

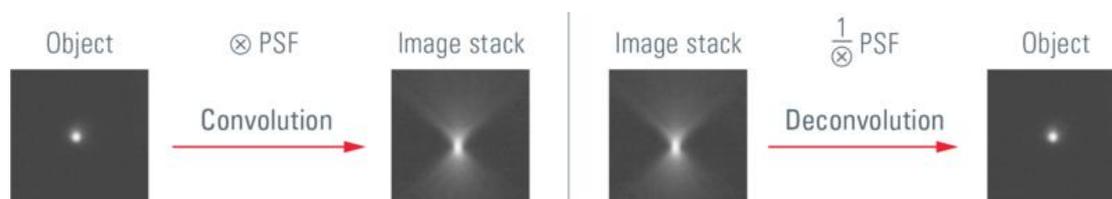
目录

背景介绍.....	2
使用方法.....	3
一、安装 image J 及插件.....	3
1、下载地址.....	3
2、插件安装方法.....	3
二、Deconvolution 使用方法.....	4
1、生成标准的 PSF.....	4
2、数据 Deconvolution.....	5

背景介绍

反卷积是一种计算密集型图像处理技术，通过该技术，可以提高显微图像的对比度和清晰度。与共聚焦显微镜不同，宽视场显微镜允许探测器接收到的所有光通过，因此许多来自非焦面的光也会被接收到，使得图像变得模糊，损失很多精细的细节。反卷积技术的主要任务就是去除非焦平面上的模糊。

点扩展函数(Point Spread Function, PSF)描述了一个成像系统对于点光源或者是点物体的响应，也可以理解其为光学系统对于脉冲的响应函数，一般用该指标来衡量重建后的系统分辨率。在荧光显微镜、望远镜或是光学显微镜的非相干成像系统中，图像形成过程是线性的，并由线性系统理论描述。这意味着两个单独成像的物体 A 和 B 的成像结果等同于两物体各自成像结果的加和。



如上图所示，在线性系统中，对于任意成像目标 Object 为 I_1 和其对应的像 Image 为 I_2 可以表示成： $I_2 = I_1 * h$ ； h 是系统函数，同时这个卷积系数 h 也是 PSF，因为当 I_1 为冲击函数时： $I_2 = h$ 。因此一个理论的系统 PSF 可以反过来通过去卷积算法来消除系统的失真，还原所取图像本来的样子。需要注意的是，由于取到的单张图片中非焦面的信息来自于多个层面，2D 的去卷积只能消除焦平面横向相邻像素的弥散影响，对非焦平面的背景不能很好的去除，因此反卷积在 3D 图像中处理后的效果会更加清晰、准确。

使用方法

一、安装 image J 及插件

1、下载地址

下载地址: <https://imagej.nih.gov/ij/>

所需插件: Diffraction_PSF_3D 、 Parallel_Spectral_Deconvolution&DeconvolutionLab2;

插件下载地址: http://fiji.sc/Diffraction_PSF_3D

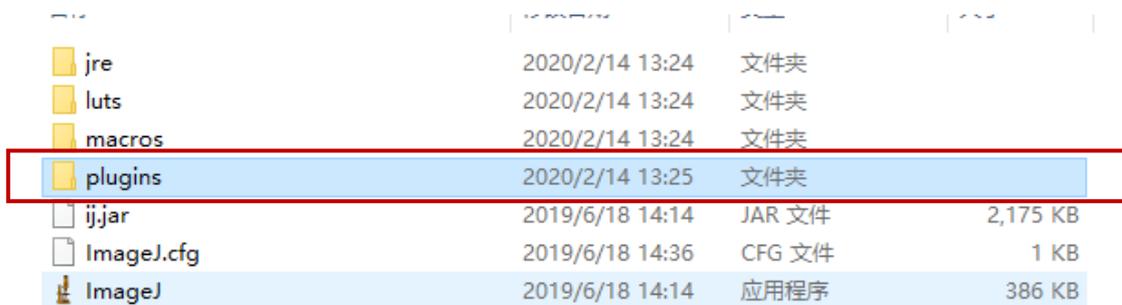
http://fiji.sc/Parallel_Spectral_Deconvolution

&<http://bigwww.epfl.ch/algorithms/deconvolutionlab/>

2、插件安装方法

1) 将下载后文件复制到 Image J 文件夹→plugins 文件夹中后, 重启 Image

J;



名称	日期	类型	大小
jre	2020/2/14 13:24	文件夹	
luts	2020/2/14 13:24	文件夹	
macros	2020/2/14 13:24	文件夹	
plugins	2020/2/14 13:25	文件夹	
ij.jar	2019/6/18 14:14	JAR 文件	2,175 KB
ImageJ.cfg	2019/6/18 14:36	CFG 文件	1 KB
ImageJ	2019/6/18 14:14	应用程序	386 KB

2) 重新打开后, 在工具栏中 plugins 菜单下即可找到 Diffraction PSF 3D、

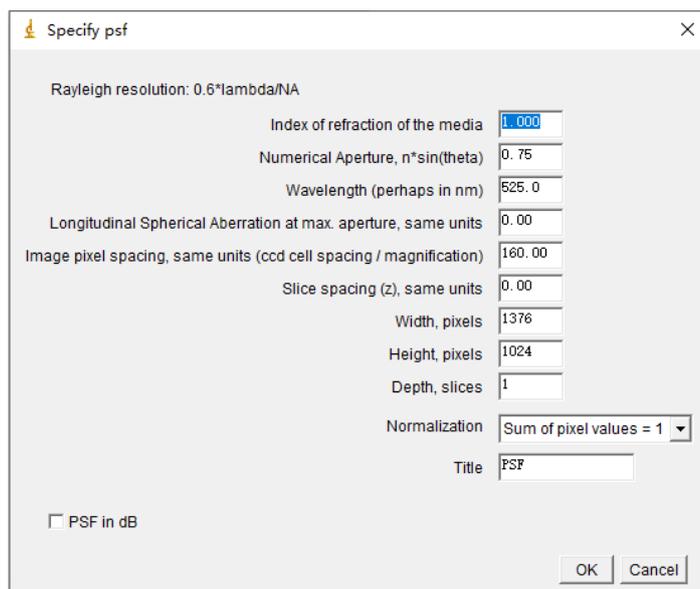
Parallel Spectral Deconvolution、DeconvolutionLab2 三个功能。

二、Deconvolution 使用方法

1、生成标准的 PSF

- a) 首先需要根据实际拍摄条件生成一个标准的 PSF，使用 Diffraction PSF 3D 功能

Plugins→Diffraction PSF 3D;



Index of refraction of the media: 拍摄时使用物镜的所匹配的介质的折射率，

例如：Air:1.000 Water:1.333 等，可在网上查找

NA: 所使用物镜的数值孔径

wavelength: 荧光的发射波长（注意不是激发波长）

Longitudinal spherical aberration 纵向球差畸变：由于大部分实验室都无法测量该参数，填写 0.00 对于计算结果相对来说比较好一些

Image pixel spacing: 查找所使用 CCD 的 pixel size 参数，可在 CCD 的技术手册中查找。若 pixel size: $6.45 \mu\text{m} \times 6.45 \mu\text{m}$ ，40×的物镜拍摄，那么 Image pixel spacing 为 $6.45 \mu\text{m} / 40 = 0.16 \mu\text{m}$ ，此处的单位为 nm，所以应该填写 160

Slice spacing: 单位为 nm. 2D: 填写 0

3D: 实际所取图像的步长, 若 3D 数据中, 每 50nm 取一张图片, 填写 50

Width&Height: 即图像行&列的像素点个数; 若取图的大小为 1024×512,

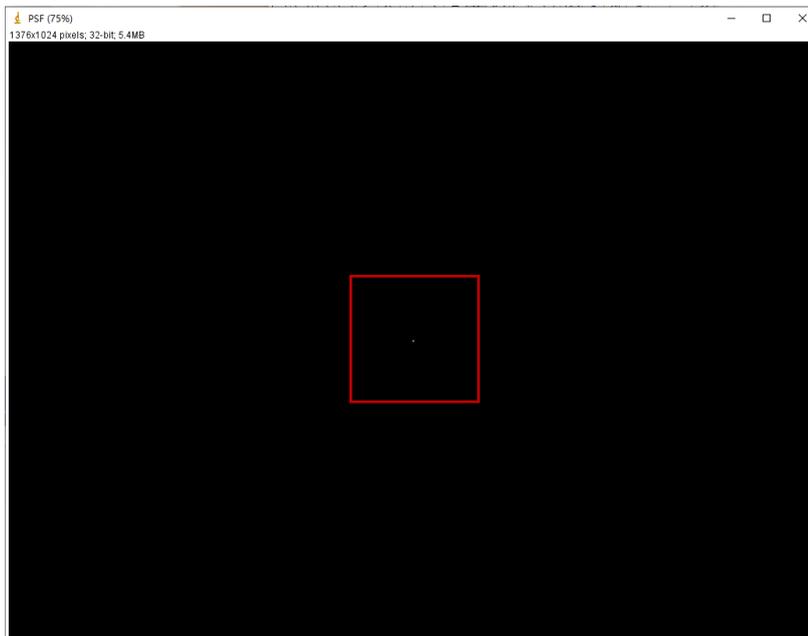
width: 1024; height: 512

Depth: 2D:填写 1; 3D: 即图像的层数

Nomolization:可以保持默认值

Title:所生成 PSF 的文件名

- b) 所有数据填写完成后, 点击 OK, 则会生成一个 2D/3D 的 PSF,点击保存, 后面会用到。



2、数据 Deconvolution

2D 灰度图:

使用 Image J 打开需要处理的图片 (注意: 该算法只能计算灰度图), 所以先介绍 grey 时的方法, 然后介绍如何处理 color 数据。注意 2D 的数据中不要存在过曝点以及噪声过高的情况, 会影响处理结果。

- a) 首先应确保数据为灰度图 (8/16/32 bit), 打开要处理的图像和前面生成的 PSF 图片数据
- b) 打开 Parallel Spectral Deconvolution (Plugins → Parallel Spectral Deconvolution→2D Spectral deconvolution/3D spectral deconvolution)

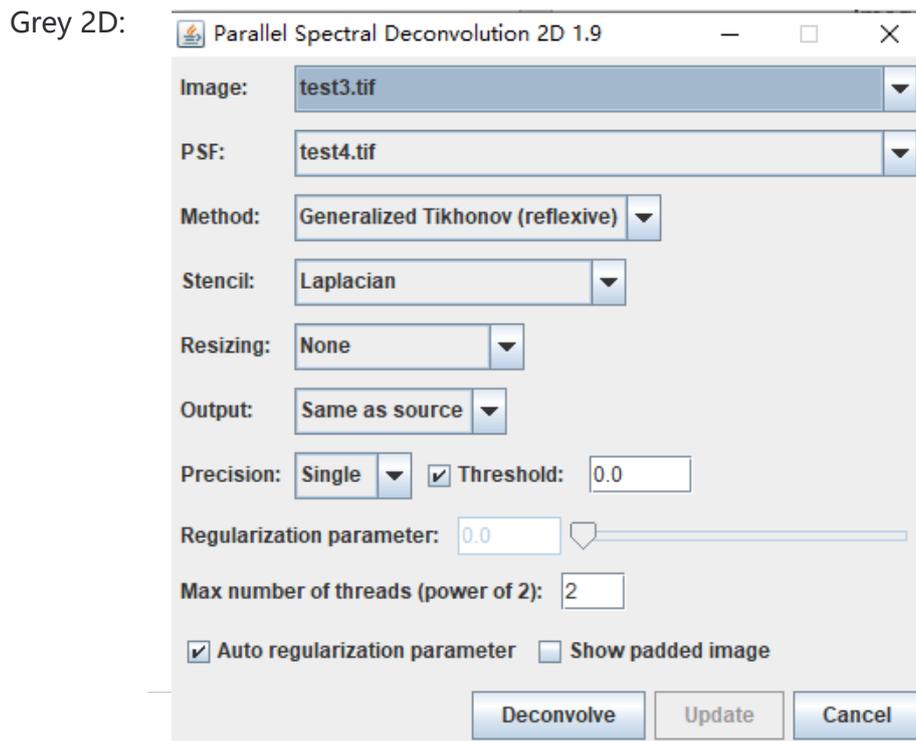
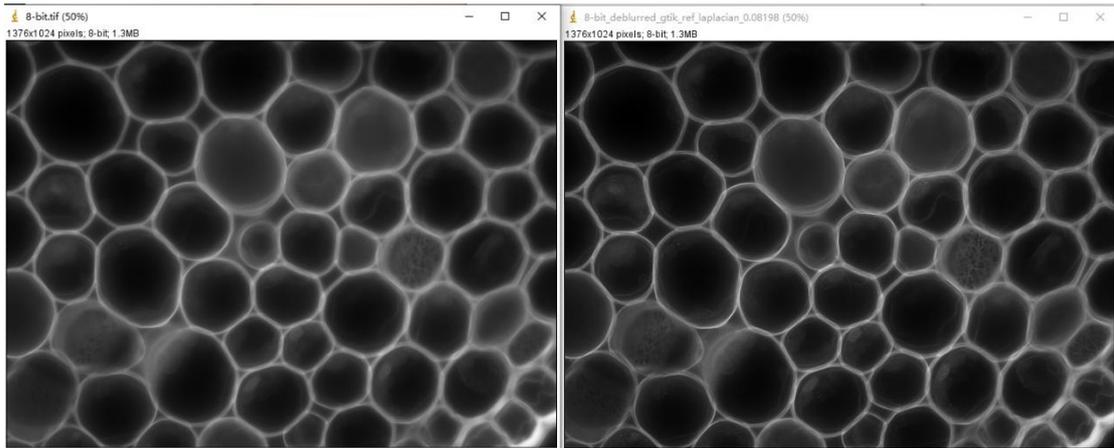


Image: 需要处理的数据

PSF: 上一步生成的 PSF

Method: **Generalize Tikhonov (reflexive) algorithm**

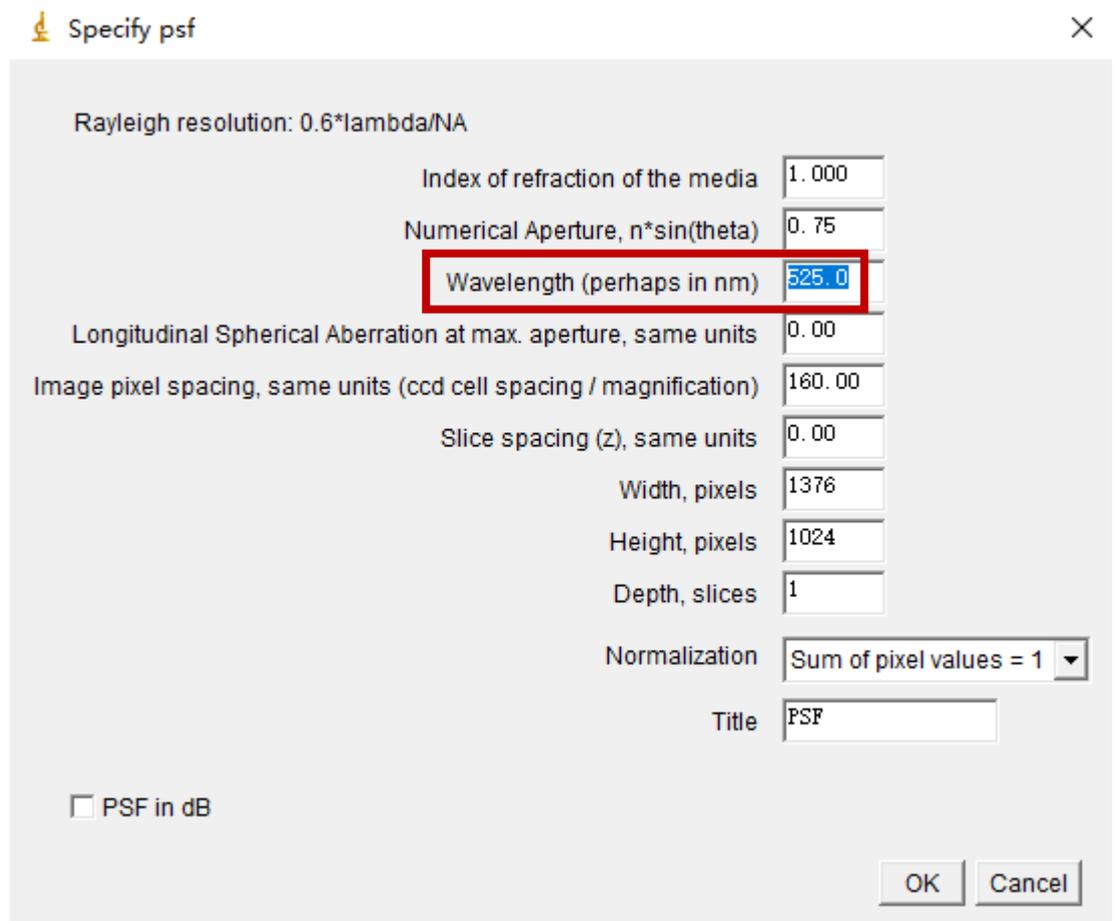
剩下的参数为默认值, 点击 deconvolve, 生成处理后的数据。



2D 彩色图片:

在理解上面的步骤的基础上, 介绍 color image 的处理方法 :

首先将 color image (RGB) 图像通过通道拆分成三个通道 (Red, Green, Blue) ,



注意: 在生成理论 PSF 时, 其中 PSF 的参数和荧光的发射波长有关, 所以 R,G,B 三

个通道分别根据使用荧光的发射波长生成三个理论的 PSF

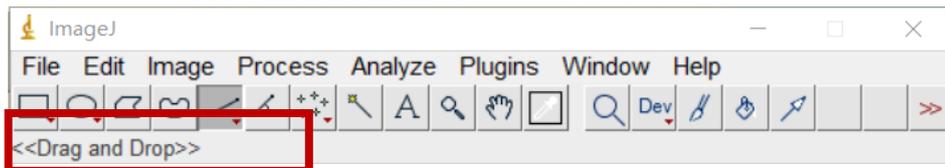
然后分别对三个通道使用对应的 PSF 进行 deconvolution 处理后，再进行通道合并。

通道拆分：Image→Color→Split channels

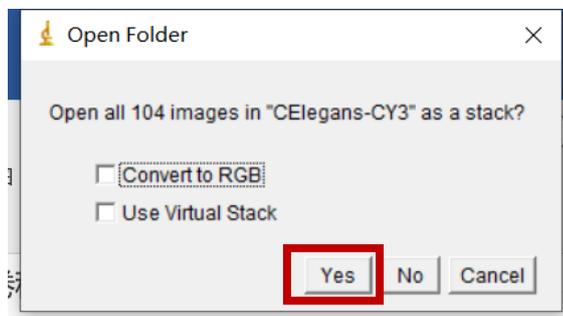
通道合并：Image→Color→Merge channels

3D 灰度图：去卷积对于 3D 图像来说，可以有更好的效果，它可以有效地交叉参考不同深度的数据以消除各层的模糊。

- a) 首先将 3D 的图片(灰度图)保存在一个文件夹中, 拖到工具栏中: (若不是灰度图, 请参照 color 3D deconvolution 的方法)



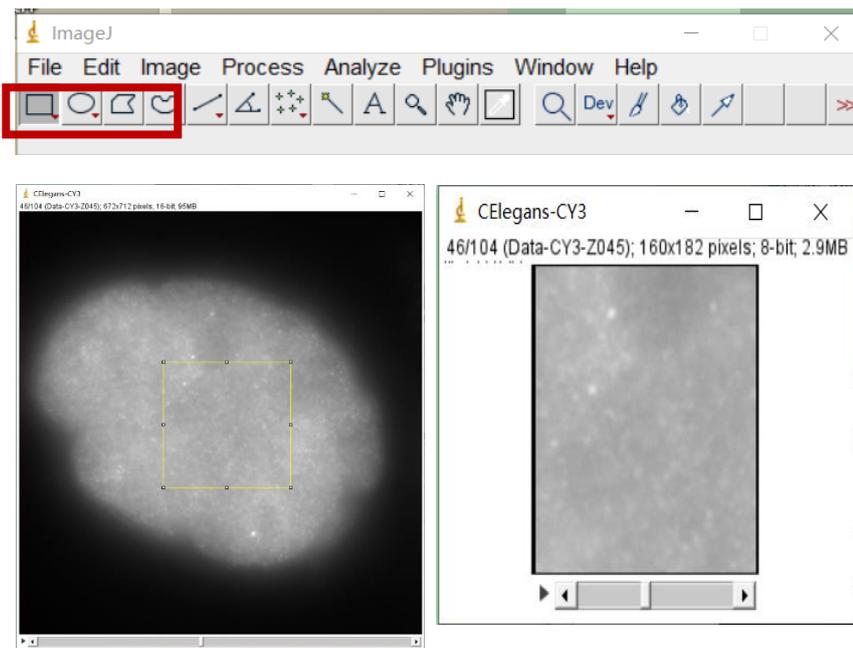
拖入后，弹出对话框：



什么都不勾选，点击 yes。

注意：如果 3D 的图片很大，如果对所有的数据进行处理会花费很长时间，建议对 3D stack 进行裁剪 (crop)，只将感兴趣的区域裁剪出来并保存。

Crop 处理方法：打开 stack，在工具栏中选择所需要的形状进行 ROI 选取，然后 image→crop，点击后会生成 crop 后的图片，进行保存



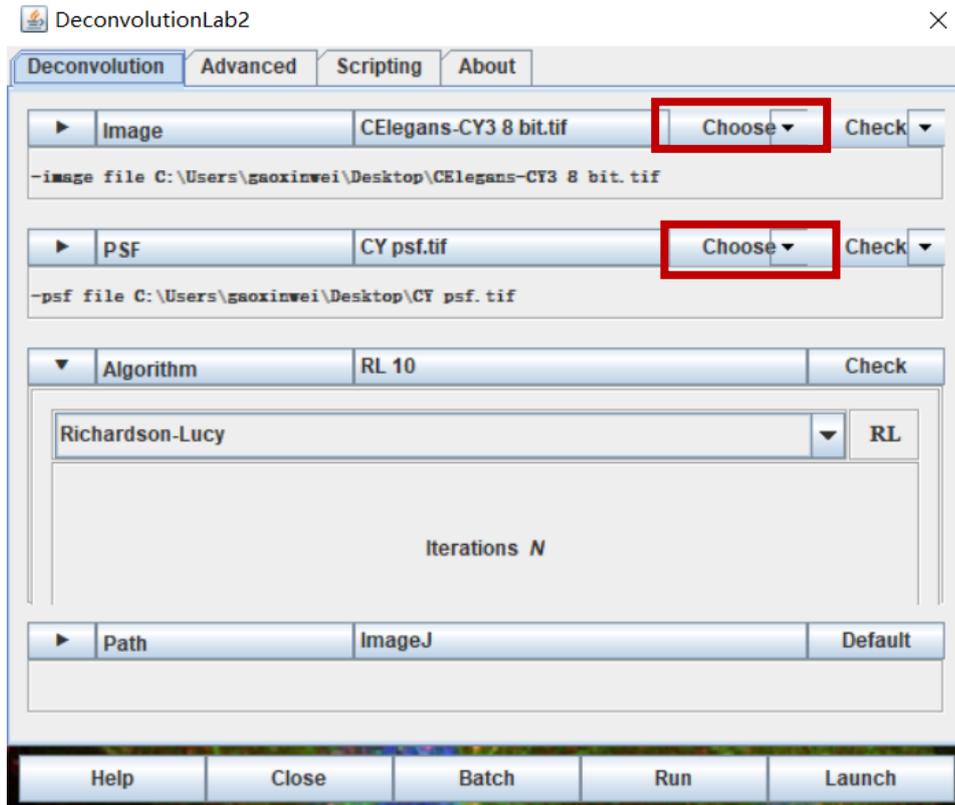
b) 然后，使用 Diffraction PSF 3D 生成一个 3D 的 PSF，进行保存。

注意：若是裁剪后的图片，根据实际的 Width&Height 进行填写

例如：原始数据为 672×712 pixels，crop 后成为 160×182 pixels，在生成 PSF 中 Width&Height 应填写 160&182。

c) 最后，使用 Deconvolutionlab2 进行去卷积

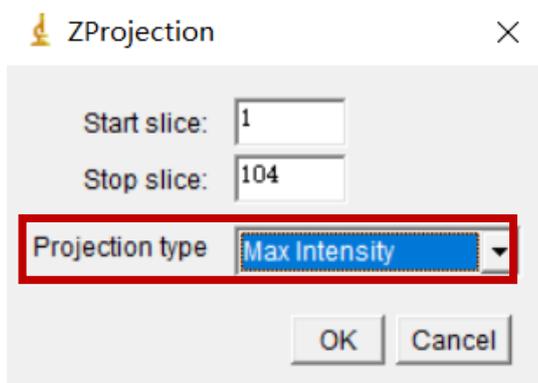
Plugins→Deconvolutionlab2→Deconvolutionlab2 Run



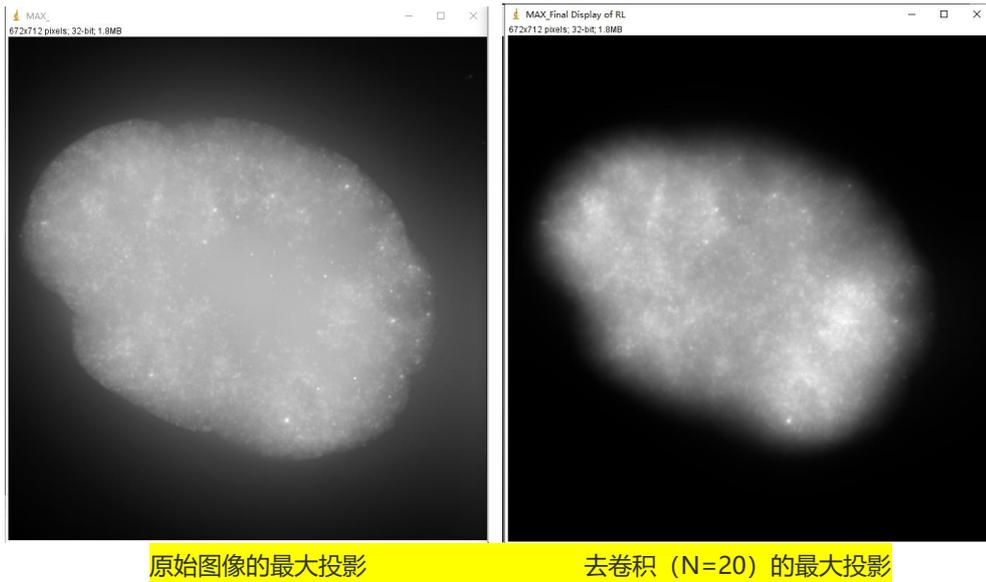
点击 Choose, 将之前保存的 8bit 的图像和生成的 PSF 载入, 3D deconvolution 使用 Richardson-Lucy system, 迭代次数 $N=10$, 根据数据特点进行迭代次数的选择, 注意不要过度迭代 (其他算法可以百度其原理, 根据数据特点进行使用), 最后点击 Run。

d) 使用最大投影的方式比较处理前后的效果

Z projection: Image → stacks → Z projection

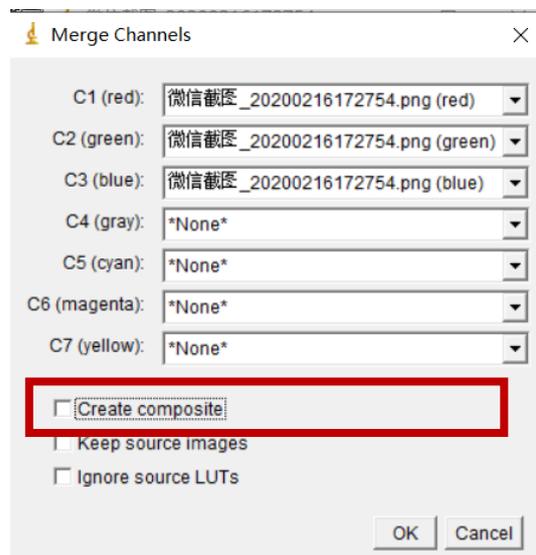


Projection type 选择 Max intensity 最大投影



3D color deconvolution

- 先将数据拆分成 3 个通道 image→color→split channels, 将会得到 3 个灰度图的 stack, 分别是 R, G, B 通道;
- 根据荧光的不同发射波长, 生成 3 个理论 PSF(R, G, B)
- 然后分别对 R, G, B 通道进行 deconvolution 处理, 参照 3D grey deconvolution 步骤;
- 处理后, 再将 R, G, B 处理后的通道合并在一起, image→color→merge channels; 注意: 不要选择 create composite 选项;



3D 去卷积的局限性:

- 1、可处理数据最大的放大倍数为 $40\times$ ，即 $40\times$ 的物镜，对于 $100\times$ 的物镜的到数据处理后并不能得到特别锐利的数据，因为我们的显微镜无法实现理想的层切厚度以及相机的解析力(140 万像素)不够高。但是对于 2D 的数据任何放大倍数都可以使用。
- 2、去卷积算法对最小分辨率有要求，但是具体的数值没有测试出来；越高的分辨率，计算出的结果越好
- 3、得到的一个准确的理论 PSF 对于数据的处理非常重要。所以我们要确认 diffraction 3D PSF 没有错，尤其是 CCD Cell Spacing 和 index of refraction 两个参数没有错误。