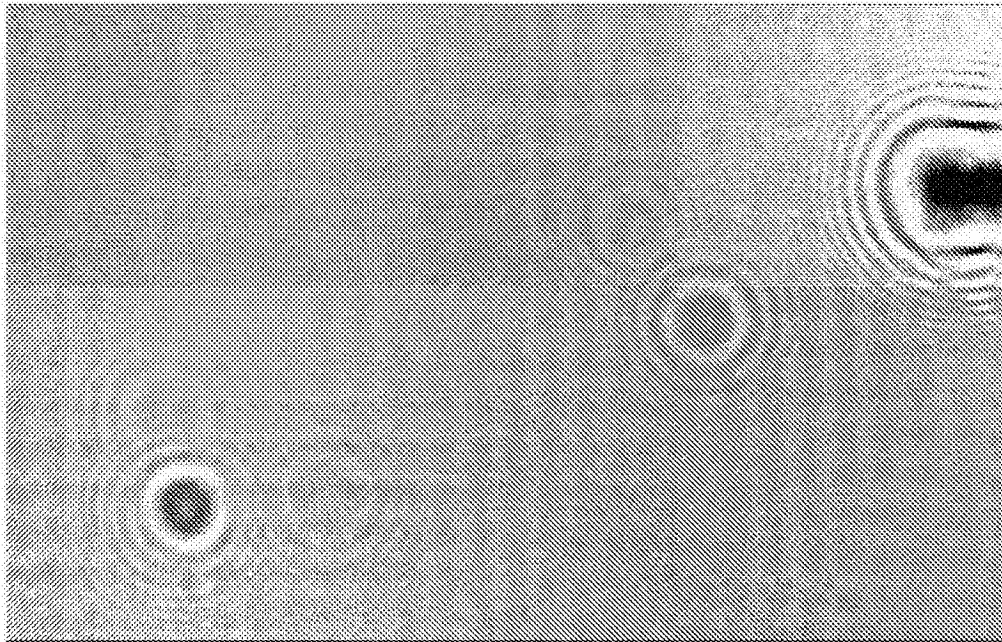


图7A

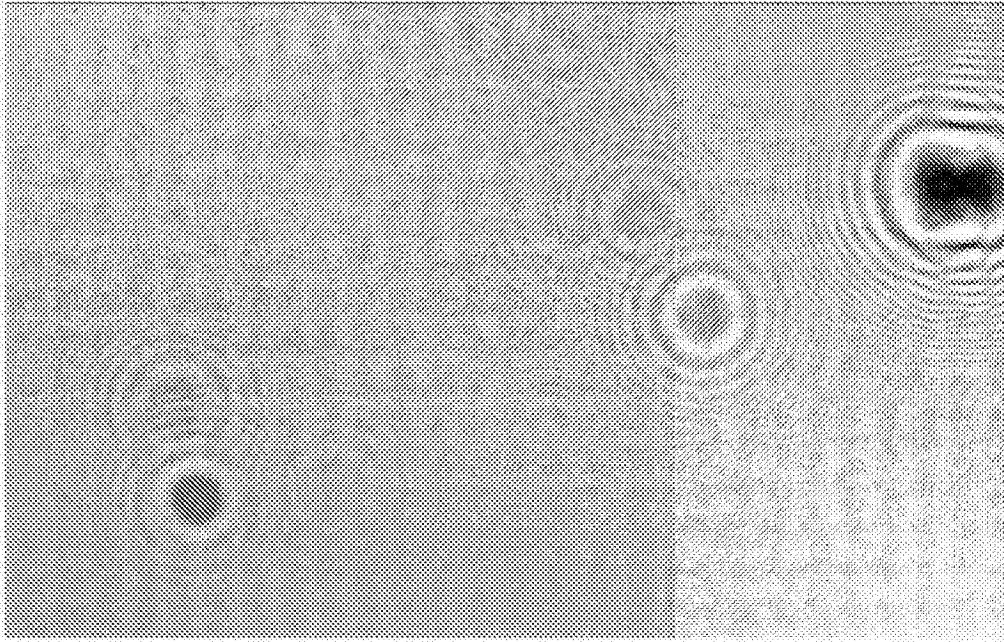


图7B