

高精度实时主动轴向防漂移系统研究

霍英东 曹博 于斌 陈丹妮 牛憨笨

A real-time axial active anti-drift device with high-precision

Huo Ying-Dong Cao Bo Yu Bin Chen Dan-Ni Niu Han-Ben

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 028701 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.028701

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.028701>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I2>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于分块速度域改进迭代运动目标检测算法的红外弱小目标检测

A block-based improved recursive moving-target-indication algorithm

物理学报.2014, 63(7): 074208 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.074208>

基于数字全息及复用技术的全场偏振态测试方法

Full-field detection of polarization state based on multiplexing digital holography

物理学报.2013, 62(22): 224204 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.224204>

单摄像机下基于眼动分析的行为识别

Eye movement analysis for activity recognition based on one web camera

物理学报.2013, 62(17): 174203 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.174203>

联合谱域与深度域光谱相位显微方法

Joint spectral and depth domain spectral domain phase microscopy

物理学报.2013, 62(16): 164204 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.164204>

基于法布里-珀罗调谐滤波器的傅里叶域锁模扫频激光光源

Fiber Fabry-Perot tunable filter based Fourier domain mode locking swept laser source

物理学报.2013, 62(6): 068703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.068703>

高精度实时主动轴向防漂移系统研究*

霍英东¹⁾²⁾ 曹博²⁾ 于斌²⁾ 陈丹妮^{2)3)†} 牛憨笨^{2)‡}

1) (中国科学院西安光学精密机械研究所, 超快诊断技术中国科学院重点实验室, 西安 710119)

2) (深圳大学光电工程学院, 光电子器件与系统(教育部、广东省)重点实验室, 深圳 518060)

3) (清华大学精密测试技术及仪器国家重点实验室, 北京 100084)

(2014年7月13日收到; 2014年9月10日收到修改稿)

基于单分子定位的荧光纳米分辨显微成像中, 系统漂移会使得单分子定位出现额外偏差, 从而使重构图像的分辨率降低, 造成图像模糊. 因此, 对系统漂移量的控制至关重要. 近年来, 防漂移的方法层出不穷. 本文针对其中一种利用光学测量原理和引入负反馈的防漂移方法做了系统的研究, 分析了其原理和实现过程, 对整个系统进行了误差分析, 通过实验标定了整个防漂移系统的精度. 该系统可以主动实时地校正漂移量, 实现了显微镜轴向 9.93 nm 的防漂移精度. 与现有商用的显微镜自带的防漂移装置相比, 防漂移精度提高了一个量级.

关键词: 纳米分辨, 四象限探测器, 轴向防漂移**PACS:** 87.64.-t, 87.64.M-, 42.30.-d, 42.30.Wb**DOI:** 10.7498/aps.64.028701

1 引言

医学和生命科学的发展对显微成像技术的要求越来越高, 要想观察到细胞内更精细的结构和细胞内分子的活动, 纳米量级的空间分辨率是前提条件, 其次还要有足够大的成像深度. 因此, 出现了很多三维纳米分辨显微成像方法^[1-3], 其中 3D-STORM (three-dimensional stochastic optical reconstruction microscopy) 方法在 2008 年就获得了横向 20—30 nm, 轴向 50—60 nm 分辨率的三维纳米分辨图像^[1]. 3D-STORM 是基于单分子定位的荧光三维纳米分辨显微成像方法, 它是在原有的 STORM 超分辨成像方法^[4,5] 基础上引入柱面镜散光^[1]、荧光干涉^[6]、双焦面探测^[7]、双螺旋点扩散函数等^[8,9] 轴向定位方法, 从而实现了三维的纳米分辨. 这种基于单分子定位的三维纳米分辨显微成

像方法通常都需要采集数千甚至数万幅单分子荧光图片^[10-12], 而相机的曝光时间一般都在几十毫秒, 所以采集过程常常需要花费几分钟甚至十几分钟. 在这个过程中由于系统的不稳定性, 特别是由于机械不稳定性、温度变化以及物镜自身重力作用而产生的轴向漂移会引起聚焦面的离焦, 几分钟之内就可以漂移数百纳米, 这对荧光单分子三维定位精度的影响很大. 因此, 抑制物镜的轴向漂移, 保证物镜聚焦面稳定是三维纳米分辨显微成像至关重要的前提. 目前, 许多商业显微镜公司都为自己的荧光显微镜开发了防漂移系统, 例如尼康的完美聚焦 (perfect focus system, PFS) 系统^[13], 利用的是盖玻片界面反射参考光的偏移表征物镜的轴向漂移量, 用电动位移装置实现校正, 防漂移精度在 100 nm 左右. 这样的防漂移精度远远不能满足荧光纳米分辨显微成像的需求. 而在实验室, 特别是在荧光的超分辨实验中, 比较常用的方法是利用

* 国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2012CB825802, 2015CB352005)、国家自然科学基金 (批准号: 61335001, 61235012, 61178080, 11004136, 60878053)、国家重大科学仪器设备开发专项 (批准号: 2012YQ15009203) 和深圳市科技计划 (批准号: ZYC201105170233A, JCYJ20120613173049560) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: dannyc007@gmail.com

‡ 通信作者. E-mail: hbniu@szu.edu.cn

设置在样品上的纳米颗粒或荧光珠作为基准标记物^[1,4,14-16],通过对基准标记物的定位来计算得到漂移量,然后在图像处理时引入漂移量校正.还有一种方法是互相关的方法^[17],通过记录样品不同焦面的透射光图像,利用互相关函数获得校正曲线,从而获得样品轴向漂移量,并实时校正.但前一种方法需要在样品中加入额外的标记物,于是系统的成像参数和器件也要与之匹配,并且高浓度的标记物可能会对样品的结构信息产生影响,实现起来较为困难.而后一种方法则需要样品的结构要足够丰富才能有足够高的精度. Huang等^[1]在三维纳米分辨成像实验中用到一种简单有效的防漂移方法,采用光学方法与四象限探测技术结合测量漂移量,并通过压电位移台的负反馈来实现漂移量的校正.但其控制漂移量在几十纳米范围内,需结合图像处理的方法做进一步高精度校正.本文针对这种方法做了系统的研究,分析了其原理和实现过程,给出了整个系统的理论误差,通过实验验证了整个防漂移系统的精度,轴向校正精度达到了9.93 nm,省去了用图像处理方法做进一步轴向漂移校正.至于横向的漂移问题,通常可以用后期的图像处理来解决^[1,18,19],这里不再赘述.

2 原理与方法

该轴向防漂移系统的功能由漂移量探测和负反馈校正两个模块共同完成.首先,针对荧光超分辨显微成像系统中的纳米量级漂移,采用测量精度高、响应时间快的光学方法进行探测.即通过引入参考光,利用显微镜将轴向漂移转为探测面上光点的横向漂移并放大100倍以上,达到微米量级;再用四象限探测器(quadrant detector, QD)探测光束横向偏移的大小,通过换算得到原轴向纳米精度的漂移量.然后,利用装在物镜的纳米级精度的压电位移装置进行反馈,使得物镜与样品之间的相对距离恢复到漂移前的大小.从而实现主动、实时的高精度漂移校正.

2.1 漂移量的光学方法探测

荧光单分子图像获取过程中,系统的轴向漂移量通常在几十到几百纳米,探测难度很大.为此,我们设计了如图1所示的光路,将物镜的轴向漂移用参考光束的横向偏移量表征,并利用了显微镜本身的放大功能将其放大到微米量级.即在原有的

荧光纳米分辨显微成像系统中引入另一束光,考虑到对生物样品的光损伤,选取了光毒性较小且对原成像系统无干扰的785 nm近红外激光作为参考光.测量原理如图1所示.

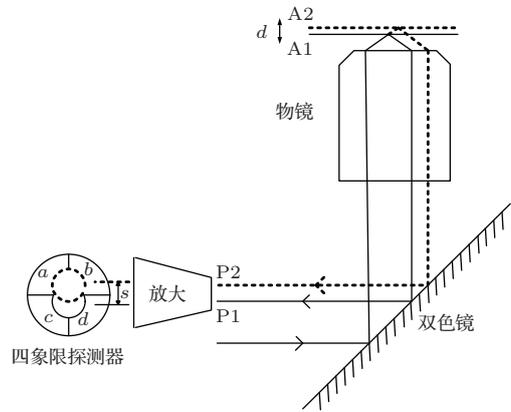


图1 防漂移测量原理

785 nm的参考光经过双色镜耦合进入光路,调节入射的参考光光轴与显微镜光轴的偏移量,当参考光从物镜出射后到达盖玻片上表面时的入射角大于等于全内反射角时,参考光在盖玻片与生物样品的界面发生全内反射.当物镜与盖玻片的相对位置由A1变化至A2时(纳米量级),由盖玻片反射出射的参考光会产生P1到P2的横向偏移.该偏移量再经过后续显微镜系统的放大,进入到QD,从而得到放大的偏移量(微米量级).

光斑在QD上的实际位置与QD各个象限电流值 a, b, c, d 有关,

$$X_p = k \frac{(a+c) - (b+d)}{a+b+c+d},$$

$$Y_p = k \frac{(a+b) - (c+d)}{a+b+c+d}, \quad (1)$$

其中 k 为一常量,与光斑大小有关.为了方便计算和表示,这里引入一个参量——归一化位置坐标,

$$X = \frac{(a+c) - (b+d)}{a+b+c+d},$$

$$Y = \frac{(a+b) - (c+d)}{a+b+c+d}. \quad (2)$$

如图1所示,光斑只会沿某一方向移动(以 Y 方向为例),光斑的偏移量可以归一化的表示为

$$s = Y_2 - Y_1, \quad (3)$$

其中, Y_1, Y_2 为P1, P2对应的归一化位置坐标;物镜漂移 d 对应光斑偏移 s ,它们之间的关系可以表示为, $d = f \cdot s$,其中 f 为一常数,与样品折射率和物镜参数有关.

2.2 负反馈校正实现全自动实时防漂移

将利用上述方法得到的高精度的漂移量,再以负反馈方式返回至物镜位移装置,即可实现防漂移.为了满足荧光三维纳米分辨显微成像对系统稳定性的要求,该防漂移系统选用了压电位移装置.压电位移台具有高精度、高分辨率和响应时间快等优点.本系统所用压电位移台是PI公司的P-721纳米位移台,配合PI公司的E-709数字压电控制器,通过调节PID(比例积分导数控制)参数,其位移精度可以小于10 nm,响应时间小于20 ms,为实现高精度的防漂移功能提供了有利条件.

本系统采用基于Labview的编程控制,流程如图2所示.

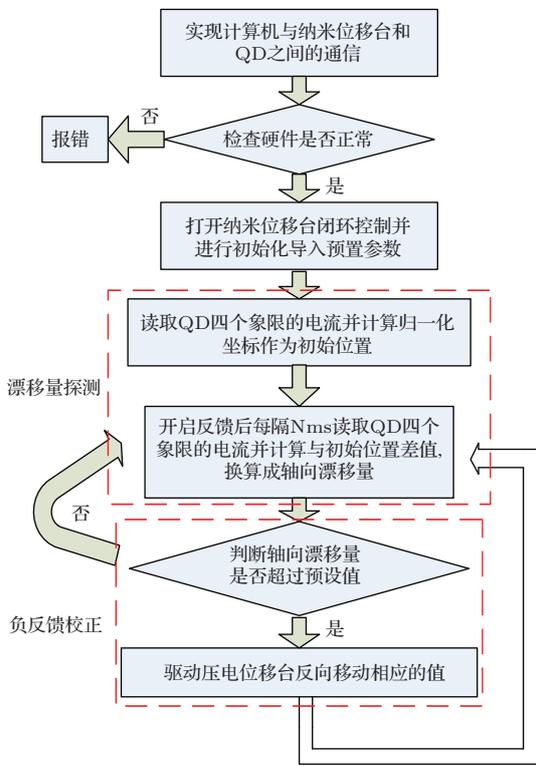


图2 Labview 程序控制流程

图2中,预置参数为纳米位移台的PID参数和起点位置;Nms为负反馈的时间间隔,该参数可以根据需要调整,但为了保证压电位移台的稳定性,负反馈时间间隔的最小值不能小于压电位移台的响应时间.

2.3 轴向位置校正

在实际应用中,虽然物镜的漂移量 d 和QD上光斑的偏移量 s 有明确的对应关系,但由于样品的

折射率通常是未知的,而且物镜本身的结构也很复杂,因此,通过直接计算的方法得到实际的漂移量往往是不可行的.考虑到漂移量 d 和光斑偏移量 s 之间存在线性关系,所以本系统选用了轴向位置校正的方法实测物镜轴向位置与光斑位置之间的关系曲线,即校正曲线.我们以水作为样品进行了测试.向单凹载玻片和盖玻片中间注水,并保证没有气泡.所用物镜为数值孔径1.4的100倍油浸物镜.保持样品面位置固定,利用压电位移台带动物镜,以50 nm步长沿轴向步进,物镜每到达一个位置,QD就读取一个参考光斑的位置.步进的时间间隔设置为30 ms,保证了压电位移台有足够的时间稳定下来,此外,在这么短的时间内,物镜的漂移量可以忽略不计.以压电位移台读出的物镜实际位置作为纵坐标,以QD读出的位置信息(光斑偏移方向上的)作为横坐标,并将得到的这一系列数据点(图3中以小圆圈表示,这里采样了20个点)进行线性拟合(拟合曲线如图3中的直线所示),即可得到系数 f , f 为图3所示直线的斜率.经过线性拟合得到直线的斜率为1.833.这意味着当QD检测到参考光斑偏移量 s 时,压电位移台带动物镜移动 $-f \cdot s$ 即可实现反馈校正,因此, f 也是反馈系数.

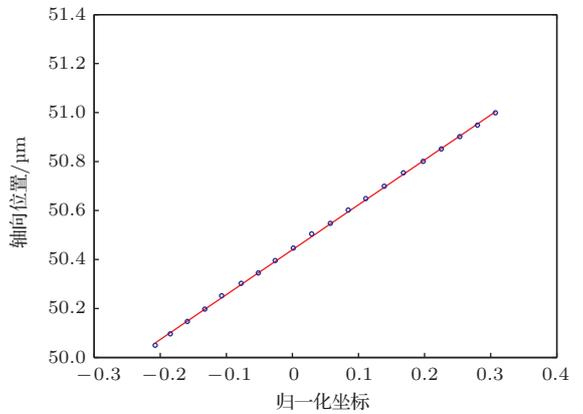


图3 轴向位置校正的线性拟合

2.4 系统误差分析

系统误差主要来源于QD的测量误差 δ_{qd} 和压电位移台的位移误差 δ_{mov} 二者的合成.由于 δ_{qd} , δ_{mov} 都是随机误差,所以整个系统的误差 δ_{sys} 应当为

$$\delta_{sys}^2 = \delta_{qd}^2 + \delta_{mov}^2 \quad (4)$$

为了得到整个系统的误差 δ_{sys} ,首先要分别对QD和压电位移台做误差评估.具体方法是:

1) 纳米位移台关闭情况下, 5 s 内, 读取 QD 所测轴向位置 1000 次, 对轴向位置做统计分析, 得到 $\delta_{qd} \approx 1.582 \text{ nm}$; 2) 控制纳米位移台以 50 nm 步距移动 1000 步, 读出每一步的位置, 对每一次的实际相对位移量做统计分析, 得到 $\delta_{mov} \approx 3.869 \text{ nm}$. 因此, 根据 (4) 式估计整个系统的误差 δ_{sys} 约为 4.18 nm.

2.5 防漂移效果实验验证

我们对防漂移效果进行了实验验证, 系统结构如图 4 所示.

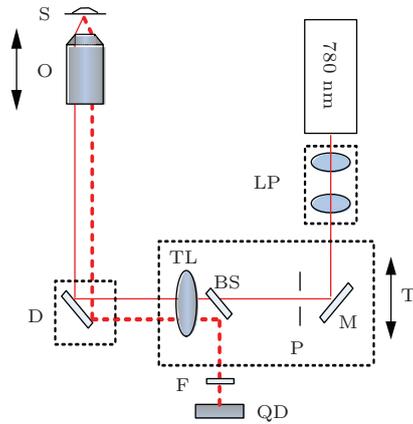


图 4 防漂移系统原理 (其中 LP 为准直系统, M 为反射镜, P 为可变光阑, BS 为分束棱镜, TL 为焦距为 300 mm 的透镜; M, P, BS, TL 整体固定在位移台 T 上, 用于调节光束偏移以产生全内反射; D 为双色镜, O 为物镜, S 表示样品, F 为带通滤光片, QD 为四象限探测器)

该系统主要是基于奥林巴斯 IX71 倒置荧光显微镜, 其中物镜为 100 \times 平场复消色差油浸物镜, 数值孔径 1.4. 参考光激光器波长为 780 nm, 功率 80 mW. 所用双色镜 (FP3) 为 Chroma 公司的 ZT647RDC.

由于水的折射率与生物样品较接近, 不同生物样品折射率总会略有差异, 实际实验中只需微调位移台 T 就可实现全内反射. 因此, 为了简单并且具有参考意义, 我们用水作为样品进行了防漂移效果的验证测试. 分别记录在不加防漂移和加防漂移的情况下 QD 的读数, 并根据校正曲线得到的反馈系数, 将其换算成轴向漂移量. 采样间隔 1 s, 一共获取 1800 个不同时刻的数据, 即 30 min 的数据. 结果如图 5(a) 所示, 它表明, 在未加防漂移反馈的情况下, 在 30 min 内轴向漂移量高达 2 μm (图 5(a) 中红色曲线所示); 而加防漂移反馈后, 在 30 min 内轴向漂移量大大减小, 对数据进行统计分析后的结果

表明, 此时轴向位置服从高斯统计分布, 标准差为 9.93 nm (如图 5(b) 所示). 以上结果表明该防漂移反馈系统的引入对于成像系统的稳定性有了很大改善, 对于基于单分子定位的纳米分辨成像方法来说, 可以大大减小荧光序列图像获取过程中由漂移引起的误差, 提高轴向分辨能力. 实验得到的防漂移精度 9.93 nm 略大于前面得到的 δ_{sys} , 主要原因是 δ_{sys} 是误差分析得到的系统所能达到的最高精度, 系统的实际精度还与长时间工作的工作环境及所设阈值有关.

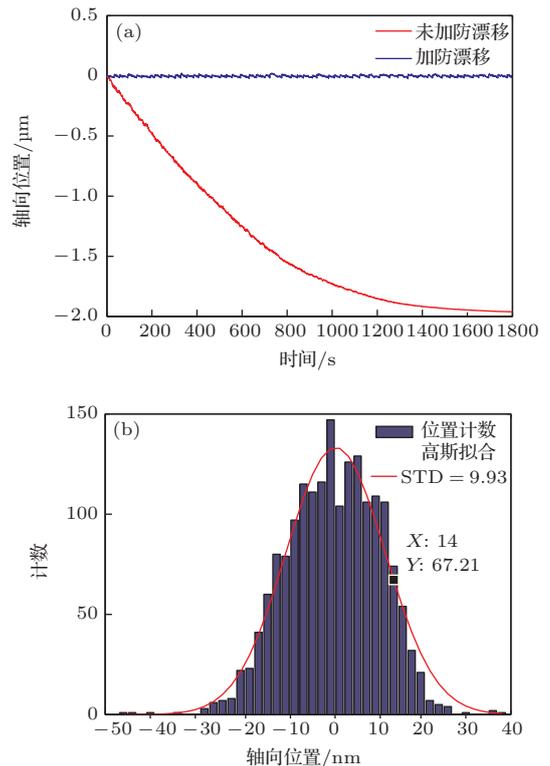


图 5 (网刊彩色) (a) 未加防漂移系统与加防漂移反馈系统情况下的漂移量对比; (b) 加防漂移系统后轴向偏移量的统计结果

3 结 论

本文对利用光学测量原理和引入负反馈的防漂移方法做了系统的理论分析和实验验证. 分析了其原理和实现过程, 给出了整个系统的理论误差; 通过实验验证了整个防漂移系统的精度, 轴向校正精度达到了 9.93 nm, 无需对样品进行改造, 更不受样品结构影响; 不需要用图像处理方法做进一步轴向漂移校正, 为荧光三维纳米分辨显微成像创造了有利条件. 该系统也可用于纳米分辨多分子追踪、纳米分辨层析成像等实验研究中, 从硬件上解决焦面稳定性问题. 此外, 由于其具有毫秒级响应时间,

也可以使观测过程中加试剂或其他人为操作造成的焦面漂移得以瞬间恢复.

参考文献

- [1] Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X 2008 *Science* **319** 810
- [2] Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, Lord S J, Liu N, Twieg R J, Piestun R, Moerner W 2009 *PNAS* **106** 2995
- [3] Juette M F, Gould T J, Lessard M D, Mlodzianoski M J, Nagpure B S, Bennett B T, Hess S T, Bewersdorf J 2008 *Nat. Methods* **5** 527
- [4] Rust M J, Bates M, Zhuang X 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [5] Chen D N, Liu L, Yu B, Niu H B 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 6948 (in Chinese) [陈丹妮, 刘磊, 于斌, 牛憨笨 2010 物理学报 **59** 6948]
- [6] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, Lippincott-Schwartz J, Gillette J M, Manley S, Sougrat R, Waterman C M, Kanchanawong P, Davidson M W 2009 *PNAS* **106** 3125
- [7] Ram S, Prabhat P, Ward E S, Ober R J 2009 *Opt. Express* **17** 6881
- [8] Li H, Yu B, Chen D N, Niu H B 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 124201 (in Chinese) [李恒, 于斌, 陈丹妮, 牛憨笨 2013 物理学报 **62** 124201]
- [9] Yu B, Li H, Chen D N, Niu H B 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 154206 (in Chinese) [于斌, 李恒, 陈丹妮, 牛憨笨 2013 物理学报 **62** 154206]
- [10] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, Betzig E 2008 *Nat. Methods* **5** 417
- [11] Bates M, Huang B, Dempsey G T, Zhuang X 2007 *Science* **317** 1749
- [12] Gould T J, Verkhusa V V, Hess S T 2009 *Nat. Protoc.* **4** 291
- [13] Peters J 2008 *Nat. Methods*, Application Notes
- [14] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, Hess H F 2006 *Science* **313** 1642
- [15] Carter A R, King G M, Ulrich T A, Halsey W, Alchenberger D, Perkins T T 2007 *Appl. Opt.* **46** 421
- [16] Lee S H, Baday M, Tjioe M, Simonson P D, Zhang R, Cai E, Selvin P R 2012 *Opt. Express* **20** 12177
- [17] Mcgorthy R, Kamiyama D, Huang B 2013 *Opt. Nanosc.* **2** 3
- [18] Wade A, Fitzke F 1998 *Opt. Express* **3** 190
- [19] Mlodzianoski M J, Schreiner J M, Callahan S P, Smolková K, Dlasková A, Šantorová J, Ježek P, Bewersdorf J 2011 *Opt. Express* **19** 15009

A real-time axial active anti-drift device with high-precision*

Huo Ying-Dong¹⁾²⁾ Cao Bo²⁾ Yu Bin²⁾ Chen Dan-Ni^{2)3)†} Niu Han-Ben^{2)‡}

1) (CAS Key Laboratory of Ultrafast Diagnostics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics of CAS, Xi'an 710119, China)

2) (Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

3) (State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instruments, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(Received 13 July 2014; revised manuscript received 10 September 2014)

Abstract

In a fluorescent nano-resolution microscope based on single molecular localization, drift of focal plane will bring an additional deviation to the accuracy of single molecular localization. Consequently, this will reduce the final resolution of the reconstructed image and cause image degradation. Therefore, it is vital to control the system drift to a minimum level as much as possible. In recent years, the anti-drift ways emerged in endlessly. In this paper we made a systematic study aiming at the method in which optical measurement and negative feedback control are used. The basic principle and its implementation of the system are analyzed, and possible error is also evaluated. Finally, the precision of the system is tested experimentally. With this device, axial drift can be detected and corrected automatically in time, and the axial anti-drift accuracy as high as 9.93 nm can be achieved, which is one order higher than that of the existing commercial microscopies.

Keywords: nano-resolution, quadrant detector, axial anti-drift

PACS: 87.64.-t, 87.64.M-, 42.30.-d, 42.30.Wb

DOI: [10.7498/aps.64.028701](https://doi.org/10.7498/aps.64.028701)

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant Nos. 2012CB825802, 2015CB352005), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61335001, 61235012, 61178080, 11004136, 60878053), the Special Funds of the Major Scientific Instruments Equipment Development of China (Grant No. 2012YQ15009203), and the Science and Technology Planning of Shenzhen, China (Grant Nos. ZYC201105170233A, JCYJ20120613173049560).

† Corresponding author. E-mail: dannyc007@gmail.com

‡ Corresponding author. E-mail: hbniu@szu.edu.cn