

# 离焦图像的互相关匹配法测量微球三维位置研究

谢湘军 雷海 常新宇 曾雅楠 胡晓东\* 胡小唐

天津大学精密测试技术及仪器国家重点实验室, 天津 300072

**摘要** 为了提高在液态环境中对直径微米量级微球三维位置测量的空间分辨力,尤其是轴向的测量精度,将互相关算法对相似图像高精度的匹配特性与离焦成像法测量微球三维位置的思想相结合,讨论基于互相关匹配的离焦成像法测量微球三维位置的方法。实验表明,该方法对微球轴向位置4 min内连续定位的测量标准差约为0.64 nm,已实现对微球三维方向1 nm阶跃变化的分辨测量,这在生物单分子动力学、粒子图像测速技术等研究领域具有重要意义。相同实验条件下,与同轴数字全息显微术对微球三维位置的对比测量和分析也初步说明了该方法在实际测量应用中的可行性与高精度的特点。

**关键词** 测量;微球三维位置;互相关;离焦成像;生物单分子动力学

中图分类号 TB96

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201535.0212002

## Three-Dimensional Microsphere Tracking Using Off-Focus Images Based on Cross-Correlation Matching Algorithm

Xie Xiangjun Lei Hai Chang Xinyu Zeng Yanan Hu Xiaodong Hu Xiaotang

State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instruments, Tianjin University,  
Tianjin 300072, China

**Abstract** To improve the resolution of three-dimensional position measurement of micrometer scale spheres in liquid, especially the resolution in the axial axis, a method named three-dimensional microsphere tracking using off-focus images based on cross-correlation matching algorithm is developed. It is a combination of the cross-correlation algorithm which has high precision matching characteristics to similar images and the idea of tracking three-dimensional microspheres using off-focus images. As a result, the experiments show that a standard deviation of about 0.64 nm is reflected when tracking the same microsphere continuously in the axial direction in four minutes, and a resolution of 1 nm step measurement in all three axes is achieved. This is significant to the study of single biological molecule dynamics and particle image velocimetry etc. Under the same experimental conditions, the comparative measurement and analysis of three-dimensional microsphere tracking with digital in-line holographic microscopy show that the method exhibits high feasibility and resolution in practical measurement applications.

**Key words** measurement; three-dimensional position of microspheres; cross-correlation; off-focus imaging; single biological molecule dynamics

**OCIS codes** 120.4820; 100.4999; 100.3008; 350.5730

## 1 引言

液体环境中直径为微米量级的微球三维位置测量在科学研究和工程技术领域诸如流体力学、粒子图像

收稿日期: 2014-07-11; 收到修改稿日期: 2014-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(61223008, 51375340)

作者简介: 谢湘军(1989—),男,硕士研究生,主要从事精密测量方面的研究。E-mail: azad.tse@gmail.com

导师简介: 胡小唐(1952—),男,博士,教授,主要从事微纳测试与加工技术、精密测量等方面的研究。

E-mail: xthu@tju.edu.cn

\*通信联系人。E-mail: xdhu@tju.edu.cn

测速技术和布朗运动等方面有着广泛应用,尤其在生物单分子动力学研究领域,比如蛋白质分子折叠与解折叠分析,要求实现对微球三维位置纳米级甚至亚纳米级分辨力的测量。鉴于其重要的研究地位,越来越多的测量方法被提出以提高对微球三维位置纳米级位移变化的测量精度<sup>[1-3]</sup>。目前,微球三维位置的测量方法主要包括应用于光镊技术中的背焦平面法<sup>[4]</sup>、磁镊技术中的互相关法<sup>[5]</sup>、显微成像技术中的基于理论算法的数字全息重构法<sup>[6-9]</sup>和米氏散射匹配法<sup>[6]</sup>以及基于实验图像序列本身的离焦成像法<sup>[10]</sup>。这些方法在其测量应用领域均有诸多优势,但也有其不足之处。光镊技术单个光阱只能操纵一个粒子;磁镊技术则要求研究对象须是磁珠;数字全息重构法则显得数据运算量大、速度偏慢;米氏散射法要求对粒子直径、折射率、系统放大倍数、环境折射率等有准确的测量值。本文讨论的基于互相关匹配的离焦成像法测量微球三维位置可广泛应用于磁镊及显微成像技术中,且有明显优势:测量分辨力高,准确度好,可同时测量多个微球对象。

对微球三维位置即横向、轴向位置的测量一般是由不同的方法完成的。横向位置测量方面,Zhang等<sup>[11]</sup>采用的阈值转换式质心法、van Loenhout等<sup>[12]</sup>提出的基于图像象限插值的互相关法等均实现了1 nm分辨力的测量。相对于对微球横向位置的准确测量定位,轴向位置的高分辨力测量一直是微球三维位置测量中的瓶颈,文献表明。目前实现对微球轴向位置测量的最高分辨力为2 nm,是Zhang等<sup>[13]</sup>通过最佳线性无偏估计的矢径投影法在对荧光粒子的离焦图像处理实现的。本文将主要基于互相关算法对离焦图像进行特征匹配的方法测量微球的轴向位置,并对实际情形的微球三维位置进行了追踪,实现了高分辨力测量。

## 2 测量原理

### 2.1 横向测量

对微球横向即垂直于光轴的XY平面方向的测量技术已较为成熟,诸如质心法、Hough变换法、梯度法<sup>[14]</sup>、基于图像象限插值的互相关法等,均可实现对条纹圆心的精准定位。用于检测圆的Hough变换是基于参数式来表示圆,其对应为一个参量空间矩阵,其中的元素为累加单元,累加后的峰值表示对输入图像检测到的圆特征值。本文采用基于中点圆算法快速取圆的Hough变换法来跟踪微球的XY向位置,由于对图像噪声具有稳健性的特点,实现了XY向位置的高分辨测量<sup>[7,15-18]</sup>。

### 2.2 轴向测量

对于轴向即Z向的微小位移量测量,采用的是基于离焦成像的方式进行的。离焦成像测量微球Z向位置的思想最早是由Speidel等<sup>[10]</sup>在2003年提出的,其后沈轶等<sup>[5,11-13,19]</sup>均在这种测量思想的匹配方法上做了许多工作。离焦成像思想主要是指在显微成像技术中,微球在距物镜焦面不同位置时所产生的条纹特征斑不同,即微球相对于物镜焦面的特定距离均会有一个不同的特定条纹与之对应,因此可由微球已知离焦距离的条纹斑构成标准来解析测量其他微球某一条纹斑所对应的轴向位置。在条纹特征解析匹配的方法中,应用效果较好的主要有矢径投影法<sup>[11,13]</sup>、最外环半径匹配法<sup>[19]</sup>和互相关法。与矢径投影、最外环半径匹配法相比,互相关法匹配图像特征有着最高的测量精度,且其Z向测量精度不依赖于XY向圆心的精准定位,即不会出现XY向与Z向测量精度的交叉影响。

本文讨论的基于互相关匹配的离焦成像法对微球Z向位置进行测量是对离焦成像思想与图像互相关匹配法的结合,其工作原理如图1所示,首先由纳米位移台按固定步距如100 nm驱动样品,每移动一步,由

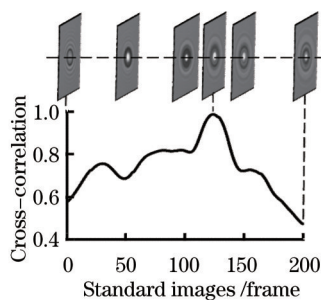


图1 Z向测量原理

Fig.1 Principle of measurement in the Z axis

CCD即时采集图像,由此构成对应微球Z向位置信息的标准图像序列库。因此,对于测量范围内微球任一位置的成像,可通过互相关匹配法将其条纹特征与标准图像序列逐一进行对比,得出“互相关值-标准图像序列号”曲线,由此解析出微球Z向位置。

具体来说,互相关匹配法是将被测微球位置条纹特征与标准图像序列库中的每一张图像进行如(1)式所示的互相关运算<sup>[20]</sup>,得到“互相关值-标准图像序列号”离散值曲线,对最大值及其附近点作多项式曲线拟合,可解析得出微球Z向纳米级测量精度。其中 $K$ 为标准图像序列库中某一图像对应的矩阵, $\bar{K}$ 为其平均值,考虑到微球可能存在微小横向偏移,选取的 $I$ 为微球被测位置图像对应的比 $K$ 略大的矩阵, $I_{x,y}$ 为从 $I$ 中有序移位截取的与 $K$ 同样大小的匹配区域, $\bar{I}_{x,y}$ 为其平均值, $K_{i,j}$ 和 $I_{x+i,y+j}$ 分别为矩阵 $K$ 和 $I_{x,y}$ 中的元素, $R_{x,y}$ 为 $I_{x,y}$ 与 $K$ 的互相关值。

$$R_{x,y} = \frac{\sum_{i=0}^{n-1} \sum_{j=0}^{m-1} (I_{x+i,y+j} - \bar{I}_{x,y})(K_{i,j} - \bar{K})}{\sqrt{\sum_{i=0}^{n-1} \sum_{j=0}^{m-1} (I_{x+i,y+j} - \bar{I}_{x,y})^2 \sum_{i=0}^{n-1} \sum_{j=0}^{m-1} (K_{i,j} - \bar{K})^2}} \quad (1)$$

### 3 实验系统

构成显微成像功能的实验光路如图2(a)所示,位于透镜焦点位置的LED点光源发出的光经透镜会聚后形成平行光束,光束中经微球散射的部分与未经微球散射的部分在倒置的显微物镜焦面位置附近干涉,干涉图像经物镜放大后由CCD成像。制备好的样品其结构如图2(b)所示,微球由IKA C-MAG HS 7加热磁力搅拌器通过加热熔融的方式固定的玻片上。

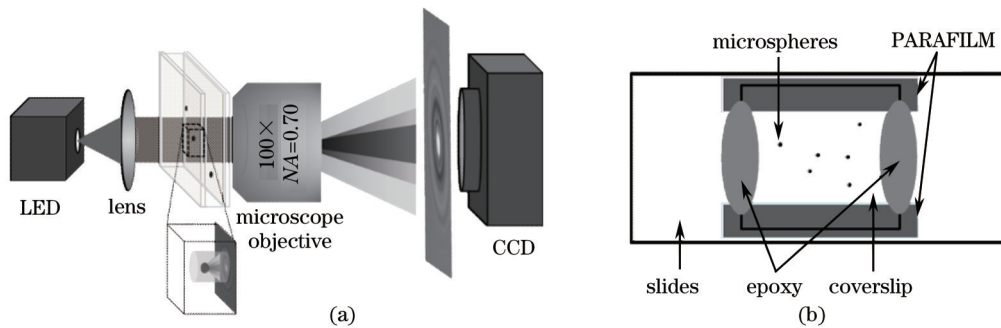


图2 实验系统。(a) 成像装置;(b)样品结构

Fig.2 Experimental system. (a) Imaging devices; (b) structure of the sample

系统使用的LED点光源(SCHOTT MORITEX, MCEP-CR8-070 & Controller MLEP-A070W1LR-100V)为红光,波长范围为613.5~645.0 nm。使用的显微物镜(Nikon, CFI L Plan EPI SLWD)放大倍率为100倍,数值孔径 $NA$ 为0.70。图像传感器CCD(Point Grey, GS2-GE-50S5M-C)的有效像素个数为2448 pixel×2048 pixel,像元尺寸为 $3.45 \mu\text{m} \times 3.45 \mu\text{m}$ ,实验过程中一般使用非全区域成像时30 frame/s的采样速率。此外,用于驱动样品移动的纳米位移台(nPoint, NPXY100Z25-102 & Controller C.300)XYZ向行程分别为100、100、25  $\mu\text{m}$ ,定位噪声分别为0.3、0.3、0.1 nm。

由于空间采样及本身噪声,使用数字化的成像装置将会引入误差。而图像的空间采样频率,理论上主要由显微成像系统的传递函数及微球的粒径大小所决定<sup>[11]</sup>。根据实验装置,艾里斑直径 $d_o = 1.22\lambda/NA = 1069 \sim 1124 \text{ nm}$ ,因此对点扩展函数(PSF)的最大采样宽度建议不超过 $d_o/10 = 106.9 \text{ nm}$ ,实验过程中所取采样宽度为100 nm。如果微球直径 $d_b > d_o$ ,图像频谱主要由被测对象的频谱而不是PSF的频谱所限制,由此得出100 nm采样宽度下可测的最小微球直径 $d_b = 1.0 \mu\text{m}$ 。实验中对 $1 \mu\text{m}/3 \mu\text{m}/5 \mu\text{m}$  (Polysciences, Inc),  $2.8 \mu\text{m}$  (Invitrogen, Dynabeads M-270),  $4.5 \mu\text{m}$  (中国石油大学重质油国家重点实验室)五种直径的微球进行了测量分析。

## 4 实验结果及分析

### 4.1 XYZ向纳米阶跃测量

为了测试基于互相关匹配的离焦成像法的测量分辨力,实验中使用该算法对微球纳米级阶跃跳变进行了测量。如图3所示,XY向1 nm及Z向2 nm的阶跃变化都可以清晰地分辨出来,其中XY向纳米阶跃的标准差分别为0.41 nm和0.34 nm,Z向的标准差为0.58 nm。

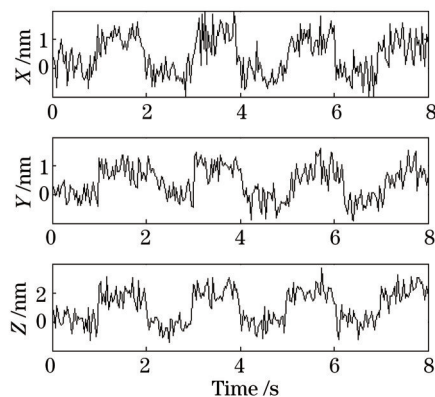


图3 XYZ向纳米阶跃测量

Fig.3 Measurement of nano-step in three axes

理论上,基于互相关匹配的离焦成像法测量微球Z向位置的分辨力可达到理想的亚纳米甚至更高水平,通过对仿真图像的分析处理也佐证了这一点。然而,事实上,尽管纳米位移台保持在一个固定的位置,微球与物镜间的相对位置每分钟会有几纳米甚至十几纳米的渐变。这一变化很大程度来源于光学平台振动及环境温差变化等引起的物镜焦距漂移或者纳米位移台位置漂移,这也是测量系统的主要误差源。如图4所示为基于互相关匹配的离焦成像法对同一位置同一微球Z向位置连续定位的结果,其中由于噪声因素引起的约50 nm的线性漂移已被减去。由图中可看出,定位结果分布在 $\pm 3$  nm范围内,对这一波动数据进行统计分析,发现其分布符合高斯分布,高斯分布定位结果的标准差为0.64 nm。因此,该实验系统下基于互相关匹

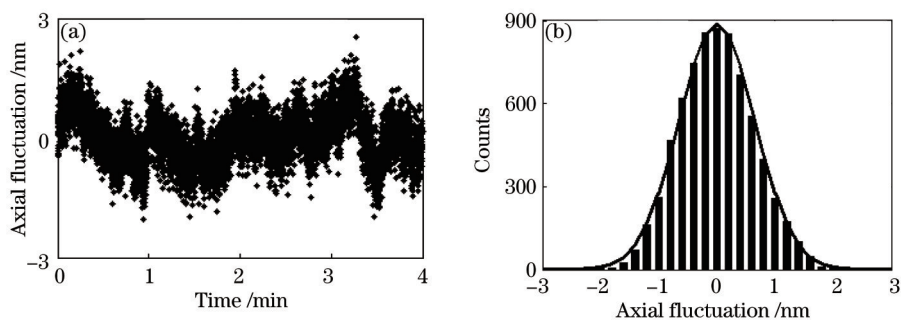


图4 静态噪声。(a)轴向位置波动;(b)统计分布

Fig.4 Static noise. (a) Axial position fluctuation; (b) statistical distribution

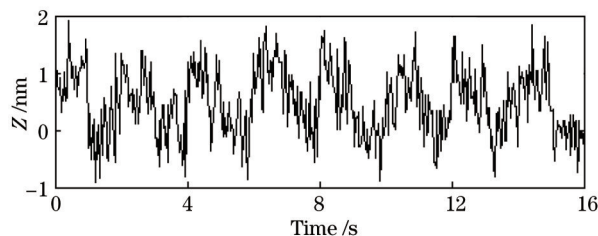


图5 Z向1 nm阶跃测量

Fig.5 Measurement of 1 nm step in the Z axis



配的离焦成像法对微球Z向位置的分辨力可达0.64 nm。图5为对Z向1 nm阶跃变化的测量结果。

### 4.2 微球大范围三角波运动测量

为了表明基于互相关匹配的离焦成像法测量微球三维位置的测量范围,实验中控制微球按给定的大范围三角波进行运动,可得到如图6所示结果。事实上,XY向的测量范围由显微成像系统的成像视野所决定,对于放大倍率约100倍的成像系统而言,XY向测量范围均可达50 μm以上,而Z向的测量范围则取决于微球大小及离焦图像的成像质量。

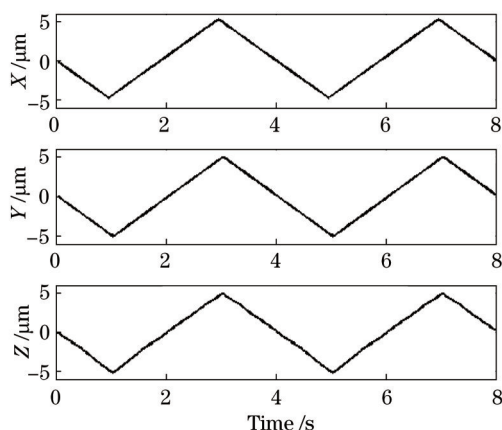


图6 XYZ向10 μm幅度的三角波运动测量

Fig.6 Measurement of 10 μm range triangular motion in three axes

### 4.3 与同轴数字全息术的对比测量

为了检验基于互相关的离焦成像法测量微球三维位置的可行性及测量精度,针对同样的实验系统与环境中的采集的微球图像,对该方法与同轴数字全息术(DIHM)测量微球三维位置的方法进行了对比。如图7所示

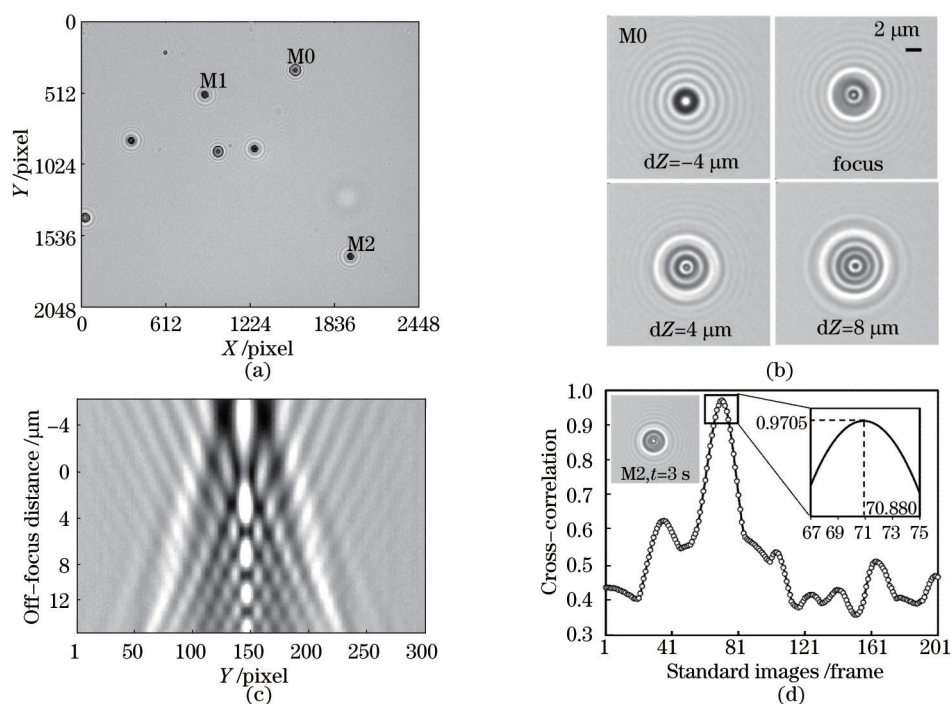


图7 实际情形微球三维位置跟踪。(a)液态环境中的微球图像;(b)由微球M0构建的标准图像库部分图像;(c)不同离焦位置时衍射环大小及强度剖面图;(d)  $t=3$  s时微球M2 Z向位置测量

Fig.7 Tracking of microspheres' three-dimensional position in practical case. (a) Image of microspheres in liquid; (b) some of standard images constructed from microsphere M0; (c) size and intensity profile of the diffraction rings at different positions of the objective's focal plane; (d) measurement of microsphere M2 in the Z axis at time  $t=3$  s

示,图(b)为由微球 M0 构建的标准图像序列库的部分图像,由于其他被测微球与微球 M0 材质相同,且各微球粒径偏差在 3% 以内,因此各微球的衍射环大小及强度分布与微球 M0 基本一致,仅与各自的离焦距离有关 [图 7(c)]. 图 7(d)展示了微球 M2 在  $t=3$  s 时刻产生的图像及其与标准库图像匹配的情形,其中由解析得出的最大互相关值所对应的图像库序列值即可推算出微球 M2 在此刻的 Z 向相对位置。

对微球 M1 和 M2 进行连续追踪的测量结果分别如图 8 及图 9 所示。两种方法对微球 M1 测量值之差的标准偏差为 2.10 nm,其中微球 M2 由于未固定而在重力、浮力、粘滞力等作用下游离向下运动。为了在同一幅图中清晰地显示两种方法的测量结果,在图 8(a)及图 9 中,对同轴数字全息测得的结果加有偏置值。

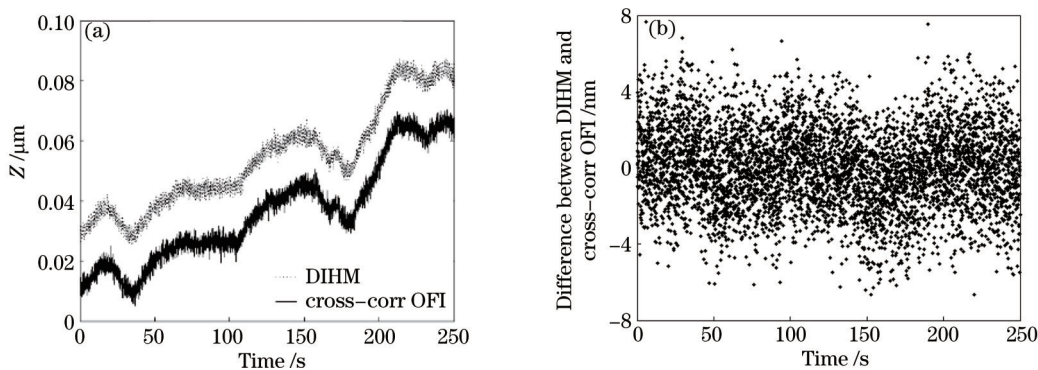


图 8 微球 M1 位置跟踪。(a) Z 向定位结果; (b) 测量值差异

Fig.8 Tracking of microsphere M1. (a) Axial position tracking results; (b) difference between the two measurement values

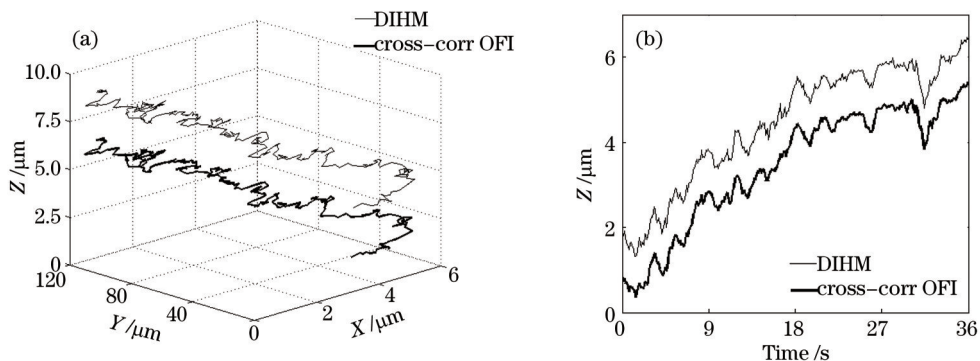


图 9 微球 M2 位置跟踪。(a) 三维位置测量结果; (b) Z 向定位结果对比

Fig.9 Tracking of microsphere M2. (a) Three-dimensional tracking results; (b) comparison of axial position tracking

## 5 结 论

鉴于互相关法对相似图像的精准匹配特性,将其应用于离焦成像法测量微球三维位置。实验结果表明,该方法可实现对 Z 向 1 nm 阶跃跳变的分辨测量,并可同时测量多个微球粒子。为测试在实际测量应用中的情形,实验中与同轴数字全息术做了对比测量,结果表明基于互相关匹配的离焦成像法对微球 Z 向微小位置变化测量具有高精度及高可行性的特性,这为生物单分子动力学如蛋白质分子折叠与解折叠时的力学特性分析等研究提供了有力的保障。

## 参 考 文 献

- 1 E Meijering, O Dzyubachyk, I Smal. Methods for cell and particle tracking [J]. *Methods Enzymol*, 2012, 504(9): 183–200.
- 2 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.
- 3 N Chenouard, I Smal, F de Chaumont, *et al.*. Objective comparison of particle tracking methods [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 281–290.
- 4 F Gittes, C F Schmidt. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers [J]. *Opt Lett*, 1998, 23(1): 7–9.

- 5 Shen Yi. High-Throughput Single-Molecule Magnetic Force Spectroscopy: Construction & Biological Application [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, 2012. 38-45.  
沈 轶. 平行高通量单分子磁力谱方法构建与生物学应用[D]. 上海: 中国科学院上海应用物理研究所, 2012. 38-45.
- 6 C F Cheong, B J Krishnatreya, D G Grier. Strategies for three-dimensional particle tracking with holographic video microscopy [J]. *Opt Express*, 2010, 18(13): 13563-13573.
- 7 Lü Qieni, Gao Yan, Ge Baozhen, *et al.*. Digital holographic particle sizing with hough transform [J]. *Chinese J Lasers*, 2009, 36(4): 940-944.  
吕且妮, 高 岩, 葛宝臻, 等. 基于霍夫变换的数字全息粒子尺寸测量[J]. *中国激光*, 2009, 36(4): 940-944.
- 8 Wu Yingchun, Wu Xuecheng, Cen Kefa. Development of digital holography in particle field measurement [J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(6): 0601001.  
吴迎春, 吴学成, 岑可法. 数字全息测量颗粒场研究进展[J]. *中国激光*, 2014, 41(6): 0601001.
- 9 Liu Huiping, Yu Jia, Wang Tian, *et al.*. Digital holographic three-dimensional sensing and imaging for aquatic species [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2014, 51(2): 020901.  
刘惠萍, 于 佳, 王 添, 等. 水下微生物的三维数字全息探测[J]. *激光与光电子学进展*, 2014, 51(2): 020901.
- 10 M Speidel, A Jonas, E L Florin. Three-dimensional tracking of fluorescent nanoparticles with subnanometer precision by use of off-focus imaging [J]. *Opt Lett*, 2003, 28(2): 69-71.
- 11 Zhang Zhipeng, C H Menq. Three-dimensional particle tracking with subnanometer resolution using off-focus images [J]. *Appl Opt*, 2008, 47(13): 2361-2370.
- 12 M T J van Loenhout, J W J Kerssemakers, I De Vlaminck, *et al.*. Non-bias-limited tracking of spherical particles, enabling nanometer resolution at low magnification [J]. *Biophys J*, 2012, 102(10): 2362-2371.
- 13 Zhang Zhipeng, C- H Menq. Best linear unbiased axial localization in three-dimensional fluorescent bead tracking with subnanometer resolution using off-focus images [J]. *J Opt Soc Am A*, 2009, 26(6): 1484-1493.
- 14 R Parthasarathy. Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 724-726.
- 15 Bao Xiaoli. The Study on Three-Dimensional Reconstruction Method of Three-Dimensional Particle Tracking Velocimetry [D]. Dalian: Dalian Institute of Technology, 2013. 26-32.  
鲍晓利. 三维粒子跟踪测速系统中的三维重构技术研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2013. 26-32.
- 16 S-H Chiu, J-J Liaw, K-H Lin. A fast randomized hough transform for circle/circular arc recognition [J]. *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*, 2010, 24(3): 457-474.
- 17 Li Muguo, Bao Xiaoli. Particle location based on circular hough transform and quadrant radius histogram [C]. 3rd International Congress on Image and Signal Processing, 2010. 1667-1670.
- 18 Zhao Lianjun, Liu Enhai, Zhang Wenming, *et al.*. Feature extraction of target based on global information [J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(4): 0415001.  
赵连军, 刘恩海, 张文明, 等. 利用全局信息提取靶标特征的方法[J]. *光学学报*, 2014, 34(4): 0415001.
- 19 A Marki, E Ermilov, A Zakrzewicz, *et al.*. Tracking of fluorescence nanoparticles with nanometre resolution in a biological system: assessing local viscosity and microrheology [J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2013, 13(2): 275-288.
- 20 J P Lewis. Fast normalized cross-correlation [J]. *Industrial Light & Magic*, 1995, 10(1): 120-123.

栏目编辑: 何卓铭