

# Лекции 9-10

## Флуоресцентные красители ч. 2

Цифровая микроскопия:  
свойства и характеристики  
цифровых камер

Запись цифрового изображения

# Детектирование флуоресценции

Квантовый выход ( $Q_e$ ) рассчитывается как вероятность излучательного перехода. Он всегда меньше единицы, но может приближаться к ней. Квантовый выход флуоресцеина (в пике) – 92%.

Эффективность детектирования флуоресценции зависит от интенсивности источника, квантового выхода (возбуждение) и от полосы пропускания запирающего фильтра.

Для оценки эффективности регистрации флуоресценции для большинства красителей используются специальные программы – например, *Spectra viewer*.

Спектры некоторых красителей могут изменяться при их взаимодействии с клеткой (как правило – сдвиг эмиссии в более длинноволновую сторону и расширение ее спектра).

# Подбор красителей и фильтров – Spectra viewer

	Channel 1			Channel 2			Channel 3		
	Ex1	Em1	$\Sigma$ 1	Ex2	Em2	$\Sigma$ 2	Ex3	Em3	$\Sigma$ 3
<b>TagFPs</b>									
<input checked="" type="checkbox"/> TagBFP	0.34	0.43	1462	0.00	0.09	0	0.00	0.00	0
<input type="checkbox"/> TagCFP									
<input type="checkbox"/> TagGFP2									
<input checked="" type="checkbox"/> TagYFP	0.01	0.00	0	0.14	0.44	616	0.00	0.03	0
<input type="checkbox"/> TagRFP									
<input checked="" type="checkbox"/> mKate2	0.01	0.00	0	0.02	0.00	0	0.30	0.30	900
<b>TurboFPs</b>									
<input checked="" type="checkbox"/> TurboGFP	0.04	0.04	16	0.44	0.34	1496	0.00	0.01	0
<input type="checkbox"/> TurboYFP									
<input checked="" type="checkbox"/> TurboRFP	0.00	0.00	0	0.09	0.02	18	0.44	0.22	968
<input type="checkbox"/> TurboFP602									
<input type="checkbox"/> TurboFP635									
<input type="checkbox"/> TurboFP650									
<b>Special FPs</b>									
<input type="checkbox"/> NirFP									

Value  $\Sigma$  is shown in red in the occurrence of an inappropriate combination of excitation and emission wavelengths in the same channel.

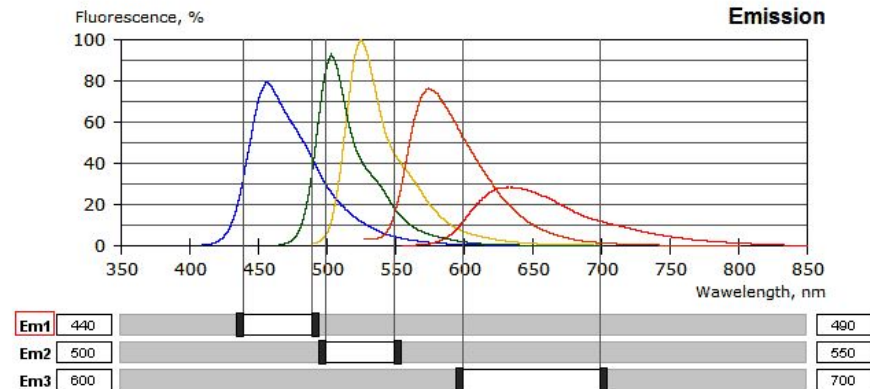
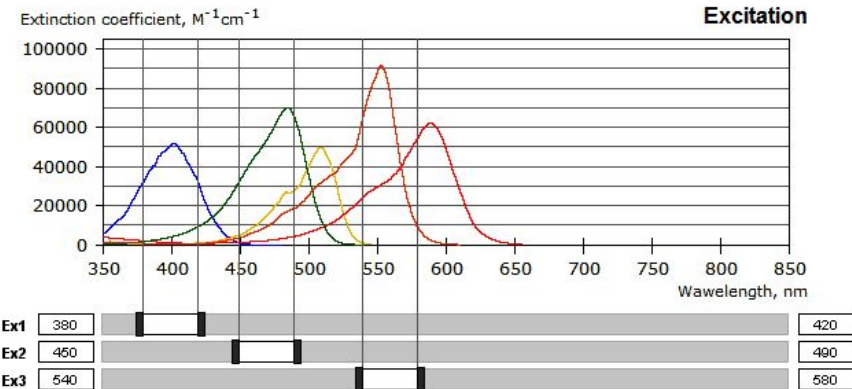
## Non-normalized spectra / wide-field excitation

Non-normalized view allows for the comparison of excitation and emission efficiencies of different FPs between each other within the selected wavelength range. Here the amplitude of each excitation peak is equal to the maximal molar extinction coefficient of the corresponding FP, and the total area of each emission spectrum is equal to the fluorescence quantum yield of the corresponding FP.

**Ex:** Relative efficiency of excitation by light of the selected wavelength range. The value is calculated as the ratio of the area under the excitation curve limited by selected wavelengths to the total area of excitation spectrum of NirFP (the reporter with the largest area of excitation spectrum among currently available Evrogen FPs).

**Em:** Quantum yield of corresponding fluorescent protein within the selected wavelength range. The value is calculated for each particular FP as a portion of the area under the emission curve, limited by selected wavelengths.

**$\Sigma$ :** Product of **Ex** and **Em**, X 10000. The value reflects the total brightness of the signal, collected in the corresponding channel.



The data provided by Spectra Viewer can be used only for preliminary estimation of relative reporter's suitability for your instrumentation; the actual performance should be tested experimentally and may vary.

Интерактивная система, позволяющая просмотреть спектры выбранных красителей и оценить их совместимость.

# Подбор светофильтров для красителя

Определение спектра возбуждения и испускания красителя – максимумы, ширина, асимметрия.

Максимальная яркость – детектирование отдельных молекул и другие случаи слабых сигналов. Используется широкая полоса пропускания запирающего фильтра или LP запирающий фильтр. Такой подход неудобен для одновременного использования нескольких красителей. Также он может приводить к относительному возрастанию автофлуоресценции. Используется чаще всего для дальнего красного света.

Для максимальной селективности (при достаточной яркости сигнала) используются относительно узкие полосы пропускания возбуждающего и запирающего фильтров, которые максимально соответствуют пикам поглощения и эмиссии красителя. Это позволяет уменьшить автофлуоресценцию (которая всегда имеет широкий спектр) и добиться большей селективности при работе с несколькими флуорохромами.

# Совместное использование нескольких красителей

Все спектры флуоресценции органических красителей широкие. Поэтому при совместном использовании более двух красителей, как правило, возникает эффект перекрывания сигналов.

При подборе красителей необходимо, чтобы расстояние между максимумами их эмиссий было не менее 40-50 нм. Желательно – 60 нм и более. Таким образом, максимальное число цветов для визуального наблюдения составляет не более трех, для инструментального (без специальных мер) – не более четырех.

Поскольку большинство спектров флуоресценции асимметричны («красный хвост»), то флуоресцентный сигнал от красителя с меньшим максимумом эмиссии «затекает» в канал более длинноволнового красителя, но не наоборот.

Для уменьшения эффекта перекрывания помимо подбора светофильтров используется процедура «компенсации», которая проводится на цифровых изображениях.

# Перекрывание сигналов

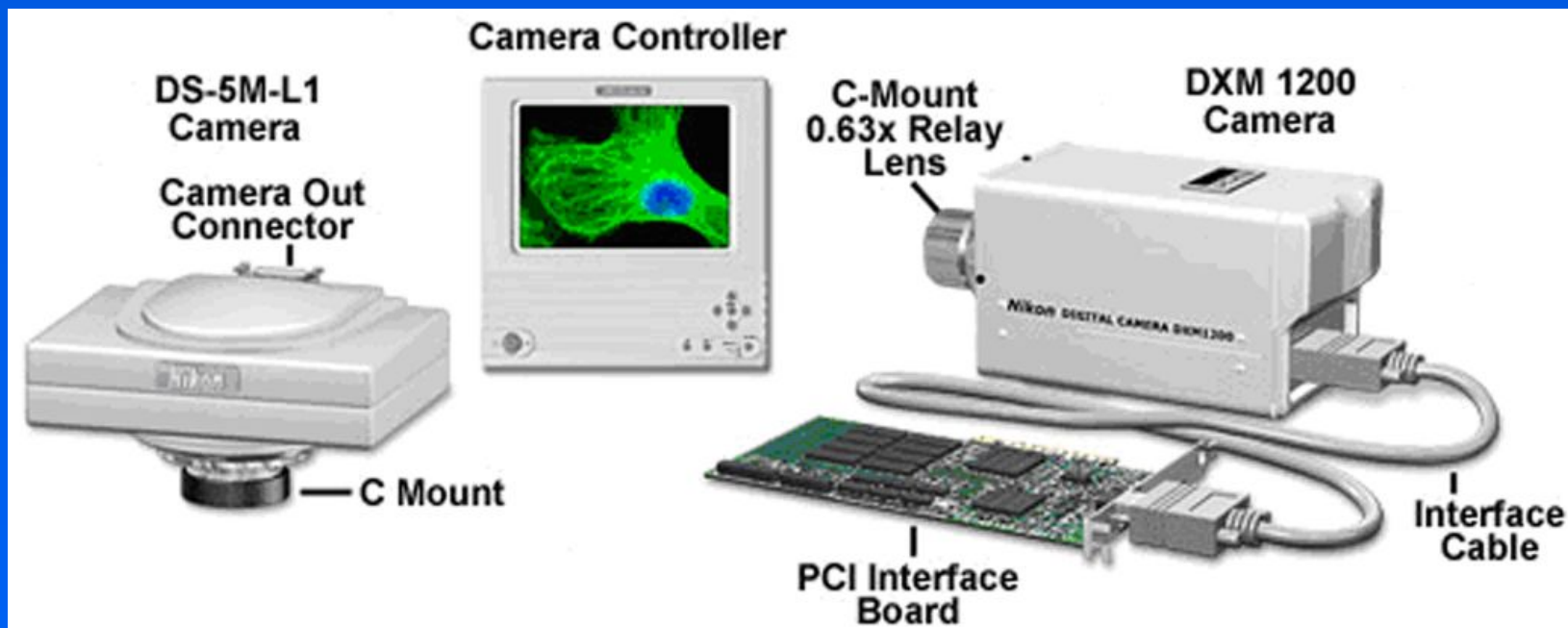
Fluorophore Filter Set	Relative Fluorophore Contributions for Each Filter Set								
	DAPI	SpAqua	SpGreen	SpGold	SpOrange	SpRed	Cy5 / FRed	Cy5.5	Cy7
DAPI	100%	30%	0%						
SpAqua	0%	100%	1%	0%					
SpGreen	0%	0%	100%	3%	0%				
SpGold		0%	2%	100%	49%	1%			
SpOrange			0%	36%	100%	11%	0%		
SpRed				0%	15%	100%	1%	0%	
Cy5 / FRed					0%	12%	100%	53%	1%
Cy5.5						0%	53%	100%	6%
Cy7							0%	12%	100%

Grey combinations are not recommended

При одновременном использовании нескольких флуорофоров основная проблема состоит в возможном перекрывании сигналов. Величина перекрывания зависит от спектров красителей и применяемых запирающих светофильтров.

# **Цифровая микроскопия: свойства и характеристики цифровых камер**

# ПЗС камеры



ПЗС – прибор с зарядовой связью  
(CCD – charged coupled device)



# Устройство ПЗС камеры

Фотодиодная матрица

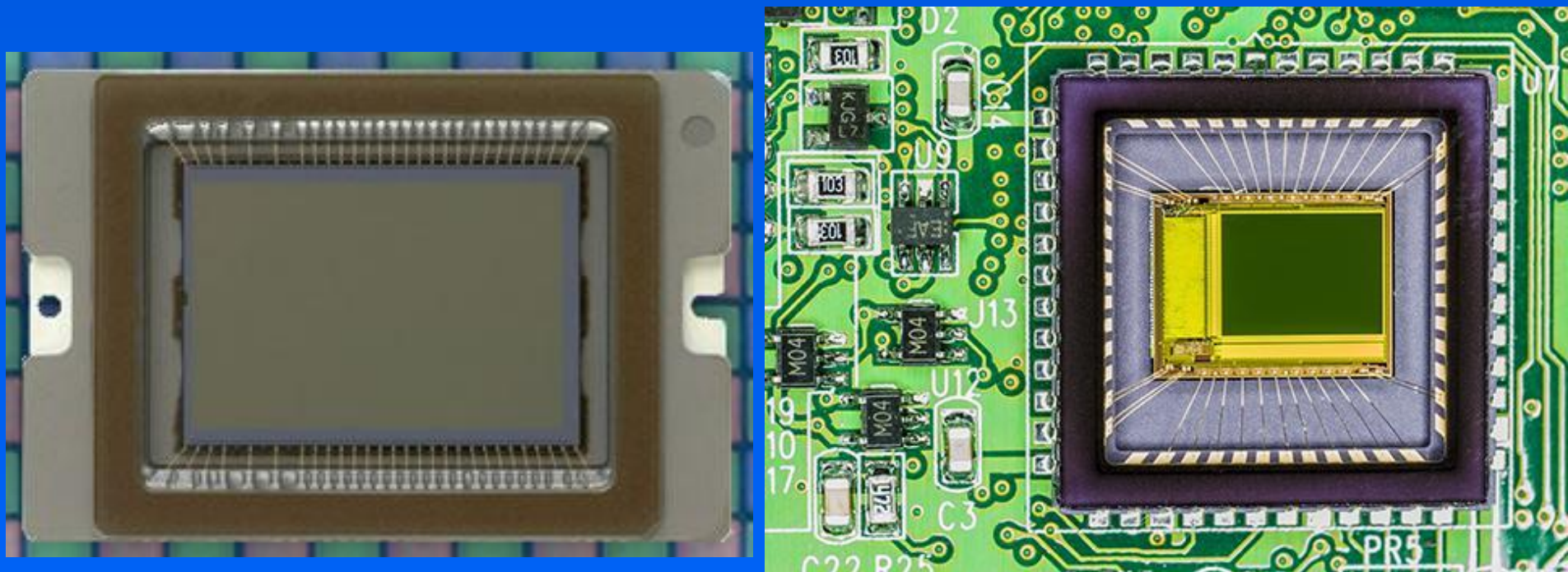
Устройство для экспозиции, считывания и обнуления

Усилитель выходного сигнала

Аналого-цифровой преобразователь сигнала (АЦП)

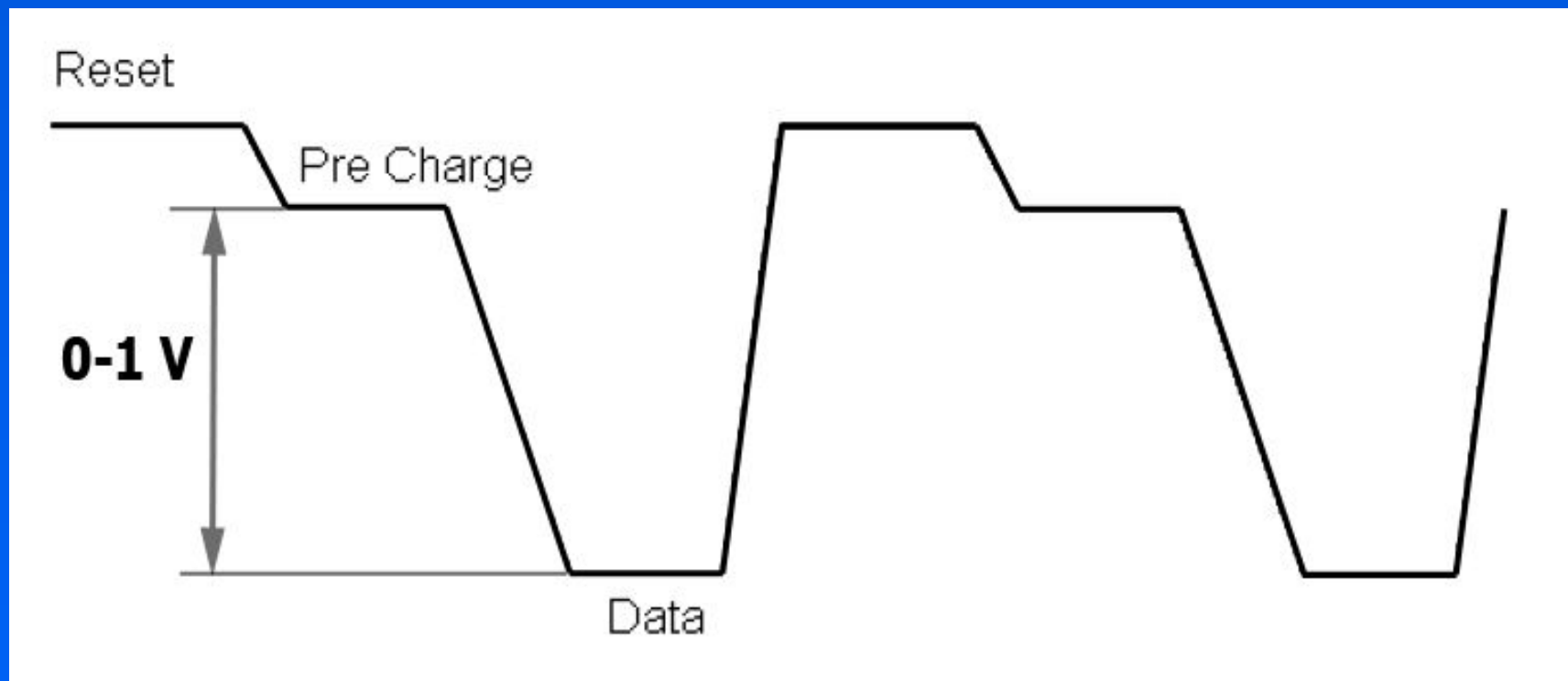
Охлаждаемая ПЗС камера имеет кроме того:  
вакуумированный корпус; систему охлаждения матрицы и считывающего устройства (ячейка Пельтье + воздушное или водяное охлаждение)

# Общий вид матрицы и ПЗС камеры



Слева – фотодиодная матрица, справа – матрица на основной плате камеры.

# Работа фотодиода



**Цикл работы фотодиода:**

**Обнуление – заряд – накопление – считывание – обнуление**

**Максимальный заряд фотодиода – емкость ячейки**

# Основные характеристики ПЗС (КМОП)-камеры

Тип камеры (cooled CCD, EMCCD, sCMOS); наличие микролинз;  
global shutter/rolling shutter

Охлаждение – нет, воздушное, водяное. Температура матрицы –  
ниже комнатной на 10-15°; отрицательная (-25°С и ниже)

Количество (строка x столбец) и размер ячеек (в мкм) – размер  
кадра (диагональ в мм).

Квантовый выход (в процентах) и спектр чувствительности.

Максимальная емкость (заряд) ячейки – в тысячах электронов.

Разрядность АЦП (системы считывания) – 8, 12 или 16 бит.

Темновой ток (электронов на ячейку в секунду).

Частота считывания – МГц (10-500). Может быть переменной.

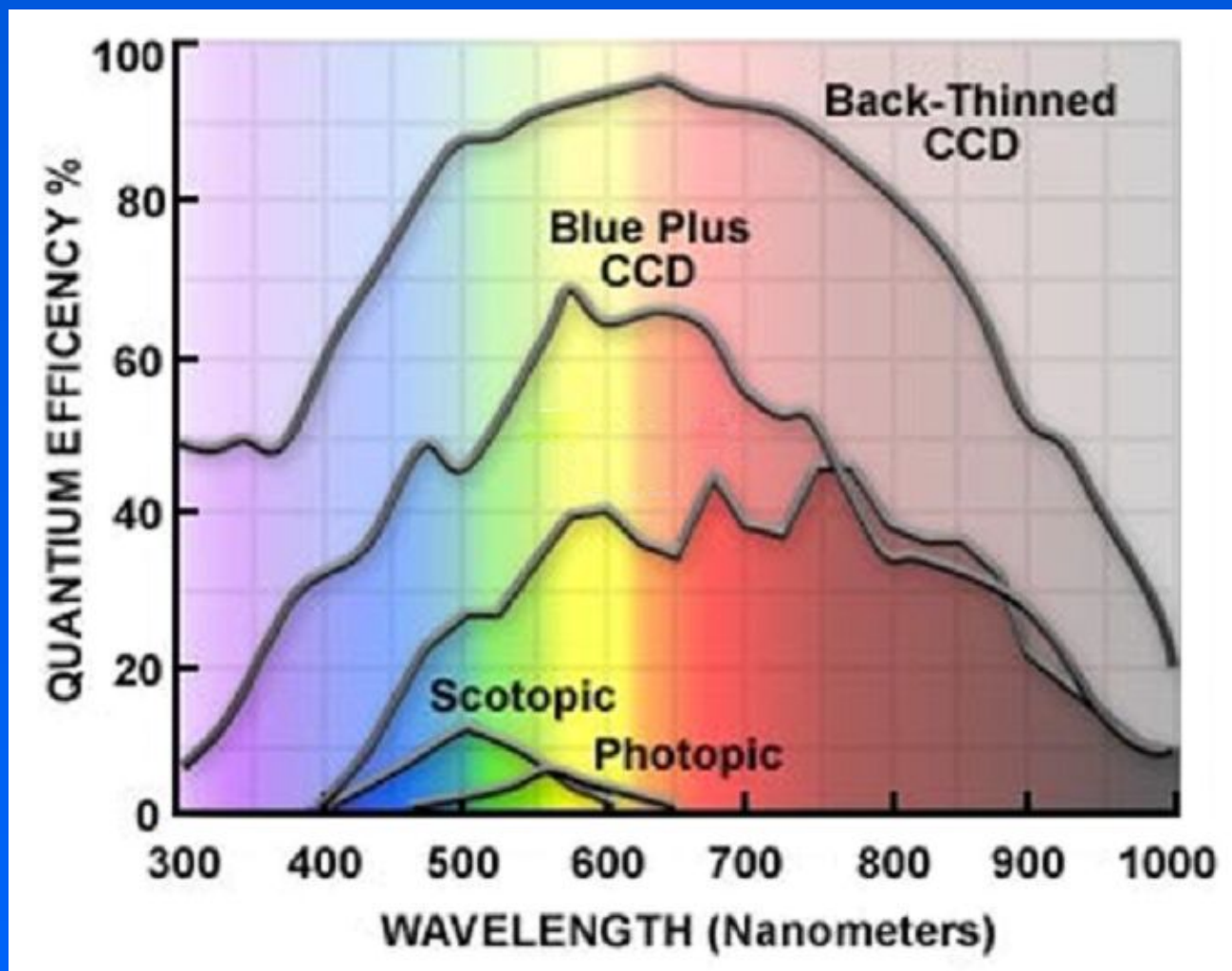
Шум считывания (электронов на ячейку).

# КМОП-камеры

КМОП-матрица (CMOS, «Complementary Metal Oxide Semiconductor») выполнена на основе КМОП-технологии. Каждый пиксел снабжён собственным усилителем считывания, а выборка сигнала с конкретного пиксела происходит, как в микросхемах памяти, произвольно.

Гибридная схема – sCMOS. Матрица выполнена по принципу КМОП камеры, а считывание производится из двух полукадров.

# Спектр светочувствительности



Спектр чувствительности определяется конструкцией чипа. Два основных типа – с максимумом около 600-650 нм (обладают высокой чувствительностью в ближнем ИК) с максимумом около 450-500 нм.

# Темновой ток и шум считывания

Темновой ток измеряется в количестве электронов на ячейку в секунду. Его природа – тепловое движение электронов.

Величина темнового тока экспоненциально растет с температурой и зависит от размера фотодиода. Для уменьшения темнового тока матрицу камеры охлаждают.

Шум считывания (электронов на ячейку) есть погрешность, возникающая из-за относительно быстрого «пересчета» электронов. Он зависит от конструкции матрицы и АЦП и возрастает со скоростью считывания (частотой).

Частота считывания камер измеряется в МГц и составляет от 0.5 до 200 и более МГц. Может быть регулируемой. В этом случае шум считывания указывается отдельно для каждой частоты.



# Емкость ячейки и разрядность АЦП

Максимальная емкость (заряд) ячейки измеряется в тысячах электронов. Она пропорциональна площади фотодиода и составляет на практике от 20000 (размер 4,5 мкм) до 350000 (размер 16 мкм).

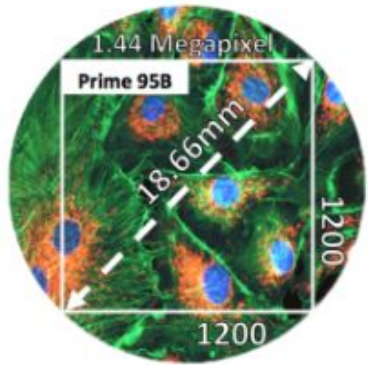
Камеры «научной» градации имеют емкость фотодиодов не менее 40000 электронов (размер более 5 мкм).

Разрядность АЦП (системы считывания) составляет 8, 12, 14 или 16 бит, что соответствует числу уровней серого  $2^8 = 256$ ;  $2^{12} = 4096$ ;  $2^{14} = 16384$ ;  $2^{16} = 65536$ . Разрядность записи числа уровней серого в компьютере составляет 8 или 16 бит.

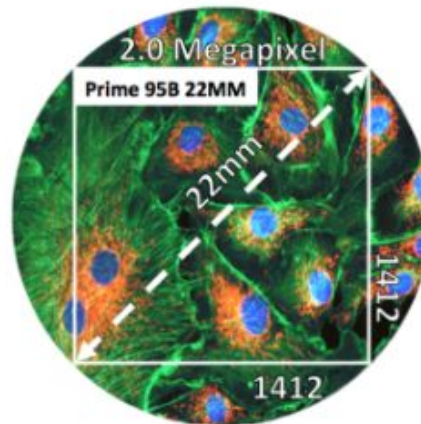
Монохромные камеры «научной» градации имеют разрядность АЦП не менее 12 бит. При этом запись изображения в компьютере производится с разрядностью 16 бит, однако «верхние» уровни яркости оказываются незаполненными.



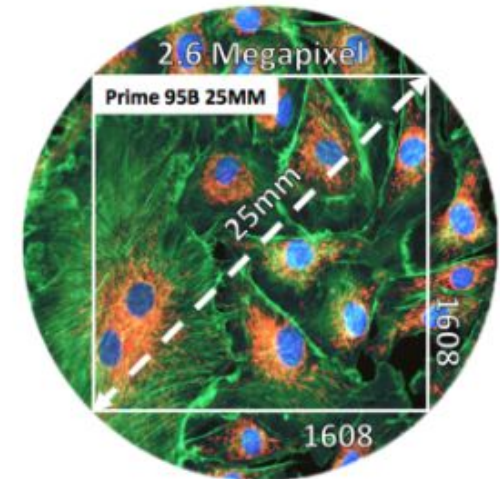
# Количество и размер ячеек определяют размер матрицы



Fits 19 mm C-mount  
microscope ports



Fits 22 mm C-mount  
microscope ports



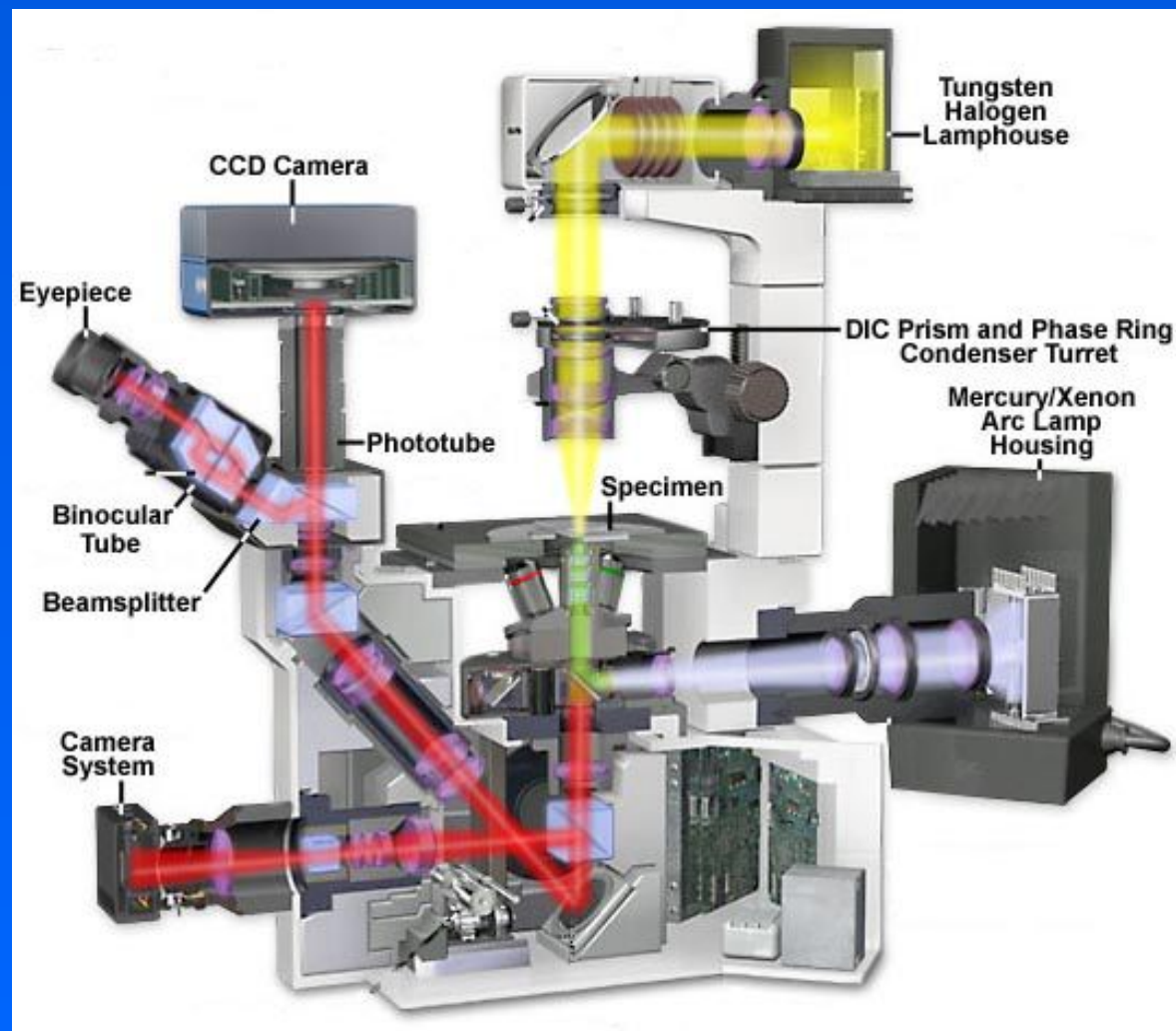
Fits 25 mm F-mount  
microscope ports

**Фотодиод имеет квадратную форму и размер в несколько микрон (2.5-15 мкм).**

**Размер матрицы определяется как произведение размера ячейки (фотодиода) на число строк и столбцов. Он может указываться точно (мм,мм) или приблизительно (в долях дюйма).**

**Камеры для микроскопии имеют размер, как правило, от 1 до 15 мегапикселей.**

# Инвертированный флуоресцентный микроскоп



# Установка камеры на микроскоп

Установка камеры производится с помощью специального механического адаптера. Камера не имеет объектива.

Прямой микроскоп – тринокулярный тубус со светоделителем. Для установки камеры используется специальная оптика (фотоокуляр).

Инвертированный микроскоп имеет боковой порт со светоделителем или зеркалом; иногда - нижний порт (под станиной). Для установки камеры в порту микроскопа изготовителем устанавливается линза, создающая действительное изображение, совпадающее с тем, которое рассматривается в окуляры. Дополнительная оптика нужна, только если необходимо изменять масштаб изображения, проецируемого на матрицу камеры (растягивать или сжимать).

Стандартное присоединение камеры – C-mount (резьба диаметром 25 мм или 1 дюйм).

# Адапторы для камеры



Простейший адаптер для камеры – c-mount, с регулируемой длиной тубуса и без линз. Он дает увеличение  $\times 1$  (устанавливается на специальном выходе инвертированного микроскопа).

На прямом микроскопе внутри адаптера может располагаться фотоокуляр (система переноса зрачка).

Более сложный адаптер имеет встроенную линзу для масштабирования с фиксированным увеличением (от 0,3 до 2,5).

# Условие парфокальности

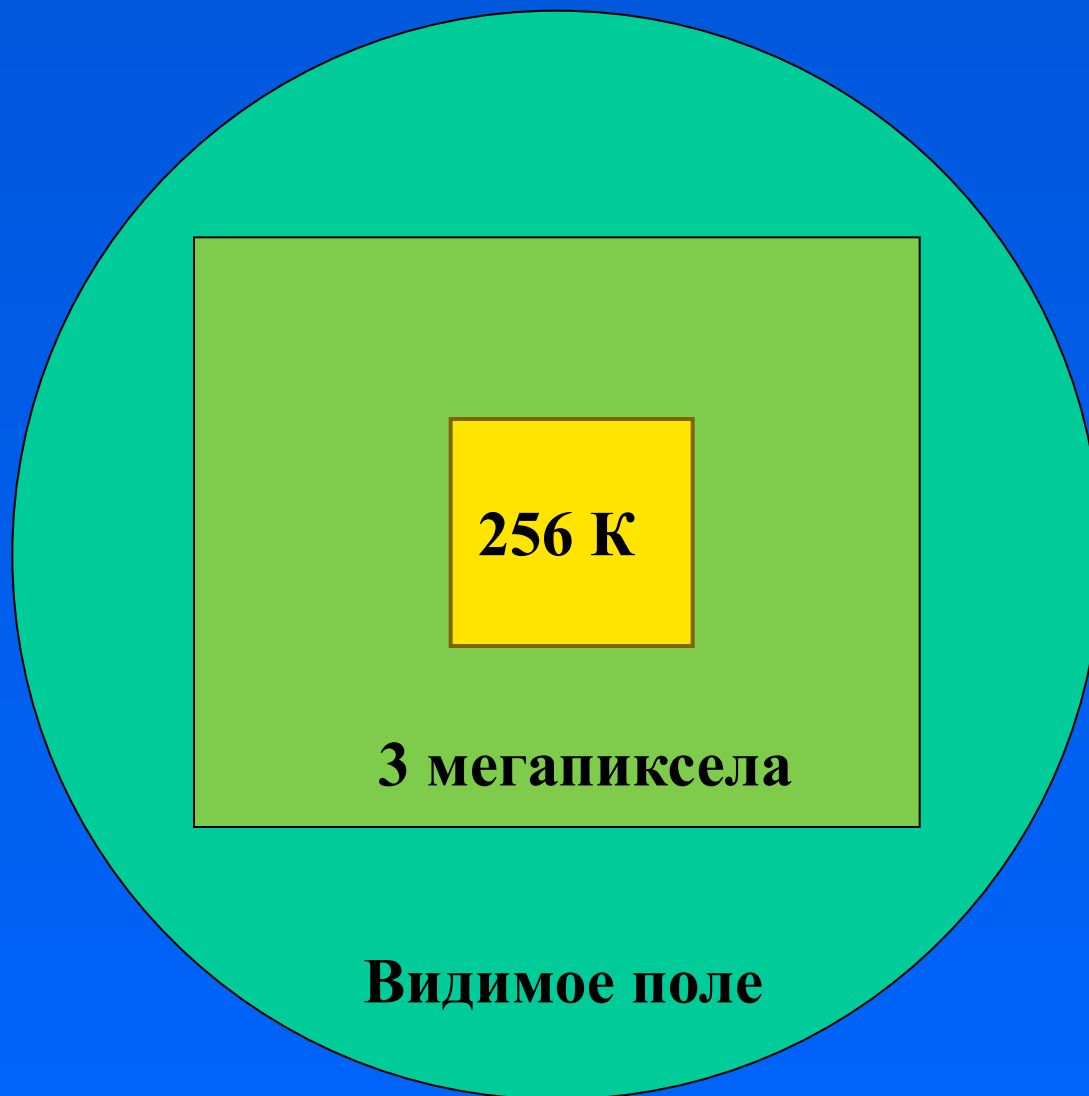
Правильная установка камеры предполагает, что изображение фокусируется на матрице при том же положении препарата на столике относительно объектива, когда оно резко изображается в окулярах (условие парфокальности).

Парфокальность камеры проверяется в процессе установки света по Келеру. Она достигается перемещением камеры относительно тубуса (станины) микроскопа.

Поскольку глубина резкости в пространстве изображений минимальная при малых увеличениях, то настройка парфокальности проверяется в объективом  $\times 10$  или меньше (желательно –  $\times 2,5$ - $\times 4$ ).

Независимая подстройка окуляров под камеру по внутренней маске – возможна только в некоторых микроскопах.

# Соотношение полей зрения



При правильной пикселизации соотношение видимого поля (окуляр 18 мм) и поля камеры выглядит примерно так.

# Основные производители профессиональных камер для микроскопии

Andor – iXON series (512x512, 1024x1024; 16 bit, QE 90% 10-20 MHz), EMCCD; CMOS – Zyla 4.2, Neo (4.2 MPx, 5.5 MPx; 16 bit, QE 60-72%, pixel size 6.45  $\mu\text{m}$ ; 200-500 MHz).

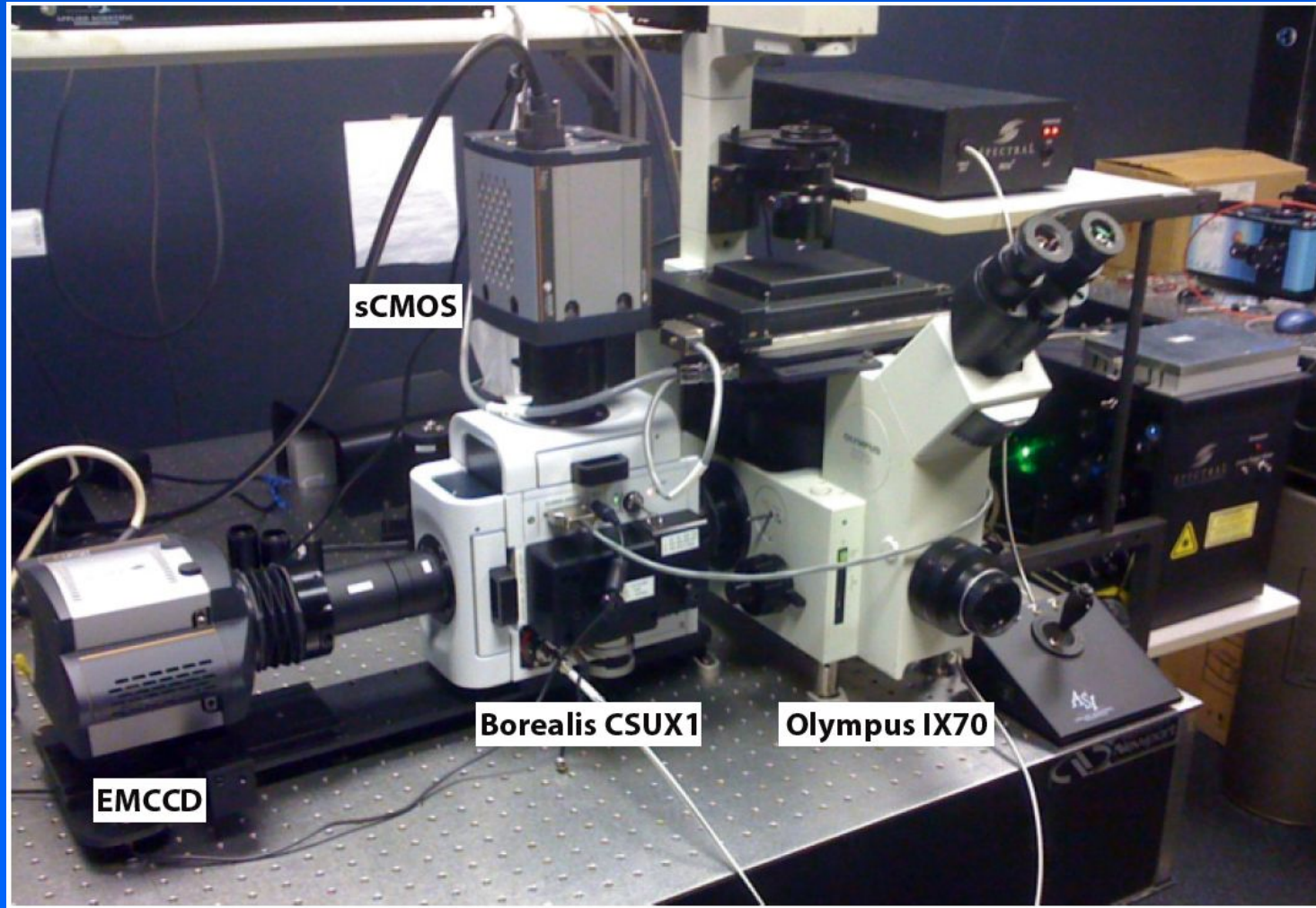
Hamamatsu Photonics – CMOS ORCA Flash 4.0 (4,2 MPx, 16 bit, QE~80%; pixel size 6.45  $\mu\text{m}$ ).

Photometrics – Prime 95B (различные матрицы – от 1.4 до 2.7 MPx; 16 bit, QE~95%, pixel size 11  $\mu\text{m}$ ); Iris 15 Scientific (15 MPx, QE 73%, pixel size 4.25  $\mu\text{m}$ ). Максимальная скорость считывания – 30 кадров в секунду и более.

Производители микроскопов (Карл Цейсс, Лейка, Никон, Олимпус) также выпускают ПЗС/КМОП камеры для микроскопов, но они значительно уступают лидерам по своим характеристикам.



# Микроскоп – общий вид





# Запись цифрового изображения

## Основные этапы:

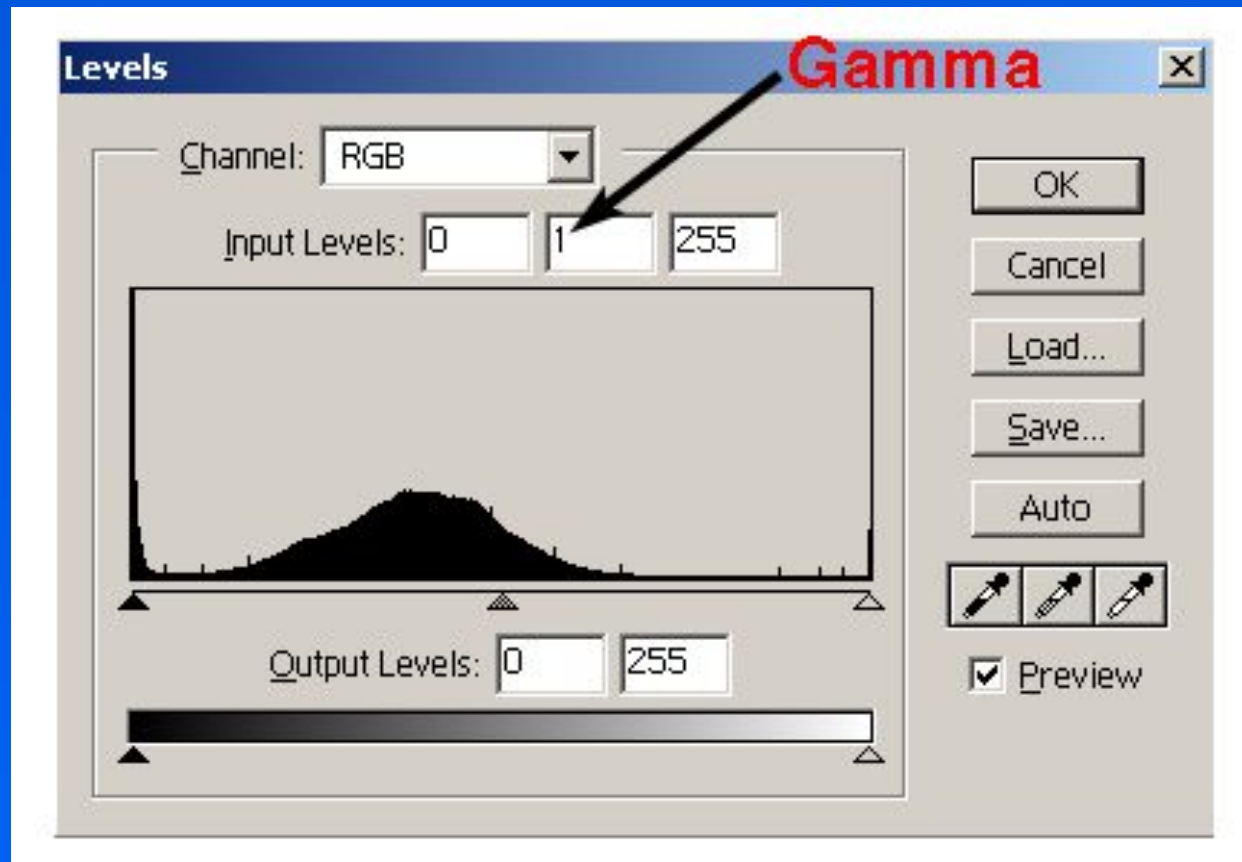
Определение необходимого разрешения (объектива и эквивалентного размера пиксела).

Проверка установки освещения (по Келеру).

Настройка гистограммы яркости – подбор экспозиции и настроек камеры для получения максимального отношения сигнал/шум.

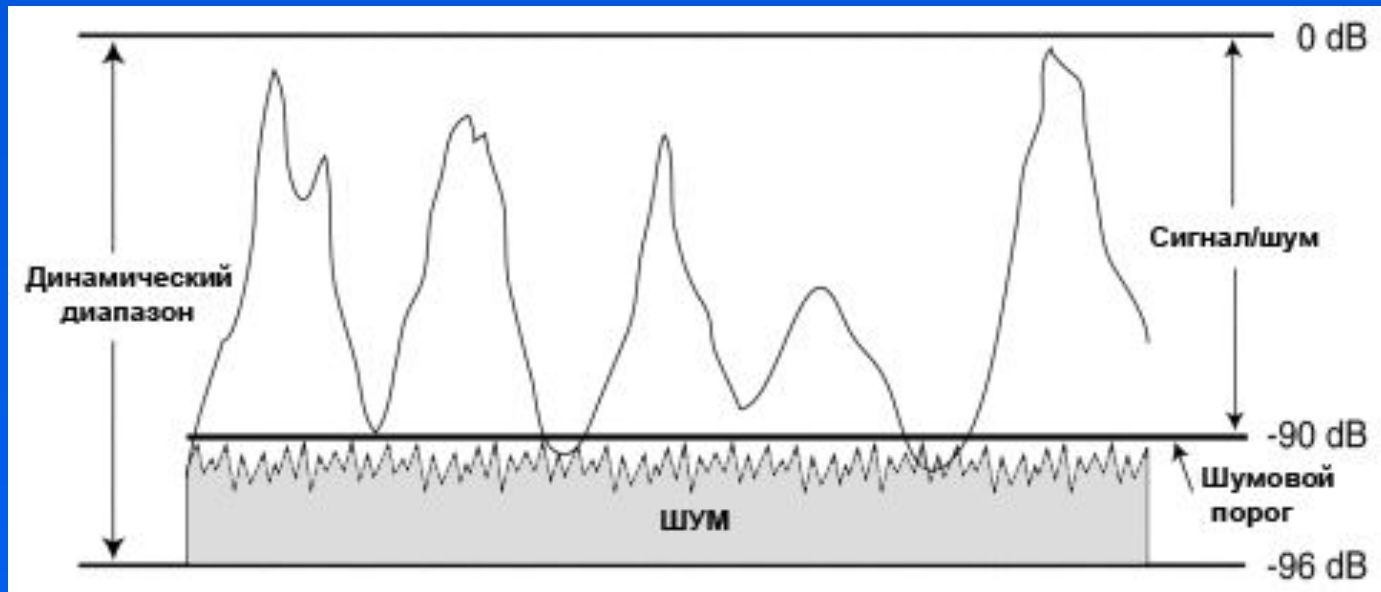
Запись изображения производится в формате TIFF (другие нежелательны), максимальное число бит на канал (ограничивается АЦП и контроллером камеры). Если прямая запись в формате TIFF с максимальной разрядностью невозможна (режим RAW или аналогичный), то необходимо выяснить, как можно данный формат преобразовать в 16-и битный TIFF.

# Гистограмма яркости



График, показывающий распределение пикселей по интенсивности, называется гистограмма яркости. В зависимости от условий съемки она может иметь различный вид.

# Отношение сигнал/шум



Максимальная величина отношения сигнал/шум является характеристикой записывающей аппаратуры.

Она обычно выражается в децибелах (логарифмическая шкала с основанием 10 – 10 дБ соответствуют  $SNR=10$ , 20 дБ –  $SNR=100$  и т.д.). Для идеального цифрового устройства  $SNR$  соответствует разрядности АЦП (8 бит – 24 дБ; 12 бит – 36 дБ; 16 бит – 48 дБ).

На практике максимальное отношение может дополнительно ограничиваться условиями съемки.

# Отношение сигнал/шум в ПЗС камере

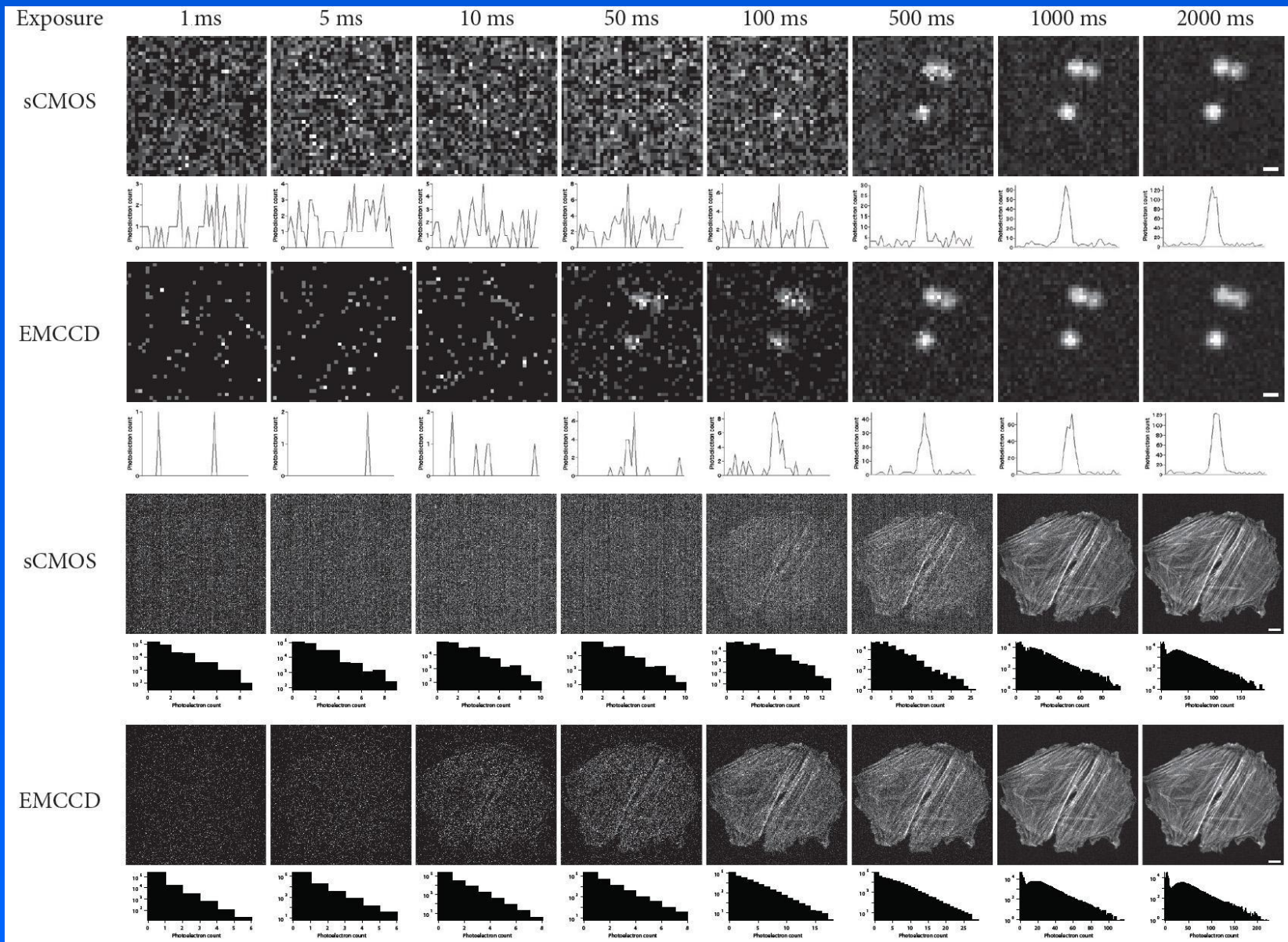
Для идеальной ПЗС камеры отношение равно квадратному корню из числа электронов. Так ячейка емкостью 50000 электронов позволяет достичь при насыщении отношения сигнал/шум  $\sim 224$ .

Поэтому камеры с маленькими ячейками не могут дать большого отношения.

Шумы камеры (шум считывания) снижают это отношение.

Система последовательного считывания приводит к неравномерному увеличению шума считывания в камере. Поэтому для научных камер используется относительно низкая скорость считывания. В большинстве современных камер имеется две скорости считывания. Меньшая скорость обеспечивает более равномерный сигнал.

# Зависимость изображения от выдержки



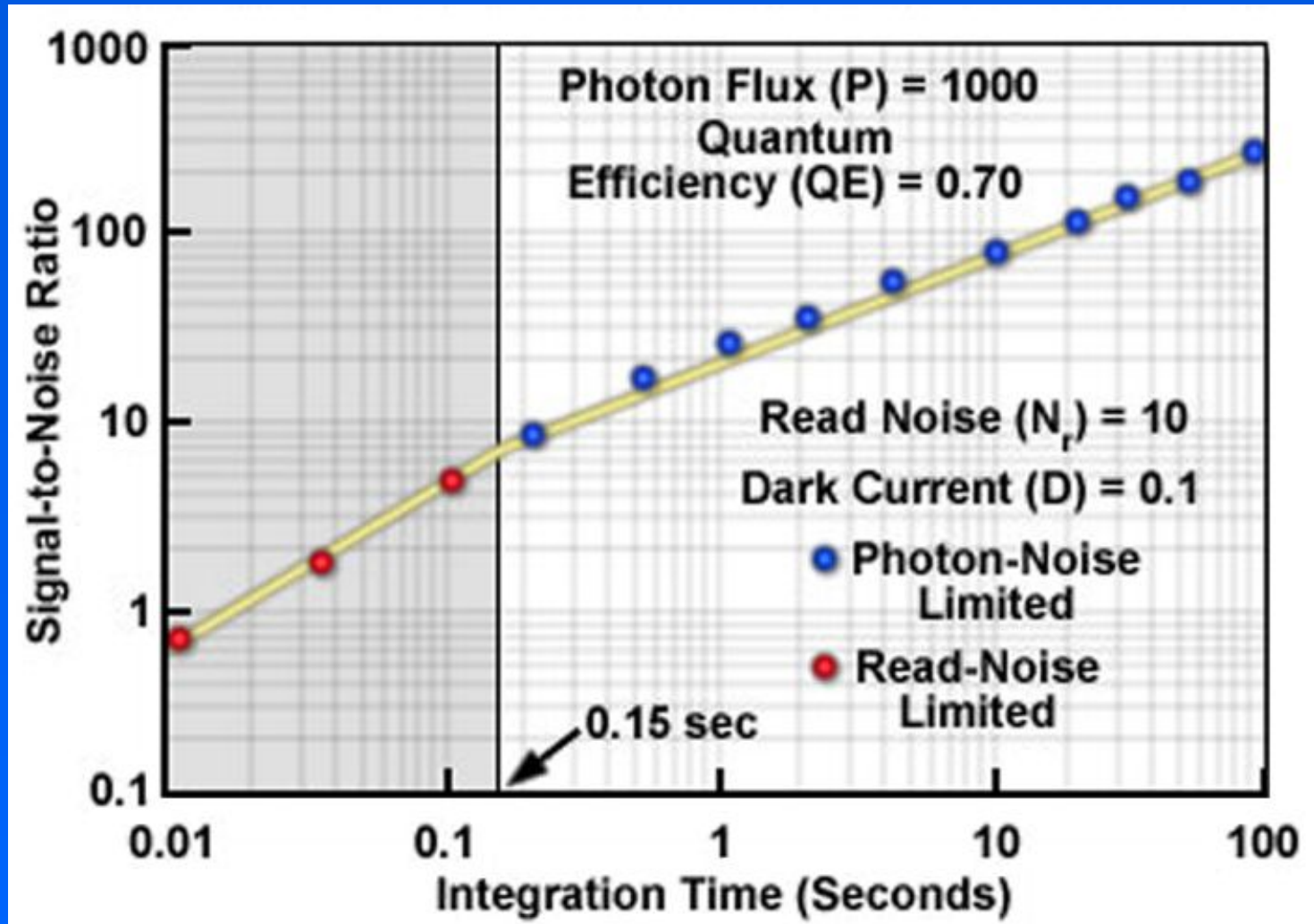
# Отношение сигнал/шум при низкой освещенности

В условиях низкой освещенности (при использовании камер с охлаждением, где темновой ток практически отсутствует) при небольших экспозициях шум считывания является основным источником неоднородностей в цифровом изображении. Отношение сигнал/шум лимитируется конструкцией камеры и растет с ростом экспозиции почти линейно.

При увеличении экспозиции (времени накопления сигнала) наступает момент, когда дробовый шум (случайные вариации в потоке фотонов, космические частицы) превышает шум считывания и темновой ток. С этого уровня отношение сигнал/шум лимитируется дробовым шумом и растет медленнее.



# Зависимость отношения сигнал/шум от времени экспозиции



# Вывод изображения на экран

Изображение, записанное с динамическим диапазоном 8 бит, теоретически может быть выведено на экран полностью, но не все его оттенки хорошо воспринимаются глазом.

Изображение, записанное камерой с динамическим диапазоном 12-16 бит, содержит большое количество информации, которая только частично отображается монитором. Для просмотра всего динамического диапазона необходимо устанавливать последовательно различные настройки изображения.

Светлые полутона воспринимаются глазом лучше, чем темные, поэтому изображение при выводе на экран часто модифицируется программным обеспечением нелинейным образом (гамма-коррекция).

Низкий контраст изображения может быть обусловлен препаратом, а может быть связан с неправильной настройкой микроскопа и камеры.

Для увеличения контраста записанного изображения применяют различные обработки. Некоторые из них не приводят к потере информации, а другие приводят.



# Разрядность АЦП и просмотр изображения

Изображение с разрядностью более 8 бит нельзя целиком вывести на экран, поскольку монитор отображает только 8 бит.

«Стандартное» выведение 16-и битного изображения предполагает, что весь динамический диапазон выводится за счет объединения соседних уровней.

Как правило, программы «шкалируют изображение» по минимуму и максимуму (то есть автоматически растягивают гистограмму яркости на экране), и интервал между ними пересчитывается в 8-и битной шкале.

Для детального просмотра полутоновых деталей (градаций серого) шкала должна быть настроена специальным образом (scale image), что достигается с использованием программ, работающих с 16-и битным изображением.

Суррогатная настройка изображения – регулировка яркости и контраста в 8-и битной шкале.

# Гистограмма яркости

График, показывающий распределение пикселей по интенсивности, называется гистограмма яркости. В зависимости от условий съемки она может иметь различный вид.

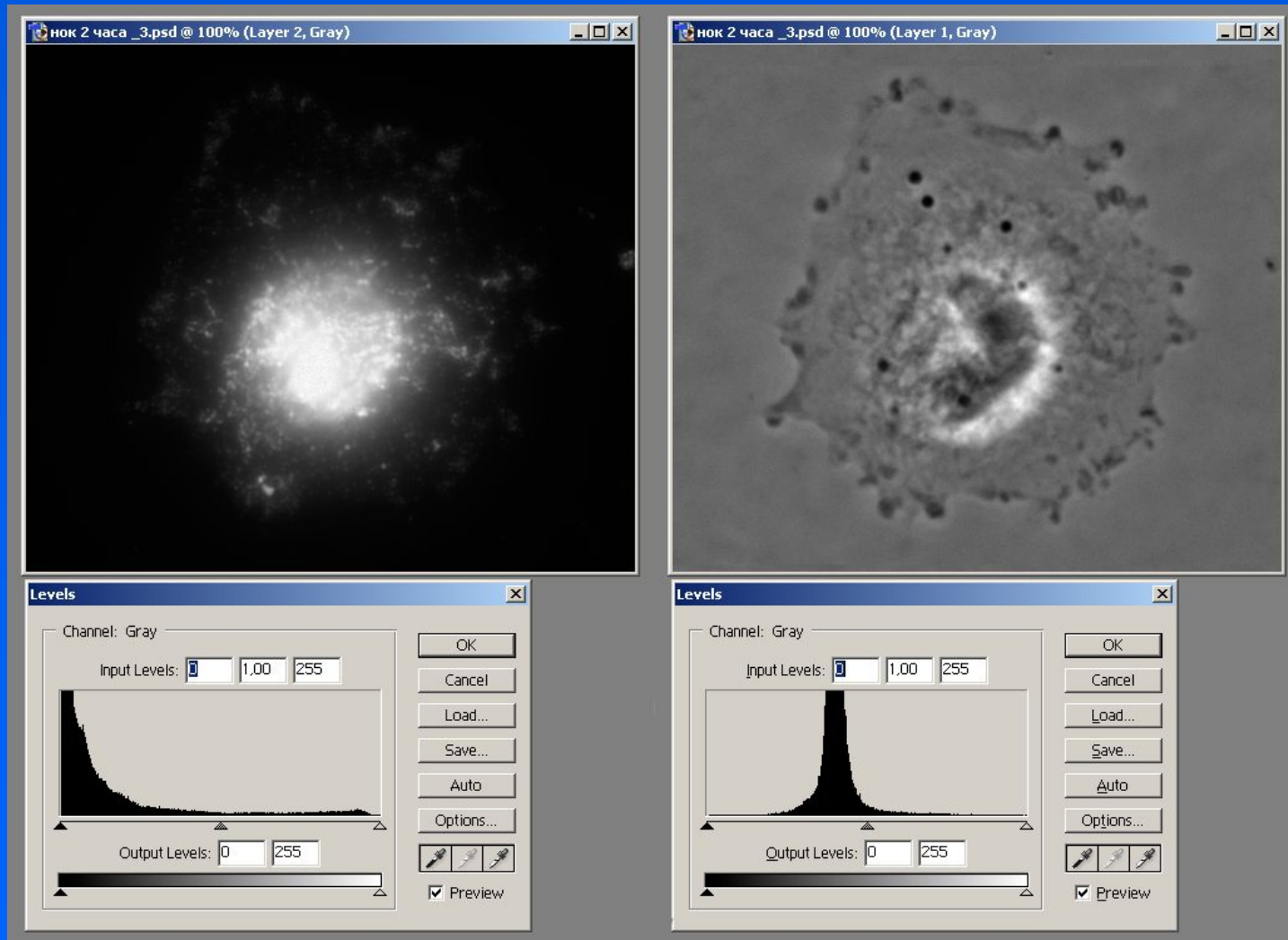
В светлом поле гистограмма имеет два или три пика, соответствующих фону и различным областям препарата.

В режиме фазового контраста и DIC – один пик, соответствующий фону.

В режиме флуоресценции – один пик, но чаще – спадающая от «0» кривая.

Правильная настройка гистограммы яркости позволяет эффективно проводить дальнейшую обработку изображения.

# Типичные гистограммы



**Флуоресценция**

**Фазовый контраст**

# Запись изображения – режим СВЕТЛОГО ПОЛЯ

Определение экспозиции производится по гистограмме яркости (объект и фон), или по условиям съемки (живые клетки).

Настройка цветового баланса – накал лампы должен быть не менее 50% от максимального. Избыточное освещение (при малых увеличениях) подавляется с помощью нейтральных светофильтров.

Определение достаточного увеличения объектива (эквивалентного размера пиксела).

Предварительная фокусировка изображения в «живом окне».

# Запись изображения – фазовый контраст и DIC

Яркость фона должна составлять около 50-70% от насыщения камеры, или время экспозиции определяется условиями эксперимента (живые клетки).

При съемке живых клеток для увеличения контраста целесообразно использование зеленого или желто-оранжевого светофильтра.

Предварительная фокусировка изображения в «живом окне».

# Запись изображения – режим флуоресценции

Настройка освещения – поле, освещаемое лампой, может быть уменьшено до эквивалентного размера матрицы камеры.

Определение экспозиции: как правило, экспозиция устанавливается максимально возможная по условиям эксперимента (живые клетки). Фиксированные препараты – экспозиция устанавливается близкой к насыщению камеры (стандартные препараты – экспозиция составляет не менее 1-5 сек. для охлаждаемых камер).

Настройка камеры – обычно не требуется, но для EMCCD камер необходима настройка усиления.

Установка светоделителя – 100% света на камеру.

Повторная съемка того же поля зрения нежелательна!

Фокусировка в живом окне может быть затруднена – проверку парфокальности надо проводить заранее.

# Цифровые изображения

**Векторная запись – изображение кодируется в виде формул, изменение масштаба не приводит к ухудшению качества и позволяет увидеть новые детали (MS Word; Adobe Acrobat).**

**Поточечная (растровая) запись – количество информации однозначно определяется количеством точек (пикселей) в записанном изображении. Изменение масштаба делает растр видимым.**

**Все ПЗС и КМОП камеры записывают изображение в растровом формате!**

**Каждый пиксел растрового изображения однозначно описывается своим положением в кадре и яркостью. Для цветного изображения яркость рассчитывается отдельно в трех каналах.**

# Непрерывное и дискретное изображение

Дифракционное ограничение разрешения оптического прибора (критерий Аббе, Рэлея) предполагает визуальное наблюдение, то есть сканирование поля зрения с исчезающе малым шагом.

При записи на матрицу изображение подвергается пикселизации – разделению на участки конечного размера (как правило, квадраты) внутри которых информация утрачивается (яркость интегрируется).

Пикселизация создает дополнительное ограничение разрешения прибора (эффект мозаики).

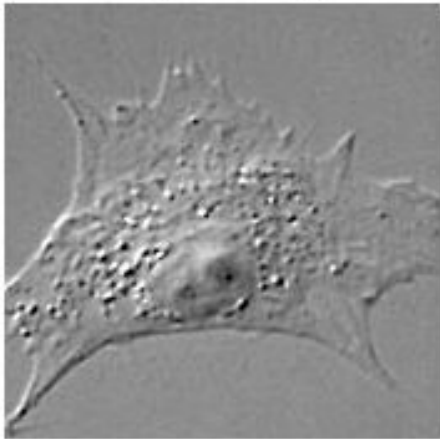
При малых размерах пиксела записанное изображение является хорошим приближением оригинала, то есть контраст его мало отличается от исходного, а за счет более широкого динамического диапазона камеры может быть даже увеличен по сравнению с визуальным.

Вопрос состоит в том, какой размер пиксела можно считать «малым»?

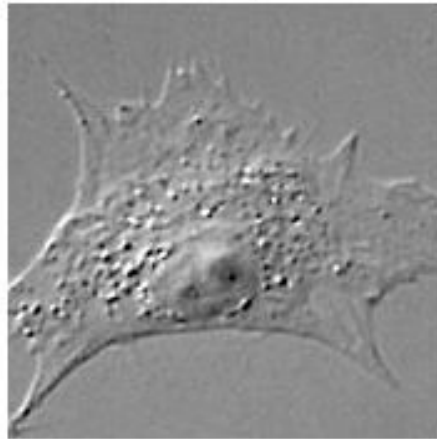


# Пространственное разрешение в ВИДЕОМИКРОСКОПИИ

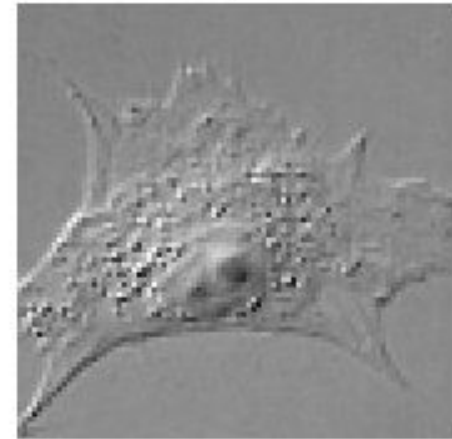
Original image



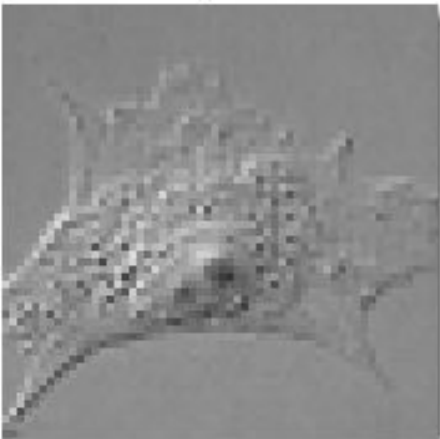
175x175 pixels



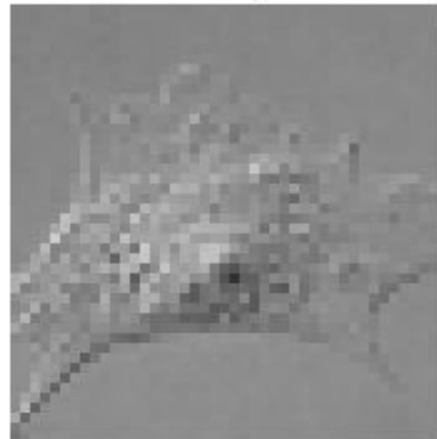
88x88 pixels



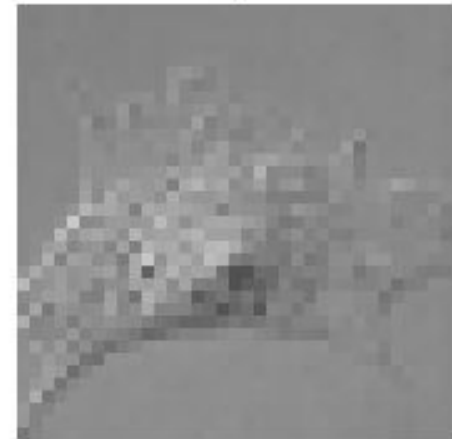
58x58 pixels



44x44 pixels



35x35 pixels



# Увеличение видеомикроскопической системы

Увеличение – масштаб изображения на экране.

Объектив  $\times 100$  дает увеличение на мониторе с диагональю 20' около  $\times 3000$ - $\times 6000$ .

Разрешение цифровой микроскопической системы ограничивается разрешением микроскопа и дополнительно – пикселизацией изображения.

При эквивалентном размере пиксела около  $1/10$  диска Эри (расчетного разрешения объектива микроскопа) разрешение цифровой микроскопической системы определяется в основном апертурой объектива. При больших размерах пиксела ограничение, связанное с пикселизацией, становится заметным.

# Разрешение видеомикроскопической системы

При достаточно ярком освещении поля зрения разрешение записанного изображения всегда хуже, чем при визуальном наблюдении.

Разрешение цифровой микроскопической системы всегда меньше удвоенного эквивалентного размера пиксела.

Если этот размер составляет не менее  $1/2$  диска Эри, то разрешение цифрового изображения существенно ниже, чем при визуальном наблюдении. На практике это означает, во-первых, снижение контраста изображения. Во-вторых, некоторые мелкие детали изображения могут исчезать, или их контраст становится переменной величиной, то есть зависит от ориентации объекта по отношению к матрице камеры.

При эквивалентном размере пиксела менее  $1/3$  диска Эри (расчетного разрешения объектива микроскопа) разрешение цифровой микроскопической системы определяется в основном апертурой объектива, однако снижение контраста также может быть заметным.

# Эквивалентный размер пиксела

Эквивалентный размер пиксела – размер пиксела камеры при проекции его в пространство предметов.

Эквивалентный размер пиксела равен физическому размеру пиксела матрицы камеры, деленному на общее увеличение, создаваемое микроскопом на матрице камеры. Соответственно, он уменьшается с ростом увеличения объектива.

Пример: для объектива  $\times 60$  и пиксела камеры  $6,45 \text{ мкм}$  эквивалентный размер пиксела составляет  $107,5 \text{ нм}$ .

Для микроскопов, скорректированных на бесконечность и имеющих специальный порт для присоединения камеры, общее увеличение определяется объективом и проекционной линзой, устанавливаемой перед камерой. Как правило, проекционная линза имеет коэффициент  $\times 1$ .

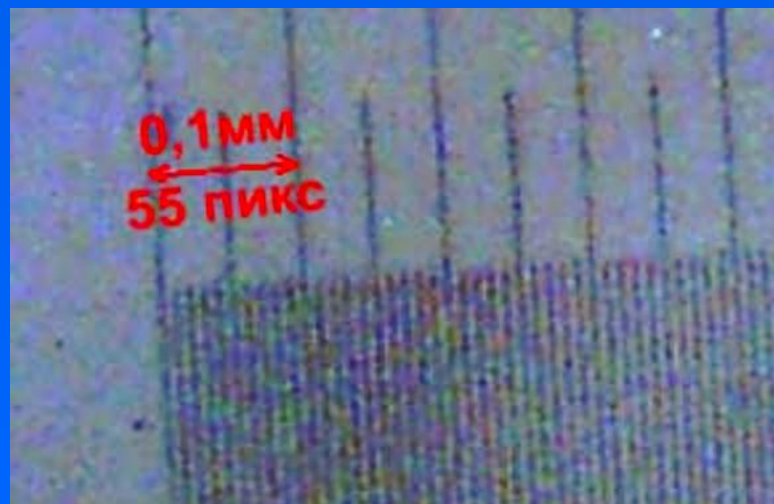
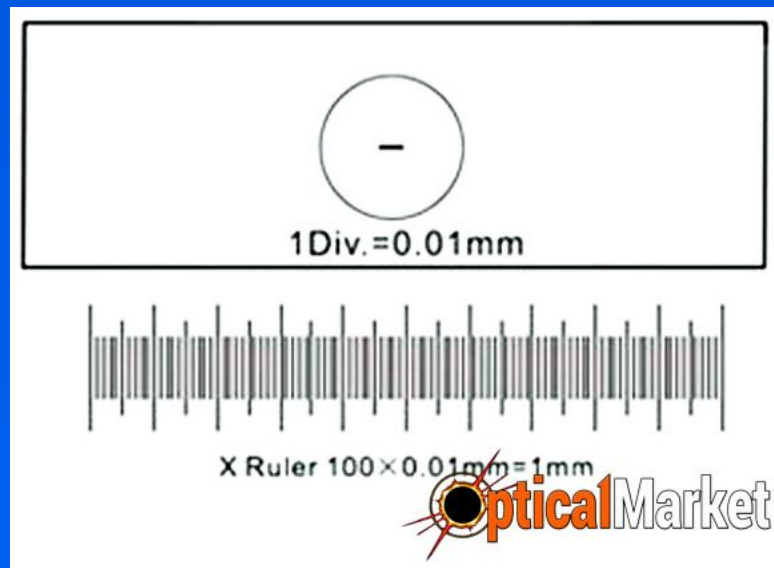
# Определение эквивалентного размера пиксела

Увеличение объектива только примерно равно указанному на оправе. Точное увеличение может отличаться на 2-3% от паспортного.

Определение эквивалентного размера пиксела проводится эмпирически на каждом микроскопе с помощью съемки объект-микрометра.

Цена деления объект-микрометра – 10 мкм (малое деление).

Пример для малого увеличения (справа) – эквивалентный размер пиксела составляет 18,18 мкм.



# Условия оптимальной записи изображения в микроскопе

Уменьшение эквивалентного размера пиксела приводит к уменьшению количества света, попадающего на него, что аналогично эффекту уменьшения чувствительности камеры. Поэтому уровень пикселизации во флуоресцентной микроскопии, составляет около  $1/3$ - $2/5$  радиуса диска Эри, но меньший эквивалентный размер пиксела позволяет сохранить больший контраст.

В практической флуоресцентной микроскопии эквивалентный размер пиксела рассчитывается исходя из требований светочувствительности. Компромисс обычно достигается при эквивалентном размере пиксела около 35-40% от разрешающей способности объектива, однако для ярких препаратов его целесообразно уменьшить до 25-30%.

Для эффективной цифровой обработки светопольных изображений эквивалентный размер пиксела должен быть не более  $1/4$  разрешающей способности объектива микроскопа.

# Теорема дискретизации (Sampling theorem)

Для однозначного восстановления (передачи) непрерывного периодического сигнала с помощью дискретной (цифровой) записи частота измерения величины сигнала (частота дискретизации) должна быть по крайней мере в 2 раза больше самой высокой частоты из спектра исходного сигнала, которую надо передать.

Пример: для передачи звука в цифровых устройствах используется частота дискретизации 44 кГц, поскольку максимальная частота звука, воспринимаемого человеком, составляет 20 кГц.



# Теорема дискретизации в микроскопии

Теорема гласит, что для записи изображения без существенной потери информации эквивалентный размер пиксела должен быть по крайней мере в 2 раза меньше разрешающей способности микроскопа (радиуса диска Эри или  $0,5\lambda/NA$ ).

Например, если радиус диска Эри для микроскопа с иммерсионным объективом  $\times 60/1,4$  составляет 0,24 мкм, то размер пиксела при записи должен быть не более 0,12 (0,1) мкм.

На самом деле для сохранения полной информации размер пиксела должен быть существенно меньше указанного выше, так как диск Эри не описывается синусоидой, а матрица камеры является двумерной. Этот вопрос будет подробно рассмотрен далее.

# Ограничения дискретного изображения

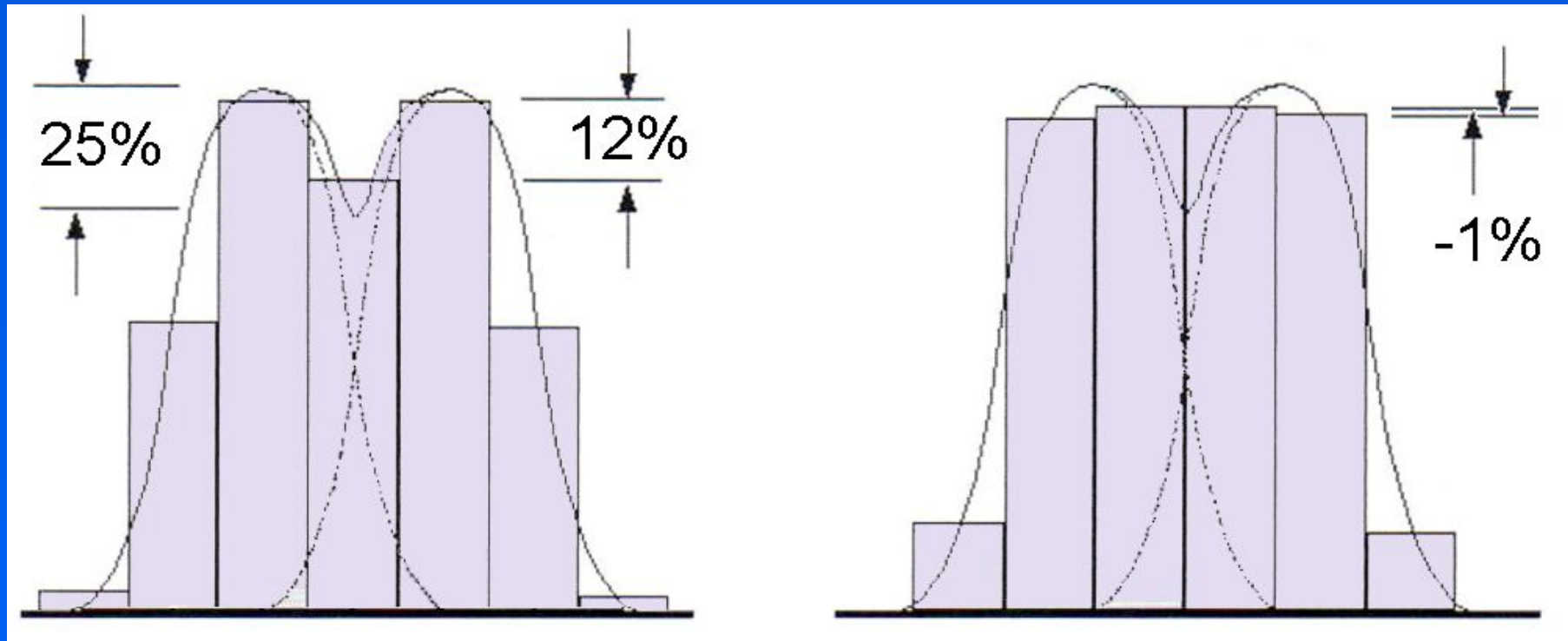
Контраст дискретного изображения всегда меньше, чем непрерывного. Основной вопрос – насколько? Так как научная камера позволяет записать больше оттенков серого, чем различает глаз, то при «восстановлении» изображения контраст может быть увеличен.

При достаточно малых эквивалентных размерах пиксела (около  $1/10$  радиуса диска Эри) записанное изображение является хорошим приближением оригинала, то есть контраст его мало отличается от исходного.

При размерах пиксела свыше  $1/4$  но менее  $1/2$  радиуса диска Эри контраст изображения становится переменной величиной. Он зависит от относительного расположения элементов изображения и элементов матрицы камеры.

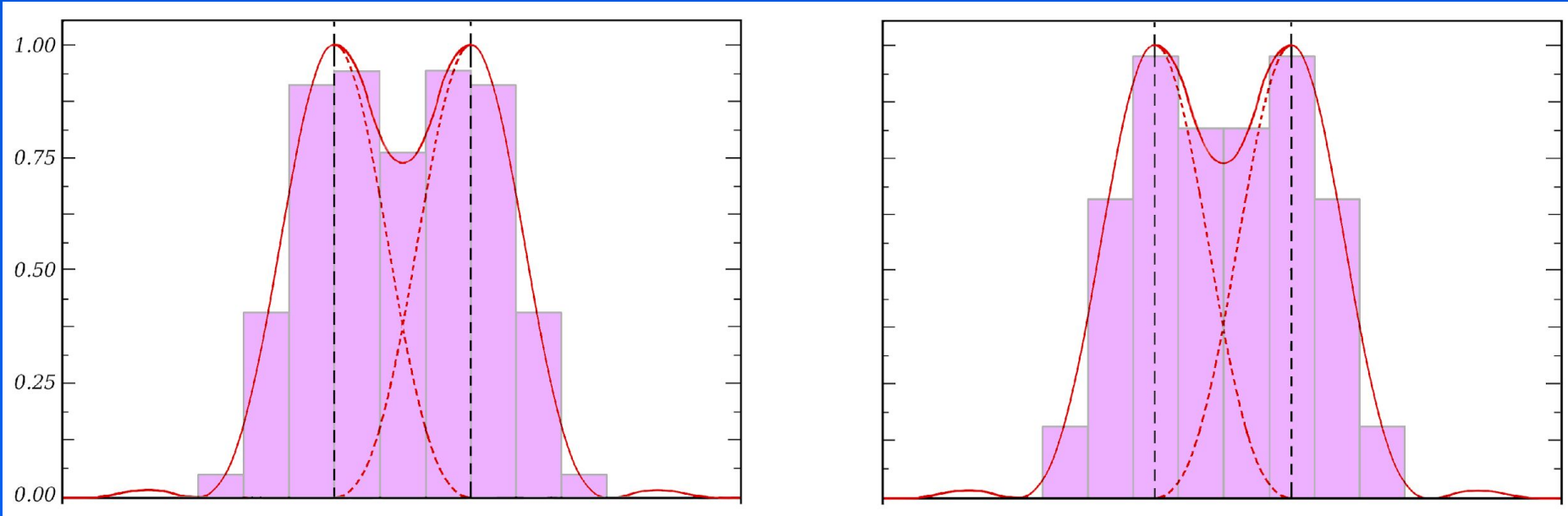
При размерах пиксела больше  $1/2$  разрешающей способности прибора, разрешающая способность цифровой системы существенно снижается и ограничивается исключительно величиной пиксела.

# Недостаточная пикселизация изображения



Максимальный эквивалентный размер пиксела, диктуемый телеграфной теоремой ( $1/2$  радиуса диска Эри), в случае, когда объекты разделены минимальным промежутком, приводит к значительному снижению контраста при «удачной» пикселизации, и полной потере контраста при «неудачной» пикселизации.

# Пикселизация изображения



Исходя из критерия Рэля, для сохранения положительного контраста при произвольном расположении точек в объекте, максимальный эквивалентный размер пиксела должен составлять менее  $1/3.2$  радиуса диска Эри. Тогда за счет увеличения контраста при съемке (12-16 разрядный АЦП) сохраняется возможность разрешения любых близко расположенных объектов.

При размере пиксела равном  $1/5$  радиуса диска Эри, контраст цифрового изображения снижается не более, чем в 1,5 раза.

# Съемка с максимальным разрешением

В большинстве микроскопов использование камеры со стандартной установкой (то есть без промежуточного увеличения) не позволяет достичь максимального разрешения при использовании объективов с относительно небольшим увеличением и большой апертурой (40/1.3; 20/0.8 и др.) из-за слишком большого эквивалентного размера пиксела.

Для достижения максимального разрешения (уменьшения эквивалентного размера пиксела) в этих случаях следует использовать объектив x100 и/или систему промежуточного увеличения изображения (имеется только на небольшом числе современных микроскопов – Nikon TiE, Zeiss в специальной комплектации).

# Максимально допустимый размер пиксела камеры для некоторых объективов при прямой съемке

**x100/1.3 (имм.) – 10 мкм**

**x60/1.4 (имм.) – 5,6 мкм**

**x40/1.4 (имм.) – 3,7 мкм**

**x40/0.75 – 6,9 мкм**

**x20/0.8 – 3,3 мкм**

**x20/0.5 – 5,2 мкм**

**x10/0.3 – 4,3 мкм**