

# 液态中交叠微球的三维纳米级位置测量方法

常新宇<sup>1</sup>, 曾雅楠<sup>2</sup>, 雷 海<sup>1</sup>, 姚成文<sup>1</sup>, 卢钧胜<sup>1</sup>, 胡晓东<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>天津农学院工程技术学院, 天津 300384

**摘要** 微球跟踪技术是生物学动态过程的重要研究工具之一。为获取相关生物学信息,需要对微纳米尺度的微球进行三维位置的测量。在实际测量中,由于液态环境中微球间及微球与其他物质间存在相互作用力,微球图像交叠的现象难以避免。交叠微球图像会导致圆环特征的交错,采用传统方法难以实现特征识别,进而无法对其定位。针对这一问题,提出了全息重构聚焦法(HRFM),通过精确定位微球的横向位置,获取其三维位置。实验结果表明 HRFM 定位微球位置较传统方法更为精确,且尤其适用于交叠微球位置的测量,对单个微球和交叠微球的测量均能达到 2 nm 的三维位移分辨率。

**关键词** 测量; 数字全息; 交叠微球; 微球三维位置; 重构

中图分类号 TB96 文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201737.0812002

## Three-Dimensional Position Measurement Method with Nanoscale Precision for Overlapped Particles in Liquid

Chang Xinyu<sup>1</sup>, Zeng Yanan<sup>2</sup>, Lei Hai<sup>1</sup>, Yao Chengwen<sup>1</sup>,

Lu Junsheng<sup>1</sup>, Hu Xiaodong<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*College of Engineering and Technology, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China*

**Abstract** Particle tracking technology is one of the most important research tools for dynamic process in biology. To obtain the relative biology information, three-dimensional position measurement of micro-nano scale particles is needed. During the actual measurement, due to the interaction force between particles and the interaction force between particles and other in the liquid environment, the overlap phenomenon of the particle patterns is unavoidable. Overlapped particle patterns lead to the feature cross of rings, and the feature is hard to be recognized by traditional methods. So we can not obtain the position of the particles. In order to solve this problem, holographic reconstruction focusing method (HRFM) is proposed, as it can measure three dimensional position of particles by accurately locating their horizontal position. According to the experimental results, HRFM for locating the position of particles is more accurate than traditional method, especially for the measurement of overlapped particle position. The three-dimensional displacement resolution of the proposed method for single particle measurement and overlapped particles measurement can both reach 2 nm.

**Key words** measurement; digital holography; overlapped particles; three-dimensional position of particles; reconstruction

**OCIS codes** 120.1880;090.1995; 100.4999; 100.3010; 350.5730

收稿日期: 2016-12-13; 收到修改稿日期: 2017-04-03

基金项目: 国家自然科学基金(51375340)、天津市自然科学基金(15JCZDJC31600)

作者简介: 常新宇(1992—),男,博士研究生,主要从事光学测量方面的研究。E-mail: eclipse@tju.edu.cn

导师简介: 胡晓东(1974—),男,博士,教授,主要从事微纳测试技术、精密测量等方面的研究。

E-mail: xdhu@tju.edu.cn (通信联系人)

## 1 引 言

随着光学显微镜技术,荧光蛋白和纳米晶体等光谱技术的发展,实时成像技术已经进展到细胞及分子水平<sup>[1]</sup>。通过这类技术追踪微米尺度微球获取信息的方法可应用于生物物理学,例如光镊测量和磁镊测量<sup>[2-3]</sup>。在细胞外微环境中,微球跟踪测量在生命科学中扮演了一个极其重要的角色<sup>[4]</sup>,可用于血液细胞元素间及血管内皮细胞间的相互作用等方面<sup>[1]</sup>。

近年来,微球位置的跟踪测量方法受到了国内外研究人员的广泛关注<sup>[5]</sup>。目前对于微球横向位置的跟踪测量,主要方法有 Hough 变换法(HTM)<sup>[6]</sup>、质心法<sup>[7]</sup>、互相关法<sup>[8]</sup>、梯度法<sup>[9]</sup>等。这些方法都是根据微球图像的特征来测量的,然而实际测量中由于微球间以及微球与溶液中其他物质的相互作用力,微球与其他物体的交叠现象难以避免<sup>[10]</sup>,导致直接使用传统方法不能识别圆的特征而无法测量其横向位置,不利于实际应用。

雷海等<sup>[11]</sup>对数字全息法重构强度图进行去卷积运算来消除散斑、离焦等信号的噪声。针对上述问题,本文基于这种方法提出全息重构聚焦法(HRFM),将其与 Hough 变换法相结合来实现对微球三维位置的测量,即对经同轴数字全息法重构后的聚焦微球强度图像采用 Hough 变换法测量微球的横向位置,再对横向位置所对应的强度曲线拟合得到其轴向位置。为验证本方法的可行性,首先对单个微球进行了测量,并与传统方法进行对比,结果表明采用本方法得到的测量结果明显优于传统方法。对微球与其他物体的交叠,以两个微球之间的交叠为例进行了测量,结果表明采用本方法可以实现对交叠微球的高分辨力三维位置测量,为其在分子动力学和生命科学领域拓宽了应用范围。

## 2 测量原理

同轴数字全息法的原理为,激光器发出平行光照射微球样品,经微球衍射的光作为衍射光,直接透过的光作为透射光。衍射光和透射光在物镜焦平面处发生干涉形成全息图,经物镜放大后被电荷耦合器件(CCD)相机接收。令衍射光和透射光分别为  $E_d(r, z)$ ,  $E_t(r, z)$ , 其中  $r$  为全息面坐标,  $z$  为微球到物镜焦平面的距离,则记录的全息图的强度可以表示为

$$I_h(r, 0) = |E_d(r, 0) + E_t(r, 0)|^2. \quad (1)$$

衍射光在传播时会逐渐变弱,到达焦平面时会有  $|E_d(r, 0)|^2 \ll |E_t(r, 0)|^2$ , 因此对全息图进行减背景和归一化处理可以得到

$$I_n(r, 0) = \frac{I_h(r, 0)}{I_b(r, 0)} - 1 \approx 2\text{Re}[E_d(r, 0) \cdot E_t^*(r, 0)] / I_b(r, 0) = 2\text{Re}[u(r, 0)], \quad (2)$$

式中  $I_b(r, 0) = |E_t(r, 0)|^2$  为视场中无微球时记录图像的强度,  $u(r, 0)$  为经微球衍射的光场,根据瑞利-索末菲衍射公式有

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

式中  $h(r, -z)$  为瑞利-索末菲传递函数,可以表示为

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

式中  $R = \sqrt{r^2 + z^2}$ ,  $k = 2\pi n / \lambda$  为在折射率为  $n$  的介质中的波数。根据傅里叶变换的卷积特性经过计算可得

$$u(r, z) = \mathcal{F}_{\text{FT}}^{-1} \{ \mathcal{F}_{\text{FT}}[I_n(r, 0)] \cdot H(q, -z) \}, \quad (5)$$

式中  $\mathcal{F}_{\text{FT}}$  表示傅里叶变换,  $\mathcal{F}_{\text{FT}}^{-1}$  表示傅里叶逆变换,  $H(q, -z) = \exp\left[iz(k^2 - q^2) \frac{1}{2}\right]$  为  $h(r, -z)$  的傅里叶变换,通过(5)式可以得到微球三维重构光场强度分布  $I_d(r, z) = |u(r, z)|^2$ , 对光强分布进行去卷积运算<sup>[12-13]</sup>, 再进行一定的分析处理即可得到微球的三维位置。提出的全息重构聚焦法结合了这种方法与 Hough 变换法,具体的处理过程主要有 5 个步骤,分别为:

- 1) 对系统采集的全息图进行减背景和归一化处理并进行重构的衍射计算;
- 2) 对重构所得强度图进行去卷积运算,消除散斑、离焦等噪声;
- 3) 根据所得的强度图得到其最大值分布曲线,找到微球聚焦位置;

- 4) 对微球聚焦位置的强度图采用 Hough 变换法, 得到微球球心横向位置;
- 5) 对微球球心对应的强度曲线进行多项式拟合, 得到微球轴向位置信息<sup>[11]</sup>。

### 3 实验装置

实验装置如图 1 所示, 由激光器发出平行光束, 光束中经微球衍射的部分与未经微球衍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成像在 CCD 上。

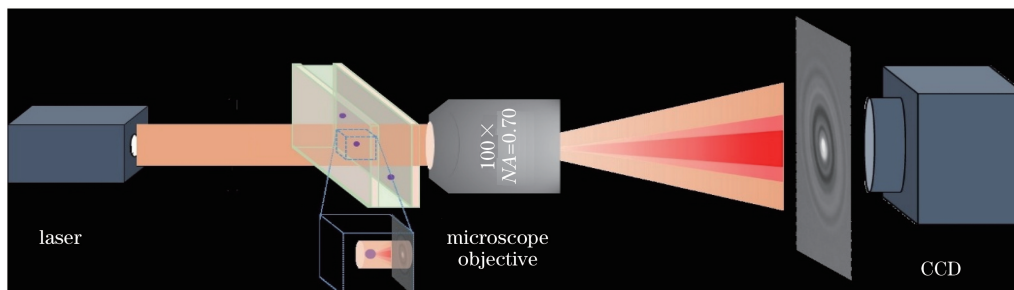


图 1 成像光路

Fig. 1 Optical imaging path

系统中使用激光二极管光源 (Edmund Optics, # 39-569), 波长为  $(670 \pm 10)$  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。CCD 相机 (Point Grey, GS2-GE-50S5M-C) 的有效像素为  $2448 \text{ pixel} \times 2048 \text{ pixel}$ , 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  $25 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$  的采样速率。用于驱动样品移动的三维纳米位移台 (nPoint, NPXY100Z25-102 & Controller C.300) X、Y、Z 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。

## 4 实验结果与分析

### 4.1 单个微球实验

为验证该算法的可行性, 对  $5 \mu\text{m}$  直径聚苯乙烯微球样品进行纳米级的阶跃操控, 并对采用该算法和传统方法所得结果进行对比。利用三维纳米位移台驱动样品分别在横向和轴向做周期阶跃移动, 并采用传统方法和全息重构聚焦法对其分别进行跟踪测量。利用图 1 的实验装置首先对单个微球进行实验验证, 采集到的图像如图 2(a) 所示, 经过 (2) 式的运算后得到图 2(b), 再对其进行衍射计算得到 (5) 式的结果, 对不同位置得到的重构强度进行分析, 得出在图 2(c) 时是聚焦的位置。横向位置测量中, 驱动样品使微球在横向上进行了 10, 5, 2 nm 的阶跃移动, 实验结果如图 3 所示, 可以明显看出采用全息重构聚焦法测得的结果在分辨力和噪声上均优于采用 Hough 变换法测得的结果, 两种方法所得结果的标准差分别为 0.5377 nm 和 1.706 nm。这是因为图 2(c) 重构后聚焦的强度图相比图 2(b) 的全息图信息更加集中, 且经过去卷积运算消除了一部分噪声, 因而得到的横向位置信息比传统方法更为精确。利用位移台使微球在轴向上同样进行了 10, 5, 2 nm 的阶跃移动, 实验结果如图 4 所示, 其标准差为 1.4419 nm。由图 3 和图 4 可得, 采用该算法对单个微球实现了 2 nm 的三维位移分辨力。

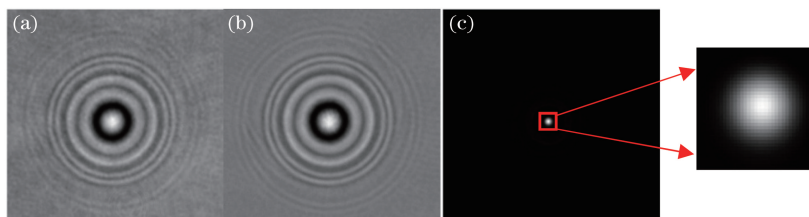


图 2 (a) 单个微球的全息图; (b) 归一化后的单个微球全息图; (c) 单个微球重构后的聚焦图像

Fig. 2 (a) Hologram of single particle; (b) normalized hologram of single particle;

(c) focused image after reconstruction of single particle

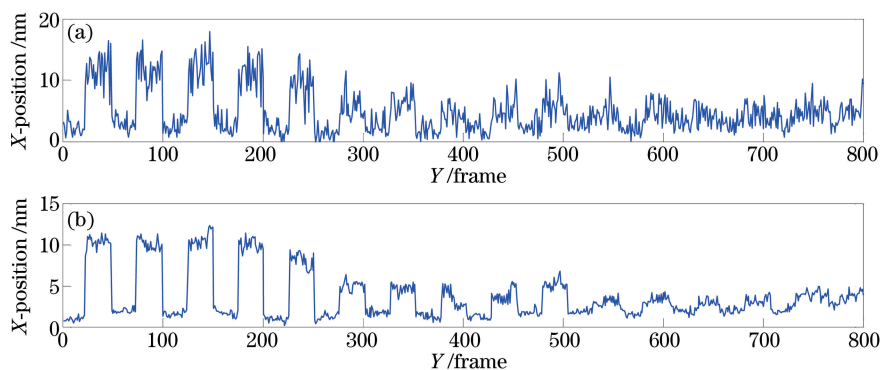


图 3 对单个微球采用(a) Hough 变换法和(b)全息重构聚焦法测得的横向阶跃位移

Fig. 3 Horizontal step displacement measured by (a) Hough transform method and (b) holographic reconstruction focusing method for single particle

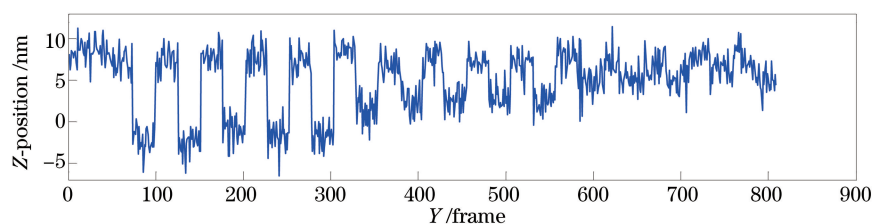


图 4 单个微球轴向阶跃运动

Fig. 4 Axial step displacement of single particle

#### 4.2 交叠微球实验

对交叠微球进行测量,采集到的图像如图 5(a)所示,经过(2)式运算后得到图 5(b)所示结果,再对其进行衍射计算得到(5)式的结果,对不同位置得到的重构强度进行分析得出在图 5(c)时是两个微球聚焦的位置,可以看出本来交叠的微球在重构后强度信息成功地分离。用三维纳米位移台驱动样品分别在横向和轴向做 10,5,2 nm 的周期阶跃位移,并对图像采用全息重构聚焦法对其进行跟踪测量。这时由于圆环强度的交错,传统方法已经无法得出其位置信息,而采用全息重构聚焦法对重构聚焦图像进行识别,得出横向测量结果如图 6 所示,对两个微球的位置进行平移以方便对比,可以看出两个微球的结果吻合较好,其中球 1[图 5(a)左侧]测量结果的标准差为 0.5898 nm,球 2 测量结果的标准差为 0.6722 nm。轴向实验结果如图 7 所示,同样实现了 2 nm 的轴向位移分辨力,其中球 1 测量结果的标准差为 1.6320 nm,球 2 测量结果的标准差为 1.8015 nm。从测量结果来看,采用该算法对单个微球的测量结果要优于对两个微球同时进行测量的结果,这是因为单个微球在重构时受噪声影响更小。

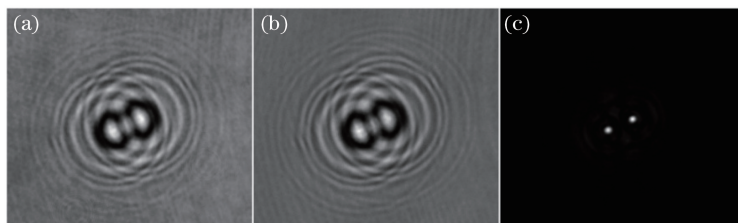


图 5 (a)交叠微球的全息图;(b)归一化后的交叠微球全息图;(c)交叠微球重构后的聚焦图像

Fig. 5 (a) Hologram of overlapped particles; (b) normalized hologram of overlapped particles; (c) focused image after reconstruction of overlapped particles

## 5 结 论

本文提出了一种全息重构聚焦法,并将其应用于微球三维位置的测量中。对单个微球的测量,相较于传统方法,该方法对重构所得强度图进行去卷积运算,消除一部分噪声,使强度信息更加集中,从而能够更加精

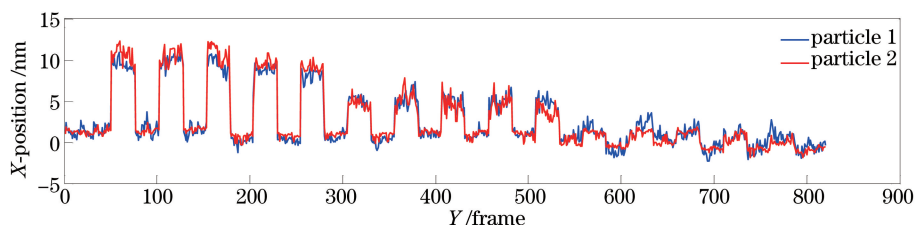


图 6 交叠微球的横向阶跃运动

Fig. 6 Horizontal step displacement of overlapped particles

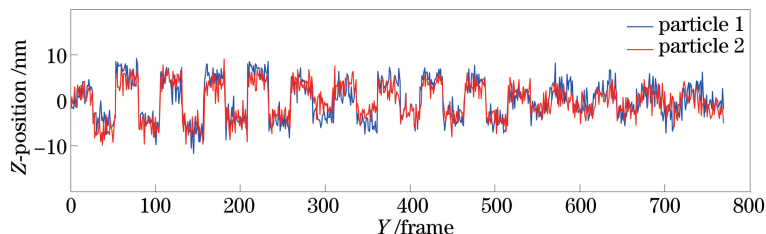


图 7 交叠微球的轴向阶跃运动

Fig. 7 Axial step displacement of overlapped particles

确地测量微球的横向位置。对于交叠的微球图像,经重构后也被成功地分离,从而实现对其定位。实验结果表明,此方法可以解决交叠微球位置测量的问题,对单个微球和交叠微球的测量都达到了 2 nm 的三维位移分辨率,为实现高准确性高通量微球三维位置并行测量提供了可能。

## 参 考 文 献

- [1] Meijering E, Dzyubachyk O, Smal I. Methods for cell and particle tracking[J]. *Methods in Enzymology*, 2012, 504(9): 183-200.
- [2] Shen Yi. High-through 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.
- [3] Neuman K C, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 491-505.
- [4] 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]. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2014, 13(2): 275-288.
- [5] Chenouard N, Smal I, de Chaumont F, *et al.* Objective comparison of particle tracking methods[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 281-289.
- [6] 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.
- [7] Arines J, Ares J. Minimum variance centroid thresholding[J]. *Optics Letters*, 2002, 27(7): 497-499.
- [8] 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.
- [9] Parthasarathy R. Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 724-726.
- [10] Crocker J C, Grier D G. Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid[J]. *Physical Review Letters*, 1994, 73(2): 352-355.
- [11] 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.
- [12] Latychevskaja T, Gehri F, Fink H W. Depth-resolved holographic reconstructions by three-dimensional deconvolution [J]. *Optics Express*, 2010, 18(21): 22527-22544.
- [13] Dixon L, Cheong F C, Grier D G. Holographic deconvolution microscopy for high-resolution particle tracking [J]. *Optics Express*, 2011, 19(17): 16410-16417.