

纳米颗粒成像自动对焦评价算法

汪路涵^{1,2}, 巩岩^{2*}, 张艳微², 高若谦², 郎松², 曹选³¹中国科学技术大学生物医学工程学院(苏州)生命科学与医学部, 江苏 苏州 215163;²中国科学院苏州生物医学工程技术研究所医用光学技术研究室, 江苏 苏州 215163;³苏州科技大学物理科学与技术学院, 江苏 苏州 215009

摘要 纳米颗粒成像过程中,离焦位置的粒子团簇和大颗粒杂质产生明亮的弥散斑,导致现有的对焦算法无法实现自动对焦功能。利用基于大津算法的二值化分割和形态学开闭方法,使离散的弥散斑聚合为一个区域,并利用连通域标记方法筛选剔除大面积的光斑区域,构造四邻域水平-对角平方函数和阈值四邻域水平-对角开方函数,将函数分别作为粗对焦和精对焦的评价指标,提高了自动对焦搜索的准确性和可靠性。实拍离焦序列图,并与 5 种常用的评价算法进行对比,结果表明所提自动对焦评价算法具有良好的鲁棒性、无偏性和单峰性。

关键词 图像处理; 纳米颗粒; 自动对焦; 评价算法; 连通域标记

中图分类号 TP391 文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP220892

Autofocus Evaluation Algorithm for Nanoparticle Imaging

Wang Luhan^{1,2}, Gong Yan^{2*}, Zhang Yanwei², Gao Ruoqian², Lang Song², Cao Xuan³¹Division of Life Sciences and Medicine, School of Biomedical Engineering (Suzhou), University of Science and Technology of China, Suzhou 215163, Jiangsu, China;²Medical Optical Research Laboratory, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China;³School of Physical Science and Technology, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, Jiangsu, China

Abstract In nanoparticle imaging, particle clusters and large impurity particles in the defocused position cause bright spots, thus hindering the existing focusing algorithms in realizing the autofocus function. This study used binarization segmentation based on the Otsu algorithm, as well as morphological opening and closing methods, to aggregate the dispersed diffuse spots into one area. Furthermore, the connected domain labeling method was used to filter out large regions of the spot area. A four-neighborhood level-diagonal square function and threshold-four-neighborhood level-diagonal square root function were constructed and used as the evaluation indicators for the coarse and fine focus, respectively, thereby improving the accuracy and reliability of autofocus search. The defocus sequence diagram was obtained and the proposed algorithm was compared to the five commonly used evaluation algorithms. The results demonstrate that the proposed autofocus evaluation algorithm is highly robust, unbiased, and unimodal.

Key words image processing; nanoparticle; autofocus; evaluation algorithm; connected domain labeling

1 引言

自动对焦技术将现代电子技术和机械自动控制技术相结合,利用光电元件代替人眼,控制镜头或调焦结构至焦点位置,获得清晰成像,广泛运用于航空航天、

显微成像、数码摄影等多个领域中^[1-4]。传统的自动对焦技术需要在成像系统外增加元件,设备体积庞大且结构复杂。随着计算机算力的增长和处理器的微型化,基于数字图像处理的自动对焦方法得以快速发展。

基于图像处理的自动对焦方法的核心在于选取适

收稿日期: 2022-03-04; 修回日期: 2022-03-07; 录用日期: 2022-03-17; 网络首发日期: 2022-03-27

基金项目: 国家自然科学基金(61975228, 62005307)、中国科学院科研仪器设备研制项目(YJKYYQ20180032)、济南高校“20 条”(2019GXRC042)、苏州市姑苏重大创新团队(ZXT2019007)

通信作者: *gongy@sibet.ac.cn

应使用场景的对焦评价函数,并配合适当的搜索策略,从而使仪器准确快速地找到焦平面位置。近年来,有很多学者就对焦评价函数展开研究,并制定了评价函数性能优劣的标准^[5-7]。2022年,熊锐等^[8]将Brenner函数与Roberts函数相结合,提出能适应多方向梯度变化的对焦评价函数;2021年,曾海飞等^[9]将梯度阈值分割引入评价函数,使改进后的算法具备更好的灵敏度和鲁棒性;2021年,王秀峰等^[10]提出一种联合余弦变换和拉普拉斯算子评价结果的方法,该方法获得了更优的聚焦评价分辨率;2019年,崔光芒等^[11]结合多尺度分解工具和梯度绝对值算子,提出了一种显微图像清晰度评价算法。常用的评价函数主要有梯度评价函数^[12]、频域类评价函数^[13]和统计学评价函数等。然而,这些评价函数大多只能用于一般场景,在一些特殊场景极易受到噪声、光照等条件的干扰,无法实现准确对焦。

纳米颗粒检测场景中,离焦图像和准焦图像差异较大,图像序列中呈现出运动的数量众多的纳米颗粒光点,且光点会随着离焦程度的增加而增大弥散程度,同时亮度降低。离焦状态下,部分粒子聚合形成的团簇及大颗粒杂质受到激光照射,会出现数量不等的明亮的离散大光斑,其亮度与准焦位置的光点相近。现有的评价函数受到弥散斑的干扰,从而无法有效判断图像的真实清晰度。本文根据实拍的离焦图像序列,结合光斑形态特点和对焦搜索策略,提出了一种连通域标记筛除大面积光斑的纳米颗粒自动对焦评价算法,实现了纳米颗粒示踪分析仪的自动对焦。

2 传统的对焦评价函数

2.1 梯度类函数

通常将评价函数分为梯度类、频域类和统计学类。其中梯度评价函数通过对图像灰度梯度差异的增强来判断图像清晰程度,经典的几种评价函数有Brenner函数、Tenengrad函数和Laplace函数等。

Brenner函数^[14](梯度滤波器法)结构最简单,只需计算单一水平方向2阶的梯度差值,表达式为

$$F = \sum_{x=1}^{M-2} \sum_{y=1}^N [f(x+2, y) - f(x, y)]^2. \quad (1)$$

Tenengrad函数^[15]利用两个算子求取水平和垂直方向的梯度值,对噪声抑制效果较好。其表达式为

$$F = \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N \left[\sqrt{S_x(x, y)^2 - S_y(x, y)^2} \right], \quad (2)$$

式中: $S_x(x, y) = f(x, y) \otimes T_x$, $S_y(x, y) = f(x, y) \otimes T_y$,

$$T_x = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}, T_y = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}.$$

Laplace函数通过对图像进行模板卷积平方运算得到清晰度评价。以Laplace算子构造的评价函数的评价效果不受图像方位变化的影响。其表达式为

$$F = \sum_{x=1}^{M-1} \sum_{y=1}^{N-1} G(x, y)^2, \quad (3)$$

$$\text{式中: } G(x, y) = f(x, y) \otimes T, T = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix}.$$

2.2 频域类函数

频域类函数根据图像高频分量的多少来评价清晰度,常用的有二维离散傅里叶变换法、二维离散余弦变换法等。然而该类方法由于需要进行变换,计算量庞大,不适用于动态显微成像等实时性要求较高的领域。

2.3 统计学函数

清晰的图像细节丰富,灰度值分布更广泛,灰度直方图集中度低,这一特性可以用统计学的方法来描述,基于统计学的评价函数主要有自相关函数和方差函数等。

自相关函数也称为Vollaths函数^[16],表示空间两点相似程度。经过发展,增强了抗噪性和降低复杂程度的改进形式为

$$F = \sum_{x=1}^{M-2} \sum_{y=1}^N f(x, y) |f(x+2, y) - f(x+1, y)|. \quad (4)$$

方差函数可以表征图像的灰度值分布,表达式为

$$F = \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N [f(x, y) - u]^2, \quad (5)$$

式中: u 为图像灰度均值。

3 连通域标记筛除弥散斑的自动对焦评价算法

纳米颗粒离焦时,粒子团簇和杂质产生明亮弥散斑,其带来的大量边缘信息将导致现有评价函数的评判依据失效,鲁棒性、单峰性大大降低。因此,去除离焦弥散斑的影响是纳米颗粒检测场景实现自动对焦的首要问题。本文提出了一种连通域标记筛除弥散斑的自动对焦评价算法,该算法在连通域标记剔除大面积弥散斑的基础上,在粗对焦和精对焦过程中分别使用两套评价函数,方法流程如图1所示。

3.1 基于大津法的图像二值化及弥散斑区域聚合

图像二值化旨在将明亮弥散斑与暗弥散斑和背景区分开来,以便后续操作去除这部分区域的干扰。大津法又称为最大类间方差法^[17],广泛运用于对目标与背景灰度差别较大的图像进行分割处理方面。其将图像分为目标和背景两部分,目标部分的像素占全图像素的比例为 P_0 ,平均灰度为 μ_0 ;背景部分的像素占全图像素的比例为 P_1 ,平均灰度为 μ_1 。整幅图像平均灰度为 μ ,当阈值为 T 时的类间方差 τ^2 的表达式为

$$\tau^2 = P_0(\mu_0 - \mu)^2 + P_1(\mu_1 - \mu)^2. \quad (6)$$

在图像灰度区间内遍历阈值 T ,使得类间方差 τ^2 达到最大值时的阈值 T_0 即为该图像的最佳阈值。原始图像 I 经大津阈值 T_0 二值化后得到的图像 B_1 为

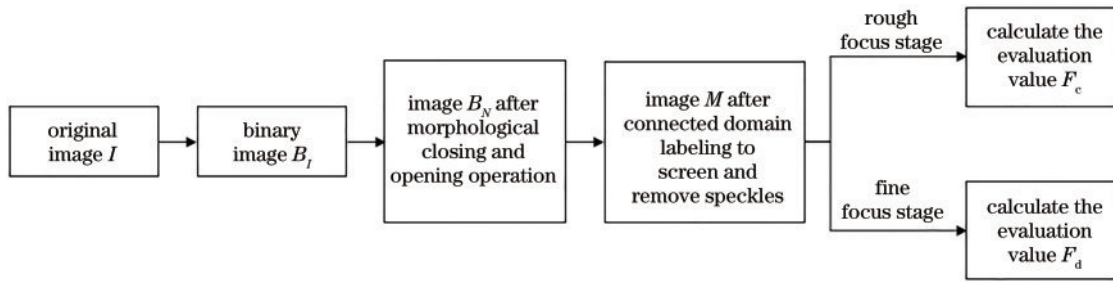


图 1 连通域标记筛除弥散斑的自动对焦评价算法的流程

Fig. 1 Flowchart of an autofocus evaluation algorithm for filtering and removing diffuse spots through connected domain labeling

$$B_I(x, y) = \begin{cases} 255, & f(x, y) > T_0 \\ 0, & f(x, y) < T_0 \end{cases} \quad (7)$$

由于弥散斑的不连续性,需要利用形态学的开闭手段将弥散光斑聚合成一个大区域,以区别于准焦图像中的小面积区域,计算方法为

$$B_N = (B_I \cdot C_n) \circ C_n, \quad (8)$$

式中: \cdot 为形态学闭运算; \circ 为形态学开运算; C_n 是半径为 n 的圆盘结构元素,取 $n=7$; B_N 为形态学操作后得到的图像。

3.2 连通域标记筛选剔除大面积弥散斑区域

经过形态学处理后得到的图像中会出现多个白色区域,包括离焦图像的明亮弥散斑区域和准焦图像中每个粒子存在的区域。为去除弥散斑区域的影响同时保留准焦图像的粒子细节,在图像 B_N 中利用连通域标记^[18]的方法。图像中每个连通的区域中的像素会被标

记为相同的值,通过逐行扫描计算各个连通域面积 $S_1, S_2, S_3, \dots, S_i$, 根据大量图像中弥散斑和准焦粒子光点的大小,经验性地引入一个阈值 $T_1=50$, 将离焦弥散斑的大面积区域和准焦粒子的小面积区域分开,同时将大面积区域去除,表达式为

$$S_i(x, y) = G_{ave}, S_i > T_1, \quad (9)$$

式中: G_{ave} 为图像的灰度均值。在原弥散斑区域填入灰度均值是为了避免灰度值置 0 所带来的干扰,因为在图像处理中一个区域的像素过亮或过暗都会造成较大的边缘梯度,将筛除大面积弥散斑区域后的图像记为 M 。图 2(a) 为含明亮弥散斑的原图像。图 2(b) 为阈值分割后的二值图像,可以看到分割后的弥散斑区域是离散分布的。图 2(c) 展示了经形态学闭开后的图像,弥散斑区域聚合为一个大面积区域,为后续处理提供方便。经连通域标记筛除大面积弥散斑后的图像如图 2(d) 所示。

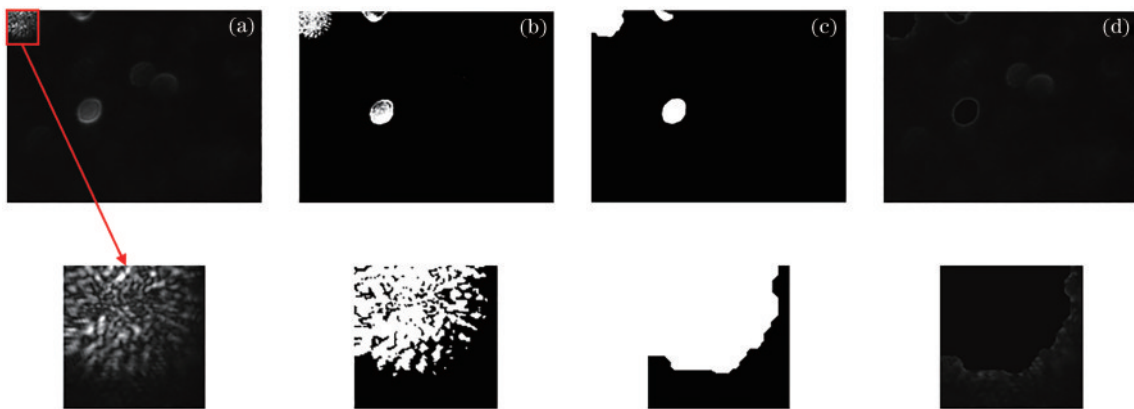


图 2 所提算法处理弥散斑的示意图。(a) 含明亮弥散斑原图;(b) 阈值分割后的二值图;(c) 形态学闭开处理后的图像;(d) 连通域标记筛除弥散斑后的图像

Fig. 2 Schematic of diffuse spots processed by the proposed algorithm. (a) Original image with bright diffuse spots; (b) binary image after threshold segmentation; (c) image after morphologically closing and opening process; (d) image after connected domain labeling to filter out the diffuse spots

3.3 粗对焦和精对焦的清晰度评价指标

普通场景的自动对焦中,目标物体的形态基本保持不变,只是在处于离焦时边缘细节因弥散而导致梯度值的下降。纳米颗粒检测场景调焦行程大,粒子的形态大小、亮度等都会随着离焦程度变化发生较大变化,用单一的标准来指导全过程的对焦是比较困难的。

因此本文提出两个函数分别用于粗对焦和精对焦情况下的图像清晰度判断。

粗对焦阶段,利用大步长遍历整个行程,找寻到其中最清晰图像的位置,需要排除离焦明亮弥散斑的干扰,准确定位遍历位置中的最清晰图像,提出的粗对焦阶段使用的四邻域水平-对角平方函数 F_c 的公式为

$$P_{ave} = [f(x, y) + f(x + 1, y) + f(x - 1, y) + f(x, y + 1) + f(x, y - 1)] \times \frac{1}{5}, \quad (10)$$

$$F_c = \sum_{x=1}^{M-1} \sum_{y=1}^{N-1} \left\{ [f(x + 1, y) - P_{ave}]^2 + [f(x + 1, y + 1) - P_{ave}]^2 \right\}, \quad (11)$$

式中: P_{ave} 表示中心像素和四邻域像素的平均值, 用以模拟点源的形态, 并代替中心像素值参与梯度值的计算; F_c 表征了筛除弥散斑后的图像 M 中所有像素的梯度值之和。

精对焦阶段, 粒子图像中都含有大量的纳米颗粒亮点, 为了有效区分形态、亮度差异较小的粒子, 微调粗对焦的函数, 引入一个阈值 T_2 并加入开方以平滑曲线。精对焦的阈值四邻域水平-对角开方函数 F_d 的公式为

$$F_d = \sum_{x=1}^{M-1} \sum_{y=1}^{N-1} \left\{ \sqrt{[f(x + 1, y) - P_{ave}]^2 + [f(x + 1, y + 1) - P_{ave}]^2} \right\}, \quad (12)$$

$$f(x, y) = \begin{cases} f(x, y), & f(x, y) > T_2 \\ 0, & f(x, y) < T_2 \end{cases}, \quad (13)$$

$$T_2 = 0.8 \times A_{max}, \quad (14)$$

式中: A_{max} 为图像中像素灰度最大值。

4 实验结果与分析

为验证所提算法的有效性, 采用中国科学院苏州生物医学工程技术研究所自主研发的双通道纳米颗粒示踪分析仪开展自动对焦实验。仪器相关参数如下:

照明激光波长为 488 nm; 成像物镜为 $10 \times$ NA0.25 消色差物镜, 焦深范围约 $10 \mu\text{m}$, 横向分辨率为 $1.19 \mu\text{m}$; 调焦电机为步进电机, 调焦单位步长为 $1 \mu\text{m}$ 。被测样品为 Thermo Fisher 公司的 100 nm 直径聚苯乙烯标准微球, 将其用去离子水稀释 250000 倍, 注入仪器样品池中。

与普通场景不同的是, 纳米颗粒成像在离焦到准焦过程中, 图像的内容以及颗粒的亮度、大小均发生较大改变, 为模拟实际对焦过程, 需采集粗对焦和精对焦的图像序列来验证评价函数在不同阶段的实际效果。将粗对焦步长设置为 50 单位步长, 精对焦步长分别设置为 20 和 5 单位步长, 根据 3 个步长分别采集图像序列(下文均用数字+步长形式描述), 同时保证采集经过准焦位置。采用 Brenner 函数、Tenengrad 函数、Laplace 函数、自相关函数及方差函数共 5 种函数与所提基于连通域标记剔除大面积弥散斑的纳米颗粒自动对焦评价算法进行对比, 所提算法在后续图表中表述为 Thispaper 函数。

图 3 为采集的粗对焦过程中的离焦序列示意图。

图 3(a)~(e) 分别为第 2、4、6、8、10 张图像, 其中第 8 张即图 3(d) 为人眼视觉判断的序列中最接近准焦位置的图像。第二行图像表征了同一斑点在离焦序列中的形态变化, 可见越接近准焦位置, 斑点越小, 亮度越大。

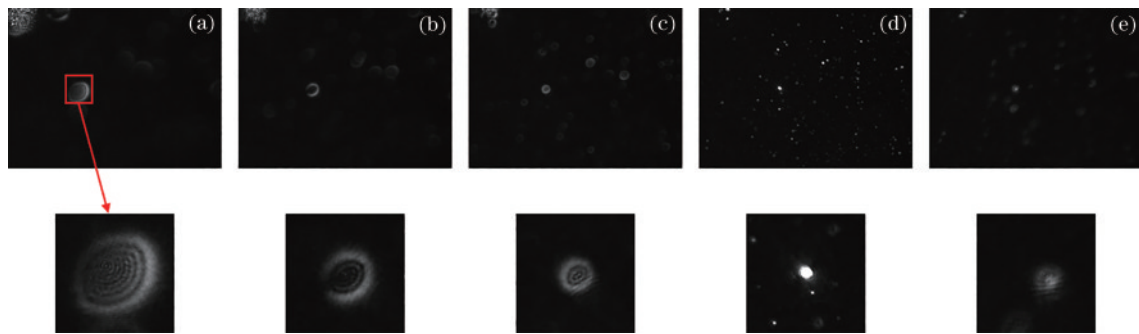


图 3 50 步长离焦序列示意图。(a)~(e) 第 2、4、6、8、10 张图像

Fig. 3 Schematic of 50-step defocus sequence. (a)~(e) The second, fourth, sixth, eighth, and tenth images

图 4 为 50 步长离焦序列的归一化清晰度评价曲线。通过曲线可以直观看出: 由于受到离焦弥散斑的干扰, 参与对比的 5 种常用评价函数均出现了严重的双峰现象, 其中 Laplace、自相关和方差函数都将存在大面积弥散斑的离焦图像错误判断为最清晰图像; Brenner 和 Tenengrad 函数对部分离焦图像(如第 2 张图像)的归一化评价也超过了 0.8, 这在实际对焦过程中极易引起误判, 导致对焦失败;

Thispaper 函数由于筛除了大面积弥散斑, 有效控制了干扰, 因此整体曲线表现出了较好的单峰性、准确性和鲁棒性。

为能定量分析和直观评价几种函数的性能, 引入清晰度比率、局部极值因子、单峰性和准确性 4 种指标来进行评判。清晰度比率 (R) 是指图像序列评价最大值 F_{max} 与最小值 F_{min} 的比值, 能够表征评价函数分辨图像不同程度离焦量的能力, 公式为

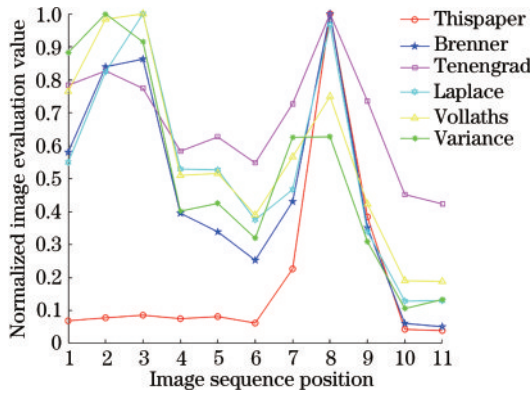


图 4 50 步长离焦序列的归一化清晰度评价曲线

Fig. 4 Normalized sharpness evaluation curve of 50-step defocus sequence

$$R = \frac{F_{\max}}{F_{\min}} \quad (15)$$

离焦弥散光斑的干扰是纳米颗粒检测场景下自动对焦技术的首要问题,而对干扰的表现则是评判函数性能优劣的重要内容。引入并改良局部极值因子 (E),以表征评价函数在平缓区内的波动程度在全局的占比,可作为参量防止对焦陷入局部极值,数值越小代表该函数在平缓区的波动程度越低,公式为

$$E = \frac{F_{\max} - F_{\min}}{F_{\max}} \quad (16)$$

式中: F_{\max} 和 F_{\min} 分别代表平缓区的最大值和最小值,设定准焦图像两侧各 2 幅图像外的区域为平缓区。

单峰性指图像序列的清晰度评价曲线中仅有一个峰值,不存在明显的次峰;准确性指曲线峰值所对应的图像为序列中最清晰的图像。两种指标在表中以 \checkmark 代表性能较好,以 \times 代表性能较差。表 1 为 50 步长离焦序列评价曲线的性能指标情况,可以明显看出所提算法的 E 值远小于其他函数,证明了平缓区的波动量小,这与评价曲线的形态结果是一致的。

表 1 50 步长离焦序列评价曲线的性能指标

Table 1 Performance index of 50-step defocus sequence evaluation curve

Evaluation function	R	E	Unimodality	Accuracy
Thispaper	25.798	0.047	\checkmark	\checkmark
Brenner	19.701	0.812	\times	\checkmark
Tenengrad	2.362	0.404	\times	\checkmark
Laplace	7.789	0.837	\times	\times
Vollaths	5.318	0.561	\times	\times
Variance	9.455	0.494	\times	\times

图 5 为精对焦阶段中 20 步长离焦序列的归一化清晰度评价曲线。由于接近准焦位置的图像差异相对较小, Laplace、方差函数的峰值位置在实际准焦处的前一位置(第 6 张),而 Tenengrad、Vollaths 函数对第 6、7

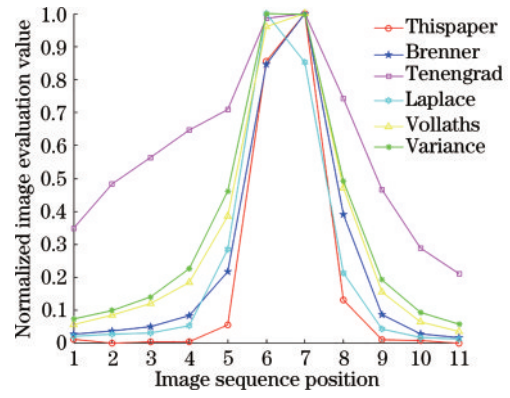


图 5 20 步长离焦序列的归一化清晰度评价曲线

Fig. 5 Normalized sharpness evaluation curve of 20-step defocus sequence

位置图像的评价值近乎持平。所提算法和 Brenner 函数可以在精确找到准焦位置的同时有效区分近焦位置,且所提算法曲线更加尖锐,对准焦位置附近图像的区分度更高。图 6(a)和图 6(b)分别对应序列中第 6 和第 7 位置,通过人眼视觉能判断图 6(b)是更接近准焦位置的图像。

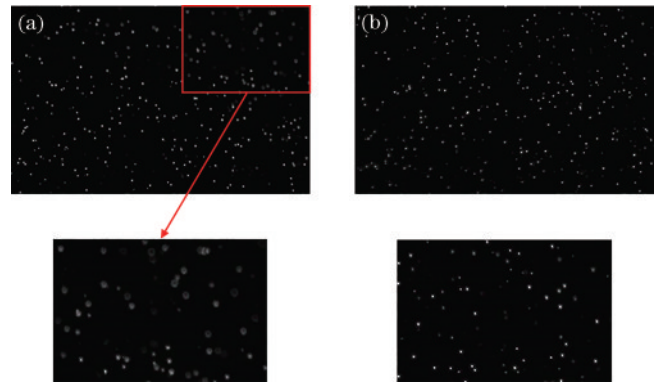


图 6 20 步长离焦序列示意图。(a)第 6 幅图像;(b)第 7 幅图像
Fig. 6 Schematic of 20-step defocus sequence. (a) The sixth image; (b) the seventh image

同理,表 2 给出了 20 步长序列评价曲线的性能指标,所提算法的各项指标表现均好于其余函数,其中清晰度比率和局部极值因子表现优异,再次证明所提算法对图像模糊程度有较好的区分能力。

自研纳米颗粒示踪分析仪的成像焦深范围约为 10 步长,因此在调焦时设置 5 为精对焦最小搜索步长。图 7 为精对焦阶段中 5 步长离焦序列的归一化清晰度评价曲线。表 3 为几种评价函数的指标对比情况,需要说明的是,由于 5 步长离焦序列范围均位于准焦位置附近,理论上不存在平缓区,因此无需使用局部极值因子来表征,表中各函数的局部极值因子以“—”来表示。可以得到: Tenengrad、Laplace 函数的极值偏离了准焦位置; Brenner、方差函数曲线出现了多峰或平峰情况;所提算法在图像区分度较小的近准焦区域仍有良好的准确性、单峰性,清晰度比率高达 14.421,曲线

表 2 20 步长离焦序列评价曲线的性能指标

Table 2 Performance index of 20-step defocus sequence evaluation curve

Evaluation function	R	E	Unimodality	Accuracy
Thispaper	1969.016	0.014	✓	✓
Brenner	56.531	0.067	✓	✓
Tenengrad	4.732	0.435	×	✓
Laplace	74.068	0.041	✓	×
Vollaths	27.511	0.149	×	✓
Variance	17.122	0.168	×	×

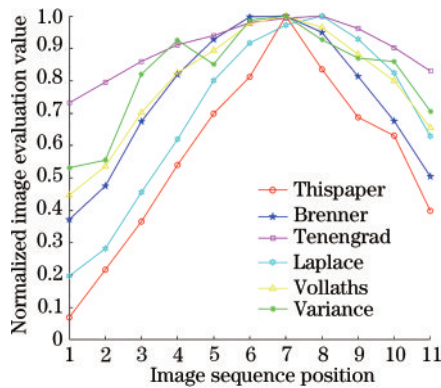


图 7 5 步长离焦序列的归一化清晰度评价曲线

Fig. 7 Normalized sharpness evaluation curve of 5-step defocus sequence

表 3 5 步长离焦序列评价曲线的性能指标

Table 3 Performance index of 5-step defocus sequence evaluation curve

Evaluation function	R	E	Unimodality	Accuracy
Thispaper	14.421	-	✓	✓
Brenner	2.691	-	×	✓
Tenengrad	1.367	-	✓	×
Laplace	5.068	-	✓	×
Vollaths	2.236	-	✓	✓
Variance	1.882	-	×	✓

形态的陡峭程度也好于其他函数,证明了所提算法精确找到准焦位置的能力。

为验证实际效果,将所提算法应用于一种粗细结合的搜索策略来指导调焦机构。粗对焦过程使用遍历法,以 50 步长遍历行程,找到最清晰图像位置,并以前后 50 步长位置为精对焦搜索区间。精对焦以遍历极值前一位置处为起点,分别以 20、5 作为步长进行爬山法搜索,直至到达准焦位置。使用纳米颗粒示踪分析仪,所提算法自动对焦后的图像如图 8 所示。



图 8 使用所提算法自动对焦的图像

Fig. 8 Image after autofocus by using the proposed algorithm

5 结 论

通过对纳米颗粒检测场景下的图像内容进行分析,探讨了离焦明亮弥散斑是引起传统自动对焦评价算法失效的主要原因。提出了一种连通域标记剔除大面积明亮弥散斑,同时立足于实际场景在粗对焦和精对焦阶段设置两种指标的评价算法。通过对多组实拍图像进行仿真测试和仪器实际测试,结果证明所提算法能有效消除明亮弥散斑的干扰,相较于传统自动对焦评价算法,具有更好的鲁棒性、准确性,能够实现纳米颗粒检测场景下的准确对焦。

参 考 文 献

- [1] Lüthi B S, Thomas N, Hviid S F, et al. An efficient autofocus algorithm for a visible microscope on a Mars lander[J]. Planetary and Space Science, 2010, 58(10): 1258-1264.
- [2] Redondo R, Cristóbal G, Garcia G B, et al. Autofocus evaluation for brightfield microscopy pathology[J]. Journal of Biomedical Optics, 2012, 17(3): 036008.
- [3] 夏浩盛, 余飞鸿. 数码显微镜自动对焦算法[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(4): 0400002. Xia H S, Yu F H. Auto focusing algorithm of digital microscope[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(4): 0400002.
- [4] Guan H K, Niinami N, Liu T. Real-time object tracking for moving target auto-focus in digital camera[J]. Proceedings of SPIE, 2015, 9400: 940009.
- [5] 张艳超, 赵建, 韩希珍, 等. SUSAN 清晰度评价函数在自动对焦中的应用[J]. 中国光学, 2014, 7(2): 240-244. Zhang Y C, Zhao J, Han X Z, et al. Application of SUSAN definition evaluation function in auto-focusing [J]. Chinese Optics, 2014, 7(2): 240-244.
- [6] 王焯茹, 冯华君, 徐之海, 等. 基于饱和像素剔除的自动对焦评价函数[J]. 光学学报, 2016, 36(12): 1210001. Wang Y R, Feng H J, Xu Z H, et al. Autofocus evaluation function based on saturate pixels removing[J]. Acta Optica Sinica, 2016, 36(12): 1210001.

- [7] 翟永平, 周东翔, 刘云辉, 等. 聚焦函数性能评价指标设计及最优函数选取[J]. 光学学报, 2011, 31(4): 0418002.
Zhai Y P, Zhou D X, Liu Y H, et al. Design of evaluation index for auto-focusing function and optimal function selection[J]. Acta Optica Sinica, 2011, 31(4): 0418002.
- [8] 熊锐, 顾乃庭, 徐洪艳. 一种适应多方向灰度梯度变化的自动对焦评价函数[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(4): 0418001.
Xiong R, Gu N T, Xu H Y. An auto-focusing evaluation function adapted to multi-directional gray gradient change [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(4): 0418001.
- [9] 曾海飞, 韩昌佩, 李凯, 等. 改进的梯度阈值图像清晰度评价算法[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(22): 2211001.
Zeng H F, Han C P, Li K, et al. Improved gradient threshold image sharpness evaluation algorithm[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(22): 2211001.
- [10] 王秀峰, 孙小伟, 王加科, 等. 余弦变换与拉普拉斯算子结合的聚焦评价方法[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(24): 2410005.
Wang X F, Sun X W, Wang J K, et al. Focus measure operator combining cosine transform and Laplacian operator[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(24): 2410005.
- [11] 崔光茫, 张克奇, 毛磊, 等. 结合多尺度分解和梯度绝对值算子的显微图像清晰度评价方法[J]. 光电工程, 2019, 46(6): 180531.
Cui G M, Zhang K Q, Mao L, et al. Micro-image definition evaluation using multi-scale decomposition and gradient absolute value[J]. Opto-Electronic Engineering, 2019, 46(6): 180531.
- [12] Subbarao M, Choi T S, Nikzad A. Focusing techniques [J]. Optical Engineering, 1993, 32(11): 2824-2836.
- [13] 赵航. 基于频谱分析法的显微镜自动对焦方法的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
Zhao H. Study on the microscope auto-focus system based on the spectrum analysis method[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [14] Brenner J F, Dew B S, Horton J B, et al. An automated microscope for cytologic research a preliminary evaluation [J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1976, 24(1): 100-111.
- [15] Tenenbaum J M. Accommodation in computer vision[D]. Stanford: Stanford University, 1970.
- [16] Vollath D. Automatic focusing by correlative methods[J]. Journal of Microscopy, 1987, 147(3): 279-288.
- [17] 包丞啸, 姜威, 王玉潇. 基于大津法分割和局部最大梯度的自动聚焦算法[J]. 光学技术, 2019, 45(6): 756-761.
Bao C X, Jiang W, Wang Y X. Automatic focusing algorithm based on Otsu segmentation and local maximum gradient[J]. Optical Technique, 2019, 45(6): 756-761.
- [18] He L F, Ren X W, Gao Q H, et al. The connected-component labeling problem: a review of state-of-the-art algorithms[J]. Pattern Recognition, 2017, 70: 25-43.