

# 显微镜的快速自动对焦算法<sup>\* \*</sup>

苗立刚<sup>\*\*</sup>, 轩 波, 彭思龙

(中国科学院自动化研究所, 国家专用集成电路设计工程设计研究中心, 北京 100080)

**摘要:** 针对平面样品的大规模显微图像采集, 提出了一种基于预测的快速自动对焦算法。首先, 利用相邻图像的对焦位置估计当前图像的对焦位置, 并在其附近做微小调整即可得到最佳对焦位置, 从而避免对焦评价曲线的多峰干扰。其次, 利用阈值分割方法选择对焦窗口以消除背景干扰, 使对焦评价函数满足无偏性。该算法大大减少了自动对焦所需要采集的图像数量, 对焦速度、精度以及鲁棒性均有明显的提高。

**关键词:** 自动对焦 对焦函数; 线性预测; 对焦窗口

**中图分类号:** TH742 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-0086(2007)01-0009-04

## Fast Autofocusing Algorithm in Microscopy

MIAO Li gang<sup>\*\*</sup>, XUAN Bo, PENG Si long

(National ASIC Design Engineering Center, Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** A fast autofocusing algorithm based on prediction is proposed for the large scale microscopic images acquisition of flat preparations. Firstly, the method uses the in focus positions of adjacent images to estimate that of current images, and then makes tiny adjustment at the estimated position to get accurate in focus position, thus, avoids the local maxima problem of focusing curves. Secondly, the global threshold method is used to select focusing window adaptively, and it can eliminate the background interference and ensure the accuracy of focusing curves. This algorithm decreases greatly the number of images that are acquired for autofocusing, and increases the speed, accuracy and robustness of the microscopic autofocusing system.

**Key words:** autofocusing; focus function; automatic microscope; linear prediction; focusing window

## 1 引 言

自动对焦是现代光学成像系统的一项重要技术。传统的主动对焦技术主要采用测距原理, 根据所测距离驱动电机调节镜头至聚焦位置, 由于需要额外的测距设备, 其适用范围相对较小。被动对焦技术利用获取的图像信息分析对焦方向, 并调整焦距到最佳位置, 目前在许多成像设备中取得了广泛的应用。被动对焦方式包括对焦深度(DFP)法和离焦深度(DFD)法<sup>[1]</sup>, DFD 法从离焦图像中取得深度信息, 只需要获得 2、3 幅的图像即可完成自动对焦过程, 速度快, 但对焦精度低。DFP 法通过搜寻对焦评价曲线的峰值实现自动对焦, 精度高, 因而显微镜的自动对焦系统多采用 DFP 法。

理想的对焦评价函数应该满足单峰性和无偏性<sup>[2]</sup>。在实际的图像采集中, 成像主体与背景的关系千变万化, 对焦评价函数经常产生多个局部极值, 而且最大峰值经常偏离成像主体最清晰的位置。目前已提出了各种方法消除对焦

曲线的局限极值<sup>[1, 3, 4]</sup>, 但是大部分都不具有普遍意义。在某些情况下, 无论采用哪种对焦评价函数, 都可能导致自动对焦的失败, 因而消除多峰和背景干扰对构建稳定的显微镜自动对焦系统具有重要的意义。

针对平面样品的大规模显微图像采集, 本文提出了一种基于预测的显微镜自动对焦方法。在平面样品的连续采集过程中, 相邻几幅图像的最佳对焦位置相差很小, 根据前一幅或几幅图像的对焦位置估计当前图像的对焦位置, 然后在估计位置附近做微小的调整, 即可得到最佳焦平面位置。这种方法既可以避免多峰干扰, 又大大减少了采集图像的数量和搜索的步骤。此外, 为了使对焦函数满足无偏性, 本文利用阈值分割的方法自适应地选择对焦区域, 可以有效地消除背景干扰。

## 2 自动对焦的原理和方法

### 2.1 自动对焦的原理

目前的数字图像对焦算法是以傅里叶光学理论作为理

\* 收稿日期: 2006 02 20 修订日期: 2006 04 13

\*\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(60272042)

\*\* E-mail: ligangmiao@ yahoo. com. cn

论基础。透镜成像的原理如图1所示, 焦距  $f$ 、物距  $u$  及像距  $v$  三者间的关系为

$$\frac{1}{u} + \frac{1}{v} = \frac{1}{f} \quad (1)$$

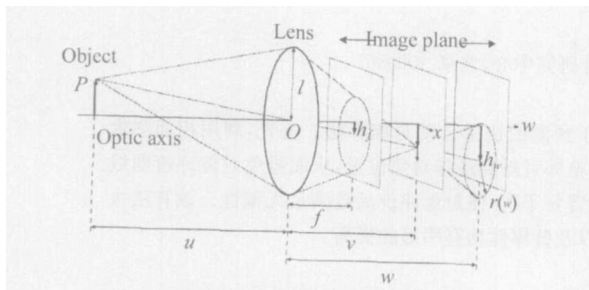


图1 透镜成像原理

Fig 1 Camera model and the focusing mechanism

理想情况下, 物平面上的每一个点发出的全部光线经过透镜折射后仍交于一点, 即每一个物点都对应一个像点。当物距为  $u$ 、像距为  $v$  时, 在像平面可以得到清晰的对焦图像。如图1所示, 若观察面与像平面偏离了  $\delta = |w - v|$ , 则在观察面上形成半径为  $r$  的模糊圆, 也就是产生了离焦像。 $r$  可以表征图像对焦的程度,  $r$  越大图像越远离焦平面, 相应的点光源成像越模糊;  $r$  越小图像越靠近焦平面, 相应的点光源成像越清晰。 $r$  与  $\delta$  间的关系为

$$r(w) = \frac{l|w - v|}{v} \quad (2)$$

其中,  $l$  为透镜的半径。由式(2),  $r$  与物的位置无关。DFE方式的对焦评价函数值随着  $r$  的减小而逐步增大, 当  $r$  最小时评价函数取最大值。

图像的清晰度与图像的高频分量有很大关系。离焦相当于低通滤波的过程, 对焦图像比离焦图像包含更多的高频分量, 细节信息比较丰富, 通常用图像中高频分量的含量作为图像对焦算法的主要依据。

## 2.2 对焦评价函数

自动对焦的关键在于图像清晰度评价函数的选择。Groen等人<sup>[2]</sup>认为, 理想的对焦评价函数应该满足: 1) 单峰性。对焦范围内只有1个极值, 不存在可能导致对焦错误的局部极大值; 2) 无偏性。对焦评价函数的最大值位置对应图像最清晰的位置; 3) 具有较强的抗噪声能力; 4) 计算量小, 对焦速度快; 5) 适应性强, 能够适应各种成像条件和采集样品。

目前的对焦评价函数主要分为空域和频域2类: 前者常用一些锐化算子来判断图像的清晰度, 其计算量相对较小; 后者则根据频域成分评价图像的对焦程度。目前, 空域对焦评价函数主要分为5类<sup>[3]</sup>: 1) 基于图像微分, 如阈值绝对梯度函数、能量梯度函数、Brenner函数、TenenGrad函数和Laplace算子等; 2) 基于图像灰度的峰谷值, 如图像功率; 3) 基于图像对比度, 如方差; 4) 基于直方图, 如熵函数; 5) 基于相关性, 如Vollath 4和Vollath 5函数<sup>[4]</sup>。较常用的有能量梯度函数、方差函数、TenenGrad算子以及熵函数等。

为了减少采集图像的数量, 通常采用一些优化的搜索

方法提高DFE的速度, 快速定位最优对焦平面。如爬山法、Fibonacci搜索方法以及曲线拟合法等<sup>[1]</sup>。Fibonacci搜索具有采样点存储量少、不确定区间容易预测等优点, 在试验次数指定的情况下, 是最优的搜索法。如果自动对焦评价函数出现大量的局部极大值时, Fibonacci搜索有可能陷入局部极大值的邻近区域。最近, 文献[7]结合DFE和DFD 2种方法的优点, 提出了一种离焦估计的方法来减少搜索时间, 在实际应用中取得了较好的效果。

## 3 显微镜自动对焦系统

目前已提出了各种对焦评价函数, 但是在实际应用中, 由于噪声、样本表面上的尘埃以及样品的背景干扰等因素的影响<sup>[8]</sup>, 导致这些对焦评价曲线出现多个局部极大值, 并且最大峰偏离图像最清晰的位置。另外, 图像信息的丰富程度也是影响自动对焦性能的一个重要因素, 信息比较少的图像更容易受到其他因素的干扰。

在显微镜的连续采集过程中, 利用样品表面的连续性, 根据前一幅或几幅图像的对焦位置估计当前图像的最佳对焦位置, 把当前图像的对焦位置限制在较小的范围内, 从而避免了多峰干扰。然后在估计位置附近做微小的调整, 即可得到当前图像的最佳对焦位置。另一方面, 它减少了对焦所需采集的图像数量, 大部分对焦函数都可以取得较好的效果。

背景的干扰使对焦函数的峰值位置偏离成像主体目标, 通常对焦函数的最大峰值出现在目标和背景间的某个位置, 从而造成成像主体的清晰度下降。为了采用提高对焦的准确性, 对梯度图像进行阈值分割, 从而可以根据图像内容自适应地选择对焦窗口, 使对焦函数满足无偏性。

### 3.1 线性预测模型

在显微镜图像采集系统中, 显微镜固定在载物平台的上方, 显微镜的光轴与拍摄物体表面垂直, 载物平台在计算机的控制下沿3个方向移动。在一定放大倍数下, 扫描样品的尺寸一般都远远超出显微镜的视场范围, 为了得到样品的全部图像, 必须对样品连续多行扫描以覆盖整个目标。如图2所示, 在高倍数显微镜下, 样品表面是一凸凹不平的曲面。载物平台在  $xy$  平面的移动过程中, 样品表面的起伏会造成图像模糊, 通过控制载物平台在  $z$  轴方向移动, 调整样本和物镜的距离, 使物体在像平面上清晰地成像。

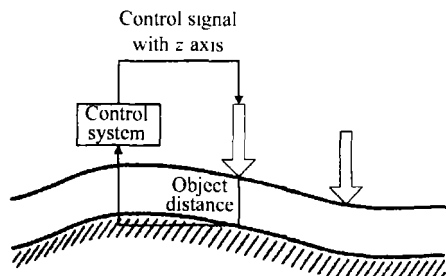


图2 高放大倍数下的样本表面

Fig. 2 Preparation surface under high amplification

用  $x(n)$  表示第  $n$  幅图像的对焦位置, 在第  $n$  幅图像前  $p$  幅图像的对焦位置  $x(n-p), x(n-p+1), \dots, x(n-1)$  已知, 希望利用这  $p$  个数据来预测第  $n$  幅图像的对焦位置  $x(n)$ 。预测的方法很多, 设  $\hat{x}(n)$  是对真实值  $x(n)$  的预测, 如果利用线性预测的方法来实现, 那么

$$\hat{x}(n) = - \sum_{k=1}^p \alpha_k x(n-k) \quad (3)$$

记预测值  $\hat{x}(n)$  和真实值  $x(n)$  间的误差为  $e(n)$ , 则

$$e(n) = x(n) - \hat{x}(n) \quad (4)$$

因此, 总的预测误差功率为

$$\rho = E\{e^2(n)\} = E\{[x(n) + \sum_{k=1}^p \alpha_k x(n-k)]^2\} \quad (5)$$

根据线性最小均方误差估计的正交原理, 使  $x(n-p), x(n-p+1), \dots, x(n-1)$  和预测误差序列  $e(n)$  正交, 即可求得使  $\rho$  最小的  $\alpha_k (k=1, \dots, p)$ 。在实际的应用中, 考虑到显微镜载物平台的步进精度及其可重复性, 当  $p$  较大时并不能取得更好的精度, 为此仅考虑通常邻近几幅图像的对焦位置, 主要包括 3 种特殊情况:

1)  $p=1, \alpha_1 = -1$ 。这种情况利用前等价于最近邻插值, 即  $\hat{x}(n) = x(n-1)$ ;

2)  $p=2, \alpha_1 = -2, \alpha_2 = 1$ 。这种情况等价于线性插值, 即  $\hat{x}(n) = 2x(n-1) - x(n-2)$ ;

3)  $p=3, \alpha_1 = -4/3, \alpha_2 = -1/3, \alpha_3 = 2/3$ 。其中系数  $\alpha_i (i=1, 2, 3)$  可用最小二乘方法求得, 即  $\hat{x}(n) = (4x(n-1) + x(n-2) - 2x(n-3))/3$ 。

在得到  $\hat{x}(n)$  后, 根据预先设定的  $z$  轴方向的微调范围  $\delta$  载物平台移动到位置  $\hat{x}(n) - \delta$  然后向上逐步移动, 当对焦函数小于前一个位置的值得时停止, 并把前一个位置的图像作为对焦图像保存下来。通常  $\delta$  可选取为一比较小的正数, 用来限定显微镜微调的范围, 并修正  $z$  轴的机械传动回差以及估计值和真实值的预测误差。 $\delta$  的大小与样本的平整度和显微镜的放大倍数有关, 因为在高倍数物镜下, 相邻图像的焦平面变化相对较大, 通常可取 2~4。

### 3.2 对焦窗口的选择

进行对焦区域选择有 2 个原因<sup>[9]</sup>: 1) 对焦评价函数的计算速度与图像像素成正比, 为了提高对焦速度, 必须减少参加运算的像素数量; 2) 如果对整幅图像运用对焦评价函数, 图像中背景干扰会对评价结果产生负面的影响, 导致图像中的成像目标无法准确对焦。

在背景干扰比较严重的情況下, 对焦窗口选取是影响对焦成败的重要因素之一。对焦窗口应该包含尽可能多的成像主体, 使背景的影响尽可能小。分离成像主体的区域可以有效地减少背景信息的干扰, 从而使对焦主体的成像最为清晰。

在采集完一幅图像后, 载物平台根据设定的步长移动到下一幅图像的位置, 并沿  $z$  轴向下移动到位置  $\hat{x}(n) - \delta$  在此位置采集到的图像中, 成像主体的清晰度大于背景清晰度, 如图 3(a) 所示。对该幅图像的梯度图像进行阈值分割<sup>[10,11]</sup>, 从而可以标记出目标所在的区域, 用这些区域作为对焦窗口就可以避免背景信息的干扰。图 3(b) 是采用 Otsu 方法得到的对焦区域。利用 30 幅图像得到的对焦评价

曲线如图 3(c) 所示, 其中曲线 1 利用了图像所有像素的信息, 曲线 2 仅利用对焦窗口内的像素信息, 而曲线 3 则利用对焦窗口以外的所有像素信息。对焦评价曲线 1 等于目标和背景 2 条对焦评价曲线的叠加。曲线 1 的最大峰值点在曲线 2、3 的最大峰值点间, 利用对焦窗口可以使峰值点对应成像主体最清晰的位置, 这与实际的情况一致。

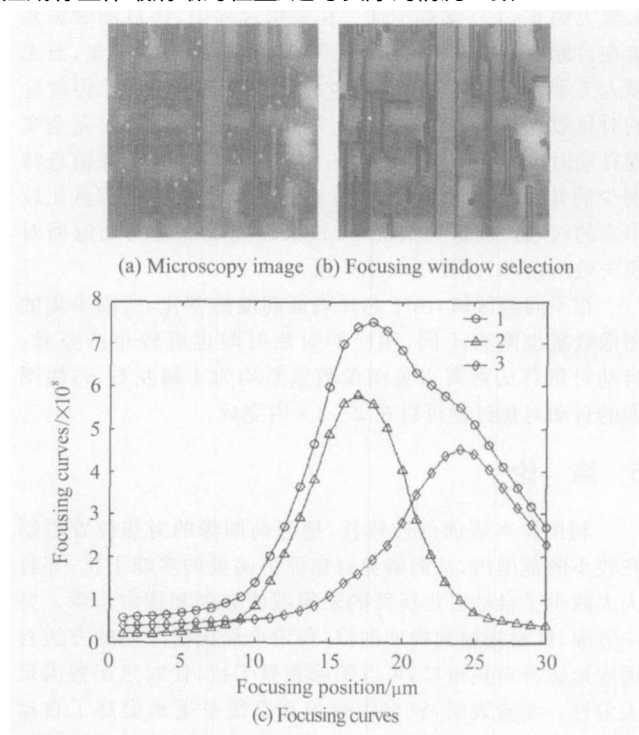


图 3 集成电路图像的对焦窗口

Fig. 3 Focusing window of IC image

在实际应用中, 通常根据不同背景信息的影响和速度的要求, 对焦窗口的选择可以进行相应的调整。

### 3.3 算法描述

综上所述, 该自动对焦系统包括以下步骤:

- 1) 设置参数  $\delta$  和  $p$ ;
- 2) 对第 1 幅图像, 手动调整到对焦的大致位置;
- 3) 利用自动对焦算法调整到最优焦平面位置;
- 4) 对第  $n$  幅图像, 载物平台移动到  $\hat{x}(n) - \delta$  利用该位置的图像选取对焦窗口, 并计算对焦评价函数的值  $f(1)$ ;
- 5) 载物平台向上移动, 并计算每幅图像的对焦函数值  $f(i)$ ;
- 6) 如果  $f(i) < f(i-1)$ , 当前图像对焦结束, 并把第  $i-1$  图像作为对焦图像; 否则转下一步;
- 7) 如果  $i \leq 2\delta$  转到 5); 否则提示对焦失败, 进行人工干预。

## 4 实验结果分析

实验所使用的计算机硬件环境为: Intel<sup>®</sup>4 处理器, CPU 为 1.6 GHz, 内存为 512 M, 软件环境为: Windows 2000, Visual C++ 6.0。步进电机在  $z$  轴方向的最小步长

为  $1\ \mu\text{m}$ , 微调参数  $\delta$  设为 3, 采用能量梯度函数作为对焦评价函数, 即

$$F_{\text{energy Grad}} = \sum_M \sum_N \{ [I(i+1, j) - I(i, j)]^2 + [I(i, j+1) - I(i, j)]^2 \} \quad (6)$$

对  $0.25\ \mu\text{m}$  工艺的集成电路芯片进行自动采集实验, 图像大小为  $1392 \times 1040$  pixels, 采用 1000 倍放大, 共需要采集大约  $6 \times 10^5$  多幅图像。在采集过程中, 该自动对焦系统在目标信息丰富的区域, 几乎可以全自动连续采集, 而无需人工干预。在目标信息较少的区域通常也能够取得较好的对焦效果。统计结果表明, 大约 96% 的图像可以完全实现自动对焦。自动对焦失败的情况通常出现在图像信息特别少的几乎空白区域, 或者没有前景信息而背景信息比较丰富的区域。在这些情况下, 该系统通常能够自动返回对焦失败的信息, 并提示人工干预。

在不同的区域, 由于芯片表面高度的变化, 所需采集的图像数量也略有不同, 相应的对焦时间也有较小的差异。自动对焦算法对需采集图像数量平均为 4 幅左右, 每幅图像的自动对焦过程可以在 2~3 s 内完成。

## 5 结 论

利用样本表面的连续性, 把当前图像的对焦位置限制在较小的范围内, 从而避免对焦评价函数的多峰干扰, 并且大大减少了自动对焦所需的采集图像数量和搜索步骤。另一方面, 针对初始的梯度图像, 利用全局阈值分割的方法自适应地选择对焦窗口, 可以消除背景干扰, 使对焦函数满足无偏性。实验表明, 该显微镜采集系统显著地提高了自动对焦的精度、速度以及鲁棒性。对焦评价函数的选择没有特殊的要求, 该方法具有较强的通用性, 常用的能量梯度函数、方差函数、TeneGrad 算子以及熵函数等。对焦函数都能够取得较好的效果。

## 参考文献:

- [1] Yalin X, Steven A S. Depth from focusing and defocusing[ A ]. *Proceedings of IEEE Computer Society Conference on CVPR* [ C ]. New York: IEEE Computer Society, 1993. 68-73.

- [2] Groen F C A, Yong I T, Lighthart G A. A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms[ J ]. *Cytometry*, 1985, 6(2): 81-91.
- [3] KANG Zong ming, ZHANG Li, XIE Pan. Implementation of an automatic focusing algorithm based on spatial high resolution energy and entropy[ J ]. *Acta Electronica Sinica* (电子学报), 2003, 31(4): 552-555. (in Chinese)
- [4] Subbarao M, Tyan J K. Selecting the optimal focus measure for autofocusing and Depth From Focus[ J ]. *IEEE Transactions on Pattern Recognition and Machine Intelligence*, 1998, 20(8): 864-870.
- [5] Santos A, Ortiz de Solorzano C, Vaquero J J, et al. Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis[ J ]. *Journal of Microscopy*, 1997, 188(3): 264-272.
- [6] Vollath D. The influence of the scene parameters and of noise on the behaviour of automatic focusing algorithms[ J ]. *Journal of Microscopy*, 1998, 151: 133-146.
- [7] Li Qi, XU Zhi hai, FENG Hua jun. Method of improving autofocus speed based on defocus estimation[ J ]. *Journal of Optoelectronics · Laser* (光电子·激光), 2005, 16(7): 850-853. (in Chinese)
- [8] Geusebroek J M, Cornelissen F, Smeulders A W M, et al. Robust autofocusing in microscopy[ J ]. *Cytometry*, 2000, 39(1): 1-9.
- [9] Li Qi, XU Zhi hai, FENG Hua jun, et al. Autofocus area design of digital imaging system[ J ]. *Acta Photonica Sinica* (光子学报), 2002, 31(1): 63-66. (in Chinese)
- [10] Otsu N. A threshold selection method from gray level histograms[ J ]. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 1979, 9(1): 62-66.
- [11] GUO Hai tao, WANG Lian yu, TIAN Tan, et al. Automatic thresholding using the Otsu algorithm based on the two dimensional bound histogram[ J ]. *Journal of Optoelectronics · Laser* (光电子·激光), 2005, 16(6): 739-742. (in Chinese)

作者简介:

苗立刚 (1974-), 男, 博士研究生, 主要研究方向为小波分析、图像处理、模式识别和计算机视觉等。