

数字共焦显微技术

陈 华 聂 雄 韦 巍 何华光 ◎ 著

DIGITAL CONFOCAL MICROSCOPY

前言

本书关于数字共焦显微技术的研究,开始于本书作者参与2002年北京理工大学承担的教育部高校博士点专项基金项目“基于多画幅图像的超分辨率图像复原技术研究(20020007006)”,以“数字共焦显微图像复原方法及其系统实现研究”为子项目开展研究。北京理工大学金伟其教授和苏秉华教授指导开展该子项目的研究。2005年作者在广西大学继续开展该项研究至2017年12月。

本书的主要内容包含三部分:第一部分为三维显微图像去卷积复原算法的研究,包括复原处理效果评价的研究,内容包括第3章至第8章;第二部分对3D-PSF(三维点扩散函数)空间大小和密度与复原效果和速度的关系,3D-PSF的构建以及3D-PSF的选取方法进行研究,内容包括第2章、第9章至第17章、第24章;第三部分对压电陶瓷驱动器控制技术方面进行了若干研究,内容包括第18章至第23章。

本书内容的研究受国家自然科学基金项目“三维点扩散函数与图像复原关系模型及优化选取方法(61164019)”、教育部高校博士点专项基金项目“基于多画幅图像的超分辨率图像复原技术研究(20020007006)”、广西区科学基金项目“数字共焦显微图像超分辨率复原方法研究(0728034)”、广西区科学基金项目“数字共焦三维点扩散函数优化选取方法(2012jjAAG0002)”、广西区科技开发计划“数字共焦显微仪研究与开发(桂科攻0992002-23)”、南宁市科技开发计划“数字共焦显微系统研究与开发(200801028A)”以及“数字共焦显微仪产业化研究(20155179)”的经费资助。项目组成员包括陈华、聂雄、韦巍、何华光、黄福莹等教师,参加研究的还有张喜、贺斌、谢红霞、董钊明、杨凤娟、蔡熠、林广升、梁日柳、莫春球、邓文波、刘胜、刘方可、黄世玲等研究生,本书的大部分章节来自他们的学位论文。陈婷、香钦清、郭伟林、杨森、石旭、李友军、韦静静、陈丹、何双燕、蒙东阳、林万晓、韦彩霞、吴瑛梅、马颜亮等本科生也参与了项目的研究。

项目研究过程中发表了研究论文40多篇,获发明专利授权2项,计算机软件著作权3项,广西壮族自治区科技成果登记1项,制定企业标准1项。

本书中的项目研究内容难免存在错误,敬请读者指正。

作者 陈华
2018年1月20日

目 录

CONTENTS

第1章 绪 论	001
1.1 光学显微镜分辨率极限	001
1.2 激光共焦扫描显微镜	002
1.3 数字共焦显微技术	002
1.4 数字共焦显微技术主要的研究内容	003
1.4.1 三维显微图像复原方法	004
1.4.2 序列光学切片采集控制技术	005
1.5 本书常涉及算法及评价指标	006
1.5.1 贝叶斯 (Bayes) 图像复原迭代法	006
1.5.2 图像复原的评价标准	007
第2章 三维显微成像的点扩散函数及其对去卷积的影响	011
2.1 引 言	011
2.2 三维显微成像 3D-PSF	011
2.2.1 3D-PSF 的计算	011
2.2.2 卷积中 3D-PSF 的空间大小	013
2.2.3 散焦像和光学切片	014
2.2.4 去卷积中 3D-PSF 的空间大小	016
2.3 频谱均值	016
2.3.1 频谱均值概念的提出	016
2.3.2 散焦像和切片图像的评价	018
2.4 实 验	019
2.4.1 光学切片间距的确定	019
2.4.2 三维样本光学切片 f 、3D-PSF 和三维切片图像 g	019
2.4.3 复原及分析	019
2.4.4 3D-PSF 层数 n 的确定	021
2.5 本章小结	022

第3章 基于 Markov 约束的 Bayes 三维显微图像复原方法	023
3.1 引 言	023
3.2 基于 Markov 约束的二维图像 Bayes 复原算法	023
3.2.1 基于 Markov 约束的泊松-最大后验概率法 Poisson-MAP (MPMAP 算法)	023
3.2.2 基于 Markov 约束的泊松-最大似然法 Poisson-ML (MPML 算法)	024
3.3 Markov 惩罚项中的邻域三维拓展	025
3.4 正则化参数 α	026
3.5 实 验	028
3.5.1 三维样本 f 、3D-PSF 和三维切片图像 g	028
3.5.2 三维 MAP 算法和 MPMAP 算法复原	028
3.5.3 三维 ML 算法和 MPML 算法复原	031
3.6 实际切片图像的复原	033
3.7 分辨率和信噪比的权衡取舍	034
3.7.1 实 验	034
3.7.2 复原图像的定量评价	035
3.7.3 结果分析	036
3.8 本章小结	037
第4章 基于小波变换阈值去噪的三维显微图像复原方法	038
4.1 引 言	038
4.2 小波变换	038
4.2.1 小波变换多分辨率分析	038
4.2.2 小波包分析	039
4.3 基于小波变换的阈值化图像去噪方法	040
4.3.1 阈值化	040
4.3.2 阈值 δ 的选取	040
4.4 小波包阈值去噪三维显微图像复原方法	041
4.4.1 小波包阈值去噪复原方法	041
4.4.2 小波包阈值去噪复原步骤	042
4.5 实 验	042
4.5.1 三维样本 f 、3D-PSF 和三维光学切片 g	042
4.5.2 图像复原比较及分析	042
4.5.3 实际切片图像的复原	044
4.6 本章小结	045
第5章 基于噪声灰度差估计三维显微图像超分辨率复原	046
5.1 引 言	046
5.2 噪声灰度差估计	046
5.3 噪声灰度差估计的步骤	047
5.4 噪声灰度差估计的准确性测试	047

5.5 实验与结果分析	049
5.6 本章小结	050
第6章 去卷积迭代算法迭代次数自动选取	051
6.1 最大似然法在图像复原中的应用	051
6.1.1 迭代次数与图像复原的关系	051
6.1.2 带判断项的最大似然算法	052
6.2 实验分析	053
6.2.1 仿真图像以及点扩散函数的构建	054
6.2.2 图像复原	054
6.2.3 图像复原结果分析	055
6.2.4 阈值 λ 的选取	056
6.3 本章小结	056
第7章 数字共焦显微技术成像分辨率	057
7.1 引 言	057
7.2 生物光学显微镜成像特性	057
7.2.1 薄样本成像	057
7.2.2 厚样本成像	057
7.2.3 厚样本光学切片成像	058
7.3 瑞利判据和半峰宽度	058
7.4 分辨率评价的两个指标	059
7.5 分辨率测量与分析	059
7.5.1 仿真厚样本设计	059
7.5.2 设计 3D-PSF	060
7.5.3 计算薄样本和厚样本图像	061
7.5.4 去卷积复原	061
7.5.5 半峰宽度测定	061
7.5.6 分辨率分析	063
7.5.7 结 论	064
7.6 本章小结	064
第8章 基于高斯函数假设的图像频谱恢复特性分析方法	066
8.1 引 言	066
8.2 图像的退化模型	066
8.3 高斯函数假设分析方法	067
8.3.1 高斯函数假设	067
8.3.2 分析方法	067
8.3.3 极限方差	068
8.3.4 方差比	068
8.4 实验计算及分析	069
8.4.1 约束最小平方滤波法 (CLS 法)	069

8.4.2 最大似然法 (PML 法)	070
8.5 本章小结	072
第 9 章 三维显微成像点扩散函数及其实现	073
9.1 3D-PSF	073
9.1.1 3D-PSF 计算	073
9.1.2 Hankel 变换	074
9.1.3 CCD 相关参数的确定	075
9.1.4 坐标变换	077
9.1.5 3D-PSF 归一化	077
9.2 软件设计与实现	077
9.2.1 3D-PSF 软件	077
9.2.2 数字共焦显微系统软件	079
9.3 本章小结	083
第 10 章 物镜移动下的三维显微图像采集方式	084
10.1 系统设计	084
10.2 光学系统点扩散函数误差分析	084
10.3 三维样本仿真实验	087
10.4 本章小结	090
第 11 章 3D-PSF 空域大小与图像复原关系	091
11.1 3D-PSF 径向大小与图像复原的关系	091
11.1.1 3D-PSF 的结构	091
11.1.2 3D-PSF 能量分布	092
11.1.3 3D-PSF 空域大小	093
11.1.4 3D-PSF 径向大小与图像复原关系	093
11.1.5 构造数学模型	099
11.1.6 3D-PSF 的选取	100
11.2 3D-PSF 层距与图像复原的关系	101
11.2.1 3D-PSF 采样定理分析	101
11.2.2 3D-PSF 不同层距与图像复原关系分析	101
11.2.3 仿真实验和结果分析	102
11.2.4 结果分析	106
11.3 本章小结	107
第 12 章 相同空间大小 3D-PSF 的层数与图像复原	108
12.1 3D-PSF 结构	108
12.2 卷积中 3D-PSF 的空间大小	109
12.3 3D-PSF 采样分析	109
12.4 相同空间大小 3D-PSF 层数确定	110
12.5 仿真实验与分析	110
12.5.1 三维显微生物样本 f , 3D-PSF 以及三维样本切片图像 g	110

12.5.2	仿真实验及结果分析	111
12.5.3	构造数学关系	114
12.5.4	3D-PSF 的选取	116
12.6	本章小结	116
第 13 章	基于复原效率曲线拐点的 3D-PSF 空间大小选取方法	117
13.1	3D-PSF 直径大小对图像复原影响的理论分析	117
13.2	图像复原效率及 3D-PSF 的选取方法	118
13.2.1	图像复原效率	118
13.2.2	基于图像复原效率的 3D-PSF 的选取方法	118
13.3	实验与分析	119
13.3.1	仿真图像和 3D-PSF 构建	119
13.3.2	仿真实验	120
13.3.3	曲线拟合	121
13.3.4	确定“可选最小空间 3D-PSF”	121
13.3.5	3D-PSF 选取	122
13.4	本章小结	123
第 14 章	光学显微成像系统 3D-PSF 能量分布	124
14.1	3D-PSF 的实现	124
14.2	3D-PSF 离散空间点数与真实空间大小的关系	125
14.2.1	3D-PSF 轴向点数与真实轴向空间大小的关系	125
14.2.2	3D-PSF 径向点数与真实径向空间大小的关系	125
14.3	3D-PSF 在空间中的能量分布	126
14.3.1	3D-PSF 能量比概念的提出	126
14.3.2	3D-PSF 能量分布理论分析	126
14.3.3	仿真实验	127
14.3.4	轴向能量与径向能量分布	129
14.3.5	3D-PSF 能量比空间分布模型	134
14.4	本章小结	134
第 15 章	3D-PSF 能量分布的选取方法	136
15.1	基于能量分布的 3D-PSF 选取	136
15.1.1	3D-PSF 的能量分布	136
15.1.2	基于能量分布的 3D-PSF 选取方法	136
15.1.3	选取方法的实现	137
15.2	基于图像复原效率的 3D-PSF	140
15.2.1	图像复原效率	140
15.2.2	基于图像复原效率的 3D-PSF 选取	141
15.2.3	选取方法的实现	142
15.3	两种选取方法的应用与分析	144
15.3.1	基于能量分布的 3D-PSF 选取的应用	144

15.3.2 基于图像复原效率的 3D-PSF 选取的应用	146
15.4 本章小结	148
第 16 章 基于区间估计的 3D-PSF 空间大小选取方法	149
16.1 3D-PSF 的结构	149
16.2 基于区间估计的选取方法	150
16.3 仿真实验	152
16.4 实验结果分析	153
16.5 3D-PSF 的选取	154
16.5.1 建立选取模型	154
16.5.2 选取结果	156
16.6 本章小结	159
第 17 章 SIFT 算法与 3D-PSF 空间大小的选取	160
17.1 SIFT 算法	160
17.1.1 SIFT 特征检测	160
17.1.2 SIFT 特征匹配	161
17.2 SIFT 特征匹配与图像复原关系分析	163
17.3 仿真实验	163
17.3.1 仿真实验方法	164
17.3.2 实验结果与分析	164
17.4 选取方法的分析与比较	169
17.4.1 两种选取方法分析比较	170
17.4.2 与现有方法比较	171
17.5 本章小结	173
第 18 章 序列光学切片自动采集方法	174
18.1 引言	174
18.2 细胞光学切片采集过程	174
18.3 清晰度评价函数	175
18.4 自动聚焦的实现方法	175
18.5 生物细胞的序列切片采集	176
18.6 实验结果与分析	177
18.6.1 自动聚焦的实验	177
18.6.2 阈值 η_0 的验证	178
18.6.3 生物细胞序列切片实验	178
18.7 本章小结	179
第 19 章 基于数控电位器调节的压电陶瓷驱动电源研究	181
19.1 压电陶瓷驱动电源的设计要求	181
19.2 驱动电源工作原理及设计	182
19.2.1 高压稳压电源和前级高压稳压电路的设计	182
19.2.2 数控电位器的设计	184

19.2.3 功率放大电路的设计	186
19.2.4 放电回路的设计	187
19.3 功率放大电路级联放电回路的仿真分析	188
19.3.1 线性度分析	188
19.3.2 输出偏移量分析	189
19.3.3 动态响应分析	189
19.4 驱动电源性能测试	190
19.4.1 静态性能测试	190
19.4.2 动态响应测试	191
19.5 本章小结	192
第 20 章 基于遗传算法的离线优化模糊 PID 控制算法	194
20.1 常规闭环 PID 控制器	194
20.1.1 控制器参数整定	194
20.1.2 实验结果与分析	195
20.2 模糊 PID 控制	196
20.2.1 模糊 PID 控制器设计	196
20.2.2 隶属度函数与控制规律	196
20.2.3 实验结果与分析	198
20.3 基于遗传算法的模糊 PID 控制研究	199
20.3.1 基于遗传算法的模糊 PID 控制思想	199
20.3.2 参数离线优化	199
20.3.3 实验结果与分析	200
20.4 本章小结	202
第 21 章 压电陶瓷物镜驱动器控制系统设计与实现	204
21.1 系统结构总体设计方案	204
21.2 控制系统组成	205
21.2.1 压电陶瓷物镜驱动器	205
21.2.2 驱动电源	207
21.2.3 微位移传感器	209
21.2.4 信号调理电路	210
21.2.5 A/D 转换电路	210
21.2.6 微处理器	211
21.3 系统控制流程	212
21.4 控制系统各模块测试与分析	213
21.4.1 数控电位器测试分析	213
21.4.2 微位移传感器测试分析	214
21.4.3 A/D 转换模块测试分析	214
21.5 控制系统整体性能测试与分析	215
21.5.1 系统控制过程	215

21.5.2 系统测试量	215
21.5.3 系统测试结果及分析	216
21.6 本章小结	218
第 22 章 基于小功率运放桥式电路的压电物镜控制器驱动电源设计	220
22.1 控制器设计指标提出	220
22.1.1 控制器设计指标计算涉及的若干公式	220
22.1.2 控制器设计指标计算	220
22.2 项目组研制的驱动电源问题分析	222
22.2.1 高压数控电位器分析测试	223
22.2.2 功率放大电路分析测试	224
22.2.3 放电回路分析测试	225
22.3 压电物镜控制器的驱动电源设计	226
22.3.1 压电物镜控制器的组成	226
22.3.2 驱动电源类型选择	227
22.3.3 放大电路设计	227
22.3.4 高压直流源设计	230
22.3.5 微控制器及 DAC 选择	231
22.3.6 传感器信号调理模块介绍及 ADC 选择	232
22.4 驱动电源性能测试	234
22.4.1 电压输出线性度	234
22.4.2 峰值电流	236
22.4.3 方波响应	237
22.4.4 静态纹波	238
22.4.5 频率响应	239
22.5 本章小结	241
第 23 章 压电物镜控制器控制算法分析、实验对比及选取	242
23.1 项目组研究的控制算法分析	242
23.2 压电物镜控制器控制算法研究与分析	243
23.2.1 逆 Preisach 前馈补偿控制算法	243
23.2.2 PID 闭环控制算法	248
23.2.3 逆 Preisach 前馈补偿结合 PID 复合控制算法	248
23.3 三种控制算法实验比较分析	249
23.3.1 逆 Preisach 前馈补偿控制算法实验分析	249
23.3.2 PID 闭环控制算法实验分析	252
23.3.3 逆 Preisach 前馈补偿结合 PID 复合控制算法实验分析	253
23.4 PID 控制算法控制器实验测试	254
23.5 本章小结	256
第 24 章 实验 3D-PSF 的构建	257
24.1 实验点光源制作	257

24.2 实验 3D-PSF 的构建	257
24.2.1 荧光微珠光学切片图像采集	257
24.2.2 多图像平均	259
24.2.3 实验 3D-PSF 的构建	259
24.3 理论 3D-PSF 的构建	260
24.4 图像复原	261
24.4.1 对荧光微珠三维切片图像的复原	261
24.4.2 对生物荧光组织三维切片显微镜图像的复原	261
24.5 本章小结	263

第 1 章

绪 论

光学显微镜自 500 年前诞生以来^[1], 为人类探索微观世界提供了有力的工具。人们通过对传统光学显微镜不断的改进, 使其空间分辨率不断提高, 功能不断增加, 用途遍及生物、医学、半导体制造工艺、材料分析、固体表面检测等诸多领域。荧光光学显微镜使人们在生物医学的观察研究中获得了更为清晰的图像。随着科学研究的不断深入, 人们越来越需要研究微细结构的信息, 如在生物学和医学领域, 不但需要观察生物样本的组织 and 结构, 还需要观察生物样本内细胞的组织和结构, 以及遗传基因学中的基因排序、医学中病变组织的诊断等, 这都需要更为清晰的高分辨率图像信息。

1.1 光学显微镜分辨率极限

传统的宽场光学显微镜包括荧光光学显微镜, 已难以满足高分辨率的要求。其主要原因有以下两点:

(1) 光学显微镜光学系统存在着光学衍射效应^[2], 系统物面上的一个点经过系统后, 在像面上的像不再是一个点, 而是一个被称为艾里斑的斑点。这是光学显微镜分辨率的理论极限。通常, 普通可见光光学显微镜的分辨率最高只能达到 200 nm, 即根据普通光学显微镜的工作原理, 难以获得分辨率突破 200 nm 的光学显微镜。

(2) 光学显微镜在生物医学众多领域中观察的样本都是三维的。在使用光学显微镜观察透明的生物样本时, 只有在焦平面上的样本才能在像面上形成清晰的焦面像, 离焦平面上的所有样本物平面则在像面上形成各自离焦模糊图像。这些模糊图像叠加到焦面像上, 就形成一幅模糊的图像, 使分辨率降低^[3]。解决离焦模糊的办法通常是采用物理切片方式, 将样本切为一系列薄片, 再分别进行观察研究。但切片有两个主要的缺点: 当切片各部分分开后, 结构间的对准信息会丧失; 同时切片时存在不可避免的几何变形, 并且有些样本是不可进行切片的。因此普通光学显微镜在观察三维厚样本的实际应用中受到很大限制。

为此, 人们另辟途径, 相继研究提出了干涉显微镜、偏振光显微镜、全息成像、立体显微镜、激光共焦扫描显微镜、多光子显微镜等新方法。特别是激光共焦扫描显微镜已成为生物学和医学领域强有力的分析仪器, 广泛应用于工业探测、计量学、材料科学、半导体材料学和地质学等领域^[4]。

1.2 激光共焦扫描显微镜

激光共焦扫描显微镜是以光学为基础，融光学、机械和电子计算机为一体的高精度显微测试仪器。与普通光学显微镜相比，虽然成像机理仍是光学成像，但不同于普通光学显微镜的宽场照明和成像，激光共焦扫描显微镜采用共轭焦点技术^[5,6]，使光源、被照物和探测器前的探测针孔处在彼此对应的共轭位置上。激光光源经过物镜后会聚照射在焦平面上样本中的采样点，激发该点产生荧光，再经过物镜在像平面上形成像点。样本中的采样点与探测针孔重合，形成共焦，如图 1-1 所示。

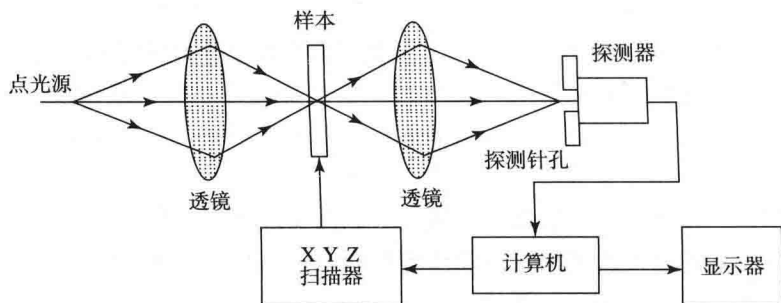


图 1-1 激光共焦扫描显微镜原理图

激光共焦扫描显微镜优点是只有焦平面上样本中的采样点被激光照射时才激发荧光，而离焦平面由于不受光源照射，不产生荧光。同时探测针孔只接收来自焦平面采样点的荧光，而阻拦离焦光及杂散光进入。这样通过扫描得到的图像只是样本中焦平面上的图像，去除了来自离焦平面虚像及杂散光的干扰，因此克服了普通荧光光学显微镜图像模糊和层析性差的缺点。将得到的图像信息数字化，通过计算机进行图像处理，可以得到相当高的横向分辨率（100 nm）和纵向分辨率（50 nm）^[7]。由于纵向分辨率高即层析性好的特性，人们可以利用它去记录厚样本特定截面像，从而获得样本的三维图像。然而，激光共焦扫描显微镜也存在以下缺点^[8,9]：由于激光作为光源聚焦在样本上，在观察荧光生物样本时，为激发荧光所需的大功率激光会造成对荧光物质的漂白作用，不仅会影响观察，而且也会造成对生物细胞的毒化作用，因此不宜长时间静态观察。此外，其成像原理是激光束逐点扫描，三维成像时间长，不适宜作高速动态观察。另外，激光共焦扫描显微系统结构复杂，采用了精密的硬件系统，整个系统价格昂贵。

对于在激光共焦显微技术的基础上发展的多光子显微镜^[10,11]，由于激发区域被精确地限制在激光束聚焦的焦平面区域，可克服激光共焦光漂白问题，减小了光损伤，增加了样本的使用寿命，但其价格更为昂贵。

1.3 数字共焦显微技术

20 世纪 80 年代出现了一种后来被称为数字共焦的显微技术。开始人们用探测器将光学显微镜的样本图像采集到计算机中进行存储和显示，并进行一些简单的图像处理。

数字图像处理技术和计算机性能的不断发展,使得人们有可能对采集到的图像作进一步大运算量的处理,包括图像去卷积复原、图像增强、几何纠正、图像分割、模式识别、三维重构、伪彩色加工以及分析测量等一系列图像处理功能,其中图像复原又形成了一系列针对三维显微图像的去卷积算法,逐渐形成了以数学算法为核心的数字共焦显微技术。

数字共焦显微技术以普通光学显微镜为基础,与 CCD 相机、步进驱动装置、计算机以及图像处理软件一起构成数字共焦光学显微系统^[12,13]。与激光共焦扫描显微技术不同,数字共焦显微技术不是通过物理的手段,而是采用数学的方法对从光学显微镜中采集的图像进行去卷积处理,去除离焦模糊信息而实现“共焦”,以此获取更高质量和高分辨率的二维、三维图像。图 1-2 所示为数字共焦光学显微系统原理图。

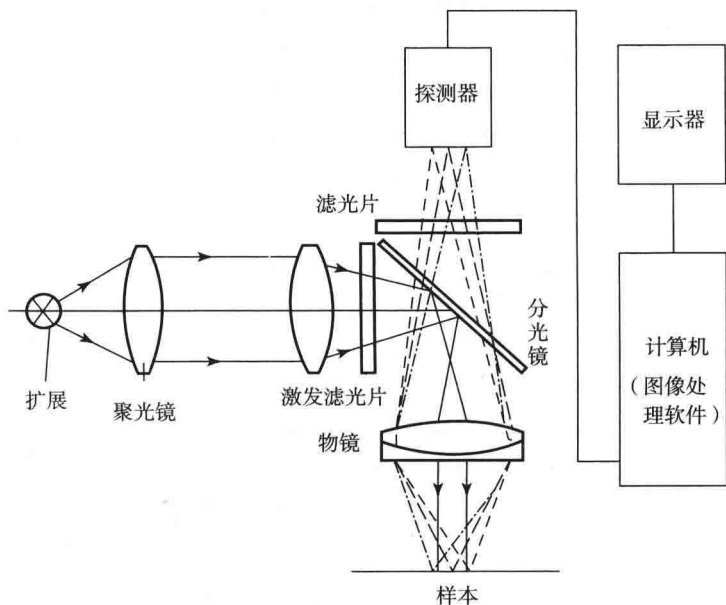


图 1-2 数字共焦光学显微系统原理图

数字共焦光学显微系统具有普通光学显微镜结构简单、使用便易的特点,并且可以在低光照下长时间照射对光敏感的活细胞,不存在强激光照射样本造成的光漂白现象和对生物细胞的毒化作用。其核心部分是处理软件,除了显微镜本身和运行软件的计算机、CCD 探测器外没有复杂昂贵的硬件系统。

目前,国际上这种数字共焦光学显微系统图像分辨率已接近激光共焦扫描显微系统^[9]。这主要得益于三维显微图像去卷积算法研究的不断进步。

1.4 数字共焦显微技术主要的研究内容

数字共焦显微技术的研究内容主要有两个方面,一是三维显微图像复原方法,二是序列光学切片采集控制技术。

1.4.1 三维显微图像复原方法

三维显微图像复原方法的研究,包括三维显微图像去卷积复原算法和三维点扩散函数 3D-PSF 的研究。

1. 三维显微图像去卷积复原算法

三维显微图像去卷积复原算法,通过数学计算方法去除图像中的离焦模糊信息,恢复样本原来清晰的结构和细节的方法。三维显微图像去卷积算法大部分是在二维去卷积算法的基础上,根据显微镜成像的特点发展而来,形成了一系列不同的技术和算法。例如,线性复原,包括逆滤波法、正则逆滤波法、维纳滤波法、正则最小平方方法等,非线性 Jansson-Van Citter (JVC) 法、正则最小平方迭代法等传统约束迭代法、最大似然法、最大后验法概率、最大熵法等统计迭代法、盲去卷积法、凸集投影法等。在对这些算法的研究中,已运用了超分的概念对算法进行分析^[18]。

三维显微图像复原的研究仍在发展,通常分为两类:领域法和图像复原法^[15]。

领域法^[21]的研究早在 20 世纪 70 年代已开始。1971 年 Weinstein 和 Castaleman 提出了由 2D 切片图像重构 3D 样本的邻域去模糊方法。领域法对显微镜得到的一系列光学切片模糊二维图像逐个进行去模糊处理,从而得到一系列清晰的二维图像集,因此领域法原则上属于二维算法。领域法简单快速,可有效改善图像对比度,但会降低信噪比,引入结构性假像。领域法主要有最近邻域法、多邻域法和非邻域法。目前国外的几乎所有的软件去卷积模块都包含领域法,甚至很多软件只有领域法。领域法主要用于对样本进行快速浏览。

图像复原法是真正三维去卷积操作的算法,由于它是对一系列光学切片进行三维计算,运算量较大,因此是在计算机性能普遍提高以后才逐渐发展起来的。它通过三维去卷积重新分布各个光学切片的光强,使其恢复原来的状态,从而达到图像复原的目的。图像复原法主要有线性复原法、传统约束迭代法、统计迭代法、盲去卷积法、凸集投影法等。

三维显微图像去卷积复原算法研究更侧重于在保证复原效果的同时,简化算法复杂性,加快处理速度,减少处理时间。将超分辨率图像复原技术应用于复原算法以及评价中。本项目组对这些方面进行了若干探索,内容包括第 3 章至第 8 章。

2. 三维点扩散函数 3D-PSF

三维显微图像去卷积复原算法是根据显微镜光学系统成像模型研究设计的,体现系统成像模型的核心显微镜光学系统的三维点扩散函数 3D-PSF。三维显微图像去卷积算法复原效果如何,除了算法本身之外,还取决于所估计的 3D-PSF 是否准确反映光学系统成像规律。关于光学系统 3D-PSF,其理论基础研究较早。20 世纪 50—60 年代 Lommel^[23]对光学系统焦点附近一些特定散焦面上的光强分布进行了计算,之后 Stokseth^[24]根据 Hopkins 给出的散焦光学系统的光学传递函数公式推导出近似形式,为光学显微镜光学系统 3D-PSF 的研究与应用奠定了理论基础。

20 世纪 80—90 年代 Agard D A、Preza C 和 Keller H E 等^[25-27]将这些理论引入显微成像及复原的研究,形成了显微镜光学系统 3D-PSF 的线性空间不变双锥体(或双漏斗)模型。2003 年 Preza C、Conchello J A 等^[28]基于生物样本和沉浸媒介间折射率的失配问题,提出随深度变化的 3D-PSF 模型和评价方法,并提出了基于随深度变化 3D-PSF 模型的三维显微图像最大似然复原方法。国内四川大学何小海等^[29,30]提出了高斯型的 3D-PSF 近似模

型,并对随深度变化的3D-PSF及相应复原进行了研究。北京航空航天大学姜志国^[31]教授指导研究生研究了3D-PSF的理论估计。

3D-PSF的空间大小和密度,在各种算法中与复原效果和运算速度密切相关。3D-PSF空间大小选取越大,切片密度越高,复原效果越好,同时处理时间越长,并且存在着非线性关系。目前在进行图像复原时,只选取3D-PSF中部的一小部分能量密度大的空间区域,而舍去3D-PSF周围大部分能量稀少区域。在何种复原效果或速度要求的情况下选取何种空间大小和密度的3D-PSF,没有明确的做法,这不利于去卷积复原算法研究中算法的比较和结果的评价。在实际光学切片采集和复原处理应用中,会由于采样稀疏、3D-PSF选取不够造成复原效果达不到要求,或由于采样过密、3D-PSF选取过度造成复原时间过长。为了规范3D-PSF空间大小和密度的合理选取,提高选取时的理论依据和确定性,有必要对3D-PSF空间大小和密度与复原效果和速度的关系,以及3D-PSF的选取方法进行研究。本项目组开展了对这方面的研究和探索,内容包括第2章、第9章至第17章。

1.4.2 序列光学切片采集控制技术

三维显微图像去卷积算法复原的对象,是对生物样本进行亚微米等间距光学切片采集的序列图像。为了保证准确的亚微米等间距序列光学切片采集的实现,需要开展亚微米等间距步进驱动控制技术的研究。该研究成为数字共焦显微技术的基础性重要工作^[32,33]。

为实现显微物镜和载物台之间纳米级的相对微位移,可以采用压电陶瓷驱动技术。压电陶瓷在纳米技术、微电子技术、微操作技术、现代生物技术和精密加工等领域的应用越来越广泛。近年来,国内外的许多高校和科研单位陆续对压电陶瓷驱动器的控制展开相关研究,提出了许多解决方法并取得了较大的进展。

1. 压电陶瓷驱动器的控制模型

由于压电陶瓷驱动器具有非线性特性与迟滞特性,给其控制带来了一定的困难。采用压电陶瓷建立数学模型是对其控制的主要方式之一。其中包括多项式拟合及一些主要的数学模型,Maxwell模型^[34]、Preisach模型^[35]、Prandtl-Ishlinskii (PI)模型^[36]及FIANN模型等,其中目前最受关注的是Preisach模型。

2. 压电陶瓷驱动器的控制方法

为了解决压电陶瓷驱动器因迟滞特性而引起输出非线性现象,其控制方法采用电压控制和电荷控制两种类型。电压控制又分为采用各种压电模型的电压前馈控制和采用各类传感器的电压反馈控制,电荷控制包括电荷前馈控制和电荷反馈控制。

3. 压电陶瓷驱动器控制系统

目前,国内外许多企业、科研都对压电陶瓷驱动器控制设备进行了深入的研究。其中商业化比较好的有:德国PI (Physik Instrument)公司开发的微定位系统及各种其他相关产品,既可达到纳米级别的高精度,又可达到毫米甚至是分米级别的大位移^[37];德国Piezomechanik公司和Piezosystem Jena公司的压电陶瓷驱动器及相关控制设备;美国Queensgate公司研制的二维工作台,行程 $50\text{ }\mu\text{m}\times 1\,500\text{ }\mu\text{m}$,重复定位精度为 1 nm ,非线性误差 0.22% ^[38];国内的哈尔滨芯明天科技公司的压电平移偏转台系列^[39],闭环线性度能达到 0.05% F.S.,重复定位精度达到 0.02% F.S.;哈尔滨博实精密的纳米级精密定位工作台等^[40],位移分辨率达到 2 nm 。国内还有一些企业及科研单位在这方面都取得了不错的成

效,促进了相关产品的国产化。

本项目组在压电陶瓷驱动器控制技术方面进行了若干研究,内容包括第18章至第23章。

1.5 本书常涉及算法及评价指标

数字共焦显微技术的核心是图像复原算法,或者称图像去卷积,它是通过数学计算方法把由于光学系统成像过程中引起图像模糊的信息去除,恢复样本原来清晰的细节。本节把本书常涉及算法及评价指标说明如下。

1.5.1 贝叶斯 (Bayes) 图像复原迭代法

Bayes 迭代法是一类精确的非线性复原方法,包括最大似然法 (maximum likelihood, ML)、最大后验法概率 (maximum a posterior, MAP)、最大熵法 (maximum entropy) 等。Bayes 迭代法是基于 Bayes 统计分析^[41-44]的复原方法,其基本思想如下:

假设图像是一个非平稳随机场,即可把原图像 f 和退化图像 g 均作为随机场。根据 Bayes 分析理论,在已知图像 g 的条件下,物体 f 的概率可写成为

$$P(f/g) = \frac{P(g/f)P(f)}{P(g)} \quad (1-1)$$

这里 $P(f/g)$ 为已知图像 g 物体为 f 的条件概率 (后验概率); $P(g/f)$ 为已知物体 f 图像为 g 的概率; $P(f)$ 和 $P(g)$ 分别表示物体和图像的先验概率。通过适当的选择 f 使 $P(f/g)$ 达到最大,这时对应的 f 就是复原的最佳估计。此时有

$$\max[P(f/g)] = \max\left[\frac{P(g/f)P(f)}{P(g)}\right] \quad (1-2)$$

式 (1-2) 等价于

$$\text{Max}\{\ln[P(g/f)] + \ln[P(f)]\} \quad (1-3)$$

对式 (1-2) 最大化计算,主要有两种方法:

1. ML 算法 (Lucy-Richardson 算法)

20 世纪 70 年代早期, Lucy^[41] 和 Richardson^[42] 独立发表了关于基于 Bayes 理论的迭代图像复原算法的论文。这种算法称为最大似然算法,简称 ML 算法。该算法表达式如式 (1-4) 所示。

$$\hat{f}^{(n+1)} = \hat{f}^{(n)} \left[\frac{g}{h \cdot \hat{f}^{(n)}} \oplus h \right] \quad (1-4)$$

这是一种迭代算法。该算法对每一次迭代结果乘以一个中括号内的校正项,使复原图像不断接近原始图像。随着误差的减小,校正项趋近于 1。校正项中的卷积运算使在出现噪声时保持算法稳定。1988 年 Holmes 等将 ML 算法应用于 3D 显微图像的复原^[45]之后,得到了广泛的研究和应用^[46]。

2. MAP 算法 (Poisson-MAP 算法)

MAP 复原算法同样基于 Bayes 理论和迭代解法,其算法表达式如下: