

基于可编程 LCD 的莱茵伯格照明显微原理与系统设计

林 飞^{1,2} 张闻文² 范 瑶^{1,2} 左 超^{1,2*} 陈 钱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 莱茵伯格照明是显微成像中光学染色的一种方式, 照明光源通过特殊的滤色片使样品与背景产生色差, 有效提高无色透明样品的对比度。基于可编程液晶显示器(LCD)的莱茵伯格照明显微系统将传统显微镜中聚光镜光阑替换成低成本的薄膜晶体管液晶显示器只需改变其照明图案, 就能够实现明场、暗场、相位差、倾斜成像以及莱茵伯格照明等多种显微成像功能。并且由于 LCD 面板的颜色与光强灵活可调, 系统可以衍生出彩虹暗场、彩虹相差等全新的光学染色方法。采用该系统对未染色的肺癌细胞、纺织纤维、小鼠肾脏切片等无色透明样品进行显微观察, 验证了系统的多样性与可靠性。

关键词 显微; 莱茵伯格照明; 可编程液晶显示器; 光学系统

中图分类号 TH742 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201636.0818002

Theory and Systematic Design of Rheinberg Illumination Microscopy Based on Programmable LCD

Lin Fei^{1,2} Zhang Wenwen² Fan Yao^{1,2} Zuo Chao^{1,2} Chen Qian²

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

²Jiangsu Province 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 Rheinberg illumination is an optical staining technique for microscopic imaging. The light passing through special filters provides chromatism between the specimen and background, which improves the contrast of colorless and transparent samples effectively. Rheinberg illumination microscopy based on programmable liquid crystal display (LCD) replaces the condenser diaphragm of conventional microscope with low-cost thin film transistor liquid crystal display. By displaying different patterns, numerous microscopy imaging modalities, such as bright field, dark field, phase contrast, oblique illumination and Rheinberg illuminations can be realized. Furthermore, because it is easy to modulate both the color and the intensity of the LCD panel, the system derives completely new methods for optical staining, such as iridescent dark-field and iridescent phase-contrast imaging. The versatility and effectiveness of the system are demonstrated by microexamination of several transparent colorless specimens, such as unstained lung cancer cells, textile fibers, and slice of mouse kidney.

Key words microscopy; Rheinberg illumination; programmable liquid crystal display; optical system

OCIS codes 180.5810; 110.0180; 110.2945; 230.3720

1 引 言

细胞作为有机体构成和生命活动的基本单位, 其结构的准确、清晰、定量重现一直以来都对生物医学和

收稿日期: 2016-03-16; **收到修改稿日期:** 2016-04-22

基金项目: 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(BRA2015294)、江苏省光谱成像智能感知重点实验室开放基金项目(3092014012200417)

作者简介: 林 飞(1992—), 男, 硕士研究生, 主要从事显微成像方面的研究。E-mail: 804685005@qq.com

导师简介: 张闻文(1981—), 女, 博士, 副教授, 主要从事光电探测与图像处理方面的研究。E-mail: zhangww@njust.edu.cn

* **通信联系人.** E-mail: surpasszuo@163.com

生命科学界的研究起着至关重要的作用。然而由于大部分生物细胞在可见光波段的吸收性较弱(无色透明),采用传统明场光学显微技术难以实现细胞的清晰成像。对此,采用化学染色以及荧光染色等侵入手段使其在镜下可见的技术在现代医学检测中得到广泛运用。近年来随着荧光蛋白技术的发展和进步,荧光显微镜得到显著发展,不同的荧光蛋白可以标记生物组织的不同部位从而实现特异性成像;另一方面,为了保证细胞的活性与功能,相差显微镜、暗场显微镜、微干涉显微镜等一系列增强对比度的无标记显微成像技术也在光学显微镜的发展过程中相继出现,它们在各领域中起着不可或缺的作用,但是都需要在照明光路中添加额外的物理遮片以及光学滤片进行空间光调制。例如,暗场显微镜需要在聚光镜中插入圆形遮片从而产生中空的圆锥形照明,而泽尼克相差显微镜需要带有环形光阑的聚光镜使其形成的像与相板共轭面完全吻合^[1]。然而与化学以及荧光染色相比,这些方式只能产生灰度图像,样品结构与背景色之间很难形成鲜明的对比。直至 1896 年,英国皇家显微学会的显微镜师 Juliet Rheinberg 提出的莱茵伯格光学染色照明结合了明场照明与暗场照明,将暗场的物理遮片改为有色滤片从而使样品与背景“染”上丰富的颜色^[2]。尽管以上这些方法可以使细胞以及其他无色透明样品无需染色便可直接观察,但依然普遍存在一些局限性:1) 显微成像模式的切换往往需要更换物理遮片、光学滤色片等一系列光学器件;2) 莱茵伯格光学滤色片的制备过程复杂,不同放大倍率的物镜都需要匹配不同半径的光学滤片,并且不同的样品所适用的颜色组合也各不相同,极大地增加了使用成本;3) 滤片颜色的不可调性使莱茵伯格光学显微无法线性调节,难以将样品与背景色的对比度调至最佳。这些问题严重影响上述显微镜的普及,尤其是莱茵伯格光学照明,至今仍未有相应的商业化产品。

如今,发光二极管(LED)照明以及数字成像技术的进步,使得显微镜照明系统的数字化控制成为可能。起初,部分学者在照明光路中放置高分辨率空间光调制器,从而实现复杂的甚至动态可切换的照明模式而不需要任何物理切换过程,但专业的空间光调制器复杂昂贵,这种方式也逐渐消失^[3-8]。之后,人们将控制照明光源的聚光器换成可编程 LED,这些基于可编程 LED 的无聚光器系统能够提供简单、低成本的多模式成像,但是很大程度上降低了光采集效率^[9-14]。2015 年,Guo K K 等^[15-17]提出采用低成本液晶显示器(LCD)实现可编程照明,此方法成本低廉、光采集效率高,并且能够方便地嵌入到大多数标准的明场显微镜中,但是系统中的扭曲向列液晶显示器只能提供二进制灰度图像,而不能实现复杂的高对比度的彩色图像,例如莱茵伯格照明。

对此,本文采用薄膜晶体管液晶显示器(TFT-LCD)作为空间光调制器,设计出一套莱茵伯格彩色显微成像系统,将非晶硅薄膜晶体管液晶显示器置于聚光透镜的后焦平面,通过软件系统设置 LCD 不同的显示模式,可以将普通的卤素灯光源调制成现有的多种显微成像以及莱茵伯格显微成像所需的光源,不仅如此,还能拓展新型的增强对比度的光学染色模式,例如彩虹暗场、彩虹相差等,实现了普通科勒式照明显微镜的多功能扩展以及智能化操作,操作简便并且成本低廉。

2 系统介绍与调试

2.1 系统介绍

实验样机采用的是低端的奥林巴斯 CX22 型显微镜。图 1 展示的是莱茵伯格彩色照明系统的光学结构以及样机全图。奥林巴斯 CX22 显微镜由带有孔径光阑的聚光镜、物镜、筒镜组成,内置卤素灯发出的光经

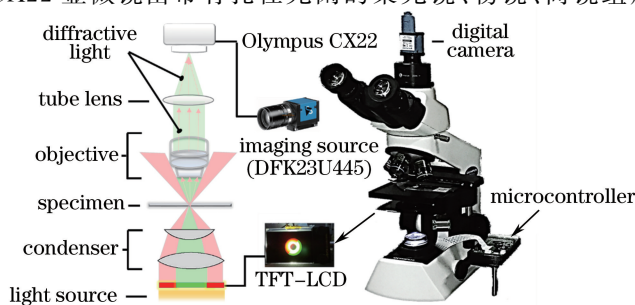


图 1 基于可编程 LCD 的莱茵伯格照明系统全图

Fig. 1 Programmable LCD-based Rheinberg illumination microscopy system

过色温转换过滤器产生白平衡照明。系统图像采集使用的是工业相机 Imaging Source(DFK 23U445,分辨率 $1280 \text{ pixel} \times 960 \text{ pixel}$, $3.75 \mu\text{m}/\text{pixel}$),核心器件 TFT-LCD 由微处理单元 RTD2660 控制,扫描频率 60 Hz ,对比度 $412:1$,最高分辨率为 800×480 ,支持 VGA/AV 两种输入。完整的液晶显示屏包括彩色滤光板以及背光板,本系统移除背光板,仅使用彩色 TFT-LCD 作为低成本的空间光滤波器,替换原显微镜中聚光镜下的孔径光阑。软件系统则采用基于 MFC 的操作程序,其集 LCD 照明控制、图像采集、图像优化于一体(如图 2 所示)。

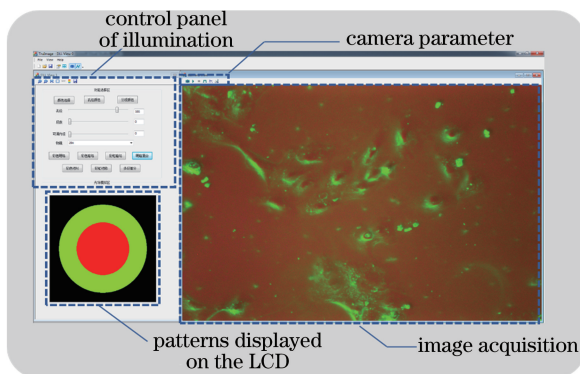


图 2 软件界面

Fig. 2 Software interface

2.2 调试

系统安装完毕后,首先需要调整照明光轴位于显微镜物镜中心,因此在光路中添加 1 个伯特兰透镜组成校准系统,该透镜是把物体所有造成的初级相放大为次级相的辅助透镜,能够将 LCD 的照明图案准确地投影在物镜的后焦面上。在调试过程中,采用的是 20 倍的相差物镜(Olympus, LUCPLanFLN $20\times$, $NA_{\text{obj}} = 0.45$),利用其相差环作为标志,当 LCD 照明图案圆心与相差环圆心完全契合时即可确认照明光轴位于物镜的中央。图 3 显示调试的整个过程,通过软件逐渐调整图像的坐标直至照明中心移至相位环的中心,此时系统校准完毕如图 3(c)所示。

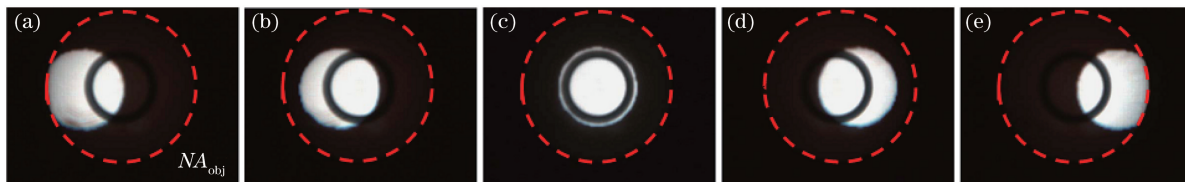


图 3 系统调整过程中后焦面图像。(a)、(b)、(d)、(e) 水平偏移; (c) 校准完毕

Fig. 3 Back focal plane images when system is being regulated.

(a), (b), (d), (e) Horizontally displaced; (c) optimally aligned

3 实 验

3.1 传统多模式显微成像

首先,将 LCD 颜色设置为普通的白色,调节 LCD 的照明图案便可实现多种传统的显微方式,例如明场、暗场、相差、倾斜照明等。系统采用 20 倍长焦距的半消色差相衬物镜,测试样品为未染色的癌细胞 LC-06。明场成像可以直接在 LCD 上显示简单的圆形得到,光路图如图 4 所示。图 5 展示的是不同照明半径的图像结果(其中 NA_{ill} 是照明孔径、 NA_{obj} 是数值孔径,插图(d)、(e)、(f)表示对应 LCD 屏上的照明图案,红色虚线表示物镜的数值孔径):(a)为小半径照明,其图像的分辨率低,对比度高;(b)、(c)逐渐增加半径,它们的分辨率也随之逐渐提高并且景深减小,该过程类似于打开传统显微镜中聚光镜的孔径光阑,此调节过程不需要任何机械调整,全部由软件操控。不过由于未染色细胞在明场照明下吸收的光很少,所以采集的图像对比度低,难以进行观察。

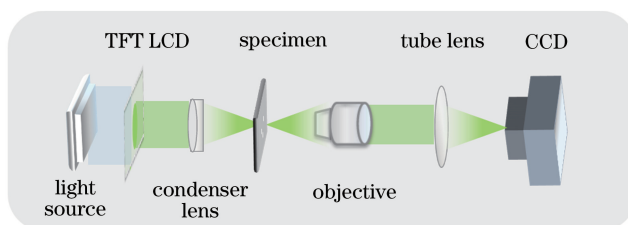


图 4 明场光路图

Fig. 4 Schematic illustration of bright field

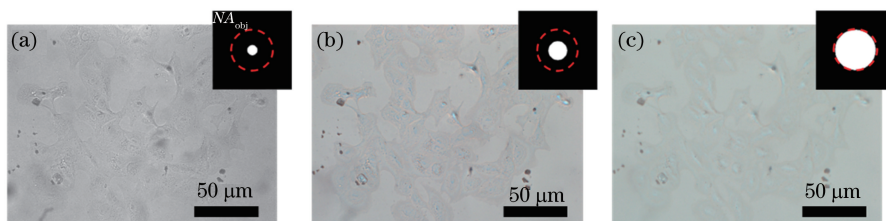


图 5 不同照明孔径下未染色肺癌细胞的明场图像。(a) $NA_{\text{ill}}=0.2 NA_{\text{obj}}$; (b) $NA_{\text{ill}}=0.5 NA_{\text{obj}}$; (c) $NA_{\text{ill}}=NA_{\text{obj}}$;
(d)~(f) 对应(a)~(c)的 LED 屏照明图案

Fig. 5 Bright-field imaging of unstained lung cancer cells with different illumination apertures. (a) $NA_{\text{ill}}=0.2 NA_{\text{obj}}$;
(b) $NA_{\text{ill}}=0.5 NA_{\text{obj}}$; (c) $NA_{\text{ill}}=NA_{\text{obj}}$; (d)-(f) illumination pattern of LED screen corresponding to (a)-(c)

将中央的圆形设置成黑色,并在数值孔径外围添加照明光环,系统便可切换至暗场显微模式。其阻挡零阶的照明光束直接进入物镜,使样品仅由衍射光照明,从而得到暗背景下的亮图像,此时 LCD 相当于传统暗场显微镜中聚光镜下的挡光薄膜。为了防止少部分直射光溢出进入物镜,暗场中心的黑色区域半径需要略大于物镜的数值孔径。暗场显微图像如图 6(b)所示,图片的对比度明显得到加强,尤其是高空间频率结构的图像信息被“点亮”。暗背景的明暗系数取决于 TFT-LCD 的对比度,本系统使用的 LCD 对比度为 412:1,这已能够提供足够的暗背景。但为了进一步删除多余的背景光,软件系统在暗场显微调节完毕后会迅速采集 LCD 纯黑模式下的图像信息作为“图像噪声”,并将之后采集到的暗场图像减去该“图像噪声”便可去除多余直射光对图像的影响。

泽尼克相差显微利用光的衍射以及干涉现象将相位信息转化为幅度信息从而观察未染色的透明样品。在传统的相差显微镜中,照明光通过具有环状光阑的聚光器以及后端物镜中相差环成像,相差环的大小由物镜的分辨率决定,因此不同倍率的物镜需要分别匹配不同大小的环形光阑。但在本系统中,仅需调整 LCD 面板上不同半径的环形图案与物镜中的环形相位板相匹配,这样不需要任何环形光阑就能够实现相差显微成像,并且对于不同倍率的物镜只需通过软件一键切换。相差显微主要用来观察类似细胞的相位样品,图像结果能够定性反应样品的折射率以及微观结构的厚度,但不能呈现三维效果,并且周围有典型的光晕现象影响观察,如图 6(c)所示。

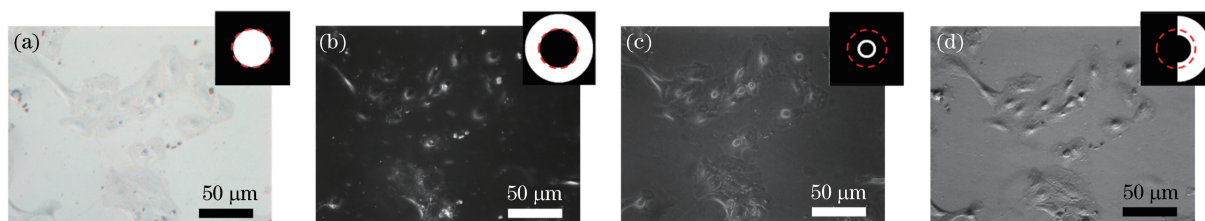


图 6 未染色肺癌细胞多种对比增强图。(a) 普通明场(对比组); (b) 暗场; (c) 泽尼克相位差; (d) 倾斜照明
Fig. 6 Contrast-enhancement imaging of unstained lung cancer cell. (a) Bright field (comparative group);
(b) dark field; (c) Zernike phase difference; (d) oblique illumination

另一种增强对比度的方法叫做倾斜照明,使用不对称的照明产生高对比度具有伪浮雕效果的图像,能够在视觉上增强样品的对比度。如图 6(d)所示,利用离轴的照明图案产生倾斜照明,对于细胞这样的相位样

品,图像结果光强分布可以大致地对应照明方向上的光程差梯度。并且利用系统的可调节性,还可以随意旋转方向以便观察样品不同方向的结构信息。相比于现有的显微镜系统,本系统成本低廉,无需一系列暗场遮片、环状光阑等纷繁复杂的光学器件,并且成像模式、物镜倍率的切换无需更换光学器件以及重校准,仅需要通过配套的软件进行控制,功能多样,可以实现一键切换。

3.2 莱茵伯格光学染色

不仅仅是灰度图像,TFT-LCD 中的红、绿、蓝彩色滤光板能够调整透过像素的色彩及光强,因此实现高对比度的彩色光学照明。莱茵伯格显微成像是经典的光学染色成像,可以视为明场与暗场的结合体,中心的圆锥形光束以及外面的空心圆锥形光束同时产生照明图像。光学染色中央的彩色滤片代替暗场显微镜不透明的挡光薄膜产生背景颜色,而具有高频空间结构的样品则被外环的散射光照亮,两者形成鲜明的对比。如图 7(a)所示,采用中心圆为蓝色、外环为黄色的莱茵伯格照明模式,透过蓝色滤片的直射光产生背景色,样品的轮廓与具体细节被外环的黄色散射光照亮,形成蓝背景上的黄色图像。相似的,绿色外环配合红色的内圆,细胞样品就会产生红色背景的绿色图像,如图 7(b)所示。图 7 插图中红色虚线表示物镜的数值孔径。

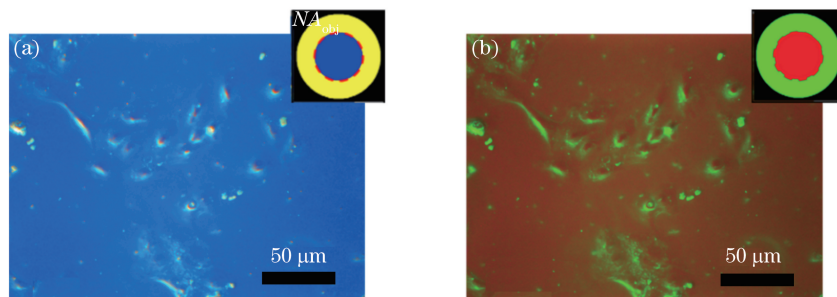


图 7 莱茵伯格照明下未染色肺癌细胞。(a) 蓝-黄莱茵伯格照明;(b) 红-绿莱茵伯格照明

Fig. 7 Imaging of unstained lung cancer cell with Rheinberg illumination. (a) Rheinberg illumination (blue-yellow); (b) Rheinberg illumination (red-green)

采用莱茵伯格彩色照明时,外环照明类似于暗场属于衍射光成像,光强较低。若中心圆区域透射率过高,直射光的光强远大于衍射光,图中样品信息会被背景噪声淹没,因此莱茵伯格滤色片中心透射率需要远低于外环区域。为了保证样品颜色与背景色达到最好的平衡,可以控制颜色不变,逐渐衰减中央滤波器的透射率,调整图像直到获得最佳对比度,如图 8 所示。

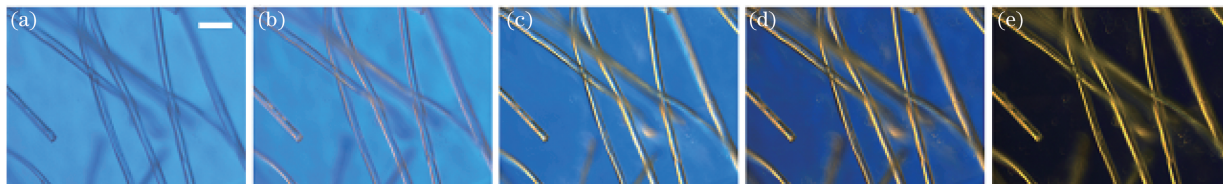


图 8 纤维组织对比增强图。(a) 蓝色明场;(b) 明场主导莱茵伯格照明;(c) 平衡的莱茵伯格照明;(d) 暗场主导莱茵伯格照明;(e) 黄色暗场

Fig. 8 Contrast-enhancement imaging of textile fibers. (a) Blue bright field; (b) bright field dominated Rheinberg illumination; (c) equalized Rheinberg illumination; (d) dark field dominated Rheinberg illumination; (e) yellow dark field

传统的莱茵伯格照明限于制作工艺,只包含 2 种或者少数颜色的彩色滤色片。然而可编程 LCD 面板能够控制每一个像素的颜色,所以能够衍生出新型的提高对比度的照明方式。首先是彩虹暗场成像,类似于传统的暗场成像,样品由中空的光锥照明,不同的是传统的暗场光环由色轮代替,光谱带从红色到紫色。传统的暗场照明是各向同性照明,而在彩虹暗场中,互补的颜色分别位于色环的对面,使暗场成像变成各向异性的增强色彩对比度的方式。不同于普通的暗场成像,不对称的彩色照明可产生阴影以及突出的伪三维形貌。图 9(c)为老鼠肾脏切片的彩色伪三维图像,图中样品的结构尤其是大脑皮层的远端小管和组织皱褶都呈现出一定的厚度,并且结构中不同的方向被染上了鲜明对比的色彩,例如肾小球囊一边呈现黄色而另一边是红色,对比色的方向可以通过改变色轮的方向来调整,从而获得最好的效果。同样地,另一种彩虹相差成

像将环形光阑改成同样大小的色轮,使传统的相差显微成像变成各向异性的对比度增强方式,彩虹相差成像能够产生色彩鲜艳华丽的图像,但依旧受光晕现象的影响,使样品结构尤其是轮廓模糊不清,如图 9(d)所示。因此,彩虹暗场显微更加适用于厚样片的实验观察,例如 $4\ \mu\text{m}$ 左右的老鼠的肾脏切片也能呈现清晰的图像结果,而彩虹相差经检测只适用于低于 $1\ \mu\text{m}$ 相对较薄的样品。

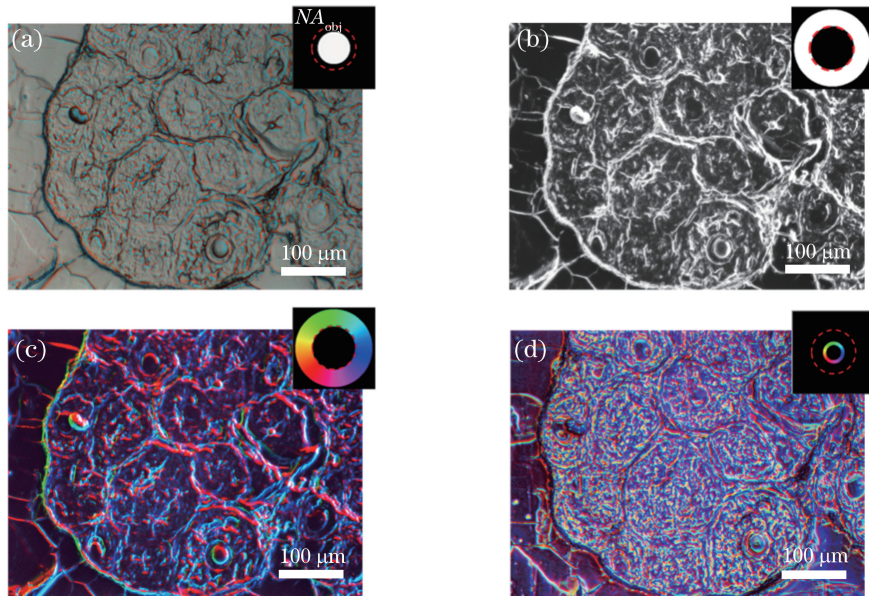


图 9 未染色小鼠肾脏切片高对比图。(a) 明场; (b) 暗场; (c) 彩虹暗场; (d) 彩虹相位差

Fig. 9 Contrast-enhancement imaging of unstained slice of mouse kidney.

(a) Bright field; (b) dark field; (c) iridescent dark field; (d) iridescent phase difference

4 结 论

设计出一套基于可编程 LCD 的莱茵伯格显微成像系统,在普通生物显微镜、聚光镜的后焦面添加低成本的 TFT-LCD 作为空间光调制器,通过配套的软件系统改变 LCD 的图像模式实现明场、暗场、相差、倾斜照明、莱茵伯格照明等多种成像模式,无需复杂的配件更换以及系统重校准等复杂的物理过程,一键切换。不仅如此,利用 LCD 颜色以及光强的灵活可调能够实现新型的光学染色成像模式比如彩虹暗场、彩虹相差等。该系统功能齐全,集照明模式切换、参数调整、图像采集于一体,并且可移植性强,对于大部分采用科勒照明的显微镜都能够进行简单快速的改装。但该系统的一个局限在于 LCD 屏幕的低透射率,经测量其透射率约为 17%,大部分光强被液晶面板吸收转化为热量。但基于 LCD 的照明系统相对光采集效率仍远高于基于 LED 的设计方案,并且随着显示技术的快速发展,LCD 的透射率和对对比度也会改善,这个缺陷也必定会逐渐弥补。

参 考 文 献

- 1 Mertz J. Introduction to optical microscopy[M]. Boston: Roberts and Company Publishers, 2010.
- 2 Rheinberg J. On an addition to the methods of microscopical research, by a new way optically producing color-contrast between an object and its background, or between definite parts of the object itself[J]. J R Microsc Soc, 1896, 16(4): 373-388.
- 3 Samson E C, Blanca C M. Dynamic contrast enhancement in widefield microscopy using projector-generated illumination patterns[J]. New J Phys, 2007, 9(10): 363.
- 4 Warber M, Zwick S, Hasler M, *et al.* SLM-based phase-contrast filtering for single and multiple image acquisition[J]. SPIE, 2009, 7442: 74420E.
- 5 Maurer C, Jesacher A, Bernet S, *et al.* What spatial light modulators can do for optical microscopy[J]. Laser & Photon Rev, 2011, 5(1): 81-101.

- 6 Steiger R, Bernet S, Ritsch Marte M. SLM-based off-axis Fourier filtering in microscopy with white light illumination [J]. *Opt Express*, 2012, 20(14): 15377-15384.
- 7 Du Yanli, Ma Fengying, Gong Qiaoxia, *et al.* Optical microscopic imaging technology based on spatial light modulator [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2014, 51(2): 020002.
杜艳丽, 马凤英, 弓巧侠, 等. 基于空间光调制器的光学显微成像技术 [J]. *激光与光电子学进展*, 2014, 51(2): 020002.
- 8 Shi Xia, Zhu Wufeng, Yuan Bin, *et al.* Experimental study of the incoherent digital holography [J]. *Chinese J Lasers*, 2015, 42(12): 1209003.
石 侠, 朱五凤, 袁 斌, 等. 非相干光照明数字全息实验研究 [J]. *中国激光*, 2015, 42(12): 1209003.
- 9 Zheng G, Kolner C, Yang C. Microscopy refocusing and dark-field imaging by using a simple LED array [J]. *Opt Lett*, 2011, 36(20): 3987-3989.
- 10 Liu Z, Tian L, Liu S, *et al.* Real-time brightfield, darkfield, and phase contrast imaging in a light-emitting diode array microscope [J]. *J Biomed Opt*, 2014, 19(10): 106002.
- 11 Webb K F. Condenser-free contrast methods for transmitted-light microscopy [J]. *J Microsc*, 2015, 257(1): 8-22.
- 12 Xu Chao, Gao Shumei, Su Zhouping, *et al.* A new optical design method of uniform illumination based on extended LED source [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2014, 51(2): 022203.
徐 超, 高淑梅, 苏宙平, 等. 一种基于 LED 扩展光源的均匀照明设计新方法 [J]. *激光与光电子学进展*, 2014, 51(2): 022203.
- 13 Hao Jian, Jing Lei, Wang Yao, *et al.* Design of uniform illumination for array LED [J]. *Acta Optica Sinica*, 2015, 35(10): 1022003.
郝 剑, 荆 雷, 王 尧, 等. 阵列型紫外 LED 匀光照明系统设计 [J]. *光学学报*, 2015, 35(10): 1022003.
- 14 Zuo C, Sun J, Zhang J, *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 Guo K K, Bian Z C, Dong S Y, *et al.* Microscopy illumination engineering using a low-cost liquid crystal display [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(2): 574-579.
- 16 Zuo C, Sun J S, Feng S J, *et al.* Programmable colored illumination microscopy (PCIM): A practical and flexible optical staining approach for microscopic contrast enhancement [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2016, 78(2): 35-47.
- 17 Zuo C, Sun J S, Feng S J, *et al.* Programmable aperture microscopy: A computational method for multi-modal phase contrast and light field imaging [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2016, 80: 24-31.