

· 论 著 ·

透射电镜图像标尺的实验研究

刘庆宏¹, 曲利娟¹, 刘冰川², 涂镇钢²

[摘要] 目的 研制数字图像标尺, 并与胶片上的标尺比较。方法 用数字成像装置在不同放大倍数下拍摄乳胶球衍模格栅标样(CP603), 用格栅间的固有距离计算数字图像标尺; 用数字成像装置和胶片同时拍 CP603, 以各自标尺测量格栅并比较。结果 制作了 31 500 倍以下的数字图像标尺; 数字标尺测量格栅的平均误差为 1.72%, 胶片标尺平均误差为 2.27%。结论 CP603 适合 31 500 倍以下透射电镜标尺的制作和放大倍数校正; 数字标尺精度高于胶片标尺。

[关键词] 透射电子显微镜; 标尺; 放大倍数

[中图分类号] R446 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.03.008

Study on image scale for transmission electron microscope

LIU Qing-hong¹, QU Li-juan¹, LIU Bing-chuan², TU Zhen-gang². 1. Department of Pathology, 2. Medical Imaging Department, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China

[Abstract] **Objective** To set up digital scale and compare the accuracy of the digital scale and the scale on film. **Methods** Pictures of CP603 were shot at different magnifications, the digital scales were calculated by using the inherent interval of grates. Pictures of CP603 were shot respectively with digital imaging apparatus and films, then the dimensions of grates measured and compared. **Results** Digital scales at different magnifications below 31 500 were created. The average deviation of digital scale and scale on films were 1.72% and 2.27% respectively. **Conclusion** CP603 is suitable for the establishment of digital scale under the magnification of 31 500. Digital scale is more accurate than the scale on film.

[Key words] transmission electron microscope; scale; magnification

透射电镜广泛应用于细胞及亚细胞结构观察。为定量测量和分析样本, 传统上用光学方法在胶片上生成反映透射电镜放大倍数的标尺。陈朝庆等^[1]在国内最早报道有关透射电镜数字成像的研究, 文中有对感兴趣区域标定的内容, 但没有介绍如何实现标定; 龚丹等^[2]发表有关数字成像装置的研究报告, 也没涉及放大倍数和标尺。笔者自 2008 年起在透射电镜上使用自制数字成像装置拍摄样本图像^[3-4], 并报道了数字系统放大倍数标尺的实现, 由于是以胶片标尺为基准, 除了胶片标尺本身误差外, 还多了一级测量和计算可能引入的误差。通过测量透射电镜标准样品直接计算不同倍数下数字成像装置所拍摄图像的标尺, 显然可以减少误差。

1 材料与方法

1.1 透射电镜数字成像系统组成 ①飞利浦 EM-208S 透射电镜; ②位于投影室内的透射电子荧光屏, 直径 70 mm; ③位于投影室外的数字致冷照相

机, 图像芯片为柯达 KAF-8300, 3332 × 2504 像素, 像素大小: 5.4 μm × 5.4 μm; ④控制计算机, 与数字致冷照相机通过 USB 2.0 接口连接。图像处理和测量工具是开源图像处理软件 Image J。

1.2 胶片类型及数字化方法 胶片规格为 90 mm × 60 mm, 曝光时间为 1.3 ~ 1.5 s, 用 Epson perfection 4490 扫描仪对胶片按以下扫描参数予以数字化, 文稿类型: 胶片; 胶片类型: 黑白负片, 图像类型: 8-位灰度; 扫描质量: 最佳; 分辨率: 300 dpi; 文稿大小: 原始胶片大小。

1.3 标准样品及图像拍摄过程 采用中镜科仪公司 CP603 标样, 格栅条纹密度为 2160 线/毫米, 线间距为 0.463 μm。本单位最常用的电镜放大倍数为 6300 倍(以下均指 90 mm × 60 mm 规格胶片的放大倍数), 而当倍数为 31 500 倍时, 数字成像装置只能拍摄下两个格栅。因此实验选择在 31 500 倍以下用胶片和数字成像装置先后(前后相差约 5 s)拍摄图像。比如, 调节透射电镜倍数至 3150 倍, 仔细调焦使图像至最清晰, 使曝光时间为 1.3 ~ 1.5 s, 对胶片曝光; 胶片曝光后立即用数字成像装置拍摄。

1.4 数字图像标尺的建立 图 1 为 CP603 在 25 000 倍数下的图像, A1B1 间的长度为 1750 像素,

作者单位: 350025 福建福州, 南京军区福州总医院, 1. 病理科, 2. 医学影像科

通讯作者: 涂镇钢, E-mail: 409773971@qq.com

B1C1 为 1754 像素; A1B1 和 B1C1 互相垂直且都包含 2 个格栅, 即 3504 个像素的长度为 $1.852\text{ }\mu\text{m}$ ($4\times 0.463\text{ }\mu\text{m}$); 数字图像水平为 3332 像素, 取其 $1/8$ 约 420 像素为标尺最大值, 210 像素为标尺最小值; 因为 $3504\text{ 像素}/1.852\text{ }\mu\text{m}\approx 1892\text{ 像素}/\mu\text{m}$, 因此有 378.4 像素对应 200 nm, 所以倍数为 25 000 的数字标尺就确定为 378 像素表示 200 nm, 如图 2 所示。

1.5 数字图像标尺与胶片标尺精度的比较方法
用数字标尺和胶片标尺分别测量数字图像和胶片上的格栅大小, 计算出它们各自对标准格栅大小 ($0.463\text{ }\mu\text{m}$) 的误差。图 3 像素为 3332×2504 , 数字标尺是 393 像素表示 $0.5\text{ }\mu\text{m}$; 图 4 为把像素为 661×1011 的胶片扫描图像裁剪成像素为 661×497 的图像, 以与图 3 适应。

1.5.1 数字图像中格栅的测量 图 3 中 C3-D3 为 2187 像素, A3-B3 为 2172 像素, 它们各自包括 6 个格栅, 因此, 每个格栅平均为: $(2187+2172)\div 12=$

363.25 像素 ; 每个格栅换算成 μm 大小为: $363.25\div 393\times 0.5\approx 0.462\text{ }\mu\text{m}$ (即 462 nm); 误差为: $(0.463-0.462)\div 0.463\times 100\approx 0.22\%$ 。

1.5.2 胶片图像中格栅的测量 图 4 中 C4-D4 为 342.8 像素, A4-B4 为 346.5 像素, 它们各自包括 6 个格栅, 因此, 每个格栅平均为: $(342.8+346.5)\div 12\approx 57.44\text{ 像素}$; 标尺 L1-L2 为 120 像素 (由于 L1-L2 有一定宽度, 这里以中心为准), 每个格栅换算成 μm 为: $57.44\div 120\times 1.0\approx 0.479\text{ }\mu\text{m}$ (479 nm); 误差为: $(0.479-0.463)\div 0.463\times 100\approx 3.46\%$ 。

2 结 果

2.1 数字图像标尺测量两次在不同倍数下拍摄的格栅及误差 表 1 中最大误差出现在放大倍数 3150 时, 为 3.46%, 所有倍数档误差的平均值为 1.72%。

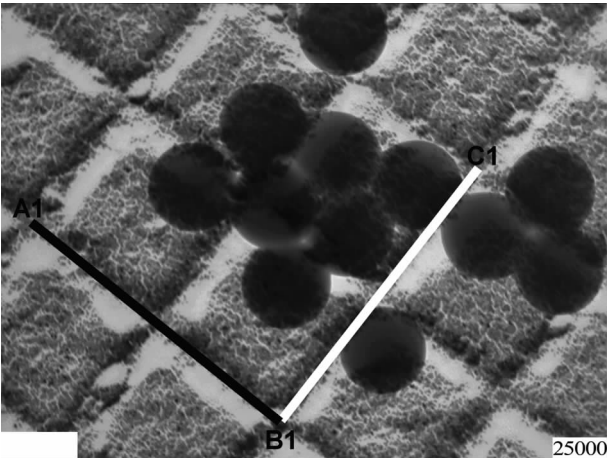


图 1 25 000 倍标尺的计算

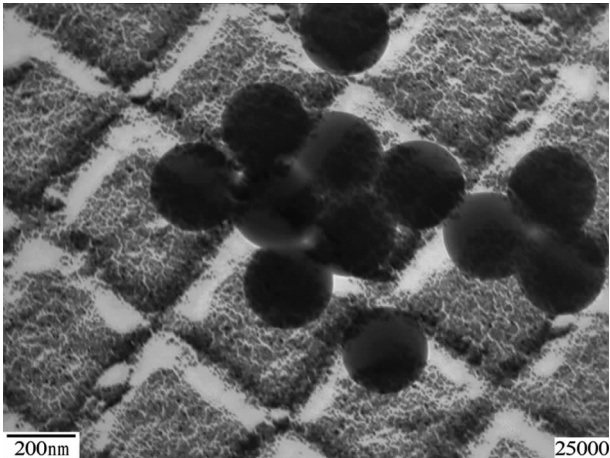


图 2 25 000 倍数带标尺的图像

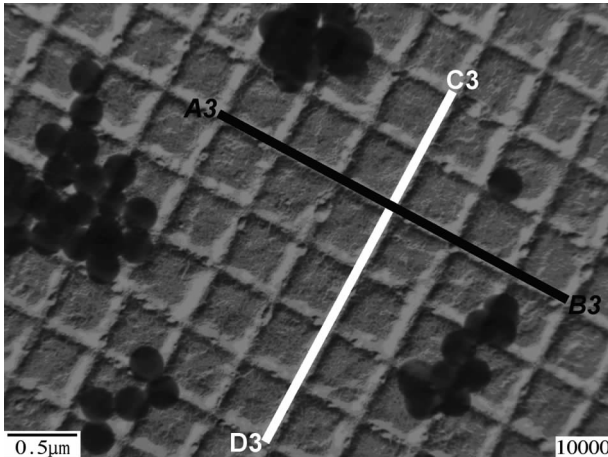


图 3 用数字标尺测量格栅示意图

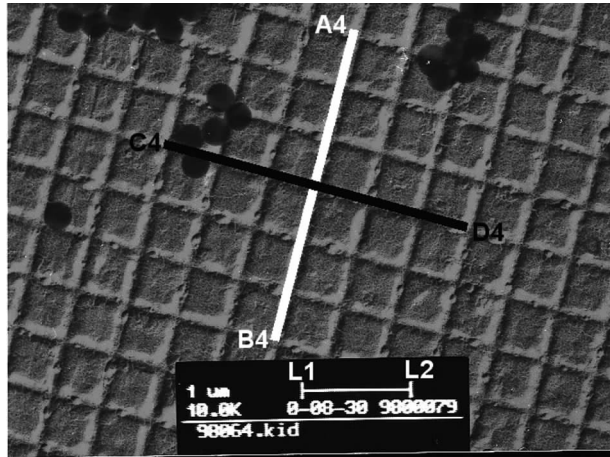


图 4 用胶片标尺测量格栅示意图

表 1 不同倍数下两次拍摄格栅的测量结果

放大倍数	25K	20K	16K	12.5K	10K	8K	6.3K	5.0K	4.0K	3.15K
第一次 (nm)	460	464	470	469	462	470	472	473	473	473
误差 (%)	0.65	0.86	1.51	1.30	0.22	1.51	1.94	2.16	2.16	2.16
第二次 (nm)	457	452	458	456	457	451	451	453	453	447
误差 (%)	1.30	2.38	1.08	1.51	1.30	2.59	2.59	2.16	2.16	3.46

注:K 为 ×1000

2.2 用胶片标尺测量不同倍数下的格栅及误差
由于胶片标尺的定位线有一定宽度,不同定位的标尺长度不一样。表 2 中第一次是以标尺定位线的外侧作为定位边界的测量结果,最大误差出现在放大倍数 12 500 时,为 4.97%;表 2 中第二次是以标尺定位线的中心作为定位边界的测量结果,最大误差

出现在放大倍数 4000 时,为 12.31%,且大多数放大倍数下的误差比第一次大;以标尺定位线的内侧作为定位边界的测量结果误差更大,结果略去。因此,应该以标尺定位线的外侧作为标尺的定位边界,此标尺最大的测量误差为 4.97%,误差的平均值为 2.27%。

表 2 不同倍数下胶片上格栅的测量结果

放大倍数	25K	20K	16K	12.5K	10K	8K	6.3K	5.0K	4.0K	3.15K
第一次 (nm)	449	462	457	440	463	456	466	441	479	450
误差 (%)	3.02	0.22	1.30	4.97	0.00	1.51	0.65	4.75	3.46	2.80
第二次 (nm)	468	488	489	481	479	475	491	471	520	473
误差 (%)	1.08	5.40	5.62	3.89	3.46	2.59	6.05	1.73	12.31	2.16

注:K 为 ×1000

3 讨论

用标准样品校正透射电镜放大倍数是通用做法,实验采用 CP603 建立的数字标尺可以满足生物医学应用需要。本实验装置是底装型的,倍数比底装胶片大,适合 31 500 倍以下放大倍数的校正和标尺建立。如果要为本装置建立倍数更大的标尺,就要使用单晶硅或其他晶格像分辨率标样。
数字标尺精度比胶片标尺高,一方面因为数字标尺新近建立,而胶片标尺自从 1998 年该机器运行以来,从没校准过;胶片标尺的定位线亦有一定宽度,不同放大倍数标尺长度差别很大,比如 12 500 倍的标尺仅为 47 像素,而 10 000 倍的标尺为 122 像素,这些都会影响胶片标尺的精度。
影响透射电镜放大倍数的电磁透镜电流、高压

等参数可能因电气、气候环境改变和器件老化而变化,通过标样定期校准透射电镜倍数,可以修正上述因素对其标尺精度的影响;标样还可用于几何失真等的校验,有助于透射电镜成像的质量控制和保证。

【参考文献】

[1] 陈朝庆,邵贝羚,孙继光,等.透射电镜 CCD 数字图像接收处理系统[J].现代仪器,1999,(5):8-11.
[2] 龚丹,曾立波,张宏波,等.透射电镜 CCD 数字图像系统的研制[J].分析测试技术与仪器,2005,11(2):133-136.
[3] 刘冰川,曲利娟,刘庆宏,等.透射电子显微镜数字成像系统的研制[J].医疗卫生装备,2007,28(10):12-13.
[4] 刘庆宏,曲利娟,刘冰川.透射电镜数字成像有关参数的探讨[J].医疗卫生装备,2010,31(6):106-108.

(收稿日期:2012-08-21;修回日期:2013-02-25)
(本文编辑:张仲书 英文编辑:王建东)