

文章编号: 1002-2082(2010)01-0070-03

一种提高共聚焦显微镜信噪比算法的研究

胡茂海, 杨晓春

(南京理工大学 电光学院, 江苏 南京 210094)

摘要: 基于共聚焦显微镜的成像特点, 建立了 Kalman 滤波算法的理论模型, 把 Kalman 滤波方法引入到系统中, 提出一种基于图像像素的 Kalman 滤波算法, 并实现了实时化的 Kalman 滤波器。实验结果表明: 该算法能够有效地提高共聚焦显微镜信噪比, 但是以牺牲时间为代价, 提高系统分辨率的根本方法还是要着重考虑优化成像系统光路和探测电路。

关键词: 共聚焦显微镜; 显微成像; Kalman 滤波器; 信噪比

中图分类号: TN713; TH742

文献标志码: A

Algorithm of improving confocal microscope SNR

HU Mao-hai, YANG Xiao-chun

(School of Electronic Engineering and Optoelectronic Technique, Nanjing University
of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract: A theoretical model for Kalman filtering algorithm is established based on the imaging characteristic of the confocal microscope. The Kalman filtering algorithm based on the image pixel is proposed and a real-time Kalman filter is realized by means of the introduction of Kalman filtering method into the system. The experimental result shows that the algorithm can effectively improve the signal-noise-ratio (SNR) for the confocal microscopy imaging systems, but it is obtained at the expense of time. Therefore, the perfect method to improve the resolution of the system is to emphatically consider the optimization of the beam path of the imaging system and the detection circuit.

Key words: confocal microscope; microscopy imaging; Kalman filter; SNR

引言

共聚焦显微术利用聚焦照明与空间滤波探测相结合, 探测衍射限制焦面位置处后向散射光信息或荧光信号信息, 抑制焦面外的背景光信号, 因而可以减少图像模糊, 提高系统的有效分辨率, 并可以对厚散射样品成清晰断层扫描图像。共聚焦显微镜不仅具有很高的横向分辨率, 而且具有较高的纵向分辨率。影响共聚焦显微镜分辨率的因素很多。Fried 曾首次研究了共焦系统高分辨率与信噪比之间的关系^[1-2], Fried 注意到, 对空间上靠得很近的 2 个点源进行定量测量时, 当间隔小到分辨率时, 需要增加信噪比以抵消小间隔的影响。另外, 共聚焦显微

镜中探测的荧光信号十分微弱, 因此提高成像系统信噪比非常必要。

在光学系统中, 理想情况下的噪声等于光学高斯白噪声。其定义为所探测到的总光子数的平方根, 即

$$N = \sqrt{S+B} \quad (1)$$

式中: N 为系统噪声; S 和 B 分别是探测到的信号与背景光子。故系统信噪比可以定义为^[3]

$$\text{SNR} = \frac{S}{\sqrt{S+B}} \quad (2)$$

提高共聚焦显微镜信噪比的方法有 2 种方法, 即优化系统硬件设计法和软件法。本文主要研究采

收稿日期: 2009-07-09; 修回日期: 2009-09-13

作者简介: 胡茂海(1967—), 男, 安徽人, 副教授, 博士, 主要从事生物光子学及显微成像技术研究。E-mail: h_mhai@yahoo.com.cn

用优化的软件算法提高系统信噪比。众所周知,对于静止图像来说,利用多帧图像平均算法可以提高图像的信噪比。但由于共聚焦显微镜利用振镜扫描成像,具有高精度定位能力,因此可以对感兴趣领域进行多次重复扫描成像。基于共聚焦显微镜的这个成像特点,本文把 Kalman(卡尔曼)滤波方法^[4-8]引入到系统中,提出了一种基于图像像素的卡尔曼滤波算法。实验结果证明,该算法可以较好地提高共聚焦显微镜信噪比。

1 算法理论依据

Kalman 滤波器本质上是一种递归预测,它采用无偏最小方差准则实现过程的最优估计,具有很好的实时性和抗噪性。将 Kalman 预测器应用于共聚焦显微镜中,提高系统扫描图像信噪比,则需要解决显微镜扫描成像过程的建模问题。共聚焦显微镜成像过程可分成光学扫描和光电探测 2 个步骤,如图 1 所示。

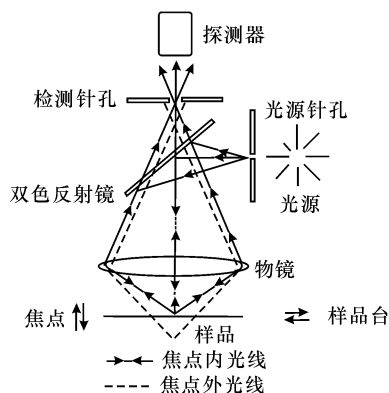


图 1 共聚焦显微镜原理图

Fig. 1 Schematic diagram of confocal microscope

首先,激光光源入射照明小孔,经光学系统成像于生物标本,生物标本激发产生的荧光再经光学系统成像于探测器。设扫描点到达探测器的荧光强度为 I ,则有^[9]:

$$I(v_p) = \iiint \left\{ \left[\iiint (S(v_s)h(v-v_s)dv_s) \right]^2 \cdot O(v_p-v) \cdot |h(v_d-v)|^2 \right\} D(v_d)dv_d \quad (3)$$

式中: v_p 为扫描点的位置; $S(v_s)$ 为成像系统光源; $D(v_d)$ 为探测器平面函数; $h(v)$ 为物镜的脉冲响应函数; $O(v_p-v)$ 为标本荧光转换系数空间分布函数。成像系统的状态方程可以表示为

$$I(k) = AI(k-1) + w(k-1) \quad (1)$$

式中: A 为系统能量传输系数,取决于光学成像系统特性,可以假设系统常数一定($A=1$)。 $w(k)$ 为系

统噪声,在光学系统中,理想情况下的噪声等于光学高斯白噪声。其统计特性为

$$E[w(k)] = 0 \quad (5)$$

$$E[w(k)w^T(j)] = Q[k]\delta_{ij} \quad (6)$$

其次,光电探测器及数模转换系统将到达探测器的荧光信号进行光电转换、信号放大、模拟信号采样转换。则成像系统观测方程可写为

$$y(k) = HI(k) + v(k) \quad (7)$$

式中: H 为系统观测转换系数; $v(k)$ 为观测噪声。在完成光电转换过程中,不仅给出表征被测对象的有用信号,同时伴随着无用的噪声信号,如热噪声、暗电流噪声、散射噪声等。观测噪声较为复杂,其噪声的统计特性通常事先是不知道的,甚至是有色噪声。为了便于讨论,此处假设观测噪声为高斯白噪声,统计特性为

$$E[v(k)] = 0 \quad (8)$$

$$E[v(k)v^T(j)] = R[k]\delta_{ij} \quad (9)$$

2 算法实现

上节给出了 Kalman 滤波器在共聚焦显微镜系统中应用的理论依据,为了在系统中真正实现 Kalman 滤波器,还需要解决如下 2 个问题,即预测器设计和初始状态计算公式的建立。

假设扫描光学图像表示为 $f(t, i, j)$, t 为当前时刻, i 和 j 为图像像素坐标。图像 t 时刻第 i 行的状态矢量为

$$F(t, i) = [f(t, i, 0) \quad f(t, i, 1) \quad f(t, i, 2) \cdots f(t, i, n)] \quad (10)$$

状态方程(4)可写成:

$$F(t, i) = AF(t-1, i) + w(t-1, i) \quad (11)$$

过程噪声的协方差矩阵为

$$Q(t, i) = \begin{bmatrix} \sigma_{w_{1,1}}^2 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \sigma_{w_{1,1}}^2 & \cdots & 0 \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ 0 & 0 & \cdots & \sigma_{w_{n,n}}^2 \end{bmatrix} \quad (12)$$

假设扫描数据图像表示为 $y(t, i, j)$, t 为当前时刻, i 和 j 为图像像素坐标,则观测方程(7)可表示为

$$Y(t, i) = HF(t, i) + v(t, i) \quad (13)$$

观测噪声的协方差矩阵为

$$R(t, i) = \begin{bmatrix} \sigma_{v_{1,1}}^2 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \sigma_{v_{1,1}}^2 & \cdots & 0 \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ 0 & 0 & \cdots & \sigma_{v_{n,n}}^2 \end{bmatrix} \quad (14)$$

由 Kalman 滤波原理可以得到一组递推的最

优滤波方程。

最优预测值:

$$\hat{F}(t|t-1, i) = A\hat{F}(t-1, i)$$

最优滤波值:

$$\hat{F}(t, i) = \hat{F}(t|t-1, i) + K(t) [Y(t, i) - HF\hat{F}(t|t-1, i)]$$

最优滤波增益:

$$K(t, i) = P(t|t-1, i)H^T [HP(t|t-1, i)H^T + R(t, i)]^{-1}$$

预测误差方差阵:

$$P(t|t-1, i) = AP(t-1, i)A^T + Q(t, i)$$

滤波误差方差阵:

$$P(t, i) = P(t|t-1, i) - K(t, i)HP(t|t-1, i)$$

在 $R, Q, P(0, 1)$ 已知情况下, 利用上述方程可以达到最优化滤波效果, 从而提高系统信噪比。

3 实验结果

基于 Windows XP 操作系统, 利用 C++ Builder 开发平台, 在我们开发研制的共聚焦扫描显微镜系统中成功实现了 Kalman 滤波器。图1 为未应用 Kalman 滤波算法扫描所得的螺旋藻图像, 激光波长 543 nm, 荧光中心波长为 650 nm, 带宽 40 nm。图 2 为应用 Kalman 滤波算法扫描所得的螺旋藻同

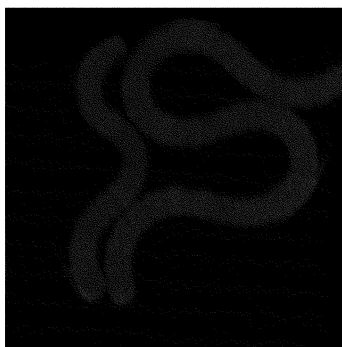


图2 滤波前螺旋藻图像

Fig. 2 Spirulina image before filtering

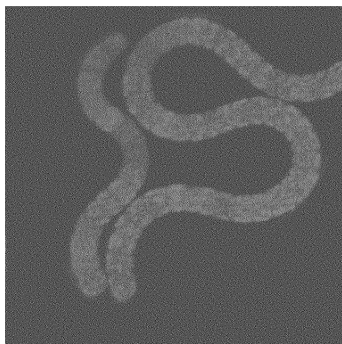


图3 滤波后螺旋藻图像

Fig. 3 Spirulina image after filtering

样深度图像, 扫描次数为 5 次。螺旋藻为一种自发荧光的生物标本, 其直径大约为 10 μm 左右。

4 讨论与分析

Kalman 滤波器是一种线性滤波器, 从其形式来看和平均滤波器没有太大的区别, 都是对观测值的一种线性组合, 只是组合的系数不同而已。由于系统具有高精度定位扫描特点, 两者在该系统中均能使用。从实验结果来看, Kalman 滤波器比平均滤波器效果好, 但其以牺牲时间为代价, 且也只是在一定程度上提高图像信噪比, 从而提高了系统分辨率。故提高系统分辨率的根本方法还是要从优化成像系统光路及探测电路设计入手。

参考文献:

- [1] FRIED D L. Resolution, signal-to-noise-ratio, and measurement precision [J]. J. Opt. Soc. Am, 1979, 69(3):399-406.
- [2] FRIED D L. Resolution, signal-to-noise-ratio, and measurement precision, addendum [J]. J. Opt. Soc. Am, 1980, 70(6):748-749.
- [3] SANDISON D R, WEBB W W. Background rejection and signal-to-noise optimization in confocal and alternative fluorescence microscopes [J]. Applied Optics, 1994, 33(4):603-615.
- [4] SCHMITT T, GEBAUER H D, FREYER R. Restoration of nuclear medicine images using a Kalman filtering approach [J]. SPIE, 1995, 2421:64-69.
- [5] LAPLANTE P A, NEILL C J. A class of Kalman filters for real-time image processing [J]. SPIE, 2003, 5012:23-29.
- [6] DZIELINSKI A, SKONECZNY S. Recurrent neural network application to image filtering. 2-D Kalman filtering approach [J]. SPIE, 1991, 1451:234-241.
- [7] TAO Hong-jiu, WANG Yue, ZHOU Zu-de. Study of image super resolution reconstruction algorithm based on Kalman filter movement estimation [J]. SPIE, 2005, 5637:406-412.
- [8] BIEMOND J, JELLE R, GERBRANDS J J. A fast Kalman filter for images degraded by both blur and noise [J]. IEEE Trans. On ASSP, 1983, 31:1248-1256.
- [9] WILSON T C, SHEPPAND J R. Theory and practice of scanning optical microscopy [M]. London: Academic, 1984.