

文章编号 1004-924X(2013)10-2543-06

用于多孔板细胞分析的自动显微成像系统

韩西达^{1,2}, 王 敏¹, 黄 强¹, 何永红^{1*}, 周超英²

(1. 清华大学 深圳研究生院 光学检测与成像实验室, 广东 深圳 518055;

2. 哈尔滨工业大学 深圳研究生院 机电工程与自动化学院, 广东 深圳 518055)

摘要: 设计了用于多孔板细胞分析的自动显微系统以实现药物筛选的自动检测。研究了系统的机械结构、人机交互软件、对焦评价函数的选择和多视野图像拼接功能。该系统采用支架式结构, 克服了形变带来的精度影响; 对比传统机械传动的优缺点后, 采用伺服电机和音圈电机两级调节的方式来提高系统精度和对焦速度。比较了几种对焦评价函数的性能并提出性能更优的评价方法。考虑到高倍显微镜下视野小对实验统计意义的影响, 设计了多视野图像拼接等图像处理功能。最后, 实验验证了系统的设计技术指标。实验结果表明: 单次对焦时间为 2 s; 对焦精度在微米级; 单次 4×4 图像阵列拼接时间为 15s, 满足系统进行药物筛选对速度、自动化程度和稳定可靠性的要求。

关键词: 显微成像; 细胞分析; 多孔板; 自动对焦; 图像拼接

中图分类号: TH742.9; TH703 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20132110.2543

Auto-microimaging system for cell analysis with multiple well plates

HAN Xi-da^{1,2}, WANG Min¹, HUANG Qiang¹, HE Yong-hong^{1*}, ZHOU Chao-ying²

(1. *Laboratory of Optical Imaging and Sensing, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China;*

2. *School of Mechanical Engineering and Automation, Shenzhen Graduate School, Harbin Institute of Technology, Shenzhen 518055, China)*

** Corresponding author, E-mail: heyh@sz.tsinghua.edu.cn*

Abstract: An auto-microimaging system to provide 3D scanning and auto-focus at each dimension was designed for the high throughput micro-imaging of drug screening. The mechanical structure, man-machine interaction software, the section of focusing evaluation function and the image titching of multi-view image for the system were researched. A rack structure was designed to overcome the limitation of accuracy from the deformation and a servo motor and a voice coil motor were combined as a two-stage controller to improve the accuracy and focus speed of the measuring system. Then, an algorithm of auto-focus was presented after several auto-focus evaluating methods were compared. According to the effect of a small view under the high power microscope on the experimental statistics, the function of image stitching was designed to fit the statistical significance of the experiment. On the

收稿日期: 2013-05-23; 修订日期: 2013-06-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 61275188, No. 81171375); 深圳市杰出青年基金资助项目; 国家重点实验室开放基金资助项目 (No. 12K05ESPCT)

experimental verification, it indicates that the time to complete the process of auto-focus is 2 s, and the accuracy of auto-focus can reach several micrometers. Moreover, the time to combine the micro-imaging regions of a 4×4 array is 15 s. The system can satisfy the requirements of short detection time, robotization, stability and reliability of cell analyzing with multiple well plates in drug screening.

Key words: micro-imaging; cell analysis; multiple well plate; auto-focusing; image stitching

1 引言

随着电子技术、控制技术与计算机技术的发展,光学仪器对自动化、智能化的要求越来越高^[1],而应用显微镜进行药物筛选实验时,往往都是以人工方式进行的,这种方式耗费时间和人力,很难大规模筛选。因此,发展自动对焦显微镜的需求日益迫切。现有的自动对焦显微镜已经实现了实验室显微镜的自动化,即自动调焦迅速找到最清晰的图像,然后用计算机控制自动切片扫描,进行医疗诊断、病理分析和实时教学等功能。不过这些都是针对实验室的切片检测,行程小,智能化程度低,难以满足现代医学大规模药物筛选的需求。

近年来,药物研发的过程中越来越重视筛选研究,利用细胞内荧光的聚集度来进行药物筛选的方法正在迅猛发展。有文献报道^[2]DNA 损伤(电离辐射或紫外线照射等)后,组蛋白被迅速地磷酸化募集其他蛋白到损伤部位形成荧光“焦点”结构,焦点的数量与电离辐射引起的双链断裂数量存在一一对应关系,表明这一指标极有可能成为检测细胞 DNA 损伤的新的特异性指标^[3-5]。因此测量每个细胞荧光“焦点”结构总面积这种量化的方法适用于大规模药物筛选^[6]。在获取细胞图像时,由于被测样品量大,而以往的显微镜检测视野小、操作繁琐,检测一张 96 孔板需要几个小时的时间,难以满足实验需求。因此研制能实现大规模药物筛选,适应能力强,速度快,可靠性能好,操作简单,用于多孔板药物分析的自动显微成像系统是十分必要的。

本文针对以往对药物检测方法存在的不足,设计了用于多孔板药物分析的自动显微成像系统。针对该系统设计了大行程二维平移台,可以同时检测 4 个 96 孔板;开发了集孔位扫描、自动对焦、图像拼接、图像信息输出等功能于一体的软件,满足用户实验需求。在显微镜自动对焦关键技术上讨论了几种对焦评价函数,并提出了新的

评价方法。对比传统机械传动的优缺点,采用伺服电机和音圈电机(直线电机)两级调节的方式,提高了显微镜的绝对精度。实验证明本系统在完成筛选工作要求的同时,具有很好的稳定性和可靠性,且检测速度快、精度高、自动化程度高。

2 用于多孔板细胞分析的自动控制显微系统的工作原理及构成

2.1 显微系统的工作原理

图 1 所示为多孔板细胞分析的自动显微成像系统成像原理图。如图所示,多孔板细胞分析的自动显微成像系统用 CCD 通过单筒显微镜拍摄检测药品,通过机械机构上下移动 CCD,代替了粗调或者微调的功能,改变显微镜成像系统的物距,获取图像传入计算机。然后对获取的图像通过自行开发的软件进行处理,获得实验结果。图中 96 孔板孔中的细胞在底部的位置分布高低不同,其对焦位置各不相同,手动对焦必然耗费大量时间。本系统的设计大大减轻了操作者的劳动强度,减少或避免操作者因反复调焦造成的主观误差,也省去了复杂的调焦步骤,大大的方便了操作者^[7]。

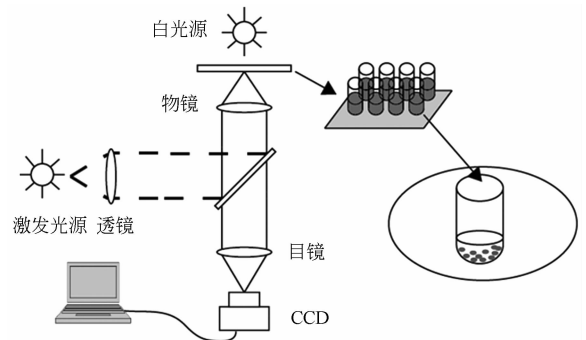


图 1 系统成像原理图

Fig. 1 Imaging principle of system

图 2 所示为多孔板细胞分析的自动显微成像系统工作原理图,主要由电机控制部分、机械传动部分、显微成像系统和 PC 机控制台组成。电机

控制部分由运动控制卡、电机驱动器和交流伺服电机组成。机械传动部分由 XY 载物台和 Z 轴运动部件。显微成像子系统由科学级 CCD 和单筒显微镜头组成。系统工作时,PC 控制台发出指令,由显微成像系统获得图像信息,电机控制部分和机械传动部分保障运动精度,由软件输出最后图像信息。

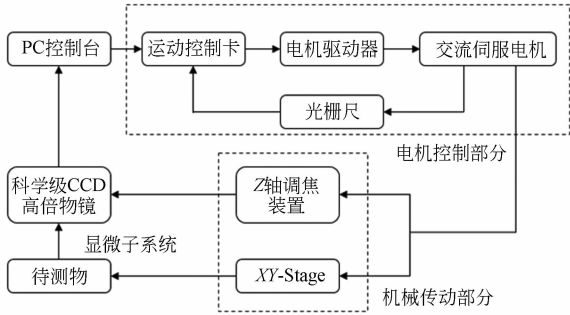


图 2 系统工作原理图

Fig. 2 System framework

2.2 显微系统的机械构成

为增大测量范围并提高绝对对焦精度,系统采取两级调节方式,由伺服电机带动精密丝杆模组进行粗调,音圈电机直驱进行微调。其中,粗调采取研磨级滚珠丝杠,丝杆运动 300 mm 导程误差在 8 μm ;微调采用音圈电机,理论定位精度达到 1 μm 。系统整体结构充分考虑到机械变形、Z 轴自重对系统精度的影响。采取如图 3 所示的支架式结构,添加加强筋,克服形变带来的精度影响。

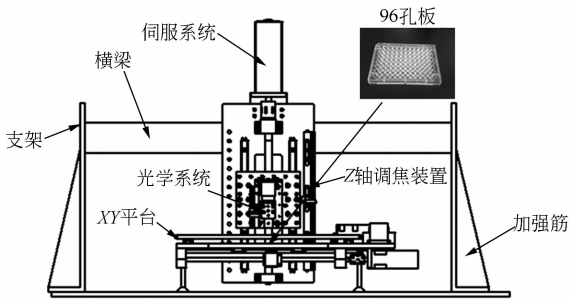


图 3 系统机械结构示意图

Fig. 3 System mechanical structure diagram

图 3 中的机械传动装置包括 XY 载物台和 Z 轴调焦装置,可以在软件的控制下按用户要求运动。系统中加入大行程 XY 载物台,可以同时安放 4 张 96 孔板并快速精确地进行孔板扫描,完全可以适应高通量样品检测。XY 载物台使用研磨级滚珠丝杠作为传动装置,定位精度在 8 μm ,小

于 96 孔板孔中心间隔的 1/1 000,满足孔位扫描精度需求。系统通过软件控制大规模药物自动检测,取代目视观察,数字成像效率高速度快,消除了由于观察者不同带来的主观差异性,大大提高了实验效率和测量精度。

3 显微系统的软件设计

3.1 软件模块设计

该软件在 VC++ 编译环境下,使用多轴控制卡提供的动态数据链接库,可分别或同时控制 X、Y、Z 轴的运动,可以设置各轴的起始速度、最大速度、加速时间、运动方式选择等。同时也可实时监测各轴运动状态是否出现异常情况,若出现异常则立即停机,直至解除异常。软件设计了循环运动功能模块,实现了周期性快速精确地移动 96 孔板。设置好运动参数后点击循环运动即开始一个周期的孔板检测,包括孔板的周期性移动、不同阵列的周期移动和对焦运动。完成一个周期检测后回到初始位置,换样后即可进行下一周期的检测。

同时设计了自动对焦模块,系统在工作时,通过 Z 轴方向上的运动系统实现调焦,带动光学成像系统沿 Z 轴方向上下移动^[10]。利用对焦评价函数计算图像清晰度值即对焦函数评价价值,通过对焦评价函数判断实现正确对焦^[8]。具体步骤如图 4 所示。

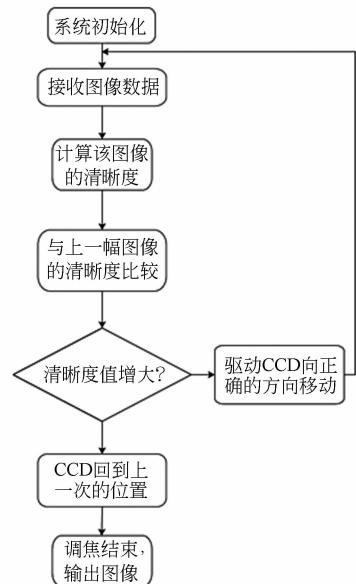


图 4 系统流程图

Fig. 4 Auto-focusing flow chart

3.2 对焦评价函数的选择

自动对焦算法是本系统软件部分的重点,而自动对焦算法的好坏在于对焦评价函数^[9]。对焦评价函数可以反应出图像对焦的程度,好的评价函数曲线应该有良好的灵敏度、稳定性和对焦精度。在采用自动对焦方法进行对焦测量时,对焦评价函数是实现该测量的关键。本工作在比较多种焦评价函数后选取以下两种对焦评价函数^[11]:

(1) 方差评价函数

理论上清晰的图像比模糊的图像具有更大的灰度级差异。所以,通过计算一幅图像的灰度值方差或标准差可以构造出一个方差函数,该方差函数即可作为图像清晰度的评价标准。当灰度方差算子取最大值时,该位置即为对焦位置。

对于一幅 $M \times N$ 像素的灰度图像,记 $g(x, y)$ 为图像在点 (x, y) 处的灰度值,为表述方便,整幅灰度图像也用 $g(x, y)$ 来表示,评价函数统一用 Φ 表示(以下同)。图像 $g(x, y)$ 的标准差 SD (Standard Deviation) 定义为:

$$\phi = SD = \left[\frac{1}{M \times N} \sum_x \sum_y (g(x, y) - \mu)^2 \right]^{1/2}, \quad (1)$$

其中: μ 为平均灰度值,由式(2)表示:

$$\mu = \frac{1}{M \times N} \sum_x \sum_y g(x, y). \quad (2)$$

对于相同的图像,图像很清晰时,其标准差 Φ 很大;当图像变的模糊时,其标准差变小。

(2) 拉普拉斯评价函数

拉普拉斯函数法是对图像进行二阶微分运算,其定义如下:

$$\nabla^2 g(x, y) = \frac{\partial^2 g(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 g(x, y)}{\partial y^2}. \quad (6)$$

二阶微分是根据不同的微分方法对应着不同的拉普拉斯算子:

$$\mathbf{L} = \frac{1}{6} \begin{pmatrix} 1 & 4 & 1 \\ 4 & -20 & 4 \\ 1 & 4 & 1 \end{pmatrix}, \quad (7)$$

对应的对焦品质评价的拉普拉斯法目标函数为:

$$\phi = \sum_x \sum_y | \mathbf{L} * g(x, y) |. \quad (8)$$

实验表明以上两种评价方法在对焦灵敏度上区别很大。其中拉普拉斯函数法在对焦清晰度和对焦离焦位置有最大的评价价值差,对焦评价曲线最尖锐,因此本文选择用拉普拉斯评价函数法作

为评价最佳对焦位置的评价函数。在开始对焦时,必须先决定搜索方向,拉普拉斯法在远离最佳对焦位置时评价价值变化过小,若以此做评估,可能会因为噪声干扰造成远离对焦位置的方向误判。而方差评价函数在较大的离焦范围内有很好的评价性能,尽管方差函数的曲线平滑,但计算速度快,因此选取方差函数来进行粗调焦。

3.3 图像拼接功能

考虑到本系统在显微镜下拍摄视野小和小视野下拍摄的图像显示信息少,不具备统计意义等问题,本文设计了多视野图像拼接模块以满足实验需求。

图像拼接技术是将一组相互间重叠部分的图像序列进行空间匹配对准,经重采样合成后形成一幅包含各图像序列信息完整的新图像的技术。同时在消除图像接缝的同时,也要保证拼接图像的质量不受损失。图像重叠区域的设置采取实验的方法得出,根据拼接效果试出最优重叠区域,当电机输入 1 400 脉冲信号时,拼接效果最好,此时平台移动 0.56 mm,即重叠区域大约是图像的一半。当继续增大重叠区域时,图像效果变化不明显,即此时为最优重叠区域。

其图像拼接的基本流程如图 5 所示。

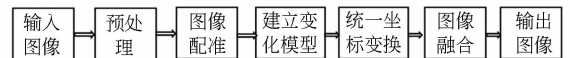


图 5 图像拼接流程图

Fig. 5 Flowchart of image stitching

本软件图像拼接功能是基于 OpenCV2.4.0 和 VC++ 平台的图像拼接,利用 OpenCV2.4.0 里的 Stitching 模块,实现图像拼接功能。根据使用者对图像的要求,可以设置图像阵列,从而改变图像大小。使用者设置好阵列数值,待获取图像后点击 Stitching 便可自动进行图像拼接。

4 实验及结果

4.1 评价函数比较实验

使用 25 倍物镜,光学分辨率为 $0.84 \mu\text{m}$ 、单次成像视野面积 1.1 mm 、图像像素为 1920×2560 。设计实验对几种常用的对焦评价函数进行比较,使用对焦系统采集了 300 幅大小为 1920

×2 560的图像。分别用 3 种函数进行处理分析,对评价结果进行归一化,得到如图 6 所示的评价函数性能比较图。

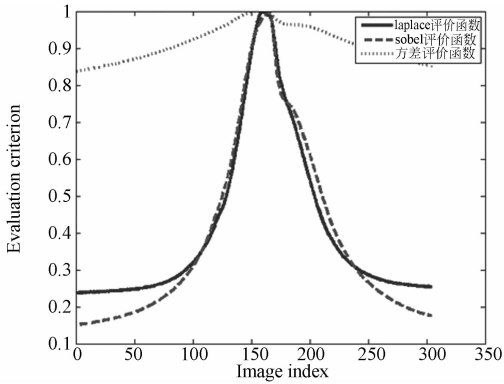


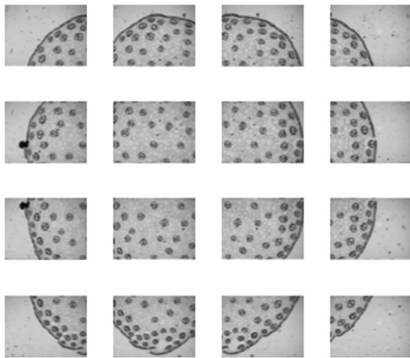
图 6 对焦评价函数性能的比较

Fig. 6 Contrast of evaluation results

从图 6 可以看出 3 种评价函数都有一维极值,图像在极值位置最清晰,因此 3 种评价函数都能实现对焦功能。方差函数、Sobel 函数、Laplace 函数 3 种评价函数在峰值点附件依次变大,可以证明其对焦性能也是依次增强。

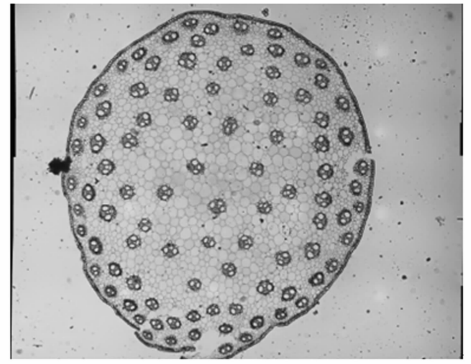
4.2 单次切片对焦及拼接实验

选取单子叶植物茎切片作为实验对象,实验



(a)4×4 图像阵列

(a) 4×4 image array



(b)单子叶植物茎切片完整图

(b) Stitching image of (a)

图 7 图像拼接实验

Fig. 7 Stitching result

设定了 4×4 图像拼接阵列。从系统初始位置开始计时,经过系统初始化、对焦采图、图像拼接结束完成单次对焦拼接实验共用 20 s。其中系统初始化用时 3 s,系统单次对焦采图用时 2 s(每个孔均需 2 s),图像拼接用时 15 s。图 7(a)为单子叶植物茎切片 4×4 图像阵列,其拼接后的结果如图 7(b)所示。

实验结果表明,该自动对焦显微成像系统可以完成自动对焦、图像拼接任务。单次测量时间在 20 s 左右。

5 结 论

本文根据药物筛选实验的需求,设计并研制了自动对焦显微成像系统。介绍了系统的独特结构和工作原理,比较了几种对焦评价函数的性能并提出了性能更优的评价方法。考虑到高倍显微镜下视野小对实验统计意义的影响,设计了多视野图像拼接等图像处理功能。实验结果表明,单次对焦采图时间为 2 s;4×4 图像阵列拼接时间为 15 s;完成单次测量孔板板孔实验时间为 20 s,满足医用自动对焦显微成像系统设计要求的。

参考文献:

[1] 毛邦福. 显微镜自动对焦系统的设计与优化[D]. 浙江:浙江大学,2006.
MAO B F. *The Design and Optimization of Microscope Autofocus System* [D]. Zhejiang: Zhejiang

University, 2006. (in Chinese)
[2] DANIEL R, RAMCHARAN J, ROGAKOU E, *et al.*. Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration, but is dispensable for post-integration repair [J]. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(44) : 45810-45814.

- [3] ROTHKAMM K, LOBRICH M. Evidence for a lack of DNA double-stand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses[J]. *Proc. Natl. Acad.*, 2003,100(9):5057-5062.
- [4] YU Y K, LU Y, YU Y N, *et al.*. γ H2AX: a bio-marker for DNA double-stranded breaks [J]. *Chin. J. Pharmacol Toxicol*, 2005,19(3):237-240.
- [5] 刁汇玲, 周春仙, 余艳柯, 等. 2-乙酰氨基苄诱导 γ H2AX 焦点的形成[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2006,2:131-137.
- DIAO H L, ZHOU CH X, YU Y K, *et al.*. 2-Acetylaminofluorene induces γ H2AX foci formation in CHL cells [J]. *Chin. J. Pharmacol Toxicol*, 2006,2:131-137. (in Chinese)
- [6] KIM S, JUN D H, KIM H J, *et al.*. Development of a high-content screening method for chemicals modulating DNA damage response [J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2011,16(2):259-265.
- [7] 尹鹏. 低信噪比环境下的自动对焦技术[D]. 济南: 山东大学, 2009.
- YIN P. *Autofocusing in Low Signal-Noise-Ratio Environment* [D]. Jinan: Shandong University, 2009. (in Chinese)
- [8] 段瑞玲, 段惠波, 李庆祥, 等. 基于图像处理的微装配自动调焦系统[J]. *光学精密工程*, 2006,14(3):468-472.
- DUAN R L, DUAN X B, LI Q X, *et al.*. Micro-assembly auto-focusing system based on image processing [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2006,14(3):468-472. (in Chinese)
- [9] 张舞杰, 杨义禄, 李迪, 等. 自动影像测量系统关键算法[J]. *光学精密工程*, 2007,15(2):294-301.
- ZHANG W J, YANG Y L, LI D, *et al.*. Key algorithms of automatic image measurement system [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2007,15(2):294-301. (in Chinese)
- [10] 陈立国, 王明月, 杨治亮, 等. 显微视觉快速自动调焦方法及实验[J]. *光学精密工程*, 2010,18(6):1361-1366.
- CHEN L G, WANG M Y, YANG ZH L, *et al.*. Fast autofocus method for microscopic computer vision [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2010,18(6):1361-1366. (in Chinese)
- [11] 王义文, 刘献礼, 谢晖. 基于小波变换的显微图像清晰度评价函数及 3-D 自动调焦技术[J]. *光学精密工程*, 2006,14(6):1063-1069.
- WANG W Y, LIU X L, XIE H, *et al.*. A wavelet-based focus measure and 3-D autofocus for microscope images [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2006,14(6):1063-1069. (in Chinese)

作者简介:



韩西达(1988—),男,黑龙江哈尔滨人,主要从事精密机械设计、机电一体化系统、图像处理与视觉的研究。E-mail: hanxida123@163.com



王敏(1954—),女,安徽宿州人,副教授,从事光学和材料方面的教学和研究工作。E-mail: wangmin@tsinghua.edu.cn



黄强(1988—),男,安徽马鞍山人,硕士研究生主要从事光机系统设计,图像处理算法的研究。E-mail: huang-q10@mails.tsinghua.edu.cn

导师简介:



何永红(1971—),男,安徽安庆人,博士,教授,1994年于安徽医科大学获得学士学位,1999年、2002年于华南师范大学分别获得硕士、博士学位,主要研究方向为生物光子学、光学检测、光学成像等。E-mail: heyh@sz.tsinghua.edu.cn



周超英(1959—),女,湖北人,教授,博士生导师,本科毕业于华中科技大学,曾到英国剑桥大学工程系做访问学者,后到帝国理工学院航空系攻读博士,1994年获博士学位。主要从事计算流体动力学、流动诱发振动分析与控制、分离流及旋涡流的数值模拟。其研究领域在海洋工程,建筑,桥梁以及飞机工业有着广泛的应用背景。E-mail: cyzhou@hit.edu.cn