

激光扫描共焦荧光显微镜的电子控制系统研究*

张 平 向际鹰 吴 震

(华中理工大学光电子工程系, 武汉, 430074)

摘要: 介绍了激光扫描共焦荧光显微镜的电子控制系统, 为了提高激光扫描器的定位精度, 在系统中提出采用基于闭环像素时钟发生器的检流计振镜所固有的扫描非线性失真补偿方案, 减少输出图象的枕形畸变, 实现行扫描空间位置的均匀性。在以细分梯形波电流驱动反应式步进电机情况下, 根据实测 $\theta-i$ 曲线, 用反插法求得与步进电机运行非均匀性相补偿的相电流波, 从而获得在小电流情况下高角度均匀的步进电机细分运行特性。

关键词: 激光扫描 电子控制系统 帧扫描 行扫描

Study on electronic control system for laser scanning confocal fluorescence microscope

Zhang Ping, Xiang Jiying, Wu Zhen

(Dept. of Optoelectronic Enging, HUST, Wuhan, 430074)

Abstract: The electronic control system for laser scanning confocal fluorescence microscope is described in this paper. For improvement of the positing precision of laser scanner, a high accuracy scanning image sampling method, based on pixels clock generator, is adapted to correct the non-linear output image pincushion distortion caused by the rotational inertial of the mechanical parts of laser scanner. In order to detect the scanning spatial position under the case of step motor driving, according to the experimentally measured $I-\theta$ curve, we can get the phase current wave form which compensates the non-linearity of $I-\theta$ curve by means of interpolation method. Therefore, the step motor can operate with high angle uniformity under the condition of low current mode.

Key words: laser scanning electronic control system frame scan line scan

一、引 言

激光扫描共焦荧光显微术是将激光共焦扫描技术和荧光成象技术结合在一起, 激光共焦

* 国家自然科学基金资助。

参 考 文 献

- 1 Wall K F, Schulz P A, Aggarwal R L *et al.* IEEE J Q E, 1993; 29(6): 1505~ 1514
- 2 Seidel S. Opt & Quant Electron, 1995; 27: 625~ 632
- 3 曾秉斌, 徐德衍, 王润文. 应用激光, 1994; 14(3): 104~ 108

* * *

作者简介: 冯国英, 女, 1970 年出生。硕士, 博士研究生。主要研究方向为新型和高功率固体激光器, 光束传输变换和光学设计等。

扫描术具有三维超分辨率的成象特性,可观察反射物的表面形貌,和荧光成象技术结合,就可直接观察试样的内部结构,不同深层的层析图象经微机处理后可显示出超分辨率的三维结构,这在生物医学科学领域可得到广泛的应用。

为了能探测到微弱的被激发的荧光,系统设计和研制中,必须考虑采用高质量的扫描成象光学系统,同时还必须采用高精度的电子控制系统和特殊的图象处理系统,本文着重研讨电子控制系统及提高扫描精度的方法。

二、激光扫描共焦荧光显微系统综述

研制的实验装置是在重庆光仪厂 XQF 型显微分光光度计基础上改制而成的, Ar^+ 激光器

发出波长为 488nm, 514nm 的激光,经扩束后进入扫描光路,经 x, y 两方向的振镜扫描及 z 方向工作台扫描形成三维扫描,扫描光束经光学系统聚焦于试样上,由试样发出的荧光经光学共焦成象系统由光电倍增管接收。

电子控制系统由主机、扫描控制单元、数据采集及相应执行部件组成,如图 1 所示。主机采用带 387 协处理器的 386 微机,可快速地进行三维荧光图象处理,采用 386 主板的 8 位 I/O 扩展槽接数据采集板和扫描控制单元,可对扫描显微镜的工作方式和工作参数进行设置,保证系统正常工作以及生成三维图象。该系统的电路框图可见图 1 所示,主要由工作台步进电机功放电路、扫描驱动及控制电路、光电探测及信号处理、数据采集电路构成。

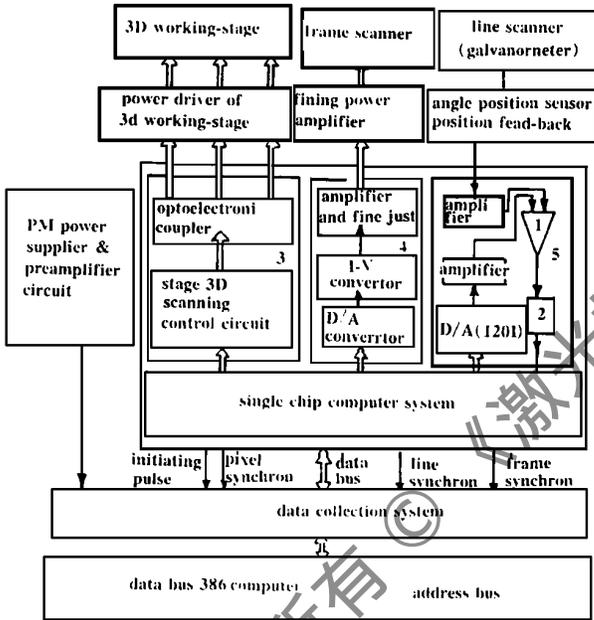


Fig. 1 Electric circuit block diagram of experimental system of LSCFM
1—comparator 2—electric level exchanger 3—stage scan control module 4—fining control module 5—scanner non-linear error compensation module

三、电子控制系统

1. 工作台步进电机的功放电路

工作台三维运动采用三台 36BF003 型步进电机,其内阻为 1.5Ω ,额定工作电流为 1.5A,采用三相六拍工作方式,用 MCS-51 单片机进行 I/O 的扩展,电路中采用高效光电耦合器件 $\Delta N25$ 进行光电隔离,采用集成功率芯片 TWH8751 实现功率放大。

2. 扫描驱动及控制电路

由于对扫描图象的精度有较高的要求,要求各扫描点之间定位误差小于象素间隔的 10%,必须考虑用于行扫描的检流计振镜的非线性失真,消除使图象产生枕形失真的影响,同时还须考虑实现帧扫的由细分电流驱动的反应式步进电机运行的均匀性,以便获得均匀的角度

度增量。

为补偿激光扫描器的非线性误差,在系统中我们采用基于闭环象素时钟发生器的扫描图象采集方案^[1],如图1所示的电路中,用一个单片机,D/A,比较器等部件组成的闭环系统来产生象素时钟。采用DA1210的输出作为标准电平信号与检流计振镜输出的位置反馈信号相比较,比较结果由单片机8031检测,并对DA重新置数,比较器的输出经逻辑变换后还被作为触发信号用以启动数据采集系统的AD转换。通过时间间隔的非均匀性来弥补空间间隔的非均匀性。从而保证采样点在空间位置上的均匀性。经实验测定,在行频取150Hz,采样密度为512点/行时,整体非线性误差由5%下降到0.1%。

研制的实验装置中采用36BF003型步进电机作为帧扫描驱动元件,采用三相六拍工作方式,最小步距为1.5°,反光镜转角为±4.6°,采集512×512象素时,每相邻两扫描行之间的角距离仅为0.018°,这小于步进电机的步距角。为此,在反光镜与步进电机之间加一减速进行机械细分,并同时还进行电细分,其值可用下式进行计算:

$$9.2^\circ / (1.5^\circ / \text{步}) \times (n_{\text{电细分}} / \text{步}) \times m_{\text{机械细分}} = 512 \quad (1)$$

当步进电机进行16细分时,则减速器传动比 m 为5.22(此值不宜太大,否则在机械设计制造较难满足精度要求)。

传统的步进电机细分控制可采用量化后的梯形波作为细分驱动的电流量,但大量的实验表明,在细分级数较高时,不能获得均匀的角度增量。我们提出在欠电流情况下应用抛物线对反应式步进电机峰值转矩——电流关系的曲线进行近似,

用反插值算法求得与运转非均匀性相补偿的电流波形,获得了欠电流高精度的步进电机细分运行特性^[2]。我们对三相反应步进电机36BF003通以阶梯波电流,进行16细分,将测得的实际转角绘成曲线,如图2所示。在曲线的前半部分, i_1 保持最大,而 i_2 均匀递增。在曲线的后半部分, i_2 保持最大值,而 i_1 均匀递减。两条曲线分别对应 $i_{\text{max}} = 1.2\text{A}$ 和 $i_{\text{max}} = 0.8\text{A}$ 的情况,对曲线进行分析可得出如下结论:

- (1) θ 与 i 不呈线性关系,即均匀的电流阶梯不能得到均匀的角度增量。
- (2) 相电流最大值(i_{max})越小则非线性越严重。
- (3) $i-\theta$ 不是中心对称曲线,即图中 o 点对应的角度并非总转角的一半。

为得到均匀的细分步距,用实测的 $i-\theta$ 曲线进行反插值以得到修正后电流波形曲线,如图3所示。图4是二者的实测步距精度比较,补偿前(输入梯形波时)相对误差达100%,补偿之后仅为6%,反映到空间距离上,仅相当于试样上的0.01 μm 误差。

3. 光电转换电路

光电转换电路主要功能是完成图象从光强信号转换成电信号。该系统采用 Ar^+ 激光器作光源,发光波长488nm,514nm,生物体被激发的荧光波长为520~550nm,由于生物体被激发

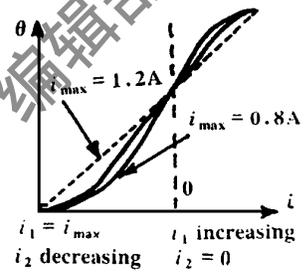


Fig. 2 θ - i relationship



Fig. 3 Photograph of compensated current curve

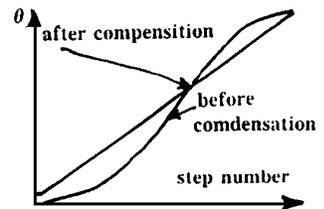


Fig. 4 Step precision comparison before and after compensation

的荧光很微弱,故选用 GDB-223 型光电倍增管作光电探测器件,其主要技术指标为:光谱响应范围为 300~670nm,阳极光照灵敏度 30A/lm,暗电流典型值为 1nA,电流增益为 3.5×10^5 ,采用 DG700 型高压稳压电源为其供电。

由于生物体所激发的荧光极为微弱,光电倍增管所输出的经过倍增后的信号需进一步放大,为得到高信噪比的输出信号,使用低噪声的前置放大器 OP27,采用两级放大,第一级为一个电流-电压变换器,将若干纳安的光生电流转换成毫伏级电压信号,第二级为增益可调的电压放大器,将输入信号放大至 2V 左右,以供主机数据采集系统进行采集。

4. 数据采集系统

数据采集系统将模拟信号转换为数字信号送入微机内存中存贮,并完成主控机与从控机之间的通讯功能。

自行设计制成的数据采集系统采用高速 8 位 AD7820 转换器,其转换时间为 $1.6\mu\text{s}$,该器件内有采样保持。用像素时钟发生器输出的时钟脉冲驱动 AD 转换,每一个时钟脉冲触发一次 AD 转换,由主机读取转换结果,将其存于内存中以供进一步处理和显示。

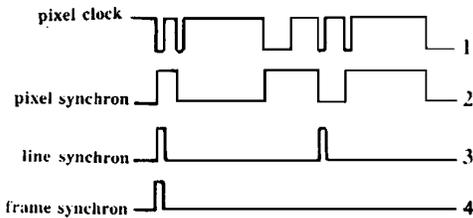


Fig. 5 Time sequence relationship of synchronous signal

上述主要信号时序关系见图 5 所示。

四、实验结果

采用本文所述的实验装置对两种采样方案进行了比较,一种利用计算机的内部精密时钟对输入信号进行等时采样(即常规采样方案),另一种用像素时钟发生器进行补偿后对信号进行不等时采样,可得到如图 6 所示结果。由图可见采用本文所述的补偿方案,采样点分布呈良好的线性,其整体非线性误差仅为 0.1% 左右。

主机和从机之间采用异步方式互相联络,用主机对扫描进行计数并发送帧同步信号,而从机对扫描点计数并发同步信号,这样,即使因偶然因素造成主从机之间的同步失调,也不会涉及到整幅图象。

主机采用查询方式对图象信号进行读取,引入像素同步信号正确判断采样时刻。

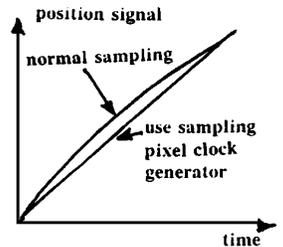


Fig. 6 Precision comparison of sampling schemes

参 考 文 献

- 1 Lijeberg A. Opt Engng, 1988; 27(9): 818~822
- 2 陈 德,张 平,向际鹰 *et al.* 光学仪器, 1994; 16(5-6): 1~6

作者简介:张 平,女,1946 年出生。副教授。现主要从事光电系统设计和信息处理技术研究。

收稿日期:1996-06-19