



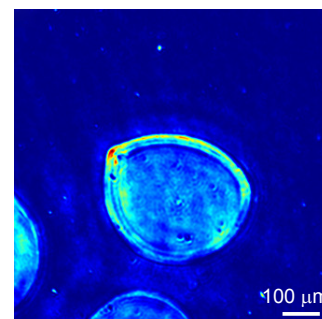
DOI: 10.12086/oe.2019.180110

## 均匀球面波数字同轴全息生物显微方法

田鹏<sup>1,2</sup>, 严伟<sup>1,2\*</sup>, 李凡星<sup>1,2</sup>, 杨帆<sup>1,2</sup>,  
吴云飞<sup>1,2</sup>, 何渝<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>中国科学院光电技术研究所微细加工光学技术国家重点实验室,  
四川成都 610209;

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049



**摘要:** 传统的小孔球面波数字同轴全息受小孔的不确定度影响, 成像质量并不理想。本文提出一种产生均匀球面波得到宽视场高分辨的显微成像方法。激光经过扩束镜、显微物镜后聚焦成一个极小的光斑, 调节针孔阵列与焦点的距离, 针孔直径与焦斑相配形成理想球面波。照明被测物后, 透射球面波和物体散射的物光波形成干涉条纹, 由大靶面图像传感器采集。载物与不载物的图像相减去掉脏点和杂光干扰。菲涅耳逆变换重构算法恢复物体信息。生物实验证明, 均匀球面波数字同轴全息能够获得高质量显微成像, 视场范围 3.22 mm×3.22 mm, 分辨率 5.09 μm, 其快速、非接触、灵活的放大倍率可广泛应用于光学元件检测、材料识别、生物医学领域。

**关键词:** 数字同轴全息; 均匀球面波; 生物显微

**中图分类号:** O438; TH742

**文献标志码:** A

**引用格式:** 田鹏, 严伟, 李凡星, 等. 均匀球面波数字同轴全息生物显微方法[J]. 光电工程, 2019, 46(1): 180110

## Biology microscopy using well-distributed sphere digital in-line holography

Tian Peng<sup>1,2</sup>, Yan Wei<sup>1,2\*</sup>, Li Fanxing<sup>1,2</sup>, Yang Fan<sup>1,2</sup>, Wu Yunfei<sup>1,2</sup>, He Yu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Optical Technologies on Nano-Fabrication and Micro-Engineering, Institute of Optics and Electronics, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan 610209, China;

<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Traditional pinhole spherical wave digital in-line holography has proved to be powerful imaging tools. Image quality is affected by uncertain round of pinhole. Here, we propose a well-distributed sphere wave generation method and it demonstrates wide field of view and high resolution microscopy. The laser focuses into an infinitesimal spot through laser beam expander and microscope objective. Pinhole permutation with different sizes is utilized to match the focal point, and emerges an ideal spherical wave. Interference fringes pattern, formed by reference sphere wave and scattered sphere wave of object, is collected by large area image sensor. The influence of dirty in image sensor and parasitic light is eliminated through subtraction with and without object. Fresnel inverse transformation reconstruction algorithm presents the object information. Biology microscopy experiments demonstrate that the proposed techniques increase the flexibility in producing well-distributed point light source and improve the im-

收稿日期: 2018-03-08; 收到修改稿日期: 2018-05-09

基金项目: 四川省科技支撑计划(2015JQ0009); 国家自然科学基金项目(61705232)

作者简介: 田鹏(1988-), 男, 博士研究生, 主要从事数字全息无损检测的研究。E-mail: 71479740@163.com

通信作者: 严伟(1977-), 男, 博士, 研究员, 主要从事光学无损检测与光学加工的研究。E-mail: yanwei@ioe.ac.cn

age quality. Field of view is 3.22 mm×3.22 mm and resolution is 5.09 μm. Furthermore, adjustable field of view with magnification, fast, no-contact make it to be a promising tool in optical element measurement, material identification, biology and medicine.

**Keywords:** digital in-line holography; well-distributed sphere; biology microscopy

**Citation:** Tian P, Yan W, Li F X, et al. Biology microscopy using well-distributed sphere digital in-line holography[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2019, 46(1): 180110

## 1 引言

随着计算机的普及，传统显微成像系统数字化成为发展的主流方向。基于图像处理的自动对焦技术虽然能够获取被测物的清晰细节<sup>[1-2]</sup>，但是难以达到快速测量的目的，并且光学系统的复杂性也还未得以解决。小孔球面波数字同轴全息是实现全息成像的最简单方式<sup>[3-4]</sup>，为显微成像领域提供了一种新的解决途径。图像传感器直接记录透射光波与物光波形成的干涉条纹，并存储于计算机中，通过计算模拟光波的传播过程，获取物光波的振幅和相位分布。相较于普通的显微方法，该方式具有光路简单、快速、实时、大视场、非接触等诸多优点，广泛应用于衍射光学元件形貌检测、干涉计量、变形测量、振动测量、粒子跟踪、粒子场测量、流场测定等领域<sup>[3-6]</sup>。

球面波的质量将直接影响成像结果。然而受加工工艺限制，很难精确制备纳米量级的小孔，也无法保证圆的不确定度。另一方面随着大靶面、低像元间距 CMOS 的发展，全息成像系统的分辨率能够进一步突破。为此，本文在传统小孔球面波数字同轴全息基础之上，利用激光扩束镜、显微物镜、小孔阵列构建理想球面波光路，通过调节针孔阵列与焦点的距离，针孔直径与焦斑相配的方式，将小孔制造误差的影响转

移到图像边缘，得到近似理想的球面波。大靶面 CMOS 黑白工业相机获取透明被测物的面形分布信息；载物与不载物相减去掉脏点、杂光和球面波包络影响；菲涅耳逆变换的数值计算方法进行数字全息图的再现。重构结果包含物体的振幅和相位分布，能够反应被测物的形貌信息。

## 2 理论推导

### 2.1 均匀球面波光路

均匀球面波数字同轴全息光路结构如图 1 所示，激光器发出的光波经过衰减片、激光扩束镜、显微物镜之后到达针孔阵列。调节针孔阵列位置，使其处于显微物镜的焦点处。当小孔直径大于焦斑时，光波透过小孔得到一个圆斑，没有衍射现象发生。逐步减小小孔直径，圆斑将放大并出现菲涅耳衍射环，直到中央圆斑突然由明转暗时，即得到最佳衍射斑。此时精调小孔直径，使中央圆斑填满 CMOS 靶面，且边缘无明显瑕疵，即得到接近理想的球面波，该光波由透射光和衍射光共同组成。

球面波照射被测物后，其中一部分作为照明光源使物体发出散射波，另一部分透射光波作为参考波，散射波与参考波在菲涅耳衍射区形成干涉条纹，由大靶面 CMOS 记录从而得到一幅数字全息图。其中激光

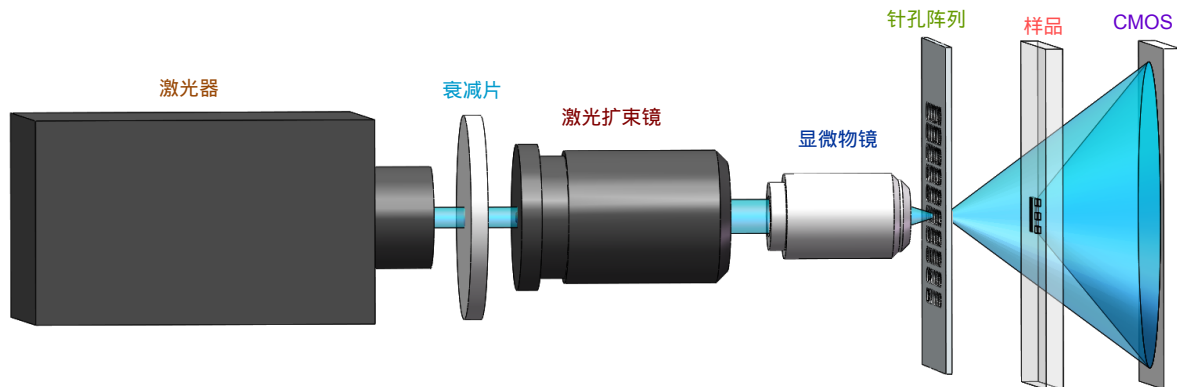


图 1 均匀球面波光路

Fig. 1 Optical path of well-distribute sphere

器在测量距离内需具备足够的相干性。衍射光斑要尽可能填满整个图像传感器靶面。样品与 CMOS 保持足够的距离以满足奈奎斯特采样条件,从而确保对于全息图上的最细条纹也能被图像传感器所记录。

设  $A_{\text{scat}}(\mathbf{r})$  表示被样品散射的球面波,  $\mathbf{r}$  为空间中任一点的矢径。未被物体散射的光是参考光  $A_{\text{ref}}(\mathbf{r})$  来表示,那么 CCD 所记录的全息干涉图可以表示为<sup>[3]</sup>

$$I(\mathbf{r}) = |A_{\text{ref}}(\mathbf{r}) + A_{\text{scat}}(\mathbf{r})|^2 = |A_{\text{ref}}(\mathbf{r})|^2 + |A_{\text{scat}}(\mathbf{r})|^2 + A_{\text{ref}}^*(\mathbf{r})A_{\text{scat}}(\mathbf{r}) + A_{\text{ref}}(\mathbf{r})A_{\text{scat}}^*(\mathbf{r}), \quad (1)$$

式中:前两项分别是参考波、散射波的自调制项,可以近似为常数,对重构结果的影响可以忽略。第三项乘以参考光波后,逆向衍射变换能够恢复物体的复振幅信息,第四项为第三项的共轭像,也称孪生像<sup>[3,7-8]</sup>,利用微分干涉法<sup>[7-8]</sup>、移相法<sup>[4,9-13]</sup>、二次测量法<sup>[6,14]</sup>以及离轴全息<sup>[15-16]</sup>等能够消除孪生像的干扰。

## 2.2 重构算法

使用球面波照明,相位物体都会包含一个球面波的相位包络,反演时必须去掉这个包络。另外光学系统中元器件以及图像传感器靶面必然会有脏点、灰尘等影响,故而全息图需要减去没有物体时的成像图以消除影响,也称为相称全息图<sup>[7-8]</sup>。

$$I(x, y) = I_1(x, y) - I_0(x, y), \quad (2)$$

式中:  $I_0(x, y)$  表示没有被测物时所成像,  $I_1(x, y)$  表示放置被测物时所成像。相减之后,没有物体的部分光强相同从而变暗,有物体变化的地方信息将会保持一致。利用相称全息图再现物体,图像明暗将反相,被测物变亮,没有物体部分变暗。另外球面波照明时,孪生像在物平面是放大的虚像,反相后灰度值较低,接近背景色(黑色),可以忽略不计。

全息图的反演重建是计算光波的逆向传播过程,即菲涅耳衍射公式的反变换。首先对式(2)所获得的相称全息图乘以参考光(近似认为是球面波)的振幅和相位,这样从式(1)中的第三项得到物体在记录平面( $\xi$ 平面)的复振幅分布,然后再基于逆向菲涅耳公式可以获得物体在空间任何一点的复振幅分布。假设物体相对点源的矢量坐标为  $\mathbf{x}$ , CCD 平面相对点源的矢量坐标为  $\xi$ ,那么物体在  $x$  处的复振幅分布为

$$K(\mathbf{r}) = \iint_{\Sigma} I(\xi) A_{\text{ref}}(\xi) \frac{\exp[-jk|\xi - \mathbf{x}|]}{|\xi - \mathbf{x}|} F_{\text{in}}(\xi) d\xi, \quad (3)$$

式中:  $\xi = (u, v, L)$ ,  $L$  表示针孔与图像传感器靶面的距离,  $F_{\text{in}}(\xi)$  表示倾斜因子:

$$F_{\text{in}}(\xi) = -\frac{j}{2\lambda}(1 + \cos\chi) = -\frac{j}{2\lambda}\left(1 + \frac{L}{\xi}\right), \quad (4)$$

式中:  $\chi$  表示空间向量  $\xi$  与光轴之间的夹角,  $\xi = |\xi|$ 。若要对式(3)直接求解,极其困难,又因被测物与针孔之间的距离远小于图像传感器与针孔的距离,泰勒展开后如下:

$$|\xi - \mathbf{x}| \approx \xi \left[ 1 - \frac{2\xi \cdot \mathbf{x}}{\xi^2} \right]^{1/2} = \xi \left[ 1 - \frac{\xi \cdot \mathbf{x}}{\xi^2} - \frac{1}{2} \left( \frac{\xi \cdot \mathbf{x}}{\xi^2} \right)^2 - \dots \right]. \quad (5)$$

取式(5)中的前两项,以及将球面波公式  $A_{\text{ref}}(\xi) = \xi^{-1} \exp[-jk\xi]$  代入式(3),可得:

$$K(\mathbf{r}) = -\frac{j}{2\lambda} \iint_{\Sigma} I(\xi) \frac{1}{\xi^2} \left( 1 + \frac{\xi}{L} \right) \exp\left[ \frac{-jk\xi \cdot \mathbf{x}}{\xi} \right] d\xi. \quad (6)$$

式(6)给出了空间中任何一点的复振幅分布,通过恢复  $K(\mathbf{r})$  就能得到物面的复振幅分布信息。而影响分辨率的主要因素是成像系统的数值孔径 NA、小孔球面波数字同轴全息由点源到图像传感器靶面的距离以及面积共同决定。

$$NA = \frac{D/2}{\sqrt{(D/2)^2 + L^2}}, \quad (7)$$

式中:  $D$  表示图像传感器的窄边宽度,  $L$  表示点源到图像传感器之间的距离,分辨率  $R$  公式如下:

$$R = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{\lambda\sqrt{D^2 + 4L^2}}{2D}. \quad (8)$$

由式(8)可知,用更短波长的激光可提高分辨率;在像元间距不变的情况下,利用合成孔径成像增加图像传感器靶面面积;图像传感器参数确定下,采用亚像素位移方式进一步缩小像元间距;采用更高倍率的显微物镜,从而缩小点光源到图像传感器的距离等。

## 3 实验结果

### 3.1 光路搭建

在超净实验室搭建如图 2 所示的光路,从左至右分别为激光器、衰减片、光阑、扩束镜、物镜、小孔、被测物、CMOS 相机。双轮衰减片包括反射式衰减片与吸收式衰减片各一套,均用于调节激光光强,反射式粗调,吸收式精调。光阑滤除进入小孔之前的杂光干扰。

为了保证光源在测量范围内的相干性,采用 473 nm 单纵模固体激光器,图中激光器为双光束,故而采用狭缝挡住其中一束。CMOS 采用方特科技公司的

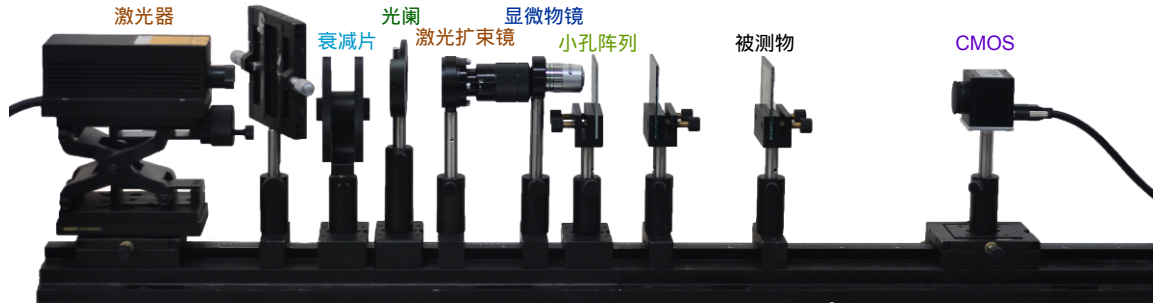


图2 实验平台

Fig. 2 Experimental platform

黑白工业相机，1200万像素 4088 pixels×3072 pixels，像元间距 3.1 μm，靶面尺寸 12.7 mm×9.5 mm。针孔阵列用二氧化硅作为基底，表面镀一层铬，然后采用激光直写的方式加工出 10×10 的不同尺寸小孔。理论上相邻两个小孔的直径差，纵向为 50 nm，用于快速粗调；横向为 5 nm，用于精调。

### 3.2 生物显微成像

实验时首先遮挡 CMOS 相机，然后调节激光强度大小，避免高功率激光损坏图像传感器。接着移动针

孔阵列到物镜焦点附近，上下调节观察菲涅耳衍射环。小孔过大时，衍射环不明显，CMOS 靶面上呈现明亮的光斑；小孔过小时，衍射环非常明显，CMOS 靶面上光强减弱；当衍射现象明显，中央衍射斑最大时进一步横向微调直至得到均匀分布的球面波。

图 3 所示为均匀球面波数字同轴全息显微成像结果。被测物是光刻机曝光加工的三横三竖，四周用粗线条指示其测试线条的位置，分辨率测试线条宽度 5 μm，长度 25 μm。图 3(a)是均匀球面波背景图，在图像中央可以看到明显的脏点。图 3(b)是测试线条的

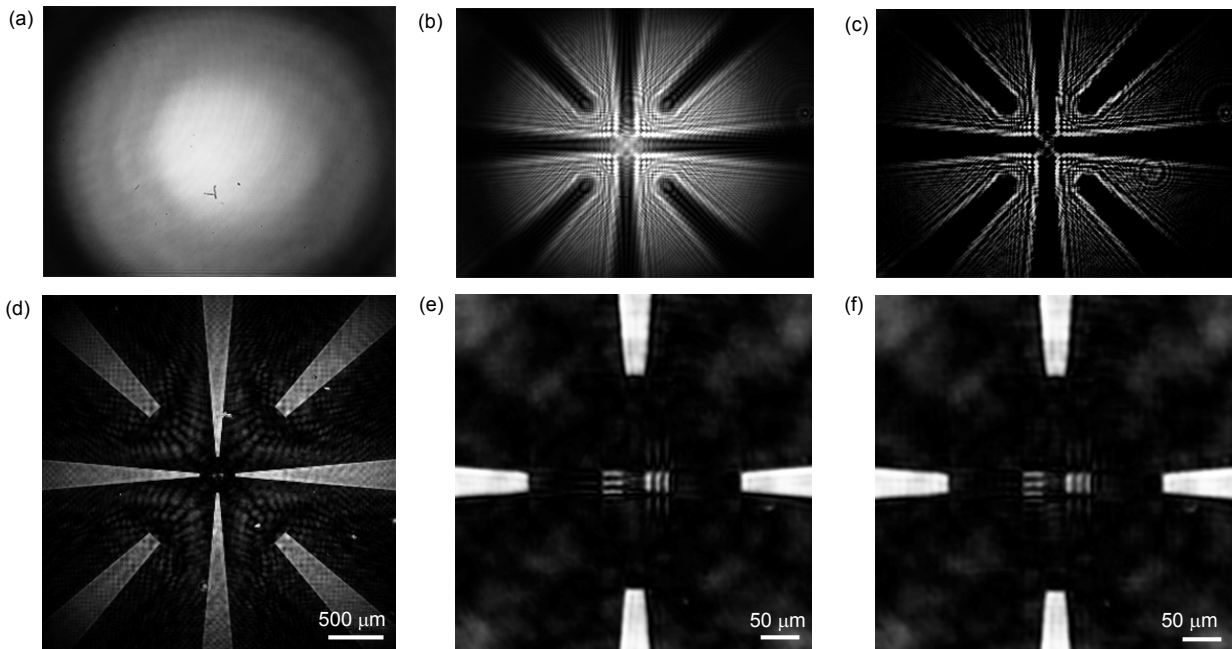


图3 5 μm 横竖条纹。(a) 背景；(b) 全息图；(c) 相称图；(d) 重构图；(e) 5.09 μm 分辨率中央放大；(f) 6.36 μm 分辨率中央放大

Fig. 3 5 μm horizontal and vertical lines. (a) Background; (b) Hologram; (c) Contrast image; (d) Reconstructed result; (e) 5.09 μm resolution central magnification; (f) 6.36 μm resolution central magnification



数字全息图。图 3(c)是两幅图相减后得到的结果，由于有物存在的地方信息保持不变，没有物体信息的地方变暗，故而图像整体看起来偏暗。图 3(d)是重建后得到的宽视场高分辨的全局图像，测试线条尺寸相较于整幅图而言直接观察图像无法分辨。将图像数字放大六倍之后得到图 3(e)，可以看到  $5\ \mu\text{m}$  线条能够有效分辨。

实验中点光源到被测物的距离  $40\ \text{mm}$ ，到 CMOS 靶面的距离  $100\ \text{mm}$ ，视场范围  $3.22\ \text{mm}\times 3.22\ \text{mm}$ ， $3000\ \text{pixels}\times 3000\ \text{pixels}$  用于重构物体信息，像元间距  $3.1\ \mu\text{m}$ ，理论分辨率  $5.09\ \mu\text{m}$ ，实验测得结果与理论一致。接下来用  $2400\ \text{pixels}\times 2400\ \text{pixels}$  重构物像，放大同样的倍数后如图 3(f)，理论分辨率  $6.36\ \mu\text{m}$ ，三条竖线明显变粗，线条间的间隔消失，无法完整识别，三横受测试片与光轴的倾斜影响变化较缓。

生物样本由载玻片与盖玻片构成，球面波穿过玻璃后，图像会发生移动。特别是盖玻片不平时最为明显。故而测量过程中需要用没有生物样本的部分作为背景图片，相减之后才能消除脏点和杂光影响。

显微成像实验采用根霉装片、蚊子口器、家蝇翅膀进行。图 4(a)~4(c)分别是生物样本的数字全息图，

可以发现三幅图的球面波光斑位置均不一样。根霉装片很薄，也很均匀，球面波基本没有移动。蚊子较厚，亮斑变小，菲涅耳衍射环非常明显。翅膀很薄，但不平，球面波往上移动。将被测物刚好移出图像边缘，采集背景图片，相减后将消除折射率带来的影响。图 4(d)~4(f)分别是生物样本的显微成像结果，能够清晰的呈现生物特征。根霉孢子囊近球形，假根相互堆叠；蚊子口器结构明显，外骨骼突出；家蝇翅膀的翅脉形成封闭的室，无“翅痣”，沿翅膀边缘有细毛。视场范围能够直接覆盖小型生物体，相较常规显微方法而言具有明显优势。

相较传统的显微成像系统的另一优势，是均匀球面波数字同轴全息单次曝光成像，聚焦过程由计算机数字化进行。而卵细胞的直径较大且有合适的厚度，用蚊子卵细胞样本显微成像有益于观察数字聚焦变化过程。图 5(a)是显微成像的全视场图像，将其放大四倍使画面仅显示单个卵细胞，并使用伪染色图，随着点光源与样品间的计算距离改变，图中细胞的外围轮廓厚度发生明显变化；图 5(b)计算出的成像面与物面位置吻合，物像特征清晰可辨；图 5(c)中计算出的成像面不在物面上，物像离焦变得模糊。

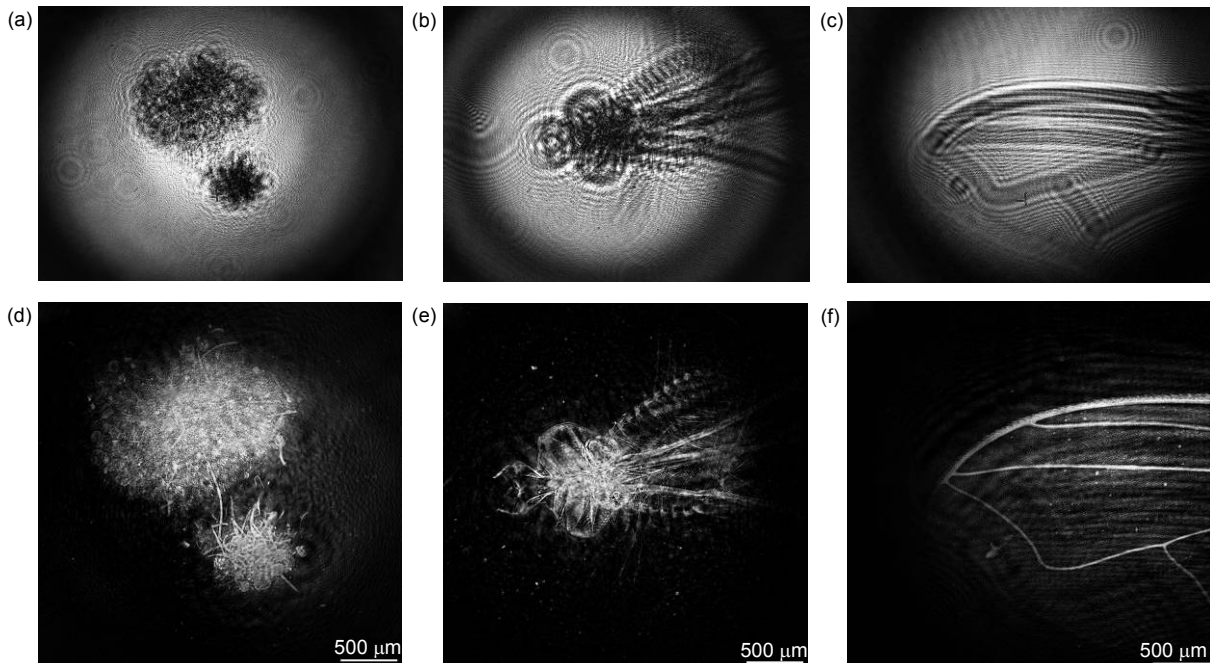


图 4 生物样本显微成像。(a) 根霉全息图；(b) 蚊子口器全息图；(c) 家蝇翅膀全息图；(d) 根霉重构结果；(e) 蚊子口器重构结果；(f) 家蝇翅膀重构结果

Fig. 4 Biology sample microscopy. (a) Rhizopusoryzae hologram; (b) Mosquito mouth hologram; (c) Housefly wing hologram; (d) Rhizopusoryzae reconstructed result; (e) Mosquito mouth reconstructed result; (f) Housefly wing reconstructed result

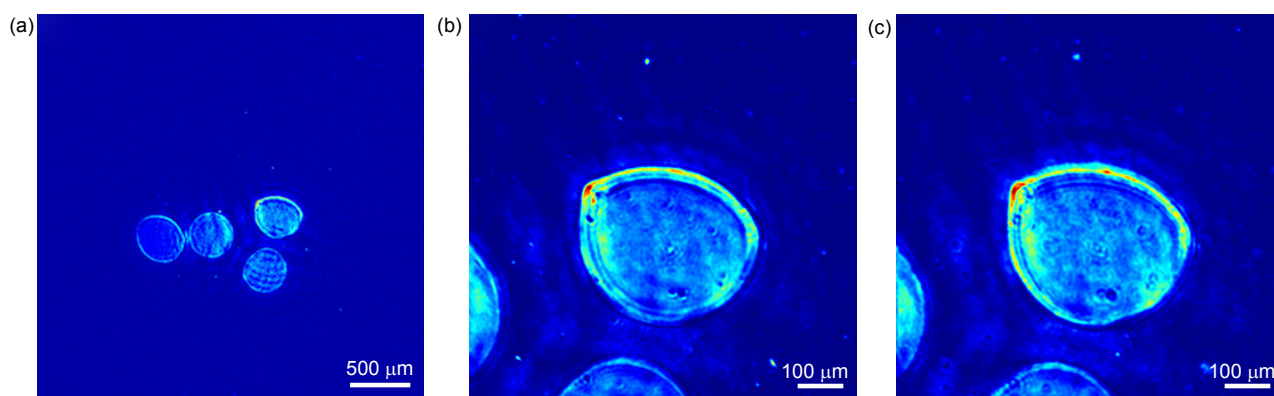


图5 蚊子卵细胞显微成像。(a) 全视场图像；(b) 数字放大图像；(c) 离焦图像

Fig. 5 Mosquito eggs microscopy. (a) Full field of view image; (b) Digital magnification image; (c) Out of focus image

## 4 结论

均匀球面波数字同轴全息是在传统的小孔数字同轴全息的基础上，加入激光扩束镜、显微物镜，利用不同直径的小孔阵列，匹配聚焦光斑生成理想球面波，解决小孔圆的不确定度和小孔尺寸对衍射的影响。CMOS 相机采集的图像显示，光波分布均匀，近似理想球面波，显微成像质量较好。

该成像系统在微米量级的高分辨率下，视场范围达到毫米量级，且非接触、单次曝光快速成像契合生物显微领域。生物样品显微成像结果也证实，成像过程不受盖玻片的影响，视场范围能够涵盖小型生物体，特别是特征尺寸在百纳米左右的生物装片，成像效果最好。

要想获得更高的分辨率，除了提高干涉条纹的对比度，改用更短波长的激光器以及更大靶面的 CMOS 相机外，还可以利用载有相机的位移台采集 9 幅图像进行拼接来得到 3 倍左右的面积<sup>[15]</sup>，当然多幅图像拼接的方式将牺牲快速成像的优势。

最后该测量系统光路结构简单，非接触测量可以广泛应用于生物医学研究、材料颗粒识别、微纳光学元件的面形检测等科研领域。

## 参考文献

- [1] Jiang M S, Zhang N N, Zhang X D, *et al.* Applications of hybrid search strategy in microscope autofocus[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2017, **44**(7): 685–694.  
江昱珊, 张楠楠, 张学典, 等. 混合搜索法在显微镜自动对焦中的应用[J]. *光电工程*, 2017, **44**(7): 685–694.
- [2] Lu B B, Liu L Q, Zheng Y M, *et al.* A method for segmenting the microscopic cable harness image automatically[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2016, **43**(10): 49–55.  
芦碧波, 刘利群, 郑艳梅, 等. 一种线束端子显微图像全自动分

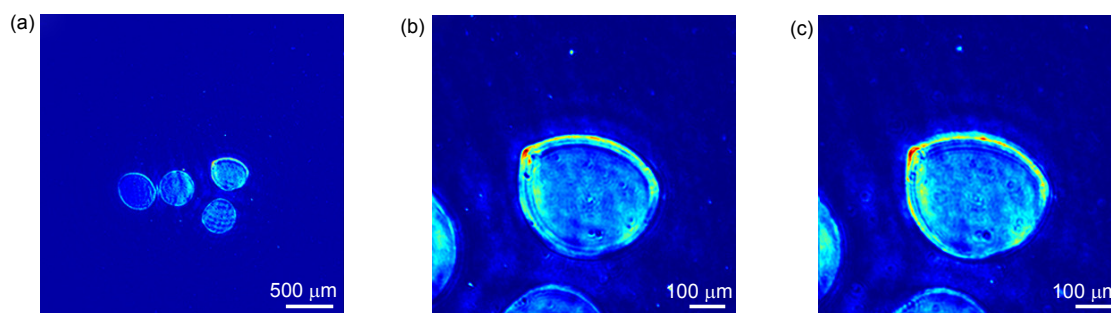
- 割方法[J]. *光电工程*, 2016, **43**(10): 49–55.
- [3] Garcia-Sucerquia J, Xu W B, Jericho S K, *et al.* Digital in-line holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2006, **45**(5): 836–850.
- [4] Xu W, Jericho M H, Meinertzhagen I A, *et al.* Digital in-line holography of microspheres[J]. *Applied Optics*, 2002, **41**(25): 5367–5375.
- [5] Malek M, Allano D, Coëtmelec S, *et al.* Digital in-line holography for three-dimensional-two-components particle tracking velocimetry[J]. *Measurement Science and Technology*, 2004, **15**(4): 699–705.
- [6] Das B, Yelleswarapu C S. Dual plane in-line digital holographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2010, **35**(20): 3426–3428.
- [7] Zhang Y C, Xie C Q. Differential-interference-contrast digital in-line holography microscopy based on a single-optical-element[J]. *Optics Letters*, 2015, **40**(21): 5015–5018.
- [8] Tian P, Hua Y L, Yang F, *et al.* High efficiency and flexible working distance digital in-line holographic microscopy based on Fresnel zone plate[J]. *Measurement Science and Technology*, 2017, **28**(5): 055209.
- [9] Kim M K. Wavelength-scanning digital interference holography for optical section imaging[J]. *Optics Letters*, 1999, **24**(23): 1693–1695.
- [10] Zhang T, Yamaguchi I. Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography[J]. *Optics Letters*, 1998, **23**(15): 1221–1223.
- [11] Yamaguchi I, Kato J I, Ohta S, *et al.* Image formation in phase-shifting digital holography and applications to microscopy[J]. *Applied Optics*, 2001, **40**(34): 6177–6186.
- [12] Poon T C. Recent progress in optical scanning holography[J]. *Journal of Holography and Speckle*, 2004, **1**(1): 6–25.
- [13] Yamaguchi I, Zhang T. Phase-shifting digital holography[J]. *Optics Letters*, 1997, **22**(16): 1268–1270.
- [14] Das B, Yelleswarapu C S, Rao D V G L N. Quantitative phase microscopy using dual-plane in-line digital holography[J]. *Applied Optics*, 2012, **51**(9): 1387–1395.
- [15] Massig J H. Digital off-axis holography with a synthetic aperture[J]. *Optics Letters*, 2002, **27**(24): 2179–2181.
- [16] Sánchez-Ortiga E, Doblas A, Saavedra G, *et al.* Off-axis digital holographic microscopy: practical design parameters for operating at diffraction limit[J]. *Applied Optics*, 2014, **53**(10): 2058–2066.

# Biology microscopy using well-distributed sphere digital in-line holography

Tian Peng<sup>1,2</sup>, Yan Wei<sup>1,2\*</sup>, Li Fanxing<sup>1,2</sup>, Yang Fan<sup>1,2</sup>, Wu Yunfei<sup>1,2</sup>, He Yu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Optical Technologies on Nano-Fabrication and Micro-Engineering, Institute of Optics and Electronics, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan 610209, China;

<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China



Mosquito eggs microscopy. (a) Full field of view image; (b) Digital magnification image; (c) Out of focus image

**Overview:** Digital in-line holography (DIH) with spherical wave, originally proposed by Gabor, is the simplest way in realizing holographic. The object light and reference light are coaxial, and interference fringes pattern are recorded digitally by image sensor. Complex amplitude distribution of object are displayed through reconstruction algorithm. In visible light range, although the resolution is micron, it provides wide field of view. Moreover, the characters of fast, real-time, non-contact make it be a promising tool in material identification, biology microscopy, lab-on-a-chip applications and particle track.

The quality of point source spherical wave, emerged from pinhole, has an important impact on the imaging. However, the size and uncertain round of pinhole cannot be eliminated refer to fabrication error. Although researchers have been capable of manufacturing nanometer accuracy pinhole, the cost is expensive extremely far more than optical elements. On the other hand, wetting films, pixel super-resolution, differential-interference-contrast are applied efficiently to improve image quality, field-of-view, and resolution, but they require sophisticated operation steps far beyond the simplicity of the spherical wave digital in-line geometry.

Diffraction is much better in condition of pinhole diameter matching for incident light wavelength. And the actual size of pinhole is determined by parameters and distance of image sensor. It makes heavy demands on manufacturing accuracy. We first consider obtaining the well-distributed spherical wave. Laser focuses into an infinitesimal spot through laser beam expander and microscope objective in turn. Altering axis distance between pinhole array and microscope can obtain suitable focal spot. Matching with the pinhole, an ideal spherical wave is generated. The influence of uncertain round of pinhole can be shifted to the edge of image sensor that is negligible. Then reconstruction algorithm simplify the computational process, which presents the object information. Finally, as a proof-of-concept, biology experiments demonstrate the proposed techniques.

As shown in mosquito eggs microscopy. Figure (a) is reconstruction result without any image processing, the field of view is 3.22 mm×3.22 mm and the resolution is 5.09 μm. Figure (b) and (c) are magnified digitally four times to display single egg. The difference of reconstruction distance, the result is changing. It is called digital focusing. Besides, the whole measurement process is fairly high efficiency, because only three steps: placing object, exposure, and reconstruction. Large area and high resolution recovery image is our target, and also the characteristic of this microscopy system. It can be used in detection of micro optical element, biological recognition, path tracking of plankton etc. Especially in biology and medicine research, high efficient, flexible working distance and field of view characters are much suitable.

**Citation:** Tian P, Yan W, Li F X, *et al.* Biology microscopy using well-distributed sphere digital in-line holography[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2019, **46**(1): 180110

Supported by Department of Science and Technology of Sichuan Province (2015JQ0009) and the National Natural Science Foundation of China (61705232)

\* E-mail: yanwei@ioe.ac.cn