

基于倾斜摄像头的显微自动对焦方法

叶一青¹, 易定容^{1*}, 张勇贞¹, 孔令华², 蒋威¹

¹ 华侨大学机电及自动化学院, 福建 厦门 361021;

² 福建工程学院机械与汽车工程学院, 福建 福州 350118

摘要 针对已有显微自动对焦方法存在的不足,提出了一种通过倾斜安装摄像头所采集图像的清晰聚焦带偏离视场中心的距离和方向来探测样本离焦量及离焦方向的方法,并搭建了一套显微自动对焦系统对该方法进行可行性验证。结果表明:该方法可以通过检测样本单帧倾斜面图像聚焦带偏离视场中心的水平偏移量,并根据标定好的离焦量-聚焦带偏移量曲线,快速获取离焦量及离焦方向,配以电机驱动可实现自动对焦。该方法的光学结构简单,可直接在常规三目显微成像系统中使用,因此可应用于各领域在线、在位大视场高分辨检测所需要的自动对焦过程。

关键词 显微; 自动对焦; 倾斜摄像头; 图像处理

中图分类号 TH742

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.1218001

Microscopy Autofocus Method Using Tilt Camera

Ye Yiqing¹, Yi Dingrong^{1*}, Zhang Yongzhen¹, Kong Linghua², Jiang Wei¹

¹ College of Mechanical Engineering and Automation, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China;

² School of Mechanical and Automotive Engineering, Fujian University of Technology, Fuzhou, Fujian 350118, China

Abstract To overcome the disadvantages of the existing microscopy autofocus technology, this study proposes a method for detecting the defocusing distance and orientation of a sample according to the distance and direction from the center of the field of view (FOV) of the focusing band in a tilt plane image, which is acquired using a tilt camera. The feasibility of this method is verified by constructing an experimental microscope autofocus system. Results show that this system can quickly obtain a defocusing distance and orientation by detecting the amount of horizontal shift from the center of FOV of the focusing band in a single-frame tilt plane image, which can be determined according to a calibration curve between the defocusing distance and focusing band's horizontal-shift value. Autofocus can then be achieved in applications using motor drive. The optical structure presented herein is simple and cost-effective. It can be directly used in a conventional, trinocular microscope-imaging system and can thus be applied to the autofocus process required in online, *in situ*, large FOV, and high-resolution detection in various fields.

Key words microscopy; autofocus; tilt camera; image processing

OCIS codes 180.4243; 120.4640; 100.2960

1 引 言

现代光电检测、医学病理诊断、生物工程研究等的蓬勃发展对先进显微成像技术提出了快速响应、高分辨率、高精度等要求。针对传统光学显微镜依靠手动调焦、人为判断、自动化程度低等问题,众多学者提出了基于不同原理的显微自动对焦系统^[1-3]。

显微自动对焦方法的核心为离焦量测量。根据

是否采用额外硬件,常用的离焦量测量方法可分为主动式对焦和被动式对焦。被动式对焦直接根据成像结果进行调焦,它又可分为对焦深度法和离焦深度法^[4]。对焦深度法主要采用图像清晰度评价函数对焦面搜索过程中的每一帧图像进行评价,通过图像清晰度评价曲线的最大值来获取焦面位置。Redondo 等^[5]、李雪等^[6]分别对 16 种适用于显微成像系统的图像清晰度评价函数进行了仿真与对比,

收稿日期: 2019-05-31; 修回日期: 2019-08-09; 录用日期: 2019-09-02

基金项目: 国家自然科学基金(51775200)、华侨大学研究生科研创新基金

* E-mail: yidr@hqu.edu.cn

分析了不同函数算法在不同条件下的性能表现与特点。研究表明,大多数算法只能在某些特定的情况下才有较好的效果。Zhang 等^[7]发现,与传统的对焦深度法相比,将对焦深度法和离焦深度法相结合的方法在一定程度上提高了自动对焦的速度,但仍需复杂的焦面搜索算法。被动式对焦的焦面搜索效率较低,限制了其在大视场高分辨率测量时所需要的子孔径扫描中的应用。主动式对焦通过外部辅助设备对离焦量和离焦方向的检测。范富明等^[8]、张小波等^[9]采用激光三角法对薄膜晶体管液晶显示面板进行了在线检测,该方法通过分析半圆光斑半径大小及成像方向来分别获取离焦量及离焦方向。在使用 $50\times$ 物镜的条件下,寻焦范围达到了 $\pm 30\ \mu\text{m}$,对焦时间小于 $0.3\ \text{s}$ 。但该光路结构中拦光板的位置安装精度要求较高,且该方法对测量样本也有一定要求,样本的反射率会导致光斑鬼影的产生。Lee 等^[10]在成像光路中设置了两片精密螺旋光栅,进而提出了一种基于叠栅效应的显微自动对焦系统,通过对离焦情况下叠栅图案进行分析,建立了离焦量与叠栅图案偏转角度的关系,在 $100\ \mu\text{m}$ 的测量范围内,系统能在 $0.1\ \text{s}$ 内完成聚焦。但该方法同样存在光路结构复杂,光栅安装精度要求较高等问题。毛新越等^[11]基于差动原理,在像面焦前-焦后等距位置设置一对光电倍增管,获得了双光路信号,然后将两路信号曲线相减得到具有过零特性的差动曲线,过零点对应显微成像系统的聚焦位置。杨宇等^[12]使用光电位置传感器(PSD)进行了快速全貌扫描,该方法的输入输出线性度不佳,需要用软件进行校准。Cao 等^[13]提出了 PSD 与单缝掩模相结合的方法,根据 PSD 检测到的狭缝图像位置确定焦面,测量范围能达到 $\pm 2\ \text{mm}$,检测误差为 $\pm 15\ \mu\text{m}$ 。蒋章伟等^[14]通过双色激光辅助对焦方法扩大寻焦范围,实现了 $2400\ \mu\text{m}$ 的对焦范围和 $20\ \mu\text{m}$ 的对焦精度,之后结合图像灰度标准差函数进行精密寻焦。近年来,众多学者将电压调焦液体透镜应用于自动对焦系统中,从而,样本可以在无轴向机械运动的情况下完成对焦,但仍需结合图像处理算法或象限光电二极管进行离焦量的计算^[15-16]。

为了实现更加有效可行的显微快速自动对焦,本文提出了一种基于倾斜摄像头对焦原理的显微自动对焦方法。该方法的光路结构简单,可以在已有的三目显微镜上添加一个倾斜安装的简易摄像头作为离焦量和离焦方向检测的辅助设备,通过分析单帧倾斜摄像头图像清晰聚焦带离开视场中心的距离

和方向,并结合预先标定的曲线,就可以快速获得离焦量及离焦方向,实现自动对焦。

2 基于倾斜摄像头的对焦原理

基于倾斜摄像头的显微自动对焦系统原理如图 1 所示。其中,正置摄像头(UC)用于获取像焦平面 P_f 处的样本图像信息,以实现样本的实时观测。倾斜摄像头(TC)用于获取倾斜成像面 P_t 上的倾斜面图像信息,进而获得样本的离焦量及离焦方向。其中,倾斜成像面 P_t 与像焦平面 P_f 所成夹角为 θ 。像方离焦量 ΔZ_i 与倾斜面图像的关系如图 2 所示。当样本位于焦平面 P_f' 时,倾斜成像面 P_t 与像焦平面 P_f 相交于 O_1 ,此时,倾斜面图像水平中心附近有一条纵向的清晰聚焦带 F_b ,聚焦带 F_b 水平向外延伸并逐渐模糊。当样本位于离焦面 P_d' 时,物方离焦量记为 ΔZ ,倾斜成像面 P_t 与像离焦面 P_d 交于 O_2 。相较于像焦平面 P_f 的倾斜面图像,像离焦面 P_d 的倾斜面图像聚焦带 F_b 发生了水平偏移。对倾斜面图像进行分析,可求得聚焦带 F_b 水平中心位置偏离倾斜面图像视场中心的方向和距离(以下简称为“倾斜面图像聚焦带偏移量”,记为 ΔN)。因此,通过建立离焦量 ΔZ 与倾斜面图像聚焦带偏移量 ΔN 的几何关系,即可在仅分析单帧倾斜面图像的情况下,快

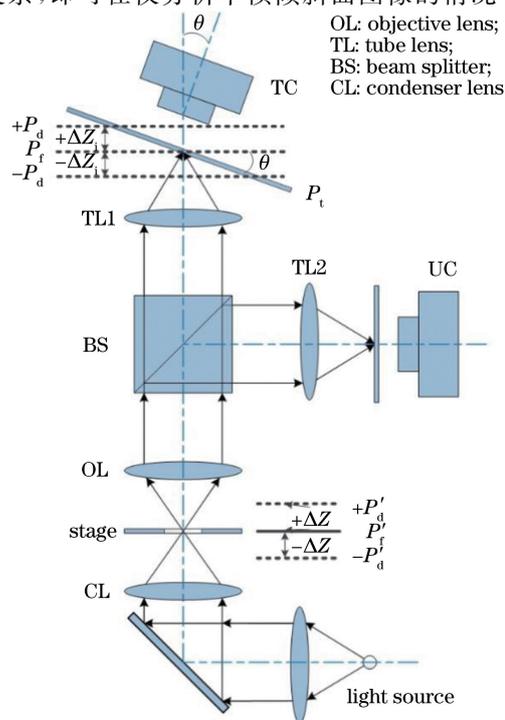


图 1 基于倾斜摄像头的显微自动对焦系统原理图
Fig. 1 Schematic of microscopy autofocus system based on tilt camera

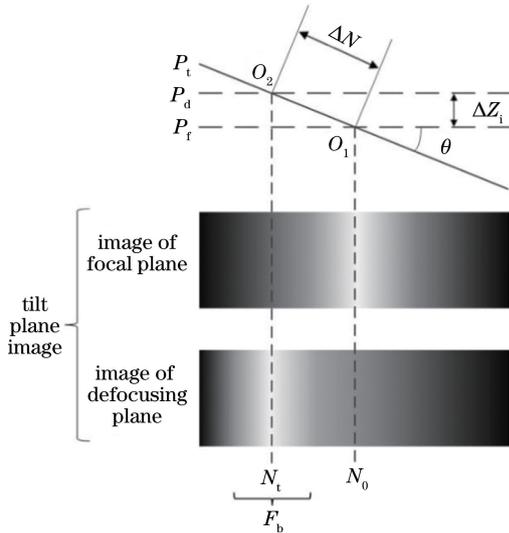


图 2 离焦量与倾斜面图像聚焦带偏移量关系原理图

Fig. 2 Relationship between defocusing distance and focusing band horizontal shift of tilt plane image

速获得样本离焦量及离焦方向,实现自动对焦。

以下将结合图 2 建立离焦量 ΔZ 与倾斜面图像聚焦带偏移量 ΔN 的理论关系。

由图 2 的几何关系可知

$$\Delta Z_i = \Delta N \times L \times \sin \theta, \quad (1)$$

$$\Delta Z_i = (N_t - N_o) \times L \times \sin \theta, \quad (2)$$

式中: ΔZ_i 为像方离焦量; L 为倾斜摄像头单个像素的长度; N_o 为倾斜面图像水平中心位置; N_t 为倾斜面图像聚焦带水平中心位置。

由工程光学相关理论可知,在理想的光学系统中,物方离焦量 ΔZ 与像方离焦量 ΔZ_i 的关系为

$$\Delta Z = \Delta Z_i / \alpha, \quad (3)$$

式中: α 为轴向放大率,其与垂轴放大率 β 满足数学关系 $\alpha = \beta^2$ 。因此(2)式可改写为

$$\Delta Z = (N_t - N_o) \times L \times \sin \theta / \beta^2. \quad (4)$$

本文显微自动对焦系统采用 Vezu US300 显微相机作为倾斜摄像头,相机感光面尺寸为 $6.4 \text{ mm} \times 4.8 \text{ mm}$,分辨率为 $2048 \text{ pixel} \times 1536 \text{ pixel}$,像素尺寸为 $3.2 \mu\text{m} \times 3.2 \mu\text{m}$ 。在实验过程中使用 2×2 binning,采集的倾斜面图像分辨率为 $1024 \text{ pixel} \times 768 \text{ pixel}$,因此 $L = 6.4 \mu\text{m}$, $N_o = 512$ 。垂轴放大率 β 即自动对焦系统的物镜放大倍率,本文后续实验中取 $\beta = 10$ 。将已知数值代入(4)式可得

$$\Delta Z = \frac{6.4}{100} (N_t - 512) \times \sin \theta. \quad (5)$$

记 $N_t - 512 = 1$,可获得离焦量 ΔZ 与倾斜角度 θ 的理论关系。由高等数学的极限理论可知,当 θ 趋近于零时, $\sin \theta$ 约等于 θ 。如图 3 所示,当 θ 在

$[0^\circ, 20^\circ]$ 区间内时,离焦量 ΔZ 随倾斜角度线性变化,并且,倾斜角度 θ 越大,离焦量 ΔZ 越大,系统载物台的工作范围也越大。因此,倾斜摄像头固定部件设计加工的倾斜角度 θ 为 20° ,其实物图如图 4 所示。

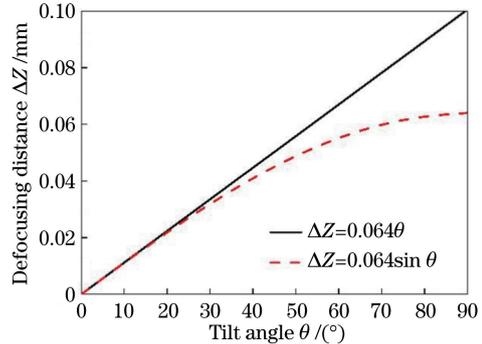


图 3 离焦量-倾斜角度理论关系图

Fig. 3 Theoretical relationship between defocusing distance and tilt angle



图 4 倾斜摄像头固定部件

Fig. 4 Fixed component of tilt camera

综上,(5)式可进一步简化为

$$\Delta Z = 0.0219 \Delta N. \quad (6)$$

此公式即系统放大率为 10 的情况下,离焦量 ΔZ 与倾斜面图像聚焦带偏移量 ΔN 关系的理论公式,且 ΔZ 与 ΔN 呈线性关系。

3 基于倾斜摄像头的显微自动对焦实验

3.1 系统组成

基于倾斜摄像头的显微自动对焦系统如图 5 所示,该系统主要包括 Motic BA410E 显微镜、Vezu US300 显微相机、Moticam Pro285A 显微相机、卤素灯光源、驱动控制模块、MicroE OPS 光栅尺和两相混合式步进电机等。

3.2 倾斜面图像聚焦带偏移量计算

基于倾斜摄像头的显微自动对焦系统的关键是对离焦量和倾斜面图像清晰聚焦带水平偏移量关系进行标定。因此,对倾斜面图像进行清晰度分析,确

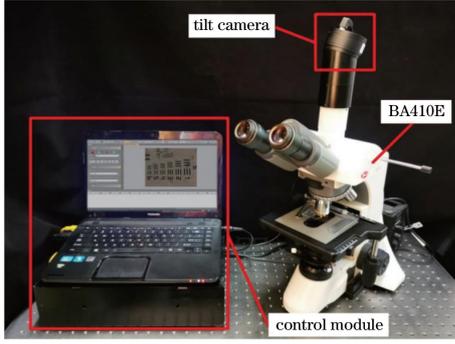


图 5 基于倾斜摄像头的自动对焦系统

Fig. 5 Autofocus system using tilt camera

定清晰聚焦带位置是本实验的一个重要环节。从理论上讲,与模糊的图像相比,清晰的图像具有更大的灰度梯度,对焦越清晰的图像,灰度变化剧烈。由基于倾斜摄像头的对焦原理可知,倾斜面图像中有一条纵向聚焦带,聚焦带水平中心位置是基于图像横向尺寸计算得到的,理论上不会因图像纵向尺寸的改变而改变。因此,通过截取感兴趣区域(ROI)计算倾斜面图像聚焦带偏移量,可在提升计算效率的同时保证计算精度。倾斜面图像聚焦带偏移量的

计算方法如图 6 所示。

倾斜面图像聚焦带偏移量的计算函数 $E(k, j)$ 主要通过计算某一像素点 (k, j) 与其水平相邻像素点 $(k, j+1)$ 、 $(k, j-1)$ 之间的灰度差平方和的开方来计算像素点 (k, j) 处的清晰度,之后通过对 j 列像素点清晰度求和得到倾斜面图像各列清晰度,清晰度最大一列的列号即对应聚焦带的水平中心位置 N_t ,表达式为

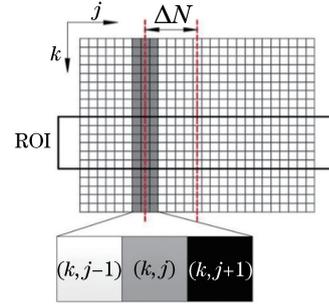


图 6 倾斜面图像聚焦带偏移量计算方法示意图

Fig. 6 Schematic of calculation method for horizontal shift of focusing band of tilt plane image

$$E(k, j) = \sum_k \sqrt{[I(k, j+1) - I(k, j)]^2 + [I(k, j) - I(k, j-1)]^2}, \quad (7)$$

式中: $I(k, j)$ 为像素点 (k, j) 处的灰度值。

基于上述分析可知,采用倾斜面图像聚焦带偏移量计算函数 $E(k, j)$ 对倾斜面图像进行图像分析后将得到一张具有局部峰值或单调递增/递减的散点图。当散点图中存在局部峰值时,说明聚焦带位于倾斜面图像上,此时样本位于焦面附近,离焦量较小;当散点图呈单调递增/递减的趋势时,说明聚焦带已经水平向右/向左偏移并超出了倾斜面图像,此时样本的离焦量较大。

3.3 离焦量-聚焦带偏移量曲线标定方法

离焦量-聚焦带偏移量曲线标定实验选用 Ready Optics 的 1951 USAF Target 显微分辨率测试板作为观测样本,显微物镜选用放大倍数为 10、数值孔径为 0.3 的物镜。用于读取轴向位移信息的光栅尺的最小分辨率为 50 nm, 1 μm 载物台轴向位移对应 20 个光栅值。标定实验的测量范围为 38 μm , 图像采集的轴向位移间隔为 2 μm 。实验时,载物台以物镜平面为起点,分别向上、下两个离焦方向运动,共采集得到 19 张倾斜面图像。倾斜面图像采集完毕后通过聚焦带偏移量计算函数分析倾斜面图像,绘制清晰度-像素散点图。聚焦带在倾斜

面图像中心的图像及相应的 ROI 图像分别如图 7(a)、(b)所示。

为进一步扩大测量范围,选取聚焦带在倾斜面图像中间、左侧、右侧的 3 张倾斜面图像,将 3 张倾斜面图像相应的清晰度-像素散点图进行拼接得到大测量范围的清晰度-像素散点图,如图 7(c)所示。实验发现,散点图的分布趋势近似高斯函数曲线,对其进行高斯函数曲线拟合,得到的高斯拟合函数为

$$y = 5.55 + 12.01 \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - 512.52}{513.22} \right)^2 \right], \quad (8)$$

式中: y 为倾斜面图像各列的清晰度值; x 为像素列数。

高斯曲线的拟合度 $R^2 = 0.9923$,表明倾斜面图像清晰度-像素散点图与高斯曲线具有极好的拟合度。曲线对称轴 $\mu = 512.52$,倾斜面图像中心位置的像素值 $N_0 = 512$,误差为 0.52 pixel。在获得清晰度-像素散点的高斯拟合曲线后,以拟合曲线的对称轴 μ 作为拟合参数 N_t ,则拟合函数为

$$y = 5.55 + 12.01 \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - N_t}{513.22} \right)^2 \right]. \quad (9)$$

对实验采集的各张倾斜面图像清晰度-像素散

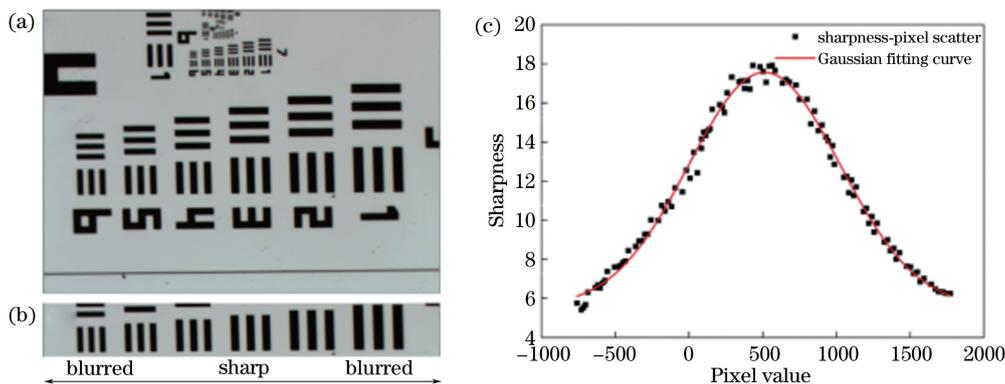


图 7 倾斜面图像及清晰度-像素散点高斯拟合曲线。(a)倾斜面图像;(b) ROI;(c)清晰度-像素散点高斯拟合曲线

Fig. 7 Tilt plane image and Gaussian fitting curve of sharpness-pixel scatter. (a) Tilt plane image; (b) ROI; (c) Gaussian fitting curve of sharpness-pixel scatter

点图进行逐次拟合,得到各张倾斜面图像聚焦带水平中心位置,并计算得到聚焦带偏移量。标定实验数据如表 1 所示。

表 1 离焦量-聚焦带偏移量曲线标定实验数据
(物镜参数:放大倍数 10,数值孔径 0.3)

Table 1 Experimental data of calibration curve between defocusing distance and horizontal shift value of focusing band (parameters of objective lens: magnification is 10; NA is 0.3)

Test number	Defocusing distance interval / μm	Grating value	Defocusing distance $\Delta Z / \mu\text{m}$	Shift value ΔN
1	[-19, -17)	-364	-18.20	1081.50
2	[-17, -15)	-325	-16.25	969.89
3	[-15, -13)	-280	-14.00	852.18
4	[-13, -11)	-243	-12.15	745.47
5	[-11, -9)	-200	-10.00	623.79
6	[-9, -7)	-157	-7.85	501.64
7	[-7, -5)	-117	-5.85	383.22
8	[-5, -3)	-74	-3.70	265.63
9	[-3, -1)	-33	-1.65	146.43
10	[-1, 1)	0	0	-2.60
11	[1, 3)	38	1.90	-87.02
12	[3, 5)	78	3.90	-180.01
13	[5, 7)	121	6.05	-277.05
14	[7, 9)	160	8.00	-388.47
15	[9, 11)	200	10.00	-505.82
16	[11, 13)	235	11.75	-616.50
17	[13, 15)	270	13.50	-737.47
18	[15, 17)	305	15.25	-844.51
19	[17, 19]	344	17.20	-961.49

将离焦量 ΔZ 与聚焦带偏移量 ΔN 的数据结果绘制成曲线,如图 8 所示。

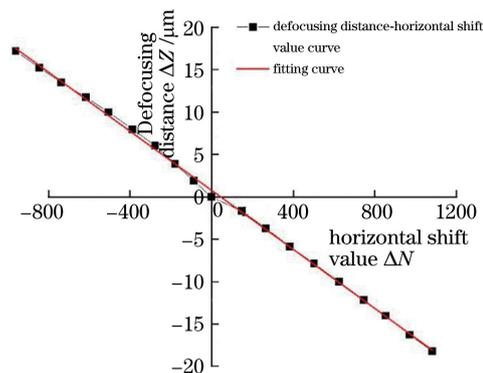


图 8 离焦量-聚焦带偏移量标定曲线

Fig. 8 Calibration curve between defocusing distance and horizontal shift value of focusing band

对曲线进行线性函数拟合,得到(10)式,线性拟合度 $R^2 = 0.9996$ 。

$$\Delta Z = -0.0174 \times \Delta N + 0.778. \quad (10)$$

(10)式与(6)式相比,斜率与截距均存在一定偏差。标定曲线的斜率小于理论公式的斜率。在假定系统放大倍数 β 与像素尺寸 L 准确的情况下,倾斜摄像头的倾斜角度误差是造成斜率与理论值存在偏差的主要原因。造成这种误差的原因可能是倾斜固定部件倾斜角度存在加工或安装误差。将标定曲线斜率数值 -0.0174 代入(5)式可计算得到离焦量-倾斜面图像聚焦带偏移量标定实验中的实际倾斜角度为 15.78° 。结合图 3 分析可知,取该度数时,离焦量 ΔZ 在线性范围内,不会影响离焦量-聚焦带偏移量标定曲线的线性关系和准确性。标定曲线的截距误差为 $0.778 \mu\text{m}$,远小于系统的景深($14.6 \mu\text{m}$)。因此,该曲线标定方法及所标定的曲线满足本文基于倾斜摄像头的显微自动对焦系统通过聚焦带偏移量

获取离焦量及离焦方向的要求。

4 显微自动对焦系统的性能测试

为测试基于倾斜摄像头的显微自动对焦系统的性能,以人血涂片作为测试样本,分别采用数值孔径(NA)为 0.25、0.3、0.35 的 3 种 10×物镜,对系统的工作范围、离焦量误差、自动对焦效率进行测试。系统性能测试的实验测量范围为±28 μm,以 2 μm 的离焦量间隔将载物台调整至不同的测试离焦量的位置,并使用光栅尺读取测试离焦量的数值,通过上文验证可行的离焦量-聚焦带偏移量曲线标定方法求

得实测离焦量,并驱动载物台运动至实测焦平面。每个测试离焦量位置各进行 5 次重复实验,采用 3 种数值孔径的 10×物镜各进行 140 次。部分不同离焦状态下的人血涂片倾斜面图像如图 9 所示。

4.1 工作范围与离焦量误差测试

系统性能测试实验测得的部分数据如表 2 所示。表中:测试离焦量的平均值记为 Z_t ;实测离焦量的平均值记为 Z_m ;实测离焦量与测试离焦量平均值的差值记为 Z_e ,并将其作为系统的离焦量误差;每个实测离焦量的标准差记为 σ ,并将其作为系统的重复性误差。

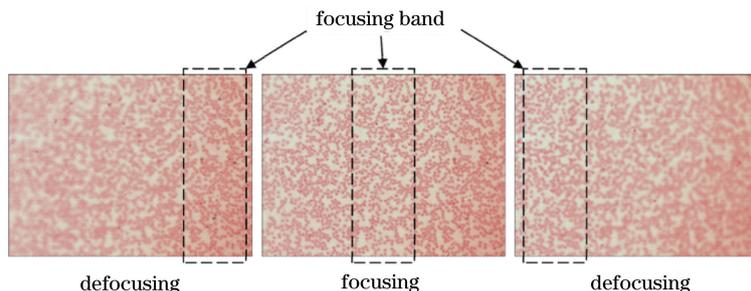


图 9 不同离焦状态下的人血涂片

Fig. 9 Images of blood smear under different defocusing states

表 2 系统性能测试实验数据表(物镜参数:放大倍数 10 倍,数值孔径 0.3)

Table 2 Experimental data sheet of system performance test (lens parameters of objective: magnification is 10; NA is 0.3)

μm

Z_t	Z_m	Z_e	σ	Z_t	Z_m	Z_e	σ
28.08	29.73	1.65	0.40	-2.00	-1.94	0.06	0.12
26.03	25.77	-0.26	0.22	-3.98	-4.42	-0.44	0.16
24.00	22.98	-1.02	0.32	-6.08	-6.68	-0.60	0.20
21.95	21.25	-0.70	0.25	-7.95	-8.71	-0.76	0.32
19.97	19.45	-0.52	0.22	-10.03	-10.98	-0.95	0.30
18.03	17.71	-0.32	0.08	-12.02	-13.17	-1.15	0.17
16.00	15.76	-0.24	0.20	-14.04	-14.97	-0.93	0.29
13.98	13.57	-0.41	0.14	-15.97	-17.09	-1.12	0.11
12.05	11.56	-0.49	0.15	-17.99	-18.80	-0.81	0.30
10.00	9.98	-0.02	0.30	-20.00	-20.74	-0.74	0.10
8.07	8.13	0.06	0.18	-22.07	-22.67	-0.60	0.19
6.02	6.33	0.31	0.17	-24.06	-25.23	-1.17	0.38
3.99	4.30	0.31	0.13	-26.02	-29.11	-3.09	0.35
1.95	2.53	0.58	0.12	-27.93	-33.77	-5.84	0.66

采用 3 种不同数值孔径 10×物镜进行系统性能测试,得到测试离焦量平均值,将其与实测离焦量平均值的数据绘制成散点图,并添加二者的理论关

系曲线,即 $Z_m = Z_t$,如图 10(a)、(c)、(e)所示。由图 10 可知:在数值孔径为 0.3 的条件下,当离焦量大于±26 μm 时,实测离焦量开始逐渐偏离二者的

理论关系线性区,此时系统的工作范围大于放大倍数为 10、数值孔径为 0.3 的物镜景深 $14.6 \mu\text{m}$ 的 3 倍;当数值孔径分别为 0.25 和 0.35 时,系统工作范围分别为 $44 \mu\text{m}$ 和 $36 \mu\text{m}$,小于数值孔径为 0.3 时的工作范围。

将 3 种数值孔径 $10\times$ 物镜系统性能测试实验结果中的离焦量误差数据 Z_e 绘制成曲线,重复性误差数据 σ 以误差棒形式表示,并添加工作范围内的误差上限与误差下限,如图 10(b)、(d)、(f) 所示。由图可知:在各自的系统工作范围内,当数值孔径为 0.25 时,离焦量误差范围为 $[-1 \mu\text{m}, 1 \mu\text{m}]$,重复性误差小于 $0.36 \mu\text{m}$;当数值孔径为 0.3 时,离焦量误

差范围为 $[-1.2 \mu\text{m}, 0.6 \mu\text{m}]$,重复性误差小于 $0.38 \mu\text{m}$;当数值孔径为 0.35 时,离焦量误差范围为 $[-1 \mu\text{m}, 1.5 \mu\text{m}]$,重复性误差小于 $0.33 \mu\text{m}$ 。不同数值孔径 $10\times$ 物镜系统性能测试数据对比如表 3 所示,其中, Z_0 为系统工作范围, σ_{max} 为重复性误差的最大值。由表 3 可见,当使用放大倍数为 10、数值孔径为 0.3 的物镜时,工作范围最大,离焦量误差最小,三者的重复性误差差别较小。

4.2 自动对焦效率

自动对焦效率主要包括图像采集、图像分析和载物台运动控制等方面的时间消耗。

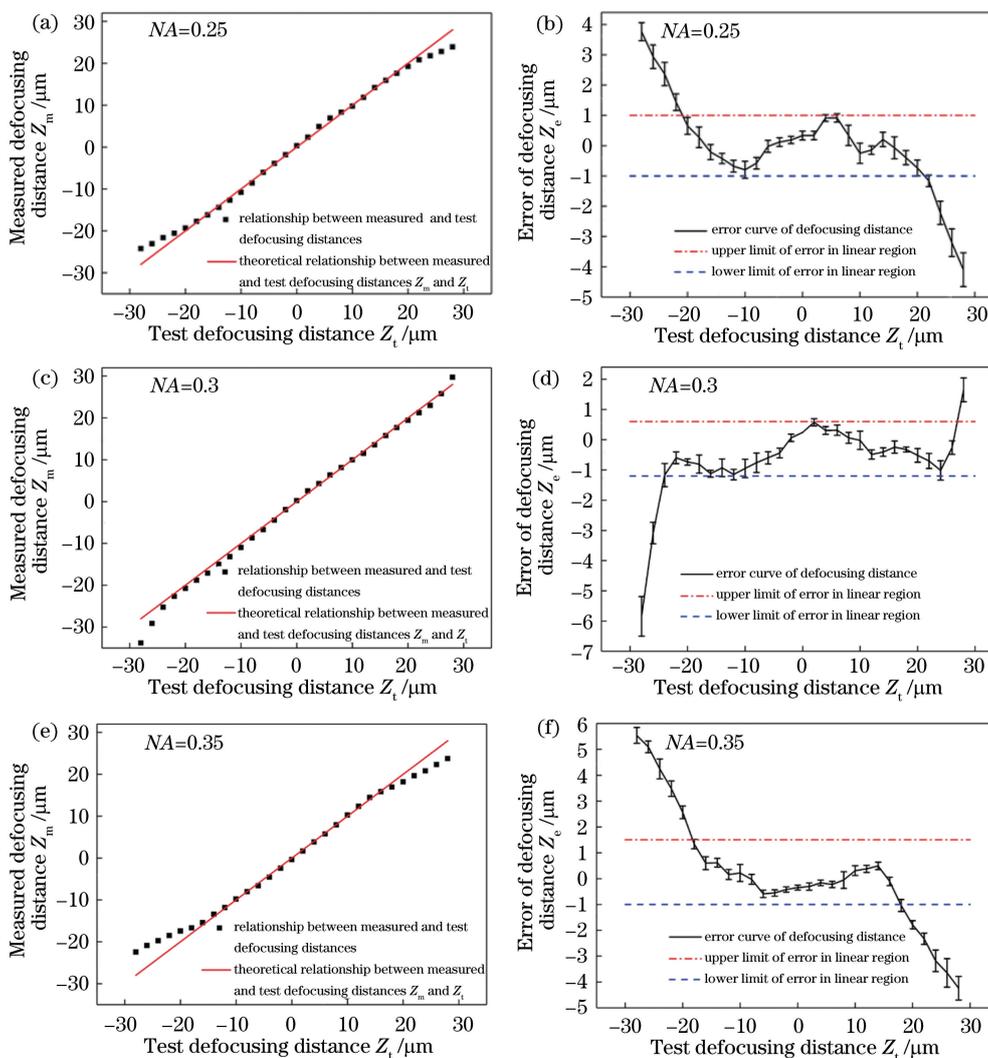


图 10 系统工作范围和离焦量误差测试结果。(a)(c)(e)不同数值孔径时的实测离焦量平均值-测试离焦量平均值;
(b)(d)(f)不同数值孔径时的离焦量误差及重复性误差曲线

Fig. 10 Testing results of operating range and defocusing distance error of the system. (a)(c)(e) Relationship between mean values of measured defocusing distance and test defocusing distance under different NA; (b)(d)(f) curves of defocusing distance error and repeatability error under different NA

表3 不同数值孔径 $10\times$ 物镜系统性能测试数据
Table 3 Comparison of system performance test data for
 $10\times$ objective lens with different NA μm

NA	Operating range Z_o	Defocusing distance error Z_e	Maximum repeatability error σ_{max}
0.25	44	$[-1, 1]$	0.36
0.3	52	$[-1.2, 0.6]$	0.38
0.35	36	$[-1, 1.5]$	0.33

图像采集时间 T_i 主要由倾斜面图像的采集帧率决定。本文采用的 Vezu US300 显微相机的帧率为 30 frame/s, 采集一帧图像的耗时为 0.033 s。

图像分析时间 T_p 为计算每帧倾斜面图像聚焦带偏移量的消耗时间, 主要取决于聚焦带偏移量计算函数的计算效率。考虑到不同计算机计算性能的差异, 选用三种常用的清晰度评价函数 (Brenner, Laplacian, Tenengrad) 与本文提出的聚焦带偏移量计算函数的计算效率进行比较。在不截取 ROI 的情况下, 各函数处理单帧图像的平均时间如图 11 所示, 可知, 聚焦带偏移量计算函数计算效率显著优于其他函数, 并且, 可以通过截取合适的 ROI 进一步缩短图像分析时间。

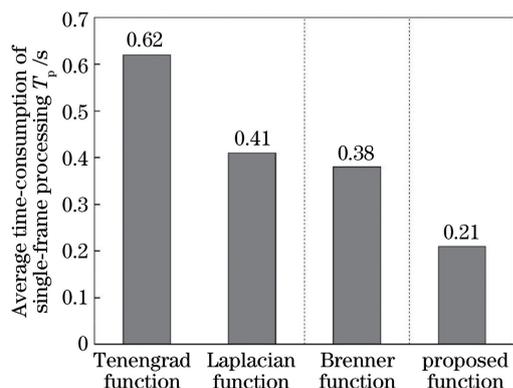


图 11 不同清晰度评价函数处理单帧图像的平均耗时
Fig. 11 Average time-consumption of single-frame image processed with different sharpness evaluation functions

载物台运动控制时间 T_s 取决于电机运动时间, 可由实测获得。在离焦量为 $15 \mu\text{m}$ 的情况下, 电机的平均运动时间为 0.63 s。

综上, 本系统完成一次倾斜面图像采集并求取离焦量和离焦方向的时间为

$$T_{t1} = T_i + T_p = 0.033 + 0.21 = 0.243, \quad (11)$$

在离焦量为 $15 \mu\text{m}$ 的情况下, 完成一次自动对焦的时间为

$$T_{t2} = T_i + T_p + T_s = 0.033 + 0.21 + 0.63 = 0.873. \quad (12)$$

5 结 论

本文提出了一种基于倾斜摄像头对焦原理的显微自动对焦方法。首先对基于倾斜摄像头的对焦原理进行分析, 推导了样品离焦量与倾斜面图像聚焦带偏移量的理论公式。通过对倾斜面图像特征的分析, 提出了一种适合求取倾斜面图像聚焦带偏移量的计算函数。之后, 以分辨率测试板作为观测样本, 通过搭建的倾斜摄像头显微自动对焦系统进行离焦量-聚焦带偏移量关系曲线的标定实验, 并验证该方法的可行性。最后, 通过 3 种不同数值孔径的 $10\times$ 物镜对显微自动对焦系统进行性能测试。测试结果表明, 当采用数值孔径为 0.3 的 $10\times$ 物镜时, 系统工作范围最大, 且离焦量误差范围最小, 系统能在 0.243 s 内快速完成一次倾斜面图像采集和离焦量及其方向的获取。本系统的工作范围还有待提升, 今后可以通过使用大靶面相机来进一步扩大工作范围。

所提方法为高精度、高分辨率、快速响应的新型显微自动对焦系统的研制提供了一种新的理论依据和实验方法。相比已有的显微对焦方法, 该方法在离焦量和离焦方向获取速度方面有了一定提升, 且该方法的光学结构简单, 方便在已有的三目显微成像系统上应用, 仅需添加一个低端摄像头及一个安装倾斜摄像头的中空机械固定结构即可。该方法有望应用于各领域在线、在位检测的自动对焦过程。

参 考 文 献

- [1] Tian P, Gu C C, Hu J, *et al.* Research survey on microscopy autofocus methods [J]. Optical Technique, 2014, 40(1): 84-88.
田畔, 谷朝臣, 胡洁, 等. 显微镜自动对焦方法研究综述[J]. 光学技术, 2014, 40(1): 84-88.
- [2] Gu C C, Cheng H, Wu K J, *et al.* A high precision laser-based autofocus method using biased image plane for microscopy [J]. Journal of Sensors, 2018, 2018: 8542680.
- [3] You Y H, Liu T, Liu J W. Survey of the auto-focus methods based on image processing [J]. Laser & Infrared, 2013, 43(2): 132-136.
尤玉虎, 刘通, 刘佳文. 基于图像处理的自动对焦技术综述[J]. 激光与红外, 2013, 43(2): 132-136.
- [4] Miao L G, Xuan B, Peng S L. Fast autofocusing algorithm in microscopy [J]. Journal of Optoelectronics • Laser, 2007, 18(1): 9-12.
苗立刚, 轩波, 彭思龙. 显微镜的快速自动对焦算法

- [J]. 光电子·激光, 2007, 18(1): 9-12.
- [5] Redondo R, Bueno G, Valdiviezo J C, *et al.* Autofocus evaluation for brightfield microscopy pathology[J]. Journal of Biomedical Optics, 2012, 17(3): 036008.
- [6] Li X, Jiang M S. A comparison of sharpness functions based on microscopes [J]. Optical Instruments, 2018, 40(1): 28-38.
李雪, 江旻珊. 光学显微成像系统图像清晰度评价函数的对比[J]. 光学仪器, 2018, 40(1): 28-38.
- [7] Zhang X D, Liu Z Q, Jiang M S, *et al.* Fast and accurate auto-focusing algorithm based on the combination of depth from focus and improved depth from defocus [J]. Optics Express, 2014, 22(25): 31237-31247.
- [8] Fan F M, Cheng L L. A fast detection and compensation of microscope defocus method based on laser triangulation method on TFT-LCD inspection [J]. Chinese Journal of Lasers, 2011, 38(2): 0208005.
范富明, 程良伦. TFT-LCD 检测中基于激光三角法的显微镜离焦快速在线检测及补偿[J]. 中国激光, 2011, 38(2): 0208005.
- [9] Zhang X B, Fan F M, Cheng L L. Improvement for fast auto-focus system using laser triangulation [J]. Infrared and Laser Engineering, 2012, 41(7): 1784-1791.
张小波, 范富明, 程良伦. 激光三角法改进的显微镜快速自动对焦方法[J]. 红外与激光工程, 2012, 41(7): 1784-1791.
- [10] Lee J Y, Wang Y H, Lai L J, *et al.* Development of an auto-focus system based on the moiré method[J]. Measurement, 2011, 44(10): 1793-1800.
- [11] Mao X Y, Zhao W Q, Wang Y, *et al.* The method of axial fast identified focus of laser differential confocal microscopy imaging[J]. Optical Technique, 2015, 41(5): 385-389.
毛新越, 赵维谦, 王允, 等. 激光差动共焦显微成像中的轴向快速定焦方法[J]. 光学技术, 2015, 41(5): 385-389.
- [12] Yang Y, Zhao Y, Yang M, *et al.* Research on the hardware automatic focusing system in microscope based on PSD [J]. Journal of Mechanical & Electrical Engineering, 2016, 33(1): 47-51.
杨宇, 赵宇, 杨明, 等. 基于 PSD 的显微镜硬件自动聚焦系统研究[J]. 机电工程, 2016, 33(1): 47-51.
- [13] Cao B X, Hoang P L, Ahn S, *et al.* High-speed focus inspection system using a position-sensitive detector [J]. Sensors, 2017, 17(12): 2842.
- [14] Jiang Z W, Yan Y, Li Y, *et al.* Wide-range and high-precision microscopic focusing system for laser-induced breakdown spectroscopy [J]. Acta Optica Sinica, 2018, 38(12): 1215004.
蒋章伟, 燕艳, 李阳, 等. 大范围高精度激光诱导击穿光谱显微对焦系统[J]. 光学学报, 2018, 38(12): 1215004.
- [15] Qu Y F, Zhu S Y, Zhang P. A self-adaptive and nonmechanical motion autofocusing system for optical microscopes [J]. Microscopy Research and Technique, 2016, 79(11): 1112-1122.
- [16] Bathe-Peters M, Annibale P, Lohse M J. All-optical microscope autofocus based on an electrically tunable lens and a totally internally reflected IR laser [J]. Optics Express, 2018, 26(3): 2359-2368.