

# 微球三维位置快速精密测量的新方法

姚成文<sup>1</sup>, 雷海<sup>1</sup>, 常新宇<sup>1</sup>, 胡春光<sup>1</sup>, 胡晓东<sup>1</sup>, 李宏斌<sup>1,2</sup>, 胡小唐<sup>1</sup>

<sup>1</sup>天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072;

<sup>2</sup>英属哥伦比亚大学化学系加拿大, 温哥华 V6T 1Z1

**摘要** 为了实现对液态环境中微球三维位置的快速精密测量,尤其是轴向的测量分辨率和速度,基于离焦成像测量理论,结合改进象限插值法和矢径投影算法,提出了一种新的方法,实现了对微球三维方向 1 nm 测量分辨率的跟踪测量。该方法测量效率高,对单个粒子轴向位置的测量速率最快达到每秒上百帧甚至更高。进一步讨论了横向位置测量误差对轴向测量分辨率的影响,分析了轴向方向大范围的跟踪测量分辨率。通过和相同实验条件下的互相关方法对比,说明该方法在实际测量中具有可行性,在实现相同轴向测量分辨率的情况下测量效率更高。

**关键词** 测量; 微球三维位置; 象限差值; 矢径投影; 单分子动力学

中图分类号 TB96 文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201737.0112002

## New Method of Three-Dimensional Position Fast and Precision Measurement of Microspheres

Yao Chengwen<sup>1</sup>, Lei Hai<sup>1</sup>, Chang Xinyu<sup>1</sup>, Hu Chunguang<sup>1</sup>, Hu Xiaodong<sup>1</sup>,  
Li Hongbin<sup>1,2</sup>, Hu Xiaotang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Precision Instrument & Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

<sup>2</sup>Department of Chemistry, University of British Columbia, Vancouver, V6T 1Z1, Canada

**Abstract** To achieve fast and accurate three-dimensional measurements of microspheres in liquid, especially axial tracking resolution and speed, this paper proposes a new measurement method based on off-focus measuring theory and combining quadrant interpolation algorithm and radial projection algorithm. Resolution of 1 nm measurement in 3D directions of microspheres is realized. The method has high measurement efficiency with the fastest measuring rate at individual particle axial position of hundred frames per second and more. The influences of horizontal deviations on axial measurements are further discussed, and axial resolution throughout dozens of micrometers is analyzed. Compared with the cross-correlation method under the same experimental conditions, this measurement method shows feasibility in practical measurement applications and enjoys higher measurement efficiency when achieving the same axial measurement resolution.

**Key words** measurement; three-dimensional position of microspheres; quadrant interpolation; radial projection; single molecule dynamics

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

## 1 引 言

微球三维位置测量<sup>[1]</sup>是一种重要的单粒子跟踪技术<sup>[2-6]</sup>(SPT),尤其是生物单分子动力学领域中的一种重要测量手段。将直径为微米量级的微球与蛋白质或脱氧核糖核酸(DNA)分子连接作为生物单分子的测量载体,通过跟踪测量微球的三维位置来实现对生物单分子动力学的力谱分析。该领域不仅要求在测量精

收稿日期: 2016-07-07; 收到修改稿日期: 2016-08-25

基金项目: 国家自然科学基金(51375340,61223008)、天津市自然科学基金(15JJCZDJC31600)

作者简介: 姚成文(1991—),男,硕士研究生,主要从事光学测量和生物单分子力谱方面的研究。

E-mail: kevin Yao@tju.edu.cn

导师简介: 胡晓东(1974—),男,博士,教授,主要从事微纳测试与加工技术等方面的研究。

E-mail: xdhu@tju.edu.cn(通信联系人)

度上实现对微球三维位置纳米级甚至亚纳米级分辨力的跟踪测量,而且为使测量结果具有统计效应,单次实验需要对大量微球进行并行甚至实时测量,因此针对微球三维位置的跟踪测量速度也提出了很高的要求。

目前国内外研究人员已提出了大量的测量方法以提高微球三维位置的测量精度和速度。在光镊技术中,基于四象限光子探测器的背焦平面法<sup>[7]</sup>能够实现微球三维位置的亚纳米分辨测量,测量速度能够达到千赫兹,但是单次实验只能测量一个粒子,难以实现对大量粒子的并行测量。其他大多数微球三维位置测量的方法是基于显微成像的图像测量,一般包含横向测量和轴向测量两方面。横向测量方面主要有质心法<sup>[8]</sup>、霍夫变换(HT)法<sup>[9-10]</sup>、象限插值(QI)<sup>[11-12]</sup>等。轴向测量方面有两大类,一是基于理论算法匹配的测量方法,如同轴数字全息法<sup>[13-16]</sup>、点扩展函数(PSF)法<sup>[17]</sup>等,二是基于已知实验图像进行匹配的测量方法,如最外环半径法<sup>[18]</sup>、互相关(COR)法<sup>[19]</sup>、矢径投影(RP)法<sup>[8,20-21]</sup>等。有学者利用质心法与矢径投影法<sup>[8,20-21]</sup>相结合,实现了微球三维位置 1 nm 分辨力的测量,但是质心法需要微球图像的衍射特征位于图像中心或附近位置,对信噪比或对比度较低的图像难以取得较高精度。有研究者结合霍夫变换法与互相关法<sup>[9]</sup>对微球三维位置进行测量,该方法测量分辨力高,但运算复杂,计算速度较慢,难以实现高通量快速测量。象限插值法<sup>[14]</sup>通过将二维图像转化为一维曲线进行计算,减小了数据运算量,提高了测量速度,在横向测量上分辨力可以达到 1 nm,但轴向测量分辨力较低。基于理论算法匹配的测量方法中以同轴数字全息法应用最为广泛,根据不同的全息重构算法产生了一些分支,常用的有菲涅耳变换法、卷积法<sup>[16]</sup>、瑞利-索末菲反向传播法<sup>[14]</sup>、洛伦兹-米氏匹配法<sup>[14-15]</sup>等,轴向测量分辨力最高可达到 2 nm。该算法的主要不足之处在于重构算法较为复杂,计算速度较慢,不太适合高通量快速测量。而基于点扩展函数<sup>[17]</sup>进行轴向匹配测量的方法,只能实现轴向 5 nm 的分辨力,精度不高。

综上所述,大多数微球三维位置的测量方法都难以满足生物单分子动力学领域中对微球三维位置的测量要求,一些方法只能实现部分维度的高精度测量,另外一些方法在测量速度或方法的适用性上有所欠缺。因此虽然目前微球的三维位置测量方法众多,但是对于能够实现对大量粒子快速高分辨力测量的目标来说,依然有较大的发展空间。本文基于离焦成像测量理论,将象限插值和矢径投影法有机结合并改进,提出微球三维位置快速精密测量的新方法,实现了全部三维方向的 1 nm 测量分辨力,同时大大提高了单个微球的测量速度,为后续进行高通量生物大分子并行实时拉伸测量<sup>[11]</sup>的研究打下了基础。

## 2 原 理

基于离焦成像测量理论,利用微球在光轴上离焦位置成像的衍射光斑特征进行三维位置测量,包括横向和轴向测量两部分。横向测量以质心法粗略确定微球圆心位置,用象限插值法<sup>[12]</sup>校正质心法的圆心测量偏差,从而精确定位微球横向位置。轴向测量建立在横向测量的基础上,利用实验记录的微球离焦图像,采用矢径投影法进行轴向位置匹配,精确定位轴向位置。

### 2.1 横向测量

微球三维位置测量实验中,单次实验的照明与电荷耦合器件(CCD)成像会有不同,使得微球图像产生明暗差异。因此在计算圆心之前,需要对图片进行归一化处理。之后使用质心法粗略确定微球圆心为原点,以角度  $\Delta\theta$  和长度  $\Delta r$  为间距建立圆栅格。栅格顶点强度值  $I_{\theta,r}$  由相邻像素的值双线性插值得到,如图 1(a)所示。

然后将各象限半径相同点的强度值相加,得到各象限强度值矢量( $Q_1, Q_2, Q_3, Q_4$ ),如图 1(b)所示。将  $Q_1$  与  $Q_4, Q_2$  与  $Q_3$  相加,分别得到 Y 轴左侧和右侧强度值矢量,将其两侧强度值矢量连接得到  $I_x(r)$ ,即  $I_x(r) = (Q_2 + Q_3) \parallel (Q_1 + Q_4)$ ,做镜像运算后得到  $I_x(-r)$ ,如图 1(c)所示。

然后将  $I_x(r)$  与  $I_x(-r)$  进行互相关运算,得到“相关系数-半径”离散值曲线  $X_x(r')$ ,如图 1(d)所示。根据互相关运算可知,该曲线中心点的位置是  $I_x(r)$  与  $I_x(-r)$  各自中心相互重合的位置。而其峰值位置与曲线中心点距离的偏差就是两倍于圆心的偏移误差  $\delta_r$ 。但实际上上述偏差是强度曲线  $I_x$  中圆心移动的距离,这与实际的圆心移动的距离并不相等,因为圆心的移动将导致曲线重新分布。为了对二者进行校正,需对半边微球的栅格点不同角度进行积分,得到误差的变换公式  $\delta_x = \delta_r / (\pi/2)$ ,即  $\delta_r$  经过变换可得圆心真正的补偿误差。同样地,求出圆心的 Y 方向的补偿误差  $\delta_y$ ,将  $\delta_x$  与  $\delta_y$  补偿到初始圆心坐标,得到修正后的 X, Y 坐标。重复迭代上述步骤,可以得到精确的圆心位置。

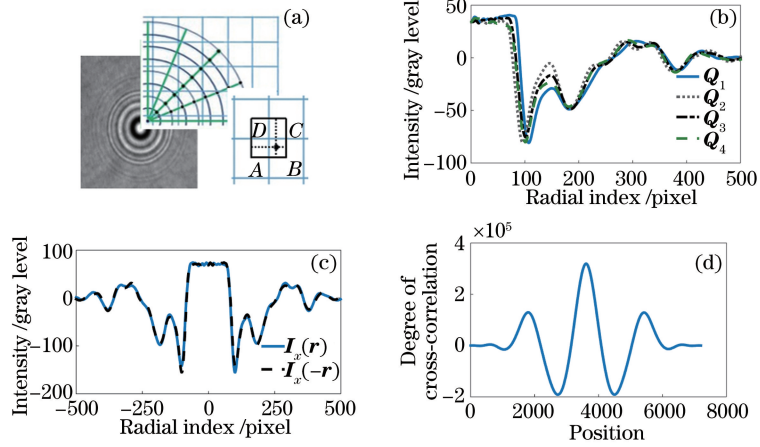


图 1 横向测量原理图。(a) 图像栅格化插值过程示意图；(b) 图像四象限强度分布曲线；(c) 左右联接后强度曲线及其镜像曲线；(d) 互相关运算求 X 最终坐标

Fig. 1 Schematic diagram of lateral measurement. (a) Schematic diagram of interpolation process in rasterized image; (b) intensity profiles of four quadrants; (c) intensity curve and its mirror curve of left quadrants concatenated with right ones; (d) cross-correlation to calculate final X-position

值得注意的是,图 1(a)在对微球图像插值的过程中,圆心附近栅格顶点分布密集,这些点多是由圆心附近几个像素点决定。这些像素点在插值曲线中占有较大比重,对结果的影响较大。同时当出现异常像素点时,容易对结果产生较大误差。为减小圆心附近像素点的影响力,采用形如下式的权重调整函数作用于各象限强度曲线,从而调节圆心附近点对整个结果的影响权重:

$$f(r) = Ar^2 \times (B - r)^2, \quad r \in [0, R], \quad (1)$$

式中  $R$  为插值半径,  $A$  和  $B$  的选取与插值栅格半径的大小以及权重的调整有关,通常会降低圆心附近及外环像素点的权重,需要结合具体实验数据确定。

## 2.2 纵向测量

轴向测量以横向测量中得到的圆心为基础,基于矢径投影<sup>[8,20-21]</sup>的方式将二维图像转化为一维矢量曲线,如图 2 所示。图像中所有像素点均按照下式投影,得到一维半径矢量  $\mathbf{M} = [m_1, \dots, m_i, \dots, m_N]^T$ 。

$$m_i = \frac{1}{\sum_{k=1}^{M_i} c_k} \sum_{k=1}^{M_i} c_k I_k, \quad (i = 0, 1, \dots, N),$$

$$c_k = \begin{cases} \frac{d - r_{i-1}}{\Delta}, & r_{i-1} \leq d < r_i \\ \frac{r_{i+1} - d}{\Delta}, & r_i \leq d < r_{i+1} \end{cases}, \quad (2)$$

式中  $M_i$  是半径  $r_{i-1}$  到  $r_{i+1}$  的环带间的像素总数,  $c$  是像素根据它到圆心的权重,  $I_k$  是像素的灰度值,  $m_i$  是

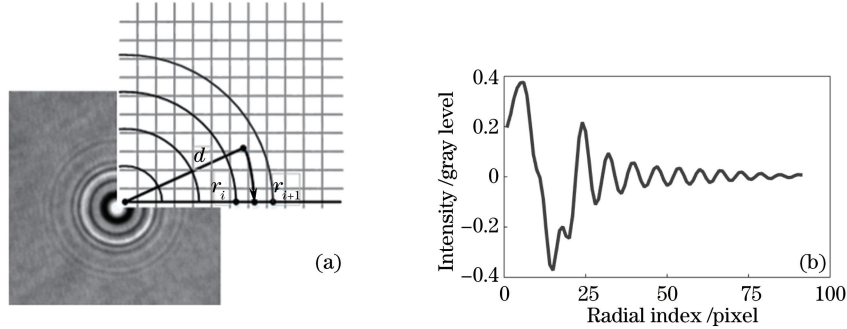


图 2 轴向测量原理图。(a) 矢径投影过程示意图；(b) 矢径投影曲线

Fig. 2 Schematic diagram of axial measurement. (a) Process of radial projection; (b) intensity profiles of radial projection

半径矢量中  $i$  点的值,  $i=0, 1, 2, \dots, N, r_i=i\Delta$ 。

根据衍射规律可知,同一个粒子在轴上不同位置经过光学系统得到的衍射图案不同,由此不同位置的图像投影得到的半径矢量  $\mathbf{M}$  也不相同。首先按照一定轴向间距,建立关于不同位置微球图像的标准化矢量矩阵  $\mathbf{S}$ ,对于每一个位置的图像,矩阵中都有唯一与之相对应的标准位置矢量  $\mathbf{S}(z)$ 。将被测图像投影矢量  $\mathbf{M}_{\text{obj}}=[m_1, \dots, m_i, \dots, m_N]^T$  与每个标准位置矢量  $\mathbf{S}(z)=[S_1(z), \dots, S_i(z), \dots, S_N(z)]$  进行匹配,最佳匹配的位置就是被测图像中小球的轴向位置,匹配原理图如图 3 所示。

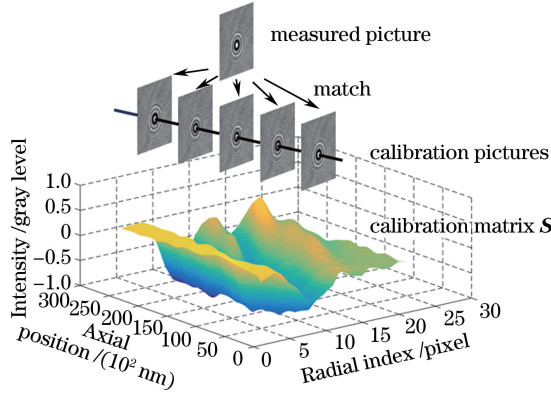


图 3 矢径投影法匹配原理图

Fig. 3 Schematic diagram of matching radial projection algorithm

将实验中被测图像对应矢量  $\mathbf{M}_{\text{obj}}$  与标准矢量  $\mathbf{S}(z)$  定义一个函数  $J_z$ , 如下式所示。在不考虑图像噪声的情况下,对  $J_z$  进行求导,当导数为 0 时,  $J_z$  取最小值,则此时的轴向位置  $Z_{\text{best}}$  最接近被测图像微球位置。

$$J_z = f[\mathbf{S}(z), \mathbf{M}_{\text{obj}}] = \sum_{i=0}^N [S_i(z) - m_i]^2, \quad (3)$$

式中  $z$  为  $\mathbf{S}$  中等间距分布的轴向位置。实际运算中,为了提高速度,以数值计算近似值代替最小真值。首先计算出标准矢量库  $\mathbf{S}$  中每个位置的矢量  $\mathbf{S}(z)$  与被测图像的投影矢量  $\mathbf{M}_{\text{obj}}$  的函数值  $J_z$ , 找到最小值  $J_{\text{min}}$ , 其对应的轴上位置  $Z_{\text{best}}$  就是最佳匹配的位置。不过由于  $\mathbf{S}$  是按照一定轴向间距建立的离散位置矢量库。这样直接求出的微球位置分辨率太低,为提高测量分辨率,在  $Z_{\text{best}}$  附近位置选取一定数量  $J_z$  函数的点,对其进行三次样条插值拟合,然后求出拟合曲线中的最高点对应的位置  $Z_{\text{final}}$ , 该位置  $Z_{\text{final}}$  即为被测图像微球的最终  $Z$  轴位置。

### 3 实验装置

实验系统光路如图 4(a) 所示。激光经过衰减器衰减,经反光镜反射改变传播方向以减小光路空间长

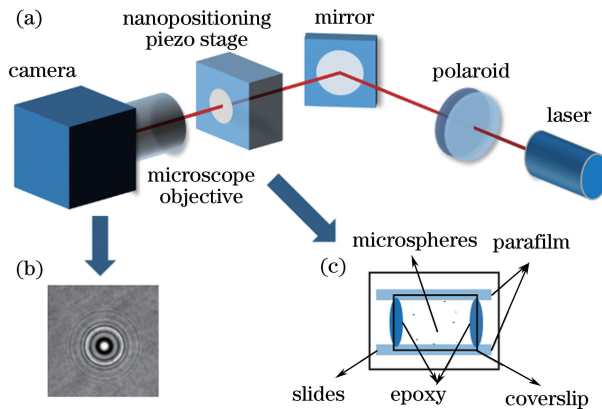


图 4 实验装置。(a) 实验光路图; (b) 实验采集图片; (c) 实验样品示意图

Fig. 4 Experimental setup. (a) Experimental light-path diagram; (b) experimental collection images; (c) experimental sample diagram

度,入射到盛有微球样品的样品池,一部分光入射到微球上产生散射光,与直接穿过玻片的透射光在显微物镜的焦平面附近发生干涉,干涉图像经物镜放大后在 CCD 上成像,成像结果如图 4(b)所示。实验中的样品结构如图 4(c)所示,微球由 IKAC-MAG HS7 加热磁力搅拌器通过加热熔融的方式固定在玻片上。系统中使用的激光光源为 Edmund 公司的型号为 39-569 的激光二极管,波长为 670 nm,功率 3 mW。显微物镜为 Nikon(CFIL Plan EISLWD),其放大倍数为 100 倍,数值孔径(NA)为 0.70。图像传感器 CCD 为 Point Grey 公司的 GS2-GE-50S5M-C,其有效像素个数为 2448 pixel $\times$ 2048 pixel,像元尺寸为 3.45  $\mu\text{m}\times$ 3.45  $\mu\text{m}$ 。用于驱动样品移动的纳米三维位移台为 N-Point 公司的 NPXY100Z25-102 & Controller C300,其 X、Y、Z 三个方向的行程分别为 100,100,25  $\mu\text{m}$ ,定位噪声分别为 0.3、0.3、0.1 nm。实验中使用的样品小球是 Polysciences,Inc 公司的粒径为 5  $\mu\text{m}$  的硅球。

## 4 实验结果与分析

### 4.1 X,Y,Z 向测量分辨力

为了测试本算法在微球 X,Y,Z 三轴方向上的测量分辨力,以微球的 X,Y,Z 三轴周期阶跃运动跟踪测量实验结果来验证。用 N-Point 三维纳米位移台驱动样品分别在 X,Y,Z 三个方向做周期阶跃运动,利用 CCD 相机进行跟踪采图,并用介绍的方法对微球的三维位置进行计算,结果如图 5 所示。从图中可以看出,三轴方向的 1 nm 周期阶跃运动都可以清晰地分辨出来,X,Y,Z 三个方向的测量标准差分别达到 0.55,0.54,0.64 nm。证明该方法实现了微球三维位置的 1 nm 测量分辨力。

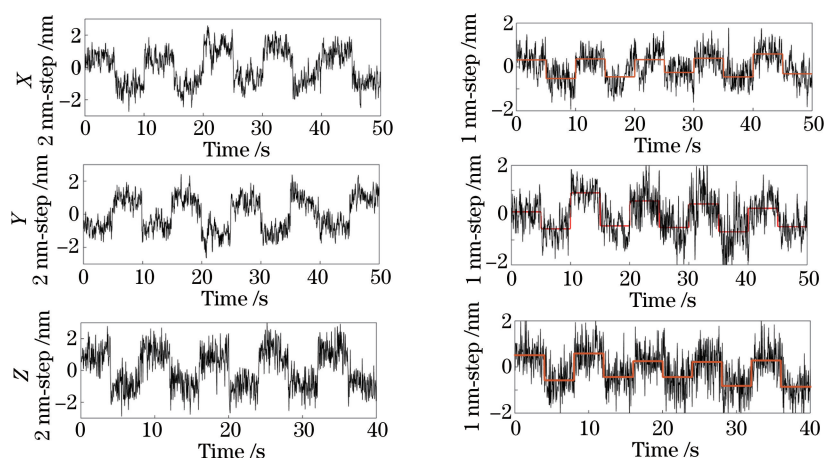


图 5 X,Y,Z 向纳米阶跃实验结果(图中红线表示台阶平均值)

Fig. 5 Experimental results of nano step in X, Y, Z axes (red line refers to average value)

### 4.2 轴向误差分析

理论上微球的三维位置的测量分辨力能达到更高水平,实际过程中测量结果会受到环境影响,影响因素有环境中的噪声、光学平台的振动、温度的变化等。这些因素都会引起物镜、样品以及 CCD 相对位置的改变,从而导致测量的不准确性,产生测量误差。实验中主要存在两种测量误差:线性系统误差及随机误差。线性系统误差的产生与实验装置的固定有关,该实验中纳米位移台等装置都是通过螺丝固定到光学平台上,固定之后产生应力释放,导致实验装置朝着一个固定的方向产生偏移,这种偏移随着应力的释放会越来越小,因此将实验装置固定后静置一段时间再开展实验可有效减小线性系统误差。但即使静置一段时间后,也没办法完全消除,实验数据中仍然会残留一些系统误差,这些误差整体上呈线性分布。通过对跟踪测量的结果进行线性拟合,提取其中的线性误差后去除。除此之外,系统中存在一定的随机误差,主要受系统白噪声影响。在实际应用中,微球的轴向位置的分辨力更加重要,所以主要分析轴向随机误差。图 6 为微球轴向位置静态连续测量结果,其中线性漂移已被减去。从图 6 中可看出,微球轴向位置定位结果分布在  $\pm 2$  nm 范围内,通过对这一波动数据进行分析,发现其分布符合正态分布,正态分布的标准差约为 0.81 nm。

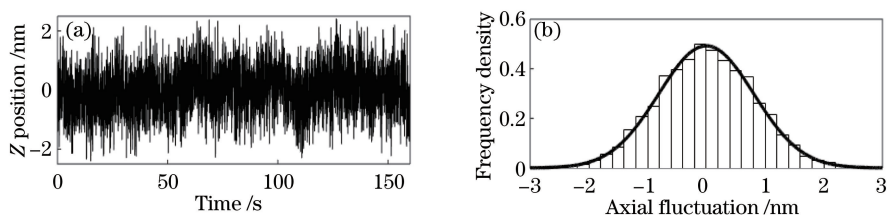


图 6 轴向静态噪声。(a) 轴向位置波动；(b) 统计分布

Fig. 6 Axial static noise. (a) Axial position fluctuation; (b) statistical distribution

### 4.3 横向测量偏差对轴向分辨力的影响

微球的轴向位置测量是建立在横向位置测量的基础上,因此横向测量产生的误差可能会对轴向测量分辨力产生较大影响。为评估该影响,通过实验来定量分析。本系统中的 CCD 像元尺寸为  $3.45 \mu\text{m} \times 3.45 \mu\text{m}$ ,测量系统横向放大率为 40 左右。横向测量的误差一般不超过一个像素,在图像中即不超过 100 nm。图 7 分析了 X,Y 两个方向上横向位置误差在 100 nm 范围内时,Z 轴位置测量标准差的变化。图中当横向位置偏差为 0 时,Z 轴位置测量标准差为 0.93 nm,当横向偏差达到 100 nm 时,Z 轴位置测量标准差也只有 1.0 nm。微球的轴向位置测量标准差变化非常小,因此该微球横向测量偏差对轴向测量分辨力的影响有限,基本可以忽略。

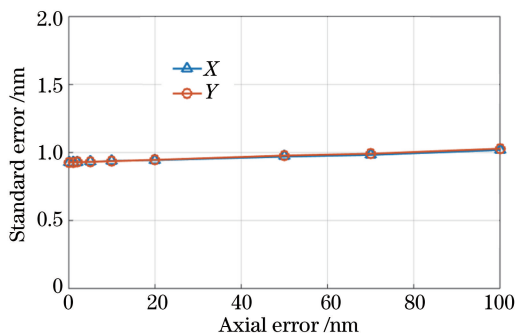


图 7 横向偏差对轴向精度影响

Fig. 7 Influence of lateral deviation on axial precision

### 4.4 轴向位置对测量分辨力的影响

图 8 为微球在不同离焦位置时的衍射图像,可以看出不同轴向位置的微球衍射光斑差异很大。而很多

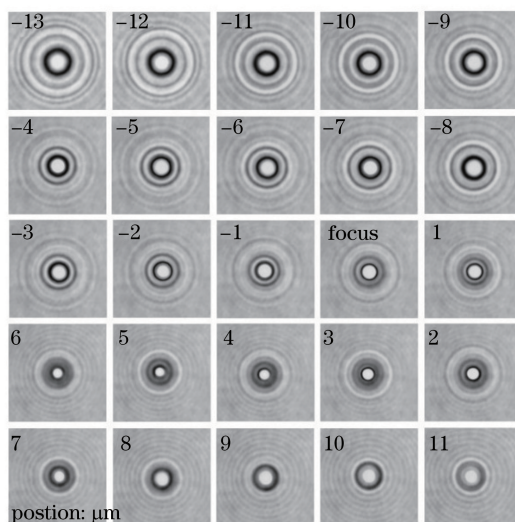


图 8 轴上不同位置微球成像图

Fig. 8 Images of microspheres at different axial positions

离焦成像的匹配算法对轴向位置跟踪测量时,高分辨力的测量范围只有几微米甚至更小,对算法的实用性产生了很大的限制。通过轴上大范围连续跟踪匹配实验,定量地讨论所提测量方法在轴向大范围的测量分辨力。以  $1\ \mu\text{m}$  为间距,选取了轴上焦点附近几十微米范围内不同轴向位置,使用三维纳米位移台驱动样品微球做周期性阶跃运动,通过计算  $2\ \text{nm}$  的周期阶跃信号的测量标准差来分析轴向位置对算法测量分辨力的影响,结果如图 9 所示。图中记录了 6 次不同实验的结果,可以看出该算法在较大范围内都能实现轴向位置的高分辨力测量,测量标准差小于  $1\ \text{nm}$ 。从图 9(a)可看出微球在焦点一侧测量分辨力高,另一侧分辨力下降明显。将图 9(a)焦点附近的曲线放大得到图 9(c)中的结果,也可以发现测量标准差整体呈上升的趋势。对于测量分辨力较高一侧,结果如图 9(b)所示,结果表明该侧距离焦点  $20\ \mu\text{m}$  范围内,微球位置测量标准差都在  $1\ \text{nm}$  范围内,即能够实现高分辨力的跟踪测量。

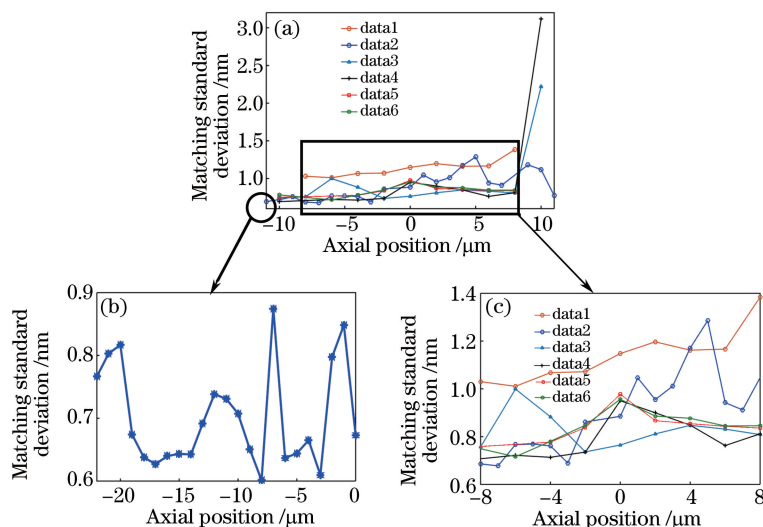


图 9 轴上不同位置矢径投影法测量精度图

Fig. 9 Matching precision at different axial positions using radial projection algorithm

#### 4.5 与互相关算法对比测量

为了检验本算法的轴向测量分辨力与速度,对相同实验系统环境中采集的微球图像,用互相关算法来计算微球轴向位置,并将其与本轴向测量的矢径投影法进行对比。通过对 4000 张图片中微球位置跟踪计算,两种不同算法计算速度与测量分辨力结果如图 10 所示,其中图 10(a)为计算速度对比图,图 10(b)为测量分辨力对比图,图中横坐标都为计算所用匹配方形区域边长,范围为  $60\sim 180\ \text{pixel}$ ,图 10(a)纵坐标为计算所用时间以 10 为底的对数,图 10(b)纵坐标为测量标准差。

从图 10 可以看出,矢径投影法与互相关法对微球的轴向位置测量都能达到  $1\ \text{nm}$  的分辨力,甚至在匹配面积较小的时候更有优势。同时本算法的计算速度远远超过互相关法,二者速度相差数十倍(计算用电脑 CPU:i5,主频为  $3.5\ \text{GHz}$ )。当匹配区域边长为  $60\ \text{pixel}$  时用  $33\ \text{s}$ ,使用矢径投影法计算 4000 张图片微球轴向位置时间为  $33\ \text{s}$ ,即可达  $100\ \text{frame/s}$  以上。如果结合图形处理器(GPU)加速,并优化算法进行并行计算,应该能够达到更高的计算速度。这为后续实现高通量粒子并行甚至实时计算打下了良好的基础。

同时为验证该方法对运动小球追踪的有效性,针对在重力、浮力和粘滞阻力共同作用下做下落运动的小球,使用本算法对其三维位置进行跟踪测量,并将跟踪测量的结果与使用霍夫变换与互相关算法跟踪测量的结果进行对比,结果如图 11 所示。其中图 11(a)为微球三维位置的跟踪结果对比图,图 11(b)为轴向位置跟踪结果对比图。为了更加直观地看到两种算法的对比,对跟踪结果增加了一定的偏置量。从图中可以看出,两种方法的计算结果能较好地吻合,从而证明该算法对运动物体的追踪是行之有效的。

## 5 结 论

基于离焦成像测量理论,结合并改进了象限插值与矢径投影法,提出微球三维位置快速精密测量的新方法。大量实验证明了该方法切实可行,实现了全部三维方向  $1\ \text{nm}$  的高分辨力测量。分析讨论了该方法横

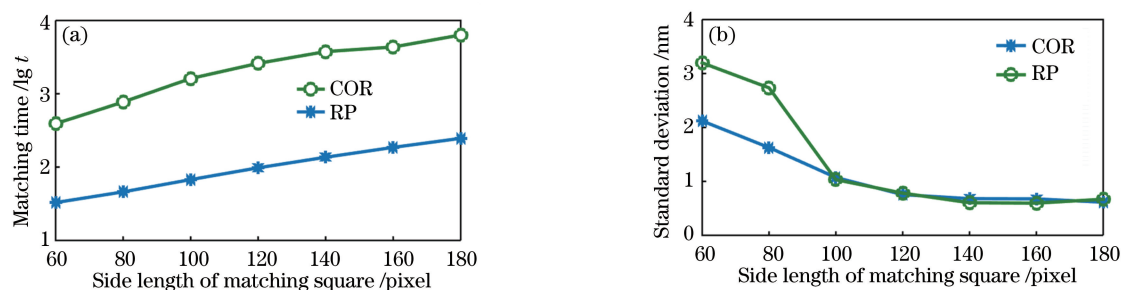


图 10 矢径投影法与互相关算法的 (a) 计算速度与 (b) 测量分辨率对比图

Fig. 10 Comparison of (a) calculation speed and (b) measurement resolution using radial projection algorithm and cross-correlation algorithm

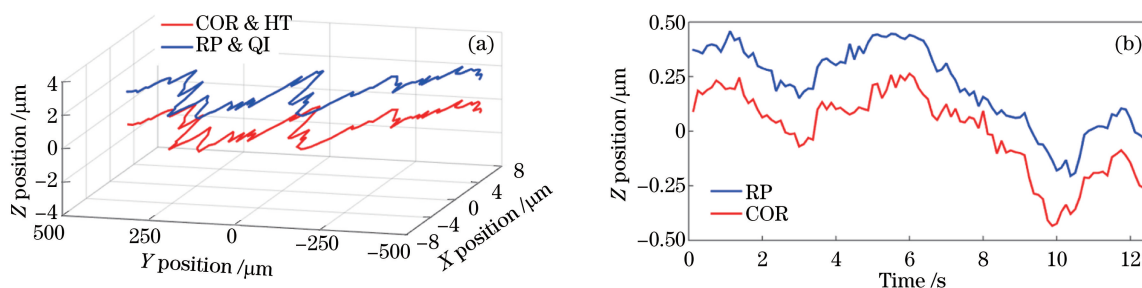


图 11 微球动态测量。(a) 三维位置测量结果；(b) Z 轴向定位结果对比

Fig. 11 Dynamic measurement of microsphere. (a) Three-dimensional measurement results; (b) comparison of Z axial position

向测量误差对轴向测量分辨率的影响,结果表明横向测量误差对轴向测量的影响较小,基本可以忽略。研究了微球轴向方向大范围内的测量精度,可实现超过  $30 \mu\text{m}$  大范围  $1 \text{ nm}$  的测量分辨率,同时得到了轴向测量高分辨率最佳匹配区域,对后续实验具有指导作用。通过与相同实验条件下互相关算法进行对比,证明了该方法具有较高的分辨率,在测量区域偏小的情况下要明显优于互相关算法。此外,该方法提高了数据处理速度,实现了单个粒子轴向位置每秒百帧以上的测量速率。为实现高通量粒子三维位置并行实时测量提供了可能。且该测量方法实验设备简单,可应用的范围很广,在分子动力学领域以及其他生物物理和生命科学等领域的一些相关测量活动中都能发挥重要作用。

## 参 考 文 献

- [1] Wu M M, Roberts J W, Buckley M. Three-dimensional fluorescent particle tracking at micron-scale using a single camera[J]. *Exp Fluids*, 2005, 38(4): 461-465.
- [2] Cheezum M K, Walker W F, Guilford W H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles[J]. *Biophys J*, 2001, 81(4): 2378-2388.
- [3] Thar R, Blackburn N, Kühl M. A new system for three-dimensional tracking of motile microorganisms[J]. *Appl Environ Microb*, 2000, 66(5): 2238-2242.
- [4] Qian H, Sheetz M P, Elson E L. Single particle tracking: analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems[J]. *Biophys J*, 1991, 60(4): 910-921.
- [5] Saxton M J. Single-particle tracking: connecting the dots[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(8): 671-672.
- [6] Luo R, Yang X Y, Peng X F, *et al.* Three-dimensional tracking of fluorescent particles applied to micro-fluidic measurements[J]. *J Micromech Microeng*, 2006, 16(8): 1689-1699.
- [7] Le Gall A, Perronet K, Dulin D, *et al.* Simultaneous calibration of optical tweezers spring constant and position detector response[J]. *Opt Express*, 2010, 18(25): 26469-26474.
- [8] Zhang Z P, Menq C H. Three-dimensional particle tracking with subnanometer resolution using off-focus images[J]. *Appl Optics*, 2008, 47(13): 2361-2370.
- [9] Xie Xiangjun, Lei Hai, Chang Xinyu, *et al.* Three-dimensional microsphere tracking using off-focus images based on



- cross-correlation matching algorithm[J]. *Acta Optica Sinica*, 2015, 35(2): 0212002.
- 谢湘军, 雷海, 常新宇, 等. 离焦图像的互相关匹配法测量微球三维位置研究[J]. *光学学报*, 2015, 35(2): 0212002.
- [10] Chiu S H, Liaw J J, Lin K H. . A fast randomized Hough transform for circle/circular arc recognition[J]. *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*, 2010, 24(3): 457-474.
- [11] Cnossen J P, Dulin D, Dekker N H. An optimized software framework for real-time, high-throughput tracking of spherical beads[J]. *Rev Sci Instrum*, 2014, 85(10): 103712.
- [12] Van Loenhout M T J, Kerssemakers J W J, De Vlaminc I, *et al.* Non-bias-limited tracking of spherical particles, enabling nanometer resolution at low magnification[J]. *Biophys J*, 2012, 102(10): 2362-2371.
- [13] Lei Hai, Chang Xinyu, Xie Xiangjun, *et al.* Deconvolution in digital holographic reconstruction for high accuracy position of microsphere tracking technology[J]. *Acta Optica Sinica*, 2015, 35(4): 0409001.
- 雷海, 常新宇, 谢湘军, 等. 去卷积数字全息重构的微球位置精确测量[J]. *光学学报*, 2015, 35(4): 0409001.
- [14] Cheong F C, Krishnatreya B J, Grier D G. Strategies for three-dimensional particle tracking with holographic video microscopy[J]. *Opt Express*, 2010, 18(13): 13563-13574.
- [15] Lee S H, Roichman Y, Yi G R, *et al.* Characterizing and tracking single colloidal particles with video holographic microscopy[J]. *Opt Express*, 2007, 15(26): 18275-18282.
- [16] Lei H, Hu X, Zhu P, *et al.* Nano-level position resolution for particle tracking in digital in-line holographic microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2015, 260(1): 100-106.
- [17] Marki A, Ermilov E, Zakrzewicz A, *et al.* Tracking of fluorescence nanoparticles with nanometre resolution in a biological system: assessing local viscosity and microrheology[J]. *Biomech Model Mechan*, 2013, 13(2): 275-288.
- [18] Speidel M, Jonás A, Florin E L. Three-dimensional tracking of fluorescent nanoparticles with subnanometer precision by use of off-focus imaging[J]. *Opt Lett*, 2003, 28(2): 69-71.
- [19] Shen Yi. High-throughput single-molecule magnetic force spectroscopy: construction & biological application [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Applied Physics Laboratory, Chinese Academy of Sciences, 2012: 38-45.
- 沈轶. 平行大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.
- [20] Zhang Z P, Menq C H. 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.
- [21] Zhang Z P, Long F, Menq C H. Three-dimensional visual servo control of a magnetically propelled microscopic bead[J]. *IEEE Transactions on Robotics*, 2013, 29(2): 373-382.