



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116266013 A

(43) 申请公布日 2023.06.20

(21) 申请号 202211622398.3

(22) 申请日 2022.12.16

(30) 优先权数据

21215122.9 2021.12.16 EP

(71) 申请人 莱卡微系统CMS有限责任公司

地址 德国威茨勒

(72) 发明人 凯·瑞特舍尔 奥利弗·施利克

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

专利代理师 宋融冰

(51) Int. Cl.

G02B 21/00 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

G06T 5/40 (2006.01)

G06T 7/90 (2017.01)

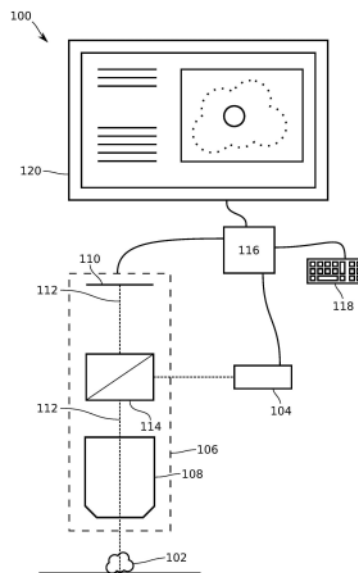
权利要求书2页 说明书6页 附图5页

(54) 发明名称

荧光显微镜系统和方法

(57) 摘要

一种荧光显微镜系统(100)包括光学检测系统(106),该光学检测系统被配置成捕获样品(102)的原始图像(300),该原始图像(300)包括多个像素,每个像素具有亮度值。荧光显微镜系统(100)还包括处理器(116)。处理器(116)被配置成确定原始图像(300)中的无效像素,为每个无效像素分配预定值,确定包括多个像素中除无效像素之外的大多数像素的亮度值的亮度值范围(410),并基于所确定的亮度值范围(410)生成样品(102)的处理后的图像(306)。



1. 一种荧光显微镜系统(100),包括:
光学检测系统(106),所述光学检测系统(106)被配置成捕获样品(102)的原始图像(300),所述原始图像(300)包括多个像素,每个像素具有亮度值;以及
处理器(116),所述处理器(116)被配置成
确定所述原始图像(300)中的无效像素;
为每个无效像素分配预定值;
确定包括所述多个像素中除所述无效像素之外的大多数像素的亮度值的亮度值范围(410);以及
基于确定的所述亮度值范围(410)生成所述样品(102)的处理后的图像(306)。
2. 根据权利要求1所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述处理器(116)被配置成为所述亮度值范围(410)中的每个亮度值分配不同的颜色值,并且基于所述分配生成所述处理后的图像(306)作为伪彩色图像。
3. 根据权利要求2所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述处理器(116)被配置成为所述预定值分配预定颜色值,并且基于所述分配生成所述处理后的图像(306)作为伪彩色图像。
4. 根据权利要求3所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述预定颜色值是所述颜色值范围的色调的补色。
5. 根据权利要求2至4中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述荧光显微镜系统(100)具有存储器元件,所述存储器元件包括至少一个查找表;其中所述查找表将亮度值与颜色值相关;并且其中所述处理器(116)被配置成基于所述查找表生成所述处理后的图像(306)作为伪彩色图像。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述处理器(116)被配置成确定所述原始图像(300)的像素是否饱和,并将每个饱和像素确定为所述无效像素之一。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述处理器(116)被配置成确定所述原始图像(300)的像素的所述亮度值是否是计算误差的结果和/或检测误差的结果,并且将每个这样的像素确定为所述无效像素之一。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述处理器(116)被配置成确定所述原始图像(300)的每个像素的置信度值,并将置信度值低于预定阈值的每个像素确定为所述无效像素之一。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述处理器(116)被配置成在所述处理器(116)为每个无效像素分配所述预定值之后,确定所述原始图像(300)的亮度直方图(400),所述亮度直方图(400)包括每个亮度值的像素数;并且其中所述处理器(116)被配置成基于所述亮度直方图(400)确定所述亮度值范围(410)。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述预定值是最小亮度值或最大亮度值。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述荧光显微镜系统(100)包括照明系统(104),所述照明系统(104)被配置成发射激发光以激发位于所述样品(102)内的至少一种荧光团;其中所述光学检测系统(106)被配置成基于受激荧光团发

射的荧光生成所述原始图像(300);并且其中所述原始图像(300)的所述亮度值对应于荧光强度。

12.根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述荧光显微镜系统(100)被配置用于荧光宽视场显微术。

13.根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述荧光显微镜系统(100)被配置用于共焦激光扫描显微术。

14.根据前述权利要求中任一项所述的荧光显微镜系统(100),其中,所述荧光显微镜系统(100)包括输出单元(120),所述输出单元(120)被配置成显示所述原始图像(300)和/或所述处理后的图像(306)。

15.一种利用荧光显微镜系统(100)生成样品(102)的处理后的图像(306)的方法,包括以下步骤:

用所述显微镜系统的光学检测系统(106)捕获所述样品(102)的原始图像(300),所述原始图像(300)包括多个像素,每个像素具有亮度值;

确定所述原始图像中的无效像素(300);

为每个无效像素分配预定值;

确定亮度值范围(410),所述亮度值范围(410)包括所述多个像素中除所述无效像素之外的大多数像素的亮度值;以及

基于确定的所述亮度值范围(410)生成所述样品(102)的处理后的图像(306)。

荧光显微镜系统和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光显微镜系统。本发明还涉及一种利用荧光显微镜系统生成样品的处理后的图像的方法。

背景技术

[0002] 荧光显微图像包括多个像素，每个像素对应于荧光显微测量的数据点。在大多数情况下，每个像素具有对应于检测到的荧光强度的亮度值。在其他情况下，荧光显微图像是例如借助于光谱解混算法的数学重构的结果。在这些情况下，每个像素还可以被分配置信度值，该置信度值代表算法已经确定相应像素的亮度值的确定性。

[0003] 荧光显微图像的像素可能被认为是无效的原因有多种。例如，像素可能饱和，例如由于检测到的荧光强度超过了检测器的动态范围。也有可能检测器读出期间出现误差，导致一个或多个像素具有与荧光强度不对应的亮度值。此外，如果在荧光强度的数学重构期间出现误差，导致与相应像素相关联的低置信度值，则像素可能被认为是无效的。无效像素是荧光显微图像中的伪像，在显示或进一步处理图像时必须考虑这些伪像。

[0004] 在荧光显微术中，通常使用只利用检测器动态范围的小范围的弱信号工作。为了更好地显示该弱信号，选择包括该信号的亮度值范围，即包括关于样品的信息的亮度值范围，并将其扩展到显示单元的全动态范围。然而，由于无效像素不包括关于该样品的信息，该无效像素干扰亮度值范围的确定。

发明内容

[0005] 因此，一个目的是提供一种荧光显微镜系统和一种利用荧光显微镜系统生成样品的处理后的图像的方法，其能够以可靠和鲁棒的方式从样品的原始图像中提取关于样品的相关信息。

[0006] 前述目的通过独立权利要求的主题来实现。在从属权利要求和以下描述中限定了有利的实施例。

[0007] 所提出的荧光显微镜系统包括光学检测系统，光学检测系统被配置成捕获样品的原始图像。原始图像包括多个像素，每个像素具有亮度值。荧光显微镜系统还包括处理器。该处理器被配置成确定原始图像中的无效像素，为每个无效像素分配预定值，确定包括多个像素中的除无效像素之外的大多数像素的亮度值的亮度值范围，以及基于所确定的亮度值范围生成样品的处理后的图像。

[0008] 预定值可以是数字亮度值、NaN或另一种数字或非数字数据类型。通过为无效像素分配预定值，对无效像素进行标记。由于预定值替换了无效像素的亮度值，所以不需要另外的存储器来存储某个像素是否有效的信息。此外，预定值可以容易地被普通的图像分析和处理程序过滤。因此，用预定值标记无效像素也增加了互操作性。

[0009] 原始图像的所有非无效像素在下文中被称为有效像素。这些有效像素的亮度值对应于由荧光显微镜系统测量和/或确定的荧光强度。因此，有效像素包括关于用荧光显微镜

系统观察的样品的相关信息。当选择亮度值范围时,预定值被排除。换句话说:通过排除预定值,当确定亮度范围时,仅考虑有效像素,即最可能包含关于样品的相关信息像素。由此,荧光显微镜系统以可靠和鲁棒的方式从原始图像中提取关于样品的相关信息。然后,基于亮度值范围,例如通过将亮度值范围扩展或拓展到全动态范围,来生成处理后的图像。

[0010] 在优选实施例中,处理器被配置成为亮度值范围中的每个亮度值分配不同的颜色值,并基于所述分配生成处理后的图像作为伪彩色图像。优选地,所有颜色值具有相同的色调。在此实施例中,荧光显微镜系统通过向用户呈现样品的彩色图像来帮助用户识别处理后的图像中的相关信息。因此,荧光显微镜系统使用户更高效地工作。

[0011] 在另一个优选实施例中,处理器被配置成为预定值分配预定颜色值,并基于所述分配生成处理后的图像作为伪彩色图像。优选地,预定颜色值是颜色值范围的色调的补色。在此实施例中,无效像素在处理后的图像中被突出显示。这允许用户快速识别它们,并允许用户更高效地工作。

[0012] 在另一个优选实施例中,荧光显微镜系统具有存储器元件。存储器元件包括至少一个查找表。查找表将亮度值与颜色值相关。处理器被配置成基于查找表生成处理后的图像作为伪彩色图像。在此实施例中,原始图像的亮度值与处理后的图像的颜色值之间的关系以查找表的形式被存储。备选地,原始图像的亮度值与处理后的图像的颜色值之间的关系可以以函数关系的形式存储。

[0013] 在另一个优选实施例中,处理器被配置成确定原始图像的像素是否饱和,并将每个饱和像素确定为无效像素之一。当原始图像的像素的亮度值处于最大值时,原始图像的像素是饱和的。这意味着,例如,在与相应像素对应的检测器位置接收的荧光强度超过了检测器的动态范围。高荧光强度可能例如是样品中密集的蛋白质积聚的结果。因此,荧光强度的实际值可能远高于检测到的最大值。因此,饱和像素不代表实际数据,并且需要被丢弃,即被确定为无效的。

[0014] 在另一个优选实施例中,处理器被配置成确定原始图像的像素的亮度值是否是计算误差的结果和/或检测误差的结果,并且将每个这样的像素确定为无效像素之一。计算误差可能例如在光谱解混期间出现。检测误差的示例是光片伪像。计算误差和检测误差都不代表实际数据,并且因此需要确定为无效的。

[0015] 在另一个优选实施例中,处理器被配置成确定原始图像的每个像素的置信度值,并将置信度值低于预定阈值的每个像素确定为无效像素之一。在此实施例中,可以使用例如机器学习算法来获得原始图像,该机器学习算法为原始图像的每个像素分配置信度值。置信度值是处理器确定相应像素的亮度值的确定性的度量。置信度值越低,数据越不可信。因此,通过忽略具有低置信度值的像素,处理后的图像变得更能代表实际样品。

[0016] 在另一个优选实施例中,处理器被配置成在处理器为每个无效像素分配预定值之后确定原始图像的亮度直方图,亮度直方图包括每个亮度值的像素数。处理器被配置成基于亮度直方图确定亮度值范围。特别地,处理器被配置成从亮度直方图中排除预定亮度值。亮度直方图为每个亮度值计数原始图像的像素数。通过分析亮度直方图,特别是亮度直方图曲线中的峰和谷,处理器可以确定亮度值范围。

[0017] 在另一个优选实施例中,预定值是最小亮度值或最大亮度值。最小亮度值和最大亮度值都不可能包含关于样品的实际信息。因此,最小亮度值和最大亮度值可以用来标记

无效像素,而不会丢失实际信息。这节省了存储器,因为无效像素的亮度值被替换。

[0018] 在另一个优选实施例中,荧光显微镜系统包括照明系统,该照明系统被配置成发射激发光以激发位于样品内的至少一种荧光团。光学检测系统被配置成基于受激荧光团发射的荧光生成原始图像。在此实施例中,原始图像的亮度值对应于受激荧光团发射的荧光的强度。照明系统可以包括一个或多个光源,特别是相干光源,光源被配置成发射激发光。当照明系统包括两个或更多个不同的光源时,每个光源可以被配置成产生特定的激发光。备选地,照明系统可以包括白光光源和可互换的滤光器单元,该滤光器单元包括两个或更多个滤光器,这些滤光器阻挡除单一波长或波长范围之外的白光的所有波长,以便生成不同的激发光。

[0019] 在另一个优选实施例中,荧光显微镜系统被配置用于荧光宽视场显微术。附加地或备选地,荧光显微镜系统被配置用于共焦激光扫描显微术。

[0020] 在另一个优选实施例中,荧光显微镜系统包括输出单元,该输出单元被配置成显示原始图像和/或处理后的图像。

[0021] 本发明还涉及一种利用荧光显微镜系统生成样品的处理后的图像的方法。该方法包括以下步骤:用显微镜系统的光学检测系统捕获样品的原始图像,该原始图像包括多个像素,每个像素具有亮度值。确定原始图像中的无效像素。为每个无效像素分配预定值。确定亮度值范围,该亮度值范围包括多个像素中的除无效像素之外的大多数像素的亮度值。基于所确定的亮度值范围来生成样品的处理后的图像。

[0022] 该方法具有与上述荧光显微镜系统相同的优点。特别地,可以使用针对荧光显微镜系统的从属权利要求的特征来补充该方法。

附图说明

[0023] 在下文中,参考附图描述具体实施例,其中:

[0024] 图1是根据一个实施例的荧光显微镜系统的示意图;

[0025] 图2是一种利用根据图1的荧光显微镜系统生成样品的处理后的图像的方法的流程图;

[0026] 图3a是原始图像的示意图;

[0027] 图3b是处理后的图像的示意图;以及

[0028] 图4是原始图像的亮度直方图。

具体实施方式

[0029] 图1是根据一个实施例的荧光显微镜系统100的示意图。

[0030] 荧光显微镜系统100被配置成借助于荧光显微术捕获样品102的原始图像300(参见图3a)。荧光显微镜系统100的照明系统104被配置成生成激发光以激发位于样品102内部的荧光团。荧光显微镜系统100的光学检测系统106被配置成基于受激荧光团发射的荧光生成样品102的原始图像。光学检测系统106包括指向样品102的物镜108,以及检测器元件110。物镜108接收受激荧光团发射的荧光,并将荧光引导至检测光束路径112中。在本实施例中,分束器114位于照明光束路径与检测光束路径112的交点处,在本实施例中,照明光束路径与检测光束路径112彼此垂直。分束器114被配置成使得激发光经由物镜108被引导到

样品102中。分束器114还被配置成使得由物镜108接收的荧光被引导朝向检测器元件110。

[0031] 荧光显微镜系统100还包括处理器116、输入单元和输出单元。处理器116连接到照明系统104和光学检测系统106,并被配置成控制照明系统104和光学检测系统106,以便获取样品102的原始图像300。处理器116连接到输入单元118和输出单元120,并被配置成经由输入单元118接收用户输入。在本实施例中,输入单元118被示例性地配置成计算机键盘。备选地,可以使用其他输入单元,诸如计算机鼠标、操纵杆或轨迹球。特别地,荧光显微镜系统100被设置成使得可以使用许多不同的输入设备。因此,用户可以选择他们最舒适的输入设备。

[0032] 控制单元还被配置成执行用于从原始图像300生成样品102的处理后的图像的方法,并且经由输出单元120向用户输出原始图像300和处理后的图像306(参见图3b)。下面参考图2至图4描述该方法。

[0033] 图2是利用上述荧光显微镜系统100生成样品102的处理后的图像306的方法的流程图。

[0034] 该过程在步骤S200开始。在步骤S202中,处理器116控制照明系统104发射激发光,以便激发位于样品102内部的荧光团。处理器116还控制光学检测系统106以捕获由受激荧光团发射的荧光,并由捕获的荧光生成原始图像300。原始图像300包括多个像素,每个像素具有亮度值。步骤S202可以由用户输入触发。在步骤S204中,处理器116确定原始图像300中的无效像素。无效像素可以是饱和像素,计算误差的结果或检测误差的结果。在任何情况下,无效像素都不代表实际数据。在步骤S206中,处理器116为每个无效像素分配预定的亮度值。该预定值可以是最大值、最小值或诸如NaN的另一种数据类型,并且唯一地将像素标记为无效像素。原始图像300的所有其他像素在下文中被称为有效像素。步骤S206的结果是修改后的原始图像300。

[0035] 在任意的步骤S208中,处理器116确定修改后的原始图像300的亮度直方图400(参见图4)。处理器116可以经由输出单元120向用户输出亮度直方图400。在步骤S210中,处理器116确定亮度值范围410(参见图4),该亮度值范围包括修改后的原始图像300的像素中的大部分像素但不包括无效像素的亮度值。当在步骤S208中确定亮度直方图400时,亮度值范围410的确定可以基于亮度直方图400。特别地,亮度值范围410的确定可以基于对亮度直方图400的曲线的分析,例如通过分析亮度直方图400的峰。下面参考图4更详细地描述基于亮度直方图400的亮度值范围410的确定。

[0036] 在步骤S212中,处理器116基于亮度值范围410从修改后的原始图像300生成样品102的处理后的图像306。特别地,处理器116将查找表应用于修改后的原始图像300,该查找表为亮度值范围410中的每个亮度值分配颜色值,优选为单一色调的颜色值。由此,生成了伪彩色图像。在此实施例中,选择查找表,使得亮度值范围410扩展到输出单元120的全动态范围。这意味着丢弃无效像素和未使用的亮度值,即不对应于修改后的原始图像300中的像素或只对应于修改后的原始图像300中的几个像素的亮度值。因此,使实际数据对用户来说更加可见。任选地,查找表可以将预定颜色值分配给预定亮度值,即无效像素。优选地,用于标记无效像素的颜色值的色调与用于给有效像素着色的颜色值的色调互补。因此,无效像素被清楚地标记,并且对用户可见。在任意的步骤S214中,用户可以调整亮度值范围410。当用户重新调整亮度值范围410时,处理器116使用调整后的亮度值范围410重复步骤S212。该

过程在步骤S216中结束。

[0037] 图3a是样品102的原始图像300的示意图。

[0038] 原始图像300包括由样品102中心的饱和像素构成的第一区域302。饱和像素在图3a中由实线示出。原始图像300中的饱和像素对应于检测到超过相应检测器像素容量的荧光强度的检测器元件110的像素。实际的荧光强度可能远高于分配给饱和像素的最大值。高荧光强度可能是例如由于样品102的相应区域中荧光团的高浓度。由于实际荧光强度在检测器元件110的动态范围之外，所以无法测量实际荧光强度。因此，饱和像素不代表实际数据。

[0039] 原始图像300还包括由围绕样品102中心的非常暗的像素构成的第二区域304。暗像素对应于弱荧光信号，并在图3a中由虚线示出。在原始图像300中，饱和像素比暗像素更亮，使得暗像素几乎不可见。例如，暗像素可以具有在0与大约200之间的亮度值，而亮度值的全范围在0与65536之间。为了使对应于暗像素的样品102的结构可见，需要重新调节原始图像300的亮度。为此，处理器116执行上文参考图2描述的方法。下面参考图3b描述得到的处理后的图像306。在上面的示例中，处理器116将亮度值范围确定为0到200，并将该亮度值范围410拓展到全范围，以便生成处理后的图像306。

[0040] 图3b是处理后的图像306的示意图。

[0041] 在处理后的图像306中，暗像素清晰可见。这在图3a中由用实线示出的暗像素代表。用来标记无效像素的预定值在亮度值范围之外。因此，饱和像素在处理后的图像306中不可见。

[0042] 图4是原始图像300的亮度直方图400。

[0043] 亮度直方图400的横坐标402表示亮度值。亮度直方图400的纵坐标404表示每个亮度值的像素数。亮度直方图400右侧的单个峰406代表已经被分配了最大亮度值作为预定值的无效像素。实际数据由亮度直方图400左侧的峰和谷的集合408代表。

[0044] 在上面参考图2描述的方法的步骤S208中确定的亮度值范围410在图4中由双箭头示出。亮度范围可以从亮度直方图400确定，例如作为包括所有有效像素的预定百分比的范围。备选地，可以确定最大亮度值，对于该最大亮度值，具有所述亮度值的像素数高于某个阈值。该最大亮度值然后可以被设定为亮度值范围410的上限。

[0045] 在所有附图中，相同或相似作用的元件用相同的附图标记表示。如本文所用，术语“和/或”包括相关联的列出项目中的一个或多个的任何和所有组合并且可以缩写为“/”。

[0046] 实施例的各个特征和这些特征彼此之间的所有组合都被认为是公开的。此外，实施例的各个特征被认为是与前面描述的各个特征或特征组相组合和/或与权利要求的各个特征或特征组相组合而公开的。

[0047] 尽管已经在装置的上下文中描述了一些方面，但是清楚的是，这些方面也代表对应方法的描述，其中框或设备对应于方法步骤或方法步骤的特征。类似地，在方法步骤的上下文中描述的方面也代表对应装置的对应框或项目或特征的描述。

[0048] 参考符号列表

[0049] 100 荧光显微镜系统

[0050] 102 样品

[0051] 104 照明系统

- [0052] 106 光学检测系统
- [0053] 108 物镜
- [0054] 110 检测器元件
- [0055] 112 检测光束路径
- [0056] 114 分束器
- [0057] 116 处理器
- [0058] 118 输入单元
- [0059] 120 输出单元
- [0060] 300 图像
- [0061] 302,304区域
- [0062] 306 图像
- [0063] 400 亮度直方图
- [0064] 402 横坐标
- [0065] 404 纵坐标
- [0066] 406 峰
- [0067] 408 集合
- [0068] 410 亮度值范围

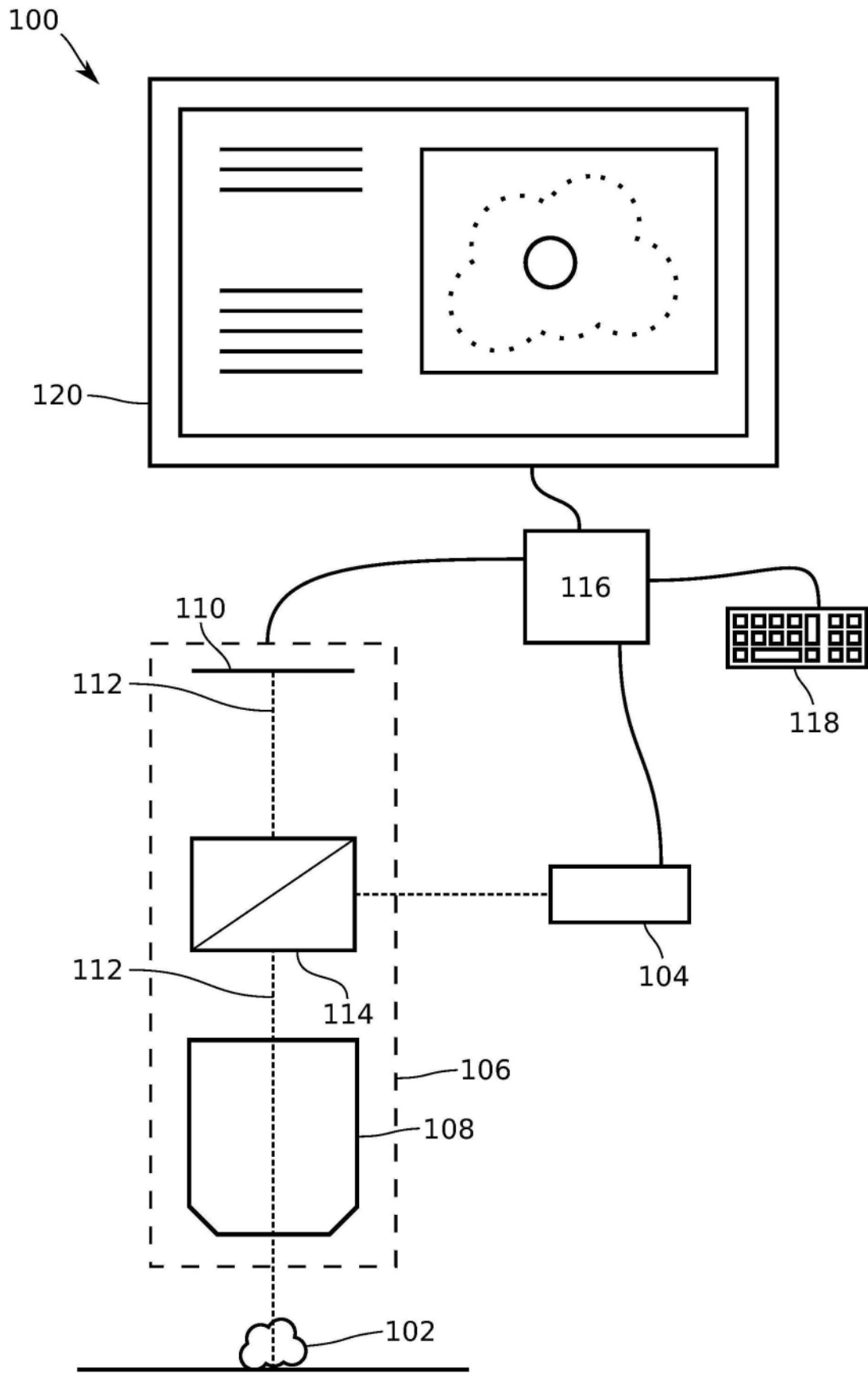


图1

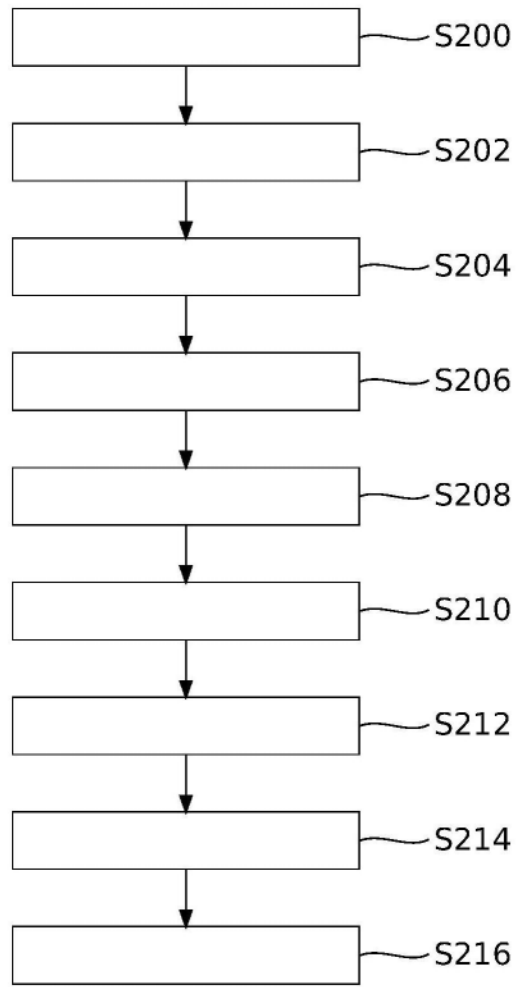


图2

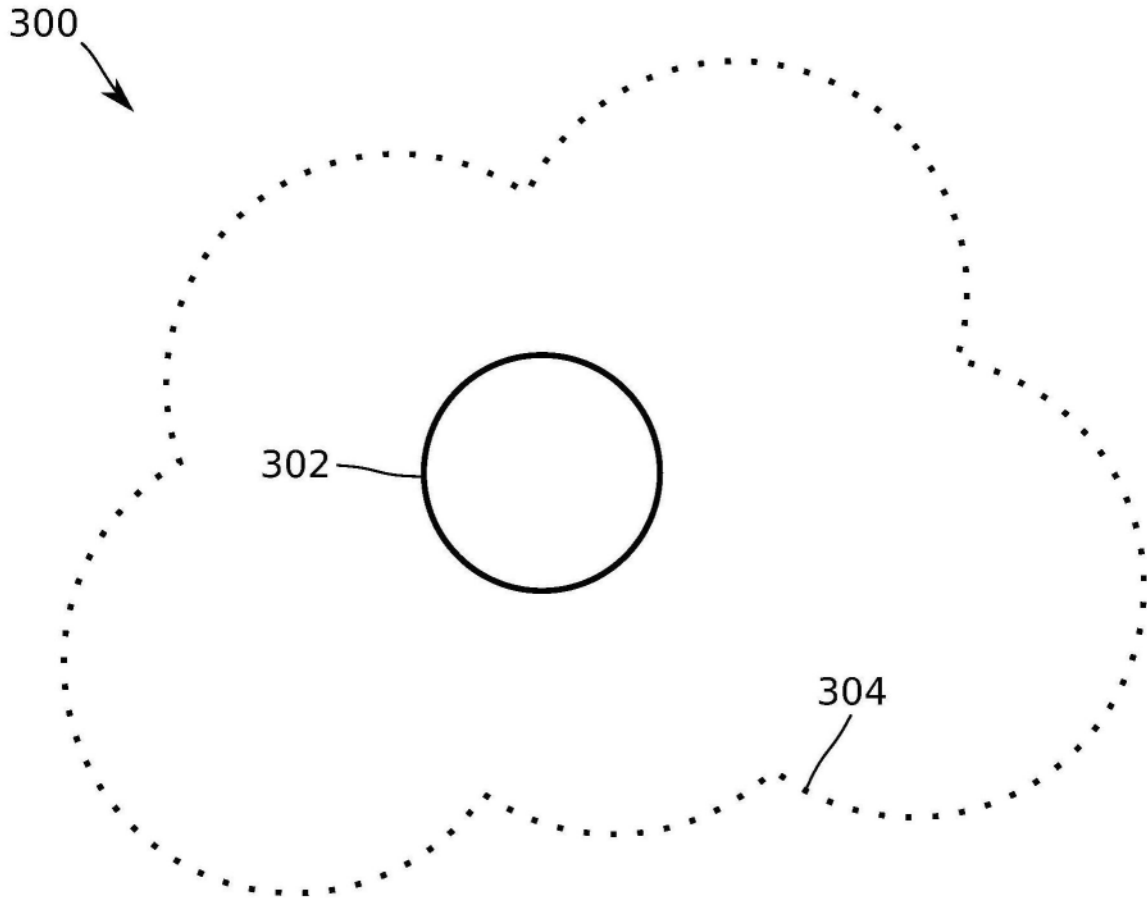


图3a

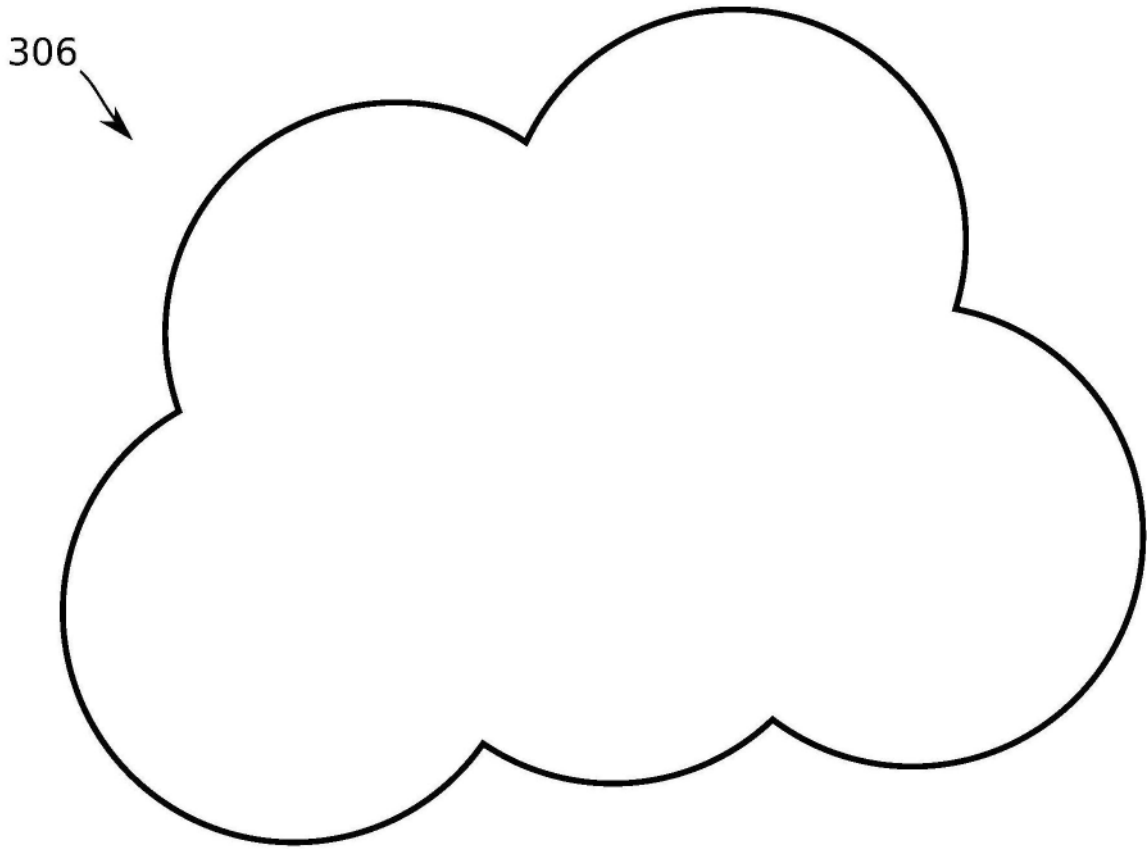


图3b

400

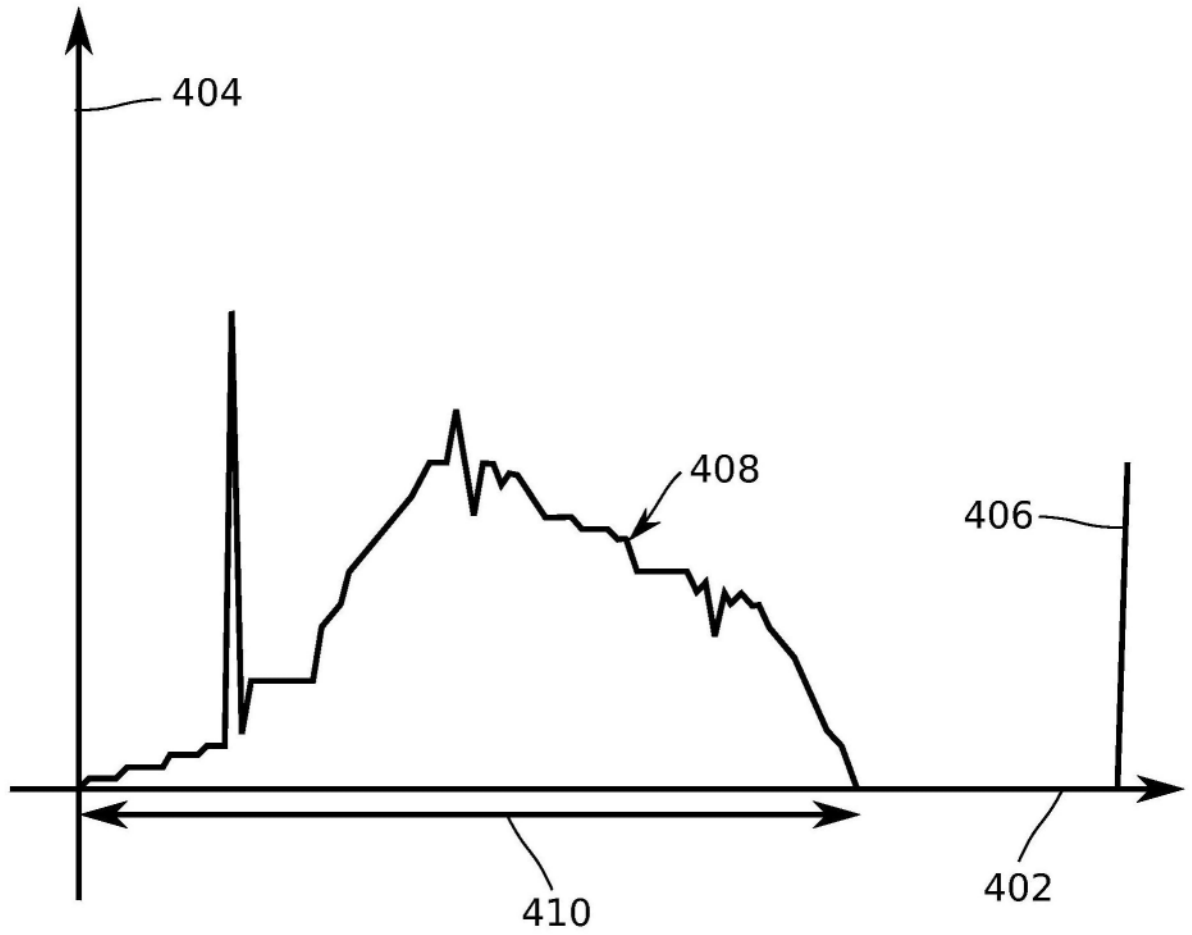


图4