基于可编程 LED 阵列照明的透射体视显微镜

孔富城^{1,2} 张玉珍² 孙佳嵩^{1,2} 陈 钱² 左 超^{1,2}

1南京理工大学电子工程与光电技术学院智能计算成像实验室,江苏南京 210094

2南京理工大学电子工程与光电技术学院江苏省光谱成像与智能感知重点实验室,江苏南京 210094

摘要为了实现对待测样品高质量的体视显微成像,提出了基于可编程发光二极管(LED)阵列照明的透射体视显微镜。该显微镜光学系统使用可编程 LED 阵列作为照明双光源,照明孔径、角度以及波长均可自由选择,通过改变可编程 LED 阵列上红蓝圆形光源的半径 r 和圆心间距 d 分别实现对体视显微镜焦深和体视角的灵活可控。实验结果表明,该显微镜系统简便,观察者根据自身需要选择合适的焦深和体视角可有效解决因人眼瞳距个体差异大引起单一体视角出现的双像不能重合等问题,实现对待测样品的直接体视显微观看。使用数值孔径 NA=0.1 (4×)的显微物镜,在最佳参数 r = 2,d = 3 时可清晰观测到待测样品的层次关系以及相对位置等三维信息。 关键词 成像系统;显微镜;三维图像;可编程照明;发光二极管阵列

大雄间 成隊示犯;亚阪说;二组图隊;可编住照明;及九二版目

中图分类号 TH742 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201636.0511005

Transmission Stereo Microscope Based on Programmable LED Array Illumination

Kong Fucheng^{1,2} Zhang Yuzhen² Sun Jiasong^{1,2} Chen Qian² Zuo Chao^{1,2}

¹ Smart Computational Imaging Lab, School of Electronics and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China

² Jiangsu Key Laboratory of Spectral Imaging and Intelligence Sense, School of Electronics and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China

Abstract A transmission stereo microscope is presented based on programmable light emitting diode(LED) array illumination so as to realize stereo imaging with high quality. The programmable LED array is the illumination source of this optical system. The radius, angle and wavelength of illumination can be chosen freely. The depth of focus and the stereotype angle can be adjusted by changing r and d of the programmable LED array at will. Experimental results show that the microscope system is simple, and double images which can not be coincided owning to the difference of individual pupil distance can be solved effectively by choosing appropriate r and d. The stereo image of samples can be obtained in details directly. The three-dimensional information such as hierarchy and relative position can be observed with optimal parameters r=2 and d=3 by using objective $NA=0.1(4\times)$.

Key words imaging systems; microscopy; three-dimensional image; programmable illumination; light emitting diode array OCIS codes 110.0180; 110.6880; 110.2945

1 引 言

显微镜是一种借助于物理方法产生物体放大影像的仪器^[1],自16世纪问世以来,作为一种通用的观察、

收稿日期: 2015-12-14; 收到修改稿日期: 2016-01-15

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(30916011322)、国家自然科学基金(11574152,61505081)、江苏省"六大高峰"人才项目(2015-DZXX-009)、江苏省"333 工程"科研项目资助计划(BRA2015294)、江苏省光谱成像智能感知重点实验室开放基金(3092014012200417)

作者简介:孔富城(1990-),男,硕士研究生,主要从事显微成像方面的研究。E-mail:251627385@qq.com

导师简介:张玉珍(1973-),女,博士,副教授,主要从事光电探测与图像处理等方面的研究。

E-mail:papershare501@163.com(通信联系人)

计量工具,其应用渗透到生活中的各行各业^[2-4]。普通显微镜只能提供待测样品的二维信息,不能传达其层次、相对位置等信息。体视显微镜又称解剖显微镜、立体显微镜,由于可真实反映待测样品的三维形态信息,因而在生物医学、工业检测、材料检测等领域中得到广泛应用。

人眼获得立体视觉效果[57]有三个必备条件:1)提供给左眼和右眼两路独立图像;2)所提供的两路图像 具有视差,包含一定的深度信息;3)两路图像可完全分离被左眼和右眼独立接收。在国内,体视显微镜的发 展初期,王良诚等^[8]提出了"连续变倍体视显微镜",指出传统体视显微镜是从两个略有差别的角度观看待测 样品,用双通道光路组成体视角为12°~15°的目镜组对同一场景下的物体同时采集两个通道的立体图像对 获取物体的景深信息,模拟人眼双目视差形成三维空间的立体视觉图像。传统体视显微镜成像原理简单但 双通道光路的使用不仅使系统笨重复杂,而且焦深和体视角不可自由调节,难以获得理想的观察效果。在国 外,基于空间光调制器的新型体视显微镜近年很受关注,2012 年 Hasler M 等[9-10] 将空间光调制器置于显微 物镜的后焦面,对待测样品经物镜成像后的光谱进行调制,使其成像在相机电荷耦合器件(CCD)的不同位 置,经后期复杂图像处理实现待测样品立体显微观看;2013 年 Lee M P 等^[11-12]提出将空间光调制器置于照 明光源处,通过对同一场景在不同角度照明实现体视显微成像的方法。新型体视显微镜克服了传统体视显 微镜系统笨重复杂的缺点,但是空间光调制器价格昂贵,本身的色散效应无法获得理想的彩色体视显微成像 效果,而且焦深和体视角不可自由调节以及不能实现对待测样品直接观看阻碍了新型体视显微镜的推广使 用。无论国内传统体视显微镜还是国外基于空间光调制器的新型体视显微镜,系统笨重复杂,成像效果不理 想,显微镜焦深和体视角不可自由调节都是无法解决的难题。近年来,很多学者采用可编程发光二极管 (LED)阵列或可编程液晶显示屏(LCD)面板作为显微镜照明光源[13-15],由于其能提供不同角度、不同波长、 不同图案的照明方式,有效地解决了现有显微镜依赖通过改变显微镜光学结构转换成像模式的弊端,不仅简 化了系统设计而且使显微镜系统的灵活性大大提升。

本文提出了基于可编程 LED 阵列照明的透射体视显微镜,不同于现有体视显微镜,使用可编程 LED 阵列作为照明双光源实现单通道体视显微成像,通过控制可编程 LED 阵列红蓝圆形光源的半径 r 和圆心间 距 d 分别实现对焦深和体视角的灵活可调。克服了传统体视显微镜系统笨重复杂、成像效果不理想的缺点,而且不需要使用空间光调制器和复杂的后期图像处理技术;用可编程 LED 阵列作为照明双光源,通过改变半径 r 和圆心间距 d 调整合适的焦深和体视角,实现对待测样品高质量的直接体视显微观看。

2 基于可编程 LED 阵列照明的透射体视显微镜

2.1 系统原理

基于可编程 LED 阵列照明的透射体视显微镜光学系统原理如图 1 所示,由可编程 LED 阵列、显微物 镜、镜筒透镜、彩色相机组成,按光学系统原理图搭建实验装置如图2所示。其中显微镜的主体框架使用奥 林巴斯 cx22,本显微镜用可编程 LED 阵列取代了原有的固定科勒照明结构,可编程 LED 阵列选用市面通 用的 P4 系列全彩色 LED 阵列,具体物理参数如表1 所示;将彩色相机置于镜筒透镜的后焦面处,彩色相机 型号为 The Imaging Source DMK 23U445,主要技术参数如表 2 所示。可编程 LED 阵列作为显微镜光学系 统的照明双光源,可提供不同角度、不同孔径、不同波长的照明光源如图3所示。它被安置在距待测样品 h=80 mm的位置,LED 阵列的中心灯位于显微系统光轴上(实验开始前,只点亮 LED 阵列的中心灯,通过 观察镜筒透镜调整 LED 阵列位置使中心灯正好位于视野中央,这时将 LED 阵列固定), l 表示 LED 灯间距 为4 mm,本实验选用的显微物镜数值孔径 NA=n • sinα=0.1,放大倍数是 4(其中 n 为空气折射率近似为 1,α 为显微物镜孔径角 2α 的半数)。若 β_{max} 表示光源最大照明角度那么 sin $\alpha = sin\beta_{max}$,由于明场成像主要靠 近轴区的直透光束通过显微物镜光阑成像,形成亮背景下的暗图像,所以要求照明孔径在显微物镜数值孔径 之内,经计算可知在某一特定方向显微物镜最多可透过5个 LED 灯,即图 3 中黄色虚线圆区域的光可透过 显微物镜。显微物镜和镜筒透镜组成无穷远校正光学显微系统,待测样品透过显微物镜的光线作为无限远 的平行光束进入镜筒透镜,由镜筒透镜进行成像。彩色相机 CCD 的成像面与显微物镜的相对位置满足齐焦 的要求,拍摄透过无穷远校正光学显微系统后的待测样品图像。它的成像过程为:将待测样品置于载物台, 控制可编程 LED 阵列使其显示半径为 r、圆心间距为 d 的两个圆形图案,其中一个为红色,一个为蓝色(针

对红蓝立体眼镜),当r=n时,直径方向上有(2n-1)个 LED 灯亮(当n=1,只有一个 LED 灯亮;当n≥2 时,光源便显示圆形光源)。可编程 LED 阵列的红蓝两束照明光透过待测样品后,经无穷远校正光学显微系 统成像,两束含有样品图像信息的光束同时入射到彩色相机 CCD 上,将彩色相机拍摄的图像输入计算机进 行显示,观察者佩戴红蓝立体眼镜观看计算机显示器即可实现直接体视显微观看待测样品立体图像。观察 者通过改变半径 r 和圆心间距 d 获取合适的焦深和体视角,从而得到最佳的观察效果。



图 1 光学系统原理图 Fig.1 Schematic diagram of optical system



图 2 实验装置图 Fig.2 Experimental installation

表 1 可编程 LED 阵列的参数

Table 1	Parameters	of	programmable	LED	array
---------	------------	----	--------------	-----	-------

Parameter	Value	
Wavelength /nm	Red 635, green 520, blue 475	
LED numbers	32×32	
Distance /mm	4	
Size of luminous surface $/\mu m$	150	
Brightness per LED $/(cd/m^2)$	2000	
Size /(mm×mm×mm)	$128 \times 128 \times 17$	
Weight of LED array /g	170	
Cone angle per LED /(°)	150	
Power supply /V	5	

	表 2	彩色相机	CCD	的参数
--	-----	------	-----	-----

Table 2 Parameters of color camera CCD

Parameter	Value	
Resolution /(pixel×pixel)	1280×960	
Sensitivity / lx	0.0015	
Assembly	Sony ICX445ALA	
Interface	USB	
Gain / dB	0~36	
Volume /mm	Height:29, width:29, length:43	
Weight $/g$	65	
Physical picture		

2.2 成像机理

基于可编程 LED 照明的透射体视显微镜成像机理是利用人眼立体视觉原理,彩色相机拍摄同一场景的 物体在红蓝两束不同角度光同时照明的图像,彩色相机拍摄的图像经红蓝镜片过滤,将同一场景有"视差"的 "两"幅图像分别送入人的左右眼,经大脑综合处理可区分物体的相对位置、深度层次关系。具体过程为:从 两个角度分别用频率、波长不同的红蓝光作为显微镜的照明光源对待测样品照明成像,两个圆形光源的半径 为r、圆心间距为 d,这种光源设置的目的是模拟形成人眼视差立体视觉,两个角度的照明光源相当于在显 微物镜傅里叶平面的两个位置成像。彩色相机拍摄的经显微物镜和镜筒透镜共同作用后待测样品的图像,



图 3 可编程 LED 阵列照明示意图

Fig.3 Schematic diagram of programmable LED array illumination

相当于将红蓝光源单独作用下有"视差"的两幅图像经过综合处理后形成一幅图像,即彩色相机拍摄的图像 实际是含有深度及"视差"信息的"两"幅图像。佩戴红蓝立体眼镜后,红色光源下彩色相机拍摄记录的图像 信息可以进入左眼,蓝色光源下彩色相机拍摄记录的图像信息可以进入右眼,相当于左右眼分别接收到有 "视差"的两幅图像,根据人眼立体视觉的形成原理,两幅含"视差"的图像经过大脑综合形成具有三维效果的 待测样品图像。

2.3 焦深和体视角的控制原理

基于可编程 LED 阵列照明的透射体视显微镜对焦深和体视角的控制原理如图 3 所示,通过控制可编程 LED 阵列产生红蓝两个圆形照明光源,假设红色圆的半径为r,圆心位于 A 点处;蓝色圆的半径为r,圆心位 于 B 点处;AB 的长度即为圆心之间的距离d,O 点为AB 的中点也是显微系统光轴与可编程 LED 阵列中心 灯的交点;OC 为可编程 LED 阵列与待测样品的距离即 h,其中 r 控制焦深和光强、d 控制体视角。通过改 变两个圆的半径 r 实现对照明数值孔径角 β 的控制:

$$\beta \approx \beta' = \arctan r/h$$
. (1)

照明数值孔径角 β 反比于焦深,通过控制 β 实现对焦深的控制。增大半径r, β 变大,焦深变小;减小半径r, β 变小,焦深变大。通过改变红蓝圆心间距d可实现对体视角的控制:

$$\varphi = \arctan d / (2h). \tag{2}$$

增大水平间隔 d,体视角变大;减小水平间距 d,体视角变小。

3 实验结果

3.1 使用数值孔径 NA = 0.1(4×)的显微物镜的实验结果

用果蝇翅膀和蚊子头部作为待测样品,在双光源不同半径r、不同圆心间距d下的实验结果如图4、图5 所示。r控制焦深和光强,当r=1时,焦深最大,但是由于照明光源比较弱,透过待测样品的光强极为有限, 待测样品中的一些"杂质"在相机成像时形成很大的衍射环,对成像质量影响很大。适当调整相机的曝光时 间,拍摄到的实验结果(a)~(c)均较暗,效果不理想,人眼无法观看到清晰的图像细节信息。当r=3或者更 大时,由于透过样品的光强较大,调整红蓝光源的间距后,透过样品的光束变化不大,拍摄到的图像所含待测 样品的景深信息很少,尽管图像清晰但佩戴红蓝立体眼镜后,图像层次感不强。d控制体视角即视差的大 小,d的变化应满足前述人眼获得立体视觉效果的条件,d太小立体效果不理想;d太大人眼无法形成立体 视觉。实验在r=2,d=3所获得的样品图像立体效果最佳,可清晰看到图4(e)中标号为1的果蝇翅膀明显 叠放于标号为2的翅膀下方,准确观察到两个翅膀的相对位置、层次信息;图5(e)中标号为2的蚊子触角叠

经上述实验讨论,使用数值孔径 NA=0.1(4×)的显微物镜,在最佳参数 r=2,d=3 时用不同待测样品 拍摄到的理想实验结果如图 6 所示。

图 6(a)用两个光学分辨力测试板叠放在一起作为待测样品,佩戴红蓝立体眼镜明显看到写有字母的光学分辨力测试板位于写有数字的光学分辨力测试板的上层,层次分布非常清楚,立体感很强;图 6(b)~(d)



图 4 果蝇翅膀在不同半径 r 和不同圆心间距 d 下的实验结果。(a) r=1, d=2; (b) r=1, d=3;
(c) r=1, d=4; (d) r=2, d=2; (e) r=2, d=3; (f) r=2, d=4; (g) r=3, d=2; (h) r=3, d=3; (i) r=3, d=4
Fig.4 Results of wings of drosophila with different r and d. (a) r=1, d=2; (b) r=1, d=3; (c) r=1, d=4; (d) r=2, d=2; (e) r=2, d=3; (f) r=2, d=4; (g) r=3, d=2; (h) r=3, d=3; (i) r=3, d=4



图 5 蚊子头部在不同半径 r 和不同圆心间距 d 下的实验结果。(a) r=1, d=2; (b) r=1, d=3;
(c) r=1, d=4; (d) r=2, d=2; (e) r=2, d=3; (f) r=2, d=4; (g) r=3, d=2; (h) r=3, d=3; (i) r=3, d=4
Fig.5 Results of head of mosquito with different r and d. (a) r=1, d=2; (b) r=1, d=3; (c) r=1, d=4; (d) r=2, d=2; (e) r=2, d=3; (f) r=2, d=4; (g) r=3, d=2; (h) r=3, d=3; (i) r=3, d=4



图 6 不同样品在最佳参数 r=2 和 d=3 下的实验结果。(a)光学分辨力测试板;(b)苍蝇口器;(c)蚂蚁头部;(d)南瓜厚茎切片 Fig. 6 Results of different samples with optimal parameters r=2 and d=3.

(a)Optical resolution test board; (b) mouth of flies; (c) head of ants; (d) stem of pumpkin

分别用苍蝇口器、蚂蚁头部、南瓜厚茎切片作为待测样品,佩戴红蓝立体眼镜可清晰观看到待测样品的各个 结构层次分布及相对位置等三维信息,立体效果很明显。

3.2 使用数值孔径 NA = 0.25(10×)的显微物镜的实验结果

当换用数值孔径 NA=0.25(10×)的显微物镜实验结果如图 7 所示,佩戴红蓝立体眼镜观察发现对于 相对位置和层次关系等三维信息,(a)图可以清晰反映出编号 1 的翅膀位于编号 2 翅膀的上层,(b)、(c)图像 质量太差,无法观看;(d)~(i)虽然图像清晰,但是样品的三维效果不明显。物镜数值孔径越大(放大倍数 越大),焦深越小,为了增大焦深,由(2)式可知应尽量缩小半径 r,当圆形光源半径太小时,透过物镜的光有 限,成像受外界干扰较大,成像质量太差;当圆形光源半径太大时,虽然图像相对清晰,但是高倍镜焦深本身 小,大半径光源的使用又减小了焦深,使得成像的三维效果很不明显。



图 7 果蝇翅膀在不同半径 r 和不同圆心间距 d 下的实验结果。(a) r=1,d=2;(b) r=1,d=3;(c) r=1,d=4;
(d) r=2,d=2;(e) r=2,d=3;(f) r=2,d=4;(g) r=3,d=2;(h) r=3,d=3;(i) r=3,d=4
Fig.7 Results of drosophila wings with different r and d. (a) r=1,d=2;(b) r=1,d=3;(c) r=1,d=4;(d) r=2,d=2;

(e) r=2, d=3; (f) r=2, d=4; (g) r=3, d=2; (h) r=3, d=3; (i) r=3, d=4

4 结 论

实验结果表明,选用数值孔径 NA =0.1(4×)的显微物镜,用不同观测物体作为待测样品做多组实验,r 控制焦深和光强、d 控制体视角,当 r=2,d=3 时观看待测样品的立体效果最理想,观察者可清晰看到待测 样品各部分的叠放次序、层次信息以及相对位置等三维形态信息。随着显微物镜数值孔径、放大倍数的增 大,由于受到显微物镜焦深以及透光减少等因素的影响,三维成像质量会变差。本显微镜与现有体视显微镜 相比,其显著优点在于使用可编程 LED 阵列作为照明双光源,简化了系统设计,不需要复杂的后期图像处理算 法,可实现对待测样品的直接观看;更重要的是赋予了显微镜照明孔径、照明角度以及不同波长照明光的灵活 选择,通过改变半径 r 和圆心间距 d 调整适合的焦深和体视角获得最佳的观察效果。如果想更加细致地调节 焦深和体视角,可选择数值孔径更大的显微物镜、增大待测样品与可编程 LED 阵列的距离 h 以及选用 LED 灯 更小或者灯间距更小的可编程 LED 阵列进行改进。基于可编程 LED 阵列照明的透射体视显微镜有望实现新 一代结构简单、成本低廉、成像质量高、可对待测样品直接观看、焦深和体视角灵活可调更人性化的体视显微镜,在未来的细胞生物学、材料学、纳米技术、医学诊断、生命科学等各领域应用上将展现巨大潜力。

参考文献

1 Wang Li, Jiang Hong, Sun Lili. Development of microscopy [J]. Science & Technology Information, 2009, (11): 117-118.

王 莉,蒋 洪,孙丽丽.显微镜的发展综述[J].科技信息,2009,(11):117-118.

- 2 Wu Liru, Tang Zhelie, Wu Yongbo, et al. Application of spatial differential confocal microscopy in obtaining edge enhanced microscopic images [J]. Acta Optica Sinica, 2014, 34(3): 0317001.
- 吴丽如, 唐志列, 吴永波, 等. 应用共焦空间微分显微镜获取边缘增强显微图像[J]. 光学学报, 2014, 34(3): 0317001.

3 Li Yong, Mao Lei, Zhang Haijun, et al. Fast phase unwrapping based on nonlinear look-up table in digital holographic microscopy[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(2): 0209025.

李 勇,毛 磊,章海军,等.数字全息显微镜中采用非线性查找表的相位快速展开[J].中国激光,2014,41(2): 0209025.

4 Dai Zhihua, Xu Yuping, Bu Jing, et al.. Light field microscope to achieve three-dimensional real-time naked-eye display [J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(10): 1022005.
戴志华,徐于萍,步 敬,等. 光场显微镜实现裸眼三维实时显示[J]. 光学学报, 2012, 32(10): 1022005.

- ⁵ Zhai Yi, Wang Zhaoqi, Wang Yan, *et al.*. Impact of chromatic and higher-order aberrations of human eyes on vision based on special eye models[J]. Acta Optica Sinica, 2014, 34(11): 1133001.
 濯 奕, 王肇圻, 王 雁, 等. 用特殊眼模型研究人眼像差与色差对视觉的影响[J]. 光学学报, 2014, 34(11): 1133001.
- 6 Zhang Zhaoyang, An Ping, Zhang Zhijiang, et al.. 2D and 3D video processing and display technology [M]. Beijing: Science Press, 2010: 198-199.

张兆杨,安 平,张之江,等.二维和三维视频处理及立体显示技术[M].北京:科学出版社,2010:198-199.

7 Zhang Xuping, Wang Jiaqi, Zhang Yixin, et al.. Large-scale three-dimensional stereo vision geometric measurement system[J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(3): 0315002.

张旭苹, 汪家其, 张益昕, 等. 大尺度三维几何尺寸立体视觉测量系统实现[J]. 光学学报, 2012, 32(3): 0315002.

8 Wang Liangcheng, Zhao Jianwen, Zhao Jing. Design and performance extension of continuous zoom stereo microscope[J]. Optical Instruments, 1996, 18(1): 6-12.

王良诚,赵建文,赵 晶.连续变倍体视显微镜的设计及性能扩展[J].光学仪器,1996,18(1):6-12.

- 9 Hasler M, Haist T, Osten W. Stereo vision in spatial-light-modulator-based microscopy [J]. Opt Lett, 2012, 37(12): 2238-2240.
- 10 Hasler M, Haist T, Osten W. SLM-based microscopy[C]. SPIE, 2012, 8430: 84300V.
- 11 Lee M P, Gibson G M, Bowman R, et al. A multi-modal stereo microscope based on a spatial light modulator[J]. Opt Express, 2013, 21(14): 16541-16551.
- 12 Lee M P, Gibson G, Tassieri M, et al.. Spatial light modulation for improved microscope stereo vision and 3D tracking [C]. SPIE, 2013, 8810: 881022.
- 13 Chao Zuo, Jiasong Sun, Shijie Feng, et al.. Programmable colored illumination microscopy (PCIM): A practical and flexible optical staining approach for microscopic contrast enhancement [J]. Opt Laser Eng, 2016, 78:35-47.
- 14 Chao Zuo, Jiasong Sun, Jialin Zhang, et al.. Lensless phase microscopy and diffraction tomography with multi-angle and multi-wavelength illuminations using a LED matrix[J]. Opt Express, 2015, 23(11):14314-14328.
- 15 Zhang Zhigang. Study of RGB LED-based color temperature tunable microscope light source [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014: 11-15.

张志刚. 基于 RGB 三基色 LED 的可调色温显微镜光源研究[D]. 杭州:浙江大学, 2014: 11-15.