

去卷积数字全息重构的微球位置精确测量

雷海 常新宇 谢湘军 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 微球三维位置的精确测量是单分子力谱测量技术中的关键。采用同轴数字全息技术对微球的三维位置进行测量。通过同轴数字全息显微系统采集一系列微球的全息图像,利用瑞利-索末菲传播原理对全息图进行三维重构,同时对重构光场进行去卷积运算,消除了散斑、离焦信号等噪音,并对微球球心纵向光场分布进行多项式拟合,提高了微球三维位置测量精度。实验表明,该方法不仅能够对全视场中的微球进行并行测量,而且能够对交叠微球进行测量,纵向分辨率达到2 nm,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。

关键词 测量;数字全息;重构;微球三维位置;去卷积;单分子力谱

中图分类号 TB877.1

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201535.0409001

Deconvolution in Digital Holographic Reconstruction for High-Accuracy Position of Microsphere Tracking Technology

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

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

Abstract High resolution three-dimensional (3D) position of microspheres tracking is the key point in the aero of single molecule force spectrum. Digital holography is emerging as a promising optical technique for 3D microspheres tracking. A sequence of holograms are acquired using charge couple device with an in-line digital holographic microscopy. Each hologram is subsequently reconstructed with Rayleigh-Sommerfeld propagation function and then deconvolved it with its propagator to suppress the artifacts and blur. Also polynomial fitting is introduced to fit the intensity profile of the volumetric reconstruction in the Z direction which can improve the resolution of 3D microspheres tracking. As a result, this method can measure multiple microspheres simultaneously and also can measure the overlapped spheres. The resolution in the Z direction is approach 2 nm, this is significant to the study of single biological molecule dynamics and particles image velocimetry etc.

Key words measurement; digital holography; reconstruction; three-dimensional position of microspheres; deconvolution; single molecule force spectrum

OCIS codes 120.4820; 090.1995; 100.3010; 100.1830

1 引言

基于图像的微球位置测量技术在科学和工程实践等众多领域中具有广泛的应用,例如研究布朗运动、细胞生物、微球相互作用^[1]以及单分子力谱测量^[2]等。随着生命科学研究的重心逐渐转移到探索生物单分子结构及其生命活动中的力学特性,以揭示生命的本质,其测量技术已经成为研究热点。目前,光镊和磁镊技术已经发展相对成熟,成为生物单分子研究的重要工具。为了实现对纳米尺度生物分子的操纵,都是在生物分子上通过物理吸附或化学修饰一个亚微米至数微米微球,然后通过光阱力或磁力操纵此微球,进而实

收稿日期: 2014-10-11; 收到修改稿日期: 2014-12-04

基金项目: 国家自然科学基金(61223008,51375340)

作者简介: 雷海(1988—),男,博士研究生,主要从事光学测量、生物单分子力谱方面的研究。E-mail: nkukid@163.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

现对生物分子的操纵,实现脱氧核糖核酸、核糖核酸和蛋白质等生物单分子力学特性的研究。微球三维(3D)空间位置的变化即反映出生物分子构象的变化,也对应着操纵力的变化,因此对其三维位置的精密测量是实现生物单分子动力学研究的关键。

目前,平面位置测量技术已经非常成熟,通过块匹配、相位相关、数字相关以及霍夫变换等技术能够实现亚像素甚至0.01 pixel的测量分辨力^[3-4]。对于纵向位置测量,共聚焦显微技术和离焦成像技术^[5]都是以物镜焦平面为基准来进行测量从而受到景深和工作距离的限制,而荧光显微技术需要对样品表面进行处理可能造成损伤。同时,上述方法对微球的同一性要求很高,且不能对相互交叠的微球进行测量,因此其适用性低。Sheng等^[6]提出了基于数字全息微球三维跟踪技术,不仅克服了上述问题,而且能够在未知微球大小情况下对视场中的所有微球同时测量。这种技术广泛应用于在粒子场的测量中^[7],但在近年的研究中,其测量精度在几十纳米至微米尺寸^[8-9],而在单分子力谱测量中生物分子拉伸尺度为亚纳米至数纳米,不能满足测量要求。

同轴数字全息在微球位置测量中,图像背景中的噪声、离焦信号、散斑、光场在系统传播过程中的反射、折射以及干涉效应产生的噪声等都会导致重构光场的不准确性,从而引起测量误差。传统的数字全息重构都是基于菲涅耳衍射原理,本文采用瑞利-索末菲传播函数对微球全息图像进行三维重构,并将广泛应用于共聚焦显微成像技术中的去卷积算法引入三维重构过程中,有效地消除了噪声的影响。然后对三维重构光场纵向分布进行多项式拟合,实现了微球位置的精确测量。

2 测量原理

同轴数字全息显微成像及重构原理如图1所示。平行光入射到样品中,被微球散射的光作为物光,而未被微球散射直接透过的光作为参考光。物光和参考光发生干涉形成全息图。令散射光和透射光分别为 $U_s(r,z), U_t(r,z)$,其中 r 为全息面坐标, z 为微球到物镜焦平面的距离。以全息面为坐标系,全息图可以表示为

$$I_h(r,0) = |U_s(r,0) + U_t(r,0)|^2 \quad (1)$$

由于 $|U_s(r,0)|^2 \ll |U_t(r,0)|^2$,因此对全息图进行归一化可以得到

$$I_n(r,0) = \frac{I_h(r,0)}{I_b(r,0)} - 1 \approx 2R_c[U_s(r,0) \cdot U_t(r,0)] / I_b(r,0) = 2R_c[u_s(r,0)] \quad (2)$$

式中 $I_b(r,0) = |U_t(r,0)|^2$ 为视场中无微球时记录图像的强度, $u_s(r,0) = U_s(r,0)/U_t(r,0)$ 为归一化的被微球散射的光场。

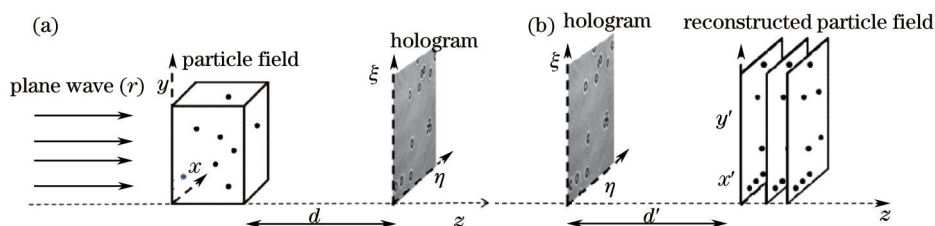


图1 同轴数字全息的成像与重构。(a)全息图的成像记录;(b)全息图的重构

Fig.1 Schematic of recording and reconstruction of particle field. (a) Hologram generation of 3D particle field using plane wave illumination; (b) plane-wise 3D numerical reconstruction of particle field from digital hologram of Fig.1(a)

在数字全息重构过程中,利用瑞利-索末菲传播函数可以得到^[10]

$$u_r(r,z) = u_s(r,0) \otimes h(r,-z), \quad (3)$$

式中 $h(r,-z)$ 为瑞利-索末菲传播函数:

$$h(r,-z) = \frac{1}{2\pi} \frac{\partial}{\partial z} \frac{\exp(ikR)}{R}, \quad (4)$$

式中 $R = r^2 + z^2, k = 2\pi/\lambda$ 。对(3)式两端同时进行傅里叶变换:

$$\text{FT}[u_r(r,z)] = \text{FT}[u_s(r,0)] \cdot H(q,-z), \quad (5)$$

式中 $\text{FT}(\cdot)$ 表示傅里叶变换, $H(q,-z) = \exp[iz(k^2 - q^2)/2]$ 为 $h(r,-z)$ 的傅里叶变换,同时由(2)式可以得到 $I_b(r,0)$ 的

傅里叶变换:

$$\text{FT}[I_b(r,0)] \approx \text{FT}[u_s(r,0)] + \text{FT}[u_s^*(r,0)]. \quad (6)$$

因此,根据(5)式和(6)式,可以得到

$$\text{FT}[I_s(r,0)] \cdot H(q,-z) = \text{FT}[u_r(r,z)] + \text{FT}[u_r^*(r,-z)]. \quad (7)$$

(7)式表明在同轴数字全息重构过程中,会产生孪生像^[11],其会影响光场的重构,但是当将样品远离焦平面时,会降低孪生像的影响^[112-131],因此在不考虑其影响的情况下可以通过(5)式和(7)式得到

$$u_r(r,z) = \text{FT}^{-1}\{\text{FT}[I_s(r,0)] \cdot H(q,-z)\}, \quad (8)$$

FT^{-1} 表示逆傅里叶变换,通过(8)式可以得到微球三维重构光场强度分布 $I_r(r,z) = |u_r(r,z)|^2$,进而可以得到微球的三维位置。然而在重构过程[(3)式]中,其假设光场在各项同向的均匀介质中传播,但是实际成像过程中光场传播所经过的介质包含一些杂质、奇点等会产生散斑以及离焦信号等,因此在重构过程中会引入噪声^[14]。这些人为引入的噪音以及孪生像都会影响微球三维重构^[15],从而影响微球的三维位置的精确定位。

去卷积运算是一种对强度图像进行处理的方法,可以提高图像信号的噪声比、消除散斑等^[16]。物体在光学系统成像中,可以将物体看作多个点的集合,而每个点通过光学系统成像可用系统的传播函数(或点扩展函数)来描述,整个物体的成像可以表示为这些点成像的集合,进而可以描述为物体和系统传播函数(或点扩展函数)的卷积。因此,通过对记录的三维图去卷积运算就能够得到清晰的物,此方法广泛应用在共聚焦图像以及荧光成像中^[17-18]。这里将去卷积运算引入到数字全息三维重构过程中,并以系统的瑞利-索末菲传播函数 $h(r,z)$ 作为卷积核,其重构的光场可表示为^[19]

$$u(r,z) = \text{FT}^{-1} \left\{ \frac{\text{FT}[|u_r(r,z)|^2]}{\text{FT}[|h(r,-z)|^2 + \alpha]} \right\}. \quad (9)$$

根据(9)式可以得到去卷积之后的重构光场,通过重构光场的三维强度分布,可以确定微球的三维空间位置。

3 实验装置

数字全息显微系统如图2(a)所示,平行光入射到样品中,被微球散射的光与未经微球散射的光在物镜焦平面产生干涉形成全息图,经物镜放大后由电荷耦合器件(CCD)成像并储存在计算机中。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。

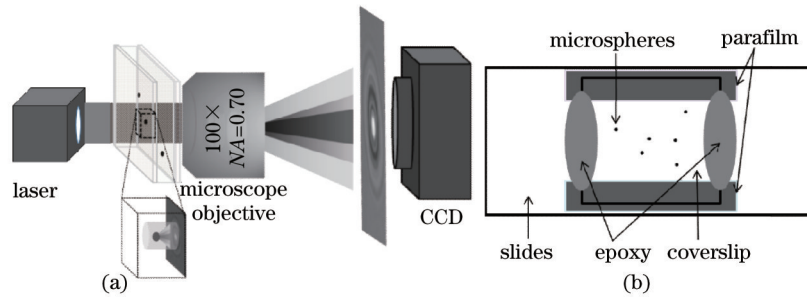


图2 实验系统。(a) 成像装置;(b) 样品结构

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

实验系统将 LD 激光器(Edmund, Laboratory Laser Diode)作为光源,波长为 635 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 μm × 3.45 μm ,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 和 25 μm ,定位噪声分别为 0.3、0.3 和 0.1 nm。实验中对 1 μm /3 μm /5 μm (Polysciences, Inc), 2.8 μm (Invitrogen, Dynabeads M-270), 4.5 μm (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

图3为实验系统记录的一幅微球的全息图3(a)和无样品时的背景图3(b)。根据(2)式通过图3(b)对全息图3(a)做归一化处理,消除由光学元件镜面及CCD像面引起的背景噪声。由于图像尺寸较大,将图像拆为单个微球和三个微球两幅图像分别进行重构和位置确定(Matlab内存所限)。Z向重构范围为 $50\ \mu\text{m}$,步距为 $1\ \mu\text{m}$,其三维重构强度分布如图4所示。图4(a)和(b)为未经去卷积运算[(8)式]的三维重构强度分布图,可以看到在微球四周有散斑以及离焦信号等噪声。图4(c)和(d)表示以点扩展函数为卷积核作去卷积运算[(9)式]之后的三维重构强度分布图,可知其消除了散斑和离焦信号等噪声,能够更加有效地提取微球的信息。图5(a)为单个微球强度分布的剖面图,图5(b)为其Z向强度分布曲线,通过曲线即可得到微球在Z方向的位置。为了更为精确地确定微球位置,对图5(b)中曲线顶点附近 $5\ \mu\text{m}$ 范围进行重构并进行多项式拟合^[20]可得到微球的精确位置如图5(b)内所示,微球在Z方向距离物镜焦平面 $23.3483\ \mu\text{m}$ 。同时从图4(b)中可以看到,此测试方法不仅能够同时对多个微球进行并行测试,并且可以对相互交叠的多个微球进行测试,这使得此种方法在实际测量中具有很高的稳健性。

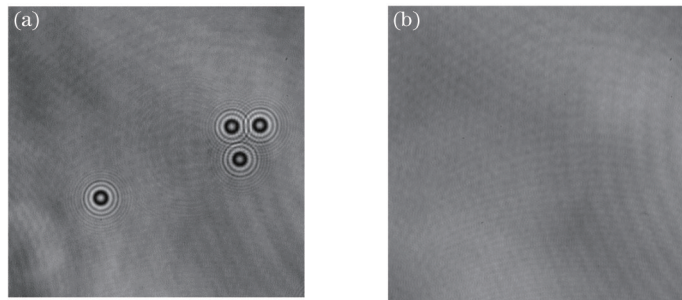


图3 (a) SiO_2 微球的全息图; (b)无样品时的背景图

Fig.3 (a) Hologram of particles of SiO_2 ; (b) background image

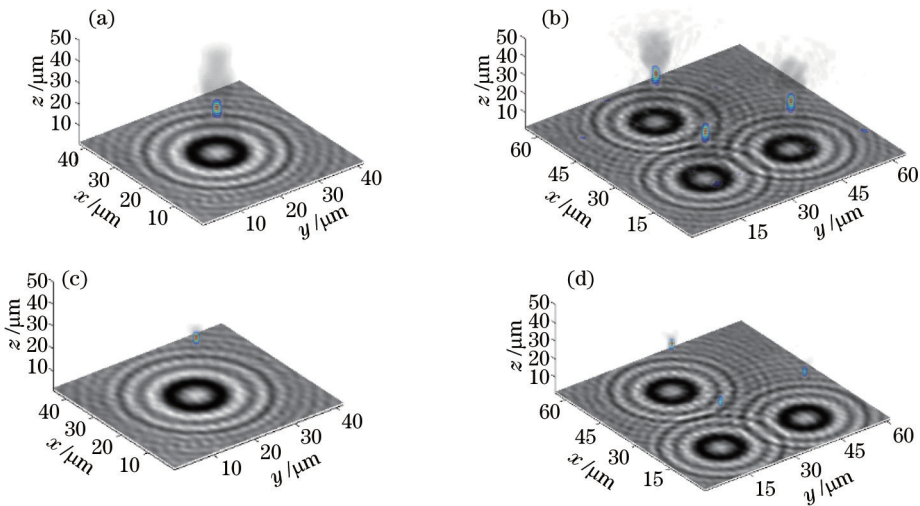


图4 (a)和(c)分别为去卷积之前和之后单个微球三维重构图;(b)和(d)分别为去卷积之前和之后三个微球三维重构图
Fig.4 (a) and (c) Volumetric reconstruction of the intensity due to a single particle SiO_2 with $4.5\ \mu\text{m}$ diameter before and after deconvolution respectively; (b) and (d) Volumetric reconstruction of three particles before and after deconvolution respectively

为了检测该数字全息重构方法的测量分辨力,实验中将样品固定在纳米位移台上,并控制位移台使其进行纳米台阶和阶跃运动,同时利用该算法进行测量。图6为测量结果,图6(a)为步长为 $5\ \text{nm}$ 的台阶运动,图6(b)为 $10\ \text{nm}$ 和 $5\ \text{nm}$ 的阶跃运动。从图6中可以看到 $5\ \text{nm}$ 的台阶及阶跃都能够清楚地分辨出来,其标准差为 $1.79\ \text{nm}$ 。此外,由于实验系统外部条件的改变,如光学平台的振动,环境温度的变化等都会引起物镜、样品以及CCD相对位置的改变,从而导致测量的不准确性,这是测量系统的主要误差来源。如图7所示为对同一位置同一微球Z向位置连续测试的结果,其中由于噪声因素引起的线性漂移已被减去。由图中可看出,定位结果分布在 $\pm 4\ \text{nm}$

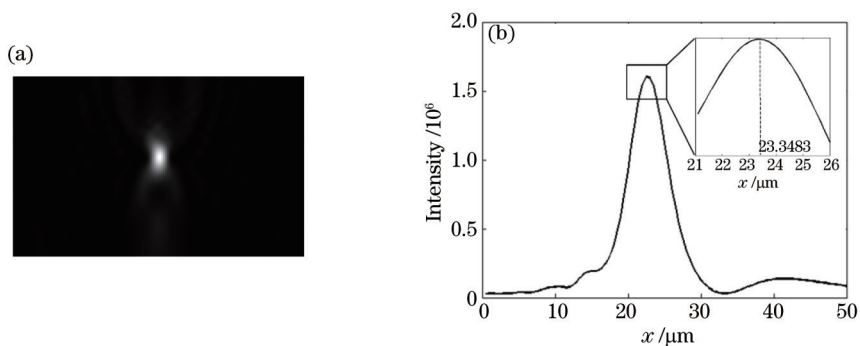


图5 (a)图4(c)中单个微球三维重构图微球中心强度剖面图; (b) Z向的强度分布曲线

Fig.5 (a) Holographic reconstruction of an X-Z slice through the center of the particle in Fig.4(c); (b) amplitude profiles along Z-direction 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 1.26 nm,因此,该实验系统下数字全息重构方法对微球 Z 向位置的测量分辨力可达 1.26 nm。

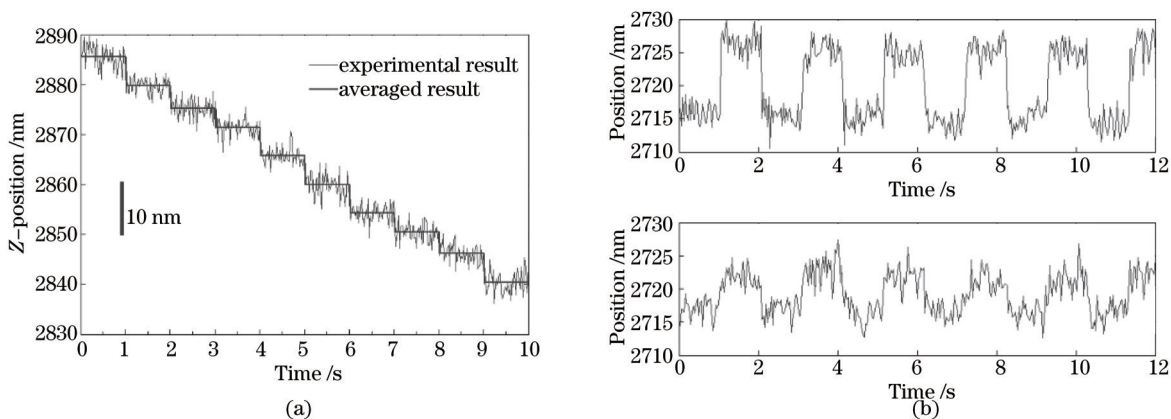


图6 微球随位移台运动。(a)步长为 5nm 的台阶运动; (b)分别为 10 nm 和 5 nm 的阶跃运动

Fig.6 Motion controlled by piezoelectric stage. (a) 5 nm stage motion; (b) nano-stepping of 10 nm and 5 nm

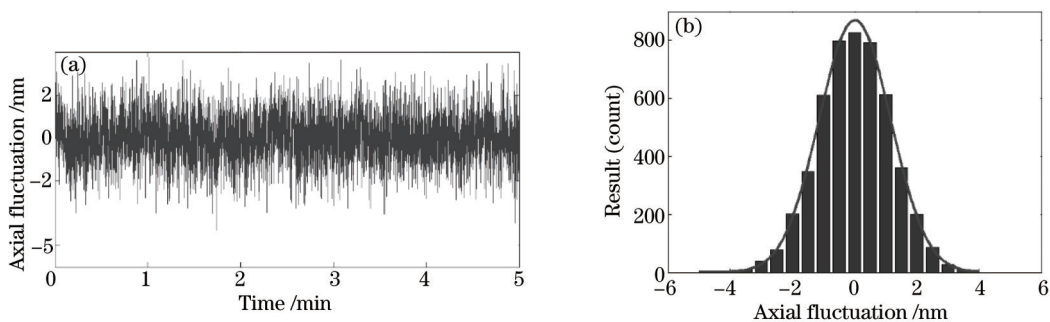


图7 静态噪声。(a)轴向位置波动; (b)统计分布

Fig.7 Static noise. (a) Axial position fluctuation; (b) statistical distribution

5 结 论

数字全息技术在微球三维位置测量中具有很强的稳健性及准确性,不仅能够同时对多个微球进行并行测量,也能够对相互交叠的微球进行位置测量。采用瑞利-索末菲传播函数进行数字全息重构,并引入去卷积运算,消除了散斑、离焦信号等影响,提高了微球三维重构强度分布信噪比,更加精确地提取微球的特征信息。结果表明,该方法对微球 Z 向位置测量分辨力达到 2 nm, 这为生物单分子力谱并行测试提供了新的方法。

- 1 J C Crocker, D G Grier. Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid [J]. *Phys Rev Lett*, 1994, 73(2): 352-355.
- 2 Keir C Neuman, Attila Nagy. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 491-505.
- 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 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.
- 5 Zhang Zhipeng, Menq ChiaHsiang. Three-dimensional particle tracking with subnanometer resolution using off-focus image [J]. *Appl Opt*, 2008, 47(13): 2361-2370.
- 6 Jian Sheng, Edwin Malkiel, Joseph Katz. Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions [J]. *Appl Opt*, 2006, 45(16): 3893-3901.
- 7 Han Changcai, Cao Na, Lei Lan, *et al.*. Study on a method for segmentation of atomization field holography in a combustion chamber [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2014, 51(8): 080901.
韩长材, 曹娜, 雷岚, 等. 燃烧室雾化场全息图像分割方法研究[J]. *激光与光电子学进展*, 2014, 51(8): 080901.
- 8 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微球尺寸测量[J]. *中国激光*, 2009, 36(4): 940-944.
- 9 V R Singh, E Darakis, G Hegde, *et al.*. A new methodology for pixel size retention in lensless digital holographic microscopy applied to micro-particle analysis [J]. *J Opt*, 2011, 13(3): 035704.
- 10 J W Goodman. Introduction for Fourier Optics [M]. New York: Roberts & Company Publishers, 2005.
- 11 Xiong Bingheng, Li Junchang. Holography Interference Measure Principles & Method [M]. Beijing: Science Press, 2009. 206-257.
熊秉衡, 李俊昌. 全息干涉计量原理和方法[M]. 北京: 科学出版社, 2009. 206-257.
- 12 L Dixon, F C Cheong, D G Grier. Holographic deconvolution microscopy for high-resolution particle tracking [J]. *Opt Express*, 2011, 19(17): 16410-16417.
- 13 F C Cheong, K Xiao, D G Grier. Strategies for three-dimensional particle tracking with holographic video microscopy [J]. *Opt Express*, 2010, 18(13):13563-13573.
- 14 Wu Yingchun, Wu Xuecheng, Wang Zhihua, *et al.*. Reconstruction of digital inline hologram with compressed sensing [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(11): 1109001.
吴迎春, 吴学成, 王智化, 等. 压缩感知重建数字同轴全息[J]. *光学学报*, 2011, 31(11): 1109001.
- 15 D K Singh, P K Panigrahi. Automatic threshold technique for holographic particle field characterization [J]. *Appl Opt*, 2012, 51(17): 3874-3887.
- 16 Lu Huimin, Xu Ming, Li Xun. Image deblurring with adaptive signal-noise ratio estimation for computational imaging system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(8): 0810002.
卢惠民, 徐明, 李迅. 用于计算成像系统的基于信噪比自适应估计的图像去模糊研究[J]. *光学学报*, 2014, 34(8): 0810002.
- 17 Wes Wallace, Lutz H Schaefer, Jason R Swedlow. A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy [J]. *Biotech*, 2001, 31(5): 1076-1097.
- 18 Y Cotte, M F Toy, N Pavillon, *et al.*. Microscopy image resolution improvement by deconvolution of complex fields [J]. *Opt Express*, 2010, 18(19): 19462-19478.
- 19 T Latychevskaia, F Gehri, H W Fink. Depth-resolved holographic reconstructions by three-dimensional deconvolution [J]. *Opt Express*, 2010, 18(21): 22527-22544.
- 20 F Verpillat, F Joud, P Desbiolles, *et al.*. Dark-field digital holographic microscopy for 3D-tracking of gold nanoparticles [J]. *Opt Express*, 2011, 19(27): 26044-26055.

栏目编辑: 何卓铭