



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109300087 A

(43)申请公布日 2019.02.01

(21)申请号 201811033711.3

(22)申请日 2018.09.05

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 丁玮 季刚 李喜霞 张建国

(74)专利代理机构 北京中强智尚知识产权代理有限公司 11448

代理人 黄耀威

(51)Int.Cl.

G06T 3/40(2006.01)

G06K 9/62(2006.01)

G06K 9/46(2006.01)

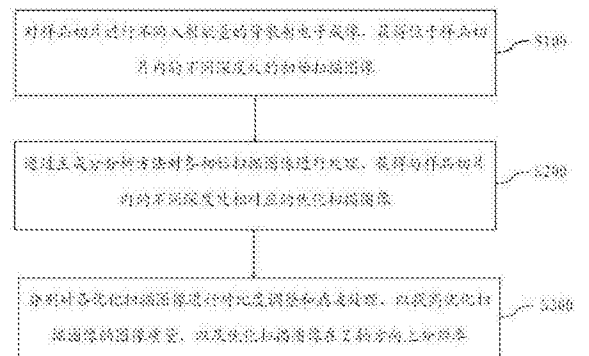
权利要求书3页 说明书10页 附图5页

(54)发明名称

提高样品切片的扫描成像在Z轴方向上分辨率方法及系统

(57)摘要

本发明公开了一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法及系统,其方法包括:通过设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,对样品切片进行不同入射能量的背散射电子成像,获得位于所述样品切片内的不同深度处的初始扫描图像;通过主成分分析方法对各所述初始扫描图像进行处理,获得与所述样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像;分别对各所述优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以提高所述样品切片的扫描图像质量、以及其在Z轴方向上分辨率。本发明针对样品切片在不改变电镜设备硬件条件的情况下,通过对样品切片内不同深度处的扫描成像并配合相应的图像处理方法,达到提高大尺度样品切片Z轴分辨率的目的。



1. 一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,其特征在于,包括:

通过设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,对样品切片进行不同入射能量的背散射电子成像,获得位于所述样品切片内的不同深度处的初始扫描图像;

通过主成分分析方法对各所述初始扫描图像进行处理,获得与所述样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像;

分别对各所述优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以提高所述优化扫描图像的图像质量、以及所述优化扫描图像在Z轴方向上分辨率。

2. 根据权利要求1所述的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,其特征在于,在通过设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,对样品切片进行不同入射能量的背散射电子成像,获得位于所述样品切片内的不同深度处的初始扫描图像时,包括:

通过对待参照的连续切片的厚度的记录以及对所述样品切片在Z轴方向上分辨率的预设,分别计算在所述样品切片内与所述待参照的连续切片的厚度一致的深度处在不同分辨率要求下,对应进行背散射电子成像所需的入射电子束电压;

通过对所述样品切片的成像位置进行标定,获得所述成像位置的坐标信息,并对所述坐标信息进行记录;

根据所述坐标信息将入射电子束定位到所述样品切片的成像位置上,利用不同入射电子束电压的入射电子束分别对所述样品切片进行背散射电子扫描,获得位于所述样品切片内不同深度处的初始扫描图像。

3. 根据权利要求1所述的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,其特征在于,在通过主成分分析方法对各所述初始扫描图像进行处理,获得与所述样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像前,包括:

对各所述初始扫描图像进行相同的观察区域选择处理后,将所有所述初始扫描图像上的观察区域进行刚体对齐和伸缩对齐处理,使所有所述初始扫描图像上的观察区域完全对齐。

4. 根据权利要求1所述的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,其特征在于,在通过主成分分析方法对各所述初始扫描图像进行处理,获得与所述样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像时,包括:

将各所述初始扫描图像转换为数值矢量后,通过主成分分析方法对各所述数值矢量进行主成分分析,得到与各所述数值矢量相应的权重矩阵;

通过所述权重矩阵分析出所述样品切片内的各深度处对应的结构信息对与此深度对应的样品切片的扫描成像贡献系数;

分别通过各所述初始扫描图像和与其相应的扫描成像贡献系数进行运算,推算所述样品切片内的各深度处对应的结构信息,获得与所述样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像。

5. 根据权利要求4所述的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,其特征在于,在将各所述初始扫描图像转换为数值矢量后,通过主成分分析方法对各所述数值矢量进行主成分分析,得到与各所述数值矢量相应的权重矩阵时,包括:

将二维的各所述初始扫描图像转换为一维的数值矢量,获得与各所述初始扫描图像数据相关的矩阵X后,求出所述矩阵X的协方差矩阵S;

根据所述协方差矩阵S的特征值 λ_i 和特征向量 U_i ,组成变换矩阵T的求解特征方程 $(\lambda_i - S)U = 0$;

将特征值 λ_i 按由小到大进行顺序排列,求出对应特征值 λ_i 的单位特征向量 U_i 后,以 U_i 为列构成所述权重矩阵;

其中,所述矩阵X为:

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix} = [x_{ij}]_{m \times n}$$

所述协方差矩阵S为:

$$S = \frac{1}{n} [X - \bar{X}] [X - \bar{X}]^T$$

$$1 = [1 \ 1 \ \dots \ 1]_{1 \times n}$$

$$\bar{X} = [\bar{x}_1 \ \bar{x}_2 \ \dots \ \bar{x}_n]^T$$

其中,在所述矩阵X中,m、n分别为各所述初始扫描图像上各个像素点的灰度值,每一行矢量表示位于所述样品切片内的不同深度处的一初始扫描图像;在所述协方差矩阵S中,

$$\bar{x}_i = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_{ik}$$

6. 根据权利要求1所述的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,其特征在于,在对各所述优化扫描图像进行对比度调整时,是通过对比度限制的自适应直方图均衡化方法对各所述优化扫描图像进行对比度调整。

7. 根据权利要求1所述的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,其特征在于,在分别对各所述优化扫描图像进行滤波处理时,包括:

分别计算所述优化扫描图像上各个像素点的邻域像素和卷积核的对应元素的乘积后,将与所述优化扫描图像上各个像素点分别对应所得的乘积值进行相加求得数值;

将各个所述像素点分别对应的乘积值进行相加数值作为与其对应的所述像素点的像素位置的值,对所述优化扫描图像上的各个所述像素点分别进行滤波处理。

8. 一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率系统,其特征在于,包括:

初始扫描图像获取模块,用于通过设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,对样品切片进行不同入射能量的背散射电子成像,获得位于所述样品切片内的不同深度处的初始扫描图像;

优化扫描图像处理模块,用于通过主成分分析方法对各所述初始扫描图像进行处理,获得与所述样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像;

图像优化模块,用于分别对各所述优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以提高所述优化扫描图像的图像质量、以及所述优化扫描图像在Z轴方向上分辨率。

9. 一种存储介质,其上存储有计算机程序,其特征在于,所述程序被处理器执行时实现权利要求1至8中任一项所述的提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法。

10. 一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率系统,包括存储介质、处理器及

存储在存储介质上并可在处理器上运行的计算机程序,其特征在于,所述处理器执行所述程序时实现权利要求1至8任一项所述的提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法。

提高样品切片的扫描成像在Z轴方向上分辨率方法及系统

技术领域

[0001] 本发明属于电子显微成像技术领域,具体涉及一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率系统。

背景技术

[0002] 扫描电子显微镜中的背散射电子成像技术是一种利用电子光学系统对观测样品进行放大成像的技术,该技术已经成为目前观察亚显微尺度生物组织样品的不可或缺手段。目前,主流的扫描电子显微镜在其XY平面上的分辨率已经可以达到 $<5\text{nm}$,因此,足以满足对生物大脑神经元这一类重要亚显微结构的观察与研究。然而,由于扫描电子显微镜成像的特点,其图像在Z轴方向上分辨率则取决于样品的切片厚度,而样品厚度则由样品技术所决定。

[0003] 目前,主流的切片技术有如下几种,一是聚焦离子束切片技术(Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope, FIB-SEM),基本原理是对感兴趣的微小区域,利用离子束对样品切片表面进行切割,其特点是切片厚度薄(通常的切片厚度约为 $15\sim 30\text{nm}$),样品切片表面积小(样品切片长宽一般不超过 $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$)。二是自动化钻石刀切片技术(Serial Block-Face Scanning Electron Microscope, SBF-SEM),它是在扫描电镜的样品切片室内安装配有钻石刀的切片机,利用该切片机实现自动连续的原位切片,该技术适用于尺寸不超过 $300\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}$ 的样品切片材料,切片厚度通常为 $50\sim 100\text{nm}$ 。三是自动化带式收集超薄切片机技术(Automatic Tape-Collecting Ultra-microtome Scanning Electron Microscope, ATUM-SEM)。其基本原理是将普通钻石刀与切片收集带相结合,在对树脂样品切片进行连续切片的同时用连续转动的带子对切片进行收集。该技术可以用于处理毫米级别的样品切片材料,其切片厚度约为 $50\text{nm}\sim 100\text{nm}$ 。后两种是基于钻石刀的切片技术更适用于脑组织这类大尺度样品切片的处理。但由于钻石刀的制作工艺以及出于损耗方面的考虑,目前,利用钻石刀获得的样品切片其厚度在 50nm 左右,而扫描电子显微镜图像在Z轴方向上分辨率取决于样品切片的厚度,因此利用该切片获得的结构的Z轴方向分辨率难以满足对样品切片细微组织结构,如神经突触这类重要组织的精确观察和分析,这已成为制约这一技术发展的一个瓶颈问题。

[0004] 目前,世界上的各大电镜公司和研究单位都在探求解决扫描电镜成像Z轴方向分辨率偏低这一问题的方法。其中,最为显著的成果是美国的Gatan公司最近推出的新一代的样品切片仪器:3VIEW®2xp,该仪器装备了高精度的超微切片机,它能够与扫描电镜相配合进行快速的样品切片和图像收集。该仪器目前能够处理最大尺寸为 $600\mu\text{m}\times 600\mu\text{m}$ 的样品切片,但是生物样品切片的极限切片厚度只能达到 30nm 。为了提高扫描电镜成像在Z轴方向上分辨率,美国的FEI公司的工程师在2012年的一个美国专利(专利号是US 8,232,523 B2)中提到了,对于生物样品切片在每次物理切割之前,通过改变扫描电镜入射电子的加速电压,收集多张电镜图片以提高样品切片在Z轴方向上分辨率的方法。根据该方法,FEI公司推出了具有射束减速模式的Teneo VS系列产品。该系列产品将超薄切割机、射束减速装置集

合在扫描电镜的腔室内部,通过逐级入射电子能量的改变获得物理切割厚度范围内不同深度的样品切片结构信息,然后利用多能反卷积的图像处理方法,得到每一深度的结构信息,再通过超薄切片机的物理切割获得整个样品切片块的二维连续图像。根据该公司提供的数据证明,该方法能够有效提高生物组织块状样品切片在Z方向上的分辨率。

[0005] 但是,利用FEI公司推出的技术进行样品切片Z方向分辨率的提高,还存在如下几个问题:一、该技术针对的主要是块状样品切片,因为该技术的成像是与腔室中的超薄切片机配合使用的,因此其针对的目标是不超过1mm*1mm的块状样品切片,而对于如小鼠大脑这种尺度更大、需要在进入腔室前被处理成一系列超薄切片的样品切片,并不是它考虑的对象;二、无法在前期采购的扫描电镜上实现,因为该技术的实现源自于FEI公司对电镜硬件的重新设计,即在腔室内部加入了电子减速模块和超薄切片机,并将其整合成了一个整体作为一个新的电镜产品推出,因此该公司前期的电镜产品都无法利用这一技术实现样品切片Z方向分辨率的提高,并且购买新的设备,其费用相当高昂。

发明内容

[0006] 针对上述现有技术存在的不足之处,本发明提供了提高样品切片的扫描成像在Z轴方向上分辨率方法及系统。

[0007] 为了达到上述目的,本发明所采用的技术方案为:

[0008] 本发明一方面提供了一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,包括:

[0009] 通过设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,对样品切片进行不同入射能量的背散射电子成像,获得位于所述样品切片内的不同深度处的初始扫描图像;

[0010] 通过主成分分析方法对各所述初始扫描图像进行处理,获得与所述样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像;

[0011] 分别对各所述优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以提高所述优化扫描图像的图像质量、以及所述优化扫描图像在Z轴方向上分辨率。

[0012] 本发明另一方面提供了一种提高样品切片的扫描成像在Z轴方向上分辨率系统,包括:

[0013] 初始扫描图像获取模块,用于通过设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,对样品切片进行不同入射能量的背散射电子成像,获得位于所述样品切片内的不同深度处的初始扫描图像;

[0014] 优化扫描图像处理模块,用于通过主成分分析方法对各所述初始扫描图像进行处理,获得与所述样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像;

[0015] 图像优化模块,用于分别对各所述优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以提高所述优化扫描图像的图像质量、以及所述优化扫描图像在Z轴方向上分辨率。

[0016] 本发明提供的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法及系统,通过对扫描电子显微镜设置不同入射电子束电压,进而利用不同能量的电子束分别对样品切片进行背散射电子成像,获得位于样品切片内的不同深度处的初始扫描图像后,通过主成分分析方法对各初始扫描图像进行处理来获得与样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像,最后通过分别对各优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以最终提高样品

切片图像的质量和样品切片在Z轴方向上分辨率。本发明针对样品切片在不改变电镜设备硬件条件的情况下,通过对样品切片内不同深度处的扫描成像并配合相应的图像处理方法,达到提高大尺度样品切片Z轴分辨率的目的。

附图说明

[0017] 图1为本发明示例性实施的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法的流程示意图;

[0018] 图2为本发明示例性实施例的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法的流程示意图;

[0019] 图3为本发明示例性实施例的对一连续切片以30nm的电子有效信息深度为间隔进行扫描生成的3张图像;

[0020] 图4为本发明示例性实施例的又一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法的流程示意图;

[0021] 图5为本发明示例性实施例的再一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法的流程示意图;

[0022] 图6为本发明示例性实施例的再又一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法的流程示意图;

[0023] 图7为本发明示例性实施的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率的模块连接示意图;

[0024] 图8为本发明示例性实施例的另一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率的模块连接示意图;

[0025] 图9为本发明示例性实施例的又一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率的模块连接示意图;

[0026] 图10为本发明示例性实施例的再一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率的模块连接示意图;

[0027] 图11为本发明示例性实施例的再又一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率的模块连接示意图。

具体实施方式

[0028] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 在本发明实施例中,包埋有样品切片是通过对样品进行负染色和树脂包埋后,再利用自动超薄切片机技术对包埋后的树脂快进行连续切割,并用胶带对连续切片进行收集,最后将这些连续切片固定在硅片上来制得的。

[0030] 如图1所示,一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法,包括:

[0031] S100、通过设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,对样品切片进行不同入射能量的背散射电子成像,获得位于样品切片内的不同深度处的初始扫描图像。

[0032] 作为本发明的一个实施例,在设置扫描电子显微镜的不同入射电子束电压,并利用不同能量的电子束分别对包埋有样品切片的连续切片进行背散射电子成像时,如图2所示,步骤S100包括:

[0033] S101、通过对待参照的连续切片的厚度的记录以及对样品切片在Z轴方向上分辨率的预设,分别计算在样品切片内与待参照的连续切片的厚度一致的深度处在不同分辨率要求下,对应进行背散射电子成像所需的入射电子束电压。

[0034] 具体地,输入连续切片的厚度、成像的数目、平均原子质量、平均原子数目、样品切片密度,就能够算出在不同的连续切片的厚度(有效信息深度)下,所需要使用的入射电子束电压。

[0035] 其中,在计算入射电子束电压时,所使用的计算公式如下:

$$[0036] \quad tBSE = 12.12 \frac{A}{\rho Z^{0.89}} (E_0)^{1.67}$$

[0037] 其中,A是样品切片中原子的平均质量,Z是样品切片中原子的平均原子数, ρ 是样品切片的密度, E_0 为电子能量,tBSE为电子有效信息深度(单位:nm)。

[0038] 例如,对于一个90nm的切片厚度来说,在ME_calculate软件中分别输入30nm、60nm和90nm的连续切片的厚度值,再输入成像的数目、平均原子质量、平均原子数目、样品切片密度,来分别计算出用于对厚度分别为的30nm、60nm和90nm的厚度的连续切片进行扫描的入射电子束电压,进而能获得分别与样品切片在30nm、60nm和90nm处进行背散射电子成像所需的入射电子束电压。

[0039] S102、通过对样品切片的成像位置进行标定,获得成像位置的坐标信息,并对坐标信息进行记录。

[0040] 具体地,由于在连续切片中的样品面积,仅占切片面积的1/5左右,而样品切片中实际感兴趣的部分则更加的小,因此在成像之前需要先对每一个样品切片的成像位置进行定位。其中,定位方法包括:

[0041] 对于每一个连续切片,在用户标定完样品切片成像位置之后,对其坐标信息进行自动记录;

[0042] 按用户要求的连续切换样品切片的位置,对所有包埋有样品切片的连续切片进行成像位置的标定。

[0043] S103、根据坐标信息将入射电子束定位到样品切片的成像位置上,利用不同入射电子束电压的入射电子束分别对样品切片进行背散射电子扫描,获得位于样品切片内不同深度处的初始扫描图像。

[0044] 具体地,成像位置的坐标信息,将电子束定位到某个连续切片的成像位置上,根据需要对样品切片的某一深度进行背散射电子成像,来设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,同时对像散、焦距、对比度进行自动调整调整,然后对样品切片内的此深度进行成像,在对此深度进行成像后,根据需要对样品切片的下一个深度进行背散射电子成像,来设置扫描电子显微镜的下一个入射电子束电压,再重复上述操作。当对一个连续切片内样品的不同深度的成像数目达到要求,则自动切换到下一个连续切片的成像位置进行同样的系列成像操作,直到所有存储的坐标信息使用完毕。如图3所示,对于厚度为90nm包埋有样品切片的连续切片,以30nm的电子有效信息深度为间隔进行扫描成像,能够得到如图所示的3张图

像,其中,圆圈内是3张图像的对比区域。

[0045] S200、通过主成分分析方法对各初始扫描图像进行处理,获得与样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像。

[0046] 作为本发明的一个实施例,在利用主成分分析方法对各扫描图像进行处理,获得与样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像之前,需要进行图像的预处理,包括:

[0047] 对各初始扫描图像进行相同的观察区域选择处理后,通过将所有初始扫描图像上的观察区域进行刚体对齐和伸缩对齐处理,使所有初始扫描图像上的观察区域完全对齐。

[0048] 具体地,在对位于样品切片内的不同深度处进行扫描成像时,不同电子束电压会带来导致样品切片在成像过程中像散、焦距等的变化,加上对样品切片进行多次成像的热效应,会导致样品切片图像在位置和取向上发生变化,同时还可能伴有局部形变的发生,而之后的主成分分析方法,需要在两张初始扫描图像在严格对齐的情况下才能进行,因此图像处理的首要的步骤是进行图像的对齐。此外,由于成像的区域往往要大于实际需要研究的区域,因此,可以对图像进行选区,以方便后续的数据分析。图像的对齐利用的是ImageJ软件包中的刚体对齐程序和伸缩对齐程序。此外,图像区域的选择则由ImageJ软件的图像框选功能完成。

[0049] 作为本发明的一个实施例,在通过主成分分析方法对各初始扫描图像进行处理,获得与样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像时,如图4所示,步骤S200包括:

[0050] S201、将各初始扫描图像转换为数值矢量后,通过主成分分析方法对各数值矢量进行主成分分析,得到与各数值矢量相应的权重矩阵;

[0051] S202、通过权重矩阵分析出样品切片内的各深度处对应的结构信息对与此深度对应的样品切片的扫描成像贡献系数;

[0052] S203、分别通过各初始扫描图像和与其相应的扫描成像贡献系数进行运算,推算样品切片内的各深度处对应的结构信息,获得与样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像。

[0053] 根据背散射电子成像的特点,在样品切片内的不同深度处内(也称为电子的有效信息深度以内),由浅层结构散射出来的电子和由深层结构散射出来的电子都对最终的图像有贡献,而且越是浅层样品切片的结构信息在系列图像中重复出现的概率越高,根据这一特点,使用主成分分析方法对系列图像进行处理。主成分分析方法的特点在于能够从多维度的信息中寻找出主要信息,消除了不同维度的信息之间的相互关系,减少不同维度信息的交叉和重复。因此我们可以将图像转换为数值矢量,进而利用主成分分析方法进行主成分分析,得到相应的权重矩阵,通过该矩阵我们可以获知样品切片内的各深度处对应的结构信息对图像的贡献,进而利用原始图像与相应的权重系数,推算在样品切片内不同深处的结构信息,最终得到样品切片不同深度的优化扫描图像信息。

[0054] 进一步的,在将各初始扫描图像转换为数值矢量后,通过主成分分析方法对各数值矢量进行主成分分析,得到与各数值矢量相应的权重矩阵时,如图5所示,步骤S201包括:

[0055] S201a、将二维的各初始扫描图像转换为一维的数值矢量,获得与各初始扫描图像数据相关的矩阵X后,求出矩阵X的协方差矩阵S;

[0056] S201b、根据协方差矩阵S的特征值 λ_i 和特征向量 U_i ,组成变换矩阵T的求解特征方程 $(\lambda_i - S)U = 0$;

[0057] S201c、将特征值 λ_i 按由小到大进行顺序排列,求出对应特征值 λ_i 的单位特征向量 U_i 后,以 U_i 为列构成权重矩阵;

[0058] 其中,矩阵 X 为:

$$[0059] \quad X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix} = [x_{ij}]_{m \times n}$$

[0060] 协方差矩阵 S 为:

$$[0061] \quad S = \frac{1}{n} [X - \bar{X}] [X - \bar{X}]^T$$

$$[0062] \quad 1 = [1 \ 1 \ \dots \ 1]_{1 \times n}$$

$$[0063] \quad \bar{X} = [\bar{x}_1 \ \bar{x}_2 \ \dots \ \bar{x}_n]^T$$

[0064] 其中,在矩阵 X 中, m 、 n 分别为各初始扫描图像上各个像素点的灰度值,每一行矢量表示位于样品切片内的不同深度处的一初始扫描图像;在协方差矩阵 S 中, $\bar{x}_i = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_{ik}$ 。

[0065] 由于,越是位于样品切片内的深度较浅的结构信息在系列图像中重复出现的概率越高,而越是位于样品切片内的深度较深的结构信息,重复出现的概率越小,根据这一特点,使用主成分分析方法对系列图像进行处理,即对所有图像进行主成分分析,得到相应的权重矩阵,通过该权重矩阵可以获知各样品切片片层结构信息对图像的贡献,进而利用原始图像与相应的权重系数,推算样品切片内的不同深度处的结构信息,再利用图像去相关方法,对样品切片不同深度的结构信息进行去相关操作,最终得到样品切片不同深度的优化扫描图像信息,其中,上述操作可以由ME_proc完成。

[0066] S300、分别对各优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以提高优化扫描图像的图像质量、以及优化扫描图像在 Z 轴方向上分辨率。

[0067] 作为本发明的一个实施例,在对各优化扫描图像进行对比度调整时,是通过对比度限制的自适应直方图均衡化方法对各优化扫描图像进行对比度调整。

[0068] 对优化扫描图像进行对比度调整,是利用对比度限制的自适应直方图均衡化方法。它是对自适应直方图均衡化方法的一种优化。直方图均衡化的基本思想是:尽量使得每个灰度级的像素数量相等。自适应直方图均衡化方法的作用:使得图像灰度级跨越更宽的灰度级范围,从而提高图像对比度;自适应直方图均衡化方法的另一个优势是:不需要额外参数,整个过程是自动的;自适应直方图均衡化方法的缺点是:拉伸后有些灰度级可能不被映射到,造成图像观感上的颗粒感;而对比度限制的自适应直方图均衡化方法主要是通过限制自适应直方图均衡化方法算法的对比提高程度来克服自适应直方图均衡化方法的过度放大噪音的问题,具体而言是通过在计算变换函数同像素周边的累积直方图函数前用预先定义的阈值来裁剪直方图以达到限制放大幅度的目的。从实际效果上看,结果对比度限制的自适应直方图均衡化方法的对比度调制,能够较好地提高图像细节的显示。

[0069] 作为本发明的一个实施例,在分别对各优化扫描图像进行滤波处理时,如图6所示,包括:

[0070] S301、分别计算优化扫描图像上各个像素点的邻域像素和卷积核的对应元素的乘积后,将与优化扫描图像上各个像素点分别对应所得的乘积值进行相加求得数值;

[0071] S302、将各个像素点分别对应的乘积值进行相加数值作为与其对应的像素点的像素位置的值,对优化扫描图像上的各个像素点分别进行滤波处理。

[0072] 对图像的滤波处理,主要是为了去除图像的噪点,这里使用的是基本的通过卷积核的线性滤波方法。即对于图像的每一个像素点,计算它的邻域像素和卷积核(滤波器矩阵)的对应元素的乘积,然后加起来,作为该像素位置的值。这样就完成了滤波过程。

[0073] 为了量化地验证新方法是否达到了提高样品切片在Z轴方向上分辨率的目的,对结果进行了量化分析。即以量化方式判断使用新方法得到的结果其分辨率是否已经达到了要求。在这里借助聚焦离子束切片技术对我们的实验结果进行量化的验证。聚焦离子束切片技术是一种利用离子束对样品切片进行切割的样品切片处理技术,它适用于小尺度样品切片的切割,而且每次样品切片切割的厚度 $<30\text{nm}$ 。将由新方法得到的图像与由聚焦离子束切片技术得到的图像进行对比,以判断新方法的可行性。其步骤如下:

[0074] 第一:选择三组小尺寸样品切片($X*Y<50\mu\text{m}*50\mu\text{m}$),分别是线虫局部、小鸟大脑局部、小鼠大脑局部,首先利用对位于样品切片内的不同深度的初始扫描图像收集策略,在不同入射电子束电压下各收集3张图像,成像深度分别为 30nm , 60nm 和 90nm ,并利用主成分分析方法进行图像处理,得到反映样品切片不同深度结构信息的图像;

[0075] 第二:利用聚焦离子束切片技术在相应的深度对该样品切片进行精细切片并利用扫描电镜成像;

[0076] 第三:将两组图像一一对比,计算它们的相关系数。然后重复上述操作,每组样品切片收集30张电镜图片,最后计算平均的相关系数。

[0077] 如果两组图片的平均相关系数在0.9以上,说明两组图片足够相似,可以认为使用位于样品切片内的不同深度处的初始扫描图像收集策略和图层分离算法所获得的样品切片不同深度的结构信息与使用聚焦离子束技术进行物理切片而后成像获得的信息非常相近,这意味着使用新方法对样品切片进行分层能够获得与物理超微切片相似的分层效果,这说明我们的方法达到了提高样品切片三维结构Z轴方向上分辨率的效果。

[0078] 统计结果显示,这三组样品切片利用位于样品切片内的不同深度处的初始扫描图像收集方法和聚焦离子束切割方法得到的图片,相关系数的平均值都在0.90以上。这说明使用新方法对样品切片进行分层能够获得与物理超微切片相似的分层效果。

[0079] 表1:利用位于样品切片内的不同深度处的初始扫描图像收集方法和聚焦离子束切割方法得到的图片的相关系数计算结果。其中,各组样品切片均收集了30张电镜图片,将两种方法得到的图片进行相关系数计算,然后求其平均值。

[0080]

样品切片	线虫局部	小鸟大脑局部	小鼠大脑局部

[0081]

本发明的图像收集方法 VS 聚集离子束切割成像方法 (两种方法所得图像相关系数 的平均值)	0.94	0.95	0.93
---	------	------	------

[0082] 进一步的,作为对上述图1所示方法的实现,本发明实施例提供了一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率系统,如图7所示,该装置包括:初始扫描图像获取模块100、优化扫描图像处理模块200、图像优化模块300。

[0083] 初始扫描图像获取模块100,用于通过设置扫描电子显微镜的入射电子束电压,对样品切片进行不同入射能量的背散射电子成像,获得位于样品切片内的不同深度处的初始扫描图像;

[0084] 优化扫描图像处理模块200,用于通过主成分分析方法对各初始扫描图像进行处理,获得与样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像;

[0085] 图像优化模块300,用于分别对各优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以提高优化扫描图像的图像质量、以及优化扫描图像在Z轴方向上分辨率。。

[0086] 作为本发明的一个实施例,如图8所示,初始扫描图像获取模块100,包括:

[0087] 入射电子束电压计算单元101,用于通过对待参照的连续切片的厚度的记录以及对样品切片在Z轴方向上分辨率的预设,分别计算在样品切片内与待参照的连续切片的厚度一致的深度处在不同分辨率要求下,对应进行背散射电子成像所需的入射电子束电压;

[0088] 坐标信息获得单元102,用于通过样品切片的成像位置进行标定,获得成像位置的坐标信息,并对坐标信息进行记录;

[0089] 初始扫描图像成像单元103,用于根据坐标信息将入射电子束定位到样品切片的成像位置上,利用不同入射电子束电压的入射电子束分别对样品切片进行背散射电子扫描,获得位于样品切片内不同深度处的初始扫描图像。

[0090] 作为本发明的一个实施例,优化扫描图像处理模块200包括:

[0091] 图像对齐单元,用于对各初始扫描图像进行相同的观察区域选择处理后,通过将所有初始扫描图像上的观察区域进行刚体对齐和伸缩对齐处理,使所有初始扫描图像上的观察区域完全对齐。

[0092] 作为本发明的一个实施例,如图9所示,优化扫描图像处理模块200包括:

[0093] 权重矩阵获得单元201,用于将各初始扫描图像转换为数值矢量后,通过主成分分析方法对各数值矢量进行主成分分析,得到与各数值矢量相应的权重矩阵;

[0094] 成像贡献系数单元202,用于通过权重矩阵分析出样品切片内的各深度处对应的结构信息对与此深度对应的样品切片的扫描成像贡献系数;

[0095] 优化扫描图像获得单元203,用于分别通过各初始扫描图像和与其相应的扫描成像贡献系数进行运算,推算样品切片内的各深度处对应的结构信息,获得与样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像。

[0096] 作为本发明的一个实施例,如图10所示,权重矩阵获得单元201包括:

[0097] 协方差矩阵S获得子单元201a,用于将二维的各初始扫描图像转换为一维的数值矢量,获得与各初始扫描图像数据相关的矩阵X后,求出矩阵X的协方差矩阵S;

[0098] 求解特征方程获得子单元201b,用于根据协方差矩阵S的特征值 λ_i 和特征向量 U_i ,组成变换矩阵T的求解特征方程 $(\lambda_i - S)U = 0$;

[0099] 权重矩阵获得子单元201c,用于将特征值 λ_i 按由小到大进行顺序排列,求出对应特征值 λ_i 的单位特征向量 U_i 后,以 U_i 为列构成权重矩阵;

[0100] 其中,矩阵X为:

$$[0101] \quad X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix} = [x_{ij}]_{m \times n}$$

[0102] 协方差矩阵S为:

$$[0103] \quad S = \frac{1}{n} [X - \bar{X}] [X - \bar{X}]^T$$

$$[0104] \quad 1 = [1 \ 1 \ \dots \ 1]_{1 \times n}$$

$$[0105] \quad \bar{X} = [\bar{x}_1 \ \bar{x}_2 \ \dots \ \bar{x}_n]^T$$

[0106] 其中,在矩阵X中,m、n分别为各初始扫描图像上各个像素点的灰度值,每一行矢量表示位于样品切片内的不同深度处的一初始扫描图像;在协方差矩阵S中, $\bar{x}_i = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_{ik}$ 。

[0107] 作为本发明的一个实施例,图像优化模块300包括:对比度调整单元,其用于通过对比度限制的自适应直方图均衡化方法对各优化扫描图像进行对比度调整。

[0108] 作为本发明的一个实施例,如图11所示,图像优化模块300还包括:

[0109] 像素点调整值获得单元301,用于分别计算优化扫描图像上各个像素点的邻域像素和卷积核的对应元素的乘积后,将与优化扫描图像上各个像素点分别对应所得的乘积值进行相加求得数值;

[0110] 像素点滤波单元302,用于将各个像素点分别对应的乘积值进行相加数值作为与其对应的像素点的像素位置的值,对优化扫描图像上的各个像素点分别进行滤波处理。

[0111] 需要说明的是,本发明实施例提供一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率系统所涉及各功能单元的其他相应描述,可以参考图1、2、4、5、6中的对应描述,在此不再赘述。

[0112] 基于上述如图1、2、4、5、6所示方法,相应的,本发明实施例还提供了一种存储设备,其上存储有计算机程序,该程序被处理器执行时实现上述如图1、2、4、5、6所示的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法。

[0113] 基于上述如图1、2、4、5、6所示方法和如图7、8、9、10、11所示虚拟装置的实施例,为

了实现上述目的,本发明实施例还提供了一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率系统,该实体装置包括存储设备和处理器;存储设备,用于存储计算机程序;处理器,用于执行计算机程序以实现上述如图1、2、4、5、6所示的一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法。

[0114] 本发明提供一种提高样品切片扫描图像在Z轴方向上的分辨率方法及系统,通过对扫描电子显微镜设置不同能量的入射电子束,来并利用不同能量的电子束分别对包埋有样品切片的连续切片进行背散射电子成像,获得位于样品切片内的不同深度处的初始扫描图像后,通过主成分分析方法对各初始扫描图像进行处理来获得与样品切片内的不同深度处相对应的优化扫描图像,最后通过分别对各优化扫描图像进行对比度调整和滤波处理,以提高样品切片图像在Z轴方向上分辨率和图像质量。本发明针对包埋有样品切片的连续超薄切片,在不改变电镜设备硬件条件的情况下,通过对样品切片内不同深度处的扫描成像和相应的图像处理方法,达到提高大尺度样品切片Z轴分辨率的目的。

[0115] 最后应当说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其限制;尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明,所属领域的普通技术人员应当理解:依然可以对本发明的具体实施方式进行修改或者对部分技术特征进行等同替换;而不脱离本发明技术方案的精神,其均应涵盖在本发明请求保护的技术方案范围当中。

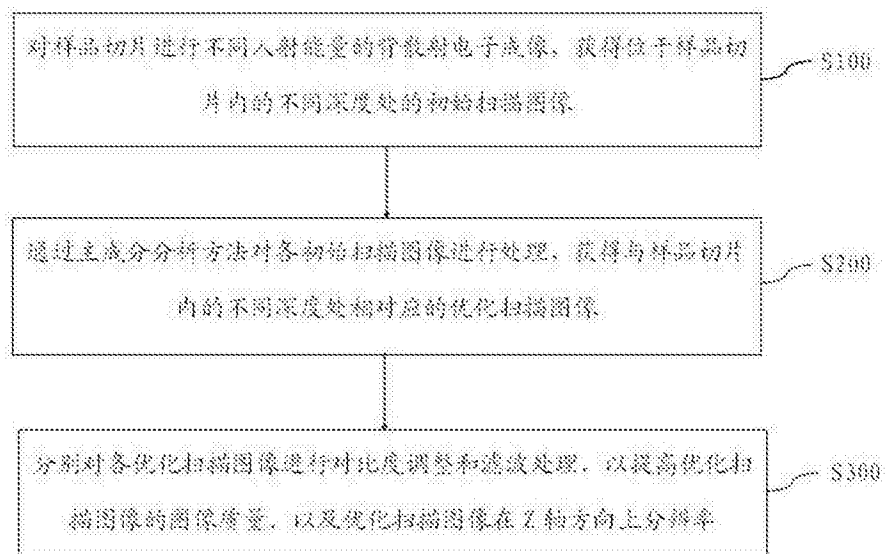


图1

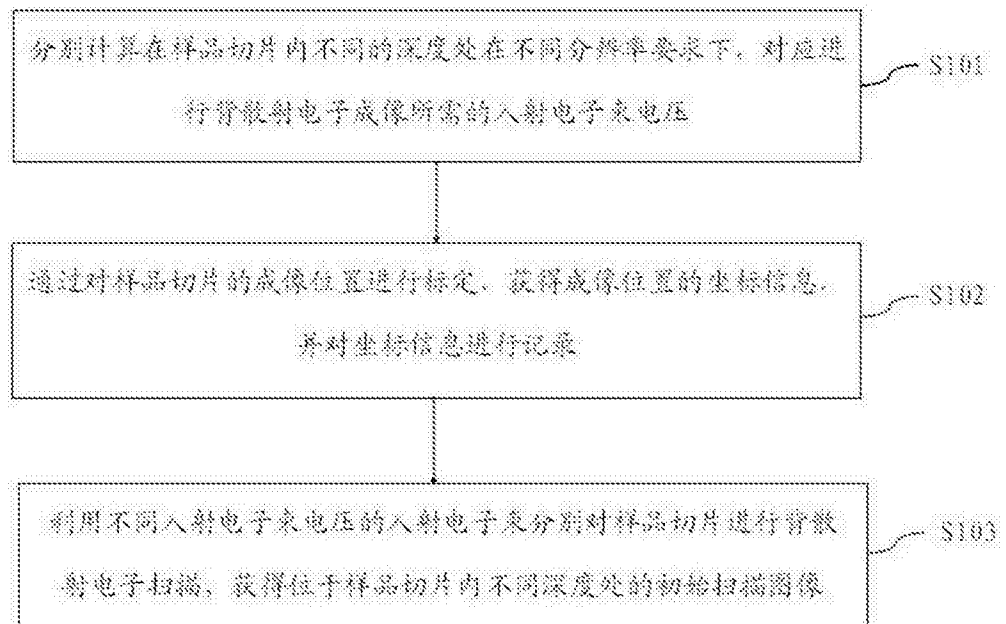


图2

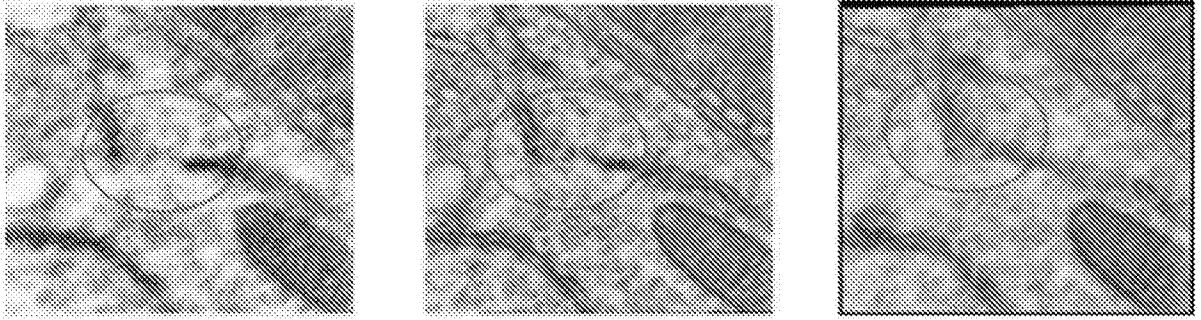


图3

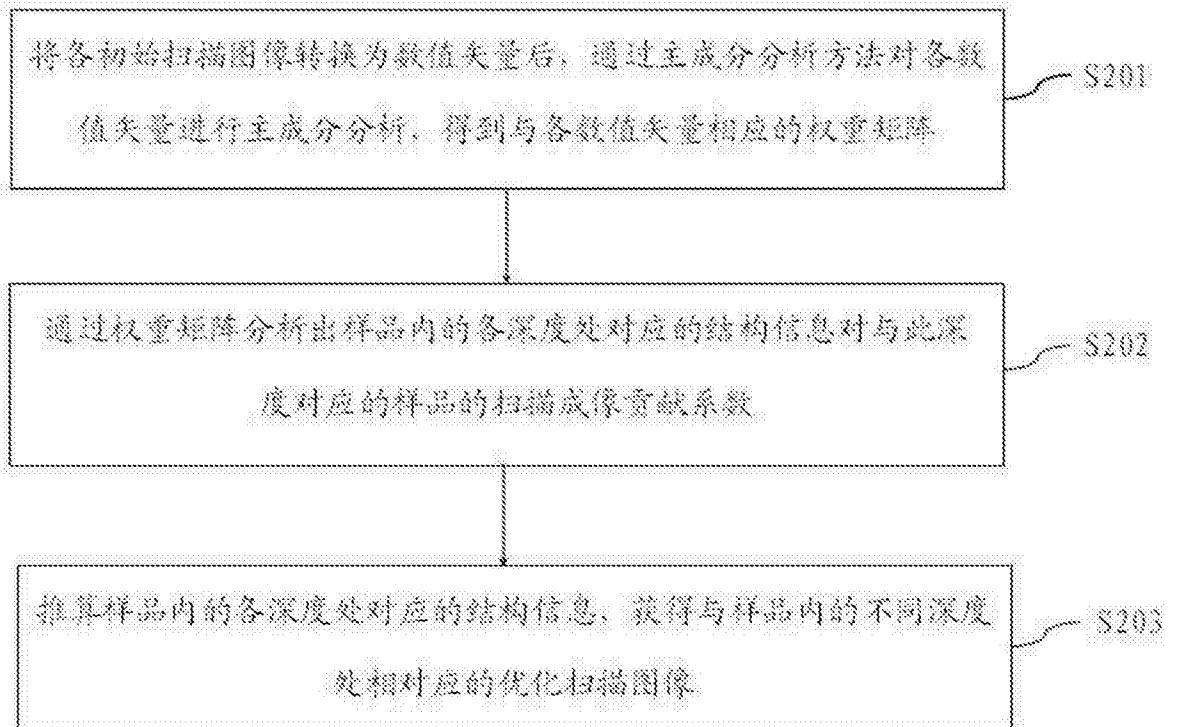


图4

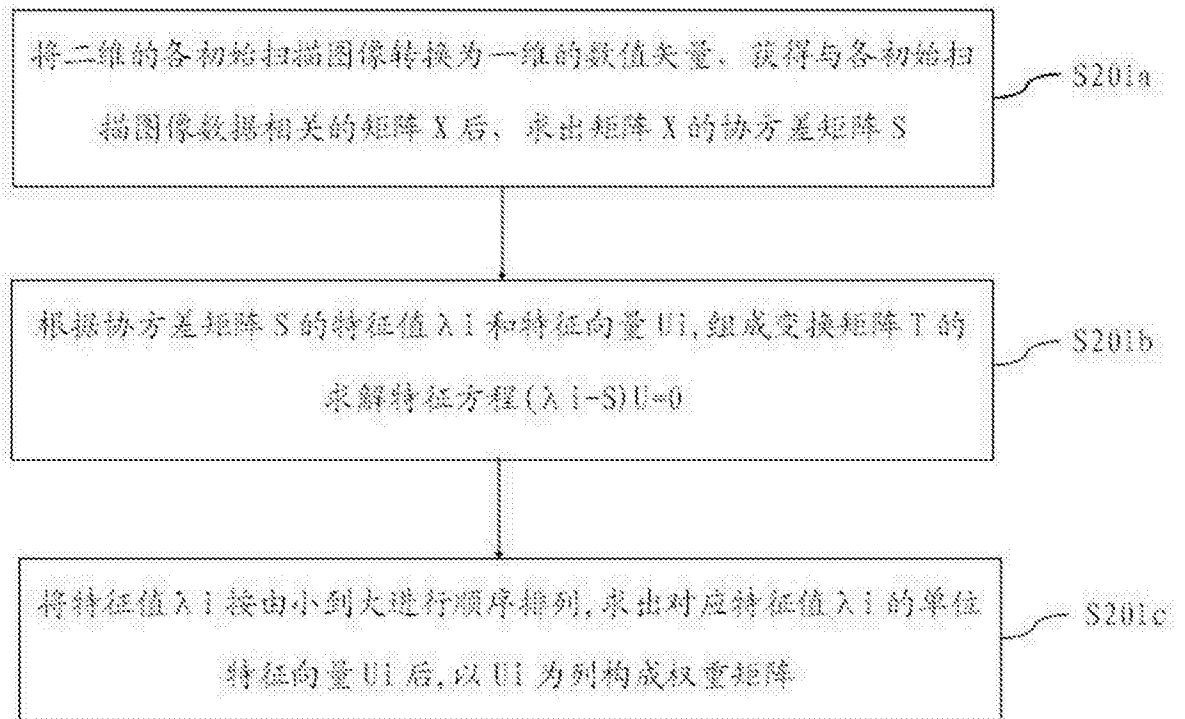


图5

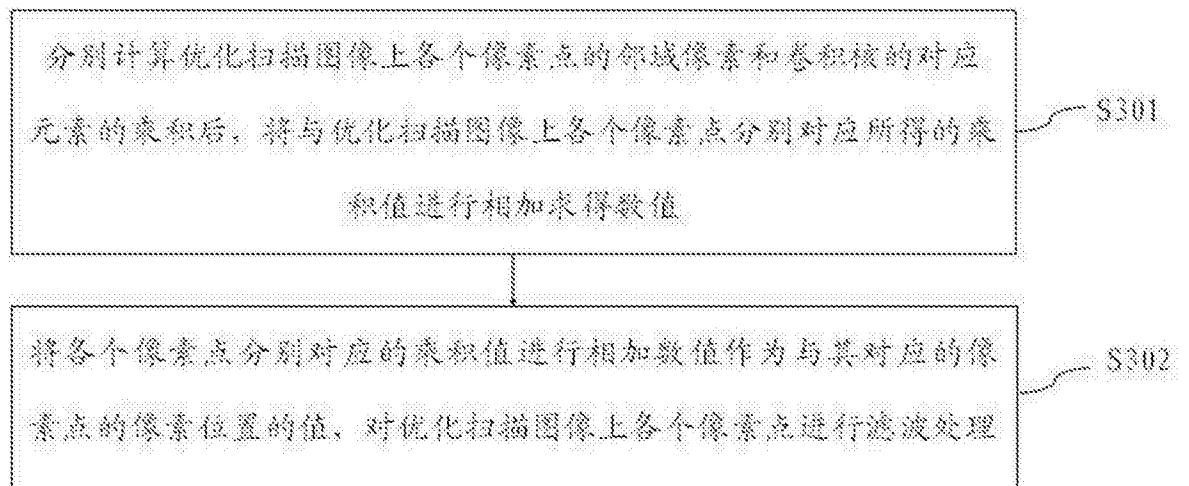


图6

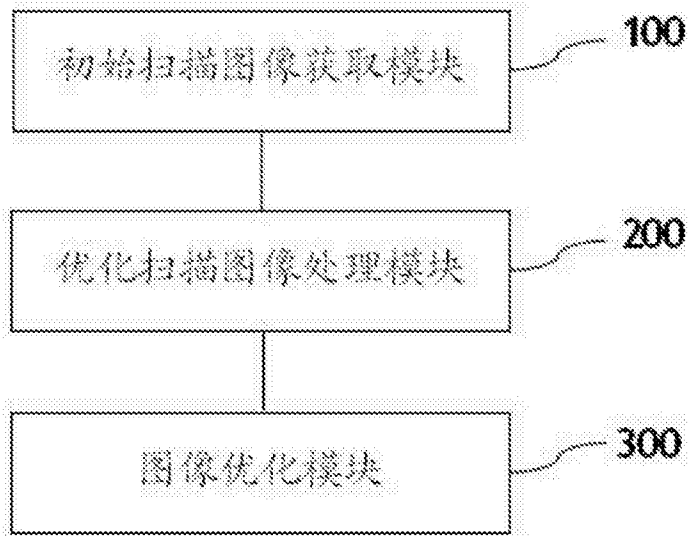


图7

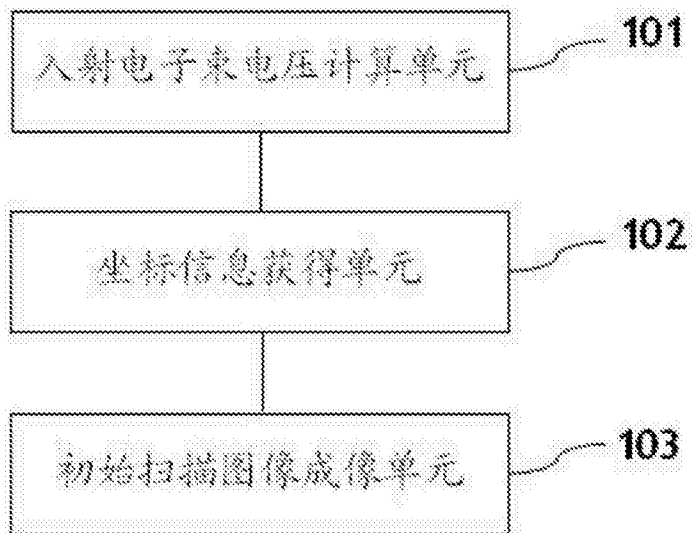


图8

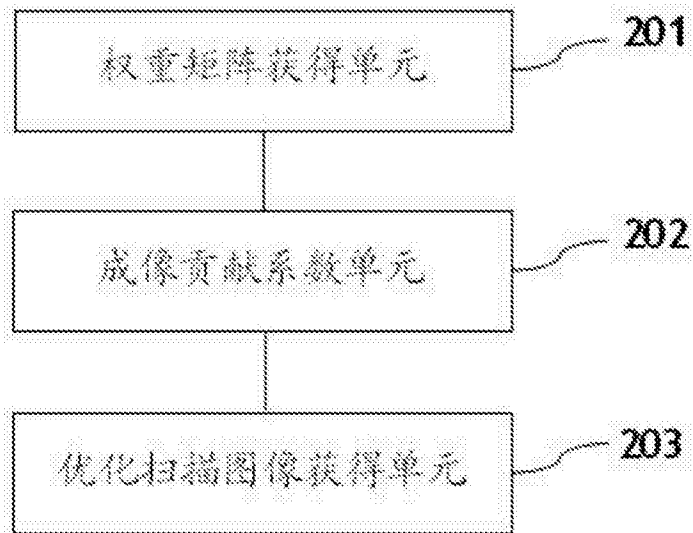


图9

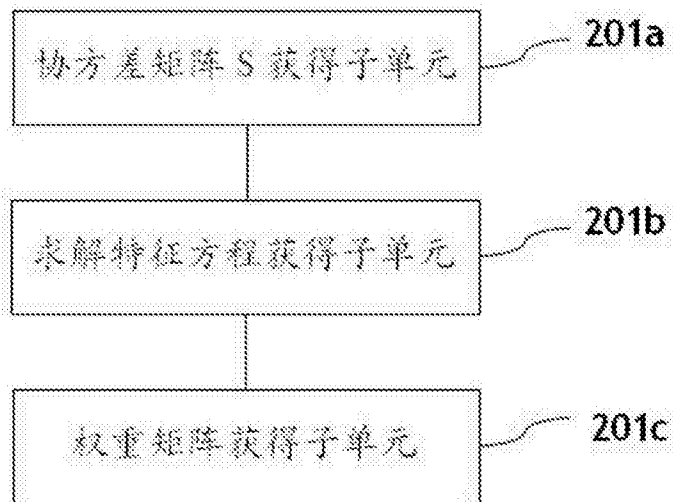


图10

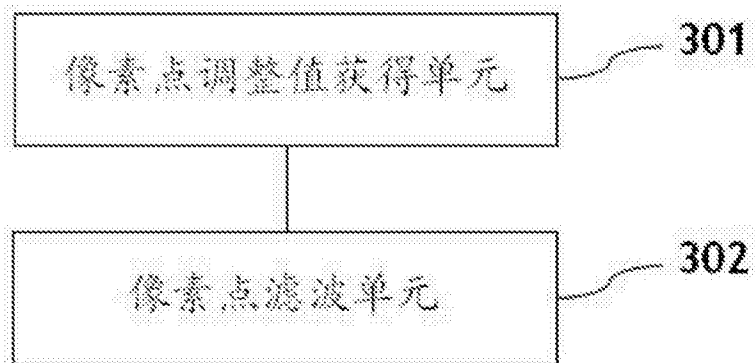


图11