

文章编号 1004-924X(2004)04-0367-06

显微高光谱成像系统的设计

肖功海, 舒 嵘, 薛永祺

(中国科学院 上海技术物理研究所, 上海 200083)

摘要:设计出一种基于棱镜-光栅-棱镜组合分光方式的显微高光谱成像实验系统。系统根据推帚式成像光谱仪的原理进行设计,采用棱镜-光栅-棱镜组合元件在后光学系统进行光谱分光,利用高精度载物台自动装置驱动样品进行推扫成像,选用 PCI 总线作为数据采集的微机接口。整个系统由显微镜、分光计、面阵 CCD 相机、载物台自动装置以及数据采集与控制模块等几部分组成。系统的光谱范围从 400 nm 到 800 nm,120 个波段,光谱分辨率优于 5 nm,空间分辨率大约 1 μm 。该系统具有直视性、光谱分辨率高、结构紧凑、成本低等优点;不仅能够提供微小物体在可见光范围的单波段显微图像,而且能够获得图像中任一像素的光谱曲线,实现了光谱技术和显微成像技术的结合,成功的将成像光谱技术应用到显微领域,可广泛应用于临床医学、生物学、材料学、微电子学等学科领域。

关键词:显微成像光谱;高光谱成像;显微镜;光栅;CCD 相机;PCI 总线

中图分类号:TH744.1 文献标识码:A

Design of microscopic hyperspectral imaging system

XIAO Gong-hai, SHU Rong, XUE Yong-qi

(Shanghai Institute of Technical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200083, China)

Abstract: A novel microscopic hyperspectral imaging system was presented, and its operating principle, structure, hardware and software design were discussed. The system was designed based on the principle of pushbroom hyperspectral imager, direct vision dispersing prism-grating-prism component was used as spectrum-dividing component, and PCI bus was used as computer interface of high-speed imaging spectral data acquiring subsystem. The whole system was composed of a microscope, a spectrometer, an area CCD camera, an automatic stage and data acquisition and control subsystem. Comparing to other spectrum-dividing technologies, the prism-grating-prism has advantages such as direct vision, high spectral resolution, compact structure and low cost. The system is capable of performing spectral imaging in plenty of spectral bands and micro-spectroscopy in any image pixel, in the spectral range 400 through 800 nm. The spectral resolution is less than 5 nm, and the spatial resolution is about one micrometre. The system can be applied to a lot of fields, such as clinic medicine, biology, material science, microelectronics. The analysis results show that it can be successfully to apply hyperspectral imaging technique to microscopic fields by combining spectral imaging with microscopic imaging technique.

Key words: microscopic imaging spectrum; hyperspectral imaging; microscope; spectrometer; grating; CCD camera; PCI bus

1 引言

光学成像技术和光谱技术是两种历史悠久而又应用广泛的光电技术,长期以来,它们分别沿着各自的方向发展,直到上个世纪 80 年代出现的成像光谱技术,才将二维成像技术和光谱技术有机地结合起来。成像光谱技术不仅能对物体进行形态成像,同时还能提供丰富的光谱信息,由于它具有光谱分辨率高、波段多、图像与光谱相结合等优点,因而使得它一出现就受到各国的极大重视,并在遥感各领域得到了广泛的应用。

近年来,随着成像光谱技术的日趋成熟,其在显微领域的应用也逐渐成为人们研究的热点^[1-9],美国、英国、希腊等国家的研究人员通过不同的技术手段将成像光谱技术应用到病理学、细胞遗传学、组织学、免疫组织化学等领域,这些不同的技术手段主要体现在光谱分光方式上。目前,用于显微高光谱成像系统的光谱分光方法主要有:棱镜或光栅分光、线性渐变滤光片、声光可调谐滤光片、液晶可调谐滤光片等。棱镜或光栅分光是一种传统的、技术发展比较成熟的分光方式,但是基于棱镜或光栅分光的光谱成像仪器的主要缺点是系统信噪比和光谱分辨率受狭缝宽度的限制,狭缝越窄,光谱分辨率越高,但系统接收到的能量也随之降低;而声光滤光片和液晶滤光片是一种新型的分光方式,目前存在的主要问题是透光效率低、光谱范围有限、波长调谐时存在像移等。相对而言,基于渐变滤光片、声光滤光片和液晶可调谐滤光片的光谱成像仪器结构比较复杂、系统成本高。

在国内,人们对成像光谱技术的研究已经有多年的历史,西安光机所、长春光机所和上海技物所等单位先后开展了基于不同分光方法的成像光谱技术研究^[10-11],但目前为止国内尚没有显微成像光谱技术研究领域的文献报道。

本文介绍的是作者研制的一种基于棱镜-光栅-棱镜组件^[12]进行光谱分光的显微高光谱成像实验系统,该系统不仅能够提供可见光范围的单波段显微图像,而且能够获得图像中任一像素的光谱曲线。

2 显微高光谱成像原理

显微高光谱成像实验系统基于推帚式成像光谱仪的原理进行设计,光路原理图如图 1 所示。处于显微镜载物台上的样品被柯勒照明系统照明,瞬时视场内的样品条带通过显微镜物镜和 0.6 倍 C-Mount 接口镜头成像于分光计的狭缝处,再经过光谱分光组件后,在垂直样品条带方向按光谱色散,最后成像于 CCD 像面。CCD 光敏面平行于狭缝的一维称为空间维,垂直于狭缝的一维称为光谱维,空间维每一行光敏元上得到的是样品条带一个光谱波段的像,这样面阵 CCD 相机每帧图像便对应于一个样品条带的多光谱图像。通过载物台自动装置对样品进行推扫,就得到整个样品的二维图像及光谱数据,即图像立方体。

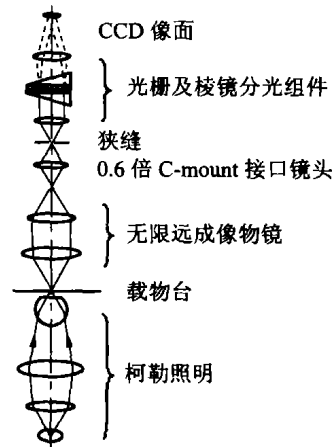


图 1 显微高光谱成像系统光路原理图
Fig. 1 Optical schematic diagram of the system

3 主要技术指标

由于成像光谱仪器的一些指标参数之间是相互影响和相互制约的,因此,对于显微高光谱成像系统,其主要指标的确定,需要考虑系统的综合性能、分系统器件的各种参数的制约等因素。

3.1 光谱范围

因为显微镜属于透射式主动光学系统,其光源一般为可见光;此外,在病理学、组织学、免疫组织化学等方面,各种染料在可见光范围均具有吸收光谱特征,因此从技术可行性和应用需求考虑,

本系统的光谱范围选择在可见光。另外,对于光栅分光,根据光栅方程得知,当波长为 λ_1 的第 k_1 级光谱与波长为 λ_2 的第 k_2 级光谱满足 $k_1 \lambda_1 = k_2 \lambda_2$ 时,将发生光谱重叠,因此为了避免光谱重叠,本系统的光谱范围只选择在 400~800 nm。

3.2 波段数

波段数的选取主要根据 CCD 相机的光谱维像元数的多少及其像元合并而定,一般没有严格的标准,选定波段数为 120。

3.3 光谱分辨率

光谱分辨率主要与分光计的狭缝宽度有关。狭缝越窄,则光谱分辨率越高,但系统接收到的能量也随之降低,因此,在保证足够光学能量的前提下,可减小狭缝宽度,以提高光谱分辨率,为小于 5 nm。

3.4 空间分辨率

空间分辨率主要与显微物镜的数字孔径、CCD 像元大小有关。对于本系统,若 CCD 像元尺寸为 27 μm ,当选用 40 倍物镜时,系统空间分辨率为 1.125 μm 。

4 系统设计

4.1 总体结构设计

由于显微镜是带有光源的主动光学系统,因此,为了获得成像光谱,从总体上考虑,有两种系统结构可供选择:

一种是在前光学系统进行光谱分光,即采用波长调谐的照明光源,照明光源以一定的波长间隔连续或非连续地扫描,在每一个预定的波长处得到一个灰度图像,波长扫描后便构成光谱图像立方体。这种方法的主要优点是不要在成像光路中插入任何光学和机械元件,因而不会增加额外的光学像差。缺点是很费时,对于上百个波段的高光谱成像而言,往往需要长达小时量级的时间。而且,这种方法不适用于荧光应用,因为要得到荧光需要激发光源。

另一种结构是在后光学系统(即成像光束)中进行光谱分光,这是用于航空航天遥感领域的光谱成像仪中广泛采用的方法,对于显微高光谱成像系统,这种方案也可以借鉴。

因此,本显微高光谱成像实验系统采用后一种结构形式,即在成像光束中进行光谱分光。利

用推帚式光谱成像仪的原理进行设计,将光谱仪子系统光学耦合到生物显微镜的三目镜筒上;利用高精度步进电机驱动载物台进行微米级平动,实现推帚成像。

整个系统在结构上主要由显微镜、分光计、CCD 相机、数据采集和控制系统几部分组成。

4.2 分光子系统设计

目前,用于成像光谱仪器的光谱分光方法主要有棱镜分光、光栅分光、傅里叶变换、声光可调谐滤光片、液晶可调谐滤光片、渐变滤光片、二元光学元件等方法^[13]。从目前的应用情况来看,光栅分光仍是应用广泛而且技术相对成熟的光谱分光方法。因此,本系统仍采用传统的光栅分光方法。而对于光栅而言,又可分为反射光栅和透射光栅。由于该系统属于直视系统,即同轴光学系统,因此,若采用反射光栅,将使系统的光轴发生折转,从而给系统结构设计带来困难。为简化设计,本系统采用透射光栅分光。

对于透射光栅,根据光栅方程,当垂直光栅入射,即入射角为零时,若取 +1 级或 -1 级衍射光谱,则衍射角不为零,即所有衍射光线将沿系统主光轴发生偏转,从而造成整个系统为非同轴系统。因此,为了使整个系统保持为同轴光学系统,采用棱镜-光栅-棱镜组合的分光方式,使分光后中心波长的衍射光线沿系统主光轴衍射。

光谱分光系统的主要设计参数如下:

狭缝:宽度 25 μm ,有效长度 8.8 mm;

准直光学镜头: $f = 40 \text{ mm}$, $f/2.8$;

会聚光学镜头: $f = 40 \text{ mm}$, $f/2.8$,与准直光学镜头为对称式结构;

光栅频率:315 1/mm;

前棱镜:顶角 11.8°,上宽度 2.4 mm,下宽度 5.8 mm,中心厚度 4.1 mm;

后棱镜:顶角 11.2°,上宽度 1.0 mm,下宽度 5.5 mm,中心厚度 3.2 mm。

4.3 载物台自动装置设计

根据推帚式成像光谱仪的特点,系统使用狭缝作为视场光阑,对瞬时视场内的观测目标进行一维采样,因此,要获得整个观测目标的二维图像,必须对另一维进行推帚。用于航空遥感的推帚式成像光谱仪是借助飞机的向前运动来完成推帚的,与之不同的是,显微高光谱成像系统是利用载物台的平动来实现对样品的推帚成像,因此该

实验系统需要设计和研制载物台自动装置。为了获得准确的光谱图像,必须对载物台的运动速度进行精确的控制。本系统利用步进电机连接滚珠丝杠,将滚珠丝杠的移动横梁连接到载物台,来驱动载物台运动。因此,载物台的运动速度是通过步进电机的转速控制来实现的。而步进电机的转速控制是通过单片机产生方波脉冲信号来触发步进电机进行步进旋转。因此,单片机产生的方波脉冲信号频率最终决定了载物台的运动速度。

系统的瞬时视场与系统的总放大倍数和 CCD 光谱维像元尺寸有关。在该系统中,CCD 光谱维像元大小为 $27 \mu\text{m}$,当使用 40 倍物镜时,系统的总放大倍数为 $40 \times 0.6 = 24$ 倍。因此,系统在光谱维方向的空间分辨率为 $27/24 = 1.125 \mu\text{m}$,而相机的帧速率为 30 帧/秒,所以,载物台的运动速度为 $1.125 \times 30 = 33.75 \mu\text{m/s}$ 。由于丝杠的螺纹间距为 1 mm,即 $1000 \mu\text{m}$,步进电机的每转步数为 10 000 步/转,因此,步进电机每旋转一步对应载物台的前进距离为 $1000/10000 = 0.1 \mu\text{m}$,最后计算出电机的运行频率为 $33.75/0.1 = 337.5 \text{ Hz}$,即需要产生的方波脉冲的周期为 $2963 \mu\text{s}$ 。

4.4 数据采集子系统

数据采集系统主要包括高光谱结果数据传输、采集、控制、存储和实时显示等功能,由于高光谱成像系统的数据传输速率非常高,因此传统的基于 ISA、EISA 总线的数据采集系统已不能满足要求。而 PCI 总线的最大数据传输速率为 132 MB/s,能满足高光谱成像系统数据采集的要求。所以,本系统采用 PCI 总线作为数据采集的微机接口。

数据采集系统采用模块化设计方法,将各个主要功能模块分离开来,模块间采用统一的接口进行通信;并且在数字逻辑实现上,采用在系统可编程(In System Program)器件,通过软件对系统进行配置,提高系统的灵活性。其具体设计方法与其他高光谱成像仪器的数据采集系统类似,这里不再赘述^[14-15]。

5 系统性能测试及结果

在完成系统集成后,首先对系统进行光谱定标。光谱定标的方法是在显微镜聚光镜下方放置一反射镜,利用一台高精度单色仪,通过平行光管照亮反射镜,读出光谱仪的帧数据,得到各波长在 CCD 像面对应的位置,即可确定各个波段对应的中心波长。同时选取若干个波段,利用单色仪测量这些波段的光谱带宽。表 1 是其中若干波段的定标结果,由于 CCD 相机光谱维共有 244 个像素,为减小数据记录压力,在数据采集时只是隔行记录 120 个波段。从光谱定标结果来看,系统的光谱分辨率在 3 nm 左右。并且可以看出从第 110 波段以后,波长大于 800 nm,考虑到二级光谱重叠,因此从第 110 个波段以后的数据不作分析。

其次是测量系统的光谱畸变,方法是利用汞灯照射反射镜,记录汞灯辐射中各个光谱线在 CCD 像面的位置,即可测得像面边沿处的光谱畸变。结果发现在 405 nm 波长处,边沿的光谱弯曲将近一个半像素,而在 546 nm 波长处,边沿的光谱弯曲一个像素,因此,最边沿像素的光谱误差在 2~3 nm。

表 1 光谱定标部分结果

Tab. 1 Some results of spectral calibration

波段	中心波长 (nm)	带宽 (nm)	波段	中心波长 (nm)	带宽 (nm)	波段	中心波长 (nm)	带宽 (nm)
1	403.7	2.8	54	591.5	2.9	108	792.0	3.4
2	407.8	3.0	55	595.0	3.0	109	795.6	3.2
3	411.9	3.2	56	598.4	3.3	110	799.3	3.3
4	416.0	2.9	57	601.6	3.1	111	803.0	3.3
5	420.1	3.0	58	605.0	3.2	112	806.6	3.5

在对系统的性能进行测试后,利用该实验系

统对人体正常血细胞进行实验观测,实验样品的

制备是将正常的人体血样滴在载玻片上,未进行其它处理。实验时使用的是40倍显微物镜。图2是从记录的图像立方体中截取的一段单波段灰

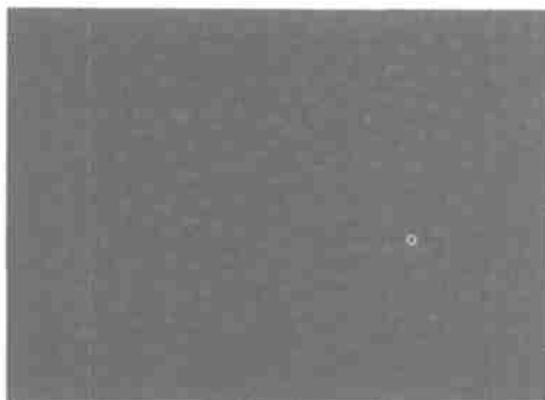


图2 血细胞的显微单波段光谱图像
Fig.2 The microscopic spectral image of specimen

度图像,其中心波长为601.6 nm,波段带宽约3 nm,图3是从图像中选取任意象素位置的光谱曲线。

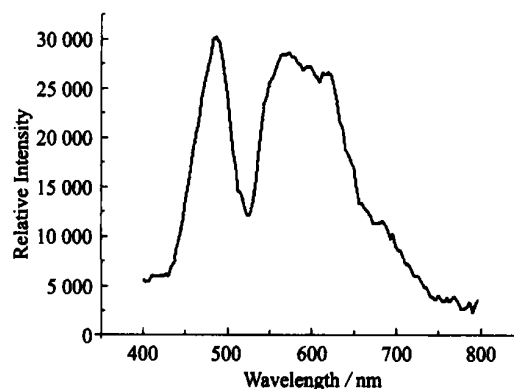


图3 其中一个像素的光谱曲线
Fig.3 The spectrum of one pixel in Fig.2

6 结束语

本文通过结合成像光谱技术和显微成像技术,设计了一种基于棱镜-光栅-棱镜组合分光方式的显微高光谱成像实验系统。相对其它分光方式,棱镜-光栅-棱镜组合分光具有直视性、光谱分辨率高、结构紧凑、成本低的优点。

成像光谱技术是20世纪80年代出现的一种新的光电技术,而将成像光谱技术应用到显微领域是各国科学家最近几年才开展的研究工作,目前虽然尚处于探索性研究阶段,但已经成为人们研究的热点。可以预见的是,显微成像光谱技术,作为一种新的技术手段,将会在临床医学、生物学、材料学、微电子学等学科领域得到广泛的应用。

参考文献:

- [1] SCHROCK E, MANOIR S, VELDMAN T, *et al.* Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes[J]. *Science*, 1996, 273(26):494-497.
- [2] ROGER A S, THOMAS N, JEFF R Z, *et al.* Hyperspectral imaging: A novel approach for microscopic analysis[J]. *Cytometry*, 2001, 43(4):239-247.
- [3] MICHAEL L H, ROGER A S, HAROLD R G. Characteristics and capabilities of the hyperspectral imaging microscope [J]. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 2002, 21(4):104-117.
- [4] ANTONIS P, DFSTATHIOS S, GEORGE D, *et al.* A Novel spectral microscope system: application in quantitative pathology[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2003, 50(2):207-217.
- [5] RICHARD M L, PAUL J C, NEAL R H. Spectral imaging and biomedicine: new devices, new approaches[C]. *Proceedings of the 31st Applied Imagery Pattern Recognition Workshop (AIPR '02)*, 2002.
- [6] TOKU KO H, TAKESHI S, NORIYO H, *et al.* Spectral imaging fluorescence microscopy[J]. *Genes to Cells*, 2002, 7:881-887.
- [7] BARBER P R, VOJNOVIC B, ATKIN G, *et al.* Applications of cost-effective spectral imaging microscopy in cancer research[J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2003, 36:1729-1738.
- [8] RICHARD L O, MARK B W, DOROTHY A E. Analysis of stained objects in histological sections by spectral imaging and differential absorption[J]. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999, 47(10):1307-1313.
- [9] 蒋月娟,李全臣. 成像光谱技术的新进展[J]. *光电子技术与信息*. 2000, 13(4):26-29.

- JIANG YJ, LI Q CH. New Development of imaging spectrometers[J]. *Optoelectronic Technology and Information*, 2000, V13(4): 26-29. (in Chinese)
- [10] 于斌,曹召良,禹秉熙. 二元光学透镜在超光谱成像仪中的应用[J]. *光学 精密工程*, 2003, 11(2): 157-161.
YU B, CAO ZHL, YU B X. Application of binary optical lens in hyperspectral imager[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2003, 11(2): 157-161. (in Chinese)
- [11] 鞠挥,吴一辉. 微型光谱仪的发展现状[J]. *光学 精密工程*, 2001, 9(4): 372-376.
JU H, WU Y H. The state of the art of micro spectrometers[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2001, 9(4): 372-376. (in Chinese)
- [12] AIKIO M. An optical component[P]. Finnish Patent No: 90289, 1994.
- [13] 郑玉权,禹秉熙. 成像光谱仪分光技术概览[J]. *遥感学报*, 2002, 6(1): 75-80.
ZHENG Y Q, YU B X. Overview of spectrum-dividing technologies in imaging spectrometers [J]. *Journal of Remote Sensing*, 2002, 6(1): 75-80. (in Chinese)
- [14] 朱华伟. PCI总线研究[D]. 中国科学院上海技术物理研究所, 2001.
ZHU H W. *Study on PCI bus*[D]. Shanghai Institute of Technical Physics, 2001. (in Chinese)
- [15] 袁晓兵,张新,王沛. PCI总线数据采集卡 Windows NT 驱动程序的设计[J]. *光学 精密工程*, 2001, 9(1): 89-92.
YUAN X B, ZHANG X, WANG P. Device driver programming in windows NT for PCI Data acquisition card[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2001, 9(1): 89-92. (in Chinese)

作者简介:肖功海(1975 -),男,湖南衡阳人,中国科学院上海技术物理研究所物理电子学专业博士研究生,研究方向为成像光谱和光机电一体化技术。E-mail: ghxiao @etang.com