

文章编号 1004-924X(2016)06-1257-07

激光共焦显微光束的偏转扫描

赵维谦*, 任利利, 盛 忠, 王 允, 邱丽荣
(北京理工大学 光电学院, 北京 100081)

摘要: 为了提高激光共聚焦系统的扫描速度, 本文提出一种逐场扫描的场同步扫描方法。构建了激光共焦显微系统, 将美国 THORLABS 公司的 GVS002 型二维检流计振镜应用于该系统, 根据光学系统参数以及扫描范围要求计算振镜的整场扫描波形。借助 NI 公司的 PCIe6353 多功能数据采集卡, 输出行同步的扫描波形, 同时, 对共焦显微系统共焦位置上针孔处的光强信号进行采集, 先后扫描一幅 256×256 和 512×512 的图像, 记录扫描图像和成像时间; 然后, 在相同的硬件结构下, 以场同步的方式输出扫描波形, 记录扫描图像和成像时间。实验结果表明: 场同步方式扫描 256×256 图像的速度可提高 10 倍, 扫描 512×512 图像的速度可提高 5 倍, 且满足共焦显微成像的清晰、抗干扰能力强等要求。与行同步扫描方法相比, 场同步扫描方法可以消除行与行之间转换的停留时间, 在不改变硬件的情况下大幅提高扫描速度。

关键词: 共焦显微; 二维振镜; 场同步; 板卡控制

中图分类号: TN409; TH742 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20162406.1257

Beam deflection scanning for laser confocal microscopy

ZHAO Wei-qian*, REN Li-li, SHENG Zhong, WANG Yun, QIU Li-rong

(School of Optoelectronics, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

* Corresponding author, E-mail: alotrabbits@163.com

Abstract: To improve the scanning speed of the laser confocal system, a field synchronous scanning method was proposed. The laser confocal microscopy system was implemented with a GVS002 two-dimensional galvanometer from the THORLABS Company. The scanning waveforms of galvanometer were calculated in accordance with the parameters and scanning range of the optical system. The synchronous scanning waveform was output from a PCIe6353 multi-functional data acquisition card of NI Company. Meanwhile, it collected the optical intensity signals at the pinhole at the focus of the confocal microscopy system and scans a 256×256 image and a 512×512 image successively, recording the scanning images and imaging time; then, the scanning waveforms were output in field synchronization under the same hardware structures, recording the scanning images and imaging time. The experimental results show that the speed of the 256×256 image scanning through field synchronization can be increased by 10 times and the speed of the 512×512 image scanning can be increased by 5 times. In addition the field synchronous scanning can meet such requirements of the confocal microscopy imaging as the clearness and strong capacity of resisting disturbance. Compared with the line synchronization scanning, the field synchronous scanning can eliminate the retention time during the line to line

收稿日期: 2016-03-22; 修订日期: 2016-04-12.

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金资助项目 (No. 51422501); 国家自然科学基金面上项目 (No. 61475020)

conversion and significantly improve the scanning speed without changing the hardware.

Key words: Confocal microscopy; Two-dimensional galvanometer; Field synchronization; Board card control

1 引言

激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM)具有独特的光学层析和高分辨成像等优势,是研究微细结构的有效技术手段和必备的大型科学仪器,广泛用于微电子、材料、工业精密检测和生物医学等领域^[1-5]。LSCM 基于点照明、点探测的工作原理,具有探测零视场,只能采集单点数据的特点,所以需要配备扫描系统才能实现二维成像,这严重制约其应用。扫描系统是 LSCM 的重要组成部分,现有的扫描方式分为机械台扫描和光束扫描两类。机械台扫描共聚焦显微镜采用单点机械扫描的形式,其扫描效率低、光能利用率差且扫描过程中易受振动影响,因此很难用于快速的三维测量场合。为解决共聚焦显微镜成像速度慢、视场小的缺点,光束扫描共聚焦检测技术成为了当前的研究热点。

目前,基于点扫描的激光共聚焦显微镜多采用双振镜扫描机构,两个振镜转轴正交放置,一个振镜实现快速行扫描,另一个振镜实现慢速帧扫描^[6],具有响应频率高、定位速度快等优点,并已广泛应用于高速扫描系统中^[7-9]。振镜行扫描和帧扫描的匹配控制,是实现样品二维高速扫描的关键^[10-14]。然而,现有的行同步控制方式的扫描速度较慢,制约了 LSCM 的成像速度,所以在原有硬件基础上提高扫描速度及仪器性能是当前研究的热点问题。本文提出了一种基于场同步原理的扫描控制方法,搭建了 LSCM 的二维振镜扫描系统。在 Visual Studio 2010 平台上编写控制和采集程序,在共聚焦显微测量系统上先后采用行同步和场同步两种扫描方式,分别扫描像素为 256×256 和 512×512 的图像,比较扫描速度和成像质量。结果表明,该方法可以消除扫描过程中换行同步时间,在不改变硬件条件的情况下将扫描速度提高 5~10 倍,满足共聚焦显微成像清晰稳定、抗干扰能力强的要求。

2 快速扫描系统的构成及其工作原理

2.1 振镜扫描系统的硬件构成

如图 1 所示,振镜扫描系统主要由二维振镜、扫描透镜、补偿透镜和显微物镜构成。其中,扫描透镜和补偿透镜共焦面,构成望远系统,起到收集光束的作用,使光束在补偿透镜后方的孔径光阑处只改变传播方向,而光束的中心位置则保持不变,从而实现物面均匀照明。

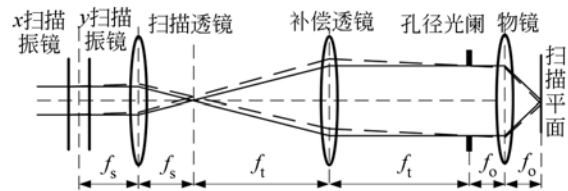


图 1 振镜扫描系统原理

Fig. 1 Principle of galvanometer scanning system

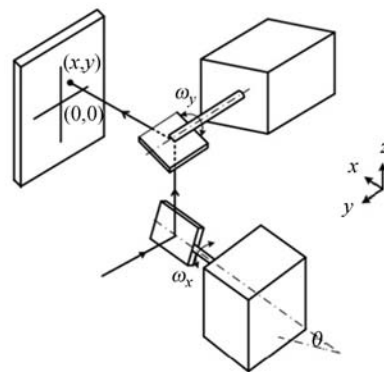


图 2 振镜结构

Fig. 2 Schematic diagram of galvanometer

图 2 所示为二维振镜的机械结构。二维振镜主要由两片转动轴互相垂直的反射镜组成,出射光束的方向随反射镜的转动而改变。根据振镜扫描系统的机械结构,运用构建的数学模型,可以得到投射点坐标与振镜角度的关系为^[15]:

$$\begin{cases} y = -\frac{f_o}{f_t} f_s \tan 2\omega_y \\ x = -\frac{f_o}{f_t} \left(e \tan 2\omega_x + f_s \frac{\tan 2\omega_x}{\cos 2\omega_y} \right) \end{cases}, \quad (1)$$

其中: e 是二维振镜中两个反射镜之间的距离, f_o 是物镜焦距, f_s 表示扫描透镜焦距, f_t 表示补偿透镜焦距, ω_x, ω_y 分别表示 x, y 振镜的偏转角度。

2.2 振镜扫描系统的工作原理

检流计振镜是一种矢量扫描设备,其基本原理如下:通电线圈在磁场中产生转矩,但与旋转电机不同,通过机械扭簧或电子方法其转子上会产生复位力矩,力矩正比于转子偏离平衡位置的角度。当线圈通入一定的电流,转子偏转一定的角度时,电磁力矩与回复力矩相等,所以振镜不能旋转,只能偏转,偏转角度与电流呈正比,再经过驱动电路后,振镜的偏转角度与控制电压信号呈正比。

本文中振镜扫描控制系统采用 PC 机作为上位机,其主要功能是计算振镜的扫描波形,通过 USB 接口与多功能数据采集卡进行通信,原理框图如图 3 所示。多功能数据采集卡将 PC 机算得的振镜波形通过 D/A 转换及放大电路变换成模拟电压信号,用以控制 X,Y 振镜运动。在振镜运动的同时,多功能数据采集卡采集共焦显微镜共焦处的光强信号,将模拟电压信号通过 A/D 转换为数字信号,并通过 USB 接口读取到 PC 端。PC 端对信号进行处理并显示。

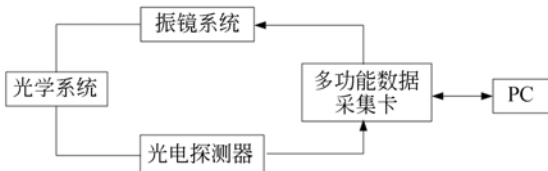


图 3 振镜控制系统原理

Fig. 3 Schematic principle of galvanometer control system

3 振镜控制方法

3.1 扫描波形

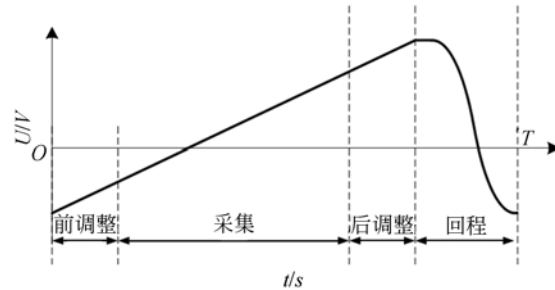
共焦显微的二维扫描一般需要对被测样品微区进行均匀等间隔的扫描,根据式(1)投射点和振镜偏角的关系以及振镜偏角和所加电压的关系,可以得到样品上指定点 (x, y) 对应的振镜偏转控制电压,即有:

$$U_x = -\frac{1}{2} \arctan \left[\left(e + f_s \sqrt{1 + \left(\frac{f_t y}{f_o f_s} \right)^2} \right) \frac{f_t}{f_o f_s} x \right] \quad (2)$$

$$U_y = -\frac{1}{2} \arctan \frac{f_t}{f_o f_s} y$$

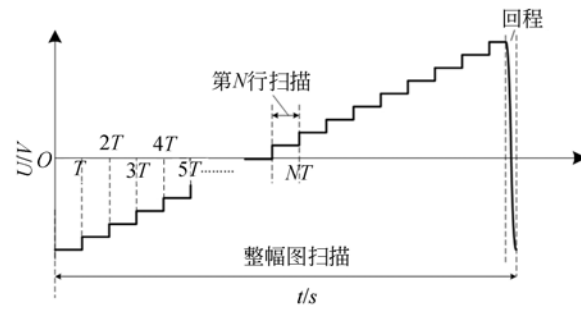
振镜的控制信号除了扫描信号,还需要加上

前后调整以及回程信号。前后调整可以实现扫描和采集的同步,平滑的回程阶段可以减小振镜运动方向改变瞬间产生的冲击,起到保护振镜的作用。振镜的扫描波形如图 4 所示。



(a) x 方向振镜的扫描驱动波形

(a) Scanning drive waveform of x -mirror



(b) y 方向振镜的扫描驱动波形

(b) Scanning drive waveform of y -mirror

图 4 二维扫描振镜驱动波形

Fig. 4 Waveforms of galvanometer

图 4(a)为 y 方向振镜偏角为 0 时, x 方向振镜扫描一行的扫描波形,图 4(b)所示为 y 方向振镜的整场扫描波形。对比这两幅图可以看出, y 方向振镜一个电压值对应 x 方向振镜一个周期,逐行扫描。

3.2 场同步基本原理

扫描过程包括振镜扫描、信号采集和实时显示及数据存储等方面。其中振镜偏转和信号采集同时进行,即数据采集卡需要同时输入和输出信号,这样就需要同步信号,保障采集到有效采集段的信号。现有技术大多采用行同步方法,即每行进行一次同步,该方法的同步效果稳定。

行同步时序图如图 5 所示。图中可以看到每输出一个行同步信号,板卡输出一行的数据,输出完毕后板卡就暂停输出和采集,并且行同步的耗时是有效扫描时间的数倍。

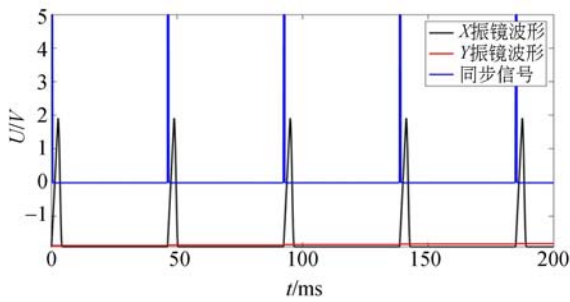


图 5 行同步时序图

Fig. 5 Line synchronous timing sequence

场同步技术是每场进行一次同步,其扫描输出波形如图 6 所示。每场发出一个同步信号,这种工作模式下,振镜的波形连续输出,行与行之间不存在停留时间,这可以消除扫描过程中因每行同步所浪费的时间,而且扫描的行数越多,节约的时间就越多。在这种模式下,程序已知每行数据点数,板卡的输出和采集采用相同的点采样率,且扫描过程中采集所有点的光强数据。第一行由同步信号保障采集到有效采集段,其余行有效数据点序号只需在前一行点序号基础上增加每行的数据点数,即可保障有效信号的采集且成像不发生错位变形。

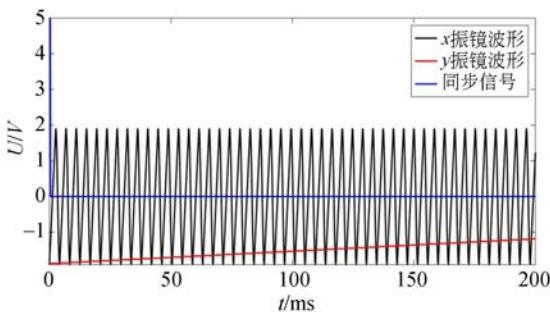
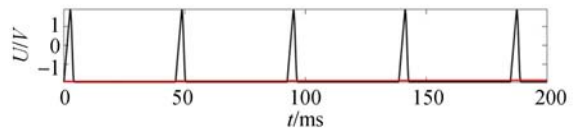


图 6 场同步时序图

Fig. 6 Frame synchronous timing sequence

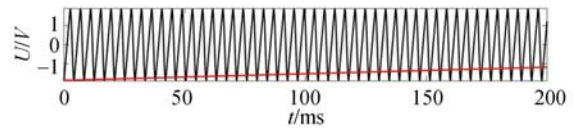
3.3 行同步与场同步的对比仿真

为了对比两种方式的扫描速度,对两种工作模式下的输出波形时序图进行了 matlab 仿真。图 7 所示为扫描 512 pixel×512 pixel 图像时的部分波形。图中可以看出,在 200 ms 内,行同步工作模式下仅能扫描 5 行,每扫描一行都需要停留一段时间,并且扫描暂停时间是振镜扫描时间的数倍,而场同步模式下可以扫描大约 50 行。两种模式下,每扫描一行的实际扫描时间一样,只是在行同步模式多了一段停留时间,这段时间即是制约行同步方法扫描速度的根本原因。



(a)行同步模式

(a)Line synchronous pattern



(b)场同步模式

(b)Frame synchronous pattern

图 7 不同同步模式输出波形对比

Fig. 7 Comparison of output waveforms in different modes

场同步技术可以有效地提高扫描速度,但是一般情况下,数据采集卡的缓存容量有一定的限制,不能一次将一场的波形完整存储下来进行重复输出,所以必须解决场扫描的缓存限制。这里提出采用数据动态写入板卡缓存的方法,设置板卡的采样点输出模式为非重采样模式,这种模式下缓存数据不可重复输出。编写程序动态向缓存内写波形数据,这样既可以消除行同步方法的暂停时间,提高扫描速度,又可以突破数据采集卡缓存空间有限的限制,降低板卡缓存容量的要求。

4 测量实验与结果

4.1 扫描实验

基于二维振镜扫描技术的共焦显微系统如图 8 所示,设置板卡点采样率为 0.2 MS/s,先后进行行同步和场同步扫描成像。

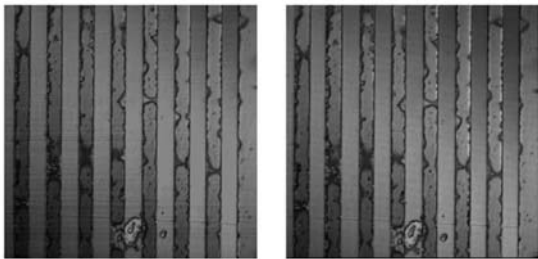


图 8 差动共聚焦显微镜

Fig. 8 Differential confocal microscopy

图 9(a)和 9(b)分别是行同步和场同步方法采集得到的像素为 256×256 的图像;图 10(a)和 10(b)分别是行同步方法和场同步方法采集得到的像素为 512×512 的图像。4 幅图像采集的是同一样品的同一区域。

与图 10 相比,图 9 中存在横向波纹,即行与行之间存在噪声。借助 matlab 平台,使用 laplace 算子对图 9 中的两幅图像进行清晰度评价。



(a)行同步 (b)场同步
(a) Line synchronous (b) Frame synchronous

图 9 256×256 采集图像
Fig. 9 256×256 images

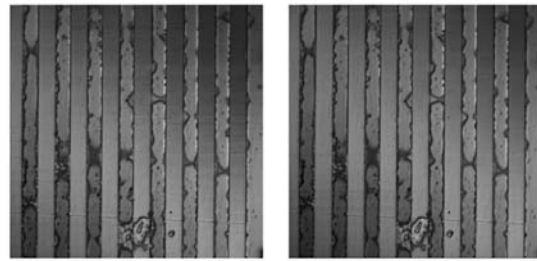
$$I(x, y) = \begin{bmatrix} g(x-1, y-1), g(x, y-1), g(x+1, y-1) \\ g(x-1, y), g(x, y), g(x+1, y) \\ g(x-1, y+1), g(x, y+1), g(x+1, y+1) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} -1, -4, -1 \\ -4, 20, -4 \\ -1, -4, -1 \end{bmatrix}. \quad (5)$$

Laplace 算子检测图像清晰度的方法属于边缘梯度检测,计算数值越大,说明图像清晰度越高。将图 9 两幅图像代入式(4),得到评价函数归一化的值分别为 0.470 7 和 0.547 8,说明图 9(b)比图 9(a)清晰。

为了比较扫描速度,进行多次实验,实验记录了多功能数据采集卡的相同点采样率为 0.2 MS/s 时,不同像素图像在不同同步方式下的扫描时间,实验结果如表 1 所示。

表 1 行同步与场同步扫描不同图像耗费的采集时间
Tab. 1 Comparison of measuring time of different images with line synchronous and frame synchronous

像素	同步方法	时间/s
256×256	行同步	12
256×256	场同步	1.2
512×512	行同步	24
512×512	场同步	4.5



(a)行同步 (b)场同步
(a) Line synchronous (b) Frame synchronous

图 10 512×512 采集图像
Fig. 10 512×512 images

评价采用的 laplace 算子为:

$$\begin{bmatrix} -1, -4, -1 \\ -4, 20, -4 \\ -1, -4, -1 \end{bmatrix}. \quad (3)$$

整幅图的清晰度公式为:

$$F = \frac{\sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N I_{xy}^2}{M \times N}, \quad (4)$$

其中:

$$\begin{bmatrix} g(x-1, y-1), g(x, y-1), g(x+1, y-1) \\ g(x-1, y), g(x, y), g(x+1, y) \\ g(x-1, y+1), g(x, y+1), g(x+1, y+1) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} -1, -4, -1 \\ -4, 20, -4 \\ -1, -4, -1 \end{bmatrix}. \quad (5)$$

由表 1 可知,与行同步方法相比,扫描一幅像素为 256×256 的图像,场同步方法将扫描时间从 12 s 缩短到 1.2 s;扫描一幅像素为 512×512 的图像,场同步方法将扫描时间从 24 s 缩短到 4.5 s。

5 结 论

本文通过使用 NI6353 多功能数据采集卡的非重采样工作模式输出振镜控制波形,实现了振镜的场同步扫描控制,通过对已知尺寸的样品进行扫描成像,对比了行同步和场同步的成像速度以及成像质量。实验结果显示:在相同的硬件条件下,与行同步工作模式相比,扫描一幅像素为 512×512 图像,场同步工作模式可以将速度提高 4 倍;扫描一幅像素为 256×256 的图像,可以将扫描速度提高 9 倍,且成像清晰。由此表明,场同步扫描模式能够满足共焦显微成像快速清晰、抗干扰能力强的要求。

参考文献:

- [1] 邱丽荣, 李佳, 赵维谦, 等. 激光共焦透镜曲率半径测量系统[J]. 光学精密工程, 2013, 21(2): 246-252.
QUI L R, LI J, ZHAO W Q, *et al.*. Laser confocal measurement system for curvature radii of lenses [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21(2): 246-252. (in Chinese)
- [2] 郭俊杰, 邱丽荣, 王允, 等. 用于惯性约束聚变靶丸测量的激光差动共焦传感器[J]. 光学精密工程, 2013, 21(3): 644-651.
GUO J J, QIU L R, WANG Y, *et al.*. Laser differential confocal sensor for ICF capsule measurement [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21(3): 644-651. (in Chinese)
- [3] 肖卉, 张德艳, 范忠义. 感染性角膜炎 466 例共焦显微镜检查结果临床分析[J]. 国际眼科杂志, 2014(10): 1825-1827.
XIAO H, ZHANG D Y, FAN ZH Y. Clinical features and confocal microscopic imaging characteristics of 466 cases with infectious keratitis [J]. *International Eye Science*, 2014(10): 1825-1827. (in Chinese)
- [4] 宋树权, 左敦稳, 赵世田. 基于激光扫描共焦显微技术的刀具刃口精密测量[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2014(7): 86-90, 103.
SONG SH Q, ZOU D W, ZHAO SH T. Precision measurement of cutting edge based on laser scanning confocal microscopy [J]. *Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition*, 2014(7): 86-90, 103. (in Chinese)
- [5] HUNTER J J, COOKSON C J, KISILAK M L, *et al.*. Characterizing image quality in a scanning laser ophthalmoscope with differing pinholes and induced scattered light[J]. *Journal of the Optical Society of America A-Optics Image Science and Vision*, 2007, 24(5): 1284-1295.
- [6] 胡茂海, 杨晓春. 共聚焦显微镜激光高速扫描控制系统设计及实现[J]. 应用光学, 2011, 32(4): 797-800.
HU M H, YANG X CH. High-speed laser scanning control system for confocal microscopy [J]. *Journal of Applied Optics*, 2011, 32(4): 797-800. (in Chinese)
- [7] 林晓东, 蔡红红, 胡居广, 等. 振镜扫描光谱仪用于托卡马克等离子体谱线轮廓测量[J]. 光电子·激光, 2004, 15(4): 502-504.
LIN X D, CAI H H, HU J G, *et al.*. Measurement of spectral profiles in Tokamak plasma with an optical scanner spectrometer [J]. *Journal of Optoelectronics • Laser*, 2004, 15(4): 502-504. (in Chinese)
- [8] 黄冬林, 杨永强. 基于振镜扫描的激光点焊形貌分析[J]. 应用激光, 2009, 29(3): 199-202, 228.
HUANG D L, YANG Y Q. An experimental study on spot shape based on galvanometer scanning laser spot welding [J]. *Applied Laser*, 2009, 29(3): 199-202, 228. (in Chinese)
- [9] 李旭东, 崔磊, 赵慧洁, 等. 双振镜点扫描三维形貌测量系统[J]. 光学精密工程, 2010, 18(7): 1648-1653.
LI X D, CUI L, ZHAO H J, *et al.*. Three-dimensional shape measurement system based on dual oscillating mirrors with point scanning [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2010, 18(7): 1648-1653. (in Chinese)
- [10] 张平, 陈德, 吴震, 等. 共焦激光扫描荧光显微镜的扫描系统研究[J]. 应用光学, 1995(3): 33-38.
ZHANG P, CHEN D, WU ZH, *et al.*. Research on scanning system of confocal laser scanning fluorescence microscope [J]. *Applied Optics*, 1995(3): 33-38. (in Chinese)
- [11] 李鹏, 范璐璐. 小型化振镜扫描器电路设计[J]. 激光与红外, 2009(11): 1193-1197.
LI P, FAN L L. Circuit design of miniature vibrating mirror scanner [J]. *Laser and Infrared*, 2009(11): 1193-1197. (in Chinese)
- [12] 陈群. 双振镜激光扫描系统的 FPGA 接口板设计[D]. 成都: 电子科技大学, 2015.
CHEN Q. *The Design of FPGA Interface Board of Dual Galvanometer Scanning System* [D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2015. (in Chinese)
- [13] 徐亮亮. 二维激光振镜扫描控制系统设计[D]. 长春: 长春理工大学, 2012.
XU L L. *Design of Two Dimensional Laser Scanning Control System* [D]. Changchun: Changchun University of Science and Technology, 2012. (in Chinese)

- Chinese)
- [14] HAYAKAWA T, WATANABE T, ISHIKAWA M. Real-time high-speed motion blur compensation system based on back-and-forth motion control of galvanometer mirror [J]. *Optics Express*, 2015, 23(25): 31648-31661.
- [15] GAO C, LIU D, ZHAO W. The distortion analysis and correction of two-dimensional scanning system in laser differential confocal microscopy[J]. *SPIE*, 2012, 8857(1): 835-838.

作者简介:



赵维谦(1966—),男,新疆伊宁人,教授,博士生导师,1993年、2003年于哈尔滨工业大学分别获得硕士、博士学位,主要从事光学测量领域的研究。
Email:alotrabbits@163.com



任利利(1992—),女,河南洛阳人,硕士研究生,2014年于北京理工大学获得学士学位,主要从事共焦显微扫描技术方面的研究。E-mail: renlili629@126.com

(版权所有 未经许可 不得转载)