



(21) 申请号 201910558190.1

(22) 申请日 2019.06.25

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110658617 A

(43) 申请公布日 2020.01.07

(30) 优先权数据  
102018210606.1 2018.06.28 DE

(73) 专利权人 卡尔蔡司显微镜有限责任公司  
地址 德国耶拿

(72) 发明人 V. 德雷舍 N. 兰霍尔兹

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105  
专利代理师 王蕊瑞

(51) Int.Cl.

G02B 21/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103926228 A, 2014.07.16  
CN 1410744 A, 2003.04.16  
US 2005259319 A1, 2005.11.24  
US 2015077844 A1, 2015.03.19  
JP 特开2000-275540 A, 2000.10.06  
WO 2017148555 A1, 2017.09.08  
CN 107228846 A, 2017.10.03

审查员 徐梦春

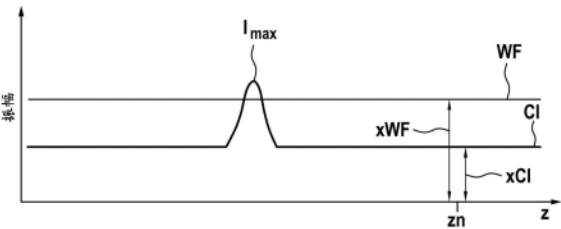
权利要求书1页 说明书5页 附图9页

(54) 发明名称

使用校正因子的显微成像方法

(57) 摘要

本发明涉及显微成像方法，其包含以下步骤：用照明辐射照明样品 (1) 并沿着检测轴线捕获检测辐射，所述检测辐射已经由照明辐射引起，在第一次时作为宽场信号 (WF) 且在第二次时作为复合信号 (CI)，所述复合信号已经由共焦图像和宽场图像的叠加来形成；通过从复合信号 (CI) 减去宽场信号 (WF) 来提取共焦图像，其中使用校正因子。所述方法的特征在于，为每个执行的成像和/或为每个成像的样品 (1) 确定当前校正因子，并且使用相应的当前校正因子来提取共焦图像。



1. 一种显微成像方法,包括以下步骤:

用照明辐射照明样品(1)并沿着检测轴线捕获检测辐射,所述检测辐射已经由所述照明辐射引起,

在第一次时作为宽场信号(WF),以及

在第二次时作为复合信号(CI),所述复合信号由共焦信号和宽场信号(WF)的叠加来形成,

通过从所述复合信号(CI)减去所述宽场信号(WF)来提取所述共焦信号,

其中使用校正因子,

所述方法的特征在于,

为每个执行的成像和/或为每个成像的样品(1)确定当前校正因子,以及

使用相应的当前校正因子来提取所述共焦信号,以及

出于在距所述样品(1)的表面(Ao)一距离处沿着检测轴线所选择的校正平面中确定当前校正因子的目的,至少一个校正宽场图像和一个校正复合图像各被捕获,其图像数据被确定并且当前校正因子基于所确定的图像数据来确定,其中所述校正平面的距离选择得这么较大,使得没有所述表面(Ao)的结构穿过所述校正平面,以及

所述距离选自用于捕获所述检测辐射的物镜镜头的点扩散函数的四到六个半高全宽的范围。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,至少一个校正宽场图像和一个校正复合图像各在当前焦平面的前面和后面的校正平面中被捕获。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述当前校正因子从校正宽场图像和校正复合图像的平均亮度来确定。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,为校正图像的每个像素对确定当前校正因子。

## 使用校正因子的显微成像方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及根据独立权利要求的前序部分的显微成像方法。

### 背景技术

[0002] 在显微术的技术领域中(例如在生物/技术样品或样品区域的高分辨率三维表示中),现有的问题在于用照明辐射的最低可能的强度照射样品,而同时具有可用于高分辨率检测 and 成像的高强度的检测辐射。同时,提供图像数据并随后成像应该在最短可能的时间内实现,理想地实时地来实现。

[0003] DE 10 2014 004 249 A1已经公开了相关的旋转盘显微术的方法。在通过其中公开的相关的旋转盘显微术来确定样品的形貌的方法中,执行以下步骤:在交替捕获放置在物体台上的样品的第一图像和第二图像期间,存在物体台和/或聚焦驱动器的垂直移动。在该过程中,垂直聚焦位置被储存为每个图像的元数据。在其他步骤中插值两个第一图像和两个第二图像,并且获得中间图像或中介图像。出于为某一垂直位置产生共焦图像的目的,中介图像通过计算与所述位置处的第二图像或第一图像组合。

[0004] 从WO 97/31282 A1已知,出于产生复合图像和非共焦图像的目的,在照明和/或检测束路径中使用适当的掩模。通过从这两个图像类型计算,由适当的组合来提取共焦图像。这允许非常快速的成像。同时,使用高比例的检测光,所以用低强度的照明辐射照明样品是足够的。

[0005] Neil等人(Neil,M.A.A等人,(1997),A light efficient optically sectioning microscope;Journal of Microscopy 189:114-117)和Wilson等人(Wilson,T.等人,(1996),Confocal microscopy by aperture correlation;OPTICS LETTERS 21:1879-1881)的出版物同样提出了这样的可能性:通过其可以从复合图像和宽场图像中提取共焦信号。

[0006] 当计算共焦图像时,可以使用以下公式:

[0007] 共焦信号 = (复合信号) -  $n \times$  (宽场信号)。

[0008] 在此,因子 $n$ 是为成像系统确定一次并在没有改变的情况下应用的校正因子,并且因子 $n$ 独立于样品。校正因子用于补偿系统相关的偏差,例如复合信号和宽场信号的光路径的不同传输值。使用该进程,例如可以沿着下文还称为 $z$ 轴的检测轴线来捕获图像的堆栈( $z$ -堆栈),并且可以出于三维成像的目的(例如样品的形貌)组合这些图像。

### 发明内容

[0009] 本发明基于以下目的,提出三维成像的改进选项,特别是使用低照明强度。

[0010] 该目的通过下文所述的显微成像方法来实现。在下文中发现有利的发展例。

[0011] 显微成像方法包含以下步骤:用照明辐射照明样品并沿着检测轴线捕获检测辐射,所述检测辐射已经由照明辐射引起。在第一次时,检测辐射被捕获作为宽场信号,在第二次时,检测辐射被捕获作为复合信号,所述复合信号由共焦图像或其信号以及宽场信号

的叠加来形成。共焦图像通过从复合图像减去宽场图像,并使用校正因子来获得。在此,从复合信号中减去宽场图像信号,并考虑校正因子。

[0012] 该方法的特征在于,为每个执行的成像和/或为每个成像的样品来确定当前校正因子。使用相应的当前校正因子来提取相应的共焦图像。

[0013] 令人意外地,发现为最初设想的应用设定一次成像系统的校正因子是完全足够的;然而,根据本发明的方法不仅减少成像像差而且允许检查新类别的材料。

[0014] 因此,本发明的核心由以下构成:远离独立于样品的校正因子,并为每个测量或每个样品动态地确定校正因子。

[0015] 基于检测辐射的所捕获的强度最大值,通过采用的评估算法来识别样品的表面。在宽场图像和复合图像之间的强度比率、或在它们的信号之间的强度比率可能在某些情况下改变,例如当在样品中出现高对比度和/或在要成像的样品的自发荧光的情况下。由于在宽场图像和复合图像之间的强度比率的改变,强度最大值可能在样品的实际表面上方或下方被不正确地标识,或者不正确地计算表面的位置。在此,不正确计算的强度值太高而使得它们不被识别为伪影,并且因此通过例如噪声截止滤波器无法消除。因此,计算出样品中的凹陷或升高部,这些实际上不存在。

[0016] 为了分析如上描述的像差,计算出的图像在 $z$ 轴的方向上布置为一个在另一个上方( $z$ 堆栈)并且从侧边观察该 $z$ 堆栈(所谓的正视图)。评估沿着 $z$ 轴的强度分布。在此,认识到,杂散光相对均匀地或恒定地布置在相对宽的 $z$ 范围之上(参见图1)。

[0017] 从该发现出发,提出了确定当前校正因子的选项;这些在下文进行更详细地解释。

[0018] 出于在方法的一个配置中距样品的表面一距离处在沿着检测轴线所选择的校正平面中确定当前校正因子的目的,至少一个校正宽场图像和一个校正复合图像各自被捕获。校正宽场图像(其还称为校正图像)和校正复合图像的图像数据(信号)被确定,并且基于所确定的图像数据来确定(例如计算或推断)当前校正因子。

[0019] 出于捕获图像数据的目的,检测物镜镜头的焦点或检测系统的焦点被指引到表面的期望的位置(期望的 $z$ 位置),并且因此限定焦平面。该距离是在焦平面和校正平面之间的间隔。

[0020] 如果校正平面的距离选择得很大,使得没有表面的结构穿过校正平面,则是有利的。因此,距离可以选自用于捕获检测辐射的检测物镜镜头或检测系统的点扩散函数的四个到六个半高全宽的范围。作为示例,距离可以是四个、四又二分之一、五个或六个半高全宽。

[0021] 校正宽场图像和校正复合图像被产生,并且在每次测量期间在距表面的足够距离处被捕获。然后,在如上所指定的公式中使用的样品指定的和当前校正因子从这两个校正图像来确定。

[0022] 在校正平面和样品的表面之间的距离的变化在一定范围内是可能的,因为杂散光成分以相对恒定的方式沿 $z$ 轴分布。此外,产生复合图像的变动是可能的,例如借助于使用开槽的掩模。还可以使用具有适应性差的针孔尺寸的旋转盘、具有适应性差的针孔尺寸的微显示器、或者具有适应性差的针孔尺寸的激光扫描显微镜(LSM)。

[0023] 存在确定当前校正因子的各种选项。当前校正因子可以从校正图像的平均亮度来确定。在此,校正图像中的每一个的灰度值被平均,并且使用计算出的平均值。

[0024] 代替灰度值的简单算术均数,还可以逐像素地来评估图像。专用的当前校正因子可以分配到每个图像元件或像素。

[0025] 因为逐像素生成当前校正因子并且在产生图像时使用当前校正因子可导致不连续性并因此导致伪影,适当的计算滤波器(例如中值滤波器或高斯滤波器)随后必要时应用于图像数据,以便于使图像数据平滑。因此为校正图像的每个像素对确定当前校正因子。在此,每个像素对由校正宽场图像的某一像素和与其对应的校正复合图像的像素来形成。

[0026] 方法的其他有利配置由以下构成:在具有样品的表面的期望位置的焦平面的上方和下方(即,在当前焦平面的前面和后面的校正平面中)记录两个校正图像,并且校正图像对二者包含在计算中。特别地,该配置可以用在足够透明的样品的情况下。

[0027] 出于进行根据本发明的方法的目的,含有记录至少两个校正图像以确定当前校正因子的记录流程是有利的。

[0028] 在其他配置中,校正宽场图像从z堆栈计算出,并且用于确定校正因子。作为示例,使用z堆栈的三维数据来形成平均值。

[0029] 本发明的优点在于以下事实:尤其可以省略在操作启动期间对独立于样品的校正因子的单个校准。此外,显著更好的信号质量意味着在评估期间省略了滤波步骤,其用于移除根据现有技术的方法中的随机或系统正和/或负信号增加(异常值)。

[0030] 根据本发明的方法的另一个优点在于,即使在常规的孔径相关的情况下,也能够自动确定适配的校正因子,因而显著地增加了用户友好性和图像数据的质量。

[0031] 该方法可以特别有利地用于那些图像捕获装置,其中宽场图像和复合图像被分离地并且连续地捕获,并且特别地作为堆栈记录被存储和处理。

[0032] 根据本发明的方法可以特别有利地用于成像样品表面的形貌。在此,可以特别地在材料测试和质量控制的领域中使用该方法。作为示例,可以用显著改进的质量来成像已经用材料移除加工的金属表面。在根据本发明的方法的情况下,表面上的反射和/或尖锐的过渡不会导致信号升高,或仅导致在小程度上的信号升高。

[0033] 根据本发明的方法的用途开创了甚至检查强烈反射样品(诸如喷漆的样品、例如诸如生物样品的感光样品,例如诸如许多类型的纸的自发荧光样品)的可能性。

## 附图说明

[0034] 下面基于附图和示例性实施例更详细地解释本发明。附图中:

[0035] 图1示出了穿过z-堆栈的截面的示意图(正视图);

[0036] 图2示出了确定当前校正因子的第一选项的示意图;

[0037] 图3示出了根据现有技术的具有选择的信号曲线的样品表面的示意图;

[0038] 图4示出了根据本发明的方法具有选择的信号曲线的样品表面的示意图;

[0039] 图5示出了根据本发明的方法沿着用材料移除加工的金属表面的z-堆栈的信号曲线的图;

[0040] 图6示出了根据现有技术的方法沿着用材料移除加工的金属表面的z-堆栈的信号曲线的图;

[0041] 图7示出了根据本发明的方法沿着配备有金属漆的样品的表面的z-堆栈的信号曲线的图;

[0042] 图8示出了根据现有技术的方法沿着配备有金属漆的样品的表面的z-堆栈的信号曲线的图；

[0043] 图9示出了根据本发明的方法沿着由纸制成的样品的表面的z-堆栈的信号曲线的图；以及

[0044] 图10示出了根据现有技术的方法沿着由纸制成的样品的表面的z-堆栈的信号曲线的图。

### 具体实施方式

[0045] 图1示出了样品1的图像的z-堆栈的所谓的正视图的示例。在各种情况下，根据公式“共焦信号 = (复合信号) - n × (宽场信号)”来计算图像。

[0046] 由箭头和由虚线指示样品1的表面Ao的位置。此外，存在沿x轴的强度最大值的曲线图。x轴正交于z轴延伸并近似平行于表面Ao。

[0047] 在x轴的大区段之上，表面Ao的特征为强反射和与其连接的强度最大值，近似具有相同z坐标齐平。在曲线Imax的左手部分的区段中在较高z坐标处发现强度最大值。这可以意味着凹陷或升高部位于样品1的该区域中，其对应于相关的x坐标，取决于在图1中如何预先放置坐标系。

[0048] 图2示意性示出了确定当前校正因子n的选项。以示例性方式，沿着z轴绘制的是宽场信号WF的振幅值和复合信号CI(复合图像)的振幅值。可以在焦平面中识别复合信号CI的振幅值的最大值(峰值)。作为示例，这个强度最大值Imax表示了样品1的表面Ao(例如，参见图1)。宽场信号WF的振幅值xWF和复合信号CI的振幅值xCI用z坐标zn确定在校正平面中。当前校正因子n可以从振幅值xWF和振幅值xCI的比率来确定。

[0049] 图3示意性示出了样品1的测量结果、穿过其表面Ao延伸的凹槽形状的凹陷2。由根据现有技术的方法所计算的图像数据示出了沿着凹陷2的边缘的高强度峰Imax。因此，在从其得到的图像中描绘了凹陷2的升高的边缘，但是这样的升高部甚至不存在于实际事实中。

[0050] 相比之下，如果图像数据通过根据本发明的方法来确定，则沿着凹陷2的边缘的强度峰Imax实质上更低(图4)。凹陷2描绘成没有升高的边缘或仅具有非常小的升高的边缘，其对应于样品1的实际形貌。

[0051] 在其他图5至10中，通过根据本发明的方法所获得的图像数据沿着与x轴相对的z轴各绘制为高度值。代替沿着x轴，高度值还可以沿着正交于x轴和z轴延伸的y轴来绘制。

[0052] 图5示出了由金属物质制成的样品1的形貌的图像数据。样品1通过铣削来加工。铣削工具的单独轨迹可以由在零附近的振幅值的周期性序列来标识。

[0053] 相同样品1的图像数据示出了在方向周期性改变的区域中的强度峰Imax，这没有再现表面Ao的实际轮廓(图6)。强度峰Imax非常窄的事实已经指示了出现成像像差，而不是实际表面形式。

[0054] 同样的可见于图7和8中。当使用根据本发明的方法时，识别并描绘配备有金属漆的样品1的表面Ao，其具有在关于零位置的近似1.5至2μm的扩散的形貌(图7)。相比之下，通过根据现有技术的方法所创造样品1的形貌具有近似5至超过10μm的扩散(图8)。

[0055] 在由纸制成的样品1的情况下获得非常相似的结果。图9示出了样品1的相对较粗糙的表面Ao，其具有关于零位置的近似10μm的扩散。

[0056] 相比之下,当使用根据现有技术的方法时,不正确地发生强度峰导致关于零位置的30至40 $\mu\text{m}$ 的扩散。

[0057] 该示例性实施例示出了,由纸制成或具有荧光(自发荧光)表面Ao的样品1可以借助于根据本发明的方法在它们的形貌方面进行检查。相比之下,根据现有技术的方法不会导致令人满意的结果或需要附加的步骤以便于减小强度峰。

[0058] 附图标记

[0059] 1 样品

[0060] 2 凹陷

[0061] Ao (样品1的)表面

[0062] CI 复合信号

[0063] I<sub>max</sub> 强度最大值、强度峰

[0064] WF 宽场信号

[0065] xCI (复合信号CI的)振幅值

[0066] xWF (宽场信号WF的)振幅值

[0067] Zn (校正平面的)位置

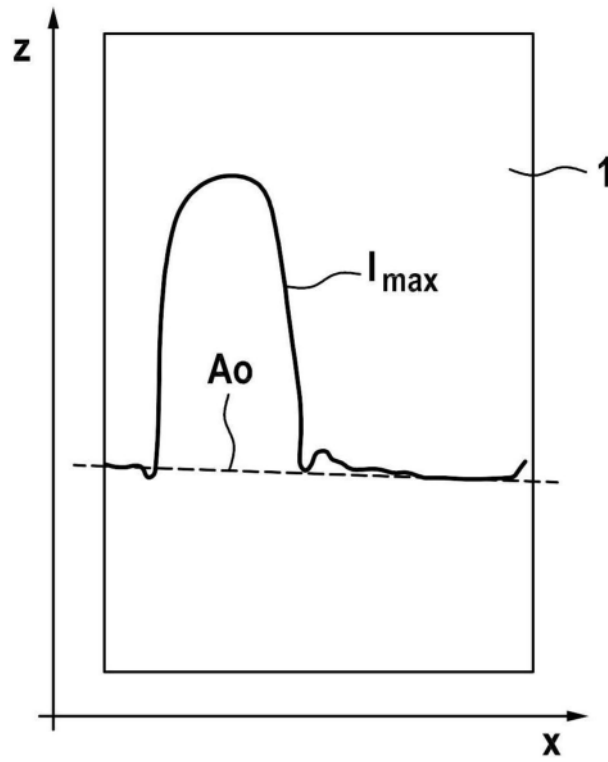


图1

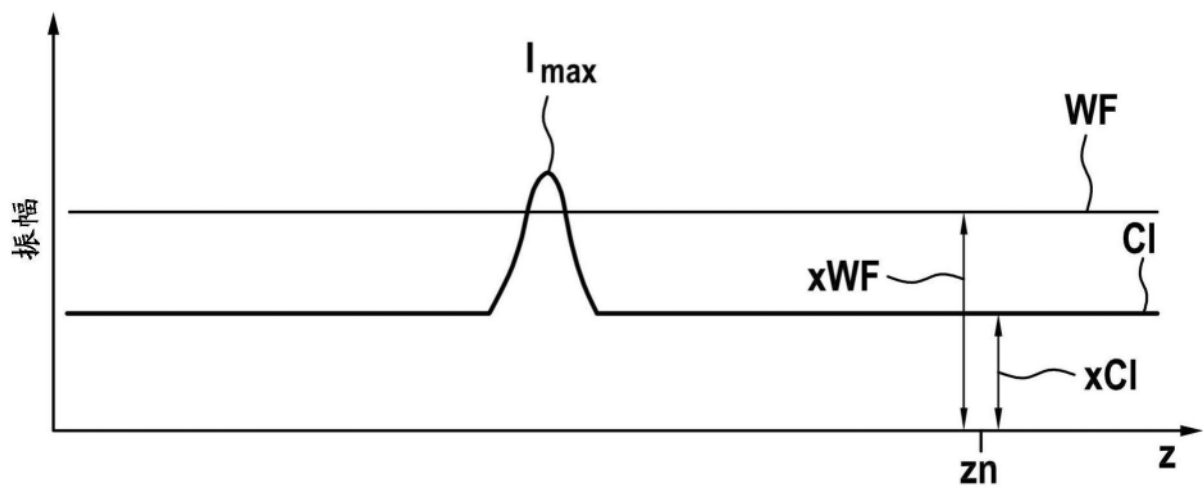


图2



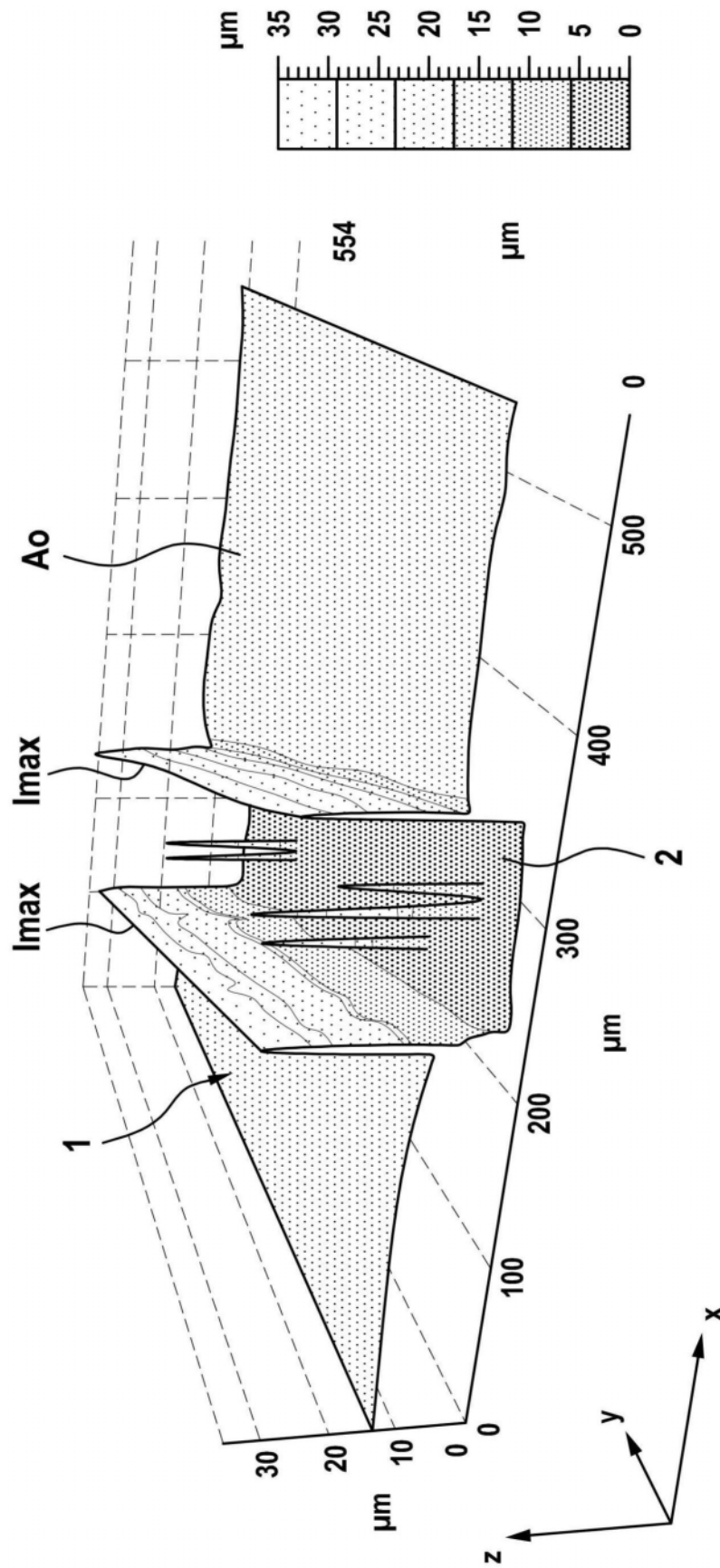


图3

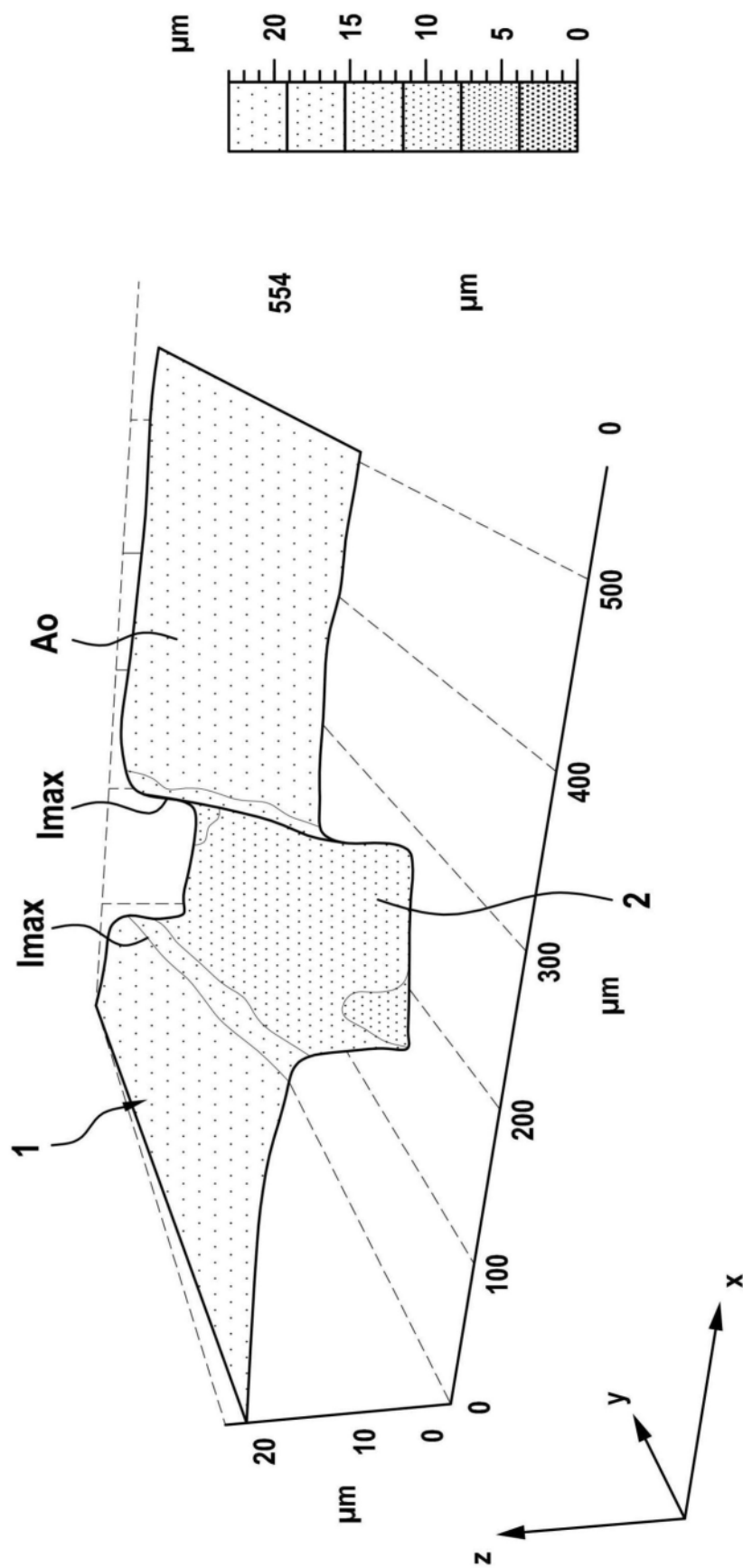


图4

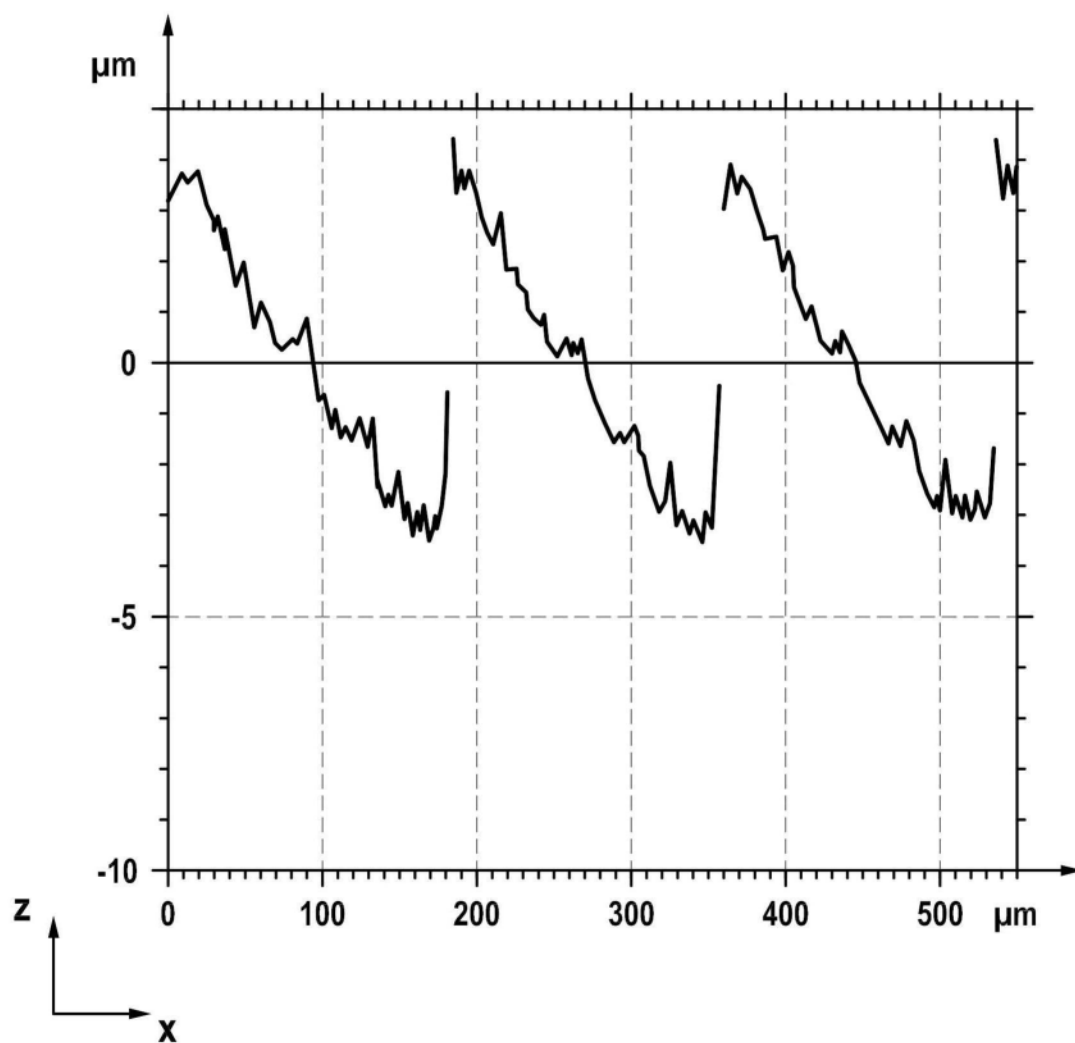


图5

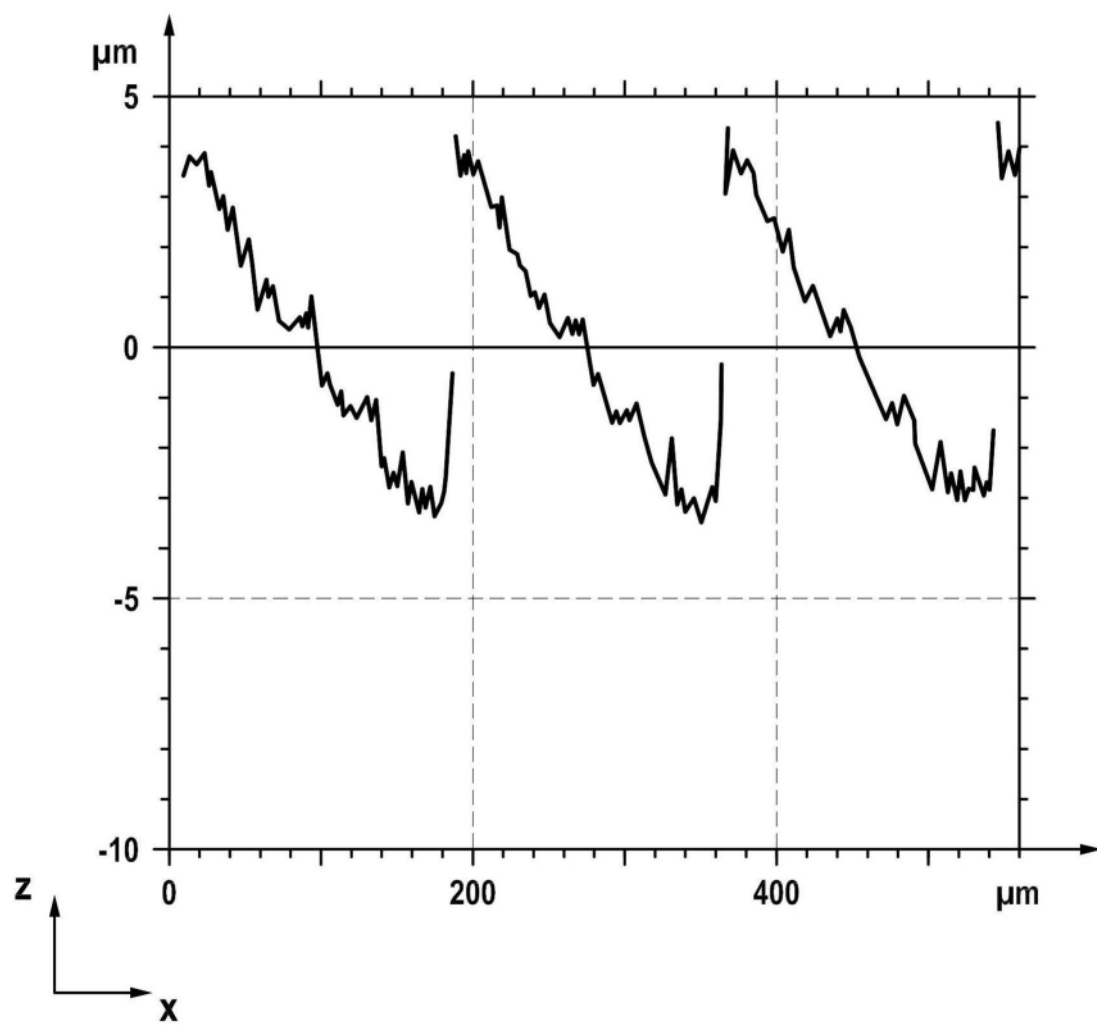


图6

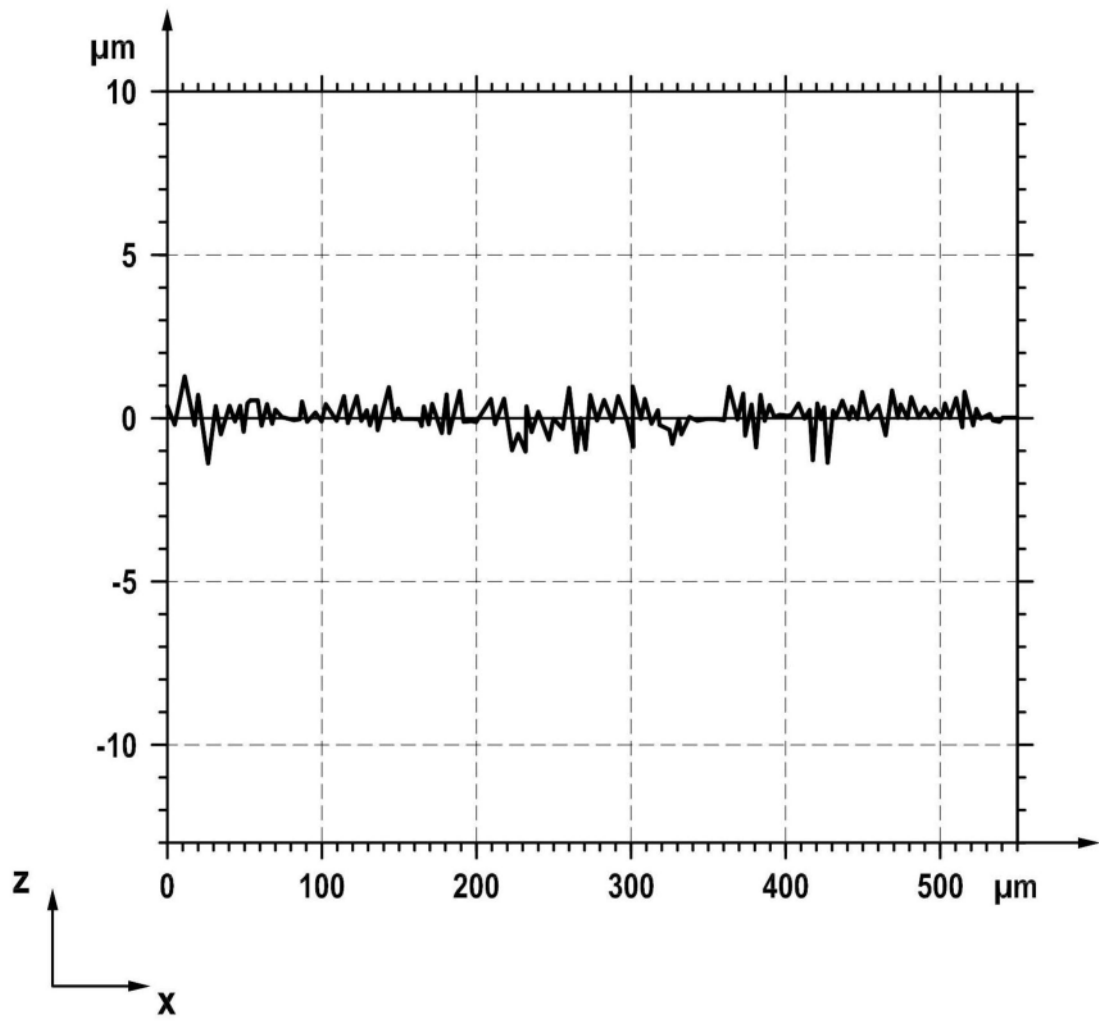


图7

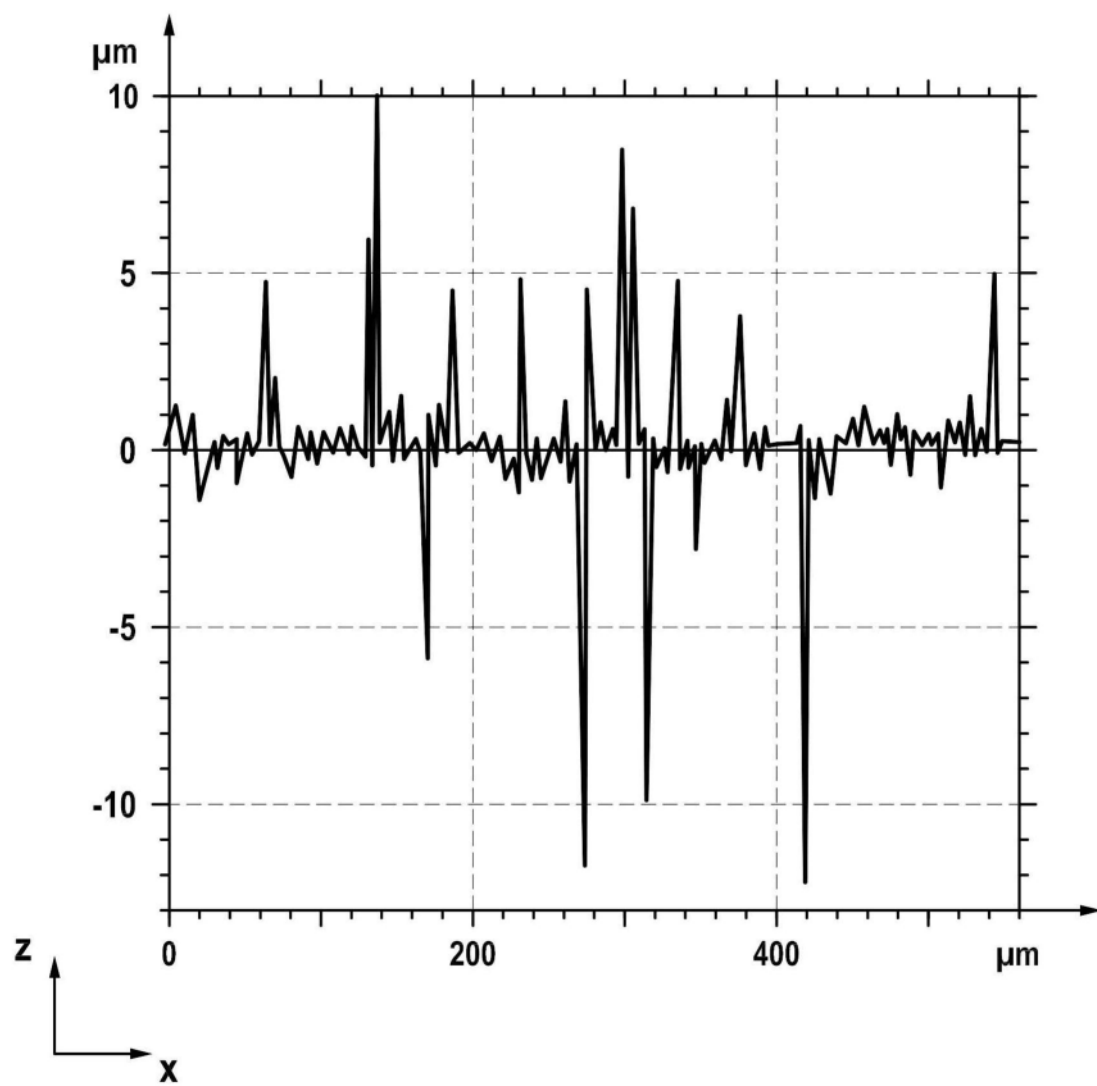


图8

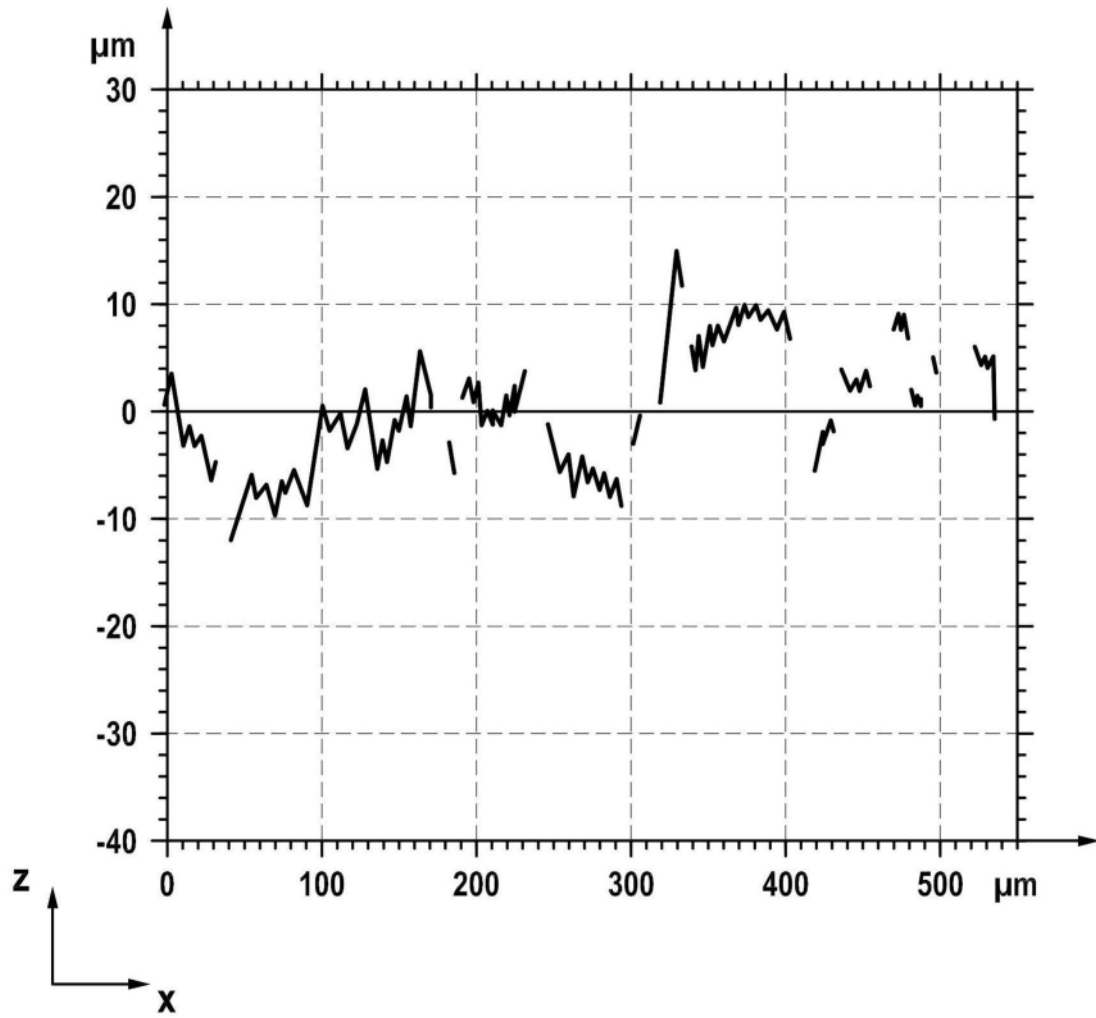


图9

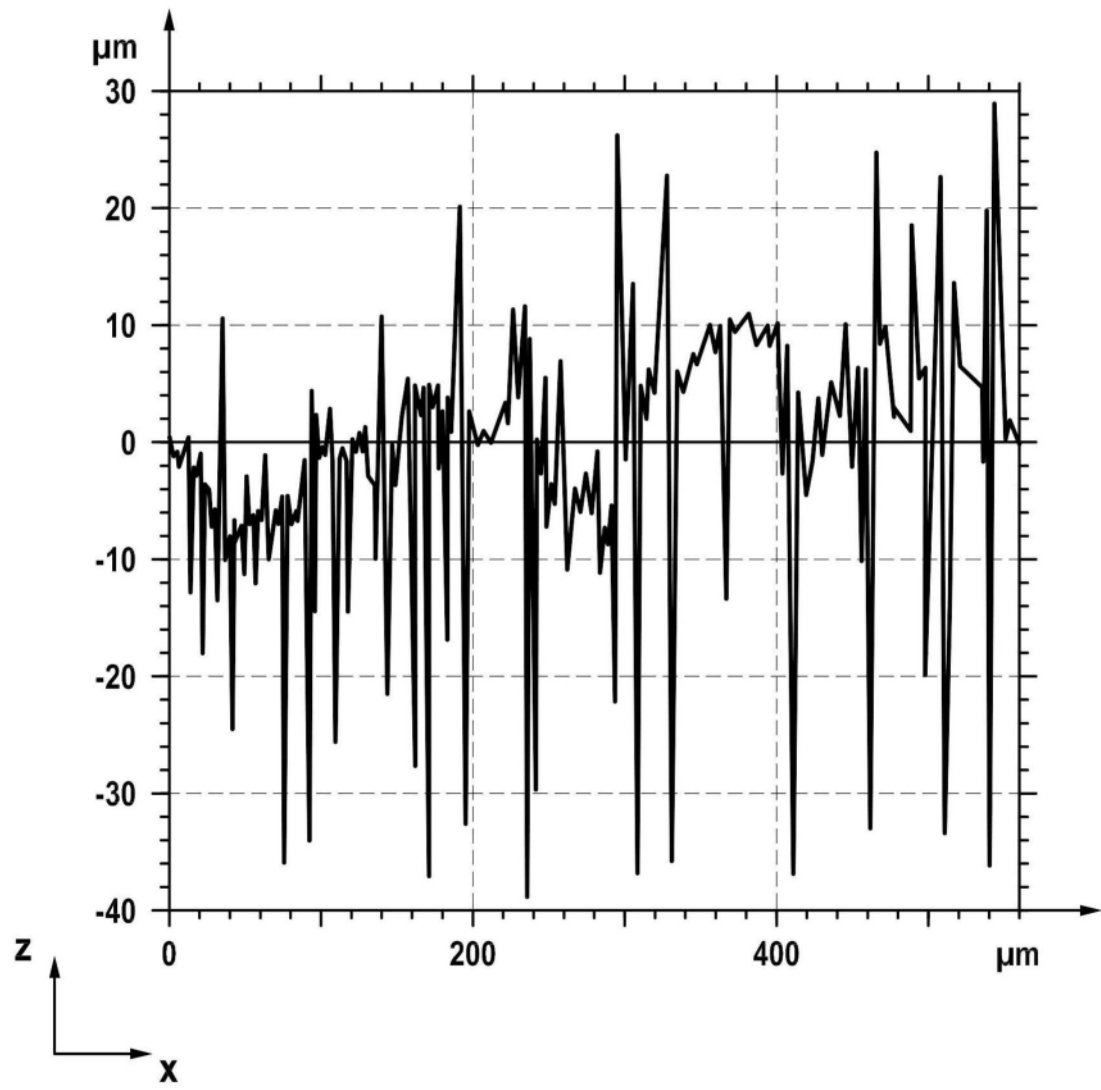


图10