

# 扫描多光谱显微成像\*

胡家陞 邹振书 郝志航 宫迅凯 侯 澍  
(中国科学院长春光学精密机械研究所, 长春 130022)

## 提 要

文本描述了一种新的显微成像方法, 它把光学扫描显微成像技术与成像多光谱技术巧妙地结合在一起, 形成扫描多光谱显微成像技术。文中叙述了系统的结构及工作原理, 介绍了所采用的图像处理系统, 给出了实验结果, 并进行了分析讨论。

关键词: 扫描光学显微术, 成像光谱术。

## 一、引 言

光学扫描显微成像技术是70年代末期发展起来的一种高精度扫描的数字成像技术<sup>[1]</sup>, 它的分辨率高, 视场大, 与数字图像处理技术结合在一起, 可根据要求进行图像增强, 目标识别和密度分割等处理, 功能大为扩展, 这在某种程度上代表了光学显微成像技术的发展方向。它的不足之处是通常采用单一波长的激光作为光源, 难以对待测样品进行光谱特性分析。为此曾提出采用白光光源加窄带滤光片的办法, 但不能同时形成多波段的图像。

为了适应遥感技术的发展, 最近几年出现了成像光谱术, 它除了用线扫描的办法获取地面图像信息外, 还把每个像元进行光谱分解, 形成目标的多光谱图像, 这样可使信息量成倍地增加。

综合目前光学扫描显微成像技术和成像光谱术各自显示出来的优点, 为了更好地满足显微成像技术的要求, 增强对显微物体(微区)的观察手段, 本文作者巧妙地把扫描光学显微成像技术与成像光谱术结合起来, 提出了一种新的扫描多光谱显微成像方法。它的特点是结构简单, 可根据需要同时得到样品不同波段的显微图像, 以便于同时分析物质的结构和组成成份。

## 二、系统结构及工作原理

扫描多光谱显微成像系统可做成透射式(透射率成像)和反射式(反射率成像)两种, 也可把两种组合成一个系统。以透射式为例, 其结构如图1所示。它的光学系统除了分光元件以外, 基本上与共焦型光学扫描显微镜的光学系统一致。白光光源S发出的光由聚光镜L聚到小孔P上作为点源, 经透射 $L_1$ 在样品上形成一点像, 即光源只照明载物台上试样o的一点。像面无穷远显微物镜OL将成像光束准直, 经光栅G进行光谱分解, 在傅里叶透镜FL

收稿日期: 1991年4月5日; 收到修改稿日期: 1991年7月8日

\* 国家自然科学基金资助的课题。

的后焦面上形成透射率光场的不同波长的谱,由线阵列探测器探测其不同波长光谱的光强。载物台在  $x$  和  $y$  方向做,高速扫描运动,这样得到的多光谱的点像被连续地存入存储器中,然后进入微机进行重构和处理,最后由显示器同时显示出样品待测区域的不同波长的显微图像。扫描方式可分为机械和光学两种方式,机械式扫描的优点是只对轴上点成像,对显微物镜要求低,可获得高质量的图像,但速度较慢。

与共焦型扫描显微镜相比,扫描多光谱显微成像系统多了一个分光元件,正是这个分光元件的作用将形成的点像进行多光谱分解,根据需要选择不同波段,由微机处理,最后显示出不同波长的待测样品的显微图像,这是普通的扫描光学显微镜无法实现的。

光源可采用连续光谱的卤素灯或其它白炽灯,对待测样品上的每一个点,在傅里叶透镜的后焦面上形成的是连续的谱。也可采用分立谱光源,如高压汞灯等,所形成的谱是分立的点。

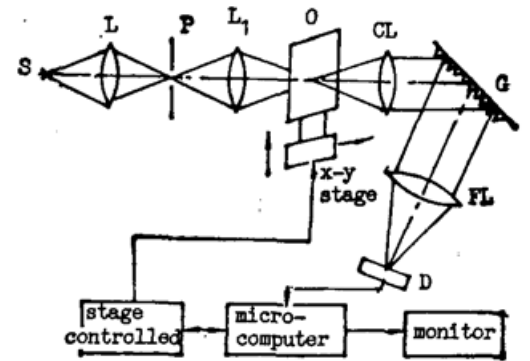


Fig. 1 Schematic of the scanning and multi-spectral microscopic imaging system (transparent type)

### 三、图像处理系统

图像处理系统的功能是完成对样品逐点扫描所获得信息进行分析、重构、识别和显示等,从而得到所需要的不同波段的图像。本系统用 CCD 黑白摄像机作为图像的输入设备,

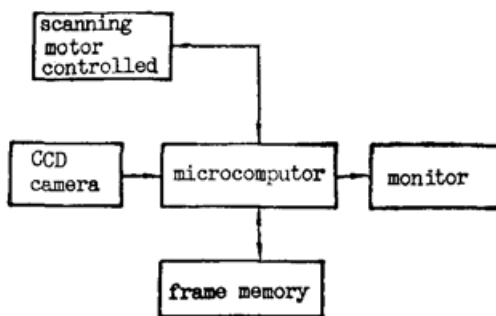


Fig. 2 Block diagram of the digital image processing system

用 PCVISION 数字图像处理板和 XT-286 微机实现对多光谱图像的处理,经处理后的图像由显示器显示出来。为实现数据采集和扫描系统的同步,计算机应接收和发出一同步信号给  $x-y$  二维扫描平台步进电机的控制电路。图像处理系统的方框图如图 2 所示。对样品上的一点,其成像光束经分光元件分光形成一光谱带,最后成像在摄像机的靶面上,可根据要求选定不同的波段,用自编的跟踪窗程序将所选定的波段嵌住。由 PCVISION 板进行数据采集,并将平均灰度值(它代

表示了样品该点对选定的这一波长的透射率或反射率值)记录在存储器内相应的不同波长图像存储区内,待整个扫描过程结束后,在每一个图像存储区内便得到了某一波长的整幅图像。最后将获取的光谱图像由显示器显示,也可以文件形式存放在磁盘上,待进一步分析与处理。由于系统的软件同时支持多个窗口,且窗口位置全屏幕可调,尺寸可任意选择,使图像灰度值的采集变得灵活方便,较为直观,可同时显示待测样品的不同波长透射率(或反射率)的显微图像,本系统可获取  $64 \times 64$ ,  $128 \times 128$  及  $256 \times 256$  像素的多光谱显微图像。

### 四、实验及结果

实验采用图 1 所示的透射式光路,光源选用高压汞灯,分光元件为透射式衍射光栅(600

lp/mm)照明样品点的大小为  $5\mu\text{m}$ ,扫描步距为  $5\mu\text{m}$ ,样品装在由微机控制的电控系统驱动的可两维移动的平台 ST 上,实现两维扫描。经分光元件出来的光束直接由 COD 相机成像在其靶面上,利用自编跟踪窗程序,对其中三个波长:  $435.8\text{nm}$ (蓝光),  $546.1\text{nm}$ (绿光),  $577.0\text{nm}$ (黄光)进行采样处理成像。图 3(a)、图 3(b)和图 3(c)分别是小白兔细胞组织微区( $0.32\times 0.32\text{mm}$ )的蓝光、绿光、黄光的透射率图像,采样点数是  $64\times 64$ 。由图 3(a)、图 3(b)和图 3(c)明显地看出其细胞组织对蓝光、绿光、黄光的透射率图像是有差别的。



(a)  $435.8\text{nm}$                       (b)  $546.1\text{nm}$                       (c)  $577.0\text{nm}$

Fig. 3 Microscopic images of the tissue of a rabbit

## 五、分析与讨论

为了说明扫描多光谱显微成像的特性,可以与通常显微镜的成像进行比较。考虑到单一波长而言(即分光后对某一波长而言),扫描多光谱显微成像的光学系统可以简化成图 4。通常光学显微镜的光学系统如图 5 所示。

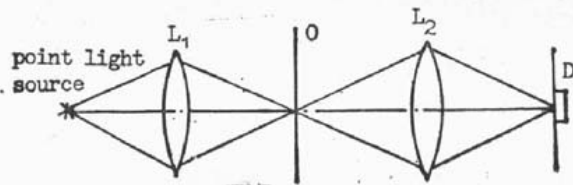


Fig. 4 Simplified schematic of the scanning and multi-spectral microscopic imaging system

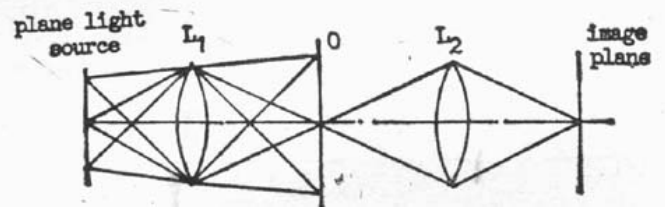


Fig. 5 Schematic of the optical system of the conventional microscope

### 1. 成像方式

通常的光学显微镜是采用面光源将整个样品均匀照亮,称之为亮视野成像,扫描多光谱显微镜成像是用点光源一次只照明样品一个点,显微物镜只对该点成像,整幅图像是通过逐点扫描完成。

### 2. 光强

显微物镜的成像特性可由其点扩散函数与样品透射(或反射)光波的复振幅的卷积来表示。通常光学显微镜只有一次聚焦,所以其像面任一点( $x, y$ )的强度可由点扩散函数模的平方与透射率(或反射率)模的平方的卷积得到<sup>[2,3]</sup>

$$I(x, y) = |h_2|^2 \otimes |T|^2, \quad (1)$$

$h_2$  为显微物镜  $L_2$  的点扩散函数,  $T$  为样品的透射率,  $\otimes$  代表卷积。而扫描多光谱显微镜一次只照亮样品上的一个点,样品上的物场是由物镜  $L_1$  的点扩散函数  $h_1$  来决定的,显微物镜  $L_2$  又将样品上的点成像到探测器上,所以其点扩散函数的振幅为  $h_1 \cdot h_2$ 。探测器上接收到

的光强可表示为

$$I(x, y) = |h_1 h_2 \otimes T|^2 \quad (2)$$

比较(1)和(2)式, 可知扫描多光谱显微成像系统可以产生一个比通常光学显微镜在视觉上更为敏锐的图像, 因而分辨率高。这和共焦型光学扫描显微镜具有同样的性质, 但扫描多光谱显微成像可同时产生样品不同波段的图像, 功能大为扩展, 信息量成倍地增加, 增强了对显微物体的观察手段。它是把扫描光学显微成像技术与成像多光谱技术巧妙地结合起来的一种新的成像技术。

由于系统采用了数字图像处理技术, 它不仅可同时显示出不同波段的显微图像, 而且还可以对每个光谱的像或多个光谱的像进行一定的图像处理, 如图像增强、彩色编码、图像相减等。因此可广泛地用于生物医学标本的测试, 矿物分析, 大规模集成电路的检测等, 使显微镜走向自动化和智能化。

分光元件光栅及傅里叶透镜参数的选择取决于所需要的整个波段宽度, 取决于线阵探测器的大小。为了使不同波长的谱在同一平面内, 便于线阵列探测器的接收, 对傅里叶透镜要求消色差和球差, 并满足

$$\eta = f \sin \theta, \quad (3)$$

式中  $\eta$  是谱距中心高度,  $\theta$  是该谱的衍射角。它的孔径大小要求能够接收所需要的整个波段的一级谱。设所需要的整个波段宽度是  $\Delta\lambda$ , 线阵列探测器的线度是  $\Delta l$ , 傅里叶透镜的焦距是  $f$ , 光栅常数是  $d$ , 那么它们之间满足下列关系

$$\Delta l = \Delta\lambda f / d. \quad (4)$$

所提出的扫描多光谱显微成像的光学系统基本上是采用了共焦型的扫描光学显微镜的光学系统, 因此本系统具有共焦型扫描显微镜的特点, 即只有焦面上象素的信息最亮, 其它位置亮度大幅度下降。利用此特点若把上述的系统改成反射式的, 如图 6 所示, 便可对三维透明物体内部的不同层次进行聚焦, 以获得各层次的显微图像, 具有层析作用, 可用来观察透明物体内部的特性。

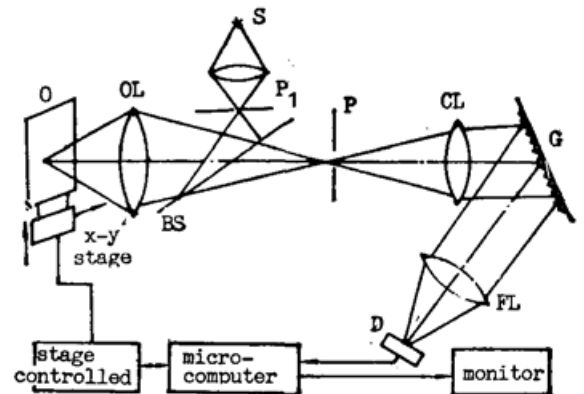


Fig. 6 Schematic of the scanning and multi-spectral microscopic imaging system (reflective type)

## 六、结 论

本文中提出的扫描多光谱显微成像技术方法是显微成像技术的开拓, 它把显微成像和图像处理结合在一起, 扩大了显微成像的功能, 增强了观察显微物体的手段。系统结构简单, 对于反射式装置还可用来观察透明物质内部的特性, 具有层析作用, 可广泛地应用于各种试样的微区检测, 使显微镜走向自动化智能化。

## 参 考 文 献

- [1] T. Wilson C. J. R. Sheppard; *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academia press., New York, 1984), 1~12.
- [2] 大出孝博;《映像情报》,1988, 20, No. 1 (Jan), 67~71.
- [3] Gondon S. Kino, Timothy R. Carle; *Physics Today*, 1989, 42, No. 9 (Sep), 54~62.

**Scanning and multi-spectral imaging microscopy**

HU JIASHENG, ZOU ZHENSHU, HAO ZHIHANG, GONG XUNKAI AND HOU SHU  
(Changchun Institute of Optics and Fine Mechanics, Academia Sinica, Changchun 130022)

(Received 5 April 1991; revised 8 July 1991)

**Abstract**

In this paper, a new method for microscopic imaging is proposed. It ingeniously combines the scanning optical microscopic imaging technique with imaging multi-spectral technique to generate a scanning and multi-spectral optical microscopic imaging technique. This method can simultaneously obtain several different wavelength microscopic images required for the same sample so that the information obtained are greatly increased, and the range of its applications can be greatly expanded. Principle and construction of the system are described and its image processing system is introduced. Experimental results are given and discussed in detail.

**Key words:** scanning optical microscopy, imaging spectroscopy.