

全自动推扫式高光谱显微成像系统设计与研究

唐凌宇 葛明锋 董文飞

Design and research of fully automatic push-broom hyperspectral microscopic imaging system

TANG Ling-yu, GE Ming-feng, DONG Wen-fei

引用本文:

唐凌宇, 葛明锋, 董文飞. 全自动推扫式高光谱显微成像系统设计与研究[J]. *中国光学*, 2021, 14(6): 1486–1494. doi: 10.37188/CO.2021-0040

TANG Ling-yu, GE Ming-feng, DONG Wen-fei. Design and research of fully automatic push-broom hyperspectral microscopic imaging system[J]. *Chinese Optics*, 2021, 14(6): 1486-1494. doi: 10.37188/CO.2021-0040

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.37188/CO.2021-0040>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

光谱成像技术在海域目标探测中的应用

Application of spectral imaging technology in maritime target detection

中国光学. 2017, 10(6): 708 <https://doi.org/10.3788/CO.20171006.0708>

推扫式多光谱遥感相机动态范围拓展方法

Dynamic range extending method for push-broom multispectral remote sensing cameras

中国光学. 2019, 12(4): 905 <https://doi.org/10.3788/CO.20191204.0905>

深海光学照明与成像系统分析及进展

Analysis and research progress of deep-sea optical illumination and imaging system

中国光学. 2018, 11(2): 153 <https://doi.org/10.3788/CO.20181102.0153>

图-谱结合的压缩感知高光谱视频图像复原

Graph-spectral hyperspectral video restoration based on compressive sensing

中国光学. 2018, 11(6): 949 <https://doi.org/10.3788/CO.20181106.0949>

结构光照明超分辨光学显微成像技术与展望

Structured illumination super-resolution microscopy technology: review and prospect

中国光学. 2018, 11(3): 307 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0307>

傅立叶变换型线偏振干涉成像系统分析与设计

Analysis and design of Fourier transform polarization interference imaging system

中国光学. 2019, 12(3): 638 <https://doi.org/10.3788/CO.20191203.0638>

文章编号 2095-1531(2021)06-1486-09

全自动推扫式高光谱显微成像系统设计与研究

唐凌宇^{1,2}, 葛明锋^{2*}, 董文飞^{1,2}

(1. 长春理工大学机电工程学院, 吉林 长春 130022;

2. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163)

摘要: 为了将光谱成像技术更方便地引入显微成像领域, 本文将高光谱成像技术与显微成像技术相结合, 搭建出一套全自动推扫式高光谱显微成像系统。系统以倒置显微镜为主体进行设计, 采用棱镜-光栅元件进行光谱分光, 利用高精度二维电动运动平台进行推扫, 同时结合电动对焦组件完成对焦, 最后成像在高灵敏 sCMOS 科学相机上。根据大多数生物样本光谱检测需求, 系统的光谱范围选择 420~800 nm。经光谱定标和空间分辨率测试, 确定系统的光谱采样率为 2.06 nm, 光谱分辨率均值优于 3.5 nm, 空间分辨率优于 0.87 μm 。系统引入激光自动对焦系统作为主动对焦模块, 以 HE 染色的乳腺癌病理切片为研究对象, 实验分别采用被动对焦和主动对焦方式进行推扫成像, 并比较分析两种方式的优劣, 认为两者均可以满足大视场成像需求, 但主动对焦成像更快速、更清晰, 更加适合推扫式高光谱显微成像系统。通过对全自动推扫式高光谱显微成像系统的设计与研究, 解决了高光谱显微成像中无法实时对焦的难题, 实现了 40 倍显微物镜下 3.25 mm \times 3.25 mm 范围内全自动成像, 有利于促进光谱技术在生物医学等领域中的应用。

关键词: 显微成像; 高光谱成像; 自动对焦

中图分类号: TH742

文献标志码: A

doi: 10.37188/CO.2021-0040

Design and research of fully automatic push-broom hyperspectral microscopic imaging system

TANG Ling-yu^{1,2}, GE Ming-feng^{2*}, DONG Wen-fei^{1,2}

(1. School of Mechanical and Electrical Engineering, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China;

2. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Science, Suzhou 215163, China)

* Corresponding author, E-mail: gemf@sibet.ac.cn

Abstract: To apply hyperspectral technology to the field of microscopic imaging more conveniently, we designed and built a fully automatic push-broom hyperspectral microscopic imaging system. In this system, an

收稿日期: 2021-02-19; 修订日期: 2021-03-15

基金项目: 国家重点研发计划 (No. 2017YFF0108600); 中国科学院仪器设备研制项目 (No. YJKYYQ20200038); 江苏省重点研发计划 (社会发展 No. BE2019683); 济南市“高校 20 条”资助项目 (No. 2018GXRC016)

Supported by National Key R&D Program of China (No. 2017YFF0108600); Supported by the Scientific Instrument Developing Project of the Chinese Academy of Sciences (No. YJKYYQ20200038); Primary Research & Development Plan of Jiangsu Province (Social Development No. BE2019683); The Science and Technology Department of Jinan City (No. 2018GXRC016)

inverted microscope was designed as the main body, a prism-grating component was used for spectrum splitting, a high precision two-dimensional motorized stage was applied for a push-broom. A motor focus module was used to control the focus, and a hyperspectral microscopic image was collected through a highly sensitive sCMOS scientific camera. The system has the advantages of low cost, easy installation and adjustment, real-time focusing and large-field-of-view imaging. The spectral range of the system is from 420 nm to 800 nm to meet the spectrum detection requirements of most biological samples. The spectral resolution was better than 3.5 nm, and the spatial resolution was better than 0.87 μm through the monochromatic collimated light scanning calibration method. Then, the HE-stained breast cancer pathological slices was as the research object. The samples were investigated and compared using passive and active focusing for push-broom imaging. The advantages and disadvantages of the two focusing methods were analyzed and summarized. The results showed that both methods can meet the needs of large-field-of-view imaging, but active focus imaging is faster and clearer, and is more suitable for push-broom hyperspectral microscopy imaging systems. Through the design and research of a fully automatic push-broom hyperspectral microscopy imaging system, real-time focusing in hyperspectral microscopic imaging was realized and 3.25 mm \times 3.25 mm field of view imaging of biological samples with a 40X objective lens was achieved. This system could be beneficial for promoting the application of hyperspectral technology in the biomedical field.

Key words: microscopic imaging; hyperspectral imaging; autofocus

1 引言

光学诊断技术通常包含光学成像诊断技术和光谱诊断技术。前者用于获取样本形态信息,如病理组学分析、细胞成像分析等;后者主要对生物组织的单点获取一定范围的光谱信息,如荧光光谱诊断分析、拉曼光谱诊断分析等。光谱成像技术是二者的结合,能够同时获取生物样本的形态信息和光谱信息,从而实现对生物样本更为全面的分析。

随着光谱成像技术的发展,光学诊断技术在显微领域的应用也越来越广泛。Sorg Brian S.等^[1]利用液晶可调谐滤光片分光的高光谱显微成像系统对人体微血管肿瘤的氧运输进行研究,根据对血红蛋白饱和度的测量和荧光蛋白的表达区分肿瘤区域,系统光谱范围为 400~720 nm,光谱分辨率为 10 nm。Liu Kunxing^[2]等人使用基于液晶可调谐滤光片的高光谱显微成像系统实现了对 DAPI 染色的肝癌细胞核的检测,系统光谱分辨率约为 7 nm,40 倍物镜下成像区域约为 330 $\mu\text{m}\times$ 330 μm 。Eady M^[3]等人基于采用声光可调谐高光谱显微成像系统实现了沙门氏菌的快速检测,系统光谱分

辨率达到 4 nm。Jiansheng Wang^[4]等人也使用声光可调谐的高光谱显微成像系统实现肝癌不同分期定量分析,也为肝癌早期诊断提供可能。肖功海等^[5]设计基于棱镜-光栅-棱镜分光的高光谱显微成像系统,光谱范围为 400~800 nm,光谱分辨率优于 5 nm,40 倍物镜下的空间分辨率约为 1 μm 。基于上述系统,李庆利^[6]等人从图谱角度对正常大鼠和糖尿病大鼠视网膜组织切片进行了研究。Samuel Ortega 等^[7-8]同样利用棱镜-光栅-棱镜分光设计了用于自动检测人脑肿瘤组织的高光谱显微成像系统,系统光谱范围在 400~1 000 nm,光谱分辨率为 2.8 nm,实现了 10 倍物镜下空间分辨率为 2.2 μm 的成像,结合监督分类算法,利用光谱信息可以区分脑部健康组织和肿瘤组织,特异性高达 92%。此外, Pu Hongbin^[9]等人也认为高光谱显微成像技术在食品工业中对微生物和残留物的检测方面具有很大的潜力。

上述高光谱显微成像系统中,主要分为凝视型、推扫型两种分光方式。前者采用液晶可调谐或声光可调谐滤光片分光,系统设计简单,应用较广,但是存在光谱分辨率低且不均匀、光谱范围受材料限制、难以实现较宽范围覆盖以及不同谱段存在空间像差、无法对运动目标成像等缺点。

后者一般采用光栅或者棱镜分光方式,同时获得样本图谱,光谱分辨率高且采样均匀,但是只能获取一维空间信息,难以自动对焦^[10],无法实现大样本成像,这一缺陷限制了推扫式高光谱显微成像系统的应用。本文将棱镜-光栅分光技术、显微成像技术和自动对焦技术相结合,研制出基于棱镜-光栅分光的全自动推扫式高光谱显微成像系统,可以实现大样本全自动高光谱成像,将进一步促进光谱技术在生物医学领域中应用。

2 推扫式高光谱显微成像系统的设计

2.1 推扫式高光谱显微成像系统的原理

全自动推扫式高光谱显微成像系统原理如图 1 所示,由高功率 LED、视场光阑、聚光镜组成的科勒照明系统实现对生物样本的照明,经过高倍显微物镜成像到分光系统狭缝处,经分光模块后,沿垂直狭缝方向实现光谱色散,沿水平方向保留空间信息,最后成像到高灵敏探测器上,经过光电转化获取生物样本的一维空间信息和光谱信息。当载物台沿着垂直狭缝方向推扫时,可以获得生物样本另一维的空间信息,得到包含生物样本的二维空间信息和光谱信息的数据立方体。推扫式高光谱成像中,采用光栅或者棱镜作为分光模块,但是光栅分光模块结构复杂,如常见的 offner 成像光谱仪^[11]物方与像方在同一侧,不利于与显微镜集成。直视形的棱镜-光栅-棱镜分光

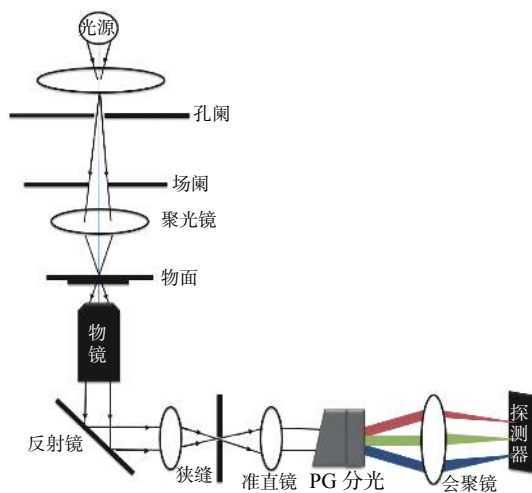


图 1 推扫式高光谱显微成像系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of push-broom hyperspectral microscopic imaging system

模块适合与显微镜集成,但是该模块采用的是体相位全息光栅,且两端均为棱镜,装调难度大,目前芬兰 Specim 能够提供商品化产品,国内如南京天文光学技术研究所等单位^[12]也具备一定设计能力。本系统中采用棱镜-光栅模块进行分光,由于光栅一端是开放的,可以采用表面浮雕型透射光栅,降低了仪器的装调难度和制作成本。

2.2 参数设计

为满足大多数生物样本光谱检测需求,光谱范围选取为 420~800 nm。照明模块采用科勒照明系统,使得照明均匀且无眩光。物镜选取 40 倍放大物镜,NA 值为 0.6,取光谱中间值 610 nm,计算得到物方空间分辨率为 0.62 μm 。经显微成像后,图 1 狭缝处像方空间分辨率为 24.8 μm 。分光模块采用课题组自主研发的棱镜-光栅模块,原理如图 2 所示,光栅刻线数为 300 gr/mm,棱镜顶角为 13.09°,光谱色散率为 76.9 nm/mm。该模块采用消谱线弯曲算法进行优化设计,整体为近直视结构,具有优良的成像及光谱特性。棱镜-光栅分光模块前后的准直镜与会聚镜为对称结构,所构建的系统放大倍率为 1:1,二者焦距均为 42.3 mm, F 数为 2.4。探测器选用高灵敏 sCMOS 相机,像元大小为 6.5 μm ,空间维像元数量为 2048 pixel,考虑到要与狭缝处像方空间分辨率匹配,采用 4 pixel \times 4 pixel 合并,等效单像元尺寸为 26 μm ,空间维长度 13.3 mm,故狭缝尺寸设计为宽 26 μm ,长 13.3 mm。

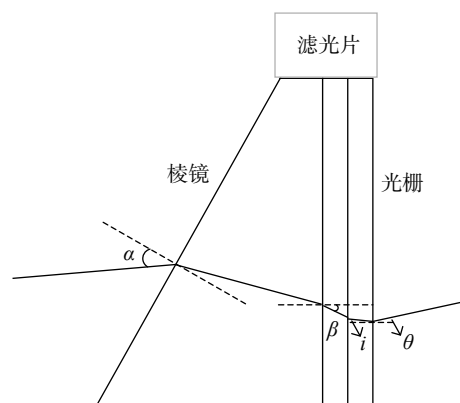


图 2 棱镜-光栅分光原理图

Fig. 2 Prism grating spectroscopic schematic diagram

根据上述参数计算出的系统空间分辨率为 0.65 μm ,光谱采样率为 2 nm。二维电动运动平台的定位精度需要优于空间分辨率,根据推扫式高

光谱成像系统的工作原理,为了获得准确的高光谱图像,必须对二维运动平台的推扫速度进行精确控制。系统的空间采样率与显微物镜的放大倍数、探测器的像元尺寸以及采样速率有关。假设探测器像元尺寸为 $d \times d$, 显微物镜放大倍率为 M , 探测器采样帧速率为 F , 则平台运动速度为

$$v = \frac{d \times F}{M} \quad (1)$$

2.3 整机系统

根据 2.2 中参数进行设计,推扫式高光谱显微成像系统如图 3 所示。系统光路选用尼康倒置显微镜 Eclipse Ti2-U; 二维运动平台选用海德星的二维电动载物台 HDS-MS.XY 8060, 最小步进可达 $0.05 \mu\text{m}$, 重复定位精度可达到 $0.5 \mu\text{m}$; 电动对焦系统采用步进电机 PS3H122R, 可以实现 $\pm 0.3 \mu\text{m}$ 重复性, 最小步进 $0.05 \mu\text{m}$; 分光成像模块采用课题组自行研发的棱镜-光栅分光模块, 通过 C 口与显微镜右侧成像通道连接; 探测器选择鑫图光电的背照式 sCMOS 科学相机 Dhyana 400BSI, 像元大小为 $6.5 \mu\text{m}$, 像元数量为 $2048 \text{ pixel} \times 2048 \text{ pixel}$ 。

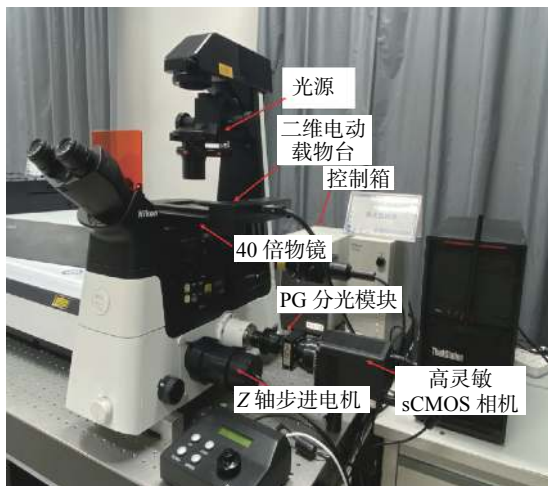


图3 整机照片

Fig. 3 Photos of the whole machine

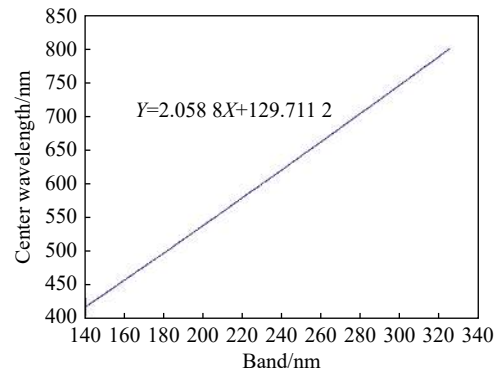
3 系统性能测试

系统集成后需要对其进行性能测试,主要是光谱定标和空间分辨率的测试。

3.1 光谱定标

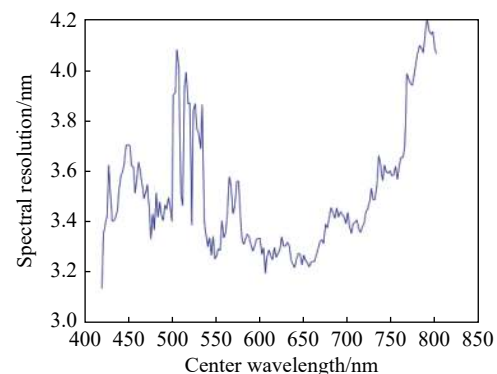
光谱定标通过 HORIBA 公司的 IHR550 单色仪, 将其光源耦合进高光谱显微成像系统的照明

光路, 采用高分辨扫描光谱定标法进行定标^[13-14], 其步进波长设为 0.2 nm 。将各波段的数据进行高斯拟合后, 获取各波段中心波长及光谱分辨率, 结果如图 4 所示, 光谱采样率为 2.06 nm , 光谱分辨率均值优于 3.5 nm 。



(a) 各波段中心波长定标结果

(a) Calibration results of central wavelength for each band



(b) 各波段光谱分辨率

(b) Spectral resolution of each band

图4 光谱定标结果

Fig. 4 Results of spectral calibration

3.2 空间分辨率的测试

空间分辨率测试通过对 Edmund Optics 的分辨率板 USAF 1951 1X 进行推扫成像实现。分辨率板组别编号从 -2 到 9, 元素编号从 1 到 6, 其中第 9 组, 第 1~3 号的线对信息分别为 512、575、645 线对/mm。系统初步调焦后, 沿 Z 轴以 $2 \mu\text{m}$ 步进进行推扫成像, 采集多幅图像, 通过拉普拉斯清晰度评价函数评判选择最清晰图像, 其第 233 波段, 中心波长为 608.3 nm 的推扫图像如图 5 所示。选取第 9 组, 第 2 号和 3 号处的图像数据, 经过归一化处理, 结果如图 6 所示。根据空间分辨率定义, 系统能够分辨第 9 组第 2 号线对, 无法分辨第 9 组第 3 号线对。根据线对信息, 经计算可知系统空间分辨率优于 $0.87 \mu\text{m}$, 接近理论设计值。

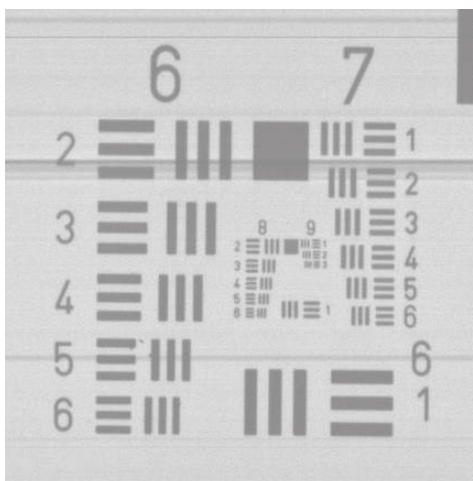


图 5 分辨率板推扫图像

Fig. 5 Push-broom image of the resolution testing board

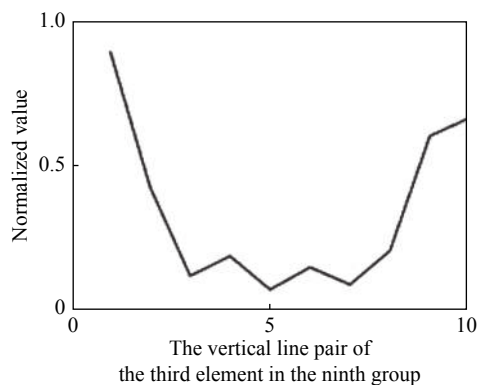
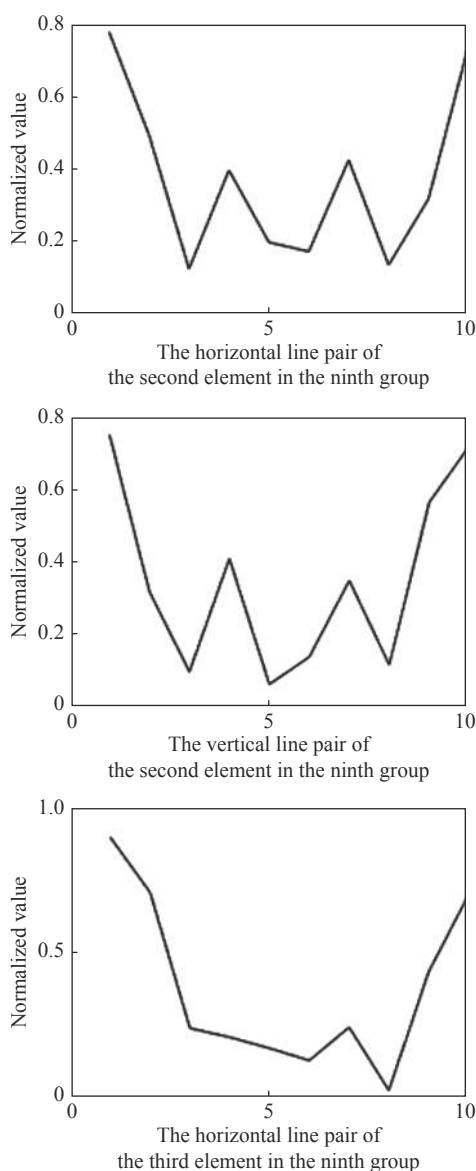


图 6 空间分辨率测试结果

Fig. 6 Results of spatial resolution test

4 自动对焦成像

显微成像系统中,景深由波和场的几何光学深度之和得出,即:

$$D = \frac{\lambda \cdot n}{NA^2} + \frac{n}{M \cdot NA} e, \quad (2)$$

其中, D 是景深; λ 是照明光的波长; n 是玻片与前透镜间介质的折射率(空气为 1.000); M 是物镜放大倍率, NA 为物镜的数值孔径; e 为可分辨的最小距离,一般取 $14 \mu\text{m}$ 。系统中采用尼康 S Plan Flour ELWD 40X/0.60 显微物镜,经计算景深为 $2.1 \mu\text{m}$ 。

推扫式高光谱显微成像系统中样本和二维平台会存在不平整情况,大视场推扫过程中很容易出现离焦,影响成像质量,自动对焦是获取大视场显微成像的关键技术。自动对焦主要包括被动对焦和主动对焦,前者在对焦过程中,通过图像清晰度评价函数寻找最佳对焦位置;后者通过主动光源等辅助装置,利用反射回探测器的光线判断离焦方向和离焦程度,从而驱动运动系统完成自动对焦。本文以 HE 染色的乳腺癌病理切片为研究对象,结合两种自动对焦方法,使用搭建的系统获取乳腺癌病理切片的大视场高光谱显微图像,并对两种对焦方法性能进行比较。

4.1 被动对焦成像

采用被动对焦方式实现大视场成像,在目标区域均匀选择多个采样点,每个采样点在 Z 轴方向上不同位置进行成像,根据清晰度评价函数和爬山算法,寻找成像最清晰的对焦位置,根据这些点的对焦位置拟合出对焦平面。推扫成像过程中

根据位置和对焦平面, 自动调整 Z 轴, 实现自动对焦。

4.1.1 对焦位置判断

高光谱显微成像系统直接获取的单帧图像包含一维光谱信息和一维空间信息, 由于光谱维信息的干扰, 无法采用常规的评价函数进行清晰度评价。根据图像特点仅采用空间维拉普拉斯评价函数进行清晰度评价, 即

$$L = \begin{bmatrix} -1 & -4 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 4 & 1 \end{bmatrix} \quad (3)$$

选定成像区域后, 取 X 轴右移 0 μm、912 μm、1 700 μm、2 500 μm 的 4 个采样点进行对焦位置判断。对每个位置进行粗对焦后选取对焦范围, Z 轴方向以 1 μm 步进, 寻找精确对焦位置。采用式(3)的评价结果, 如图 7(彩图见期刊电子版)所示, 对焦位置如表 1 所示, 可以看出由于仅有一维空间信息, 算法鲁棒性较弱, 容易出现虚假对焦位置。

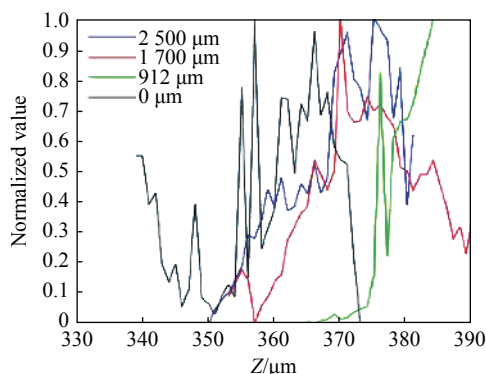


图 7 基于单帧图像清晰度评价曲线

Fig. 7 Definition evaluation curves based on a single-frame image

表 1 单帧图像和推扫图像清晰度评价的对焦位置

Tab. 1 Focus positions for clarity evaluation based on the single-frame image and the push-broom image

Position/μm	Single frame image/μm	Push scan image/μm
0	357	369
912	376	378
1 700	376	374
2 500	371	367

为了能更准确地寻找对焦位置, 利用二维空

间信息进行清晰度评价, 同样选取 X 轴右移 0 μm、912 μm、1 700 μm、2 500 μm 的 4 个采样点进行对焦位置判断, 进行粗对焦后选取对焦范围, 每个 Z 轴位置推扫 65 μm(100 pixel)。选取第 233 波段, 中心波长为 608.3 nm 的二维图像, 采用拉普拉斯清晰度评价函数进行评价, 结果如图 8(彩图见期刊电子版)所示, 对焦位置同样如表 1 所示。由图 8 和表 1 可以看出, 清晰度评价曲线具有明显的单峰性, 可以精准判断对焦位置。

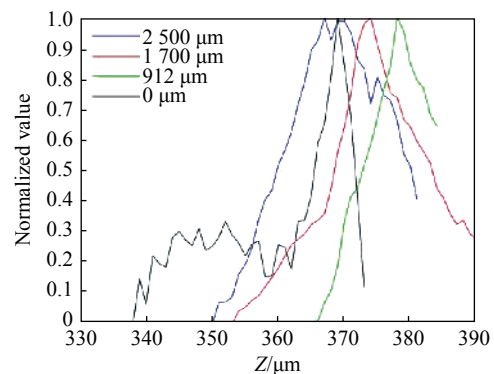


图 8 基于推扫图像的清晰度评价曲线

Fig. 8 Definition evaluation curves based on the push-broom image

将基于单帧图像和基于推扫图像的清晰度评价方法获取的清晰对焦位置进行对比, 可以得出以下结论:

(1) 基于单帧图像清晰度评价无法很好地寻找对焦位置;

(2) 在 2 500 μm 的范围内, 生物样本对焦位置变化超过 10 μm, 超出成像系统的景深, 证明了大视场成像中自动对焦的必要性。

4.1.2 对焦平面建立与自动推扫成像

被动对焦的聚焦策略是选择合适的插值方法在采样点上拟合出对焦平面, 当推扫成像时, 根据运动位置和拟合的对焦平面, 配合对焦电机运动, 实现自动对焦。考虑到对焦位置平滑性, 所以系统中采用成熟的样条插值, 4.1.1 中 4 个采样点的对焦位置插值结果如图 9 所示。

为实现大视场自动扫描成像, 选取样本 X 轴 0 μm、912 μm、1 700 μm、2 500 μm, Y 轴 0 μm、912 μm、1 700 μm、2 500 μm, 共 16 个采样点, 经过对各采样点推扫图像的清晰度评价, 获取了采样点的对焦位置, 如表 2 所示, 通过进行样条插值, 获取二维对焦平面, 如图 10 所示。

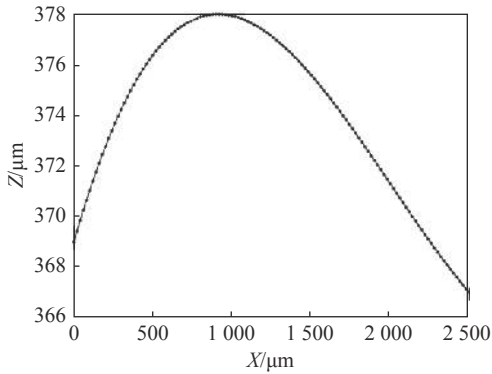


图 9 X 轴 4 个采样点对焦位置插值结果

Fig. 9 Interpolation results of focusing positions of four sampling points on the X-axis

表 2 Z 值数据
Tab. 2 Z value data

Y/μm	X/μm			
	0	912	1700	2500
0	369	378	374	371
912	378	385	380	376
1700	385	388	385	382
2500	367	376	375	373

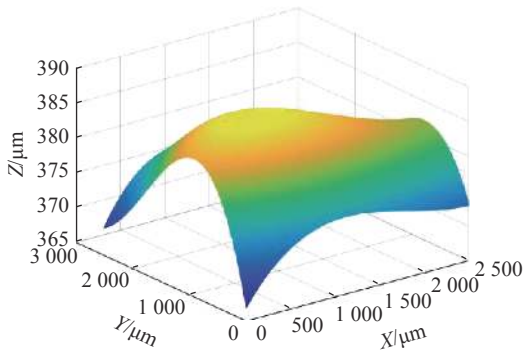


图 10 二维平面插值结果

Fig. 10 Interpolation results on a two-dimensional plane

4.1.3 大视场自动推扫成像

为获取乳腺癌病理切片大视场数据, 成像范围设置为 $3250\ \mu\text{m} \times 3250\ \mu\text{m}$, 推扫路径如图 11 所示, 在 X 轴方向推扫 $3250\ \mu\text{m}$, 采集单幅 $510\ \text{pixel} \times 5000\ \text{pixel}$ 图像数据, 将二维运动平台右移 $325\ \mu\text{m}$, 保证 X 方向存在 10 pixel 重叠, 重复推扫 10 幅图像。推扫过程中根据位置和拟合对焦平面, 实时自动对焦。将采集的 10 幅高光谱显微图像进行拼接, 获取 $5000\ \text{pixel} \times 5000\ \text{pixel}$ 的高光谱病理图像, 其中第 233 波段的图像去除条纹噪声后的结果如图 12 所示。

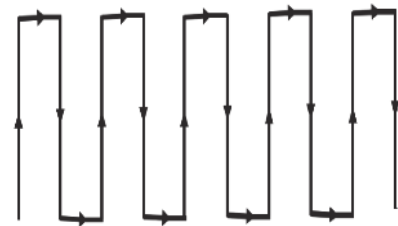


图 11 推扫路线

Fig. 11 Push-broom route

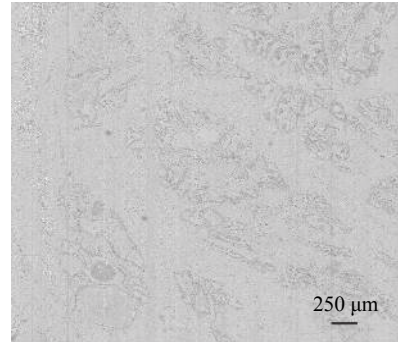


图 12 基于被动对焦的大视场推扫成像

Fig. 12 Push-broom imaging with a large field of view based on passive focusing

4.2 主动对焦

主动式对焦是在显微镜的物镜和镜筒之间安装主动对焦光路, 原理如图 13 所示。主动对焦模块由近红外激光光源、光阑、分光镜、可调准直透镜以及二向色镜组成, 近红外激光光源发射近红外激光, 视场受光阑限制, 经准直透镜后充满 $\frac{1}{2}$ 物镜, 经物镜聚焦到样本, 样本反射回物镜、准直镜, 最后聚焦到线传感器上, 根据激光在传感器上检测到的位置, 能够检测样本与物镜的离焦量。通过对可调准直透镜进行前后调节, 调整激光在样品 Z 轴上聚焦的点, 进而改变激光面与成像面之间的距离。其中近红外激光光源波长选择 $800\ \text{nm}$ 以上, 配合 $800\ \text{nm}$ 以上波长反射的二向色镜, 以在自动对焦过程中不影响显微镜正常工作。

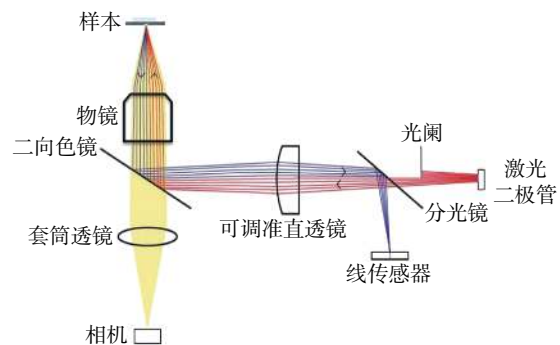


图 13 主动对焦原理示意图

Fig. 13 Schematic diagram of active focusing principle

系统采用 Prior Scientific 的 PureFocus850 模块实现自动对焦,对焦结果通过线探测器两侧离焦量的关系进行判断,当两者之差与两者之和的比值小于 0.2 时,说明焦面准确。运动过程中,自动对焦模块会根据离焦量实时调整 Z 轴,保证样本始终处在清晰对焦的位置上。

利用主动对焦模块进行自动对焦前,通过设置激光信号,找到最清晰对准平面,然后开启主动对焦功能。选取 4.1.1 中同一样本区域,在 X 轴方向从 0 μm 到 2500 μm ,每隔 500 μm 记录对焦位置,将推扫图像清晰度评价对焦位置进行样条插值,对比结果如表 3 所示。二者平均误差为 0.1 μm ,表明被动对焦与主动对焦结果一致性较好,也说明样条插值用于对焦平面建立的可行性。

表 3 主动对焦推扫图像的对焦位置

Tab. 3 Focus position based on active focus push-broom image

Position / μm	Active focus position/ μm	Push scan image/ μm
0	369	369
500	376	376.2
1000	378	377.9
1500	375	375.7
2000	371	371.1
2500	367	367

与被动对焦成像区域设置一致,采用主动对焦方式进行推扫成像,推扫路径与图 11 一致。同样将采集的 10 幅高光谱显微图像进行拼接,获取 5000 pixel \times 5000 pixel 的高光谱病理图像,其中第 233 波段的图像去除条纹噪声后的结果如图 14 所示。

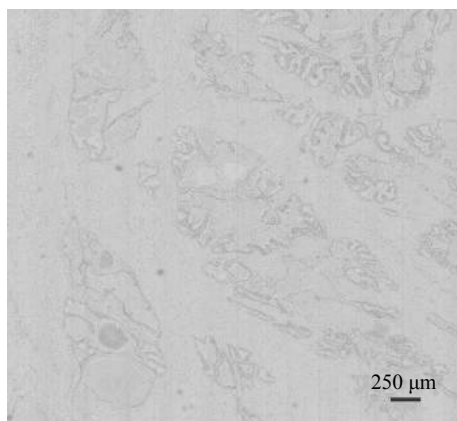


图 14 基于主动对焦的大视场推扫成像

Fig. 14 Push-broom imaging with a large field of view based on active focusing

4.3 对比分析

通过分析被动对焦和主动对焦成像实验结果,认为二者均可以用于高光谱显微成像系统中。下面将从结构复杂度、成像清晰度以及成像速度 3 个方面进行对比分析。

对于仪器结构复杂度,被动对焦无需增加额外的硬件,而主动对焦需要增加主动对焦光路,仪器结构更加复杂。被动对焦技术优于主动对焦技术。

从成像清晰度角度分析,在成像区域相同时,被动对焦与主动对焦得到的图像清晰度评价值分别为 6.3584×10^9 、 6.3590×10^9 ,结果说明主动对焦技术略优于被动对焦技术。

主动对焦和被动对焦成像速度的差异主要在于建立对焦平面所需的时间长短。被动对焦中针对选取的点在 Z 轴方向连续推扫成像,单点用时 90 s,16 个点合计用时 1440 s。主动对焦主要是进行寻找激光面与成像面的位置和调整图像到最清晰,实验中实际分别用时 55 s 和 12 s,合计 67 s。大视场推扫成像时间二者接近,单幅推扫均用时 125 s,通道切换时被动对焦用时 3 s,主动对焦用时 7 s(通道切换后需要用时 4 s 完成离焦到正焦的状态调整),合计用时被动对焦 1277 s,主动对焦 1313 s。完成大视场推扫成像,二者分别用时 2717 s 和 1380 s,除去推扫成像时间,二者实际对焦时间分别为 1467 s 和 130 s,主动对焦速度显著优于被动对焦。

综上所述,主动对焦成像技术增加了对焦光路,结构复杂,但是显著提高了对焦速度,同时也一定程度上提升了成像清晰度,更适合推扫式高光谱显微成像系统。

5 结 论

本文通过将棱镜-光栅分光技术、显微成像技术以及自动对焦技术相结合,设计了一套全自动推扫式高光谱显微成像系统,空间分辨率优于 0.87 μm ,光谱范围为 420~800 nm,光谱分辨率均值优于 3.5 nm。以经过 HE 染色的乳腺癌病理切片为研究对象,通过被动对焦和主动对焦两种方法均实现了 40 倍物镜下 3.25 mm \times 3.25 mm 区域内清晰成像。通过对两种方法进行比较,认为两者均能满足大视场成像要求,但主动对焦通过检

测光路辅助能够实现更快速且清晰的成像,更适
合推扫式高光谱显微成像系统。本文研发的系统

将更加方便地把光谱技术引入显微成像领域,有
利于促进光谱技术在生物医学等领域中的应用。

参考文献:

- [1] SORG B S, MOELLER B J, DONOVAN O, *et al.*. Hyperspectral imaging of hemoglobin saturation in tumor microvasculature and tumor hypoxia development[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2005, 10(4): 44004.
- [2] LIU K X, LIN S F, ZHU S Q, *et al.*. Hyperspectral microscopy combined with DAPI staining for the identification of hepatic carcinoma cells[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(1): 173-180.
- [3] EADY M, PARK B. An unsupervised prediction model for salmonella detection with hyperspectral microscopy: a multi-year validation[J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(3): 895..
- [4] WANG J SH, LI Q L. Quantitative analysis of liver tumors at different stages using microscopic hyperspectral imaging technology[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2018, 23(10): 106002..
- [5] 肖功海, 舒嵘, 薛永祺. 显微高光谱成像系统的设计[J]. *光学精密工程*, 2004, 12(4): 367-372.
XIAO G H, SHU R, XUE Y Q. Design of microscopic hyperspectral imaging system[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2004, 12(4): 367-372. (in Chinese)
- [6] 李庆利, 薛永祺, 肖功海, 等. 显微高光谱成像的生物组织定量检测机理及方法研究[J]. *科学通报*, 2008, 53(4): 493-496.
LI Q L, XUE Y Q, XIAO G H, *et al.*. Research on the mechanism and method of biological tissue quantitative detection based on micro-hyperspectral imaging[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53(4): 493-496. (in Chinese)
- [7] ORTEGA S, GUERRA R, DÍAZ M, *et al.*. Hyperspectral push-broom microscope development and characterization[J]. *IEEE Access*, 2019, 7: 122473-122491.
- [8] ORTEGA S, FABELO H, CAMACHO R, *et al.*. Detecting brain tumor in pathological slides using hyperspectral imaging[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(2): 818-831.
- [9] PU H B, LIN L, SUN D W. Principles of hyperspectral microscope imaging techniques and their applications in food quality and safety detection: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(4): 853-866.
- [10] SELJEBOTN S T. Continuous autofocus for line scanning hyperspectral camera[D]. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology, 2012.
- [11] 张佳伦, 郑玉权, 蔺超, 等. 消像散的自由曲面棱镜光谱仪光学系统设计[J]. *中国光学*, 2020, 13(4): 842-851.
ZHANG J L, ZHENG Y Q, LIN C, *et al.*. Design of a freeform curved prism imaging spectrometer based on an anastigmatism[J]. *Chinese Optics*, 2020, 13(4): 842-851. (in Chinese)
- [12] 张天一, 朱永田, 侯永辉, 等. LAMOST高分辨率光谱仪研制[J]. *中国光学*, 2019, 12(1): 148-155.
ZHANG T Y, ZHU Y T, HOU Y H, *et al.*. Construction of a LAMOST high resolution spectrograph[J]. *Chinese Optics*, 2019, 12(1): 148-155. (in Chinese)
- [13] 魏巍, 崔继承, 唐玉国, 等. 医用显微成像光谱仪的光谱定标技术[J]. *光学精密工程*, 2016, 24(5): 1015-1020.
WEI W, CUI J CH, TANG Y G, *et al.*. Spectral calibration of medical microscopic imaging spectrometer[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2016, 24(5): 1015-1020. (in Chinese)
- [14] 迟明波, 韩欣欣, 徐阳, 等. 宽谱段高分辨扫描光谱定标技术[J]. *中国光学*, 2020, 13(2): 249-257.
CHI M B, HAN X X, XU Y, *et al.*. Broad band and high resolution scanning spectrum calibration technology[J]. *Chinese Optics*, 2020, 13(2): 249-257. (in Chinese)

作者简介:



唐凌宇(1997—),女,黑龙江绥化人,硕士研究生,主要从事机械工程等方面的研究。E-mail: tangly9996@163.com



葛明锋(1987—),男,江苏南通人,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事高光谱、荧光显微成像方面研究。E-mail: gemf@sibet.ac.cn