

极小景深条件下显微镜大范围聚焦算法

翟永平¹ 周东翔¹ 刘云辉²

(¹ 国防科技大学电子科学与工程学院, 湖南 长沙 410073)
(² 香港中文大学机械与自动化工程系, 中国 香港)

摘要 自动聚焦是全自动显微成像中的一项关键技术。为了克服已有聚焦算法对聚焦起始点敏感及聚焦范围过小的问题,从分析大范围聚焦曲线形态入手,依据离焦距离、初始搜索方向和初始搜索范围等参量和曲线形态参数间的制约关系,将聚焦划分为六种类型,极值搜索中结合聚焦函数值的变化信息并通过启发式方式将未知类型转化为基本型,从而实现了大范围聚焦到小范围聚焦的转换。然后在聚焦曲线陡峭区范围内对曲线进行高斯拟合以获取最优焦平面。基于自行研发的全自动显微镜系统对提出的算法进行了验证,实验结果证明了该算法的有效性。

关键词 显微术;自动聚焦;极值搜索;景深;聚焦函数;高斯拟合

中图分类号 O436 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201232.0418001

Large Range Autofocusing Algorithm for Microscopy with Small Depth of Field

Zhai Yongping¹ Zhou Dongxiang¹ Liu Yunhui²

¹ College of Electronics Science and Engineering, National University of Defense Technology, Changsha, Hunan 410073, China

² Department of Mechanical and Automation Engineering, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

Abstract Auto-focusing is one of the key issues in automatic microscopy. The traditional methods suffer from the small search range and are sensitive to the starting position. An autofocusing algorithm for guiding automatic search of the optimal focal plane under large search range for microscopy with small depth of field is proposed. The autofocusing procedures are divided into six types, including two basic types and four complex types, based on the correlations of the defocus distance, the search direction, the search range and the parameters of the focusing curve. Then, the complex types are transformed into the basic types using the changes information of the values of the focusing functions. Therefore, the large search range is transformed into small search range and the traditional extremum search method, i. e. Gaussian curve fitting method can be used for guiding automatic search of optimal focal plane. Experimental investigation has been conducted to demonstrate the validity of the proposed method.

Key words microscopy; auto-focusing; extremum search; depth of field; focusing function; Gaussian fitting

OCIS codes 180.5810; 100.2000; 110.1085

1 引 言

基于图像处理的被动式聚焦在显微镜自动聚焦中得到了广泛应用,这种聚焦方式不依赖于任何测距设备,仅利用获取的序列数字图像分析系统的聚焦状态,并按照一定的搜索策略控制电机反复调节镜头或载物台位置,直到获取最清晰的图像^[1]。被

动式聚焦主要涉及两个关键问题:一个是聚焦测度,即如何评价图像的聚焦或清晰程度,针对此问题很多学者提出各种聚焦评价函数,典型的有灰度差分函数^[2]、Tenengrad 函数^[3]和改进拉普拉斯算子(SML)函数^[4]等;另外一个问题是极值搜索策略,即如何快速可靠地找到聚焦函数的极大值点,从而

收稿日期: 2011-09-14; 收到修改稿日期: 2011-10-31

基金项目: 国家自然科学基金(60975023)资助课题。

作者简介: 翟永平(1982—),男,博士研究生,主要从事医学图像处理、医疗机器人等方面的研究。

E-mail: talkshow88@gmail.com

导师简介: 刘云辉(1965—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事机器人学、机电系统和计算机视觉等方面的研究。

E-mail: yhliu@mae.cuhk.edu.hk

完成自动聚焦。目前已提出的极值搜索策略很多,典型的有盲人爬山算法^[5,6]、曲线拟合算法^[4]和 Fibonacci 算法^[7]等。在一般的应用中,这些算法均可成功搜索到焦平面,不同算法之间的区别主要体现在聚焦速度的快慢上。但在显微镜自动聚焦中,由于系统景深非常小,比如采用 100 倍物镜(油镜)、数值孔径为 1.25 时,其景深一般在 $0.5 \mu\text{m}$ 左右,而另一方面聚焦起始点跟焦平面之间的距离(称为离焦距离)相对于系统景深而言数值非常大(称这种情况为大范围聚焦),这种情况下,聚焦函数值往往仅在焦平面附近具有显著变化,而在远离焦平面时聚焦函数值无显著变化。以上几种传统算法均假设在整个聚焦范围内,聚焦函数值有显著变化,因此无法处理大范围聚焦的情况。文献[8]通过分析聚焦曲线形态,提出了大范围聚焦面临的问题,但是没有给出有效的解决方案。

本文从分析聚焦曲线形态入手,首先给出大范围聚焦的数学定义。然后依据离焦距离、搜索范围和曲线形态参数间的制约关系,将聚焦中可能遇到的情况划分为六种类型,其中两种为基本型,也是传统聚焦算法所考虑的情况,其他几种类型较为复杂,极值搜索中结合聚焦函数值的历史变化信息并通过启发式方式将这些复杂类型转化为基本型,从而实现了大范围聚焦到小范围聚焦的转换。然后在聚焦曲线陡峭区范围内对曲线进行高斯拟合以获取最优焦平面。最后,基于自行研发的全自动显微镜系统对提出的算法进行了验证,实验结果证明了该算法的有效性。

2 聚焦曲线形态分析及聚焦相对范围数

2.1 聚焦函数

目前提出的聚焦函数非常多,这些函数可以分为三类:1)基于图像梯度的聚焦函数,典型的有差异和模块(SMD)函数^[2]、Tenengrad 函数^[3]和 Brenner 函数^[9]等;2)基于频域的函数,比如基于小波变换的函数^[10,11]等;3)基于图像统计信息及自相关的函数,比如灰度方差函数^[12]等。目前应用最为广泛的是基于图像梯度的聚焦函数,这类函数计算简单,抗噪性能较强。另外,方差函数在很多应用中也有不错的性能。下面给出几个典型的聚焦函数。

1) SMD 函数

$$F_{\text{SMD}} = \sum_{x,y} [|g(x,y) - g(x,y-1)| + |g(x,y) - g(x-1,y)|], \quad (1)$$

函数中 $g(x,y)$ 代表图像在 (x,y) 点处的灰度值,下同;

2) SML 函数

$$F_{\text{SML}} = \sum_{x,y} [|2g(x,y) - g(x-1,y) - g(x+1,y)| + |2g(x,y) - g(x,y-1) - g(x,y+1)|]^2; \quad (2)$$

3) Tenengrad 函数

$$F_{\text{Tenengrad}} = \sum_{x,y} [G_x^2(x,y) + G_y^2(x,y)], \quad (3)$$

式中 $G_x(x,y)$ 和 $G_y(x,y)$ 分别为图像 x,y 方向的一阶 sobel 算子差分;

4) Brenner 函数

$$F_{\text{Brenner}} = \sum_{x,y} |g(x,y) - g(x+2,y)|^2; \quad (4)$$

5) 方差函数(Var)

$$F_{\text{Var}} = \sum_{x,y} [g(x,y) - \bar{g}]^2, \quad (5)$$

式中 \bar{g} 为图像灰度的均值。

2.2 聚焦曲线形态分析

在显微镜成像过程中,在焦平面处获取的图像最为清晰而在焦平面两侧获取的图像则逐步模糊。相应地,理想的聚焦函数应该在焦平面处取得最大值,而在焦平面附近随着图像模糊程度的加剧,聚焦函数值急剧下降。当目标(或载物台)离开焦平面一定距离后,图像中几乎看不到任何内容,这时如果继续远离焦平面,图像的清晰程度不会产生显著变化,相应地聚焦函数值的变化也非常缓慢,此时其值的波动主要是受随机噪声的影响。图 1(a) 给出了 SMD, SML, Tenengrad, Brenner 和方差函数的聚焦曲线图,图中纵坐标为归一化的聚焦函数值,横坐标代表图像索引号,范围从 $-97 \sim 97$ 共 195 幅图像,相邻图像间采集步长(光轴方向距离)为 $0.4 \mu\text{m}$,索引号为 0 处代表该图像在焦平面处获取,索引号绝对值越大代表该图像离焦平面越远。从图 1(a) 可看出,无论哪种聚焦函数,其聚焦曲线在整个聚焦范围内(从 $-97 \sim 97$),只有在焦平面附近是“陡峭”的,而在远离焦平面的区域,聚焦曲线显得较为“平缓”。为了描述聚焦函数曲线的这种特性,将曲线划分为陡峭区和平缓区如图 1(b) 所示,陡峭区宽度是有限的,用 W_s 表示,平缓区则分布在陡峭区两侧,随着图像离焦程度的加剧,其宽度也无限延伸。在陡峭区,横坐标(图像索引)的任何轻微改变都将引起聚焦函数值的剧烈变化,而在平缓区,横坐标的变化不会引起聚焦函数值的显著变化。进一步,将陡峭区划分为左陡峭区和右陡峭区,其宽度分别用 W_{LS} 和

W_{RS} 表示,相应地,平缓区也可以分为左平缓区和右平缓区,左右平缓区跟陡峭区的分界点分别称为左

临界点和右临界点。

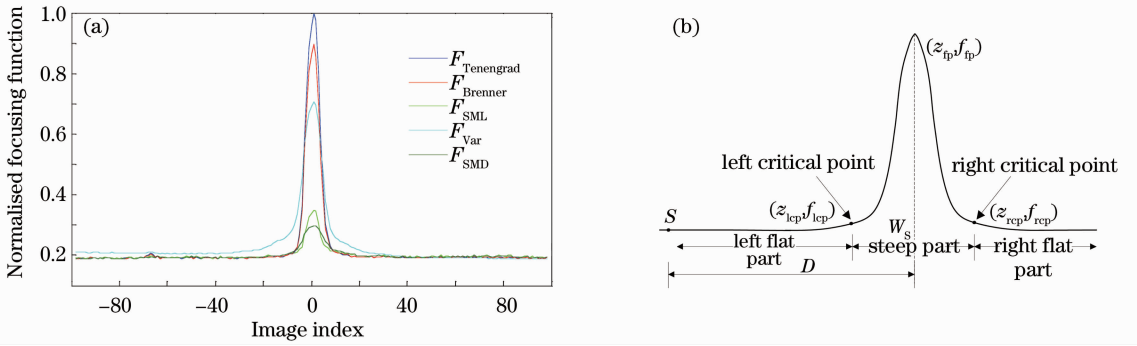


图1 (a)典型聚焦函数曲线形态;(b)聚焦曲线陡峭区和平缓区的划分

Fig. 1 (a) Typical curves; (b) different parts (flat part and steep part) of the focusing curve

设 (z_i, f_i) (其中 $i = 1, 2, 3, \dots$)为聚焦曲线上的离散点列,这些点列在聚焦曲线上的位置从左到右排列,反映了图像由模糊到清晰再到模糊的过程,为了准确定位临界点,将满足以下条件的第一个点 (z_n, f_n) (从左到右的顺序)作为左临界点

$$\frac{f_n}{\bar{f}_{n-1}} > \gamma, \quad (6)$$

式中 γ 为比例系数,其取值大于1, \bar{f}_{n-1} 为前 $n-1$ 个点的聚焦函数值的平均值,即

$$\bar{f}_{n-1} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n-1} f_i, \quad (7)$$

此时左临界点坐标 $z_{lcp} = z_n, f_{lcp} = f_n$ 。若用 (z_{fp}, f_{fp}) 代表焦平面点的坐标,那么左陡峭区宽度由下式决定:

$$W_{LS} = |z_{lcp} - z_{fp}| \times \Delta S, \quad (8)$$

式中 ΔS 为相邻图像间的采集步长。采用同样的方式按照从右至左的顺序可以获得右临界点的坐标。从而右陡峭区宽度 W_{RS} 为

$$W_{RS} = |z_{rcp} - z_{fp}| \times \Delta S, \quad (9)$$

整个陡峭区宽度为左右陡峭区宽度之和:

$$W_S = W_{LS} + W_{RS} = |z_{rcp} - z_{lcp}| \times \Delta S. \quad (10)$$

由于显微镜系统的前后景深不是严格相等的,因此聚焦曲线的左陡峭区和右陡峭区宽度也不严格相等,但差距不大,在精度要求不高的情况下可近似认为

$$W_{LS} = W_{RS} = \frac{1}{2} W_S = W_{0.5}, \quad (11)$$

式中 $W_{0.5}$ 称为陡峭区的单边宽度。通过实验发现,陡峭区宽度主要受显微镜系统景深、图像内容和聚焦函数的影响,显微镜系统景深越大,陡峭区宽度越大。当显微镜系统景深确定时,图像内容的丰富程

度对陡峭区宽度有着决定性影响,图像内容越丰富,陡峭区宽度越大。另外,不同的聚焦函数其陡峭区宽度也存在较大差异,详细分析见实验部分。

需要指出的是,在自动聚焦中,陡峭区宽度是一个非常重要的参量,直接决定着聚焦搜索过程最大步长 ΔS_{max} 的选取,在以往的研究中,搜索步长的选取非常随意,往往在粗聚焦阶段选取很大的步长,但若步长过大,则有可能导致聚焦中前后两个采样点分别落在聚焦曲线的左右平缓区,也即聚焦过程“直接跨越”了聚焦曲线的陡峭区“而不自知”,这种情况下会误认为聚焦还在平缓区进行,从而导致聚焦的失败。因此,为了保证在任何情况下聚焦过程都能到达陡峭区从而找到焦平面,聚焦的最大步长必须小于陡峭区宽度,也即

$$\Delta S_{max} < W_S. \quad (12)$$

2.3 聚焦相对范围数

若在某次自动聚焦行为中,聚焦起始点 S 跟显微镜系统焦平面间的距离为 D (称为离焦距离),将该距离跟聚焦函数陡峭区单边宽度的比值定义为聚焦相对范围数 N_F :

$$N_F = \frac{D}{W_{0.5}} = 2 \frac{D}{W_S}. \quad (13)$$

根据此定义,当聚焦起始点位于焦平面时,由于 $D = 0$,因此 $N_F = 0$;当聚焦起始点位于陡峭区时, $0 < D \leq 1/2 W_S$,因此 $0 < N_F \leq 1$;当聚焦起始点位于平缓区时, $D > 1/2 W_S$,因此 $N_F > 1$;随着聚焦起始点逐渐远离焦平面, N_F 也逐渐增大。另一方面,当离焦距离 D 给定时,聚焦函数陡峭区宽度 W_S 越小(往往意味着显微镜系统的景深很小、图像内容非常稀疏),聚焦相对范围数 N_F 越大。因此所谓的大范围聚焦实际上指的是聚焦的相对范围数较大,

而不仅仅是离焦距离较大。

3 大范围聚焦极值搜索策略

3.1 聚焦类型

在显微镜自动聚焦中,聚焦起始点 S 跟焦平面间的相对方向关系是未知的,因此初始搜索方向只能随机选取,可能选对(朝靠近焦平面的方向搜索),也可能选错(朝远离焦平面的方向搜索)。同时,离焦距离 D 跟聚焦函数陡峭区单边宽度 $W_{0.5}$ 间的关系也是未知的,从而聚焦相对范围数 N_F 也未知,聚焦范围可能很大,也可能很小。在聚焦过程中,搜索不能无限进行,还必须给定合理的初始搜索范围 R ,该搜索范围必须大于陡峭区单边宽度的 2 倍,即

$$R > 2W_{0.5}. \quad (14)$$

归纳初始搜索方向、离焦距离 D 、陡峭区单边宽度 $W_{0.5}$ 以及初始搜索范围 R 之间的关系,聚焦中可能出现的情况有如下 6 种:

(1) 初始搜索方向朝焦平面靠近,且 $D \leq W_{0.5} < 1/2R$,如图 2(a) 所示;

(2) 初始搜索方向朝焦平面靠近,且 $W_{0.5} < D < R$,如图 2(b) 所示;

(3) 初始搜索方向朝焦平面靠近,且 $R \leq D < R + W_{0.5}$,如图 2(c) 所示;

(4) 初始搜索方向远离焦平面,且 $D < W_{0.5}$,即 $N_F < 1$,如图 2(d) 所示;

(5) 初始搜索方向远离焦平面,且 $D \geq W_{0.5}$,即 $N_F \geq 1$,如图 2(e) 所示;

(6) 初始搜索方向朝焦平面靠近,且 $D \geq R + W_{0.5}$,如图 2(f) 所示。

以上第(1)和第(2)种类型是最为简单的两种类型,焦平面在初始搜索范围 R 内,聚焦函数值 F 首先增加,然后减小,因此初次搜索即可找到焦平面,称这两种为基本型。实际上,在基于聚焦函数分析原理的自动聚焦中,极值搜索都必须经历 F 值先增加后减小的过程才能表明搜索过程已经“跨越”了焦平面,然后或采取小步长反向搜索或曲线拟合方式找到焦平面。因此,在自动聚焦过程中,无论初始搜索方向跟其他参量之间的关系符合以上 6 种类型中的哪一种,最终都必须转化为基本型才能成功找到焦平面。因此,搜索算法设计的关键是准确判断当前聚焦过程的类型,并采取有效的方法将当前聚焦类型转化为基本型,从而实现自动聚焦。

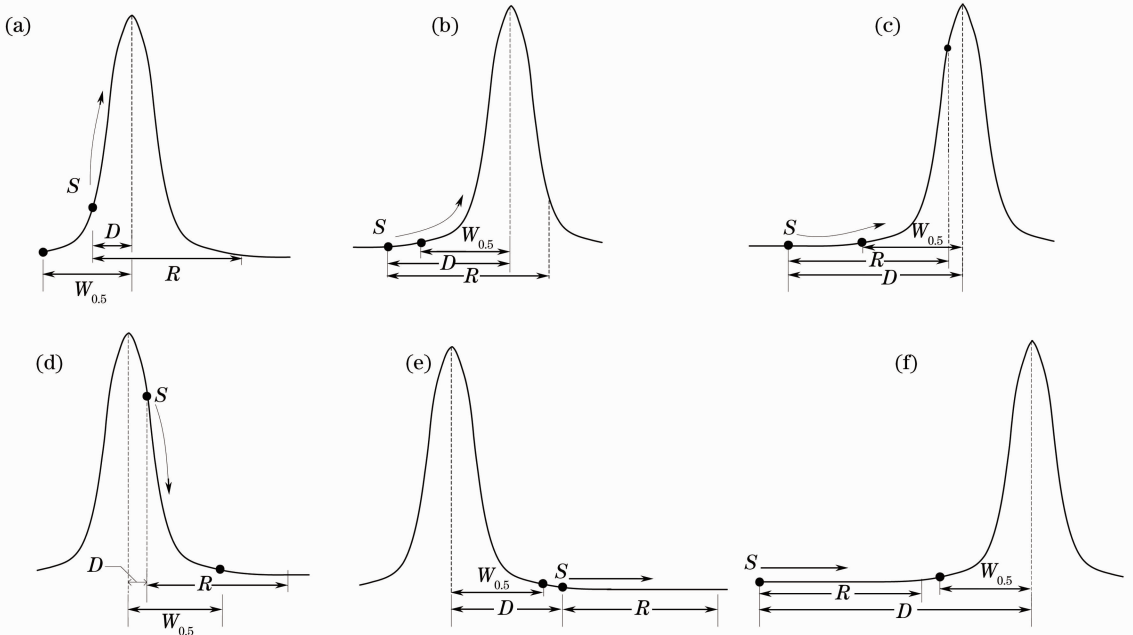


图 2 聚焦类型划分(依据初始搜索方向、初始搜索范围、离焦距离及陡峭区半宽度之间的关系)

Fig. 2 Different focusing procedure types according to the relation among the search range, the search direction, the defocus distance and the half-width of the steep part of focus curve

3.2 F 值变化的有效性

设 F_{n-1}, F_n 为搜索范围 R 内相邻采样点的聚焦函数值,定义聚焦函数 F_n 的变化有效性因子如下:

$$Cf_n = \begin{cases} \frac{F_n - F_{n-1}}{\min(F_n, F_{n-1})}, & \text{if } n \geq 1 \\ 0, & \text{if } n = 0 \end{cases}, \quad (15)$$

并规定:若 $Cf_n > \epsilon$,说明聚焦函数值 F_n “有效

增加”，并将当前搜索过程中值连续“有效增加”的次数记为 I_{cnt} ， F 值每“有效增加”1 次， I_{cnt} 便增加 1；若 $-\epsilon \leq Cf_n \leq \epsilon$ ，说明聚焦函数值 F_n 无明显变化，并将当前搜索过程中 F 值连续无明显变化的次数记为 U_{cnt} ， F 值每“无明显变化”1 次， U_{cnt} 便增加 1；若 $Cf_n < -\epsilon$ ，说明聚焦函数值 F_n “有效减小”，搜索过程一旦遇到这种情况，说明正在远离焦平面，必须停止继续前进，因此 F 值“有效减小”的次数只能为 1，故不予定义。前述 ϵ 为一大于零的常数，称为局部极值因子，定义为

$$\epsilon = \frac{F_{LocalMax} - F_{LocalMin}}{F_{LocalMin}}, \quad (16)$$

式中 $F_{LocalMax}$ 和 $F_{LocalMin}$ 分别为聚焦函数平缓区的极大值和极小值，局部极值因子 ϵ 的大小主要取决于噪声因素，另外跟聚焦函数、图像内容的丰富程度也有一定关系，在实际聚焦过程中可通过实验的方式测定。

F 值变化的有效性概念实际上是将“凹凸不平”的聚焦曲线人为的进行了“平滑”，尤其是在聚焦曲线的平缓区，当图像受噪声影响非常大时，虽然图像的清晰度没有任何变化，但是聚焦曲线却显得“坑坑洼洼”，其 F 值一直处于波动状态。引入 F 值变化的有效性后，这些 F 值的波动都会被忽略，认为 F 值“无明显变化”，从而克服了噪声对 F 值变化判决的影响。

3.3 聚焦类型判决及转换

在基于聚焦函数分析的自动聚焦中，不同采样点处聚焦函数值 F 的相对变化情况反映了系统当前的聚焦状态：若 F 值持续有效增加，说明搜索过程正在靠近焦平面；若 F 值持续有效减小，说明正在远离焦平面；若 F 值无明显变化，说明搜索过程

正在平缓区进行，无法判明聚焦方向。分析前述六种类型的聚焦函数 F 值变化情况可发现，在整个初始搜索范围内，不同类型其 F 值的变化情况是不同的，因此可以根据 F 的变化情况对聚焦过程的类型做出判断，具体为：

- 1) 若 F 首先持续有效增加，然后持续有效减小，则为第(1)型；
- 2) 若 F 首先在小范围内波动，然后持续有效增加，最后持续有效减小，则为第(2)型；
- 3) 若 F 首先在小范围波动，然后持续有效增加，则为第(3)型；
- 4) 若 F 持续有效减小，则为第(4)型；
- 5) 若 F 一直在小范围波动，没有明显增大或减少的趋势，则为第(5)或第(6)型。

明确聚焦类型后，可采取不同的策略将它们转化为基本型。对于第(3)型，只需将搜索范围扩大，保持搜索方向不变即可转化为基本型；对于第(4)型，只需改变搜索方向即可转化为基本型。而第(5)和第(6)种类型较为复杂，这也是大范围聚焦中经常遇到的情况，而传统的聚焦算法对此则没有考虑。这两种类型虽然搜索方向一个朝焦平面靠近[第(6)型]，而另一个远离焦平面[第(5)型]，但由于搜索过程一直在平缓区进行，导致它们的聚焦函数值 F 的变化情况没有显著差异，因而无法通过 F 的变化情况对当前聚焦过程的类型做出判断。对这两种类型，进行统一处理，通过不断扩展搜索范围和反复改变搜索方向的方式，直至转化为基本型。具体可采用两种实现方式：

方式一：反向扩展搜索范围法(反向扩展法)

如图3(a)所示，从当前搜索终点 E 开始，转换

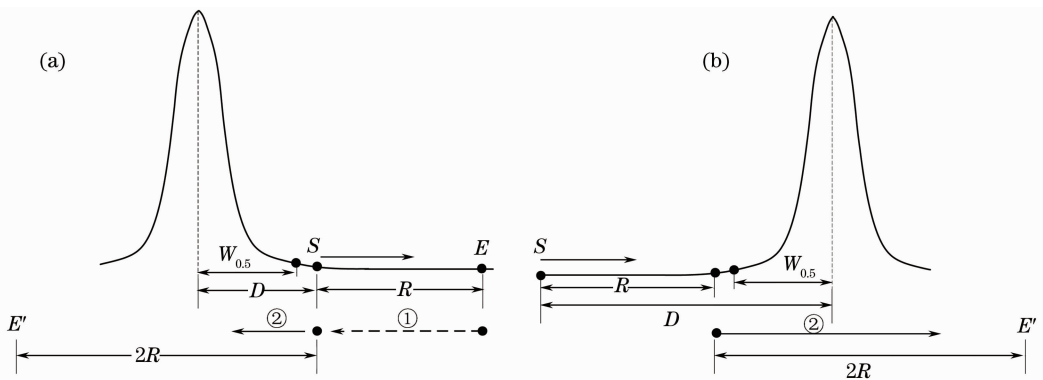


图3 (a)反向扩展搜索范围法;(b)同向扩展搜索范围法

Fig.3 (a) Search direction is reversed then the search range is expanded; (b) the search direction is kept and the search range is expanded

搜索方向,以大步长快速返回至原聚焦起始点 S (图中虚线箭头所示),在实际聚焦中,由于电机存在回程误差,因此实际返回步长 b_s 略大于初始聚焦范围 R ,若电机回程误差为 ΔD ,则实际返回步长

$$b_s = R + \Delta D. \quad (17)$$

然后,从 S 点开始,将搜索范围扩展为原范围的 2 倍,保持当前搜索方向不变,开始搜索(图中实线箭头 ② 所示)。若在此搜索过程中, F 值出现“有效增加”的状态,说明搜索过程正在朝焦平面靠近,聚焦过程会转化为基本型或第(3)型,而第(3)型很容易转化为基本型;若在整个 $2R$ 搜索范围内, F 值仍然“无明显变化”,那么从当前搜索终点 E' 开始,转换搜索方向,以大步长快速返回至上一个搜索终点 E ,保持当前搜索方向,并将搜索范围扩展为 $4R$,继续搜索,如此反复,直至转化为基本型。

方式二:同向扩展搜索范围法(同向扩展法)

该方式跟反向扩展法类似,区别在于,同向扩展法首先不转换搜索方向,而是保持原始方向不变,仅将搜索范围扩展为原范围的 2 倍,进行搜索,如图 3(b)所示。若在扩展搜索范围内, F 值“无明显变化”,则采取跟反向扩展法类似的方式快速返回至上一个搜索终点 E ,保持当前方向,继续搜索,如此反复,直至转化为基本型。

一般而言,对于第(5)型,反向扩展法较同向扩展法效率要高,尤其是当初始搜索范围 R 较大的时候,而对于第(6)型,同向扩展法效率要高于反向扩展法。但在实际聚焦中,无法提前预知聚焦类型,若假设聚焦中第(5)型跟第(6)型出现的概率相同的话,那么无论采取反向扩展法还是同向扩展法,总体效率应该是相当的。

下面给出基于 F 值分析的聚焦类型判决及转换的算法步骤:

- 1) 系统标定。测定及 ΔD ,给定 R 及 ΔS ;
- 2) 初始化。 $n \leftarrow 0, I_{\text{cnt}} \leftarrow 0, U_{\text{cnt}} \leftarrow 1$;
- 3) 获取图像,计算 F_n 和 Cf_n ;
- 4) 判决:

if $Cf_n > \epsilon$

if $n\Delta S < R$

then $I_{\text{cnt}} ++$,跳转至步骤 5)

else

做出判决:当前类型为第(3)型。跳转

至步骤 6)

else if $-\epsilon \leq Cf_n \leq \epsilon$

if $n\Delta S < R$

then $U_{\text{cnt}} ++$,跳转至步骤 5)

else

做出判决:当前类型为第(5)型或第(6)型。跳转至步骤 8)

else

if $I_{\text{cnt}} = 0 \& U_{\text{cnt}} = 0$

then 做出判决:当前类型为第(4)型。跳转至步骤 7)

else if $I_{\text{cnt}} \geq 1 \& U_{\text{cnt}} = 0$

then 做出判决:当前类型为第(1)型。

else

做出判决:当前类型为第(2)型;

5) 移动步长 $\Delta S, n \leftarrow n+1$,跳转至步骤 3);

6) 保持当前搜索方向不变,将搜索范围扩展为当前搜索范围的 2 倍,转化为基本型;

7) 转换搜索方向,搜索范围大小不变,转化为基本型;

8) 采用反向扩展搜索范围法,直至转化为基本型。

4 陡峭区极值搜索

当搜索过程转化为基本型后,聚焦将在陡峭区进行。根据傅里叶光学成像原理,离焦图像可以看成是聚焦图像跟特定的点扩展函数的卷积结果,当离焦程度不严重时,点扩展函数可用高斯模型近似表达。因此,在陡峭区采用高斯拟合的方式寻找最优焦平面。设 z 代表当前采样点跟焦平面之间的距离(左边为负,右边为正),则聚焦函数值 $F(z)$ 用高斯模型表示如下:

$$F(z) = m \exp\left[-\frac{(z-\mu)^2}{2\sigma^2}\right], \quad (18)$$

式中 m 表示聚焦函数的最大值, μ 为高斯均值(代表最优焦平面的位置), σ 为高斯标准差。将搜索中采用的聚焦函数形式记为 F_X ,则在第 i 个采样点 z_i 获取的图像其聚焦函数值为 $F_X(z_i)$,其中也称为图像索引号,在焦平面左侧其值取负,右侧取正,若采样步长为 ΔS ,则:

$$z_i = i\Delta S. \quad (19)$$

采用最小二乘原理对以上模型进行数据拟合,也即求解以下最小二乘问题

$$\sum_{i=N_L}^{N_R} \|F(z) - F_X(z_i)\|^2 \sim \min. \quad (20)$$

式中 N_L 和 N_R 确定了参与拟合的数据范围,分别称为拟合的左右限。分别令 $F_X = F_{\text{Tenengrad}}, F_X =$

$F_{\text{Brenner}}, F_X = F_{\text{Var}}$, 然后获取数据(对聚焦函数值进行了归一化)并进行高斯拟合, 其中 $N_L = -6$, $N_R = 6$, $\Delta S = 0.4 \mu\text{m}$, 拟合结果如表 1 所示, 拟合的优劣程度用误差平方和 (SSE)、误差均方根 (RMSE) 及方程的决定系数 (R-Square) 等曲线拟合中的三个常用指标进行评价, 其中 SSE 及 RMSE 取值范围为 0 到 1, 这两个值越接近 0 说明拟合误差越小。R-Square 的取值范围也为 0 到 1, 该值越接近 1 说明拟合曲线跟原始数据的逼近程度越好。

表 1 陡峭区聚焦曲线高斯拟合结果

Table 1 Gaussian fitting results of the steep part of the focusing curves

Focusing function forms	Model parameter			Evaluation index		
	m	μ	σ	SSE	RMSE	R-Square
$F_{\text{Tenengrad}}$	1.011	-0.0886	5.003	0.006563	0.02562	0.9931
F_{Brenner}	0.9922	-0.097	5.332	0.009625	0.03756	0.972
F_{Var}	0.9819	-0.099	8.363	0.009434	0.039	0.9751

需要注意的是参与拟合的数据范围(简称为拟合范围)对拟合结果影响非常大, 只有在聚焦曲线的陡峭区聚焦函数才能用高斯模型拟合, 随着拟合范围的扩大(意味着数据向聚焦曲线平缓区过渡), 聚焦函数模型越来越远离高斯模型, 此时高斯拟合结果不可用。图 4(a) 为 $N_L = -97$, $N_R = 97$ 时 Tenengrad 函数的拟合曲线, 此时 R-Square 仅为 0.08379, 意味着实测数据跟高斯曲线相去甚远,

从拟合评价指标来看, 无论是 Tenengrad 函数、Brenner 函数, 还是方差函数, 在 $i \in [-6, 6]$ 范围内它们的实测数据跟高斯模型的拟合误差都非常小, RMSE 均小于 0.04, 而 R-Square 这一重要指标也均大于 0.97, 表示高斯模型跟原始数据的逼近程度非常好。从模型参数来看, 模型均值(代表最优焦平面的位置)跟实际数据误差最大为 -0.099 , 考虑到 $\Delta S = 0.4 \mu\text{m}$, 因此实际误差仅为 $-0.0396 \mu\text{m}$, 非常接近焦平面。

图 4(b) 为 $N_L = -6$, $N_R = 6$ 时 Tenengrad 函数的拟合曲线, 从曲线形态来看, 实测数据跟高斯模型拟合效果非常好。图 4(c) 和 (d) 分别给出了 R-Square 和 SSE 随着拟合范围不断增大的变化曲线(横坐标数值为 $N_R - N_L$, 且 $N_R = -N_L$), 显然, 在聚焦曲线陡峭区内, 拟合范围对 R-Square 和 SSE 数值无明显影响, 随着拟合范围的增大, 尤其当进入到平缓区后, R-Square 几乎呈线性减小趋势, 而 SSE 则几乎呈线性

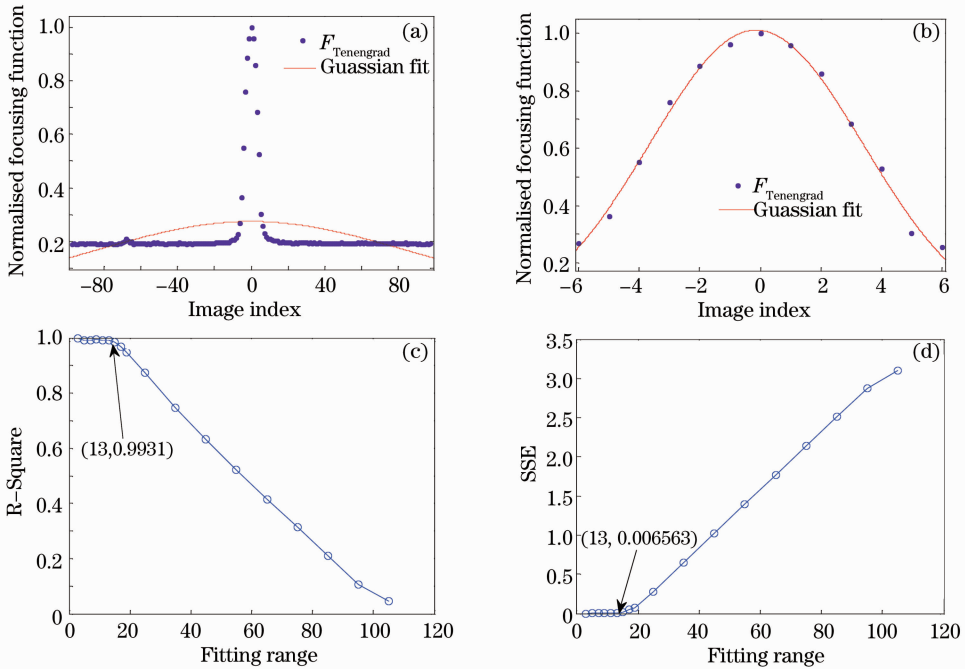


图 4 (a) 大范围高斯拟合; (b) 陡峭区高斯拟合; (c) R-Square 随拟合范围的变化曲线; (d) SSE 随拟合范围的变化曲线
 Fig. 4 (a) Gaussian fitting for both the steep part and the flat part of the focusing curve; (b) Gaussian fitting for only the steep part of the focusing curve; (c) R-Square decreases nearly linearly along with the increase of the fitting range; (d) SSE increase nearly linearly along with the increase of the fitting range

增加趋势,意味着实测数据跟高斯模型的拟合程度越来越差。因此,在聚焦过程中,必须确保聚焦过程进入陡峭区后方可采用高斯拟合方式寻找焦平面。

实际聚焦过程中,当发现聚焦函数值有效减小后,即可停止搜索,并采用以上方式进行高斯拟合寻找最优焦平面,然后驱动载物台返回相应的步长(要考虑回程误差)即可到达最优焦平面。

5 实 验

5.1 实验平台及图像数据获取

图 5 为全自动显微镜系统采用 Olympus 显微镜光路系统及大恒 CCD 相机采集图像,其中物镜放大率为 100 倍(油镜),其数值孔径为 1.25, CCD 相机分辨率为 $1392 \text{ pixel} \times 1040 \text{ pixel}$ (141M),整个显微镜系统景深约为 $0.5 \mu\text{m}$,工作距离 W_D 约为 $190 \mu\text{m}$ 。载物台为自行研发的三轴运动平台,该平台在电机的驱动下可沿 X, Y, Z 三轴运动,其中 Z 轴传动系统采用高精度步进电机及滚珠丝杠,步进分辨率可达 $0.02 \mu\text{m}$ 。

以显微镜焦平面为原点采集 1 幅图像,然后在焦平面左右两侧各采集 97 幅图像,相邻图像间的步长 $\Delta S = 0.4 \mu\text{m}$ 。所用标本为肺结核病人的痰涂片样本,为了更具一般性,在大量标本中选取了两组典型样本,样本按照所观察图像中内容的多寡分别以 A、B 标记,其中 A 样本图像内容非常丰富,B 样本图像内容较少。这样,获取了两组图像数据,每组有 195 幅图像。图 6 中第一行给出了 A 组样本中几幅典型图像,第二行给出 B 组样本中几幅典型图像。

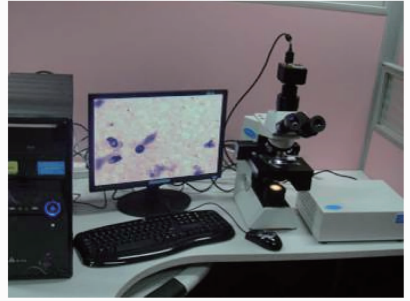


图 5 自行研发的全自动显微镜系统
Fig. 5 Automatic microscopic system

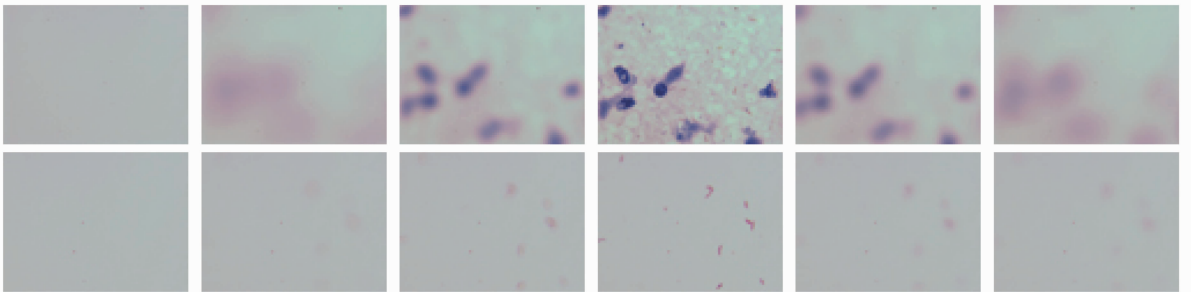


图 6 样本图像
Fig. 6 Sample images

5.2 参数测定

1) 聚焦曲线形态参数测定

以 A、B 两组样本为实验数据,依据(8),(9),(10),(12)及(15)式分别计算 Tenengrad 函数、Brenner 函数、SMD 函数、SML 函数、方差函数的陡峭区宽度 W_s 、聚焦相对范围数 N_F 以及局部极值因

子 ϵ ,结果如表 2 所示,其中 W_s 以 μm 为单位, N_F 跟 ϵ 无单位。由于 N_F 的计算和离焦距离 D 有关,因此,仅以 D 为显微镜工作距离 W_D 的一半为例进行测定,也即 $D = \frac{W_D}{2} = \frac{190}{2} = 95 \mu\text{m}$ 。

表 2 聚焦曲线形态参数测定结果

Table 2 Measured results of shape parameters of focusing curves

Parameters	Samples	$F_{\text{Tenengrad}}$	F_{Brenner}	F_{SMD}	F_{SML}	F_{Var}
W_s	Sample A	24	26.4	32	29.6	71.2
	Sample B	5.6	5.6	5.6	4	14.4
N_F	Sample A	7.9166	7.1970	5.9376	6.419	2.6685
	Sample B	33.9286	33.9286	33.9286	47.5	13.1944
ϵ	Sample A	0.056	0.060	0.078	0.076	0.032
	Sample B	0.062	0.068	0.053	0.058	0.035

分析以上数据,可得出如下结论:1)图像内容的丰富程度直接影响聚焦函数陡峭区宽度 W_s 和聚焦相对范围数 N_F ,对同一个聚焦函数,图像内容越丰富, W_s 越大,相应地 N_F 越小(离焦距离 D 相同的情况下);2)不同的聚焦函数其陡峭区宽度也不同,相应地其 N_F 也不同,其中方差函数的陡峭区宽度远大于其他函数,相应地,当离焦距离 D 相同时,方差函数具有最小的 N_F ;3)无论取哪种聚焦函数,图像内容丰富程度如何,当离焦距离 D 取显微镜工作距离 W_D (主要由景深决定)的一半时 N_F 均远大于1,说明了在极小景深条件下,显微镜自动聚焦往往是大范围聚焦;4)局部极值因子的大小没有呈现出一定的规律性,这主要是由于该值受图像噪声影响非常大,考虑到以上所有函数的局部极值因子均小于0.08,因此在实际聚焦中选取 $\epsilon=0.08$ 即可。

2) z 轴回程误差标定

借鉴文献[8]的方法进行 z 轴回程误差的标定。首先将载物台置于显微镜焦平面一侧适当位置(比如焦平面上侧适当位置),启动相机获取图像,并计算当前图像的聚焦函数值,然后开始朝焦平面方向运动,每移动步长 ΔS ,获取图像并计算聚焦函数值,如此继续,直至载物台“跨越”了焦平面适当距离,将当前载物台的位置称为参考位置(或参考零点)。然后从参考位置开始,按照同样的方式反向移动载物台,获取图像并计算聚焦函数值,直至再次“跨越”焦平面适当距离。若以上两次测试聚焦函数最大值对应的 z 轴位置分别用 z_1, z_2 表示(以参考零点为参考点),那么 z 轴传动系统回程误差可用以下公式近

似计算:

$$\Delta D = |z_1 - z_2| \times \Delta S. \quad (21)$$

测试中,取 $\Delta S=0.04 \mu\text{m}$,也即两个步进分辨率,按照以上方式反复测试10次,统计结果得出本系统回程误差为 $\Delta D=(0.3 \pm 0.02) \mu\text{m}$ 。

5.3 聚焦实验

实验配置为:1)平台采用5.1节所述显微镜系统;2)标本为肺结核病人痰涂片,为了排除图像噪声影响,选取的标本中图像内容均较为丰富;3)大范围聚焦阶段采用方差函数,陡峭区极值搜索阶段采用Brenner函数;4)聚焦参数:局部极值因子 $\epsilon=0.08$, z 轴传动系统回程误差 $\Delta D=0.3 \mu\text{m}$,大范围聚焦阶段搜索步长 $\Delta S=10 \mu\text{m}$,陡峭区极值搜索阶段步长 $\Delta S=2 \mu\text{m}$,初始聚焦范围 $R=100 \mu\text{m}$ 。

实验过程为:首先在焦平面上侧随机选取聚焦起始点(在显微镜工作距离范围内),搜索方向也随机选取(这点很重要),采用文中算法进行聚焦实验10次。然后在焦平面下侧采用同样的方式进行聚焦实验10次。为了表征算法性能,大范围聚焦阶段以成功转换为基本型为聚焦成功,陡峭区聚焦阶段以聚焦误差 δ 表示聚焦效果,定义为参考最优焦平面位置 z_f (由人眼观察图像清晰程度的方式近似确定)跟算法获取的焦平面位置 μ 的差值的绝对值,即: $\delta = |\mu - z_f|$ 。

实验结果:1)在大范围聚焦阶段,以上20次实验聚焦类型全部判决正确并成功转换为基本型,表明文中大范围聚焦算法是非常有效的;2)陡峭区聚焦实验的聚焦精度误差统计分布如表3所示。

表3 聚焦误差分布统计结果

Table 3 Distribution of the error of the focal plane position

Error range	$\delta \leq 0.2 \mu\text{m}$	$0.2 \mu\text{m} < \delta \leq 0.5 \mu\text{m}$	$0.5 \mu\text{m} < \delta \leq 2 \mu\text{m}$	$\delta > 2 \mu\text{m}$
Times	11	6	2	1
Percentage / %	55	30	10	5

根据表3中统计结果可知,20次实验中17次实验(85%)的聚焦误差小于 $0.5 \mu\text{m}$,考虑到显微镜系统景深约为 $0.5 \mu\text{m}$,因此,这些实验均可认为是成功聚焦的。其他3次实验(10%)的聚焦误差在 $0.5 \sim 2 \mu\text{m}$ 之间,仅有1次(5%)实验误差大于 $2 \mu\text{m}$,考虑到搜索步长 $\Delta S=2 \mu\text{m}$,因此若将搜索步长减小的话,聚焦误差可进一步下降。

6 结论

对极小景深条件下显微镜大范围聚焦问题进行了研究。通过极值搜索过程中聚焦函数值变化信息

实现聚焦类型的判决及转换,从而克服了传统聚焦算法聚焦范围过小的问题。在实验部分,首先基于自行研发的全自动显微镜系统对算法参数进行了标定,然后对算法进行了验证。结果表明:在图像内容较为丰富的情况下,文中算法的聚焦类型转换成功率高达100%,聚焦误差可以控制在显微镜景深范围内。需要指出的是:当图像内容极为稀疏时,算法受噪声影响会越来越大,这种情况下需要首先对聚焦函数曲线进行增强(文献[18]给出了基于图像内容加权的聚焦函数增强算法),然后采用文中算法进行极值搜索,可以克服噪声对算法性能的影响。

参 考 文 献

- 1 Zhai Yongping, Zhou Dongxiang, Liu Yunhui *et al.*. Design of evaluation index for auto-focusing function and optimal function selection [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(4): 0418002
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
- 2 R. A. Jarvis. Focus optimization criteria for computer image processing [J]. *Microscope*, 1976, **24**(2): 163~180
- 3 J. M. Tenenbaum. Accommodation in Computer Vision [D]. Stanford: Stanford University, 1970
- 4 S. K. Nayar, Y. Nakagawa. Shape from focus [J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1994, **16**(8): 824~831
- 5 K. S. Choi, J. S. Lee, S. J. Ko. New autofocusing technique using the frequency selective weighted median filter for video cameras [J]. *IEEE Trans. Consumer Electron.*, 1999, **45**(3): 820~827
- 6 Jie He, Rongzhen Zhou, Zhiliang Hong. Modified fast climbing search auto-focus algorithm with adaptive step size searching technique for digital camera [J]. *IEEE Trans. Consumer Electron.*, 2003, **49**(2): 257~262
- 7 Chen Guojin. Implementing the Auto-Focusing System Based on the Digital Image Process Technology [D]. Xi'an: Xi'an Electronics University, 2007
陈国金. 数字图像自动聚焦技术研究及系统实现[D]. 西安: 西安电子科技大学, 2007
- 8 F. R. Boddeke. Quantitative Fluorescence Microscopy [D]. Delft: Delft Technische University, 1999
- 9 J. F. Brenner, B. S. Dew, J. B. Horton *et al.*. An automated microscope for cytological research: a preliminary evaluation [J]. *J. Histochem. & Cytochem.*, 1976, **24**(1): 100~111
- 10 Y. Ge, B. Nelson. Wavelet-based autofocusing and unsupervised segmentation of microscopic images [C]. In: Proc. IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2003, **3**: 2143~2148
- 11 Vishnu V. Makkapati. Improved wavelet-based microscope autofocusing for blood smears by using segmentation [C]. In: 5th Annual IEEE Conference on Automation Science and Engineering, 2009, 208~211
- 12 G. J. Chen, M. F. Zhu, Y. K. Wang *et al.*. Study on definition evaluation function based on image contrast variation [C]. In: Proc the 2007 Annual Conference on International Conference on Computer Engineering and Applications, 2007, 254~258
- 13 A. Santos, C. O. Solorzano, J. J. Vaquero *et al.*. Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis [J]. *J. Microscopy*, 1997, **188**(3): 264~272
- 14 Sun Jie, Yuan Yuehui, Wang Chuanyong. Comparison and analysis of algorithms for digital image processing in autofocusing criterion [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(1): 35~39
孙 杰, 袁跃辉, 王传永. 数字图像处理自动图像聚焦算法的分析和比较 [J]. *光学学报*, 2007, **27**(1): 35~39
- 15 Hu Fengping, Chang Yilin, Ma Yanzhuo *et al.*. Development of the video automatic focus method [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(10): 1901~1906
胡凤萍, 常义林, 马彦卓 等. 视频自动聚焦的实现研究 [J]. *光子学报*, 2010, **39**(10): 1901~1906
- 16 Huang Yan, Xu Qiaoyu, Ye Dong *et al.*. Auto-focus method based on autocorrelation of derivative image [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(12): 3435~3440
黄 艳, 徐巧玉, 叶 东 等. 基于微分图像自相关的自动对焦法 [J]. *光学学报*, 2010, **30**(12): 3435~3440
- 17 B. S. Luthi, N. Thomas, S. F. Hwiid *et al.*. An efficient autofocus algorithm for a visible microscope on a Mars lander [J]. *Planetary and Space Science*, 2010, **58**(10): 1258~1264
- 18 Zhai Yongping, Zhou Dongxiang, Liu Shun *et al.*. Content based focus measure for robust auto-focusing of microscopy in biomedical applications [C]. IEEE 4th International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NANOMED), 2010, 130~135

栏目编辑: 韩 峰