

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98802309.1

[43]公开日 2000 年 3 月 8 日

[11]公开号 CN 1246929A

[22]申请日 1998.1.14 [21]申请号 98802309.1

[30]优先权

[32]1997.2.7 [33]US[31]08/796,196

[86]国际申请 PCT/US98/00318 1998.1.14

[87]国际公布 WO98/35256 英 1998.8.13

[85]进入国家阶段日期 1999.8.4

[71]申请人 Q3DM 有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 杰弗里·H·普赖斯

米格尔·布拉格-赞洛查尔

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

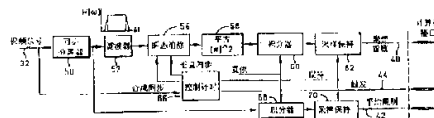
代理人 文 琦

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 自动聚焦显微镜系统用模拟电路

[57]摘要

自动聚焦显微镜系统用模拟电路测量直接从显微镜 CCD 相机视频信号来测量物体聚焦的程度。然后该电路返回主机一个指数,用来调整显微物镜的位置,使该物体处于焦点上。通过不同垂直位置上的指数的比较,可找到最佳焦距。为了确定聚焦程度而采用的标准来源于视频信号谱的能量分布。该信号通过高通滤波器、(除去扫描假象的)选通器、平方电路和积分器。视频谱的高频能量在最佳焦距上为最大值,当光学器件散焦时,分布转换成低频。使用本发明的模拟电路可得到低成本、实时自动聚焦,代替了昂贵的实时影像处理专用硬件。



权 利 要 求 书

1、在自动聚焦系统中，包含显微镜、代表显微镜产生的放大影像的影像信号源、和自动显微镜聚焦控制，该控制可根据聚焦指数信号使显微镜聚焦，用于产生聚焦指数信号的电路，包括：

滤波器，用于提供代表影像信号中预设频率的过滤信号；

瞬态消除器，与滤波器相连，消除来自过滤信号的扫描假象；

平方电路，与瞬态消除器相连，平方过滤信号中频率部分的值；
和

指数积分器，与平方电路相连，通过积分过滤信号的频率部分的平方值，产生代表显微镜焦距的聚焦指数信号。

2、权利要求 1 所述的电路，进一步包括一个照明积分器，可根据影像信号产生平均照明信号。

3、权利要求 2 所述的电路，其中聚焦控制包括一个处理器，该处理器根据聚焦指数和平均照明信号，产生代表显微镜聚焦函数的聚焦位置信号。

4、权利要求 1 所述电路，进一步包括一个二极管，该二极管与指数积分器的输出相连，可防止聚焦指数信号的衰减。

5、权利要求 3 所述的电路进一步包括：

第一个二极管，与指数积分器的输出相连，防止聚焦指数信号衰减；和

第二个二极管，与照明积分器的输出相连，防止平均照明信号衰减。

6、权利要求 1 所述的电路，其中瞬态消除器对于过滤信号应用一维窗口。

7、权利要求 1 所述的电路，其中瞬态消除器对于过滤信号应用二维

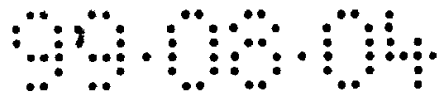
窗口。

- 8、权利要求 1 所述的电路，其中影像信号为视频信号。
- 9、权利要求 8 所述的电路，其中扫描假象包括视频信号扫描线的端部。
- 10、权利要求 1 所述的电路，其中滤波器具有与显微镜的镜片传递函数特性基本相同的传递特性。
- 11、自动聚焦控制系统，可根据代表放大影像的视频信号控制显微镜的焦距，包括：

自动聚焦模拟电路，通过产生代表放大影像中的聚焦程度的聚焦指数信号和表明放大影像中的平均照明度的平均照明信号以响应视频信号；和

计算机，与自动聚焦模拟电路相连，根据聚焦指数信号和平均照明信号产生聚焦位置信号；

聚焦位置信号表明显微镜的焦距位置。
- 12、权利要求 11 所述的自动聚焦控制系统，其中聚焦指数信号表明放大影像的分辨率。
- 13、权利要求 11 所述的自动聚焦控制系统，其中聚焦指数信号表明视频信号的预设频率中所包含的能量。
- 14、权利要求 13 所述的自动聚焦控制系统，其中自动聚焦模拟电路由视频信号的段通过滤产生聚焦指数信号。
- 15、权利要求 14 所述的自动聚焦控制系统，其中自动聚焦模拟系统在产生聚焦指数信号时消除了来自视频信号的扫描假象。
- 16、权利要求 11 所述的自动聚焦控制系统，其中自动聚焦模拟电路



包括：

滤波器，可提供代表视频信号中的预设频率的过滤信号；

瞬态消除器，与滤波器相连，可消除来自过滤信号的扫描假象；

平方电路，与瞬态消除器相连，平方过滤信号的频率部分的值；
和

指数积分器，与平方电路相连，通过积分过滤信号频率部分的平方值，产生聚焦指数信号。

17、权利要求 16 所述的自动聚焦控制系统，进一步包括照明积分器，可根据影像信号产生平均照明信号。

18、权利要求 17 所述的自动聚焦控制系统，其中聚焦控制包括处理器，该处理器可根据聚焦指数和平均照明信号，产生代表显微镜聚焦函数的聚焦位置信号。

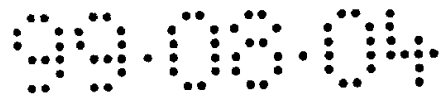
19、权利要求 16 所述的自动聚焦控制系统，进一步包括一个二极管，该二极管与指数积分器的输出相连，可防止聚焦指数信号的衰减。

20、权利要求与 16 所述的自动聚焦控制系统，进一步包括：

第一个二极管，与指数积分器的输出相连，可防止聚焦指数信号衰减；和

第二个二极管，与照明积分器的输出相连，可防止平均照明信号的衰减。

21、权利要求 11 所述的自动聚焦控制系统，其中计算机结合从每个聚焦位置处获得的聚焦指数信号值和平均照明信号值，为大量显微镜聚焦位置中的每个位置生成一个聚焦函数值，并结合许多聚焦函数值产生代表显微镜聚焦位置的聚焦位置信号。



说明书

自动聚焦显微镜系统用模拟电路

技术领域

本发明属于显微镜使用领域，在该领域中，显微镜所观察到的影像的焦距是被自动调节的。显微镜焦距的这种自动调节被称为“自动聚焦”。本发明在自动聚焦系统中得以应用。本发明进一步涉及到模拟电路的加入，该电路起到传递函数的效果，该传递函数归属于自动聚焦系统的显微镜光学，消除损害自动聚焦功能的扫描假象，并弥补照明的不稳定。

背景技术

自动聚焦在自动化显微镜中是必不可少的，它可解决诸如机械不稳定性、载玻片和盖片的不规则性、活标本的运动以及热膨胀的影响等问题。自动聚焦可以克服这些限制，并可以在全自动、用数量表示的显微镜中进行精确、可重复的测量。许多实验都将受益于自动聚焦，不能缺少自动聚焦的例子包括：

(a) 以高分辨率扫描大的区域，其中视界的深度受到限制（如子宫颈癌检查，每个载片上有 10,000 个显微镜区）

(b) 慢速拍摄实验（如从几小时到几天）

(c) 结合 (a) 和 (b) 的慢速拍摄扫描血细胞计数法，其中自动聚焦的速度成为瞬时分辨率的基本决定因素。

不论不稳定源是什么，只要位置变量比自动聚焦更正具有更大的时间常量，则自动聚焦将会补偿。

典型的自动聚焦系统包括含放大镜和可调载物台的自动显微镜，显微镜滑片固定在载物台上，对滑片上的标本进行放大观察。与载物台配合的电机提供了载物台位置的垂直调节。提供了用于放大镜片和载物台间的垂直（Z-轴）调节的装置。这可以包括调整物镜的 Z-轴位置或通过载物台 Z-轴调节来完成。相机通过放大镜片接收放大影像，



并向自动聚焦电子器件提供代表放大影像的电子信号。自动聚焦电子器件按照显示聚焦程度的函数来处理该信号，为垂直调整装置提供调整（或错误）信号。作为响应，垂直调整装置调整物镜或载物台的垂直位置，改变放大影像的焦距。在自动聚焦系统中可以包括其它的电路系统，来自动转移（扫描）滑片上的标本。

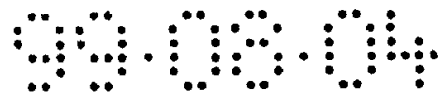
为自动聚焦而试验了许多方法，包括分辨率、对比度和熵。近来已经显示，光学分辨率的测量能可靠并准确地完成自动聚焦。参见 1994 年的 Cytometry 16 上第 283-297 页，Price, J. H. 和 Gough D.G. 的“Comparison of Phase-Contrast and Fluorescence Digital Autofocus for Scanning Microscopy”。该实验性证明强化了下面的逻辑定义：最高的分辨率发生在最佳焦距处。当影像散焦，并失去分辨率时，细节就会模糊。用可分离高频的滤波器分析傅立叶频谱，可以测量分辨率。高频（信号能量）的平方和可被用作分辨率的度量值。从频谱上讲，这可以是高通滤波器或段通滤波器。典型的滤波器应用的是影像密度的一次导数。另一个是 laplacian 滤波器，它是影像密度二次导数的测量。laplacian 滤波器具有更突出的高通特性，以更小的量级测量分辨率。平方放大了函数值间的差异。

为了比较不同的标准，自动聚焦系统典型地计算作为 Z-轴位置函数的焦距函数。从每个 Z-轴位置得到的影像计算出焦距函数值。根据 Price 等，使用数字滤波器的焦距函数的典型公式包括一维高通滤波器与影像 i_{xy} 的卷积，得到平方和，并归一化以降低不稳定照明的影响。这种关系在公式 (1) 中给出。

$$f(z) = \sum \sum ([-1 \ 2 \ -1] * i_{xy})^2 / [(1/XY \text{ of pixels})(\sum \sum i_{xy})]^2 \quad (1)$$

其中 z 是垂直位置， i_{xy} 是位置 (x, y) 处的密度。

模拟聚焦电路已在 1973 年的 IEEE Transaction on Biomedical Engineering, 20(2) 的第 126-32 页中, Ali Kujoory, M., Mayall, B.H. 和 Momdoleohn, M.L. 的“Focus Assist Device for a Flying-Spot Microscope”和 1974 年的 Journal of Histochemistry and



Cytochemistry, 22(7)的第 536-587 页中 Johnson, E. T. 和 Goforth, I. J. 的“Metaphase Spread Detection and Focus Using Closed Circuit Television”中报道过。在 1995 年的 Meas. Sci. Technol., 6 的第 583-587 页中, 中 Mekeoug, I...Sharpe, J. 和 .Johnson, K.A 的“Low-Cost Automatic Translation and Autofocusing System for a Microscope”描述了在显微镜使用中的自动聚焦用模拟电路。然而, 这些设计并没有考虑选择高频滤波器时自动聚焦系统传递函数的影响。在这些以前的应用中未考虑的其它重要因素包括位于水平线间的滤波器终端影响, 该终端影响位于视频信号内, 并用于照明不稳定性更正的归一化。进一步说, 在信息含量低的影像中, 通过在水平线末端的滤波器的失真, 背景密度的变化占据显著地位。

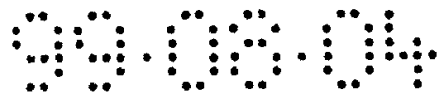
发明解析

本发明的目的是在例如荧光着色的生物标本的扫描显微镜的使用中, 在低成本下应用快速、准确的自动聚焦。

本发明在自动聚焦系统中应用, 该系统包括显微镜、代表由显微镜产生的放大影像的视频信号源和自动显微镜聚焦控制, 该控制可根据聚焦指数信号调整显微镜焦距。利用产生聚焦指数信号的模拟电路, 在本文中使本发明具体化。该电路包括一个滤波器, 该滤波器提供代表视频信号中预设频率的过滤信号。瞬态消除器与滤波器连接, 消除来自过滤信号的扫描假象。平方电路与瞬态消除器相连, 将过滤信号的预设频率部分值平方。与平方电路连接的积分器通过积分过滤信号频率部分的平方值, 产生代表显微镜聚焦程度的聚焦指数信号。

更可取的是, 该电路进一步包括了根据视频信号产生平均照明信号的积分器。处理器将聚焦指数信号和平均照明信号在自动聚焦系统的聚焦控制中结合起来, 产生代表显微镜焦距位置的焦距位置信号。该聚焦控制利用焦距位置信号来调整显微镜, 使其到达焦距位置。

假设交织扫描产生一视频信号, 则瞬态消除器也产生加在视频信号上的窗口来定义放大影像区, 在该区中将产生聚焦指数信号。



因此本发明的目的之一是为自动聚焦系统提供一个模拟电路，来产生代表聚焦程度的聚焦指数信号。

进一步的目的是提供这种平均照明信号电路，该照明信号通过处理器与聚焦指数信号相结合，产生焦距位置信号。

附图概述

当结合相应的附图来阅读下面的详细描述时，可以进一步从下面的详细描述中了解本发明的目的、优点和特性，其中：

图 1 是完整的自动显微镜系统的框图；

图 2 是自动聚焦显微镜系统用模拟电路的框图；

图 3a 和图 3b 是说明图 2 模拟电路操作的波形图表；

图 4 包括图 4A、图 4B、图 4C 和图 4D，是说明应用图 2 模拟电路最佳模式的电路示意图；

图 5 是说明数字和模拟聚焦函数曲线图，该曲线用来表明带有图 2 和图 4 模拟电路的自动聚焦显微镜系统操作的实验结果；和

图 6 是表示用图 1 的自动聚焦显微镜系统在不同的可变焦距下放大厚细胞单层的模拟聚焦功能曲线图。

实施本发明的最佳模式

现在参考图，其中相同的参考数字表示相同的元件，如图 1 中表明，自动聚焦系统 10 包括含有物镜 14 和显微镜载物台 16 的显微镜 12，载物台上可固定滑片。载物台 16 可在 X 和 Y 方向上移动，这样，根据已知方法就可以扫描载物台上承载的显微镜滑片的连续区域。这样的—个区域由参考数字 18 表示。显微镜包括荧光着色生物标本照明用装置 20 和相衬或其它显微术发射照明用装置 22。影像区 18 被显微镜 12 的放大镜放大，该显微镜包括物镜 14 和放大镜 23。相机 30 得到的每个放大影像通过交织扫描生成—视频信号，该信号代表放大的影像并包括交织扫描所必需的不同的同步成分。视频信号由信号通道 32 提供给程序控制式的通用数字计算机 34，该计算机除了其它功能外，还包括影像处理器 38 和聚焦信号处理器 39。

视频信号也被提供给使本发明具体化的自动聚焦模拟电路 36。自动聚焦模拟电路 36 产生聚焦指数信号、平均照明信号和触发信号，它们分别由信号通道 40、42 和 44 提供给计算机 34 的聚焦处理器 39。

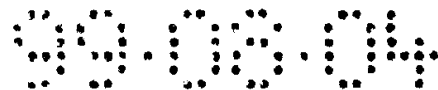
计算机 34 的聚焦处理器 39 组成自动显微镜聚焦控制，根据聚焦指数信号、平均照明信号和触发信号来计算聚焦函数信号。在显微镜 12 的多个聚焦位置的每个位置上都会产生一个聚焦函数信号。这些信号被聚焦处理器 39 结合在一起，产生代表显微镜 12 聚焦位置的聚焦位置信号。聚焦位置信号由信号通道 50 提供，被用来控制已知装置，该装置调节物镜 14 位置，从而使显微镜 12 聚焦。其它信号由信号通道 52 提供，用来调节载物台 16 的 X 和 Y 位置。

不包括自动聚焦模拟电路 36 的自动聚焦系统在美国专利 5, 548, 661 的 12 栏第 28 行-14 栏第 36 行中进行阐明，它全部包含在本说明中。

硬件和实验方法

自动聚焦系统 10 是根据本发明，为了模拟操作作用的相衬和明亮视场照明而设立的。细胞通过带有明亮相衬 Ph3 的 CF Fluor DL 40×C, 0.85NA 物镜在 Nikon Optiphot 显微镜中成像。这些影像通过装在 Dage VE-1000 CCD RS-170、频率响应是 7MHz 的照相机上的 Nikon CCTV 0.9-2.25 放大镜来进一步放大。显微镜载物台 16 在计算机 34 的控制下，在荧光影像血细胞计数法用步进电机带动下，在 X、Y 平面内移动。显微镜载物台 16 经由微型步进驱动器和相应的 AT ISA-bus 的计算机板来控制。

通过改变物镜 14 的位置可改变焦距，物镜带有压电物镜定位器 (PIFOC) 和 E-S810_10 闭环控制器 (Polytec PI, Costa Mesa, CA)。对于小于等于 $1\mu\text{m}$ 的运动而言，物镜 14 的位置在 10 ms 内是稳定的。PIFOC 的位置由数模 (D/A) 转换器的输出控制，该转换器位于计算机 34 中含有的 Keithley Metrabyte (Taunton, MA) DAS 1600 的数据采



集板内。该 12 位 D/A 转换器将 PIFOC 的 100 μm 的范围分为 4,096 个等级，每个等级为 24nm。

影像处理器 38 使用 RS-170 视频输入板，(Imaging Technology Inc. 的 VSI-150)，捕捉以视频信号形式出现的放大影像，并应用在 4.2MHz 时以 3dB 衰减、在 8MHz 时以 12dB 衰减的抗混淆滤波器。参照这些值来设计本发明模拟电路滤波器，并使该模拟电路可对照于数字版。

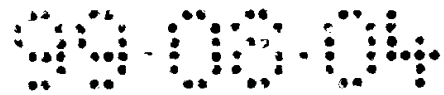
模拟电路的应用

本发明提供了自动聚焦模拟电路 36，它可测量直接来自相机 30 的视频信号的聚焦程度，并解决以前的设计限制。图 2 的框图和图 4 的电路图说明了该新颖电路的功能部分。用来确定散焦程度的标准是包含在放大影像中作为空间频率函数的相关能量。在散焦情况下，与放大影像相邻的元件变得模糊或被中和在一起，导致更高空间频率的损失。通过测量这些频率中作为焦点位置函数的相关能量，建立起确定最佳焦点位置的标准，因为能量呈单调变化，并且在焦点处最大。仅当高频率被用作聚焦标准时，为相衬所作的这些假设才成立。当在含有低频的情况下，单调性通常会被扰乱。参见引用的 Price 等的作品。

模拟电路 36 在视频信号的平方值的积分中采用聚焦函数，作为影像中能量的度量值。视频信号在平方前先被过滤，以增强基本上由焦距决定的高频。公式 (2) 代表由模拟电路 36 和计算机 34 完成的数据处理。滤波器 52 以电路组件的形式从视频信号中选择频率范围，在平方和积分后，模拟电路 36 产生一个聚焦指数值 $\iint (dI_{xy}/dx)^2 dx dy$ ，该值作为聚焦指数信号值与平均照明值 (I_{xy}) (平均照明信号的值) 一起被返回计算机 34。在 A/D 转换后，计算机 34 使用聚焦信号处理器 39 来平方平均照明值，并在进行了下面的除法后，产生聚焦函数 $F(z)$ ：

$$F(z) = \iint (dI_{xy}/dx)^2 dx dy / (\iint I_{xy} dx dy)^2 \quad (2)$$

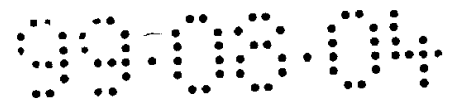
聚焦函数的形式由聚焦标准、显微镜和相机的传递函数以及影像物体决定。有用的聚焦函数的特性是：1) 单峰性，只有一个最大值；2)



准确性，最大值发生在焦距位置；3) 可重复性，聚焦函数曲线的准确度；4) 应用性，焦点值的快速计算。参见引用的 Price 等的作品和 1985 年 Cytometry 6 第 81-91 页中 Groen, F.C.A., Young, I.T. 和 Lighthart, G. 的 “a Comparison of Different Focus Functions for Use in Autofocus Algorithms”。模拟电路在应用中比数字电路具有更显著的优点，只要它们能够在前三个特性上与数字电路相附。这是因为在常规视频下操作的模拟组件相对而言普遍存在，并且价格不贵。

模拟电路 36 直接从视频信号测量焦距。相机 30 的输出为常规扫描视频形式，包括两个交织区。模拟电路 36 可以分成一个模拟部分和一个数字/计时部分。模拟部分可以进一步地分成一个聚焦指数部分和一个平均照明部分。模拟电路 36 提供给计算机 34 三个信号：聚焦指数信号、平均照明信号和触发脉冲。

现在看图 2 和图 4，表示区域 18 的放大影像的视频信号被提供给常规同步分离器 50，该分离器消除来自视频信号的水平垂直脉冲。同步分离器 50 的输出被供给带有传递函数 $H(\omega)$ 的段通滤波器 52 的输入。滤波器具有频率响应，由于上述原因仅滤通视频信号中的高频部分。滤波器 52 产生代表影像信号中预设高频的过滤信号。该过滤信号提供给滤波器 52 的一个输出，该输出与瞬态消除元件 56 的输入相连。瞬态消除元件 56 由取自视频信号的同步信号选通。在优选实施例中，该选通消除了影像信号的每条扫描线的起始端和末端处产生的扫描假象。实际上，瞬态消除元件 56 也可被视为窗口发生器，对于视频信号中的每条扫描线而言，它可以产生比扫描线短的窗口，对应的扫描线的端部伸展出窗口的端部。垂直同步脉冲的供给使瞬态消除元件 56 能够产生一个二维窗口，该窗口可以在两个交织区中的每一个的上面移动，形成以典型扫描格式出现的视频框架。瞬态消除元件 56 在去除扫描假象后，将过滤信号提供给与平方电路 58 的输入相连的一个输出。平方电路平方过滤信号中的预设频率部分的值，将平方后的值作为一个输出，该输出与积分器 60 的一个输入相连。积分器 60 积分过滤信号频率部分的平方值，产生一个模拟状态的聚焦



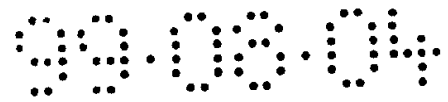
指数信号，该信号被提供给取样及保持电路 62。该取样及保持电路 62 被选通，以保持积分器 60 生成的积分信号的电压值。该积分信号（聚焦指数信号）的电压值代表显微镜 12 的聚焦程度。该聚焦指数信号由信号通道 40 提供给计算机 34。因此，元件 52、56、58、60 和 62 形成模拟电路 36 模拟部分的聚焦指数部分。模拟电路 36 的平均照明部分由积分视频信号的积分器 68 组成，并由同步分离器 50 去除其同步信号。例如，积分器 68 在视频线上的视频信号的积分代表该线上的平均照明。积分器 68 的值被取样及保持电路 70 取样并保持，取样及保持电路的输出形成供给信号通道 42 的平均照明信号。

模拟电路 36 的数字部分包括控制计时电路 66，该控制计时电路接收完整的影像信号，包括其所有的扫描假象，例如垂直和水平同步部分。控制计时电路 66 产生复位并保持信号，使分别在取样及保持电路 62 和 70 中的积分器 60 和 68 顺序同步。并且，控制计时电路 66 产生信号线 46 上的触发信号。

控制计时电路 66 进一步产生瞬态消除元件 56 用来形成窗口所必需的同步信号。

数字部分

参考图 2 和图 4，同步分离器 80(LM1881, National Semiconductor, Arlington, TX) 探测到在控时电路 66 中的视频信号的同步脉冲，该分离器提取水平和垂直脉冲。该计时信息被用来生成代表应用聚焦功能影像区域的窗口。该窗口至少允许去除滤波器 52 在水平线端部产生的间断。模拟电路 36 的这部分可被用作罩发生器，来选择处理视频区的任意矩形部分；通过改变两个单稳多谐振荡器的时间常数，可在垂直和水平方向上定义任意窗口尺寸。该窗口的第一部分由触发器 82a 和 82b 建立；第二部分由触发器 83a 和 83b 建立。这种类型的模拟罩已被用作视频尺寸分析仪。参见 1972 年 IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 19(5)第376-81页中Yin, F.C.P.、Tompkins, W.R.、Peterson, K.L. 和 Intaglietta M 的“A Video-Dimension Analyzer”。瞬态消除元件 56 中的选通放大器 84 使用该窗口信息。



在每个窗口或视频区后，生成一个触发脉冲。控制计时电路 66 也产生频率为 60Hz 的连续触发脉冲，选通计算机 34 以进行对应于每个区的模拟值的 A/D 转换。

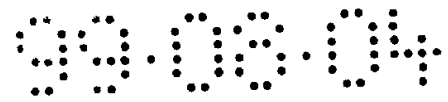
模拟部分

滤波器 52 与宽频单块放大器 90-96 一起使用，该放大器带有高转换速率和高速及稳定性的内部统一增益频率补偿。这种高频、高速放大器较低频器件更易于产生振荡。然而，这种不稳定性可通过减少放大器输入和输出处的杂散电容来消除。电源旁通也被用于稳定性的增进，加入的小电容与反馈电阻并联，以补偿滤波器中不可避免的杂散电容。

图 3a 显示了水平视频线 100 与选定顺序模拟处理输出的图表。同步分离器 50 去除了每个波形 102 的混合视频信号的同步部分。参考电平为接地电平，并且因为同步脉冲的顶部为负，输出将消除同步并使消隐电平接地。在视频信号输入中除去同步脉冲后，该信号被供给聚焦指数部分中的滤波器 52 和照明积分器 68。

在两极有源 Butterworth 滤波器的设置中使用滤波器（LT1220, Linear Technology Corporation, Milpitas, CA）的每个操作放大器 90-96，四个操作放大器排列于第四级低通部分 52a 和第四级高通部分 52b 中。在 2MHz 到 4MHz 内选择频率响应，使之与数字滤波器响应相匹配，该频率响应反映了显微镜 12 中的镜片传递函数。2.56 的段通增益被用于补偿信号衰减。由于各组件的广带宽和整体补偿，无需进一步的特别设计就可以得到好的性能。正确地选择各组件，则截止频率独立于放大器带宽，并仅仅由低通部分 52a 和高通部分 52b 中对应的 R-C 网络决定。显然，这些网络可以包括手调元件。波形 104 代表滤波器输出。

窗口化的过滤信号被补偿、放大和平方，如波形 106 和 108 所示。接着，过滤、平方后的信号在一个视频区上被积分器 60 积分。积分器 60 包括复位、积分和保持控制等功能，可在每个区的末端将电容 110



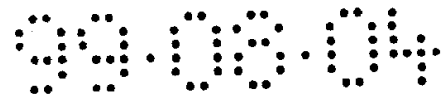
复位，将用于聚焦指数计算的过滤信号积分，并当滤波器 52 无明显输出时，通过二极管 114 保持中间聚焦。先前的自动聚焦模拟电路缺少保持控制，表现为在影像特征之间的聚焦指数输出衰减。这在图 3a 中以波形 109 清楚地表示，其中，在平方波形 108 上标有“盲区”的部分，积分器 60 产生的积分信号的值并不衰减。使用带二极管 114 的积分器 60，而不是常规积分器，可保证聚焦指数更理想地吻合每个视频区的真实数学积分。类似地，积分器 68 的输出由电容 116 和二极管 118 控制。

平均照明部捕捉了去除同步后的视频信号，通过积分一个区域上的信号来度量平均照明量。取样及保持电路被用来为 A/D 板保持最终模拟值。接着，该积分的最终输出和聚焦指数由计算机 34 中的模-数板进行转换。在每个视频区的终点向计算机发出触发信号，以开始新的换算。聚焦指数、平均照明和触发各自接地，并分别与计算机 34 或信号通道 40、42 和 46 按常规方法连接。

在模拟电路 36 中生成的窗口如图 3b 所示，可结合图 2 和图 4 来理解。对于扫描线尺寸，触发电路 82a-82b 根据水平消隐，可生成任一视频线的水平窗口脉冲 120。触发电路 83a-83b 根据垂直消隐，可产生垂直窗口脉冲 124。晶体二极管电路 126 作为与门响应脉冲 120 和 124，当两个脉冲都为高时，将过滤信号从滤波器 52 传送到平方电路 58。显然，在控制计时电路 66 中，触发电路可用于计数和计时，来选择性地调整窗口的尺寸。

聚焦软件、自动聚焦算法

在聚焦处理器 39 中，采用中断服务程序 (ISR)，在由模拟电路 36 提供触发信号的基础上，得到聚焦指数和平均照明信号的模拟值。这个程序还控制聚焦位置、来自自动聚焦电路的模拟值采集和归一化的聚焦程度的计算。可用 C 语言和汇编语言来编写程序。C 程序用 Metaware High C (Santa Cruz, CA) 进行编码。Phar Lap (Cambridge, MA) 汇编程序被用于中断服务程序。



在每个区的末端，触发脉冲起动 ISR，将聚焦指数和平均照明信号的模拟值转变成 C 程序可接受的数组，以计算和设置最佳焦距。

为了确定最佳焦距，计算机 34 执行聚焦程序，其中，物镜 14 的 Z-轴位置被依序排为大量的聚焦位置 (Z_j)。在每个聚焦位置上，捕捉聚焦指数和平均照明信号的值，根据公式(2)计算出聚焦函数值($F(Z_j)$)。聚焦函数值被计算机 34 存贮在图 1 的 130 中。

在每个聚焦程序后，计算机 34 存贮大量位置的聚焦指数，用幂级加权平均数来寻找最佳焦距。通常，单元部分的离散垂直分布会产生包含多个极值的有形聚焦曲线。由于这些原因，加权平均数

$$W_a = \frac{\sum z(F_z)^n}{\sum (F_z)^n} \quad (3)$$

被使用，其中 W_a 是幂级加权平均位置， z 是垂直 (Z-轴) 位置， F_z 是从一个 z 位置上得到的影像上计算出来的聚焦函数 (公式 (2)) 的值， n 是用于加权的幂级。乘方可增强峰值，而平均则降低了标本 3 维特征的影响。

实验结果

显微镜影像中的反差不是标本的固有特性。然而，它是 (1) 照明光波和标本结构的相互作用和 (2) MTF 和显微镜反差生成模式的产物。(1) 取决于标本结构和照明光波的情况；(2) 取决于照明的情况和如何处理离开标本的波。参见 1986 年 Plenum Press, New York 中 Inoué, S. 的 “Video Microscopy”。

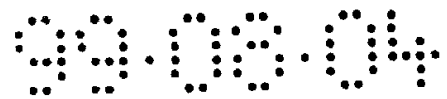
在这些实验中，相衬显微镜被用作自动聚焦的成像技术。在相衬中，透明细胞引入的相变被转换成密度中的变化。参见 1989 年 Pergamon Press 中, Born, M. 和 Wolf, E. 的 “Principles of Optics”。由此产生的影像中的反差可用于完成自动聚焦。相衬也表现为镜片高通滤波器。参见 1986 年 Plenum Press, New York 中 Inoué, S. 的 “Video Microscopy”。经验上，相衬已显示出更易于显示聚焦函数曲线中的侧峰。参见引用的 Price 等的作品。这样，仔细地选择高频对于保证

单峰性是重要的。

在图 5 中，显示了不同 Z-轴位置上的细胞单层相衬实验的图表。通过模拟和数字版可得到类似的聚焦函数曲线，峰的宽度和函数的精确度基本上是单峰的。曲线显示出主波瓣外的阻尼边峰。在单元变焦上的欠抽样会加剧这种情况。增加放大率则导致 Nyquist 采样，并削减了这种情况。滤波器的低截止捕捉到中间范围的频率，在该范围频率下无法假设单峰特性。聚焦指数系统传递函数的增大频率响应导致侧峰趋势降低，该传递函数包括滤波器、CCD 相机和镜片传递函数。

图 6 显示了使用厚细胞单层的模拟聚焦指数图表。标本的 3 维结构产生了最佳焦距的误差，并导致了聚焦函数的扩展。增加的标本厚度似乎也加强了侧峰。这样，聚焦曲线的形状取决于标本和系统传递函数。特定实验条件下的采样周期可用具有 $10\mu\text{m}$ 间隔的显微镜滑片影像来校准。在 1X（使用 40 X 的物镜）的放大率下，该周期为 303nm。根据 Rayleigh 标准可得出分辨率， $d=1.22\lambda / (\text{NA}_{\text{obj}}+\text{NA}_{\text{cond}})$ 。当在照明为 500nm、 NA_{cond} 为 0.52 和 NA_{obj} 为 0.85 时，可得到 445 nm 的分辨率。则所求的 Nyquist 采样为 222.5nm。这样就得到的 Nyquist 采样用放大系数为 $(303/222.5)=1.36\text{ X}$ 。但是，由于许多实际的原因，实际上必需进行更多的采样。参见所引用的 Inoué, S. 等的著作。

这种精心设计的模拟电路的主要优点在于低成本而无性能损耗。实时自动聚焦的数字处理要求使用带流水线结构的实时影像处理器，这可能使成本上升一个数量级。并且，数字滤波器复杂性的增加具有加法效应，这进一步增加了成本或降低了速度。另外，数字自动聚焦使简单任务再次程序化，并且对于实时操作而言，数字影像处理源可被用于简单的一维滤波器，作为派生滤波器（即 $\{1, -1\}$ 和 $\{-1, 2, -1\}$ 高通滤波器和 $\{1, 0, -1\}$ 段通滤波器）的离散近似值。然而，考虑到数字影像处理的成本，用具有相同性能的不贵的模拟电路替换数字应用，可释放这个重要资源，使其可用于其它的、可能是最重要的任务。



通常，使用模拟电路的一个不足之处（至少是与功能相同的数字电路相比）是需局限于动态范围。数字动态范围与像素和灰度的乘积的平方根成正比。模拟处理局限于 A/D 转换器的位数。当然，有限的模拟动态范围可通过加入自动增益控制电路来克服。另外，模拟的应用允许任意的上限截止频率（直到相机的极限），而在数字版中，该上限由影像处理器决定。这使得滤波器 52 中的聚焦截止频率与显微镜镜片传递函数的吻合变得简单，生成更准确的滤波器函数曲线以提高自动聚焦的可重复性。假设 CCD 相机为 768 像素/线，影像处理器 38 仅能数字化 512 像素/线。而采用模拟电路 36，插入式管座可被用于滤波器 52，来简化滤波器功能与每个光学相机和镜片传递函数组合的吻合。模拟电路滤波器 52 比影像处理器 38 的转化简单得多，并且改动起来更便宜。

如上面的详细说明所示，描述并指出了本发明应用于不同实施例的基本的、新颖的特性，但是应该明白，在不脱离所述发明的精神和范围下，本领域的技术人员可以完成所述器件在形式上和细节上的不同的省略、替换和改变。

说明书附图

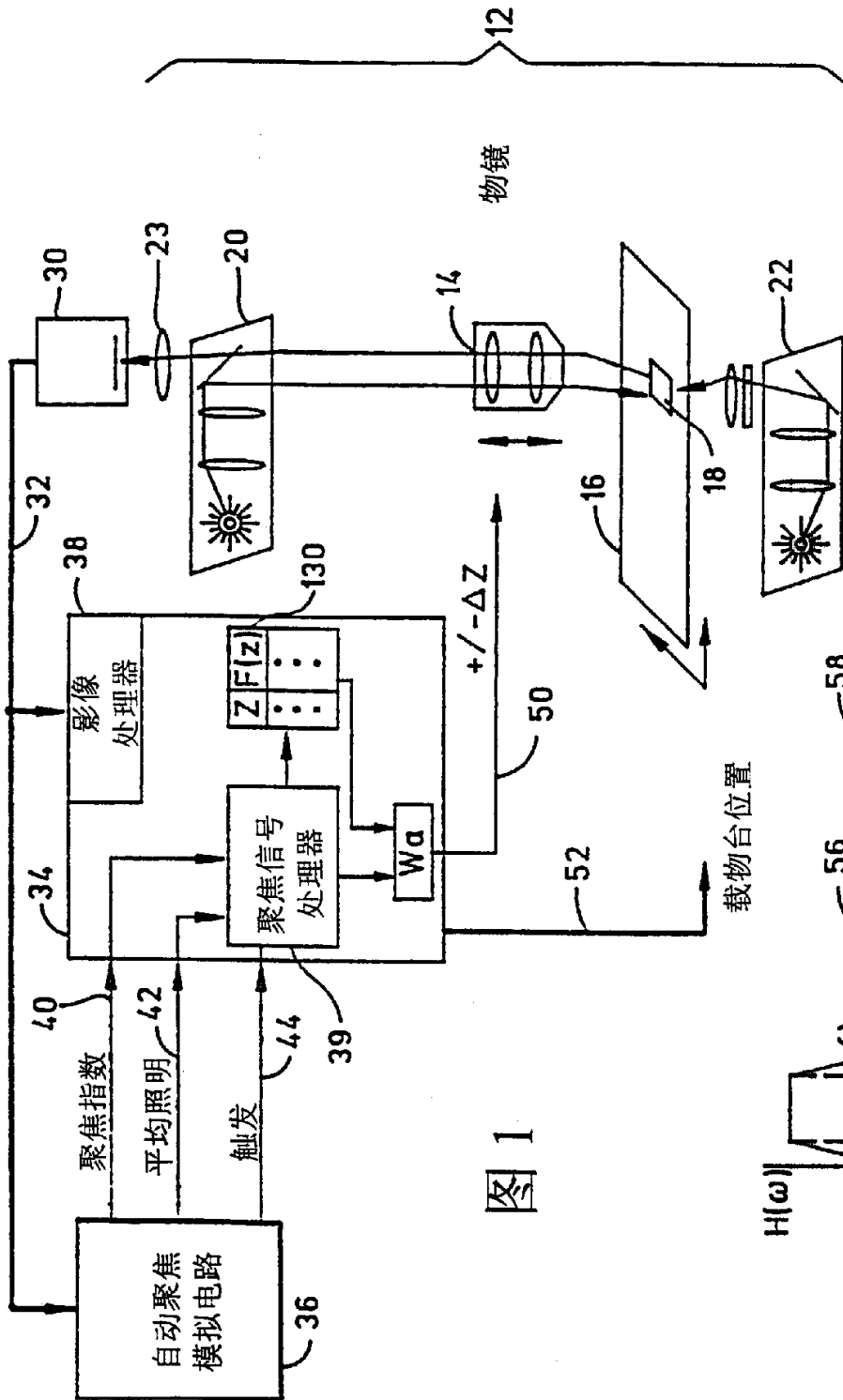


图 1

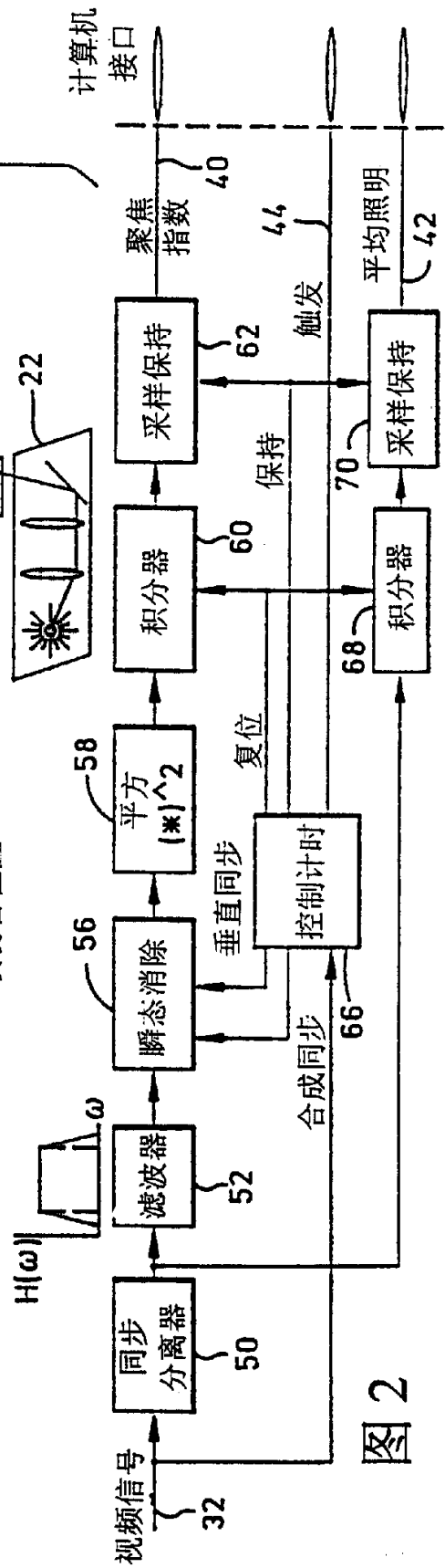


图 2

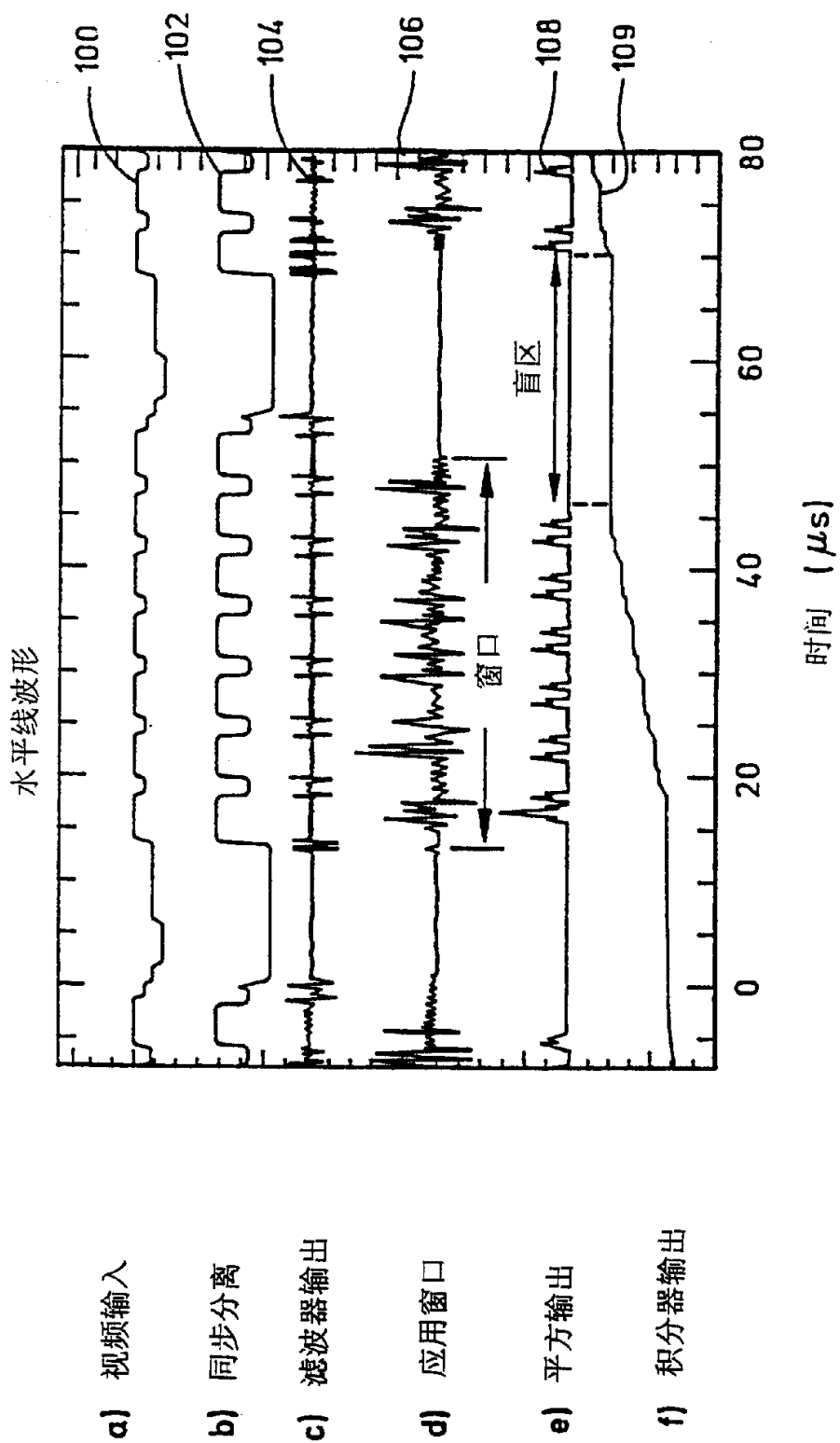


图 3A

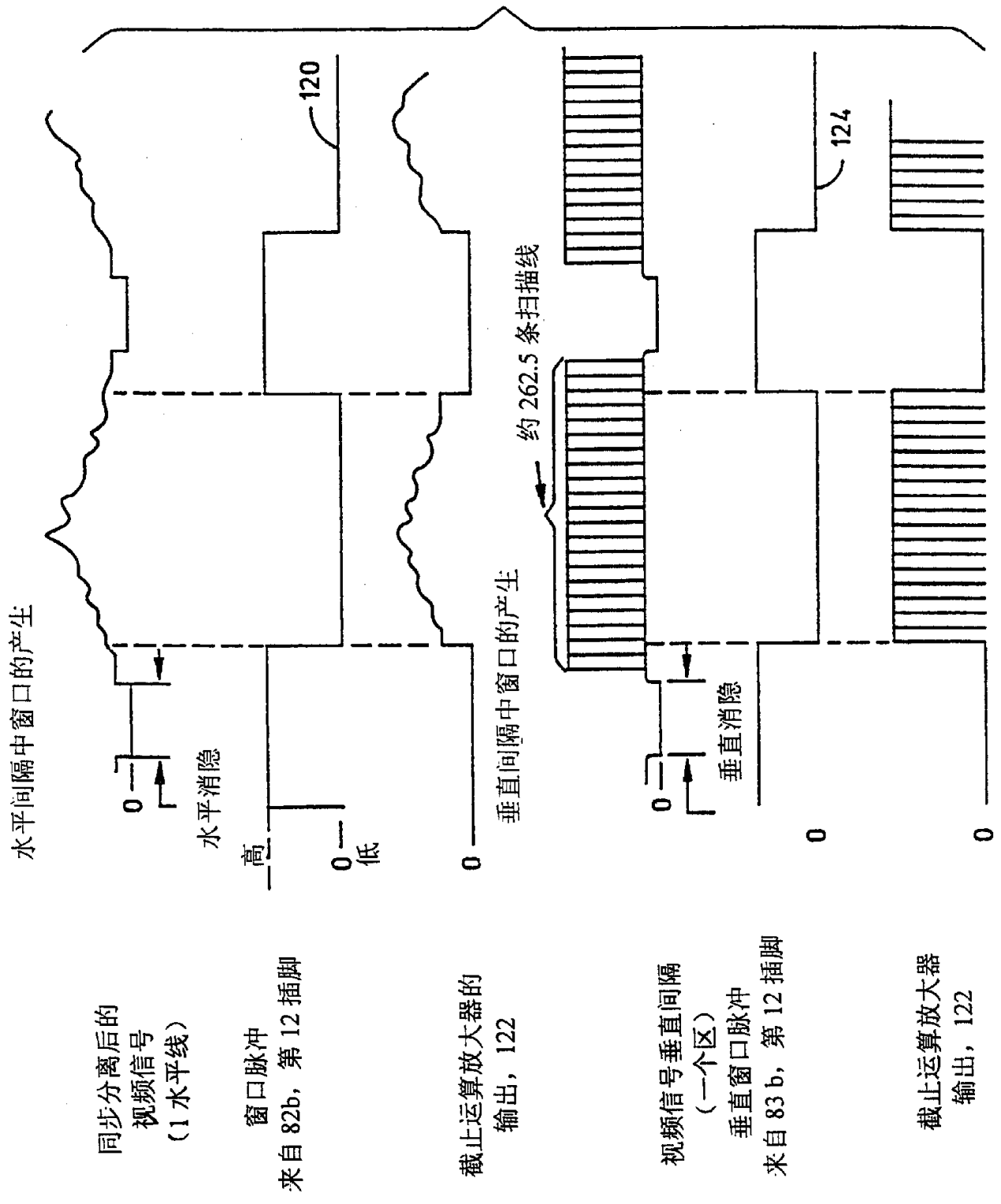


图 3B 截止运算放大器的输出, 122

滤波器 52

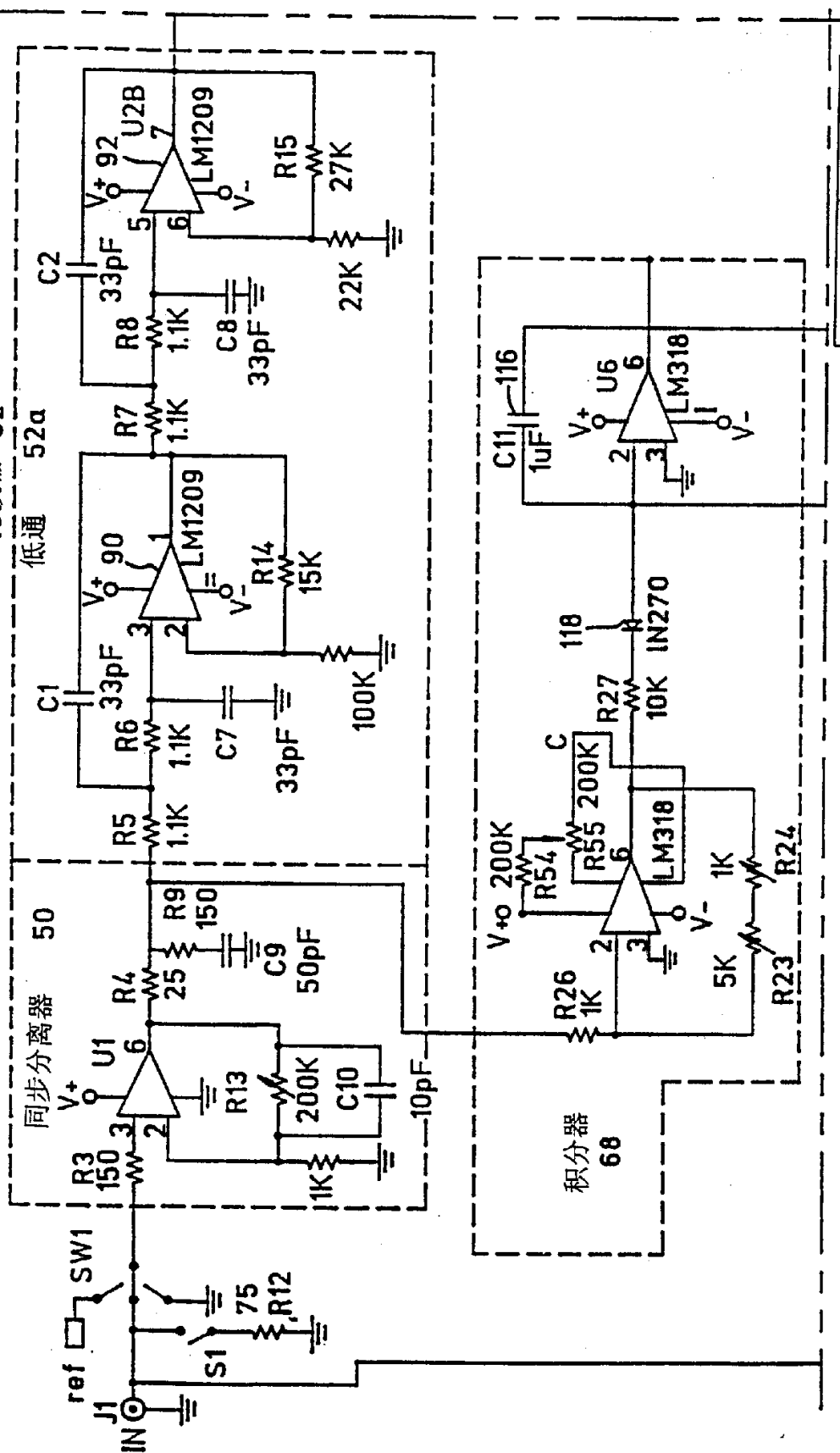


图 4A

图 4A

图 4C

图 4

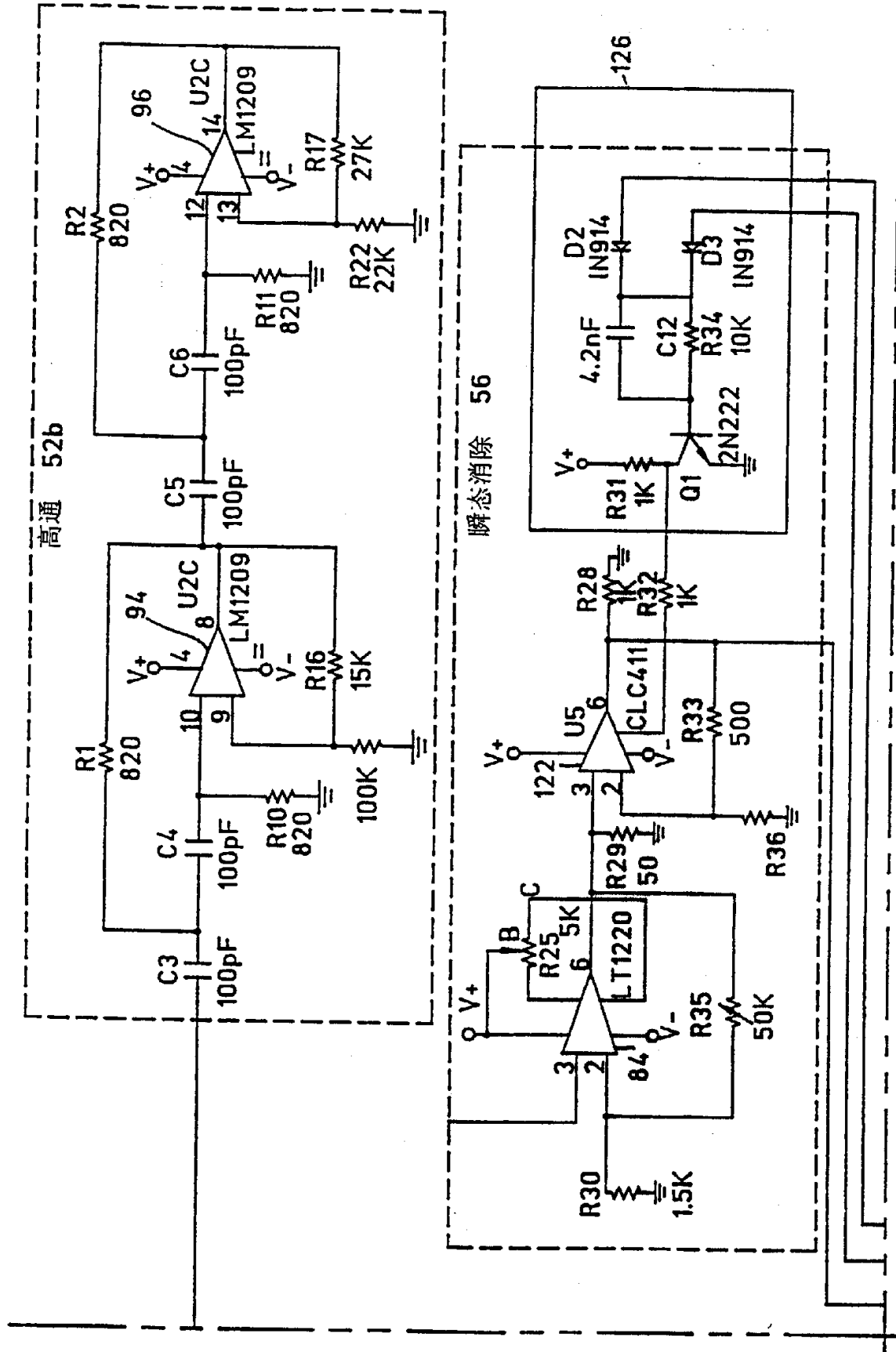


图 4B

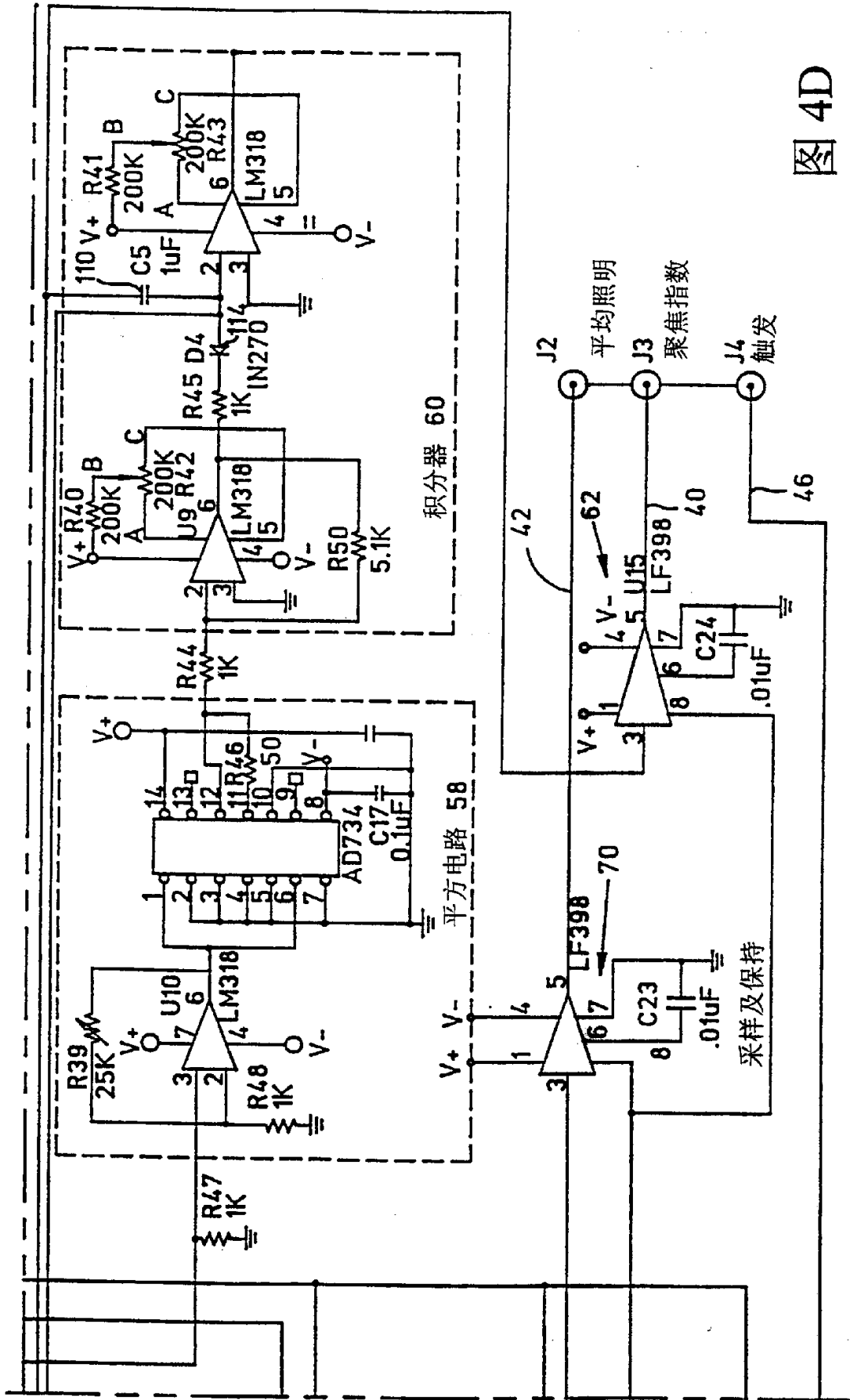


图 4D

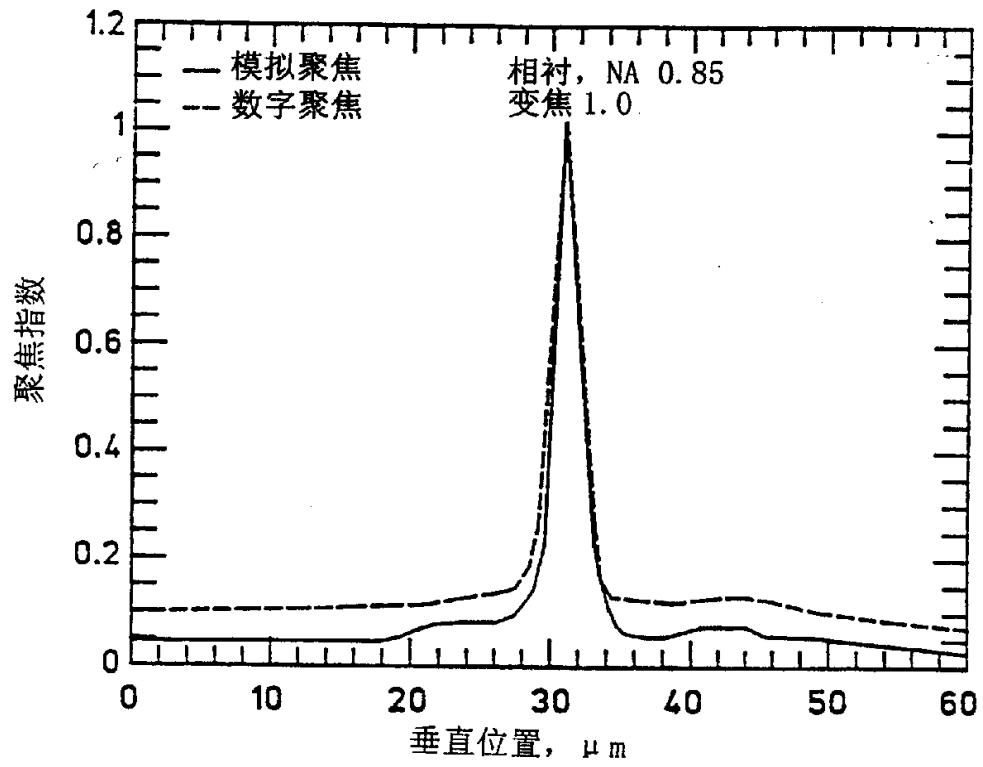


图 5

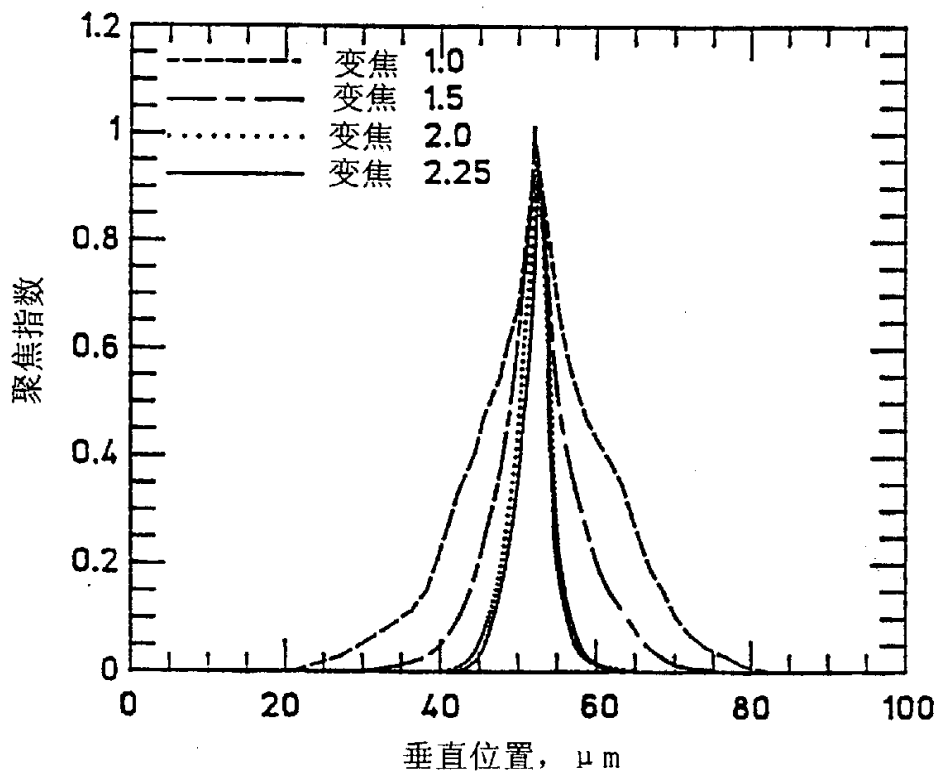


图 6