

图像采集自动生物显微镜系统 自动调焦的研究

李贺桥 张以谟 容常青

(天津大学现代光学仪器研究所, 天津 300072)

刘国林

(空军天津医院, 天津 300381)

摘 要 阐述了以 CCD 为光电探测器件, 采用步进电机驱动, 集工作台自动扫描、自动调焦和图像的自动采集为一体的显微镜系统自动调焦机理, 改进了均方差评价函数, 完成了自动调焦, 为显微图像的采集和处理提供了强有力的手段。

关键词 显微镜, 图像采集, 自动调焦, 评价函数。

随着科学技术的发展, 为了迅速准确地对显微图像进行自动采集、处理和识别, 对显微镜的自动化程度提出了更高的要求。在该系统中, 必须解决的问题即是自动调焦, 它会影响图像采集的质量, 致使后期的图像处理无法进行。本文以 CCD 为光电探测器的显微镜景深的基础上, 对自动调焦评价函数进行了探讨和研究, 并对实验结果作出了具体分析。

1 自动调焦系统及景深

本系统采用 CCD(电荷耦合器件)作为光电探测器, 其将光电转换, 积分存储, 扫描传输和信号读出四种功能集于一体。系统框图如图 1 所示。CCD 接受二维图像, 经视频放大及转换后, 信号进行 A/D 转换, 最后由 DMA 方式采集到计算机内存, 而后可从事必要的处理和特征提取, 结果可由监视器显示或打印机输出。当一幅图像处理结束后, 可由计算机通过 I/O 接口控制步进电机驱动工作台在水平方向和垂直方向移动, 分别完成视场自动更换和自动调焦, 如有特殊要求时还可配制自动拍照机构。

自动调焦系统由微机、CCD、自动调焦机构、数据采集电路、A/D 转换以及显微物镜和照明部分组成。自动调焦机构如图 2 所示, 其利用 BF36-003 步进电机轴直接与 XSS-2 型生物显微镜的微调焦手轮轴连接。与手轮轴一体的斜齿轮与载物台升降的齿条啮合, 借助载物台自重可消除调焦反向的空程。原微调焦手轮转动一格值载物台竖直方向位移 $1\ \mu\text{m}$, 而步进电机在驱动电路控制下(二细分后)每步距 0.75° , 使载物台移动 $0.42\ \mu\text{m}$, 为提高调焦精度创造了条件。计算机控制视场扫描电机转动, 带动载物台移动一显微视场后, 随着调焦系统在

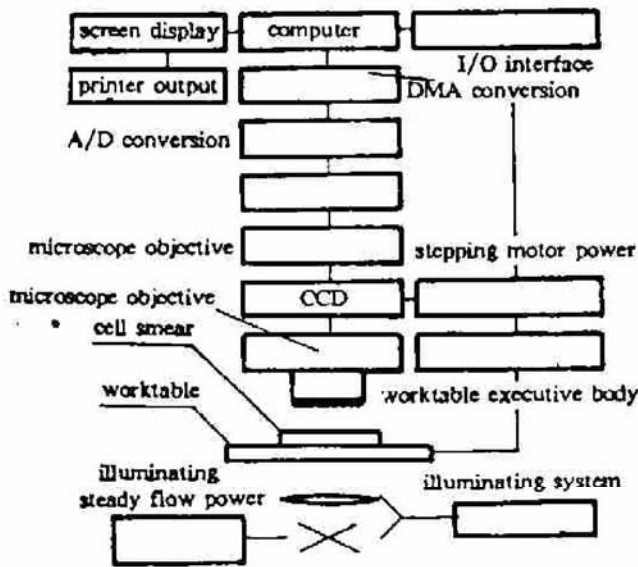


Fig. 1 Schematic diagram of the system

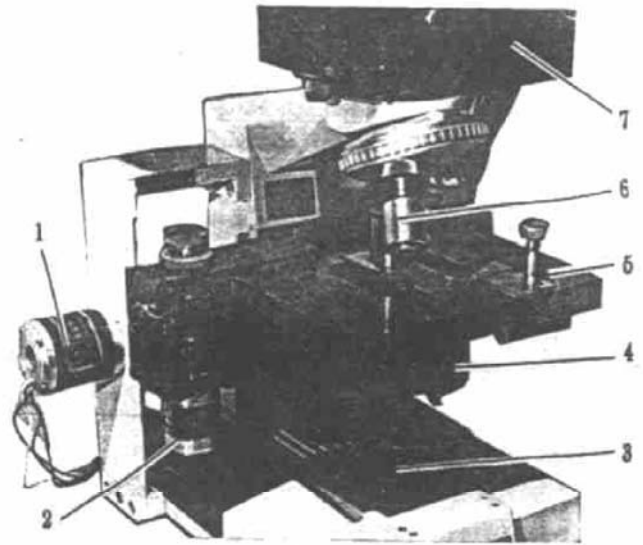


Fig. 2 Field of view auto-scanning and focusing device

- 1. Autofocusing motor, 2. Scanning motor 1,
- 3. Illuminating device, 4. Scanning motor 2,
- 5. Microscope stage, 6. Objective lens, 7. CCD dark box

调焦范围内对最佳调焦位置的搜寻，CCD 将显微图像二维空域坐标的光强分布变换为一维时间域的电信号，经放大，A/D 转换后存入微机内存的是一幅幅离散的数字图像。而每幅之间的间距(即调焦步距)能否满足自动调焦的调焦精度要求，则必须对系统景深进行计算。在几何光学中，显微物镜景深是以人眼分辨率且设物面是理想状态，即厚度为零条件下给出的。但在本系统中是以 CCD 为光电探测器件，确定其物镜景深时应在 CCD 分辨率的基础上，同时要考虑细胞涂层厚度来研究。图 3 是显微物镜光路图。AB 为对准平面，若 dx 为离焦量，根据几何光学中垂轴放大率 β 、轴向放大率 α 和角放大率 Γ 之间的关系^[1]，并考虑 dx, dx' 为一微小量(可认为 $u = u_1, u' = u'_1$)，考虑对准平面前后两种情况，则可导出：

$$2dx = Z/\beta \operatorname{tg} u \tag{1}$$

式中 Z 为 CCD 能分辨的最小线性量，即像敏单元间距， $Z = 15 \mu\text{m}$ ，物镜 $\beta = 40, NA = 0.65$ ，则可推出 $\operatorname{tg} u = 0.855$ ，代入上式可得 $2dx = 0.44 \mu\text{m}$ 。上式假设被观察物是理想状态，即物面厚度为零，但细胞涂层厚度与 $2dx$ 相比是绝对不能忽略的。涂层中的细胞一般应保持不变形，故涂层厚度 \geq 细胞平均直径(腹水细胞平均直径是 $10 \mu\text{m}$ 左右)。实际上，采用光对透射显微镜进行调焦时，只要将对准平面调到涂层中任何一位置即可满足调焦要求，因此 $2dx$ 应近似取 $10 \mu\text{m}$ ，这样，自动调焦步距只要 $< 5 \mu\text{m}$ 就可满足调焦要求。

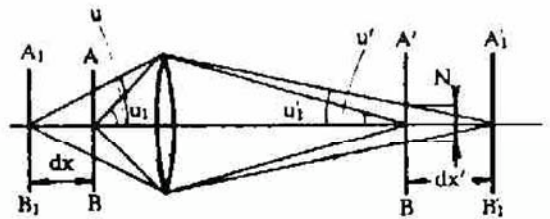


Fig. 3 Optical path diagram of objective lens

2 自动调焦评价函数

自动调焦的关键是构造合理的评价函数。人们曾报道一些调焦评价函数，如阈值积分法^[2]，高频带法^[3]，信息熵法^[4, 5]及用电致伸缩器件方法^[6]等，不同的评价函数只适用于各自特殊的调焦对象。本文在对不同离焦量情况下的细胞图像信号进行分析探讨的基础上，构造出适合低对比度的显微图像自动调焦评价函数。它应具备抗干扰能力强；在所需调焦范围内

具有唯一性,即仅有一个极值;无偏性,即处于最佳调焦状态时评价函数才给出极大值或极小值。

在齐焦状态下(离焦量为零)图像是最清晰的,代表细胞信息的像素数量最多,细胞与背景相比灰度差最大,而且像素的灰度值分布范围最广。随着离焦量的增大,图像变的愈模糊,代表细胞信息的像素数目减少,细胞与背景的灰度差以及像素灰度的分布范围也出现缩小趋势,最后整个视场的灰度值全部集中到某个背景灰度上,图像中的细胞信息完全消失。即随着离焦量的变化,细胞图像在以下几方面呈现出比较明显的差异:代表细胞的像素数目;细胞本身的灰度值;图像灰度分布范围。下面对其进行讨论,分别给出三种评价函数。

2.1 有效像素数评价函数

在图像分割中,若某个像素的灰度小于预先确定的阈值,就认为它代表细胞的信息,此像素即为有效像素。对图像中的有效像素进行统计,便构成一个自动调焦评价函数:

$$N = \sum_{x=0}^M \sum_{y=0}^N n(x, y) \quad (2)$$

$$n(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{当 } f(x, y) < V \text{ 时} \\ 0 & \text{当 } f(x, y) \geq V \text{ 时} \end{cases}$$

式中 N 为图像有效像素数; $f(x, y)$ 是与 $n(x, y)$ 对应的灰度值; V 为细胞灰度的阈值,对染色后的细胞涂片中细胞轮廓在显示器上的清晰轮廓实验分析定出其灰度值,输入计算机内存。此函数之优点是只体现细胞的有效信息,不受背景噪声的干扰,灵敏度高;但当系统照明亮度发生变化时,该函数波动较大,易产生误调焦。

2.2 有效灰度评价函数

细胞图像中,细胞灰度值低于背景灰度值,当像素的灰度小于输入计算机内存的灰度阈值时,认为它代表细胞信息,将此灰度值与阈值相减,就构成了该像素有效灰度,进行累加得到了该图像的有效灰度。当离焦量由大到小变化时,细胞信息逐渐增强,图像的有效灰度值呈增大趋势。这样,可以用图像的有效灰度值作为自动调焦评价函数:

$$G = \sum_{f(x, y) \in s} [V - f(x, y)] \quad \{s: f(x, y) < V\} \quad (3)$$

式中 G 为有效灰度值, V 是细胞灰度阈值, $f(x, y)$ 为 (x, y) 处的像素灰度。该有效灰度同样只包含细胞的有效信息,仍然易受到照明亮度变化的影响。

2.3 均方差评价函数

在图像矩阵中,各元素的值代表相应像素的灰度。当离焦量由大到小变化时,由于细胞信息的增加,图像的灰度分布范围增大,此分布特性可由随机变量的均方差给予描述,并定义出自动调焦均方差评价函数:

$$J(x, y) = \left\{ \sum_{x=0}^M \sum_{y=0}^N [f(x, y) - \bar{f}(x, y)]^2 \right\}^{1/2} \quad (4)$$

式中 $\bar{f}(x, y)$ 为图像中所有像素灰度的平均值, $f(x, y)$ 为各像素灰度值。当离焦量由大到小变化时, $J(x, y)$ 呈现增大的趋势,且在最佳调焦位置取得极大值。在调焦过程中,照明系统亮度的变化在直方图中只能使灰度值整体发生平移。而对上述函数影响很小。因此,其具有抗亮度变化干扰的性质,但对整个图像作为研究对象,在一定程度上受到背景噪声的干扰,某些有效信息将被淹没,造成误调焦。

2.4 修正后的均方差函数

综上所述的三种评价函数,为了正确评价视场中细胞信息,既提高其识别灵敏度,又要

避开有效信息受背景干扰, 综合几类评价函数的优点, 对(4)式进行修正得出:

$$J(x, y) = \left\{ \sum_{f(x, y) \in s} [f(x, y) - \bar{f}(x, y)]^2 \right\}^{1/2} \quad \{s: f(x, y) < V\} \quad (5)$$

$$\bar{f}(x, y) = \left[\sum_{f(x, y) \in s} f(x, y) \right] / I$$

式中 $\bar{f}(x, y)$ 是图像中有效像素灰度的平均值; V 为细胞的灰度阈值; I 为有效像素数。该函数只计算代表细胞信息的有效像素, 不对整幅图像逐点统计, 因此可从函数中消除背景噪声的影响, 提高了有效信息的含量和评价函数的灵敏度, 而当照明亮度改变时均方差函数本身不受干扰, 其灵敏度和抗干扰性最佳。

3 实验结果

实验是以腹水细胞涂片作为受控对象, 景深接近于 $10 \mu\text{m}$, 而调焦范围是根据视场更换过程中有可能产生的最大离焦量给出, 采用在整个调焦范围内单方向等步距搜索方式。调焦步距小于景深一半时, 评价函数必定能找出最佳值。为了进行比较, 对相同视场分别计算上述四种评价函数的曲线以及两种均方差评价函数在另一视场中的对比曲线, 见图 4 和图 5。

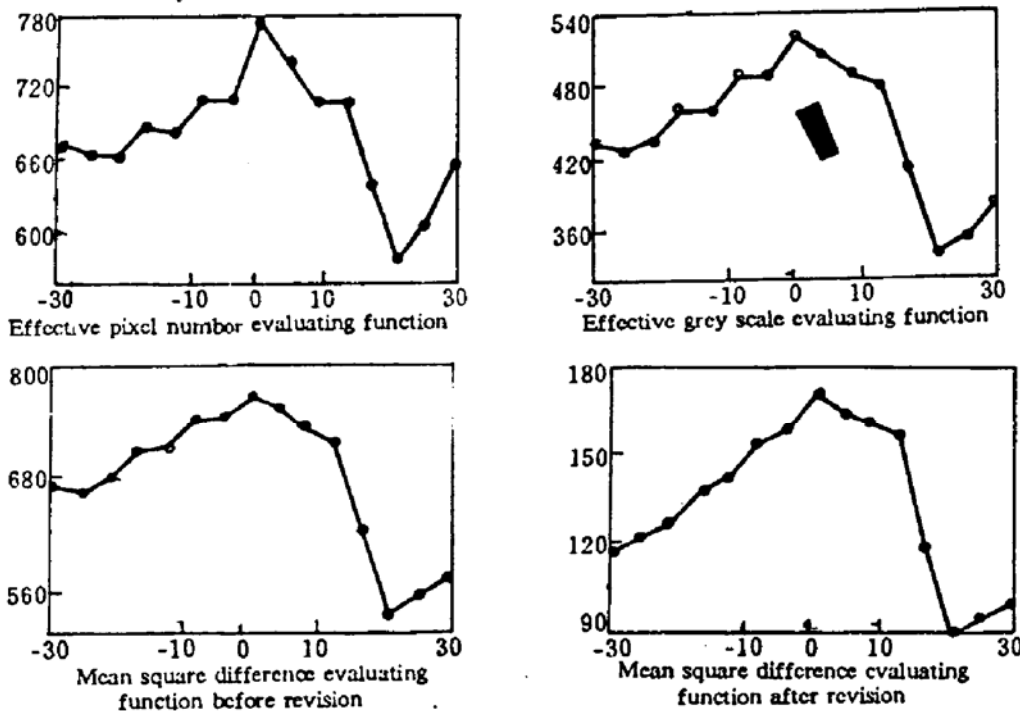


Fig. 4 Contours of four focusing evaluating functions

(a) Effective pixel number evaluating function, (b) Effective grey scale evaluating function, (c) Mean square difference evaluating, (d) Mean square difference evaluating

图 4 中视场 A 调焦范围是 $\pm 30 \mu\text{m}$, 调焦步距是 $4.2 \mu\text{m}$ 。曲线的横坐标代表离焦量, 单位 μm ; 纵坐标代表各种评价函数值, 无实际量纲。从曲线可知, 四种评价函数在最佳调焦位置(离焦量等于零)均能得到最大值。但各函数的单调性不同, 在离焦量从 $-30 \sim 0 \mu\text{m}$ 的调焦过程中, 由于受到照明亮度等因素的影响, 有效像素评价函数和有效灰度评价函数出现局部峰值, 改进前的均方差评价函数虽无局部峰值, 但与修正后相比其单调性(或峰值的明显性)较差。图中曲线右端有上升趋势, 这是因为当离焦量大于 $30 \mu\text{m}$ 时, 显微镜的调焦物面已接近盖玻片的表面, 在此面上粘有一些小灰尘和其它杂质, 当物镜对它们成像时, 评价函数相应地也得到了比较明显的反映。这也从另一方面说明了评价函数的灵敏度较高。图 5 比较了

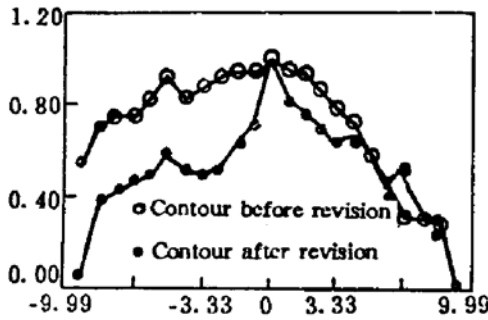


Fig. 5 Focusing contours of mean square difference evaluating function
“o” Contour before revision, “.” Contour after revision

两种均方差评价函数的调焦效果,在视场 B 最佳调焦位置附近以微小步距进行自动调焦。两种评价函数的曲线归一化后置于同一坐标系内,调焦范围是 $\pm 10 \mu\text{m}$,步距为 $0.84 \mu\text{m}$ 。“o”表示的是修正前的均方差函数,“.”表示的是修正后的。从图中可见,修正后的均方差函数单调增减性较好,尤其在最佳调焦位置附近,峰值非常明显。这是因为它不受背景噪声的影响,从而大大提高了评价函数的信噪比。

对上述实验的重复调焦精度利用 σ 公式进行了实验。

$$\sigma = \left\{ \left[\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \right] / (n - 1) \right\}^{1/2}$$

式中 X_i 为各次的最佳调焦位置, \bar{X} 是 X_i 的平均值, n 取 11 次,测得重复精度 $2\sigma = 1.32 \mu\text{m}$,远小于景深 $10 \mu\text{m}$ 。

结 论 本系统采用的调焦系统和机构,采用修正后的均方差自动调焦评价函数,在最佳调焦位置给出了唯一的峰值,具备最佳的单调性、灵敏度、信噪比和抗干扰性,良好的稳定性和重复调焦精度,它完全能满足图像采集生物自动显微镜系统的低对比视场的自动调焦要求。

参 考 文 献

- [1] 张以谟主编, 应用光学, 第二版, 北京, 机械工业出版社, 1988: 39~41
- [2] M. L. Mendelsohn, et al., Computer oriented analysis of human chromosomes- I focus. *Computer Biol. Med.*, 1972, 2: 137~150
- [3] E. M. Deeloy, et al., Automatic focusing of optical system by extremum control. *Proc. IEEE*, 1967, 114(1): 161~182
- [4] C. E. Shannon, A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Techn. J.*, 1948, 27(3): 379~423
- [5] Zhang Yimo, Li Heqiao, Huang Zhijun, An automated microscope system for cell image processing. *Proc. SPIE*, 1990, 1230: 604~607
- [6] Ryuji Suyama, Kei Tanemoto, Yoshinari Kobayashi et al., Autofocusing system of optical microscope utilizing electrostrictive actuators. *Jpn J Appl Phys.*, 1991, 30(6): 1290~1294

Study on Automatic Focusing of Image Collecting Automatic Biological Microscope System

Li Heqiao Zhang Yimo Rong Changqing

(Institute of Optoelectronics and Precision Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Liu Guolin

(Air Force Hospital, Tianjin 300381)

(Received 27 March 1994; revised 8 August 1994)

Abstract In this paper the mechanism of automatic focusing of a microscope system is presented. This system uses CCD served as photo-electric detector and is driven by step motors. The microscopical field can be automatically screened, focused and micro-image can be automatically collected. Automatic focusing is completed by the Mean Square Error Function. It provides a powerful means of micro-image collection and processing.

Key words microscope, image collection, auto-focusing, evaluating function.