

文章编号: 0253-2239(2010)07-1994-07

# 一种荧光单分子高精度快速跟踪方法的研究

鄢志丹<sup>1,2</sup> 孙立东<sup>2</sup> 李艳宁<sup>1</sup> 胡小唐<sup>1</sup> P. Zeppenfeld<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>天津大学精密测试技术及仪器国家重点实验室, 天津 300072  
<sup>2</sup>林茨大学实验物理研究所原子与表面科学系, 奥地利, 林茨 A-4040)

**摘要** 论述了一种高精度快速的单分子实时跟踪方法, 包括图像去噪处理与高斯掩模质心法相结合的定位算法和同时考虑等效光强和帧间最大运动位移的同分子概率链接算法。对不同信噪比(SNR)下的单分子荧光图像的仿真结果表明, 该定位算法与被认为表现最好的二维直接高斯拟合相比, 不仅运算时间缩短为原来的 1/10, 而且在整个测试信噪比范围内具有更低的偏差和更好的精度, 甚至在低信噪比时也能得到可信的小偏差、高精度中心位置值。在普通个人计算机上利用该方法对单分子的百万像素级序列帧进行实时跟踪时, 跟踪速率能达到 4~5 frame/s。

**关键词** 图像处理; 荧光成像处理; 单分子跟踪; 图像去噪高斯掩模(IDGM)法; 实时分子运动监测

**中图分类号** TP751.2; Q27 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS20103007.1994

## A High-Accuracy and Fast Method for Tracking Fluorescent Single Molecules

Yan Zhidan<sup>1,2</sup> Sun Lidong<sup>2</sup> Li Yanning<sup>1</sup> Hu Xiaotang<sup>1</sup> P. Zeppenfeld<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Precision Measuring Technology and Instruments, Tianjin University, 300072 Tianjin, China)  
<sup>2</sup>Institute für Experimentalphysik, Johannes Kepler Universität Linz, Linz A-4040 Austria)

**Abstract** An efficient method is proposed to track the motion of single molecules fast and accurately. Single molecule localization is realized by image de-noising and applying a centroid algorithm based on Gaussian mask. Then the corresponding locations are linked into trajectories taking into consideration the characteristic intensity and actual displacement between subsequent frames. The method is quantitatively evaluated by using simulated sequential images at variable signal-to-noise ratios (SNRs). Compared with two-dimensional direct Gaussian fitting which is considered to be the best technique for deriving centers of single molecules, the method proposed here not only shortens the computational time to 1/10 but is also superior over the whole range of SNRs yielding lower bias and standard deviation. Particularly, at low SNRs, where the two-dimensional direct Gaussian fitting doesn't work properly, the center coordinates can still be reconstructed. A speed of 4~5 frame/s (one million pixels per image) has been achieved in the current study on a commercial personal computer.

**Key words** image processing; fluorescence imaging processing; single-molecule tracking; image de-noising Gaussian mask(IDGM); real-time molecule motion monitoring

## 1 引言

以单分子荧光显微术为基础的单分子检测与跟踪(SMD/SMT)<sup>[1~8]</sup>, 以其速度快、分子选择性强、

高分辨率微区观测等特点, 成为进一步理解受体在溶液或薄膜上的平面运动情况, 荧光标记大分子和有机体的扩散方式、胶体相互作用、分子马达运动特

收稿日期: 2009-09-09; 收到修改稿日期: 2009-10-26

基金项目: 中国-奥地利国际合作项目(WTZ-VII. VB. 18, 2008DFA71610), 国家自然科学基金(50675152)和高等学校学科创新引智计划 111 项目(B07014)资助课题。

作者简介: 鄢志丹(1982—), 男, 博士研究生, 主要从事荧光目标检测与识别、微纳测试技术等方面的研究。

E-mail: zhidanyan@tju.edu.cn

导师简介: 胡小唐(1952—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事光电测控技术、微纳测试与加工技术、精密测控技术等方面的研究。E-mail: xthu@tju.edu.cn

性、蛋白分子的聚核与裂解,深入讨论细胞内或细胞间反应机理等的强大技术手段。

对于三维结构上远小于显微镜分辨率的单个分子,其将在像空间一定区域内形成分散的电磁场斑点,其分布的情况可用点扩展函数(PSF)表示,尽管在斑点内的细节不得而知,但若存在充足的检测光子数,可以在超越衍射极限的更高精度上推算斑点中心位置<sup>[9]</sup>。单分子跟踪的空间分辨率与时间分辨率,即单分子位置坐标精度和每帧荧光图像采集时间间隔是两个重要的评价指标,高的空间和时间分辨率可以反映出分子在微区内的快速变化,能够更加准确地把握其运动机理和扩散特性。目前 SMT 实验的轨迹获取几乎都是首先用 CCD 将单分子的运动以时间序列一帧一帧记录下来,然后在离线的情况下,对每帧中的单个分子图像进行定位,获得具有亚像素的位置坐标,最后将同一点在相邻帧上的位置链接起来。采用大像素值、高采集速率、高灵敏度 CCD 和低偏差、高精度的二维直接高斯拟合定位算法被认为当前是最佳的选择。这种离线的 SMT,虽然其单分子轨迹计算不受时间限制,可对荧光图像进行高速采集,但是缺乏分子运动观测的实时性,当温度等其他分子运动微区环境的条件改变时,不能快速获得相关的运动变化信息,无法对单分子运动状态进行快速反馈。而如果将二维直接高斯拟合应用到实时单分子跟踪中去,虽然能保证跟踪的空间分辨率,却又因其复杂的耗时运算大大降低了时间分辨率。为此,本文将荧光图像去噪(FID)<sup>[5,10]</sup>和单分子定位高斯掩模(GM)<sup>[11]</sup>结合起来,形成新的荧光单分子定位算法,称之为图像去噪高斯掩模(IDGM)法,并且利用概率法来实现单分子连续帧内的链接。该方法结构简单、运算速度快、在很低的信噪比(SNR)下也表现良好,非常适用于实时单分子的跟踪研究。

## 2 单分子仿真荧光图像

CCD 所获取的分子荧光图像是由大小一致的百万级像素结构组成的数字图像。该图像除了包含分子的荧光信息外,还不可避免地存在背景噪声和散粒噪声。背景噪声的成因较多,如光学器件残余荧光、样品杂质荧光、非焦平面杂散荧光、瑞利散射光、CCD 读取噪声、暗电流等。散粒噪声,也称像素噪声、离散化噪声,是一种 CCD 器件进行离散光电

子计数时产生的具有泊松分布特征的信号。由于实际实验中无法得知单分子的准确位置信息,只能获取其计算位置,故通过仿真来定量评价算法。

### 2.1 技术参数

依据实验荧光显微成像系统来确定单分子仿真荧光图像的 PSF,该系统以 NIKON 90 i 荧光显微镜为主体,配有 CFI60(色差校正光学系统和无限远光学系统的融合)物镜(NA:0.55,放大倍率:50×)、中继放大镜片组(放大倍率:4×)和 UV-1A 荧光滤镜组,其典型发射波长为 420 nm。荧光图像由 Andor 生产的 Luca 系列之 DL-602 电子增益图像探测器(EMCCD)采集,其成像范围和像素数目分别为 8 mm×8 mm 和 1004 pixel×1002 pixel。通过以上数据,计算得出每个像素约表示 40 nm×40 nm 的实际物空间,该系统光学分辨率约为 465 nm,衍射斑第一零级半径约占 12 pixel[如图 1(a)]。

### 2.2 仿真图像序列

在单分子荧光图像中,可设置背景噪声为一个常数,而通过用一个以均值等于图像原始像素值的泊松分布的随机值实现对散粒噪声的仿真<sup>[10,12]</sup>。仿真图像序列的建立分为三个步骤:1)生成不同峰值  $I_0$  的无噪声单分子 PSF 成像模型,其大小为 50 pixel×50 pixel[图 1(b)];2)将该模型叠加到具有常数背景噪声  $b$  的图像中(200 pixel×200 pixel),明确其中心位置,此时单分子图像峰值调整为  $I_p = I_0 + b$ [图 1(c)];3)依据每个像素的值,用泊松分布随机值来代替各原始像素值[图 1(d)]。计算中,设定背景噪声  $b = 100$  灰度值,若调整不同的  $I_0$ ,可得到不同的  $I_p$ ,进而得到不同单分子图像的 SNR [ $R_{SN} = (I_p - b)I_p^{-1/2}$ ]。对于每个 SNR,分别建立 10000 frame 背景噪声相同、中心位置确定,而具有不同散粒噪声分布的单分子荧光图像,并依据此序列图像,来评估定位算法。

## 3 单分子跟踪方法

### 3.1 定位

单分子跟踪包括两个重要的步骤,一是具有亚像素分辨率的单分子位置确定,即定位,二是利用概率法实现单分子连续帧内的链接,即链接。而细分起来,定位又可分为荧光图像的去噪处理和单分子亚像素分辨率位置确定,分别称之为图像去噪和精细定位。

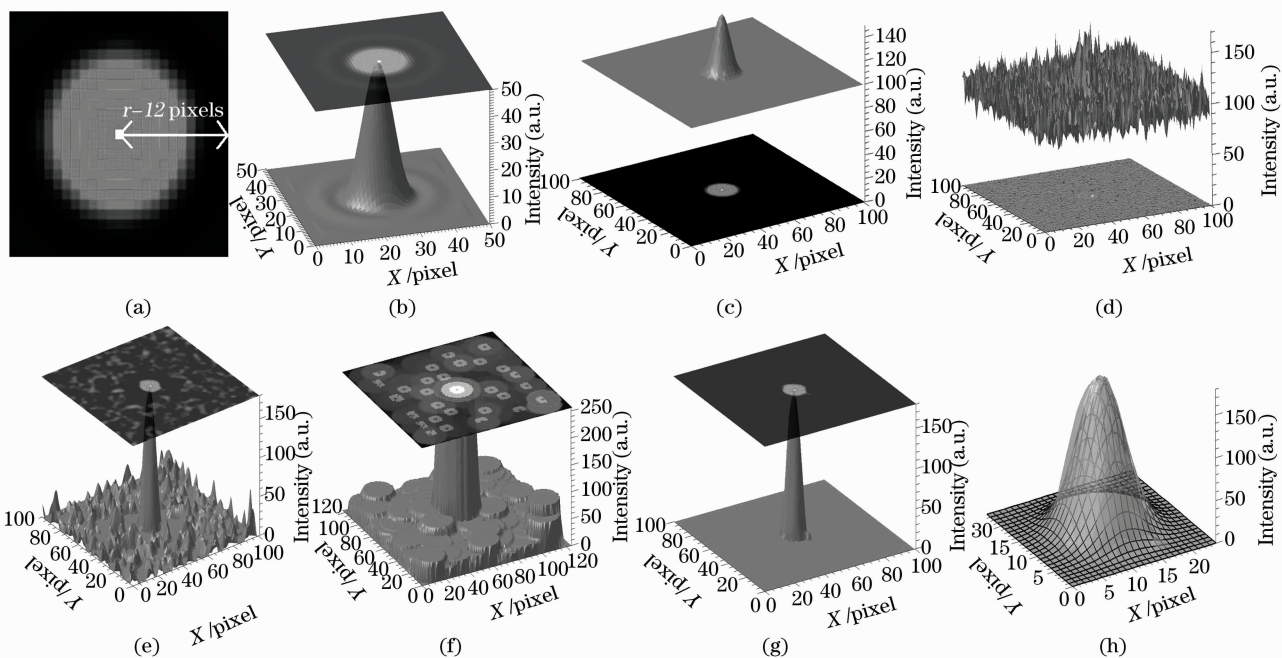


图 1 具有亚像素精度的单分子定位算法原理

Fig. 1 Schematic procedures of deriving the center of a single molecule from simulated fluorescent image with sub-pixel accuracy

### 3.1.1 图像去噪

图像去噪的目的就是尽可能地去掉两种噪声以分离分子图像信息。将原始 CCD 图像数组先转换成浮点类型  $I_0(x, y)$ , 经过卷积后即可得到去噪后的图像  $I(x, y)$ :

$$I(x, y) = \frac{1}{K_0^w} [D(x, y) - B(x, y)], \quad (1)$$

式中

$$D(x, y) = \sum_{i, j=-w}^w D_x(x-i, y-j) K_y^d, \quad (2)$$

$$B(x, y) = \sum_{i, j=-w}^w B_x(x-i, y-j) K_y^b, \quad (3)$$

$$D_x(x, y) = \sum_{i, j=-w}^w I_0(x-i, y-j) K_x^d, \quad (4)$$

$$B_x(x, y) = \sum_{i, j=-w}^w I_0(x-i, y-j) K_x^b, \quad (5)$$

$$K_0^w = \frac{1}{B} \left[ \sum_{i=-w}^w \exp\left(\frac{i^2}{2}\right) \right]^2 - \frac{B}{(2w+1)^2}, \quad (6)$$

$$B = \left[ \sum_{i, j=-w}^w \exp\left(-\frac{i^2+j^2}{4}\right) \right]^2, \quad (7)$$

式中  $D_x(x, y)$ ,  $B_x(x, y)$ ,  $D(x, y)$ ,  $B(x, y)$  分别表示  $x$  方向和二维卷积后的去除散粒噪声图像和背景图像模型。  $K_x^d, K_x^b, K_y^d, K_y^b$  为  $x, y$  方向上去除散粒噪声和背景噪声的卷积核, 其中  $K_x^d = (K_y^d)^T = \exp(-i^2/4)/B$ ,  $K_x^b = (K_y^b)^T = [M_f(2w+1) - 1/(2w+1)]$ ,  $[M_f(\cdot)]$  表示  $\cdot$  个元素值为 0.0 的行矩阵。  $w$  是正整数, 其物

理意义为大于或等于衍射斑半径, 而小于分子间距离 (若图像上存在多个分子时) 的像素个数, 这是一个十分重要的参数, 它的选取是否得当, 直接影响去噪结果, 以及接下来的分子位置精细确定。根据整个荧光成像系统的配置,  $w$  大小设定为 12 pixel (与  $r$  相等)。在进行卷积前, 现将原始图像  $I_0(x, y)$  沿上下左右四边同时外延  $w$  个像素, 其值大小与各边值相等。将卷积后得到的去噪图像  $I_f(x, y)$  重新剪切为原始图像大小, 并将其中因用高斯分布估计噪声时产生的负像素值设置为 0。利用图像去噪算法去除背景噪声和散粒噪声的后, 单分子图像信息便凸显出来 [图 1(e)]。

### 3.1.2 精细定位

精细定位可进一步细分为三个步骤: 像素级估计定位, 去除伪分子信息点和亚像素级精细定位。

实现像素级精度的中心位置定位是精细定位的第一步。采用图像数学形态学处理技术中的 256 级灰度膨胀算法来实现区域极大值的选择, 在进行膨胀算法时, 以  $w$  为半径创建结构圆, 并将图像向上下左右四个方向外延  $w$  个像素, 选择图像膨胀前后像素值的相同点即是极大值点 [图 1(f)]。为了减少后续处理的运算量, 考虑到有效单分子荧光图像区域的极值点是整帧图像高亮点, 因此可设定一个百分比  $\eta$ , 当极值点像素值位于全部像素值前  $\eta$  时, 此极大值即为估计中心位置, 否则剔除之。

尽管在估计中心时使用百分比  $\eta$  可以剔除一部分低亮度的伪点,但对于明亮的伪点(指 CCD 器件上不能成像的点的全白的斑点,一般就是独立的一个像素),通过引入中心位置等效光强  $N_{pNor}$  来加以剔除:

$$N_{pNor} = \frac{\sum_{(i-x_p)^2+(j-y_p)^2 \leq w^2} I_{ij} N_{ij}}{\sum_{(i-x_p)^2+(j-y_p)^2 \leq w^2} N_{ij}^2}, \quad (8)$$

式中

$$N_{ij} = \exp\left[-\frac{(i-x_p)^2+(j-y_p)^2}{2\sigma^2}\right], \quad (9)$$

式中  $I_{ij}$ ,  $N_{ij}$  分别表示去噪后图像点  $(i, j)$  处的像素值和高斯加权值,  $\sigma$  为高斯曲面的宽度,其大小为  $0.36w$  假设经膨胀算法后,图像中存在  $q$  个估计中心值,则  $p=0, 1, 2, \dots, q-1$ , 并设置一定的阈值  $N_T$  ( $N_T$  是一个光强度判断阈值,只有极大值  $w$  半径范围内的光强度到达一定的值后,才可以认为该点就是一个单分子的成像。它的设置与 CCD 采集图像时的曝光时间、荧光分子光子发射速率等实验时参数密切相关,需要通过多次设置才能确定一个比较合理的数值),分别对每个位置进行等效光强计算,若某一候选点  $P(x_p, y_p)$  的  $N_{pNor} \geq N_T$ , 则被视为单分子信号点。去除非噪声伪点后[图 1(g)],接下来便可采用精细定位算法来确定具有亚像素精度的单分子点中心位置。

精细定位算法可分为两大基本类型:一是直接计算单个分子位置;二是选取一个图像模板,通过计算模板与实际图像的相关值来进行确定。前者包括质心法、二维直接高斯拟合等,而后者包括诸如相关矩阵法等,以上三种算法,质心法速度最快,但精度较低;二维直接高斯拟合法和相关矩阵法精度较高,但运算量较大,其中二维直接高斯拟合对于单分子成像精度最高<sup>[12]</sup>。这些算法虽然形式不同,但都能实现亚像素的精度,大大超出光学衍射极限,甚至达到了“纳米”级的定位精度<sup>[13,14]</sup>。

对于实时在线跟踪荧光单分子,在保证低偏差、高精度的同时,必须考虑到运算的速率。在质心法和二维直接高斯拟合两种算法优点的基础上,采用高斯掩模精细定位算法:

$$x_{cp} = \frac{\sum_{(i-x_p)^2+(j-y_p)^2 \leq w^2} i I_{ij} N_{ij}}{\sum_{(i-x_p)^2+(j-y_p)^2 \leq w^2} I_{ij} N_{ij}},$$

$$y_{cp} = \frac{\sum_{(i-x_p)^2+(j-y_p)^2 \leq w^2} j I_{ij} N_{ij}}{\sum_{(i-x_p)^2+(j-y_p)^2 \leq w^2} I_{ij} N_{ij}}, \quad (10)$$

$(x_{cp}, y_{cp})$  为点  $p(x_p, y_p)$  的具有亚像素分辨率的中心位置坐标,称之为特征点坐标。其拟合原理如[如图 1(h)]所示。

### 3.2 链接

链接是形成单分子运动轨迹的最后一步,也是最重要的一步,即在确定每帧的单分子位置坐标后,通过合理的链接算法把表示同一分子的点以时间序列的方式连接起来。而以等效光强和运动位移为评价因素的概率法,是一种有效的特征点匹配方法<sup>[13]</sup>。

为简化起见,先来考虑前后两帧的连接情况。为找出与前帧某一特征点所对应的下一帧特征点,假设分子在这段时间内,存在最大可能的移动距离  $R$ ,对于前帧某一点  $P_c(x_{cp}, y_{cp})$ ,在下一帧中以  $(x_{cp}, y_{cp})$  为圆心,以  $R$  为半径的  $I(x_{cp}-R; x_{cp}+R, y_{cp}-R; y_{cp}+R)$  像素范围内,存在  $n$  个特征点,如图 2(b)所示( $n=2, m$  和  $l$ )。利用概率法进行特征点匹配:

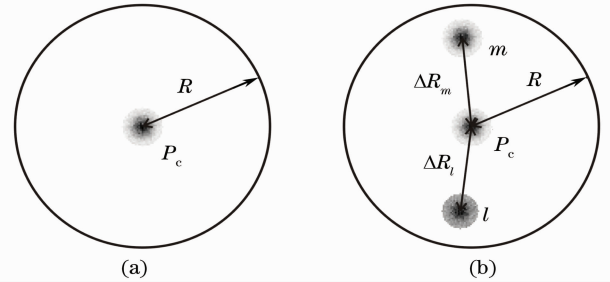


图 2 连续帧内同分子链接原理

Fig. 2 Link of a corresponding single molecule within two successive frames

$$P_i = \exp\left[-\left(\frac{\Delta R_i}{R}\right)^2\right] \exp\left[-\left(\frac{\Delta N_i}{N_i}\right)^2\right], \quad (11)$$

式中  $\Delta R_i$  是下一帧第  $i(i \leq n)$  个特征点相对于前帧  $P_c(x_{cp}, y_{cp})$  点的移动距离;  $\Delta N_i, N_i$  是此两点等效光强之差和平均值,  $P_i$  表示  $i$  和  $P_c$  的链接概率。遍历下一帧  $r$  范围内所有特征点后,若  $i=m, m \leq n$  时,  $P_m$  最大,并大于设置的概率阈值  $P_T$ ,即在至少多大可能下认为  $m$  点是前帧  $P_c$  点的继续,加之在此前已经完成了对  $m$  点的中心位置计算,则将  $P_c$  和  $m$  点的中心位置按时间序列通过直线连接起来,即得到了该点这段时间间隔的运动轨迹。当连续匹配前后两帧特征点后,便得到该分子在多帧、长时间

范围内的运动轨迹。

## 4 结果与讨论

### 4.1 定位算法比较

为了能准确地把握该算法实际的表现,一方面

采用大数据量的图像序列(10000 frame),另一方面同被认为是在单分子定位中具有较高精度的二维直接高斯拟合运算结果相比较。以计算位置 $(\hat{x}, \hat{y})$ 同实际中心 $(x, y)$ 的偏差平均值 $b_p(\Delta)$ 和标准差 $\sigma_p$ 作为评估指标

$$b_p(\Delta) = \langle [(\hat{x} - x)^2 + (\hat{y} - y)^2]^{1/2} \rangle, \tag{12}$$

$$\sigma_p = \langle \{ [(\hat{x} - x)^2 + (\hat{y} - y)^2]^{1/2} - \langle [(\hat{x} - x)^2 + (\hat{y} - y)^2]^{1/2} \rangle \}^2 \rangle^{1/2}. \tag{13}$$

如图 3 所示,无论对于那种算法,其 $b_p(\Delta)$ 和 $\sigma_p$ 都会随着 SNR 的提高持续地降低,这说明图像的信噪比是影响单分子定位结果的重要因素,因此增大荧光信号和削弱背景噪声,把荧光信号从激发光和噪声中有效分离出来,是实现荧光图像上分子精确定位的关键。除去噪运算外,还应该在可能的条件下,选择高纯度、大吸收面积、高量子产量、高光学稳定性的荧光物质,使用边界锐利的滤镜组去除杂散

光(如瑞利散射光、光学器件散射光和溶液杂质的荧光),利用荧光和杂散光在时间特性上的区别来消除拉曼散射光,采用低暗噪声、高采集效率的探测器(如液氮冷却、背光照明的增强 CCD 或电子增益 CCD)、构建高效的去噪光路(如大数值孔径物镜、共焦、双光子激发光路等等),这些都可提高单分子荧光检测效率并降低背景噪声强度。

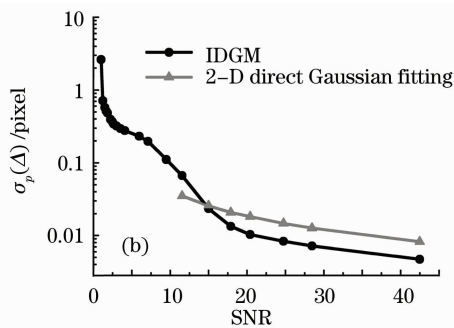
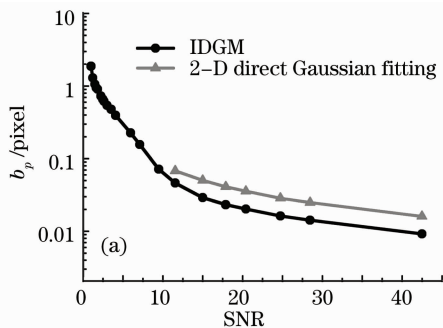


图 3 图像去噪高斯掩模法与直接高斯拟合仿真结果

Fig. 3 Simulated result of IDGM and 2-D direct Gaussian fitting

通过仿真,发现对于相同处理量的荧光图像序列, IDGM 算法不仅运算时间短,约为二维直接高斯拟合的 1/10,而且其计算值的偏差更低、精度更高。参照 Cheezum 等<sup>[12]</sup>的思路,将精确定位后的计算结果分为三类: 1) 真实可信计算值,  $b_p(\Delta) \leq 0.1$ ,  $\sigma_p \leq 1$  pixel; 2) 相对可信计算值,  $0.1 < b_p(\Delta) \leq 1$ ,  $\sigma_p \leq 1$  pixel; 3) 无效计算值,  $b_p(\Delta) > 1$  或者  $\sigma_p > 1$  pixel。从计算结果上看来(图 3),二维直接高斯拟合在低 SNR 时(小于 11.5),由于在进行曲线拟合时,计算结果不收敛,故偏差和精度无从计算(比文献[12]的结果较大,可能是采用了不同背景噪声数值和更大数量的仿真图像序列的缘故。因为 $b_p(\Delta), \sigma_p$ 的计算是建立在每帧图像计算得到的中心位置数据的基础之上,一旦其中之一因为随机的散粒噪声分布范围太大,则不能得出可信中心位置值),而对于 IDGM,由于质心运算的基本原理,在每

个 SNR 时,都有相应的中心位置计算值,并且当  $1.48 \leq R_{SN} < 8.33$  时,可得到相对可信计算值,如在  $R_{SN}$  为 1.66 时,其  $b_p(\Delta), \sigma_p$  分别约为 0.80 pixel 和 0.44 pixel (约为 32.0 nm 和 17.6 nm); 当  $R_{SN} \geq 8.33$ , 可得到真实可信的计算值,如在  $R_{SN}$  为 9.48 时,其  $b_p(\Delta), \sigma_p$  分别约为 0.072 pixel 和 0.082 pixel (约为 2.88 nm 和 3.28 nm)。当  $R_{SN} \geq 11.5$  时,无论是 IDGM 还是二维直接高斯拟合,都能得到真实可信的计算值,但 IDGM 比二维直接高斯拟合表现更为突出,其计算值的偏差和精度 ( $R_{SN} \geq 15.0$ ) 都小于利用二维直接高斯拟合所得到的计算结果,如在信噪比为 15.0 时,其  $b_p(\Delta), \sigma_p$  分别约为 0.028 pixel 和 0.024 pixel (约为 1.12 nm 和 0.096 nm),而此时二维直接高斯拟合结果分别为 0.049 pixel 和 0.026 pixel (约为 1.96 nm 和 1.04 nm) 因此, IDGM 定位算法不仅在整个  $R_{SN}$  范围内,具有较低的偏差

和较高的精度,而且能在低,甚至极低  $R_{SN}$  下,依然得到可信的计算值,加之其结构简单、运算速度快,非常适用于实时单分子的跟踪研究。

Cheezum 等<sup>[12]</sup>定量比较分析了质心算法、二维直接高斯拟合、相关矩阵算法和绝对差求和算法在对于点光源成像时中心定位的偏差和精度,并且表明二维直接高斯拟合对尺寸远小于光波长的物体定位时,具有最小的偏差和最高的精度,本文正是以此来评估算法;Sbalzarini 等<sup>[10]</sup>利用与本文相同的去噪方法,而使用质心方法来精细中心位置,该算法同样具有运算量小、偏差低、精度低的特点,但与本文算法相比其在高  $R_{SN}$ (约大于 9.0)时稍微逊色,但差别很小;Rogers 等<sup>[15]</sup>提出了一种高斯加权的多项式拟合方法,依据不同大小、形状的观测物体,估计与之相关的加权高斯分布宽度,通过四阶多项式来拟合物体荧光图像,该算法具有与本文算法类似的去噪技术和计算精度,但其计算量相对较大,运算复杂。此外,Andersson<sup>[16]</sup>和 Berglund 等<sup>[17]</sup>分别提出了基于 Bancroft 全球定位系统(GPS)和虚拟窗质心法的快速 SPT 定位算法,在用作单分子定位时也都具有与二维直接高斯拟合相当的表现。总体来说,IDGM 在荧光单分子检测、定位、跟踪研究中,具有较强的优势,是一种有效的方法。

#### 4.2 去噪核半径 $w$ 对计算结果的偏差和精度的影响

在单分子荧光图像去噪和分子定位算法中,去噪核半径  $w$  是一个关键的参数,它的选择是否适当,对最后的运算结果存在重要的影响作用。为了衡量  $w$  的影响力度,选取  $R_{SN}$  为 15.0000 时( $f_{Peak} = 400$  灰度值, $b = 100$  灰度值)的 10000 frame 仿真序列图像,设定  $w$  从 2 pixel 一直到 17 pixel 计算其偏差和精度(图 4)。可以看出,在  $w$  较小时( $2 \leq w \leq 12$ ),随着  $w$  的增大,其  $b_p(\Delta)$  和  $\sigma_p$  不断降低,但降低速度越来越慢。这主要是因为运算时包含的分子光强信息越来越多,计算中心与实际位置越来越相近。此后随着  $w$  的增加,其  $b_p(\Delta)$  和  $\sigma_p$  基本保持在一个非常小范围内波动,因此增加  $w$  值除了增加更多的运算量外,再也不能降低偏差和提高精度,而在存在多个分子时, $w$  值过大,定位时分子间的影响增大,不利于实现精确定位,因此,在进行算法的评估时所选取的  $w = 12$  pixel 是合理的。

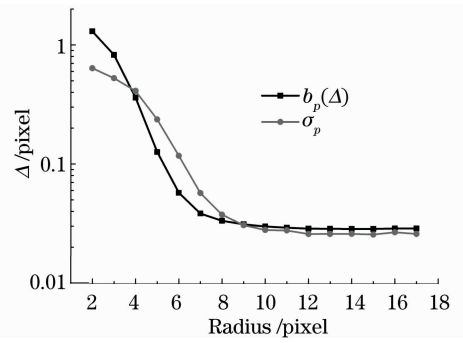


图 4 计算偏差和标准差与去噪核半径大小的变化关系

Fig. 4 Bias and standard deviation as a function of the radius ( $w$ ) of de-noising kernel

#### 4.3 单分子实时跟踪

为了实时的荧光单分子跟踪,以 LabVIEW 作为主要的开发环境,将荧光图像采集、荧光显微镜操作、温度控制、SMT 运算处理融为一体,开发出一套高效灵活在线的边采集、边跟踪、边控制的应用程序(SPT),并利用该程序在对加入噪声的 100 frame 连续随机运动的单个分子仿真荧光图像序列进行跟踪[图 5(a)].每帧大小为  $1004 \text{ pixel} \times 1002 \text{ pixel}$ ,在制作该图像序列时,同样选取  $R_{SN} = 15.0000$  时( $f_{Peak} = 400$  灰度值, $b = 100$  灰度值)的一个理想的大小为  $50 \text{ pixel} \times 50 \text{ pixel}$  的单分子像,然后随机移动分子像中心,并控制分子帧间移动的最大位移为 300 pixel,每移动一次,生成一个新的帧,然后将如前所述的方式分别将背景和散粒噪声加于其上。分别设置去噪核半径、等效光强阈值、分子帧间最大移动位移、链接概率阈值为 12 pixel,1000 灰度值,300 pixel,50%,当在双核 3.0 GHz CPU,4 GB 内存的计算机上运行该仿真时,发现可实现 4~5 frame/s 的快速跟踪。同时,利用该应用程序成功实现了对在云母基体上六联苯(para-sexiphenyl, p-6p)分子微粒(其三维尺寸小于荧光发射波长典型值)的实时跟踪。如图 5(b)所示是捕捉到的 p-6p 分子微粒的一条运动轨迹,其观测区域为  $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ ,空间分辨率达 4 nm,采集帧数 70 frame,SPT 运算速率约为 4~5 frame/s。

对于单分子在不同帧间的链接,除本文使用的概率法外,Corcker 等<sup>[8]</sup>以布朗运动扩散概率为基础,讨论了胶体散粒运动轨迹生成的算法;Sbalzarini 等<sup>[10]</sup>依据微粒匹配算法,利用图像技术理论,通过构建各帧特征点互联矩阵,来确定链接准则。

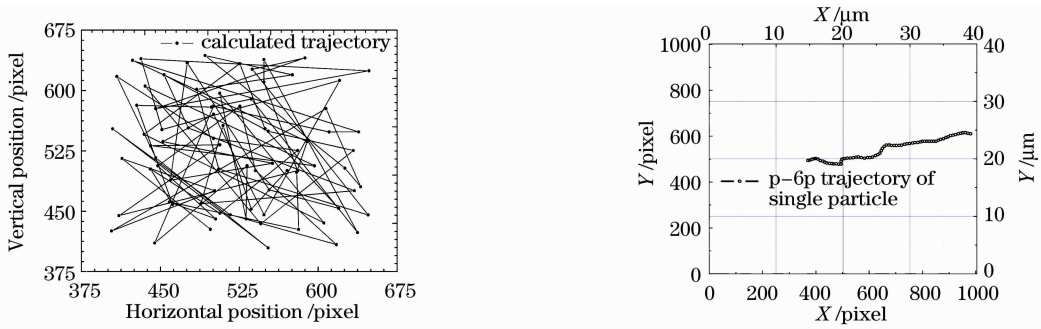


图 5 利用单分子跟踪软件获取的某一单分子扩散运动的仿真轨迹(a)和某一 p-6p 分子微粒在云母基体上的运动轨迹(b)

Fig. 5 Trajectories of a simulated single molecule(a) and a p-6p particle on Mica substrate; (b) calculated with the present real-time single molecule tracking application software

## 5 结 论

图像去噪高斯掩膜定位与同分子概率链接相结合的单分子跟踪方法结构简单、运算时间短,计算精度高,在很低的信噪比下也表现良好。该算法可以应用到所有成衍射斑图像的物体的实时跟踪中去,而不仅仅限于单分子,可以是两个,甚至多个分子的集合体,也可以是细胞中的某些微小粒子、纳米级的荧光量子点等。此外,在现有的单分子成像系统基础上,还可以将单分子检测与跟踪同单分子光谱、荧光共振能量转移<sup>[18]</sup>、荧光寿命和荧光产率<sup>[19]</sup>等分析结合起来,发展成为动态的多功能荧光分子测试手段。实时地获取分子的运动轨迹和其他光学参数,相信对进一步深入理解相应微粒的运动特征、扩散方式、光谱特性、发光机理和评估微观环境因素的影响等有着重要的价值。

## 参 考 文 献

- 1 Q. A. Hong, M. P. Sheetz, E. L. Elson. Single-particle tracking-analysis of diffusion and flow in 2-dimensional systems [J]. *Biophys. J.*, 1991, **60**(4): 910~921
- 2 G. M. Lee, A. Ishihara, K. A. Jacobson. Direct observation of Brownian-motion of lipids in a membrane [J]. *P. Nat. Acad. Sci. U.*, 1991, **88**(14): 6274~6278
- 3 S. Courty, C. Luccardini, Y. Bellaiche *et al.*. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging [J]. *Nano Lett.*, 2006, **6**(7): 1491~1495
- 4 T. M. Watanabe, H. Higuchi. Stepwise movements in vesicle transport of HER2 by motor proteins in living cells [J]. *Biophys. J.*, 2007, **92**(11): 4109~4120
- 5 J. C. Crocker, D. G. Grier. Methods of digital video microscopy for colloidal studies [J]. *J. Colloid Interf. Sci.*, 1996, **179**(1): 298~310
- 6 Qu Peng, Zhao Xinsheng. Applications of single molecule fluorescence detection in life science [J]. *Physics*, 2007, (11): 70~76  
曲 鹏, 赵新生. 单分子荧光检测在生命科学中的应用 [J]. *物理*, 2007, (11): 879~885
- 7 Peng Shuangyan, Huang Tao, Wang Xiaobo, *et al.*. Identifying and distinguishing single-molecule based on the fluorescence photon statistic measurement [J]. *Laser and Optoelectronics*

*Progress*, 2006, **43**(1): 49~55

- 彭双艳, 黄 涛, 王晓波 等. 用荧光光子统计测量作单分子识别与分辨 [J]. *激光与光电子学进展*, 2006, **43**(1): 49~55
- 8 J. Gelles, B. J. Schnapp, M. P. Sheetz. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision [J]. *Nature*, 1988, **331**(6155): 450~453
  - 9 N. Bobroff. position measurement with a resolution and noise-limited instrument [J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 1986, **57**(6): 1152~1157
  - 10 I. F. Sbalzarini, P. Koumoutsakos. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology [J]. *J. Struct. Biol.*, 2005, **151**(2): 182~195
  - 11 R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes [J]. *Biophys. J.*, 2002, **82**(5): 2775~2783
  - 12 M. K. Cheezum, W. F. Walker, W. H. Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles [J]. *Biophys. J.*, 2001, **81**(4): 2378~2388
  - 13 C. M. Anderson, G. N. Georgiou, I. E. G. Morrison *et al.*. Tracking of cell-surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled device camera-low-density-lipoprotein and influenza-virus receptor mobility at 4-degrees-C [J]. *J. Cell Sci.*, 1992, **101**(2): 415~425
  - 14 A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney *et al.*. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization [J]. *Science*, 2003, **300**(5628): 2061~2065
  - 15 S. S. Rogers, T. A. Waigh, X. B. Zhao *et al.*. Precise particle tracking against a complicated background; polynomial fitting with Gaussian weight [J]. *Physical Biology*, 2007, **4**(3): 220~227
  - 16 S. B. Andersson. Localization of a fluorescent source without numerical fitting [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(23): 18714~18724
  - 17 A. J. Berglund, M. D. McMahon, J. J. McClelland *et al.*. Fast, bias-free algorithm for tracking single particles with variable size and shape [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(18): 14064~14075
  - 18 Shan Guangcun, Huang Wei. Theoretical study of single-pair fluorescence resonant energy transfer spectroscopy in microcavity [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(4): 1049~1053  
单光存, 黄 维. 微腔中单分子对荧光共振能量转移光谱学的理论研究 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(4): 1049~1053
  - 19 Zhang Limin, He Huiyuan, Gao Feng *et al.*. Image reconstruction in fluorescence molecular tomography based on full time-resolved scheme [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(7): 1262~1268  
张丽敏, 慧 园, 高 峰 等. 荧光分子层析中的全时间分辨图像重建法 [J]. *光学学报*, 2008, **28**(7): 1262~1268