

文章编号: 1005-5630(2015)02-0170-05

单点式位移平台激光共聚焦扫描荧光显微镜

陶振强, 贾南南, 阮 斌

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

摘要: 为了获得细胞图像, 利用 Visual Studio C# 开发了移动位移平台的控制程序, 使用位移平台单点扫描的方式设计激光共聚焦扫描显微镜 (laser confocal scanning microscope, LCSM)。为了获得高分辨率的位移, 位移由精度可以达到 1 nm 的压电陶瓷驱动器驱动。设计了梳状和矩形两种扫描路径, 通过程序设计位移补偿的方法弥补了机械运动的偏差。利用算术平均值的数字滤波方法处理数据采集卡采集的数据以减小随机噪声的影响。实验结果证明, 利用 C# 程序控制的单点式平台扫描 LCSM 具有较好地测量效果。

关键词: 共聚焦; 荧光显微镜; 数字滤波; 平台扫描; C# 程序控制; 位移补偿

中图分类号: Q 631 **文献标志码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1005-5630.2015.02.017

Single-point displacement of the platform laser confocal scanning fluorescence microscope

TAO Zhenqiang, JIA Nanman, RUAN Bin

(School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In order to obtain cells image, we use Visual Studio C# to develop the control program of the mobile displacement platform, and use displacement single-point scanning way to design laser confocal scanning microscope (LCSM). In order to obtain high resolution displacement, displacement of the platform with piezoelectric ceramic actuator is used and the highest accuracy can reach 1 nm. Both comb and rectangle scanning paths are designed, by programming the displacement compensation method to make up the mechanical movement deviation. Digital filtering arithmetic average method of dealing with the data acquisition card is used to collect data to reduce the influence of random noise. Experimental results show that single-point platform using C# program LCSM has a very good effect.

Keywords: confocal; fluorescence microscopy; digital filtering; displacement of the platform; C# control program; displacement compensation

引 言

激光共聚焦扫描显微镜^[1] (laser confocal scanning microscope, LCSM) 高度结合光、机、电、计算机和图像处理等技术, 使其在光学显微领域具有极其重要的地位。与传统的光学显微镜相比其具有很高的横

收稿日期: 2014-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (61178079)

作者简介: 陶振强 (1990—), 男, 硕士研究生, 主要从事超分辨成像的研究。E-mail: tao089084018@sina.cn

向和纵向分辨率^[2-3],光学切片式的测量方式可以观测物体的三维结构。其优良的性能在半导体^[4]、材料科学^[5]、生物医学^[6]领域具有广泛的应用。激光共聚焦扫描荧光显微镜是结合激光共聚焦扫描显微镜和激光诱导荧光成像技术^[7]的用于观察细胞内部结构的仪器。

激光共聚焦扫描显微镜以光学共轭焦点(简称共焦)成像技术^[8]为基础,相比传统的荧光显微镜最大的优点在于加上了扫描系统,通过扫描可以对物体进行三维动态检测。扫描系统通常有两种工作方法^[9]:光束扫描和物体扫描。光束扫描就是被扫描物体不动光束运动;物体扫描就是被扫描物体运动光束不动。光束扫描的优点是扫描速度快、精度高;物体扫描的优点是视场大、光学畸变小。

1 激光共聚焦扫描显微镜的原理

激光共聚焦扫描显微镜采用共轭焦点技术,使用激光作为光源,被探测物体和探测器处于彼此对应的共轭焦点位置。如图 1 所示,激光器发出的激光光束通过扩束镜扩束形成平行度好、直径合适的平行光束,此光束被二向色镜反射后进入物镜,被物镜聚焦于载物台上的被测物体(以细胞为例)上。被荧光染色的细胞受激光照射后发出另外一种波长的光,反向通过物镜形成和入射光束平行的荧光平行光,荧光可以通过二向色镜而不被反射。通过二向色镜的荧光被透镜聚焦,在焦点处放置有针孔,此处针孔的作用是滤除非焦点处荧光的杂散光,针孔处放置有光电倍增管(PMT)以接收荧光信息。

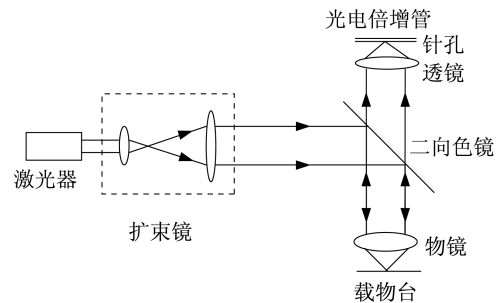


图 1 激光共聚焦扫描显微镜原理图

Fig. 1 Laser confocal scanning microscope principle

2 激光共聚焦扫描荧光显微镜的关键因素

2.1 针孔大小的选择

PMT 前方针孔大小的选择对 LCSM 成像影响极大,有关针孔大小该如何确定的研究有许多^[10-11],研究表明,当针孔直径恰好等于一个爱里斑直径时,探测器通过针孔接收的光能量最大,成像效果最好。爱里斑通过系统成像的直径为

$$D = \beta \frac{1.22\lambda}{NA} \quad (1)$$

式中: β 为系统的放大倍率,即物镜的焦距和透镜焦距之比; λ 为所用光波长; NA 为物镜数值孔径。实验所用的 $\lambda=405 \text{ nm}$, $NA=0.95$, $\beta=40$,由此可知爱里斑成像直径约为 $20.8 \mu\text{m}$ 。

2.2 数字滤波处理方法

LCSM 成像数据是通过采集卡 A/D 转换而来,通过采集卡把模拟信号转换为数字信号。由于通过采集卡采集转换的数据没经过任何处理,会带有许多干扰信号,噪声较大。为了得到更好的数据使图像更加清晰,就需要对采集的数据进行处理,以滤除干扰信号。数据处理方法多种多样^[12],最常用的有算术平均值数字滤波、加权平均值数字滤波、滑动平均值滤波、中值滤波等。

由于实验中会有各种随机干扰(随机噪声),实验选用的是算术平均值数字滤波方法,按输入的 N 个采样数据 $x_i (i=1, 2, 3, \dots, N)$, 寻找 y , 使 y 与各采样值间的偏差平方和最小,其公式为

$$E = \min \left(\sum_{i=1}^N (y - x_i)^2 \right) \quad (2)$$

对式(2)求极值可得 $y = \sum_{i=1}^N x_i / N$, 该方法就是把 N 次采样值相加,然后取其算术平均值为本次采样值。

实验是通过 C# 编写程序^[13]对采集卡采集的数据进行处理,程序代码如下:

```
sum=0;
{
```

```

for (int k=0;k<GParameters. averages; k++)          GParameters. averages 为在每一点采集的数据个数
{
    double[]data= reader. ReadSingleSample();      读取采集卡采集数据
    sum=sum+data[0];                               对某一点所有数据进行累加
}
sampledata[i,columns -1 -j]= sum/GParameters. averages;    i,j 为行数和列数
}

```

3 位移平台控制设计

为了达到更好的实验效果,使用 PI 公司生产的压电陶瓷驱动的六轴纳米位移平台,型号是 P-562. 6CD, x 、 y 、 z 轴移动范围均为 $200\ \mu\text{m}$,位移精确度为 $1\ \text{nm}$,完全可以满足高分辨率的需求。采用单点扫描方法控制平台移动,单点扫描就是把单一方向上的量程按要求分成等分点,位移平台移动时在每一个点上停一下,同时采集卡在此采集数据,实验采用每点采集 $1\ 000$ 个数据,然后取平均值。

3.1 扫描方式的选择

单点扫描可分为两种扫描方式:梳状波扫描和矩形波扫描。梳状波扫描就是扫描沿着同一个方向进行,也就是说沿 x 轴的方向不变, x 的起始点是一定的;矩形波扫描就是双向来回扫描,也就是说沿着 x 轴方向在起点和终点来回交替变化。图 2、图 3 分别是梳状波、矩形波扫描的局部路径图。

梳状波扫描程序为:

```

for(int i=0;i<rows;i++)
//PI 的 y 轴对应图像的 y(行数)
{
    for(int j=0;j<columns;j++)
//PI 的 x 轴对应图像的 x(列数)
    {
        goalPos[0]= goalPos[0]+x_grid;
    }
//移动 PI 台到新的一行
goalPos[0]= GParameters. nowPos[0];
//x 轴返回起始位置
goalPos[1]=goalPos[1]+y_grid;
//y 轴移动一个采集距离
}

```

矩形波扫描程序如下:

```

for(inti=0;i<rows;i++)
{
    if((i+1)% 2 == 0)//判断奇偶行
    {
        for(int j=0;j<columns;j++)
        {
            goalPos[0]=x_Initial+GParameters. xRange
                -j * x_grid;
        }
    }
}

```

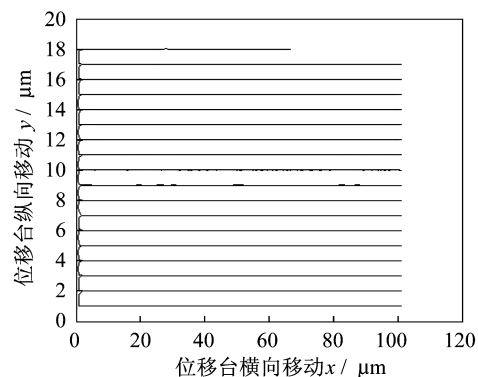


图 2 梳状波扫描局部路径

Fig. 2 Comb wave scanning path

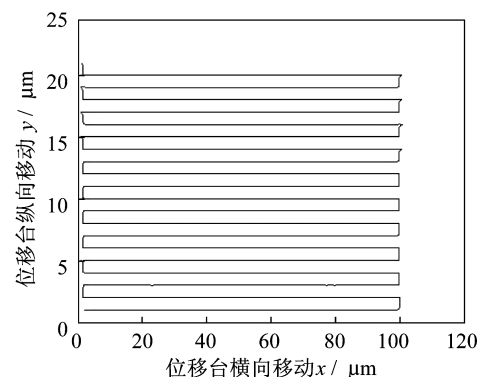


图 3 矩形波扫描局部路径

Fig. 3 Rectangular wave scanning path

```

else
{
for(int j=0;j<columns;j++)
{
GoalPos[0]=x_Initial+j * x_grid;
}
}
goalPos[1]=y_Initial+(i+1) * y_grid; //y 跳到新一行

```

3.2 位置偏差的补偿

由图2、图3可以看出,扫描时位移台移动和设计会有偏差,这是由于位移台移动有加速和减速过程,所以采集卡在采集数据时就会有偏差,也就是说对于细胞上某一点 (i, j) 预期对应的下一点 $(i, j+1)$ 可能由于位移台移动时机械误差的原因变成点 $(i, j+2)$,如图4所示。这时可以在程序中弥补机械运动产生的位移偏差,增加代码为: $goalPos[0]=x_Initial+j * x_grid \pm n$;其中 n 值随实际情况选取,所得效果如图5所示。

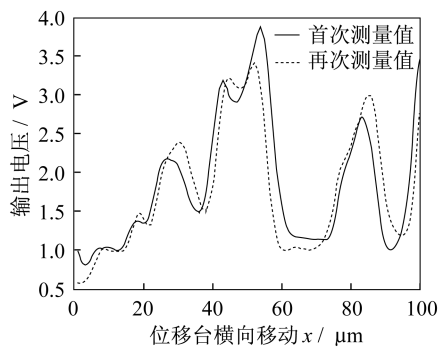


图4 实际带有位置偏差的效果图
Fig. 4 Position deviation

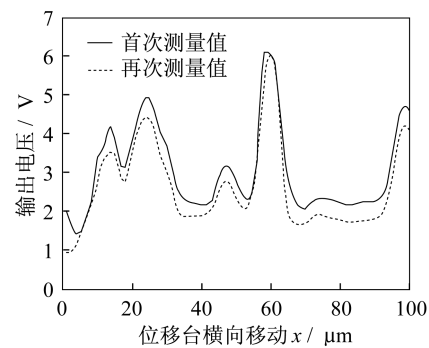


图5 程序纠正的效果图
Fig. 5 Correction by using program

4 实验结果

图6为所设计的实验装置图。考虑荧光效率,激光器使用的是波长为405 nm的半导体激光器,为了得到大视场范围我们使用了数值孔径为0.95的物镜,本实验所采用的样品是老鼠的神经细胞,其平均尺寸约为 $10 \mu\text{m}$ 。图7为本实验的扫描细胞效果图,由图像可以看出,用Visual Studio C#程序控制的扫描对于细胞的扫描成像具有很好的效果。

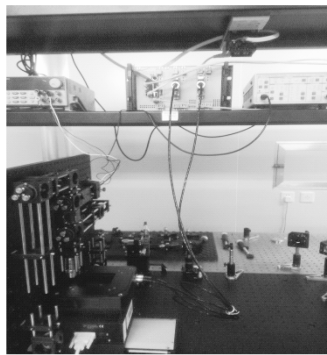


图6 实验装置图
Fig. 6 Experimental setup

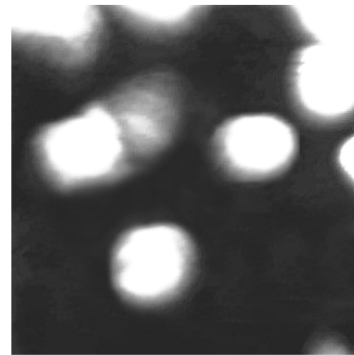


图7 扫描细胞成像图
Fig. 7 Cell image

5 结 论

影响激光共聚焦扫描荧光显微镜系统图像质量的因素有很多,比如光路搭建是不是共轴,数据采集卡的增益系数稳定性,光电倍增管(PMT)的驱动电源的电流电压值是否稳定等等,若要得到好的实验效果需要综合考虑这些因素。

参考文献:

- [1] 田明丽,包正康,刘昱. 激光共聚焦扫描显微镜及其应用[J]. 光学仪器,2001,23(1):16-19.
- [2] 霍霞,吕建勋,杨仁东,等. 激光共聚焦显微镜与光学显微镜之比较[J]. 激光生物报,2001,10(1):76-79.
- [3] SHEPPARD C J R, WILSON T. Depth of field in the scanning microscope[J]. Optics Letters,1978,3(3):115-117.
- [4] 曾毅波,蒋书森,黄彩虹,等. 激光共聚焦扫描显微镜在机电系统中的应用[J]. 光学精密工程,2008,16(7):1241-1246.
- [5] 方园,梁高飞,朱光明,等. 共焦激光扫描显微镜及其在钢铁相变原位观察中的应用[J]. 宝钢技术,2006(6):64-69.
- [6] 于彦华,邢达. 激光共聚焦扫描显微镜及其在生物医学中的应用[J]. 激光杂志,1999,20(6):35-38.
- [7] 高少佳. 激光诱导荧光技术及其在生物仪器中的应用[D]. 杭州:浙江大学,2005:13-20.
- [8] 王锡文,张果,杨春梅. 共焦点成像技术[J]. 西南石油学院学报,2004,26(5):10-13.
- [9] 张景和,袁雅珍,阮锦. 激光扫描显微镜中的扫描系统[J]. 光学精密工程,1995,3(2):62-65.
- [10] GE H Y, WANG B H, REN Q S. Influence of detector on resolution in confocal imaging system[J]. Acta Photonica Sinica,2006,35(4):587-590.
- [11] WILSON T, CARLINI A R. Size of the detector in confocal imaging systems[J]. Optics Letters,1987,12(4):227-229.
- [12] 伍杰灵. 数据采集系统中数字滤波算法的研究[D]. 北京:北京林业大学,2010:15-25.
- [13] 魏汪洋,靳鲲鹏. C#从入门到精通[M]. 北京:化学工业出版社,2011:32-133.

(编辑:刘铁英)

=====

(上接第 169 页)

统复杂、效率低等除垢防垢效果不理想的弊端,解决了单一频率电磁信号无法实现变频共振而引起除垢低效或除垢失败的问题。理论分析和实验结果均验证了防垢除垢系统方案的可行性,整个电路系统结构紧凑、功耗低、便于操作,仅需 36 V 直流电源即可正常工作。

参考文献:

- [1] 陈璨. 基于电磁场的除垢、防垢技术研究[D]. 东营:中国石油大学,2008.
- [2] 伍懿美. 高频电磁水处理器的电磁场分析及实验研究[D]. 重庆:重庆大学,2012.
- [3] 蒋文斌. 基于变化电磁场的电磁除垢系统[D]. 杭州:中国计量学院,2012.
- [4] 苏翔云. 变频防垢除垢仪的研究[D]. 郑州:郑州大学,2011.
- [5] 费继友,李玉泉,白鑫. 水的电磁变频除垢防垢技术和实验研究[J]. 化工自动化及仪表,2011,38(2):157-161.
- [6] 刘芳,彭润玲,陈家璧,等. 基于 AVR 单片机的双液体变焦透镜驱动系统[J]. 光学仪器,2009,31(5):62-66.
- [7] 何金平. 电压源型 PWM 变换器控制与应用[D]. 武汉:华中科技大学,2012.
- [8] 王志伟. 基于 FPGA 的变频电磁除垢仪的研究[D]. 西安:西安工程大学,2011.
- [9] 张立勋,沈锦华,路敦民,等. AVR 单片机实现的直流电机 PWM 调速控制器[J]. 机械与电子,2004(4):29-32.
- [10] 徐晓宙,罗融. 高频电磁场对防水垢机理的实验研究[J]. 西安交通大学学报,1997,31(1):124-126.

(编辑:程爱婕)