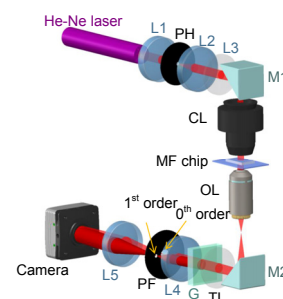


DOI: 10.12086/oe.2019.190046

微流体衍射相位显微成像及其在寄生虫测量中的应用

顾鑫^{1,2}, 黄伟^{2*}, 杨立梅², 李丰²¹ 中国科学技术大学纳米技术与纳米仿生学院, 安徽 合肥 230026;² 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 江苏 苏州 215600

摘要: 本文提出了一种将衍射相位显微技术与微流体芯片相结合的方法对水源性寄生虫进行定量测量。结合干涉技术与光学显微镜搭建了衍射相位显微成像系统, 实现对寄生虫的高灵敏度实时测量。基于光刻工艺, 设计和制作了 U 型捕获结构双层微流体芯片, 实现高通量的单个寄生虫捕获。将与聚二甲基硅氧烷(PDMS)折射率相同的聚蔗糖水溶液通入微腔, 消除 U 型捕获结构边缘衍射在相位成像时产生的显著干扰噪声。利用不同直径的标准聚苯乙烯微球验证了该系统的准确性, 最大相位值误差不超过 3%。采用上述系统测量了 100 个贾第鞭毛虫包囊和 100 个隐孢子虫卵囊, 然后从干涉图中重构出两虫的相位图。通过对定量相位图的分析得出两虫的形态学参数与定量的光体积差分布, 定量的数据为了解其生理特性提供了依据。微流体衍射相位显微成像系统结构简单, 稳定性好, 测量精度高, 在对单个微生物进行实时监测和无标记定量研究方面具有巨大的潜力。

关键词: 微流体; 衍射相位显微技术; 干涉; 全息

中图分类号: O436.1; TH742

文献标志码: A

引用格式: 顾鑫, 黄伟, 杨立梅, 等. 微流体衍射相位显微成像及其在寄生虫测量中的应用[J]. 光电工程, 2019, 46(12): 190046

Microfluidic diffraction phase microscopy and its application in parasites measurement

Gu Xin^{1,2}, Huang Wei^{2*}, Yang Limei², Li Feng²¹School of Nano Technology and Nano Bionics, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;²Suzhou Institute of Nano-Technology and Nano-Bionics, Chinese Academy of Science, Suzhou, Jiangsu 215600, China

Abstract: This paper proposes a method of using diffraction phase microscopy combined with microfluidic chip to quantitatively measure waterborne parasites. A diffraction phase microscopy system is built up by combining interferometry with optical microscope to achieve high sensitivity real-time measurement of parasites. Based on soft lithographic techniques, a double-layered microfluidic chip with U-shaped trapping structures is designed and fabricated for high throughput single parasites trapping. Ficoll solution with the same refractive index as polydimethylsiloxane (PDMS) is introduced into the microfluidic chamber to eliminate significant artifacts in phase imaging originating from diffraction at the edges of trapping structures. The accuracy of the system is verified using standard polystyrene microspheres of different diameters, and the error of maximum phase shift does not exceed 3%. 100

收稿日期: 2019-01-25; 收到修改稿日期: 2019-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61505240); 苏州市应用基础研究计划(SYG201414); 中国科学院青年创新促进会人才资助项目(2015258)

作者简介: 顾鑫(1994-), 男, 硕士研究生, 主要从事激光生物成像的研究。E-mail: xgu2017@sinano.ac.cn

通信作者: 黄伟(1983-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事激光生物成像的研究。E-mail: whuang2008@sinano.ac.cn

Giardia Lamblia (G. *Lamblia*) cysts and 100 *Cryptosporidium Parvum* (C. *Parvum*) oocysts are measured using this system. The phase maps of the parasites are obtained from the interferograms. The morphological parameters and quantitative optical volume difference distribution of the two kind of waterborne parasites are obtained by analyzing the quantitative phase maps. Quantitative data provides the basis for understanding their physiological characteristics. The microfluidic diffraction phase microscopy system has simple structure, good stability and high measurement accuracy, and has great potential for real-time monitoring and label-free quantitative studies of single microorganism.

Keywords: microfluidic; diffraction phase microscopy; interference; holographic

Citation: Gu X, Huang W, Yang L M, *et al.* Microfluidic diffraction phase microscopy and its application in parasites measurement[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2019, **46**(12): 190046

1 引言

水源性传染病是由于饮用或接触受病原微生物污染的水而引起的一类传染病。贾第鞭毛虫和隐孢子虫是两种常见的水源性原生动物寄生虫,可引起宿主腹痛、腹泻、腹胀、呕吐等不良症状。近年来,由贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊污染饮用水引起的水传播疾病多次爆发流行,对生态环境和人类健康构成了严重危害,已经成为了引起世界各国关注的重要公共卫生问题^[1-2]。

EPA 1623 作为检测贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊的标准方法受到世界各国卫生部门的广泛认可,该方法采用光学显微镜和免疫荧光法相结合的方式,通过染色观察虫体内部的结构特征,克服了微生物透明、成像对比度差的缺点^[3]。然而,将光学显微镜和免疫荧光工具简单相结合的方式是有缺陷的。采用荧光标记的方法,虽然可以提高成像对比度,但是操作繁琐,耗时长,而且这种方法会导致光漂白和光毒性反应,对微生物或者活细胞造成无法恢复的损伤。同时荧光信号难以量化,很难得到定量的数据结果^[4]。近年来,随着高灵敏度检测方法的发展,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[5]和酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[6]作为两种基因分子水平检测方法逐渐受到关注,然而这些检测方法成本昂贵,获取信息有限,无法给出足够的分析数据。

定量相位显微成像技术是一种无荧光标记的细胞和组织成像方法,其得到的生物细胞样品相位分布是具体的、可视化的,并可从相位分布中得到生物样品的折射率和厚度等具体信息^[7]。按照定量相位显微成像技术的干涉模式及相位信息的获取方式,可以分为相移干涉^[8]和离轴干涉^[9]两种。美国哈里森光谱实验室将希尔伯特相位成像技术与傅里叶变换相结合^[10-11],

形成离轴和共光路布局的衍射相位显微镜,此系统噪声低,稳定性高、图像采集速度快,被广泛应用到微生物检测领域^[12]。目前,在关于利用衍射相位显微技术进行定量相位成像的已发表研究中,大多数生物样品采用的是制备好的贴壁细胞,此时可以避免样品发生横向和纵向的随机布朗运动^[13-14]。对于悬浮的样品,一般将样品放置在载玻片和盖玻片之间进行观察成像。在这种情况下,样品随机分散在介质中,它们倾向于聚集并形成团簇。在所成像区域的干涉图中可能有来自相邻样品的干扰,从而引入意外的衍射和干扰噪声,导致定量相位图中产生误差或伪像。同时,样品的随机布朗运动会造成离焦现象,降低了相位恢复的准确性。

本文设计制作了 U 型捕获结构双层微流体芯片,结合干涉技术与光学显微镜搭建了衍射相位成像系统。用微流体芯片捕获了单个的贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊阵列,调节微流体芯片微腔内浸没介质的折射率使其等于聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)折射率,消除 U 型捕获结构边缘衍射在相位成像时产生的显著噪声干扰。通过对相位图分析得出两种水源性寄生虫的形态学参数与定量的光体积差分布,定量的数据为了解其生理特性提供了依据。

2 系统设计

2.1 光路结构

微流体衍射相位显微成像系统如图 1 所示。衍射相位显微成像系统是由光学显微镜结合衍射光栅和 4f 系统所形成。光源为波长 633 nm 的氦氖激光(HNL210L-EC, Thorlabs Inc.),激光经过空间滤波器(L1~L2, $f=75$ mm)中的针孔滤波得到均匀的准直光,进一步入射到光学显微镜系统。准直光经过收集透镜 L3 聚焦到聚光镜(0.3NA)的后焦点,从聚光镜出射的

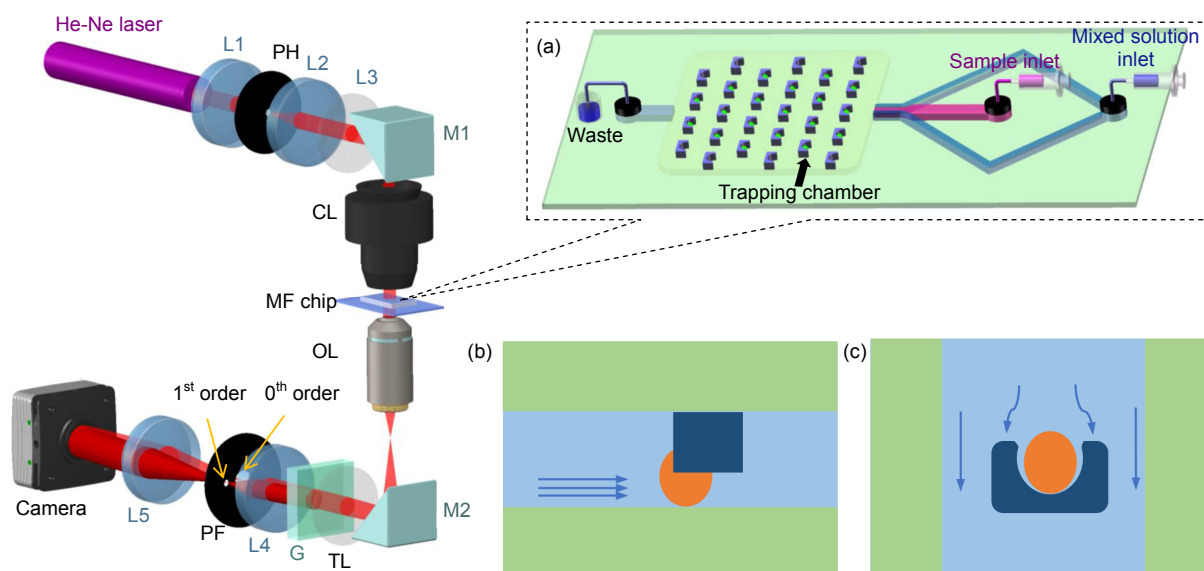
光为均匀的平面波。激光进一步照射到微流体芯片中被捕获的样品上, 经过样品的散射场由物镜($60\times$, 0.7NA , Nikon Inc.)收集并通过筒镜 TL 放大成像。从筒镜出射的平行光束入射到闪耀光栅 G(70 grooves/mm , #46067, Edmund optics Inc.)上产生多个衍射级。光栅后方放置有 $L4(f=40\text{ mm})$ 和 $L5(f=150\text{ mm})$ 组成的 $4f$ 放大系统, $4f$ 系统的放大率由光栅周期和相机的像素尺寸所决定。一个双孔滤波器 PF 放置在透镜 $L4$ 的傅里叶面处, 小圆孔与大圆孔分别只让 1 级光和 0 级光通过, 1 级光经过小孔($D=10\text{ }\mu\text{m}$)滤波过滤掉样品信息作为参考光, 0 级光完整通过大孔($D=2.4\text{ mm}$)作为物光。两束光在相机(DS-Fi2, Nikon Inc.)面上形成干涉光场。系统中所采用的透镜均是双胶合透镜, 具有更好的聚焦效果与离轴性能, 极大地减少了像差。

测量过程中, 将捕获的样品与系统对准, 拍摄含有样品信息的干涉图和无样品的背景图像^[15]。相位重建分为相位提取和相位解包两个过程。采用常见的 Hilbert 算法从干涉图中提取出相位信息。首先将含有样品信息的干涉图进行傅里叶变换得到功率谱, 然后将一级谱移到中心, 并使用低通滤波器提取一级谱进

行逆傅里叶变换得到包裹相位图, 随后减去经过相同步骤处理后的背景相位图, 去除由于光学元件的缺陷引入的背景噪声^[16]。相位提取算法中的反正切运算只能得到范围在 $(-\pi, \pi]$ 之间的包裹相位。事实上, 在大多数情况下, 生物样品与周围环境介质产生的相位差都要大于 2π , 本文采用运算较快的 Goldstein's 算法^[17]进行相位解包裹得到最终的样品相位图。

2.2 微流体芯片

图 1(a)所示为微流体芯片三维结构图, 芯片由并行排列的 U 型结构捕获阵列组成, 每一行包括 4 到 5 个捕获结构, 下一行微结构设置在上一行的间隙处使样品能够充分被捕获。本文设计的微流体芯片采用双层结构, 在提高捕获效率的同时缓解了芯片内的流体压力。图 1(b)与 1(c)分别为双层微结构的侧视图与俯视图, 上层含高度为 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的柱状微结构, 下层为高度为 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的无微结构通道, 该双层结构可以保证流体易于通过微通道。一旦寄生虫被捕获, 寄生虫将占据 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的通道, 进入被捕获区域的流体会减少并将未捕获的寄生虫带到其它捕获结构上。在芯片两端设



PH: pinhole; M1~M2: mirrors; L1~L5: lenses; CL: condenser lens; OL: objective lens; MF: microfluidic; TL: tube lens; G: grating; PF: pinhole filter

图 1 微流体衍射相位显微成像系统示意图。(a) 微流体芯片三维结构图; (b) 双层结构侧视图; (c) 双层结构俯视图

Fig. 1 Schematic of microfluidic quantitative phase imaging system. (a) Three-dimensional structure diagram of microfluidic chip; (b) Side view of double-layered structure; (c) Vertical view of double-layered structure

计有两个入水口和一个出水口,两个入水口分别用于通入水源性寄生虫样品和配制好的折射率匹配液,出水口将残留的废液进行收集。

微流体芯片的制作主要包括模具的制作与芯片的固化键合两个步骤。使用负性光刻胶 SU-8 2002 和 SU-8 2010 (MicroChem Corp.) 分别制作高度为 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的微流体通道和高度为 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的含捕获结构的微流体通道。将 PDMS (Sylgard 184, Dow Corning Corp.) 预聚体和固化剂按质量比 10 : 1 均匀混合,在真空箱中放置 1 h 除尽混合物中的气泡。然后将 PDMS 混合液倾倒在模具上,放入 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内固化两小时,待冷却至室温后取下 PDMS 芯片并切割打孔。换上无捕获结构的模具,重复上述步骤制作另一块 PDMS 芯片,完成后对两块 PDMS 芯片表面进行氧等离子体处理,最后在显微镜下将两块 PDMS 芯片进行对准键合,放入 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱,静置过夜。

3 准确性验证

系统采用的是常用的透射式生物显微镜,其分辨

率是由光波长 λ 、聚光镜数值孔径 NA_{con} 和物镜数值孔径 NA_{obj} 所共同决定的,经过计算可以得到本文搭建的微流体衍射相位显微成像系统的横向分辨率为 $0.77\text{ }\mu\text{m}$,该系统能够实现对水源性寄生虫的亚微米级定量测量。为了验证微流体衍射相位成像系统的准确性,使用聚苯乙烯微球($4.8\text{ }\mu\text{m}$, G0500, ThermoFisher Inc.) 对其进行了测试。通过扫描电子显微镜对微球标称直径进行测量,均值为 $4.852\text{ }\mu\text{m}$,标准差为 $0.021\text{ }\mu\text{m}$ 。首先取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 原溶液加去离子水稀释 200 倍,另外加 0.01% 的 Tween[®] 20 溶液防止小球粘附在微腔壁上。然后将溶液吸入注射器,注射器通过微管与微流芯片的样品入口相连。最后采用精密注射泵 (LSP02-1B, Wenhao Co., Ltd.) 以 $1\text{ }\mu\text{L/min}$ 的速率对注射器进行缓慢推进,5 min 后在显微镜下进行观察,所捕获微球的明场图如图 2(a) 所示。图 2(b) 和 2(c) 分别是捕获微球的干涉图和相位图,可以看出在对捕获的微球进行定量相位成像时,干涉图中微球与 U 型微结构接触的边产生了严重畸变,导致恢复的相位图中出现大量误差与伪像。这是由于 PDMS 与水折射率差别较大,

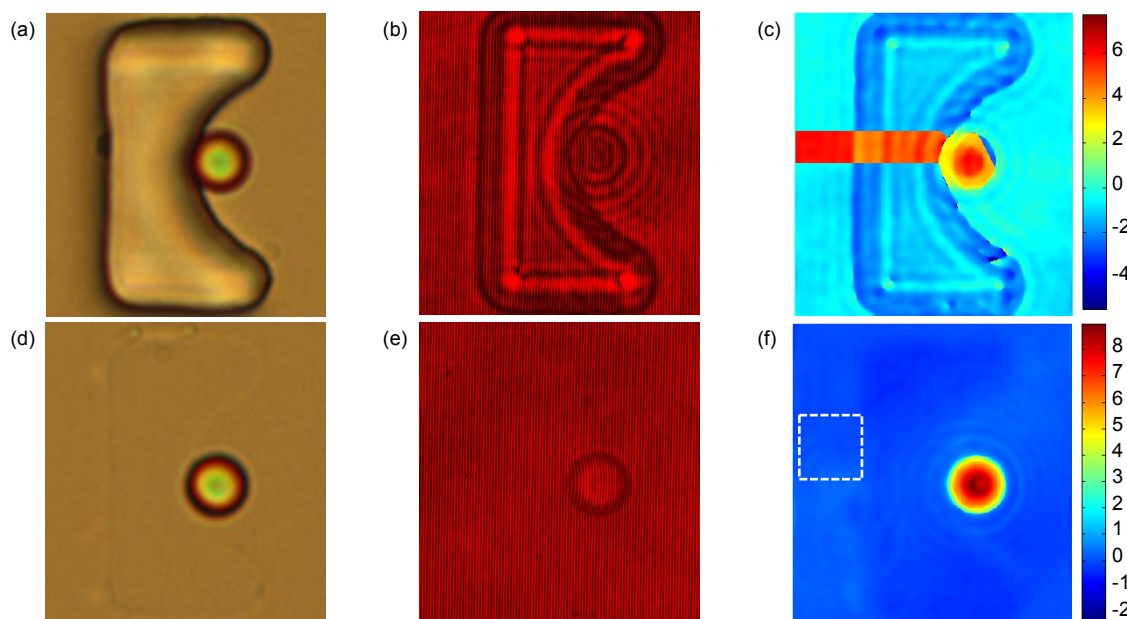


图 2 聚苯乙烯微球定量相位成像。(a) 去离子水中捕获聚苯乙烯微球明场图;(b) 去离子水中捕获聚苯乙烯微球干涉图;(c) 去离子水中捕获聚苯乙烯微球定量相位图;(d) 折射率匹配液中捕获聚苯乙烯微球明场图;(e) 折射率匹配液中捕获聚苯乙烯微球干涉图;(f) 折射率匹配液中捕获聚苯乙烯微球定量相位图

Fig. 2 Quantitative phase imaging of polystyrene microspheres. (a) Bright field image of trapped polystyrene microsphere in deionized water; (b) Interferogram of trapped polystyrene microsphere in deionized water; (c) Phase image of trapped polystyrene microsphere in deionized water; (d) Bright field image of trapped polystyrene microsphere in refractive index matching solution; (e) Interferogram of trapped polystyrene microsphere in refractive index matching solution; (f) Phase image of trapped polystyrene microsphere in refractive index matching solution

光在两者接触面处产生显著的衍射现象,使得微球相位无法准确恢复。

U型微结构的衍射现象可以通过将微腔内浸没溶液的折射率调整到与PDMS的折射率相同来消除。使用椭圆偏振光谱仪(MD2000D)测得PDMS芯片在633 nm波长下折射率为1.4110,PDMS芯片折射率与固化温度及时间密切相关,模具上的微通道阵列可以保证一次制作多个相同折射率的芯片。为了使折射率匹配溶液能够提供良好的生物相容性,采用聚蔗糖(PM400, Sigma-Aldrich)配置折射率匹配液。聚蔗糖是一种典型的蔗糖多聚体,其羟基含量高,易溶于水,具有相对低的渗透压和膜透性,可以使细胞保持生理和形态的完整性,因此广泛用于细胞分离和培养基制备等生物学应用^[18-19]。调整去离子水与聚蔗糖比例,使用折射率仪(PAL-RL, 测量范围 1.3306~1.5284, ATAGO)对混合液体折射率测量,在聚蔗糖溶液质量体积浓度为51.35%(w/v)时得到折射率为1.4110的匹配液。

将折射率匹配液通过微流体芯片的混合液体入口缓慢通入微腔中,图2(d)为隐掉微结构后的明场图,可以看出微结构可以基本被隐去。图2(e)和2(f)分别是隐掉微结构后捕获微球的干涉图和相位图,干涉图中U型微结构的衍射现象基本消除并得到清晰完整的小球轮廓,相位重建后微球周围的干扰噪声被消除,得到了均匀背景的微球定量相位图。在整个测量过程中,先从样品入口通入样品水溶液,待样品被充分捕获后停止样品的通入,然后从混合液体入口通入折

率匹配液隐去微结构。

聚苯乙烯微球的相位延迟可以表示为

$$\varphi(x,y) = \frac{2\pi}{\lambda}(n_p - n_m)h(x,y), \quad (1)$$

其中: n_p 和 n_m 分别为聚苯乙烯微球和其所处液体介质的折射率, $h(x,y)$ 表示聚苯乙烯微球的厚度分布。分别捕获直径为2 μm , 3 μm , 4.8 μm 的聚苯乙烯微球并隐去微结构,测量其最大相位延迟。每个直径下对应测量10个聚苯乙烯微球,不同直径聚苯乙烯微球的最大相位延迟如图3(a)所示,可以看出实验测量结果与理论结果相一致,最大相位值误差不超过3%。实验中进一步验证了相位测量的可重复性,将隐去微结构的4.8 μm 微球移动到视野范围内的10个不同位置处,测量该球在每个位置下的最大相位延迟,10次测量值的标准偏差为5.79 nm,表明不同位置对测量值的影响程度较小。因此,本文搭建的微流体衍射相位成像系统具有较高的定量测量准确性和精确性。

为了分析成像系统在相位测量时的稳定性,在图2(e)的实验条件下拍摄了同一个微球在10 s内的210幅连续干涉图。将获得的干涉图通过相位重建得到相位图,取每幅相位图中相同的背景区域,通过计算该区域每个像素点相位值的变化来量化相位波动。图2(f)中白色虚线区域(100 pixels×100 pixels)内每个像素点相位值的标准偏差分布直方图如图3(b)所示,系统的时间噪声平均误差为5.11 nm,与之前报道的2.96 nm^[20]为同一数量级。较低的相位波动有助于精确地对样品相位进行测量。

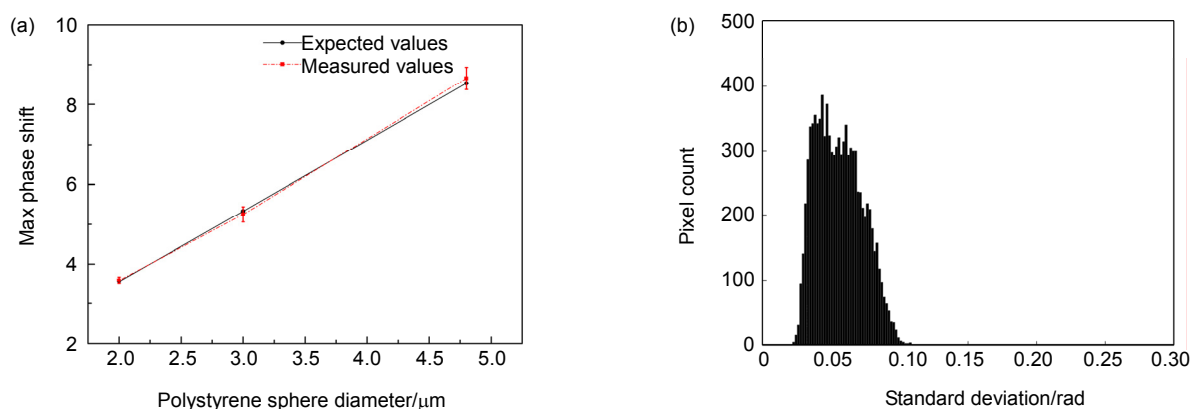


图3 (a) 不同直径聚苯乙烯微球的相位延迟; (b) 像素点处相位值波动直方图

Fig. 3 (a) Phase shift of polystyrene microspheres of different diameters; (b) Histograms of pixel-wise phase fluctuations

4 水源性寄生虫测量

贾第鞭毛虫和隐孢子虫均属于寄生性的致病原生物。贾第鞭毛虫的生活史包括了滋养体和包囊两个不同的发育阶段。包囊呈椭圆形，有较厚的囊壁，成熟的包囊具有感染性，通过污染的食物、水源进入宿主。隐孢子虫有裂殖生殖、配子生殖和孢子生殖三个阶段，随宿主粪便排出的成熟卵囊在环境中为感染阶段^[21-22]。两种寄生虫在水中易倾向于聚集成簇，成像区域可能会有来自相邻寄生虫衍射的干扰。悬浮寄生虫的随机布朗运动会造成离焦现象，对实验结果的准确性产生较大干扰。

使用微流体芯片可以高效地分离出单个寄生虫阵列，精确地对其形态和生理学参数进行研究。实验采用的贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊样品来自美国 Waterborne 公司的原装样品，型号分为 P101 和 P102C。取 10 μL 原溶液滴入配好的磷酸盐缓冲溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 中进行稀释，将稀释后的悬浮液转移到注射器中，整个测量过程与聚苯乙烯微球测量相类似。图 4(a) 为 20 倍物镜下在 PBS 中贾第鞭毛虫捕获阵列的显微镜明场图，单个虫体可以较好地单个捕获位点所捕获，进而实现高通量的单个虫体定位观察。可以看出，寄生虫透明度较高，虫体内部结构对比度差，虫体之间具有一定的形态学差异性。进一步获得寄生虫的定量相位图可以提高形态学参数测量的准确性。图 4(b) 为折射率匹配液中捕获贾第鞭毛虫的明场图，被捕获的贾第鞭毛虫几乎没有损失，这有助于高通量地对该虫进行定量相位成像。

样品的不同区域具有不同的折射率和厚度分布，

衍射相位成像通过干涉记录样品的光程差 (optical path difference, OPD, 用 D_{OPD} 表示) 来反映样品信息。光程差是样品和周围介质之间折射率差沿光轴的积分，表示为

$$D_{\text{OPD}}(x,y)=\int_0^{h(x,y)}(n(x,y,z)-n_0)dz, \quad (2)$$

其中： $n(x,y,z)$ 为样品折射率分布， n_0 为周围介质折射率， z 为沿光轴的坐标， $h(x,y)$ 为样品的厚度分布。通过 D_{OPD} 对样品总投影面的积分可以得到样品的光体积分差 (optical volume difference, OVD, 用 D_{OVD} 表示)，表示为^[23]

$$D_{\text{OVD}}=\iint D_{\text{OPD}}(x,y)dxdy. \quad (3)$$

图 5(a) 和图 5(c) 分别是捕获的贾第鞭毛虫和隐孢子虫在折射率匹配液中的干涉图，图 5(b) 和图 5(d) 是对应的无干扰噪声定量相位图，其最大相位值处于理论值范围之内。使用上述系统对 100 个贾第鞭毛虫包囊和 100 个隐孢子虫卵囊进行测量，从相位图中提取出定量信息。图 6 展示了贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊的形态学分布结果，贾第鞭毛虫包囊的长轴在 9 μm ~16 μm 之间，短轴在 5 μm ~10 μm 之间，其椭圆度平均值为 0.44。对于隐孢子虫卵囊，长轴和短轴在 3 μm ~6 μm 之间，椭圆度平均值 0.14。测量结果与之前报道^[18-19]的参数相一致。贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊的 OVD 分布如图 7 所示，直方图显示了两虫 OVD 值的分布差异。可以看出，直方图呈高斯分布，贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊的 OVD 均值为 6.51 μm^3 ，1.52 μm^3 ，标准偏差为 1.98 μm^3 ，0.84 μm^3 。两虫的形态学参数和光体积分参数也为两虫的鉴别区分提供了有力的依据。

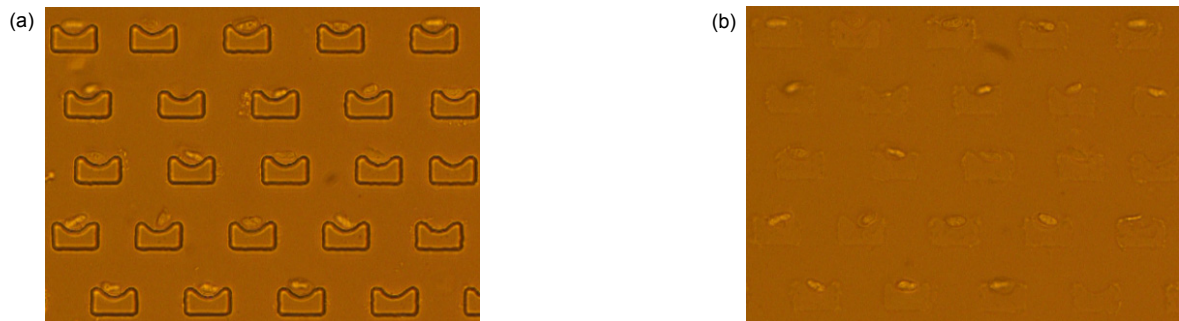


图 4 贾第鞭毛虫包囊捕获阵列。(a) 在 PBS 中；(b) 在折射率匹配液中

Fig. 4 Trapping array with trapped *G. Lamblia* cysts. (a) In PBS; (b) In refractive index matching solution

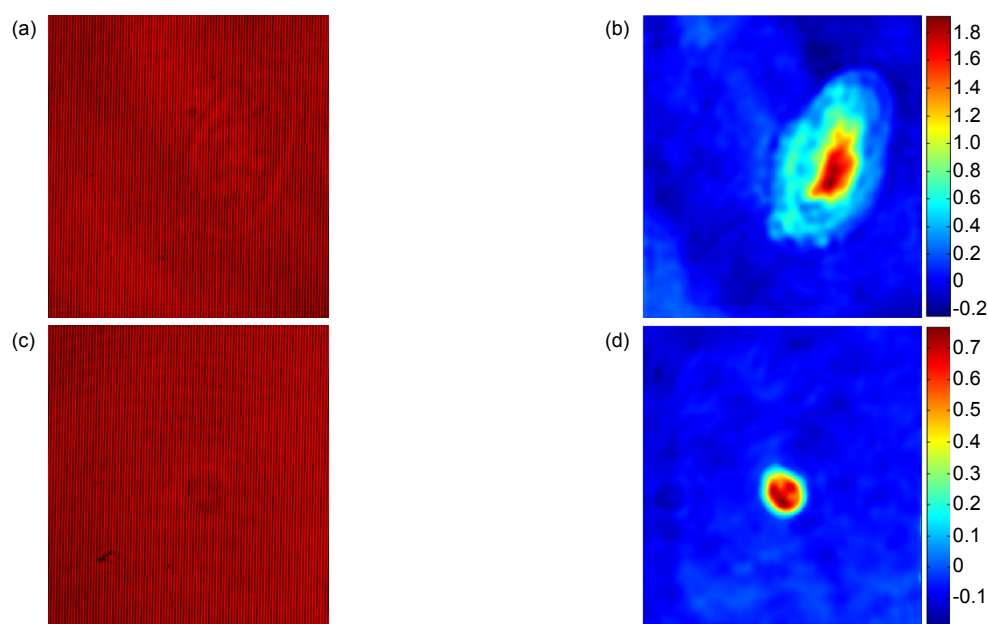


图 5 水源性寄生虫定量相位成像。(a) 折射率匹配液中捕获贾第鞭毛虫包囊干涉图；(b) 折射率匹配液中捕获贾第鞭毛虫包囊定量相位图；(c) 折射率匹配液中捕获隐孢子虫卵囊干涉图；(d) 折射率匹配液中捕获隐孢子虫卵囊定量相位图

Fig. 5 Quantitative phase imaging of waterborne parasites. (a) Interferogram of trapped *G. Lamblia* cyst in refractive index matching solution; (b) Phase image of trapped *G. Lamblia* cyst in refractive index matching solution; (c) Interferogram of trapped *C. Parvum* oocyst in refractive index matching solution; (d) Phase image of trapped *C. Parvum* oocyst in refractive index matching solution

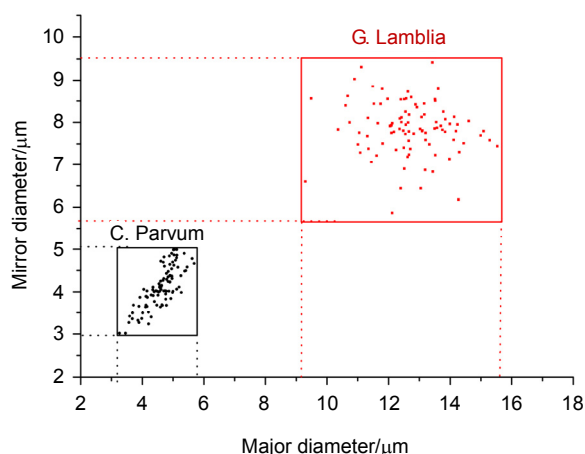


图 6 贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊的形态学测量统计图

Fig. 6 Statistical analysis of morphological measurements of *G. Lamblia* cyst and *C. Parvum* oocyst

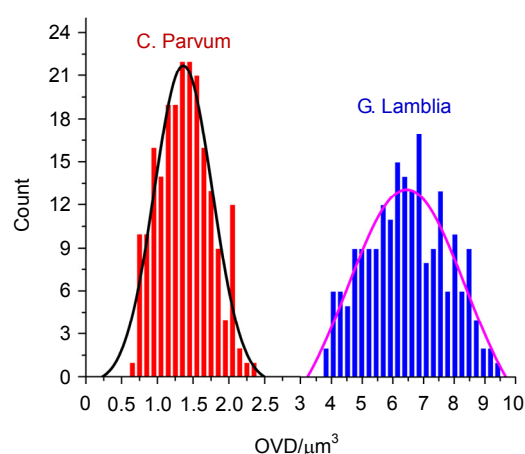


图 7 贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊的光体积差分布图

Fig. 7 OVD of *G. Lamblia* cyst and *C. Parvum* oocyst

5 结 论

本文设计和开发了基于微流体芯片装置的衍射相

位成像系统。制作的含 U 型捕获结构的双层微流体芯片实现了对贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊的高通量捕获。针对 U 型捕获结构在相位成像时产生的显著衍

射伪像,采用折射率匹配液隐去 U 型微结构,进而消除干扰噪声。利用不同直径的标准聚苯乙烯微球验证了系统的准确性,结果表明微流体衍射相位成像系统可以准确地进行定量相位成像。最后对无伪像的贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊定量相位图进行了统计分析,贾第鞭毛虫包囊长轴 $9\ \mu\text{m}\sim 16\ \mu\text{m}$,短轴 $5\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$,椭圆度平均值 0.44。隐孢子虫卵囊长轴和短轴在 $3\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m}$ 之间,椭圆度平均值 0.14。贾第鞭毛虫包囊和隐孢子虫卵囊的 OVD 均值分别为 $6.51\ \mu\text{m}^3$, $1.52\ \mu\text{m}^3$,标准偏差分别为 $1.98\ \mu\text{m}^3$, $0.84\ \mu\text{m}^3$ 。微流体衍射相位成像系统在对微小生物体分离筛选,以及无标记定量成像方面具有广阔的应用前景。

参考文献

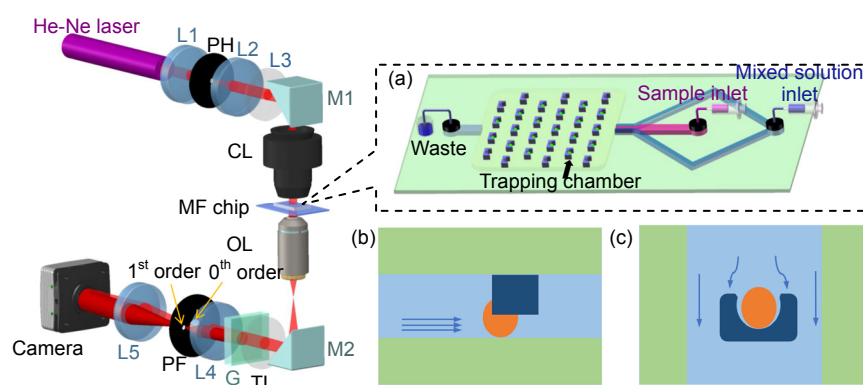
- [1] Marshall M M, Naumovitz D, Ortega Y, et al. Waterborne protozoan pathogens[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1997, **10**(1): 67–85.
- [2] Savioli L, Smith H, Thompson A. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'[J]. *Trends in Parasitology*, 2006, **22**(5): 203–208.
- [3] EPA. Technologies and techniques for early warning systems to monitor and evaluate drinking water quality: a state-of-the-art review[R]. Washington, DC, USA: Environmental Protection Agency, 2005.
- [4] Hoebe R A, van Oven C H, Gadella Jr T W J, et al. Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, **25**(2): 249–253.
- [5] Guy R A, Payment P, Krull U J, et al. Real-time PCR for quantification of giardia and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(9): 5178–5185.
- [6] Sadaka H A, Gaafar M R, Mady R F, et al. Evaluation of ImmunoCard STAT test and ELISA versus light microscopy in diagnosis of giardiasis and cryptosporidiosis[J]. *Parasitology Research*, 2015, **114**(8): 2853–2863.
- [7] Park Y K, Depeursing C, Popescu G. Quantitative phase imaging in biomedicine[J]. *Nature Photonics*, 2018, **12**(10): 578–589.
- [8] Ikeda T, Popescu G, Dasari R R, et al. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems[J]. *Optics Letters*, 2005, **30**(10): 1165–1167.
- [9] Popescu G, Deflores L P, Vaughan J C, et al. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics[J]. *Optics Letters*, 2004, **29**(21): 2503–2505.
- [10] Paganin D, Nugent K A. Noninterferometric phase imaging with partially coherent light[J]. *Physical Review Letters*, 1998, **80**(12): 2586–2589.
- [11] Shaked N T, Zhu Y Z, Rinehart M T, et al. Two-step-only phase-shifting interferometry with optimized detector bandwidth for microscopy of live cells[J]. *Optics Express*, 2009, **17**(18): 15585–15591.
- [12] Popescu G, Ikeda T, Dasari R R, et al. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics[J]. *Optics Letters*, 2006, **31**(6): 775–777.
- [13] Park K, Millet L J, Kim N, et al. Measurement of adherent cell mass and growth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, **107**(48): 20691–20696.
- [14] Eldridge W J, Sheinfeld A, Rinehart M T, et al. Imaging deformation of adherent cells due to shear stress using quantitative phase imaging[J]. *Optics Letters*, 2016, **41**(2): 352–355.
- [15] 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. 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.
- [16] Xiang W D, Yang P, Wang S, et al. Underwater image enhancement based on red channel weighted compensation and gamma correction model[J]. *Opto-Electronic Advances*, 2018, **1**(10): 180024.
- [17] Goldstein R M, Zebker H A, Werner C L. Satellite radar interferometry: two-dimensional phase unwrapping[J]. *Radio Science*, 1988, **23**(4): 713–720.
- [18] GE Healthcare. Ficoll PM70, Ficoll PM400, Data File 18–1158-27 AB[EB/OL]. <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3-bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=12817>.
- [19] Low F C, Wiemken A. Fractionation of *Hevea brasiliensis* latex on ficoll density gradients[J]. *Phytochemistry*, 1984, **23**(4): 747–750.
- [20] Zheng C, Zhou R J, Kuang C F, et al. Digital micromirror device-based common-path quantitative phase imaging[J]. *Optics Letters*, 2017, **42**(7): 1448–1451.
- [21] Thompson R C A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis[J]. *Veterinary Parasitology*, 2004, **126**(1–2): 15–35.
- [22] Smith H V, Nichols R A B. *Cryptosporidium*: detection in water and food[J]. *Experimental Parasitology*, 2010, **124**(1): 61–79.
- [23] Aknoun S, Savatier J, Bon P, et al. Living cell dry mass measurement using quantitative phase imaging with quadriwave lateral shearing interferometry: an accuracy and sensitivity discussion[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, **20**(12): 126009.

Microfluidic diffraction phase microscopy and its application in parasites measurement

Gu Xin^{1,2}, Huang Wei^{2*}, Yang Limei², Li Feng²

¹School of Nano Technology and Nano Bionics, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

²Suzhou Institute of Nano-Technology and Nano-Bionics, Chinese Academy of Science, Suzhou, Jiangsu 215600, China



Schematic of microfluidic quantitative phase imaging system. (a) Three-dimensional structure diagram of microfluidic chip;

(b) Side view of double-layered structure; (c) Vertical view of double-layered structure

Overview: Quantitative phase imaging (QPI) is developed based on light microscopy as an advanced modality for label-free biomedical optical imaging. Diffraction phase microscopy (DPM) is demonstrated as a novel QPI technique, which combines many of the best attributes of current QPI methods. In the quantitative phase imaging process, the suspended sample is usually placed between a coverslip and a glass slide for observation imaging. The sample is easy to aggregate and form clusters and have weak Brownian motion in this case, which can introduce unexpected noise interference in the imaging area.

In this paper, we propose a method of using DPM combined with microfluidic chip to quantitatively measure *Giardia Lamblia* (*G. Lamblia*) cysts and *Cryptosporidium Parvum* (*C. Parvum*) oocysts. The DPM system is placed at the output port of conventional light microscope. The DPM interferometer is created using a diffraction grating in conjunction with a 4f lens system. A three-dimensional structure of a microfluidic chip is fabricated using polydimethylsiloxane (PDMS). The chip consists of parallel arrays of U-shaped trapping structures, which contained between 4 and 5 traps over its width. Each row of traps is placed at the gap from the previous row to allow the sample to be fully trapped. A double-layered structure is designed and fabricated to increase trap efficiency and reduce pressure in the chip. Ficoll solution with the same refractive index as polydimethylsiloxane (PDMS) is introduced into the microfluidic chamber to eliminate significant artifacts in phase imaging originating from diffraction at the edges of trapping structures. The accuracy of the system is verified using standard polystyrene microspheres of different diameters, and the error of maximum phase shift does not exceed 3%. The microfluidic phase imaging system can be accurately used for quantitative phase imaging. 100 *G. Lamblia* cysts and 100 *C. Parvum* oocysts are measured using this system. The phase maps of the parasites are obtained from the interferograms. The morphological parameters and quantitative optical volume difference distribution of the two kind of waterborne parasites are obtained by analyzing the quantitative phase maps. Quantitative data provides the basis for understanding their physiological characteristics. The microfluidic diffraction phase microscopy system has simple structure, good stability and high measurement accuracy, and has great potential for real-time monitoring and label-free quantitative studies of single microorganism.

Citation: Gu X, Huang W, Yang L M, *et al.* Microfluidic diffraction phase microscopy and its application in parasites measurement[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2019, **46**(12): 190046

Supported by National Natural Science Foundation of China (61505240), the Applied Basic Research Programs of Suzhou City (SYG201414), and the Youth Innovation Promotion Association of CSA (2015258)

* E-mail: whuang2008@sinano.ac.cn