

# 椭圆偏光学显微成像系统中的图像采集及处理技术

孟永宏, 靳刚

(中国科学院力学研究所, 北京 100080)

**摘要:** 椭圆偏光学显微成像是近几年发展起来的一种超薄膜及表面结构显示技术, 它不仅为分子生物学、生物医学(尤其是分子生物医学)及分子生物材料学等领域提供了一种新的研究手段, 而且在临床疾病诊断、微电子器件及纳米材料检测等方面具有潜在的应用前景。本文针对椭圆偏光学显微成像系统及其成像(简称“椭圆偏成像”)特点, 提出了扩展图像量化等级法、快速采样—时间积分法和多采样点平均法以改善椭圆偏成像质量和样品表面定量分析的可靠性, 并给出理论分析及实验结果。这些图像采集和图像处理技术在椭圆偏光学显微成像系统中行之有效, 同时也适用于类似的图像处理系统。

**关键词:** 椭圆偏成像; 图像采集; 图像处理

中图分类号: TP391.4 文献标识码: A

## 1 引言

椭圆偏光学显微成像是近几年发展起来的一种非接触测量超薄膜分布及表面微细结构的方法<sup>[1,2]</sup>。它将传统的光学椭圆偏术、CCD摄像、计算机采样和图像处理技术相结合, 不仅可以测量光波的幅值变化, 而且对于相位体所引起的光波的位相变化具有极高的灵敏度。椭圆偏光学显微成像技术保留了传统椭圆偏术纵向分辨率高的特点(达 $10^{-10}$  m), 同时又具有测量面积大(达数 $\text{cm}^2$ )、取样速度快(对 $10^5$ 以上像素的图像取样速度每秒达25帧以上)、横向分辨率高(达 $10^{-6}$  m量级)和结果直观(全部实验结果以图像形式显示)的特点<sup>[3]</sup>。

本文在考虑椭圆偏光学显微成像技术及其图像特点的基础上, 为提高图像质量和改善图像数据分析的可靠性, 提出了扩展图像量化等级法、快速采样—时间积分法和多采样点平均法, 并给出相关的实验结果。

## 2 椭圆偏光学显微成像系统及其图像处理技术

### 2.1 椭圆偏光学显微成像系统

椭圆偏光学显微成像系统的原理如图1所示<sup>[2]</sup>。其基本装置为传统的PCSA椭圆偏仪: 即, 起

偏器—补偿器—样品—检偏器。在此系统中, 采用扩展平行光束代替传统的窄光束, 单色偏振光照射样品, 样品对入射光波进行调制, 使得反射光波中含有样品的信息, 通过透镜成像系统在CCD摄像机上成像, CCD摄像机采集到的模拟信号由视频监视器显示, 并进一步经过图像采集卡进行A/D变换形成数字图像文件进入计算机。

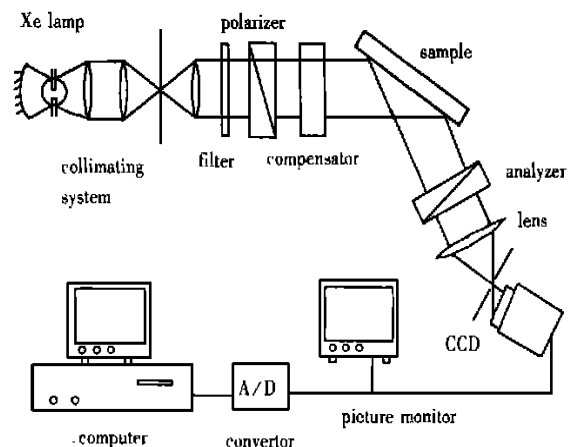


Fig. 1 Schematic diagram of ellipsometric imaging system

CCD摄像机产生的电信号与入射到其光敏面上的光强成正比。可以利用椭圆偏图像分析样品表面的三维形貌及薄膜的厚度分布, 也可以分析样品表面的动态形貌变化和厚度分布变化的规律。分析椭圆偏图像时, 要求原始图像具有良好的成

像质量。为此,我们采用扩展图像量化等级法来提高图像纵向分辨率、采用连续抓取-时间积分法提高图像信噪比来改善图像的质量。同时,采用多采样点平均法降低随机噪声对图像定量分析的影响,提高定量分析的可靠性。

## 2.2 扩展图像量化等级法提高椭圆偏图像纵向分辨率

在椭圆偏光学显微成像系统中,图像卡对 CCD 摄像机获取的模拟信号进行数字化处理(即: A/D 转换)。数字化过程就是对模拟信号进行采样和量化,通常采用均匀量化,其量化分层越多,量化误差越小<sup>[4]</sup>。即图像的纵向分辨率越高,图像包含样品细节的信息就越丰富,从而有利于利用图像对样品进行分析。该系统中采用了加拿大 Matrox Electronic System Ltd. 公司的 Matrox Pular 黑白图像卡,该图像卡在 A/D 转换时的量化等级可以控制在 8bit 或 10bit。因此,通过扩展图像量化等级可以提高图像的纵向分辨率,把数字图像量化的灰度级从 256(即 8bit)提高到 1024(即 10bit)时,系统的纵向分辨率可提高 4 倍,同时信噪比保持不变。此方法为显示超薄膜层的表面分布提供了技术基础。

## 2.3 连续抓取-时间积分法提高椭圆偏图像信噪比

为了提高椭圆偏图像的信噪比,采用快速采样-时间积分法,即利用椭圆偏光学显微成像系统在短时间内对待测样品进行连续图像采集,然后对采集的图像进行时间平均。假设在实验条件保持不变的情况下,样品发生可观察的变化所需时间为  $T$ ,快速采样(即连续抓取图像)的持续时间为  $\tau$ 。在快速采样-时间积分法中要求

$$\tau < T \quad (1)$$

假设单幅图像中任一点的噪声标准差为  $\delta$ ,  $N$  ( $N$  为整数)幅图像进行平均后相应点的噪声标准差为  $\delta_n$ 。可以证明<sup>[5]</sup>: 平均后的图像中任一点的噪声标准差降为

$$\delta_n = \frac{\delta}{N} \quad (2)$$

因此,连续抓取 100 幅图像进行平均可将图像的噪声降低一个数量级。对于信噪比要求更高的图像,可以采用短时间内抓取更多图像进行时间平均来得到。这种方法可以有效地降低图像噪声,提高图像信噪比,从而改善图像质量。此方法为椭圆偏光学显微成像显示样品表面的细微结构提供了可能性。

## 2.4 多采样点平均法提高样品分析的可靠性

椭圆偏光学显微镜成像系统以直径 40mm 的光束照射样品表面,CCD 摄像机以  $4 \times 10^5$  以上的像素同时进行成像。如果样品局部被污染了,可以从图像上观察出来,以区分污染物所引起的错误信号对测量结果的影响,这是采用单点测量的传统椭圆偏仪所难以做到的。椭圆偏成像是由 CCD 摄像机经过光电转换,再经过黑白图像卡进行 A/D 变换后形成的,此过程中产生的噪声会直接影响图像的质量。样品上具有相同表面特征(如厚度相同)的待测区可看作由空间很多采样点组成,因此,可以通过对这些采样点进行测量并取其平均值来得到该区域的表面特征参数。多采样点平均法能有效地降低随机误差对测量结果的影响。在实际操作时,首先取这些采样点在图像上对应像素的灰度值,然后取这些灰度值的平均,这样就可以分析出样品上该区域的表面信息。此过程可表示为

$$G = \frac{\sum_{i=0}^{M-1} g(x_i, y_i)}{M} \quad (3)$$

其中,  $G$  表示多像素灰度值的平均,  $g(x_i, y_i)$  表示第  $i$  个像素的灰度值,  $M$  为选定像素的个数。假设图像中任一点的噪声标准差为  $\delta$ ,  $M$  ( $M$  为整数)个像素进行平均后的噪声标准差为  $\delta_n$ 。可以证明<sup>[5]</sup>,多采样点平均后的噪声标准差理论上降为

$$\delta_n = \frac{\delta}{M} \quad (4)$$

由此可见,采用此方法对图像进行定量分析,可以有效地降低测量结果的噪声标准差,从而提高了分析的可靠性。

## 3 实验结果及分析

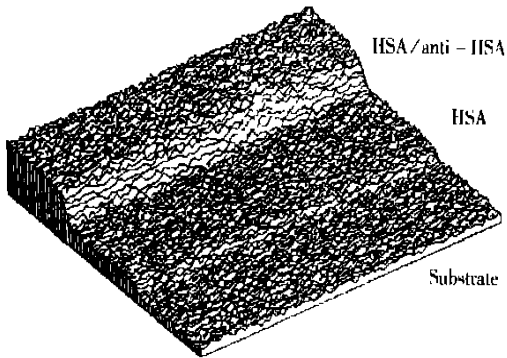
为了展示椭圆偏光学显微成像系统的功能和图像处理的效果,选用生物分子薄膜为测试对象。生物分子薄膜是薄而透明的,在物理上属于超薄相位体。由于相位体基本不引起光波的幅值变化,所以用显微镜是难以探测的。而椭圆偏光学显微成像系统对相位体所引起的光波的位相变化具有极高的灵敏度,所以,利用该系统可以测量生物分子薄膜的表面分布。

图 2~3 中显示了人血浆白蛋白(HSA)和人血浆白蛋白及其抗体(anti-HSA)形成复合物表面分布的三维立体图。立体图中的高度对应于以灰度分布的黑白椭圆偏图像中的灰度值。样品制备已另文发表<sup>[7]</sup>,在实验过程中,该样品保持不变。

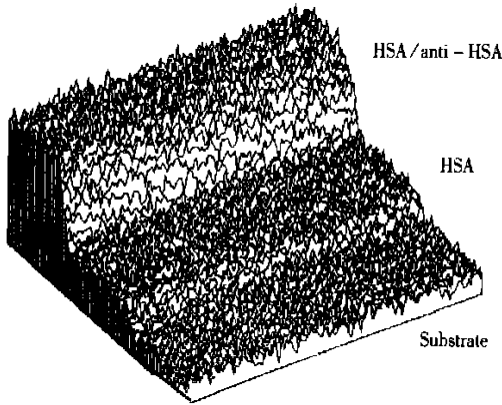
图 2 中的(a)和(b)是分别在 0.1s 内以 8bit 抓取和在 0.13s 内以 10bit 抓取的单幅椭偏图像的三维厚度分布图,图 3 中的(a)和(b)是分别在 10s 内以 8bit 和在 13s 内以 10bit 连续抓取的 100 幅椭偏图像进行平均后的三维分布图。图中各层从低到高依次为基底、HSA 单分子吸附层和 HSA/anti-HSA 复合膜层。表 1 中列出了图中各层的灰度值(多采样点进行平均后的灰度值),这些灰度值为后边的分析提供了数据。

Table 1 Average greyscale of the layers in Fig. 2 ~ 3, respectively

	Substrate	HSA	HSA/anti-HSA	Difference between Substrate and HSA
Fig. 2(a)	11.96	20.57	48.98	8.61
Fig. 2(b)	47.31	81.42	195.37	34.11
Fig. 3(a)	11.47	20.01	48.54	8.54
Fig. 3(b)	46.72	81.11	194.94	34.39

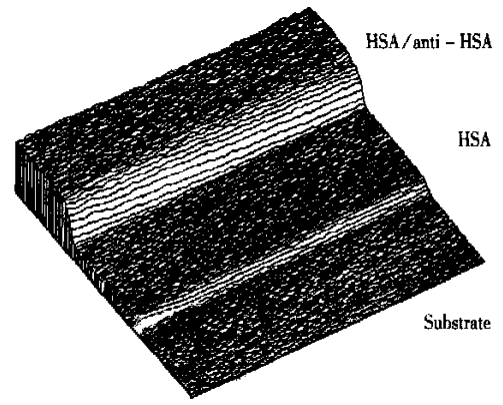


(a)

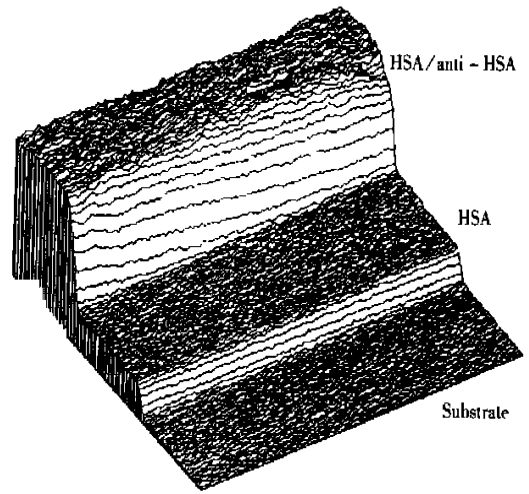


(b)

Fig. 2 Three-dimensional distribution of single ellipsometric images of HSA and HSA/anti-HSA with 8bit depth (a) and 10bit depth(b), respectively



(a)



(b)

Fig. 3 Three-dimensional distribution of averaged ellipsometric images of HSA and HSA/anti-HSA by 100 successive images with 8bit depth (a) and 10bit (b), respectively

### 3.1 扩展图像量化等级法对图像纵向分辨率的影响

考察图 2, HSA 单分子吸附层与基底的灰度值在 8bit 图像中相差 8.61, 在 10bit 图像中相差 34.11。经过厚度标定<sup>[2]</sup>, 饱和的 HSA 单分子吸附膜层的厚度约为 2.5nm。所以, 在系统设置不变的情况下, 当以 8bit 抓取图像时图像的纵向分辨率为 0.3nm, 以 10bit 抓取纵向分辨率为 0.07nm。由此可见, 采用扩展量化等级法把量化等级从 256 提高到 1024 后, 图像的纵向分辨率提高了 4 倍。从图 3 中也可得到相同的结论。

### 3.2 快速采样-时间积分法对图像信噪比的影响

比较图 2(a) 与图 3(a) 可以定性地看出, 采用快速采样时间积分法将 100 幅连续图像进行时间

积分并平均后, 图像上的噪声明显降低, 信噪比明显提高。

为了定量的说明该方法对图像信噪比的影响。以另取的一个表面厚度均匀分布的样品为研究对象, 对该样品以 8bit 的纵向分辨率、10 幅每秒的速率抓取 5000 幅图像, 在此过程中样品保持不变。首先, 在该系列的每幅图像上相同位置  $P(m, n)$  上取像素的灰度值, 得到 5000 个表示样品上同一点的多个测量值, 用 Bessel 公式<sup>[5]</sup>进行计算, 得到单幅图像上该点灰度测量值的噪声标准差为 1.29。然后, 将此系列中每 10s 内连续抓取的 100 幅图像进行时间平均, 得到 50 幅平均图像, 取这些图像上  $P(m, n)$  位置的像素灰度值并用 Bessel 公式进行计算, 得到平均图像上该点像素灰度值的噪声标准差为 0.13(约为单幅图像噪声标准差的  $1/\sqrt{100}$ )。由此可见, 采用该方法对 100 幅图像进行时间积分并平均后, 噪声降低了 1 个数量级, 因为有效信号保持不变, 所以 S/N 提高了 1 个数量级。

### 3.3 多采样点平均法对分析样品的影响

以图 2(a) 对应的椭圆偏图像中的 HSA 单分子吸附层所在的区域为研究对象, 在该层上取一个含  $170 \times 50$  个像素的区域, 这些像素的灰度值在 14~27 之间分布。对这些值用 Bessel 公式进行计算, 得到单点测量时的噪声标准差为 1.92。将该区域中每列的 50 个像素进行平均, 用 Bessel 函

数对这些平均值进行分析, 得到取 50 点平均进行测量分析时的噪声标准差为 0.28(约为单点测量的  $1/\sqrt{50}$ )。显然, 采用多采样点平均法提高了图像分析可靠性, 这与理论分析是一致的。

## 4 结 论

本文通过考虑椭圆偏光学显微成像系统及椭圆偏成像的特点, 提出用于提高图像纵向分辨率和提高图像信噪比的图像采集方法, 以及分析样品的多采样点平均法。这些方法在系统配套软件 << Ellipsometric Imaging Expert System >> 中得以实现。实验表明文中提出的方法取得了良好的结果。

实验室中的椭圆偏光学显微成像系统已成功地研究了多种蛋白分子在固相表面的吸附机理<sup>[6]</sup>和多种抗原-抗体之间的相互作用<sup>[7]</sup>等, 并成功地检测了人体内分泌激素<sup>[8]</sup>等。在这些研究与检测中, 采用本文中提出的扩展图像量化等级法、快速采样-时间积分法和多采样点平均法得到了良好的椭圆偏成像质量和样品表面的定量分析结果, 证明了本文提出的方法是行之有效的。

此研究得到国家自然科学基金委和中国科学院的支持, 在此谨致谢意。

### 参考文献:

- [1] Cohn R F, Wagner J W. Dynamic imaging microellipsometry[P]. United States Patents: No. 5076696, 1991. 12-31.
- [2] Jin Gang, Jansson Roger, Arwin Hans. Imaging ellipsometry revisited: Developments for visualization of thin transparent layers on silicon substrates[J]. Rev. Sci. Instrum. 1996, 67(8): 2930- 2936.
- [3] 靳刚, 孟永宏, 邢建华, 王战会. 生物分子吸附膜层的图像显示——光学椭圆偏显微成像技术应用之一[J]. 测试技术学报, 1998, 12(3): 166- 171.
- [4] 陈延标, 夏良正. 数字图像处理[M]. 北京: 人民邮电出版社, 1990, 145.
- [5] 沙定国. 实用误差理论与数据处理[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 1993. 27- 28.
- [6] Jin Gang, Wang Zhan-Hui, Meng Yong-Hong, Zhao Zi-Yan. Imaging ellipsometry for the visualization of bio-molecular layers[J]. Proc. IEEE, 1998, 20(2): 581- 584.
- [7] Jin Gang, Meng Yong-hong, Xing Jian-hua, Zhao Zi-Yan. Visualization of molecule interaction between antigen and antibody—one of ellipsometric imaging application[J]. Proc. SPIE, 1998, 3548: 131- 135.
- [8] Zhao Zi-yan, Jin Gang, Wang Zhan-hui. Detection of somatotropin and corticosterone with imaging ellipsometry [J]. Proc. IEEE, 1998, 20(2): 590- 593.

## Technique of image grabbing and processing in ellipsometric imaging system

MENG Yong-hong, JIN Gang

(*Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

**Abstract:** Ellipsometric imaging, which has been developed during recent years, is a kind of technique for visualizing the superthin layer distribution and surface structure. It not only supplies a new tool for studying molecule biology, bio-medicine (especially molecule bio-medicine) and bio-molecule materials science, but also has promising applications in disease diagnosis and examination of micro-electronic elements and nano-materials. In order to improve the quality of images, Expanding Pixel Bit-depth and Fast Grabbing and Time Averaging, as well as Averaging Over Pixels are proposed. Above methods have been proved effective in the system with some experiment results. These methods may be used in some similar imaging systems.

**Key words:** ellipsometric imaging; image grabbing; image processing

作者简介: 孟永宏(1974-),男,陕西大荔县人。1997年毕业于北京理工大学光电工程系,获光电检测及仪器仪表专业学士学位。1997年进入中国科学院力学研究所参加工作,目前主要从事光学与生物交叉科学的研究。椭圆偏光显微成像系统是作者所在课题组于1998年研制的,该系统目前处于国际领先水平。利用该系统已在研究生物分子之间的相互作用、自装配单分子膜层(SAM)等研究方面取得良好的结果,并在SPIE,IEEE等国内外刊物上发表多篇学术论文。并且,利用该系统为中国科学院上海细胞生物所、北京协和医科大学等单位的药物筛选和受体-配体研究提供了崭新的手段。主要在研究中负责光学检测、图像采集和处理等工作。

靳刚(1957-),男,北京市人。1993年获法国巴黎皮埃尔·玛丽·居里大学物理学博士。1992-1994年曾任法国国家科研中心合作研究员,从事导电聚合物光学特性研究。1994-1996年作为访问学者在瑞典Linköping大学从事椭圆偏光成像及分子生物学应用研究。现任中国科学院力学研究所研究员、博士生导师和中国科学院专家委员会委员,兼任山东省医学科学院客座教授,并多次受聘为葡萄牙里斯本大学客座教授。目前从事生物分子测试技术研究和生物材料科学研究。