

# 一种在显微镜照明光路上实现假彩色编码的方法

王 华

邓明晰

(重庆工业学校物理组, 重庆 630043) (后勤工程学院基础部, 重庆 630042)

**摘 要** 提出一种在显微镜照明光路上实现假彩色编码的方法, 即在照明光路上对光源进行分区彩色编码, 以得到彩色化的显微图像。

**关键词** 照明光路, 显微图像, 假彩色编码。

实现显微镜图像的彩色化, 一直是显微镜生产和使用者的追求目标。过去采用的方法主要有两种, 一种是在成像光路上进行彩色编码, 另一种是利用光的干涉效应, 如 Romarski 干涉相衬显微镜。由于显微镜生产过程中对成像光路要求极高, 采用前者所得到的彩色图像效果不甚理想, 这已被有关工作所证实<sup>[1]</sup>。至于后者, 虽可得到理想的彩色图像, 但价格昂贵, 生产困难, 使一般使用者难以承受<sup>[2]</sup>。鉴于此, 本文提出一种实现图像假彩色的新方法, 即在显微镜的光路中对光源进行编码, 有实现容易、操作简便的特点, 实验表明, 可得到较理想的假彩色显微图像。

## 1 光路结构

光路结构如图 1 所示, 光源 1 发出的光通过集光镜 2 照明编码板 3, 经过编码后的光通过聚光镜 4 照明物体 5, 物体由物镜 6 成像在像面 8 上, 而 7 为显微镜物镜出瞳, 通常在物镜的后焦面上。编码板的结构如图 2 所示, 透光函数为:

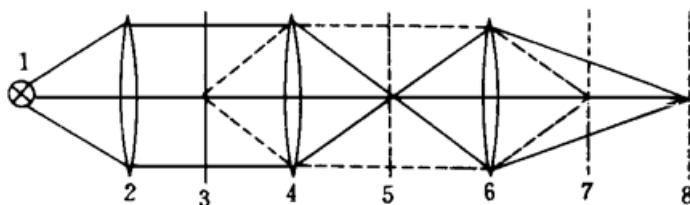


Fig. 1 Schematic diagram of the experimental arrangement

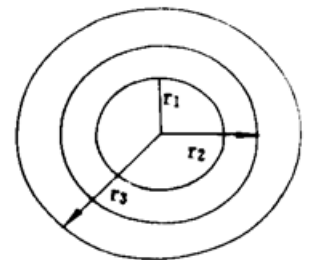


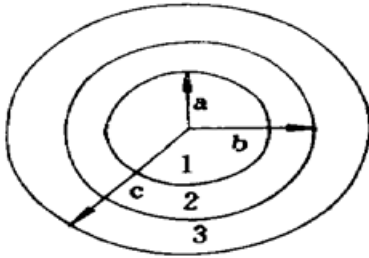
Fig. 2 Encoding disk

$$\sigma(r) = \begin{cases} I_1\delta(\lambda - \lambda_1), & r \leq r_1 \\ I_2\delta(\lambda - \lambda_2) & r_1 \leq r \leq r_2 \\ I_3\delta(\lambda - \lambda_3) & r_2 \leq r \leq r_3 \end{cases} \quad (1)$$

其中  $\delta(\lambda)$  为狄拉克函数,  $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ 、 $\lambda_3$  分别对应三种不同颜色的光波长。

## 2 理论分析

本文所采用的方法基于这样一个事实,物镜光瞳具有一定大小,显微镜对不同角度入射的不同颜色的照明光有不同的截止频率,据此来进行彩色编码。在 Hopkins 的部分相干理论中<sup>[3]</sup>,显微镜照明光源对显微图像的作用可由位置处在聚光镜出瞳上的有效光源代替,而由于编码板在聚光镜前焦面上,这样聚光镜出瞳就与物镜出瞳重合,即有效光源面在物镜出瞳 7 上,因此有效光源可表示为:



$$\sigma(x_0, y_0) = \begin{cases} I'_1\delta(\lambda - \lambda_1), & x_0^2 + y_0^2 \leq a^2 \\ I'_2\delta(\lambda - \lambda_2), & a^2 < x_0^2 + y_0^2 \leq b^2 \\ I'_3\delta(\lambda - \lambda_3), & b^2 < x_0^2 + y_0^2 \leq c^2 \end{cases} \quad (2)$$

式中  $a$ 、 $b$ 、 $c$  分别取决于  $r_1$ 、 $r_2$ 、 $r_3$  及聚光镜和物镜系统的放大率,  $I'_1$ 、 $I'_2$ 、 $I'_3$  分别为有效光源面(见图 3)中 1、2、3 区的透过率,  $x_0$ 、 $y_0$  为有效光源面坐标。根据 Hopkin 部分相干理论,像面上点

Fig. 3 Image of encoding disk on the back focal plane of the objective lens

$(x, y)$  处像的强度  $B(x, y)$  可表为:

$$B(x, y) = \iint \sigma(x_0, y_0) |\Phi(x_0, y_0, x, y)|^2 dx_0 dy_0 \quad (3)$$

式中  $\Phi$  为等效光源面  $dx_0 dy_0$  照明时,物在像面上的振幅分布,

$$\Phi(x_0, y_0, x, y) = \int a(x', y', x_0, y_0) F(x', y') \exp j(xx' + yy') dx' dy' \quad (4)$$

其中光瞳面上坐标以  $(x', y')$  表示;  $a(x', y', x_0, y_0)$  为有效光源面  $dx_0 dy_0$  照明时,物在光瞳面上的振幅分布函数;  $F(x', y')$  为物镜光瞳函数。由于有效光源分区均匀,所以

$$B(x, y) = \iint I'_1 |\Phi(x_0, y_0, x, y)|^2 dx_0 dy_0 + \iint I'_2 |\Phi(x_0, y_0, x, y)|^2 dx_0 dy_0 + \iint I'_3 |\Phi(x_0, y_0, x, y)|^2 dx_0 dy_0 \quad (5)$$

上式的积分限 1、2、3 如图 3 所示。在计算  $\Phi(x_0, y_0, x, y)$  过程中,若以  $\xi$ 、 $\eta$  表示物面坐标,为简单起见,假设物的透过率函数为:

$$A(\zeta, \eta) = \exp(-j\omega\zeta) \quad (6)$$

其傅里叶变换(略去常数)为:

$$F[A(\zeta, \eta)] = \delta(\omega + u) \delta(v) \quad (7)$$

式中  $u$ 、 $v$  是物质空间的频率坐标。因光瞳面在物镜焦平面上,所以平面  $(x', y')$  就是物质的频谱面。一般地,当有效光源面  $dx_0 dy_0$  照明物时,  $u$ 、 $v$  与  $x'$ 、 $y'$  存在如下关系:

$$u = x' - x_0, \quad v = y' - y_0 \quad (8)$$

因而

$$\Phi(x_0, y_0, x, y) = \iint \delta(\omega + x' - x_0) \delta(y' - y_0) F(x', y') \exp j(xx' + yy') dx' dy' \quad (9)$$

物镜光瞳函数  $F(x', y')$  通常取如下形式:

$$F(x', y') = 1, \quad x^2 + y^2 \leq h^2; \quad F(x', y') = 0, \quad x^2 + y^2 > h^2 \quad (10)$$

$h$  表示出瞳半径, (9) 式积分得到,

$$\Phi(x_0, y_0, x, y) = F(x_0 - \omega, y_0) \exp j(x_0 x + y_0 y - \omega y) \quad (11)$$

据(10)式, 有  $|\Phi|^2 = F(x_0 - \omega, y_0)$ , 因此

$$\begin{aligned} B(x, y) &= \iint F(x_0 - \omega, y_0) dx_0 dy_0 + \iint F(x_0 - \omega, y_0) dx_0 dy_0 + \iint F(x_0 - \omega, y_0) dx_0 dy_0 \\ &= B_1(\lambda_1, x, y) + B_2(\lambda_2, x, y) + B_3(\lambda_3, x, y) \end{aligned} \quad (12)$$

(12) 式中的  $B_1(\lambda_1, x, y)$  是两个圆  $x_0^2 + y_0^2 = a^2$  和  $(x_0 - \omega)^2 + y_0^2 = h^2$  的重迭积分,

$$B_1(\lambda_1, x, y) = \begin{cases} \pi a^2 & \omega < h - a \\ 0 & \omega > h + a \\ A_{11}(\omega) + A_{21}(\omega) & h - a < \omega < h + a \end{cases}$$

同理,  $B_2(\lambda_2, x, y)$  和  $B_3(\lambda_3, x, y)$  分别表为:

$$\begin{aligned} B_2(\lambda_2, x, y) &= \begin{cases} \pi(h^2 - a^2) & \omega < h - a \\ \pi h^2 - A_{11}(\omega) - A_{21}(\omega) & h - a < \omega < b - h \\ A_{12}(\omega) + A_{22}(\omega) & b - h < \omega < b + h \\ 0 & \omega > b + h \end{cases} \\ B_3(\lambda_3, x, y) &= \begin{cases} 0 & \omega > c + h \quad \text{或} \quad \omega < b - h \\ \pi h^2 - A_{12}(\omega) - A_{22}(\omega) & b - h < \omega < b + h \\ A_{13}(\omega) + A_{23}(\omega) & b + h < \omega < c + h \end{cases} \end{aligned}$$

其中  $b - h > b - a$ , 且有:

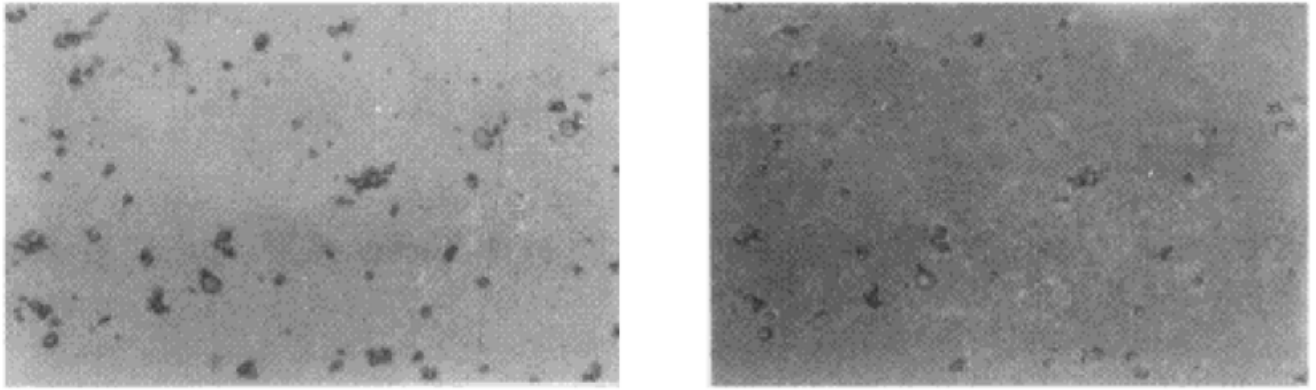
$$\begin{aligned} A_{1i}(\omega) &= d_i^2 \cos^{-1} \left[ \frac{\omega^2 + (d_i^2 - h^2)}{2\omega d_i} \right] - d_i^2 \left[ \frac{\omega^2 + (d_i^2 - h^2)}{2\omega d_i} \right] \left\{ 1 - \left[ \frac{\omega^2 + (d_i^2 - h^2)}{2\omega d_i} \right]^2 \right\}^{1/2} \\ A_{2i} &= h^2 \cos^{-1} \left[ \frac{\omega^2 + (h^2 - d_i^2)}{2\omega h} \right] - h^2 \left[ \frac{\omega^2 + (h^2 - d_i^2)}{2\omega h} \right] \left\{ 1 - \left[ \frac{\omega^2 + (h^2 - d_i^2)}{2\omega h} \right]^2 \right\}^{1/2} \end{aligned}$$

$d_i (i = 1, 2, 3)$  分别对应  $a, b, c$ 。

从以上讨论可得, 加上编码板后, 空间频率为  $\omega$  的物质的光强由  $B_1(\lambda_1, x, y)$ 、 $B_2(\lambda_2, x, y)$  和  $B_3(\lambda_3, x, y)$  三项组成, 由于  $B_1$ 、 $B_2$  和  $B_3$  分别对应三种颜色光源的光强, 因此在像面上得到的空间频率为  $\omega$  的物质像为三种颜色光强不同权重的迭加, 当空间频率改变, 这个权重就按  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$  随  $\omega$  的值而变, 对于物面上的不同物质, 相应的空间频率各不相同, 因而三种颜色迭加的权重因子就不同, 物面上的不同物质对应像的颜色就会变化, 从而形成彩色图像。

### 3 实验研究

根据上述分析, 在 XSZ-H 显微镜的照明光路安装了编码板, 通过大量的实验观察, 发现对本标本都能得到较好的彩色图像, 用  $25\times$  物镜摄得的自来水水迹标本明场和编码对比图像如图 4 所示(黑白图)。在彩色照片上可以看出物体的边缘带有明显的红色, 而中间部分带有蓝色, 这主要是编码板 1 区透蓝光, 3 区透红光的缘故, 当  $\omega$  大于  $h + a$  时,  $B_1$  等于零, 而边缘高频信息丰富, 故颜色主要由  $B_2$ 、 $B_3$  决定, 对于中间部分, 空间频率主要是低频成分, 当  $\omega \leq b - h$  时,  $B_3 = 0$ , 颜色主要由  $B_1$ 、 $B_2$ 。因此, 理论分析与实验是相符合的。



(a) bright field

(b) encoding

Fig. 4 Experimental results

**结束语** 本文提出的在显微镜照明光路实现彩色编码的方法,其本质是通过频率大小来进行假彩色编码的。由于物镜出瞳大小的限制,显微物镜对不同角度入射的照明光有不同截止频率,由此产生了由频率大小假彩色编码的效果。实验研究表明,在显微镜照明光路上进行假彩色编码,有装配容易、操作简便的特点,可以得到较理想的彩色编码图像。

感谢北京农业大学余炳生教授、第三军医大学瞿建才教授对本工作的大力支持。

### 参 考 文 献

- [1] Arthur Strange, Variable asymmetrical contrast microscope. *Microscope*, 1987, **35**(3): 279~ 289
- [2] G. Nomarski, A variable achromatic phase contrast microscope. *J. Opt. Soc. Am.*, 1968, **58**(7): 1568~ 1568
- [3] M. De, P. K. Mondal, Phase and amplitude contrast microscopy in partially coherent light. *J. Research of the National Bureau of Standards-C. Engineering and Instrumentation*, 1965, **69**(3): 199 ~ 212

## A Method of Microscope Pseudo-Color Encoding in the Illuminating System

Wang Hua

(Section of Physics, Chongqing Industrial School, Chongqing 630043)

Deng Mingxi

(Logistical Engineering University, Chongqing 630042)

(Received 6 December 1995; revised 24 October 1996)

**Abstract** In this paper, a new microscope pseudo-color encoding method based on the pseudo-color of optical source in the illuminating system was proposed. With the new pseudo-color encoding method, color microscope images were obtained in the actual experiment.

**Key words** illuminating system, microscope images, pseudo-color encoding.