

# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102279048 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 14

(21) 申请号 201110090770. 6

(22) 申请日 2011. 04. 12

(71) 申请人 华东师范大学

地址 200241 上海市闵行区东川路 500 号

(72) 发明人 李庆利 王依婷

(74) 专利代理机构 上海蓝迪专利事务所 31215

代理人 徐筱梅 张翔

(51) Int. Cl.

G01J 3/28(2006. 01)

G01J 3/02(2006. 01)

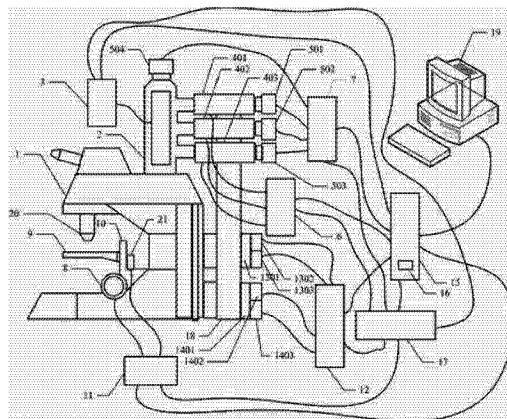
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

## (54) 发明名称

一种宽波段显微成像光谱系统及其变波长快速调焦控制方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种宽波段显微成像光谱系统及其变波长快速调焦控制方法,系统包括显微镜、多光路切换器、光路控制器、分光单元、增强型电荷耦合器件 (ICCD)、分光单元控制器、图像采集单元、驱动电机、载物台、载物台支架、位置传感器、光源和分光单元支架、对焦控制器、2×1 光路耦合器、反射普通光源、反射激光光源、透射普通光源、透射激光光源、光源控制器、图像配准和控制单元、电源模块、计算机,系统能够根据波长的变化自动调整载物台的高度,实现对波长变化所引起焦距变化的快速补偿,并可以对于采集的单波段图像进行像素级配准;本发明成像光谱范围宽,覆盖了紫外、可见光和红外,可同时获取样本的显微图像和光谱信息,可对检测样本进行结构和功能上的识别与分析。



1. 一种宽波段显微成像光谱系统,其特征在于该系统包括显微镜(1)、多光路切换器(2)、光路控制器(3)、第一分光单元(401)、第二分光单元(402)、第三分光单元(403)、第一 ICCD (501)、第二 ICCD (502)、第三 ICCD (503)、第四 ICCD (504)、分光单元控制器(6)、图像采集单元(7)、驱动电机(8)、载物台(9)、载物台支架(10)、对焦控制器(11)、光源控制器(12)、第一 2×1 光路耦合器(1301)、反射普通光源(1302)、反射激光光源(1303)、第二 2×1 光路耦合器(1401)、透射普通光源(1402)、透射激光光源(1403)、图像配准和控制单元(15)、通信接口(16)、电源模块(17)、光源和分光单元支架(18)、计算机(19)、物镜(20)、位置传感器(21),所述显微镜(1)、反射普通光源(1302)、反射激光光源(1303)、第一 2×1 光路耦合器(1301)、透射普通光源(1402)、透射激光光源(1403)、第二 2×1 光路耦合器(1401)、物镜(20)、多光路切换器(2)、第一分光单元(401)、第二分光单元(402)、第三分光单元(403)成光路连接,其中,反射普通光源(1302)、反射激光光源(1303)、第一 2×1 光路耦合器(1301)、透射普通光源(1402)、透射激光光源(1403)、第二 2×1 光路耦合器(1401)、第一分光单元(401)、第二分光单元(402)、第三分光单元(403)通过光源和分光单元支架(18)与显微镜(1)固定在一起;反射普通光源(1302)、反射激光光源(1303)通过第一 2×1 光路耦合器(1301)耦合后接入显微镜(1)的反射光源接入端;透射普通光源(1402)、透射激光光源(1403)通过第二 2×1 光路耦合器(1401)耦合后接入显微镜(1)的透射光源接入端;反射普通光源(1302)、反射激光光源(1303)、透射普通光源(1402)、透射激光光源(1403)的控制输入端连接到光源控制器(12)的控制输出端,光源控制器(12)的输入端连接到图像配准和控制单元(15)的控制输出端;载物台(9)固定在载物台支架(10)上,载物台支架(10)通过精密螺纹与驱动电机(8)耦合,驱动电机(8)的控制输入端连接到对焦控制器(11)的输出控制端上,对焦控制器(11)的输入端连接到图像配准和控制单元(15)的控制输出端上;多光路切换器(2)耦合到显微镜(1)的成像输出端口,多光路切换器(2)的四路输出分别耦合到第一分光单元(401)、第二分光单元(402)、第三分光单元(403)的前端和第四 ICCD (504)的输入端;第一分光单元(401)、第二分光单元(402)、第三分光单元(403)的后端分别耦合到第一 ICCD (501)、第二 ICCD (502)、第三 ICCD (503)成像端口上,第一 ICCD (501)、第二 ICCD (502)、第三 ICCD (503)、第四 ICCD (504)的数据输出端连接到图像采集单元(7)的数据输入端上,图像采集单元(7)的输出端连接到图像配准和控制单元(15)上,第一分光单元(401)、第二分光单元(402)、第三分光单元(403)的控制端连接到分光单元控制器(6)的控制输出端上,分光单元控制器(6)的控制输入端连接到图像配准和控制单元(15)的控制输出端上;图像配准和控制单元(15)连接到计算机(19)上,图像配准和控制单元(15)上预留有通信接口(16);电源模块(17)分别连接到图像配准和控制单元(15)、光路控制器(3)、图像采集单元(7)、分光单元控制器(6)、光源控制器(12)、对焦控制器(11)上。

2. 根据权利要求 1 所述的宽波段显微成像光谱系统,其特征在于所述第一分光单元(401)、第二分光单元(402)、第三分光单元(403)分别处于不同的工作波长范围,其数量可以为两个以上。

3. 根据权利要求 1 所述的宽波段显微成像光谱系统,其特征在于系统所使用的光路元件均为能够透过从紫外到红外整个光谱范围的器件。

4. 根据权利要求 1 所述的宽波段显微成像光谱系统,其特征在于所述显微镜(1)为普

通光学显微镜、荧光显微镜或者倒置显微镜。

5. 根据权利要求 1 所述的宽波段显微成像光谱系统,其特征就在于所述显微镜(1)的照明光源是普通白光光源、激光光源、透射照明光源或反射照明光源。

6. 一种使用权利要求 1 所述系统实现变波长快速调焦控制方法,其特征就在于该方法包括以下步骤:

a、设置数据采集参数,包括采集超光谱图像的光谱范围、光谱分辨率、光源类型;

b、控制分光单元工作于其起始扫描波长位置,使用 ICCD 采集当前波长单波段图像,根据图像灰度差异自动调整载物台直至正确对焦,记录载物台位置作为该分光单元起始波长对应的载物台起始位置;

c、根据比尔朗伯定理计算调整到不同波长值时,在该波长成像时载物台位置相对于步骤 b 测量的分光单元起始波长载物台起始位置应该补偿的值,并作为波长与载物台位置补偿表存储;

d、进行显微超光谱图像数据采集时,首先使分光单元工作于起始波长位置,控制载物台处于步骤 b 的起始位置,使用 ICCD 记录单波段图像,然后根据设定的光谱分辨率调整分光单元工作于新的波长位置,根据新的波长值查载物台位置补偿表,对载物台位置进行修正,然后采集该波长位置的单波段图像,如此循环直至所有波长扫描结束;

e、根据预存的变波长焦距补偿值对所有单波段图像进行像素级配准,去除由于焦距变化对数据光谱维引起的影

## 一种宽波段显微成像光谱系统及其变波长快速调焦控制方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种显微成像光谱装置,特别是一种具有变波长快速调焦控制和图像配准功能的宽波段显微成像光谱系统。用于临床诊断、新型材料分析等领域。

### 背景技术

[0002] 生物学和医学发展经历了依靠外观辨认的解剖生物学阶段(组织学阶段)和深入细胞层次的显微细胞生物学阶段,目前正在向分子生物学更高阶段发展,不但要求从分子层次探求生命和疾病的生理、病理源由和影响情况,更要求认识细胞内外化学和生化组分及其变化信息。细胞内外组分的定性、定量和定位信息及其变化情况,将直接影响着细胞的生存、发展微环境状态,也会影响其生理和病理状态,因而直接决定生命过程及生物组织的形成、发育和老化,以及疾病的形成、发展、药物的作用等生物医学领域最重要的问题。传统医学成像诊断显示的是生物组织病变的解剖变化,这种成像方法已经不能适应生命科学和病理学发展的新要求。如何从细胞水平甚至分子水平研究疾病发生发展机制并探讨诊断和治疗疾病的有效方法,已经成为影像学、生物学和临床医学研究的热点。显微成像光谱技术可以同时提供生物组织样本图像和光谱两方面的信息,即图像立方体。因此可以同时检测目标进行结构成像和功能成像,在细胞遗传、免疫荧光、免疫组织化学、病理学和新药创制等领域有着巨大的应用潜力。

[0003] 经对现有技术文献的检索分析发现,中国专利申请号:200410017031.4,《显微高光谱成像系统》公开的技术方案是:把显微成像技术和高光谱成像技术相结合的一种集成系统,包括光学显微镜、光谱仪、面阵 CCD 相机以及专用数据采集与处理软件。可提供图谱合一微观光谱图像,能广泛应用于临床医学、生物学、材料学、微电子学等学科领域中。该技术方案是一种推帚式的显微高光谱成像系统,该系统利用步进电机驱动载物台进行平动,实现物方推扫。而在实际使用过程中,这种推扫的方式带来两个问题:一是推扫是一种机械运动,速度比较慢,使图像采集时间较长;二是推扫运动使得操作繁琐,可靠性不高,不利于作为通用设备使用。

[0004] 针对这些问题,中国专利申请号:200810036683.0,《分子光谱成像仪》使用声光调谐滤波器(Acousto Optic Tunable Filter, AOTF)或者液晶可调谐滤波器(Liquid Crystal Tunable Filter, LCTF)作为色散单元,避免了推扫运动,可以实现快速成像;成像的光谱范围可以包括可见光和近红外两部分;但是,该系统是通过对光源分光实现的光谱成像,测量时不可避免地会受到环境杂散光的影响,给成像质量带来不利影响。

[0005] 虽然这两个系统都实现了对显微目标下的光谱成像,但是仍然存在一定的问题:首先,这两个系统设计时都没有考虑到波长变化对成像焦距的影响,没能解决在采集超光谱图像时随着波长的变化引起的单波段图像变模糊的问题;其次,现有类似系统在设计时并没有考虑焦距变化后各个单波段图像之间的配准问题;最后,现有系统没有实现高分辨率普通光学成像与光谱成像同时采集和配准以及波长范围可根据需要调整的问题。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是针对现有技术的不足而提供的一种具有变波长快速调焦控制和图像配准功能的宽波段显微成像光谱系统。该系统使用对焦控制器自动根据波长的变化计算并调整显微镜的成像焦距,从而克服单波段图像随着波长的变化而模糊的问题;该系统使用分光单元对显微镜后端进行分光,避免了测量环境杂散光的影响;该系统使用光路切换器对成像光路进行多路切换,满足不同波长成像检测范围和保留高分辨率普通光学成像的需要,同时使用图像配准单元对在焦距微调后采集的不同波长的单波段图像进行像素级配准,避免光谱维测量误差的出现。由于所提供的数据采集和控制软件可以根据预先设定波长范围自动计算出每个波长需要补偿的焦距值,因此在实际图像数据采集时调焦速度比传统的对焦方法要快,与后续的图像配准功能结合起来,真正实现了变波长快速调焦和图像配准相结合的宽波段显微光谱成像。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的:

一种具有变波长快速调焦控制和图像配准功能的宽波段显微成像光谱系统,它包括显微镜、多光路切换器、光路控制器、分光单元、增强型电荷耦合器件(Intensified Charge Coupled Device, ICCD)、分光单元控制器、图像采集单元、驱动电机、载物台、载物台支架、位置传感器、光源和分光单元支架、对焦控制器、 $2 \times 1$  光路耦合器、反射普通光源、反射激光光源、透射普通光源、透射激光光源、光源控制器、图像配准和控制单元、电源模块、计算机。

[0008] 不同于普通显微镜和现有的显微超光谱成像系统,本发明的系统所有的光路部分元件均由能够透过紫外和红外的材料构成,不会由于光路元件的原因而限制系统采集数据的光谱范围。显微镜的成像光路耦合了多光路切换器,多光路切换器具有四个以上的标准接口,分别耦合到高分辨率 ICCD 和不同波长工作范围的分光单元前端,各个分光单元的后端耦合有 ICCD,分别用于采集样本的高分辨率普通光学图像和不同波长的单波段图像。光路控制器的控制端连接到多光路切换器上,光路控制器的控制输入端连接到图像配准和控制单元上,用于根据测量需要选择不同的光路到达各个分光单元。分光单元控制器的控制端分别连接到各个分光单元,控制其工作于不同的波长,分光单元控制器的输入端连接到图像配准和控制单元上,接收其发出的控制指令。显微镜的载物台固定在载物台支架上,载物台支架通过精密螺纹与驱动电机耦合,驱动电机连接到对焦控制器的控制端上,在对焦控制器的控制下,驱动电机可以按照预先计算的调整值随着分光单元控制器对分光单元工作波长的调整而上下移动载物台,从而根据波长的改变而快速改变成像焦距,安装在载物台支架上的位置传感器可以记录当前载物台的位置信息。光源控制器的控制端分别连接到反射普通光源、反射激光光源、透射普通光源、透射激光光源四个照明光源上,其中反射激光光源和反射普通光源通过  $2 \times 1$  光路耦合器将光路引入显微镜,透射普通光源和透射激光光源通过另一  $2 \times 1$  光路耦合器将光路引入显微镜,光源控制器的输入端连接到图像配准和控制单元上,根据图像配准和控制单元的控制需要控制照明光源的工作,分别对应于样本的透射照明和反射照明。电源模块分别连接到光路控制器、分光单元控制器、图像采集单元、对焦控制器、光源控制器、图像配准和控制单元上,为其提供各种电压的工作电源。图像采集单元采集的数据传输到图像配准和控制单元中,图像配准和控制单元一方面实现对单波段图像的像素级配准,最后将采集的数据传输到计算机供后续处理分析;另一方面接收计算机数据采集软件的控制指令,对系统的光路控制器、分光单元控制器、图像采集单元

和对焦控制器按照时序进行控制,使其协同工作采集出高质量显微超光谱图像数据。该数据既包含了样本的空间结构信息,也包含了每一像素点的光谱信息。通过对这些数据的综合分析,结合一定的智能识别分析算法,可以进一步提高样本识别分析的精度。

## 附图说明

[0009] 图 1 为本发明系统结构示意图;

图 2 为本发明变波长快速调焦控制流程图。

## 具体实施方式

### 实施例

[0010] 下面以图 1 为实施例,说明本发明的结构特征,技术性能和效果。

[0011] 本实施例中,显微镜 1 的反射普通光源 1302、反射激光光源 1303、第一  $2\times 1$  光路耦合器 1301、透射普通光源 1402、透射激光光源 1403、第二  $2\times 1$  光路耦合器 1401、物镜 20、多光路切换器 2、第一分光单元 401、第二分光单元 402、第三分光单元 403 分别成光路连接,其中整个系统所使用的光路元件均为能够透过从紫外到红外整个光谱范围的器件。

[0012] 反射普通光源 1302 和反射激光光源 1303 通过第一  $2\times 1$  光路耦合器 1301 耦合后连接到显微镜 1 的反射光源输入端,根据样本测量需要提供反射的普通光或者激光光源;透射普通光源 1402 和透射激光光源 1403 通过第二  $2\times 1$  光路耦合器 1401 耦合后连接到显微镜 1 的透射光源输入端,根据样本测量需要提供透射的普通光或者激光光源;反射普通光源 1302、反射激光光源 1303、透射普通光源 1402、透射激光光源 1403 的控制输入端连接到光源控制器 12 的控制输出端上,光源控制器 12 的控制输入端连接到图像配准和控制单元 15 的控制输出端上,图像配准和控制单元 15 根据采集数据的需要通过光源控制器 12 选择显微镜 1 的照明方式和照明光源。图像配准和控制单元 15 上预留 USB、RJ45 等各种通信接口 16,可以将采集的数据输出到其他设备。

[0013] 载物台 9 固定在载物台支架 10 上,载物台支架 10 通过精密螺纹与驱动电机 8 耦合,驱动电机 8 的控制输入端连接到对焦控制器 11 的输出控制端上,对焦控制器 11 可以根据需要通过驱动电机 8 推动载物台 9 实现微米级的上下移动,对焦控制器 11 的输入端连接到图像配准和控制单元 15 的输出端上,图像配准和控制单元 15 可以根据拟采集超光谱图像的波长范围预先计算每个波段需要补偿调整的焦距值,采集时通过对焦控制器 11 控制相应部件实现焦距的补偿。安装于载物台支架 10 上的位置传感器 21 可以记录载物台 9 的当前位置,并且可以实时将该位置信息传输给对焦控制器 11,为电机的控制提供反馈参数。

[0014] 光路控制器 3 的输出控制端连接到多光路切换器 2 上,控制多光路切换器 2 将显微镜成像光路在四个通道之间进行切换输出,光路控制器 3 的控制输入端连接到图像配准和控制单元 15 的控制输出端上,多光路切换器 2 按照图像配准和控制单元 15 的指令选择相应的成像光路到不同工作波长范围的分光单元;多光路切换器 2 的四路输出分别耦合到第一分光单元 401、第二分光单元 402、第三分光单元 403 的输入端和第四 ICCD 504 的输入端,分别实现不同波长的分光和直接的光学成像;第一分光单元 401、第二分光单元 402、第三分光单元 403 的控制端连接到分光单元控制器 6 的控制输出端上,分光单元控制器 6 的

控制输入端连接到图像配准和控制单元 15 的控制输出端上,在图像配准和控制单元 15 根据采集需要选择了不同的成像光路后,由分光单元控制器 6 控制相应的分光单元工作,实现分光功能;第一分光单元 401、第二分光单元 402、第三分光单元 403 的输出端分别耦合有第一 ICCD501、第二 ICCD502、第三 ICCD503,第一 ICCD501、第二 ICCD502、第三 ICCD503、第四 ICCD504 的输出连接到图像采集单元 7 上,记录不同波段的灰度图像和高分辨率普通光学图像;图像采集单元 7 的输出端连接到图像配准和控制单元 15 上,由图像配准和控制单元 15 对采集的所有单波段图像和高分辨率普通光学图像结合采集参数进行像素级配准。

[0015] 光源和分光单元支架 18 分别将反射普通光源 1302、反射激光光源 1303、第一 2×1 光路耦合器 1301、透射普通光源 1402、透射激光光源 1403、第二 2×1 光路耦合器 1401、第一分光单元 401、第二分光单元 402、第三分光单元 403 与显微镜 1 固定在一起成为一个整体。

[0016] 电源模块 17 连接到图像配准和控制单元 15、光路控制器 3、图像采集单元 7、分光单元控制器 6、光源控制器 12、对焦控制器 11 上,对其提供相应的工作电源;图像配准和控制单元 15 的输入端连接到计算机 19 上,计算机 19 上运行系统控制和图像数据分析软件,对图像配准和控制单元 15 的工作模式和参数进行设置,并对采集的数据进行后续的智能化识别分析。

[0017] 系统变波长快速调焦流程如图 2 所示,在进行数据采集时,首先通过运行于计算机 19 上的操作软件设置数据采集参数,包括采集超光谱图像的光谱范围、光谱分辨率、光源类型等并将这些参数发送到图像配准和控制单元 15 上,图像配准和控制单元 15 根据所选择的参数通过光源控制器 12 选择相应的光源和照明方式,通过光路控制器 3 将成像光路切换到第四 ICCD504,第四 ICCD504 可以直接采集没有经过分光的显微图像,图像采集单元 7 对采集的图像灰度进行分析并与设定值进行比较,如果没有满足要求则通过对焦控制器 11 继续移动载物台 9,如此循环直至载物台 9 的位置达到要求,即能够清晰成像,则通过位置传感器 21 记录当前载物台 9 的位置。

[0018] 通过光路控制器 3 将成像光路切换到第一 ICCD501 光路,在分光单元控制器 6 的控制下使第一分光单元 401 工作于其起始扫描波长位置,使用第一 ICCD501 采集当前波长下的单波段图像,同时使用相同的方法调整载物台 9 直至单波段图像清晰度达到要求并记录下载物台 9 的位置;使用相同的步骤切换成像光路分别获得第二分光单元 402、第三分光单元 403 的起始波长时能清晰成像的载物台位置,将这些位置参数作为起始采集参数记录下来为后续自动采集使用。

[0019] 根据比尔朗伯定理计算当光的波长发生变化时,显微镜成像焦距应该补偿的值并将其作为参数表存储到图像配准和控制单元 15 中,正式开始自动采集时,首先根据采集参数的设置情况选择相应的成像光路,通过分光单元控制器 6 使分光单元工作于设定的波长,图像配准和控制单元 15 根据当前工作波长与起始波长的差、起始波长时载物台 9 的位置,结合预存的变波长焦距补偿值计算当前工作波长载物台 9 的位置,通过对焦控制器 11 控制载物台 9 移动到指定位置从而实现快速对焦,图像采集单元 7 通过 ICCD 采集当前波长的单波段图像并存储,根据设置的光谱分辨率修改分光单元的工作波长,同时使用相同的方法继续计算并调整载物台的位置,直至设定光谱范围内的所有的单波段图像都采集完毕。将所采集的图像数据传输到图像配准和控制单元 15 中,根据预存的变波长焦距补偿值

对所有单波段图像进行像素级配准,去除由于焦距变化对数据光谱维引起的影响,将配准后的数据传输到计算机 9,使用智能识别分析软件进行后续的处理和分析。

[0020] 本发明通过使用多个不同工作波长范围的分光单元实现了更宽光谱范围的显微超光谱成像;根据图像灰度差异使用新算法实现了数据开始采集时首波段的自动对焦;根据比尔朗伯定理预先计算焦距补偿值,控制载物台移动解决了采集过程中由于波长变化引起的变焦快速补偿问题;通过多种光源的耦合实现了多种照明方式的灵活搭配,可以测量生物自体发光和激光激发荧光成像;通过实时记录采集参数结合相应算法对采集的单波段图像和高分辨率光学图像进行了像素级配准,消除了由于变焦引起的光谱维误差。本发明实现了具有根据波长变化进行快速调焦控制和图像配准功能的宽波段显微成像光谱系统,该系统能够提供更丰富的样本信息,在生物医药、纳米科技等领域具有良好的应用前景。



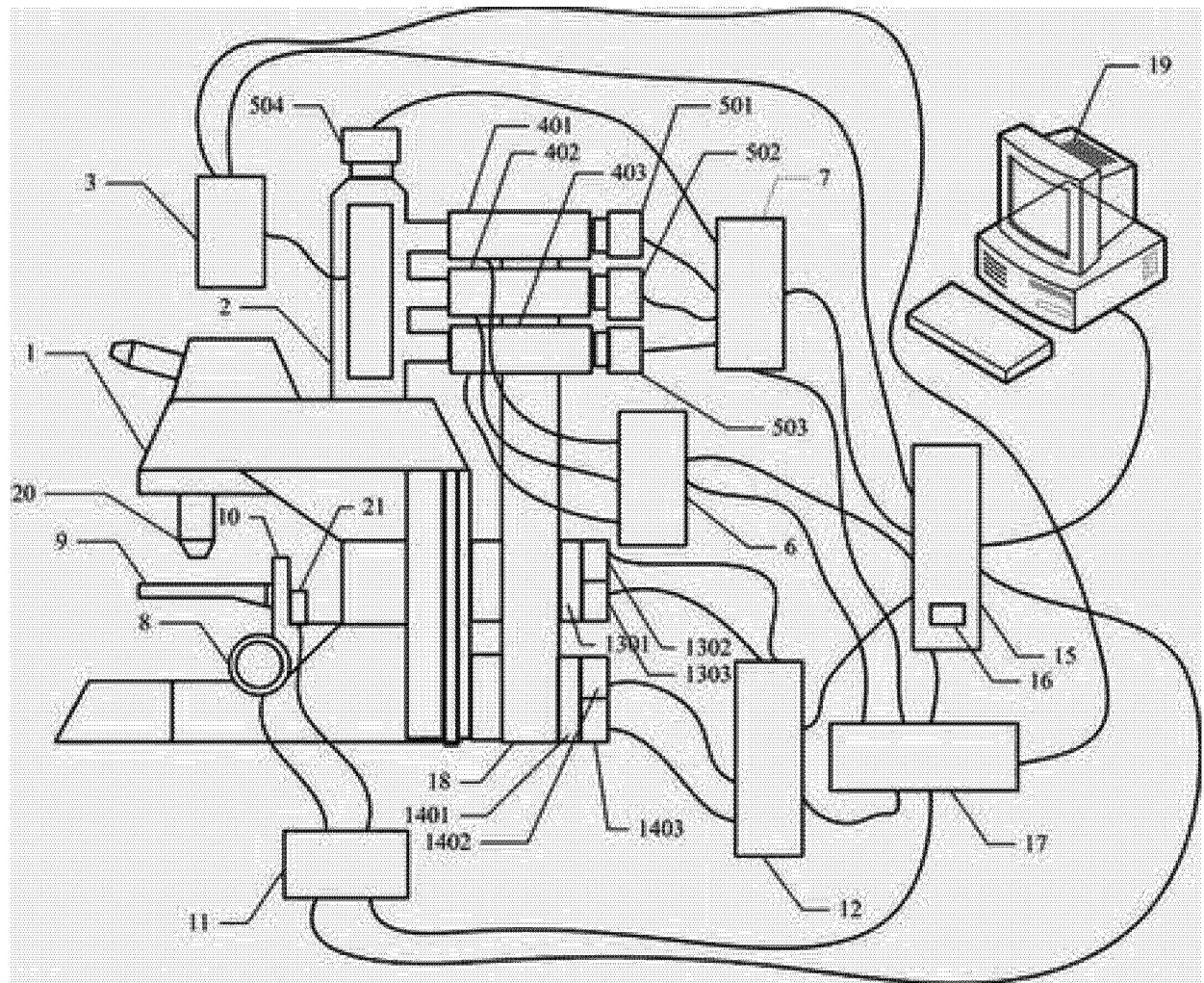


图 1

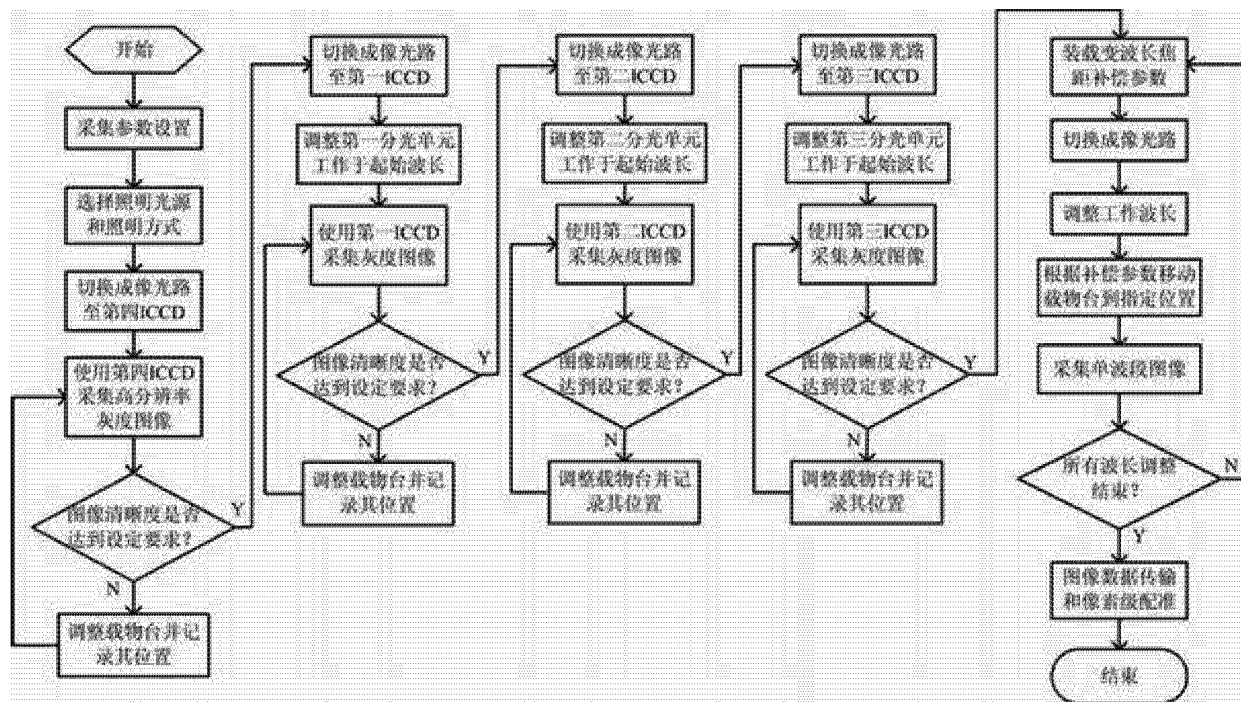


图 2