

理想的生物医学用 CCD 影像系统

——介绍高性能科学级冷却式 CCD 影像系统

郭汉平

1. 前言

随着科学技术的进步,获得影响像的手段不断增多,其中 CCD 就是一种最新型的影响像处理工具。它是一种电荷耦合器件(Charge-Coupled Device),能将光信号转换成电信号,使图象易于进行分析、处理。

最初的 CCD 为民用(如家用摄像机、保安监控),这一类为电视规格 CCD(video CCD)。随着时间的推移,人们逐渐发现了它在科研上的利用价值,至今,仍有人将这种 CCD 用在某些研究上。但由于它并非为科研而设计,使其在研究中的应用有很大局限性,尤其在生物医学研究上,其性能明显不足。这就促成了专为科研而设计的科学级冷却式 CCD 的出现。(二者的性能对比见附表 1)。美国 Princeton Instrument (PI 公司)是世界上最大的冷却式 CCD 生产厂,推出了适合多种研究领域的 CCD,更有专为生物医学研究而设计的整套系统。

本文以 PI 公司的高性能影响像系统为例,向大家介绍科学级冷却式 CCD 的特点。

2. 影像系统的组成:

科研用影像系统一般由 CCD 摄像头(camera)、控制器(控制读取及冷却)加上计算机及软件组成(如图 1)。其中 CCD 与显微镜(或镜头)连接以获取影像,是整套系统的核心部分,下面我们做重点介绍。

3. CCD 芯片的基本构造与原理:

CCD 芯片是将对光极为敏感的象素(pixel),利用半导体技术累积成二维面阵列的形状(如图 2)来感测及传输信号。芯片通常由数百万个象素

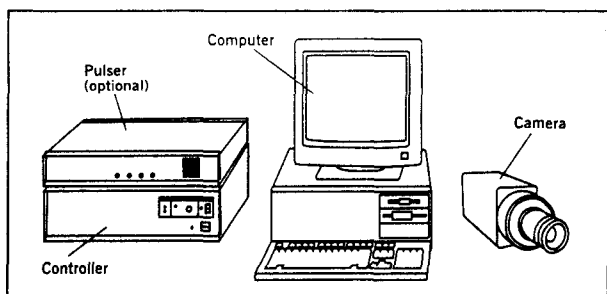
组成(象素结构如图 3)。当加一个正电位在象素的电闸上时,就会在硅基底产生一个耗尽区,称为势能井(potential well),可以储存由光打在硅基上产生的自由电子(e^-)。势能井有它的饱和限制,面积越小的象素所能储存的电子数越少。

当要读出这些电子时,势能井中的电荷便沿着一个一个的象素传输出放大器上。传输的方法是利用电位在一个多相电闸(multiple phase gate)上的变化,使得势能井中的电子有时间次序地在象素上移动,以携带电荷往要传输的方向移动。图 4 画出了在势能井中的电荷载利用一个三相电闸的电位变化挪移的过程。不同象素的电荷在传输的过程中不可混合,如此才能知道电荷是在哪个象素上产生的,整个 CCD 面阵上所有象素组合而成的影响像才会真实可信。

在 CCD 芯片中(图 2),含多个象素的二维阵列称为平行记录器(parallel register),主要用来感光。位于平行记录器上面的一列称为序列记录器(serial register)。信号读出时,平行记录器先将最上面一列的电荷号传入序列记录器中,然后在序列记录器中,由最靠近输出放大器(output amplifier)的象素开始,一个一个地把信号传入放大器中。如此周而复始,直到把整个平行记录器中的每个象素的信号都读完了,才开始另一回合的曝光。

CCD 芯片含有上百万个象素,电荷在从一个至另一个象素的传输过程中不应丢失太多,以免影像失真,这一性能叫电荷适移效率(charge transfer efficiency, CTE)。科学用 CCD 的迁称效率趋近于 1。

对整个 CCD 的工作原理,读者可以以雨水示意图(图 5)来简单地理解。



The above diagram shows a typical system configuration. Some components are not necessary for some system configurations.

图1 科学用 CCD 影像系统

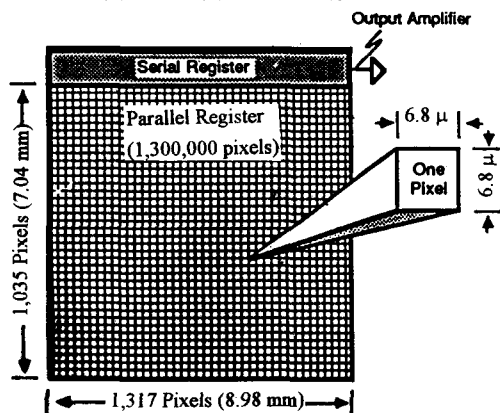


图2 CCD 芯片示意图

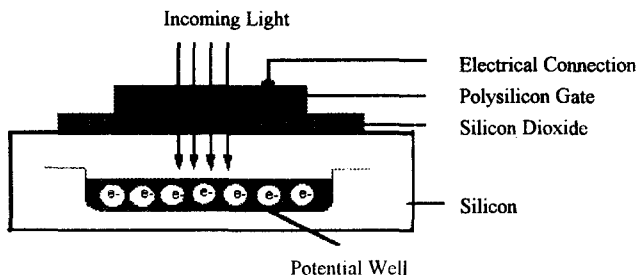


图3 象素的基本构造

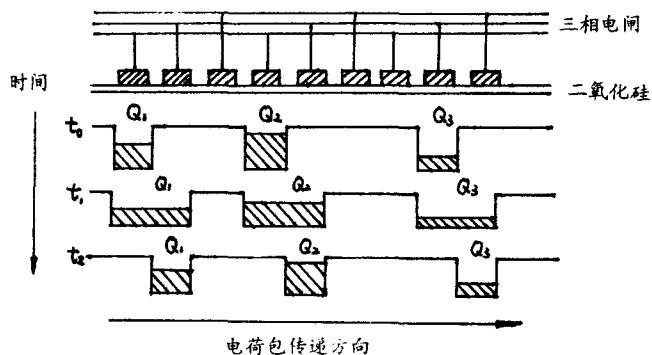


图4 象素电荷的传递方式

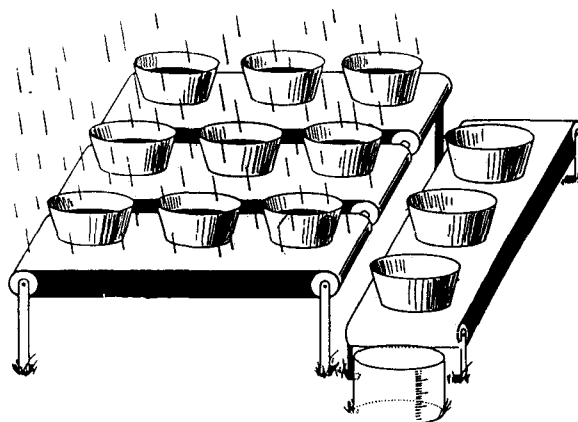


图5 雨水示意图

Determining the brightness distribution in a celestial object with a charge-coupled device can be likened to measuring the rainfall at different points in a field with an array of buckets. Once the rain has ceased, the buckets in each row are moved horizontally across the field on conveyor belts. As each one reaches the end of the conveyor, it is emptied into another bucket on a belt that carries it to the metering station where its contents are measured.

4. 理想的生物医学影像系统具备的特点：

随着生物医学研究的深入,对影像系统提出了越来越高的要求。如:探测极微弱光信号、探测快速的变化过程、有选择地观测某些部,对灵敏度及分辨率的要求越来越高。如今,更要能用计算机进行处理、分析、储存等等。也就是说,影像系统需要具备如下特点:

4.1 高灵敏度(High Sensitivity):

要想观察到原来无法看到的现象,要求 CCD 的灵敏度要相当高,也就是说,探测极弱的信号(通常 $<10^{-4}lux$)时不致被噪声所掩盖。科学级冷却式 CCD 可以探测 $<10^{-6}lux$ 的信号,采用特殊技术制造的背照明式(Back-illuminated)CCD 甚至可作单光子测量。而电视规格 CCD 最多只可探测 $10^{-3}lux$ 的光,根本无法满足生物医学研究的要求。

影响灵敏度的主要因素是量子效应及芯片噪声。量子效应(Quantum Efficiency, QE)是势能并产生自由电子的能力,即光信号转换成电信号的

能力,与硅材质及环境温度有关。冷却式 CCD 的量子效率通常在 40%以上,背照明式 CCD 更可高达 80%,而电视规格 CCD 只有 15%左右。

CCD 芯片的噪声主要是热噪声,通常称为暗电流(dark current),它是由硅基上的电子统计热运动所产生的。在 CCD 未曝光前(即暗的,dark),这些电子已存于象素内。当用 CCD 采集光信号时,这些电子便和实际信号所产生的电子一同被读出。一般而言,暗电流在室温时约为 100-1000 pa/cm² 这个数量级。假设为 1000pa/cm²,则在一个 24um × 24um 的象素上,暗电流就有 35,000e-/pixel/sec。假设这个象素的最大电容量是 350,000 个,则 CCD 曝光 10 秒后,噪声高达 350,000e-/pixel/sec,所有的信号将完全被噪声所掩盖。这正是电视规格 CCD 应用受到限制的原因。

科学级冷却式 CCD 采用制冷芯片的技术,使噪声大幅降低。以 PI 公司的 1317k 芯片为例,冷却到-50℃时,噪声只有 0.005e-/pixel/sec,几近于无。再降低温度,噪声进一步降低,采用液氮制冷,可冷却至-140℃。

4.2 大动态范围(High Dynamic Range):

若是我们观察的样品其不同部分的光强度差异很大,例如,一个神经元染色后,细胞体吸收了大量染料,荧光很强,而轴突末梢吸收的染料很少,只产生微弱的荧光,两者信号强度的差异可达上千倍。这就要求影响像系统要能同时测量极强与极弱光。最强与最弱光信号的比值称作动态范围,用 bit 为单位。动态范围与势能井所能储存电子数的多少有关。一般电视规格 CCD 的动态范围 8bit,即 2⁸(256 级),而 PI 的 CCD 系统可做到 12-18bit,即 4,000-260,000 级,比电视规格 CCD 高 16-1000 倍。大动态范围的另一个显著优点是能把一定强度的信号分得更细,得到层次更多的影像。

4.3. 高分辨率(High Resolution):

对于影响像的分辨率可理解为能够分辨出的最小微粒有多大,或者说能够将两个微粒区分开来的能力。提高分辨率的办法是放大,采用光学显微镜甚至电子显微镜等等。但显微镜的放大倍数并不能无限地提高(因其分辨极限为所用照射源波长的一半)。另外,放大倍率的提高会使视域缩小,使我们无法一次看到感兴趣的区域。那么,有

没有办法提高从显微镜下所得影响像的分辨率呢?

每一幅影响像都是由许多点组成的,当这些点之间的间隔小于我们人眼的分辨能力时,我们就认为其为一条线或一个面,而点的大小直接影响影像的清晰度。点越小,影像就越清晰。只有对一幅清晰度足够好的影像进行放大,才会使分辨率提高。电视规格 CCD 的象素点最多只有 700 × 500 个,也就是说,它只可将所得影像分成 35 万个点。而 PI 公司的冷却式 CCD 现在最多可以做到 1600 万(4k × 4k)个象素,为电视规格 CCD 的 45 倍。如果用这两种 CCD 连接在同一个显微镜上观测同一影像,PI CCD 的分辨率比电视规格 CCD 要高 45 倍。也就是说只有使用具有高分辨率的冷却式 CCD,才有可能看到以前无法看到的细节。

4.4 高线性度(High Linearity):

我们得到的影像与真实影像是否能够很好吻合呢?这取决于影像系统的线性。所谓线性是指影像系统在整个光谱范围内得到的信号与真实影像的光强度是否呈线性关系。电视规格 CCD 因多为民用,无需很高的线性,因为我们知道,人眼对光度的感应为对数关系。而在科研中多需要观测细微差别,或是做一些定量研究时,良好的线性则至关重要。PI 公司的产品非线性度在整个光谱范围内小于 1%,达到了很高的水平。

4.5 数字化输出影像及可编程性(Digital Output And Programmability):

理想的影像系统不但应能自动控制影像采集方面的一些功能,如 CCD 的温度(噪声水平)、曝光时间,影像自动存取等,而且应具有影像处理分析的能力。一般电视规格的 CCD 无法直接输出数字信号,只有再通过一影像卡将模拟信号转换成数字信号,再送计算机处理,这样转换过程,又会增加信号的噪声,使系统的灵敏度进一步降低。而 PI 公司的冷却式 CCD 可直接输出数字信号送计算机处理,保证了影像的高灵敏度。PI 公司与世界上著名软件开发商密切合作,使许多著名软件可直接用于 PI 公司的影像系统。如 Universal Imaging Corporation 的 MetaMorph 与 MetaFluor, Media Cybernetics 公司的 Image-Pro[®] Plus 等,这些软件可很好地满足生物医学研究的要求。

PI 公司的 CCD 影像系统还可同工作站相连,使功能进一步加强。

4.6 整个系统使用弹性大:

电视规格 CCD 用途单一,只能作一些简单的影像。而为科学研究设计制造的冷却式 CCD 则不然,下面仅举几例说明。

A. 曝光时间可控:可根据影像的信号水平,选取最佳的曝光时间,在芯片上积分(on-chip),以降低读出噪声,获取最佳的影像。

B. CCD 温度可控:以选择最符合试验要求的最佳灵敏度与动态范围。

C. 采集影像的速度可控:冷却式 CCD 大多每秒可截取 3-10 幅满影像,如需要更高速度,可采用箱化(binning)--将几个象素合并成一个大象素、次阵列读出(sub-array readout)--只读出感兴趣的影像等操作方式,或采取 PI 公司的高速 CCD 系统。

上述几点是做影像时的弹性。由于冷却式 CCD 是一种非常好的光电转换器件,除了可用于

影像系统外,还可用于其他光量测方面,如喇曼光谱、荧光光谱等的测定。在作这些方面的工作时,只需将 CCD 移到相应的谱仪上即可。

5. 应用:

美国 PI 公司最新推出的 MicroMax 系统,是专为生物医学研究而设计的,适应于如下领域:

- Cell Calcium Imaging
- FISH-Fluorescence In-Situ Hybridization
- Neurobiologic Imaging
- CGH-Comparative Genomic Hybridization
- Immunofluorescence Microscopy
- Optical Biosensors
- Fluorescence Anisotropy
- Fluorescence Ratio Imaging
- SEM Imaging

PI 公司影像系统的中国代理是先锋公司,电话:010-4241580

附表 1. * * Video Cameras 与 High-Performance Cooled Cameras 主要规格比较表 * *

主要规格	High-Performance Cooled Cameras	Video Cameras
芯片规格	科学级、冷却式	Video 级别、非冷却式
芯片尺寸	多种可选,象素数目从 576×384 到 3k×2k 个 象素尺寸:6.8×6.8um 到 26×26um 前照明或背照明(Front or Back-Illuminated)	350 线,象素数目<768×494 象素尺寸:8um 只能前照明(only Front-Illuminated)
量子效应	极佳	尚好
动态范围	Linear, 12-18bits	< 8bits
灵敏度	暗电流<1e-/pixel/sec(电冷) <1e-/pixel/hour(液氮制冷)	0.2lux(at full video)
读出噪声	10-15e-rms(1 count)	很大,无法列举(Not-specified)
图象读出格式	Full Frame/Frame Transfer	Frame-Transfer or Inte-Line
芯片积分	0 秒至数小时	无此功能
读出方式	Full frame/Binning/Sub-Array	只能以电视信号(TV mode only)
光谱范围	400-1100nm(typical) 190-1100nm(with UV coating) 260-1100nm(Back-illuminated)	400-1100nm
读出速度	<10frames/sec A/D speed: 25KHz to 5MHz	30frames/sec (30Hz) TV Video Rate