

图像复原式整形环形光横向超分辨共焦 显微测量新方法*

赵维谦 陈珊珊 冯政德

(哈尔滨工业大学自动化测试与控制系, 哈尔滨 150001)

(2005 年 12 月 7 日收到, 2006 年 1 月 19 日收到修改稿)

提出一种新的图像复原式整形环形光横向超分辨共焦显微测量法. 该方法首先利用二元光学器件, 将高斯照明光束整形为环形光束, 用于初步改善共焦显微镜的横向分辨力, 然后利用基于最大似然估计法(maximum likelihood estimate, MLE)的单幅图像超分辨复原技术, 重建测量图像的高频信息, 来进一步改善共焦显微镜的横向分辨力. 实验表明, 当 $\lambda = 632.8\text{nm}$, $N.A. = 0.85$ 时, 该方法能使共焦显微镜获得优于 $0.1\ \mu\text{m}$ 的横向分辨力. 利用该方法建立的横向超分辨共焦显微系统除了具有显著的超分辨效果外, 还具有低成本的优点, 因而该方法为共焦显微系统横向分辨力的改善提供了一种新的技术途径.

关键词: 超分辨, 超分辨复原, 最大似然估计, 共焦成像

PACC: 0760P, 4230V, 4225F

1. 引 言

尽管共焦显微镜点照射和点探测的特殊光路布置, 已使其横向分辨力比普通光学显微镜的横向分辨力改善了 1.4 倍^[1-4], 但与其轴向分辨力相比, 横向分辨力仍低 2 个数量级, 仅达 $0.4\ \mu\text{m}$ 左右, 这很难满足目前日益精细的三维微细结构, 如微台阶、微沟槽、集成电路线宽等测量时, 对高横向分辨力传感器的需求. 因此, 对于进一步改善共焦显微镜横向分辨力的研究显得尤为迫切.

目前, 有关改善共焦显微镜横向分辨力的研究可分类如下: 一是基于光瞳滤波原理的超分辨方法和技术^[4-7], 如文献 4 利用衍射光学器件将高斯光束整形为环形光束, 使共焦传感器的横向分辨力优于 $0.2\ \mu\text{m}$; 文献 5 设计了一种三区复振幅光瞳滤波器, 使共焦显微镜的横向分辨力改善了 30% 等; 二是通过改变共焦显微镜的光路结构或引入其他光学器件来实现超分辨的方法和技术^[8-10], 如文献 8 提出的 4Pi 共焦显微术, 文献 9 基于该技术提出双光子和多光子激励的 4Pi 共焦显微术; 文献 11 提

出了自相干共焦干涉显微法, 其利用双光束干涉来锐化系统点扩展函数, 使共焦显微系统的横向分辨力改善了 38% 等. 此外, 还有一类是图像超分辨复原技术, 即在不改变成像系统的前提下, 利用超分辨复原算法处理测得的图像, 重建图像的高频信息, 从而提高光学系统的横向分辨力.

上述第一、二类光学超分辨方法和技术主要通过改变系统的光路布置、增加超分辨光瞳滤波器、改变光源照明方式等硬件技术来实现. 若想仅利用此类技术来较大程度地改善共焦显微镜的横向分辨力, 必将面临较高的成本、尚待解决的技术和系统复杂化等问题. 而图像超分辨技术, 其复原算法灵活多变, 但复原效果依赖于被复原的初始图像的质量.

基于此, 本文提出一种融“光学超分辨”技术和“图像超分辨”复原技术于一体的超分辨新方法. 该方法首先利用低成本的超分辨光瞳滤波器, 将高斯光束整形为环形光束, 用于初步改善共焦显微镜的横向分辨力, 然后利用基于最大似然估计法的单幅图像超分辨复原技术, 来进一步改善共焦显微镜的横向分辨力, 最终使共焦系统达到优于 $0.1\ \mu\text{m}$ 的横向分辨能力.

* 国家自然科学基金(批准号: 50475035), 高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20050213035) 和新世纪优秀人才支持计划(批准号: NCET-05-0348) 资助的课题.

2. 图像复原式整形环形光横向超分辨共焦显微测量法

2.1. 整形环形光共焦显微系统

为满足超分辨复原技术对被复原的初始图像的高质量要求,首先利用超分辨光瞳滤波技术对共焦显微系统的横向分辨特性作初步改善.图1是我们建立的横向超分辨整形环形光共焦显微系统^[3,4].

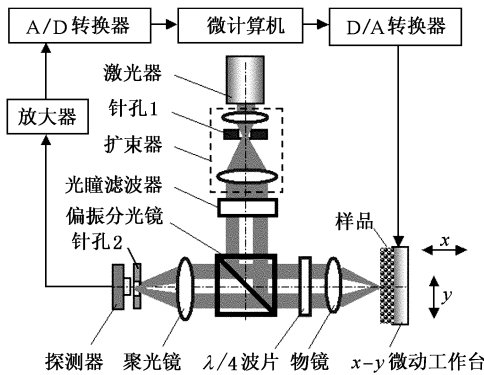


图1 整形环形光共焦显微系统

该系统利用二元光学器件(BOE)将高斯照明光束整形为环形光束,通过优选环形光内、外环半径比 ϵ ,来锐化爱里斑的主瓣,从而达到改善共焦显微系统横向分辨力的目的.

当物镜和聚光镜相同时,整形环形光共焦显微系统探测到的横向强度响应为^[4]

$$I(v, 0) = \frac{1}{(1 - \epsilon^2)^2} \cdot \left| \frac{1}{v} [J_1(v) - \epsilon J_1(\epsilon v)] \right|^4, \quad (1)$$

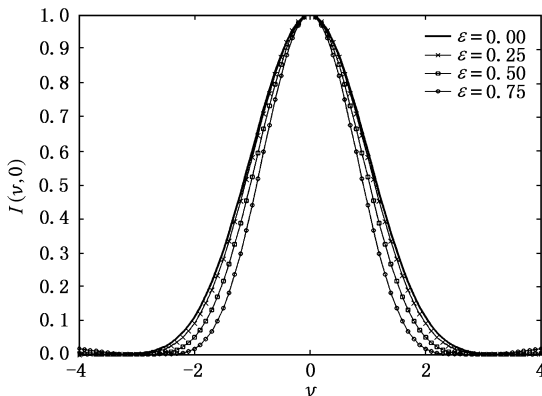


图2 归一化横向强度响应曲线

其中 v 为归一化横向光学坐标; $J_1(v)$ 为一阶贝塞耳函数.

归一化横向强度响应曲线 $I(v, 0)$ 如图2所示.

可见 ϵ 值越大,横向强度响应的半高宽就越小,意味着系统的横向分辨力提高得越明显.但这种方法,横向分辨力的改善是以轴向分辨力的降低和光能损失为代价的,因而 ϵ 值不能取太大,故仅利用此方法仍不能满足对共焦显微系统高横向分辨力的需求.

2.2. 图像超分辨复原方法

2.2.1. 原理

首先,理想图像或成像物体应具备非负性和有界性^[12,13],表示为

$$\begin{aligned} f(x) &> 0, x \in X, \\ f(x) &= 0, x \notin X, \end{aligned} \quad (2)$$

其中 X 为物体的范围, $f(x)$ 为物体的光强度.

将 $f(x)$ 的傅里叶频谱依据成像系统的截止频率分为截止频率以下部分 $F_a(u)$ 和截止频率以上部分 $F_b(u)$,对(2)式作傅里叶变换得

$$F(u) = [F_a(u) + F_b(u)] \otimes \text{sinc}(Xu), \quad (3)$$

其中 \otimes 表示卷积.

由于 sinc 函数是空域无限的,通过卷积运算,必然会使成像物体中截止频率以上的信息叠加到截止频率以下的频率成分中.这就意味着对于非负有界物体所成的像,其截止频率以下的频率成分中包含了物体的所有低频和低频信息.

考虑噪声影响,成像过程可表示为

$$g(x) = h(x) \otimes f(x) + n(x), \quad (4)$$

其中 $f(x)$ 为理想图像或成像物体, $g(x)$ 为实际系统成像, $h(x)$ 为成像系统的点扩散函数, $n(x)$ 为噪声.

由于噪声影响及成像系统的低通滤波作用,由(4)式解得的物体估计通常不符合(2)式描述的非负性和有界性.因此在图像复原算法实现时,必须施加以下两个约束操作:1)数字截断,保证物体解的非负性;2)空间截断,保证物体解的有界性.上述截断过程引入非线性操作,而信号的非线性操作具有附加高频成分的性质.因此,通过对约束操作引入的高频分量作逐步调整,即可实现对整形环形光共焦显微系统测量图像的进一步超分辨复原.

2.2.2. 实现方法

整形环形光共焦显微系统是通过点探测器将探

测到的光子进行离散计数并转化为光强来获取测量图像的,其成像过程可视为一个泊松过程,因此本文选用基于泊松模型的最大似然估计法(Poisson MLE),其迭代式为^[12,13]

$$f^{k+1}(x) = f^k(x) \int_y \left[\frac{h(y-x)}{\int_x h(y-x) f^k(x) dx} \right] g(y) dy, \quad (5)$$

其中 $f^k(x)$ 为第 k 次迭代后得到的对理想图像 $f(x)$ 的估计; $g(x)$ 为整形环形光共焦显微系统实际测得的图像; $h(x)$ 为整形环形光共焦显微系统的振幅点扩散函数。

(5) 式可简写为

$$f_{k+1} = f_k \left(h * \frac{g}{h \otimes f_k} \right) \varphi(f_k), \quad (6)$$

其中 $*$ 为相关; φ 为 MLE 迭代式。

MLE 算法的特点:只要保证迭代初值大于零,那么算法每一步迭代结果都非负,同时每一步迭代均能保证能量守恒。这正好满足图像复原过程中的两个约束条件:非负性和有界性。

虽然 MLE 算法全局收敛且稳定,但其收敛速度慢,故本文采用文献[14]提出的“自动加速法”来加速其迭代过程。

该加速算法基于“预报-校正”机理,即先根据已有的理想图像估计值 f_k, f_{k-1}, \dots, f_0 预报出第 k 次期望值 y_k , 再对期望值 y_k 加以修正得到理想图像的第 $k+1$ 次迭代估计值 f_{k+1} 。具体迭代式如下:

预报过程

$$y_k = f_k + \alpha_k t_k = f_k + \alpha_k (f_k - f_{k-1}); \quad (7)$$

校正过程

$$f_{k+1} = \varphi(y_k), \quad (8)$$

其中 f_k 为理想图像的第 k 次迭代估计值; y_k 为第 k 次期望值; t_k 为方向向量。

加速参数 α_k 定义为

$$\alpha_k = \frac{\sum p_{k-1} p_{k-2}}{\sum p_{k-2} p_{k-2}}, \quad (9)$$

其中修正值 p_k 计算如下:

$$p_k = \varphi(y_k) - y_k. \quad (10)$$

只有 $k \geq 2$ 时, α_k 才有值,所以加速算法只能对 $k > 2$ 的 f_k 加速,而 f_1, f_2 的值仍使用迭代式(6)直接计算。

由于成像系统的 PSF 表征物体成像退化过程,因此在 MLE 迭代过程中,对整形环形光共焦显微系

统的 PSF 估计得越准确,复原效果将越理想。而受实验条件所限,本文中的 PSF 选取整形环形光共焦显微系统的理论计算值来代替,PSF 横向特性可由(1)式求得。为能完整反映系统横向 PSF 信息,离散 PSF 应包含所有的非零值点。数值仿真得:当归一化横向光学坐标 v 取 $-6 \sim 6$ 时,便可将 PSF 的非零值点基本包含在内。

图 3 是 v 取 $-6 \sim 6$, 采样步距 Δv 取 0.04 时,得到的 301×301 个点数的横向 PSF 响应图。

由于归一化横向光学坐标 v 与实际横向半径 r 之间存在关系

$$v = 2\pi r \sin a_0 / \lambda, \quad (11)$$

其中, $\sin a_0$ 是物镜的数值孔径, λ 为入射光波长。

则当 PSF 模拟采样的光学坐标间隔 $\Delta v = 0.04$ 时,对应实际横向半径的采样间距

$$\begin{aligned} \Delta r &= \Delta v \lambda / (2\pi \sin a_0) \\ &= 0.04 \times 632.8 \times 10^{-3} / (2 \times 3.14 \times 0.85) \\ &= 0.005 \mu\text{m}. \end{aligned}$$

对 PSF 离散时,采样间距越小越能反映图像细节,且最好能小于测量图像的采样间距,这样复原后的图像就越真实。但 PSF 采样率又不能太高,否则会导致数据量过大,进而影响到图像复原速度。

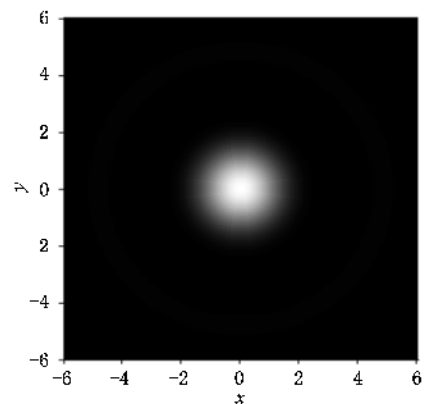


图 3 振幅点扩散函数(PSF)横向响应

3. 实验与分析

3.1. 测量系统

依据图 1 构建实验装置。光源选用 $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ 的氦氖激光器,物镜选用 60×0.85 的显微物镜,探

测器选用 NEWFOCUS 公司生产的 2001 型光电接收器. 针孔选用 NEWPORT 公司的 PH-8 型针孔, 孔径为 $8\ \mu\text{m}$. 微位移工作台的驱动器选用 NEWFOCUS 公司生产的大范围、高稳定性微位移驱动器, 配以缩小比例为 5:1 的柔性铰链工作台组成纳米微动系统. 微位移驱动器的每个驱动脉冲可使微位移工作台获得 2nm 的进给. 该系统横向扫描标准台阶时, 取采样步距为 $0.01\ \mu\text{m}$, 略大于 PSF 的离散间隔 $0.005\ \mu\text{m}$, 满足超分辨复原的要求.

下面通过比对测试 DI 公司 Dimension3100 型原子力显微镜(AFM)配带的标准台阶, 来考核超分辨图像复原式整形环形光共焦显微系统横向分辨力的改善程度.

图 4 为经 Dimension3100 型 AFM 扫描的标准台阶测量结果, 两标识点(三角)垂直方向对应的台阶高度等于 118.23nm , 两标识点水平方向对应的台阶跳跃区距离为 136.72nm .

由于标准台阶高度仅为 118.23nm , 因而探针形状(本 AFM 采用圆锥型的探针)对 AFM 的横向分辨力影响很小, 即使考虑到探针形状的影响, 其横向分辨力仍可优于 1nm , 因此 136nm 可视为该台阶样品跳跃区的实际距离.

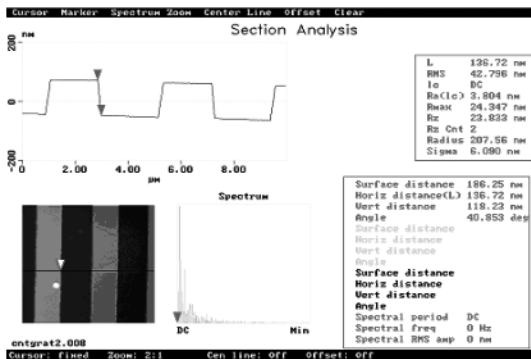


图 4 AFM 扫描的标准台阶测量结果

图 5 为不同形式的共焦显微系统测得的台阶曲线图. 其中, 曲线 A 为 $\epsilon = 0$ 即未加二元光学器件时, 普通共焦显微系统测得的台阶曲线图, 台阶的高度约为 120nm , 跳跃区的距离为 $0.403\ \mu\text{m}$. 曲线 B 为添加二元光学器件 $\epsilon = 0.5$ 时, 整形环形光共焦显微系统测得的台阶曲线图, 台阶的高度约为 120nm , 跳跃区的距离为 $0.268\ \mu\text{m}$, 若再考虑台阶自身跳跃区为 136nm , 则整形环形光共焦显微系统的横向分

辨力应优于 $0.2\ \mu\text{m}$.

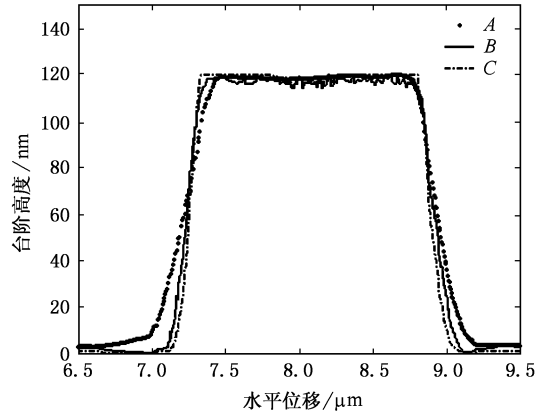


图 5 台阶测量曲线比较图

显见, 曲线 B 比曲线 A 在台阶跨越区更接近于原子力测得的真实曲线. 所以, 整形环形光法能改善共焦显微系统的横向分辨力.

3.2. 测量结果超分辨复原

为验证基于 MLE 算法的超分辨复原技术的有效性, 依据上述原理及步骤, 将整形环形光共焦显微系统测得的标准台阶曲线 B 进行进一步的超分辨复原操作, 结果绘于图 5 中, 曲线 C 所示.

显见, 经 MLE 图像超分辨算法处理后, 台阶的高度约为 120nm , 跳跃区的距离变小, 约为 $0.2\ \mu\text{m}$, 若再考虑台阶自身跳跃区为 136nm , 则超分辨图像复原式整形环形光共焦显微系统的横向分辨力应优于 $0.1\ \mu\text{m}$. 与曲线 A, B 相比, 曲线 C 在台阶跨越区更接近于原子力测得的真实曲线, 即图像超分辨复原技术使整形环形光共焦显微系统的横向分辨能力进一步得以改善.

4. 结 论

本文提出了一种融整形环形光横向超分辨技术和图像超分辨复原技术于一体的改善共焦显微系统横向分辨力的新方法. 实验结果表明, 当 $\lambda = 632.8\text{nm}$, $N.A. = 0.85$, $\epsilon = 0.5$ 时, 利用该方法建立的共焦显微系统的横向分辨力优于 $0.1\ \mu\text{m}$. 故该方法为共焦显微镜横向分辨力的改善提供了一种新的技术途径.



- [1] Hamilton D K , Wilson T 1982 *Appl. Phys.* B **27** 211
- [2] Wilson T 1990 *Confocal Microscopy* (London : Academic Press Limited) p1
- [3] Zhao W Q , Tan J B , Qiu L R 2004 *Optics Express* **12** 5013
- [4] Zhao W Q , Tan J B , Qiu L R 2005 *Sensors and Actuators A* **120** 17
- [5] Yun M Y , Liu L R , Sun J F , Liu D A 2005 *J. Opt. Soc. Am. A* **22** 272
- [6] Liu L , Deng X Q , Wang G Y , Xu Z Z 2001 *Acta Phys. Sin.* **50** 48 (in Chinese) [刘力、邓小强、王桂英、徐至展 2001 物理学报 **50** 48]
- [7] Xiao F R , Yuan J H , Wang G Y , Xu Z Z 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 1731 (in Chinese) [肖繁荣、袁景和、王桂英、徐至展 2004 物理学报 **53** 1731]
- [8] Hell S W , Stelzer E H K 1992 *J. Opt. Soc. Am. A* **9** 2159
- [9] Hell S W , Stelzer E H K 1992 *Opt. Commun.* **93** 277
- [10] Tang Z L , Liang R S , Chang H S 2000 *Acta Phys. Sin.* **49** 1076 (in Chinese) [唐志列、梁瑞生、常鸿森 2000 物理学报 **49** 1076]
- [11] Kang D K , Gweon D 2003 *Opt. Lett.* **28** 2470
- [12] Van Kempen G M P , Van der Voort H T M , Bauman J G J , Strasters K C 1996 *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **15** 76
- [13] Su B H , Jin W Q , Niu L H 2001 *Opt. Tech.* **27** 6 (in Chinese) [苏秉华、金伟其、牛丽红 2001 光学技术 **27** 6]
- [14] Biggs D S C , Andrews M 1997 *Appl. Opt.* **36** 1766

A confocal measurement method based on superresolution image restoration and shaped annular beam *

Zhao Wei-Qian Chen Shan-Shan Feng Zheng-De

(Department of Automatic Testing and Control , Harbin Institute of Technology , Harbin 150001 , China)

(Received 7 December 2005 ; revised manuscript received 19 January 2006)

Abstract

A new confocal measurement method based on superresolution image restoration and shaped annular beam is proposed. Firstly , we employ a binary optical element (BOE) to shape a Gaussian beam into an annular beam which preliminarily improves the lateral resolution of a confocal microscopy system , then we use a superresolution image restoration technique based on the theory of maximum likelihood estimate (MLE) to retrieve the lost high frequency information of the testing image , which further enhances the lateral resolution. The experimental results indicate that a lateral resolution of better than $0.1\mu\text{m}$ is achieved when $\lambda = 632.8\text{nm}$ and $N.A. = 0.85$. In addition to the distinct superresolution effect , the proposed method also has the advantage of low cost , therefore , it provides a novel technical way to improve the lateral resolution of a confocal microscopy system.

Keywords : superresolution , superresolution restoration , maximum likelihood estimate (MLE) , confocal microscopy

PACC : 0760P , 4230V , 4225F

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 50475035) , the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No. 20050213035) and the New Century Excellent Talents in University (Grant No. NCET-05-0348).