

11 Компенсация глобального дрейфа в длительных измерениях во флуоресцентной наноскопии квантовых точек*

© А.А. Баев, А.А. Роженцов[¶]

Поволжский государственный технологический университет,
424000 Йошкар-Ола, Россия

[¶]e-mail: RozhencovAA@volgatech.net

Поступила в редакцию 24.09.2018 г.

Представлен подход к повышению точности обработки изображений флуоресцентных мерцающих одиночных квантовых точек, основанный на оценке параметров функции, описывающей глобальный дрейф, по информации о достаточно длительной серии изображений одиночных квантовых точек. Приведены результаты обработки серии кадров, полученных в экспериментах с одиночными квантовыми точками CdSe/ZnS.

DOI: 10.21883/OS.2019.01.47054.270-18

Введение

Медленный дрейф — пространственный сдвиг изображения во времени — является одной из серьезных проблем различных микроскопических техник: зондовой микроскопии, люминесцентной наноскопии и т.д. Характерные значения сдвигов могут варьироваться от десятков до нескольких сотен и более нанометров в час. Причинами могут быть нестабильности в системе позиционирования образца, медленные изменения пространственного положения оптических элементов в системе регистрации, связанные с механической и температурной нестабильностью и т.п. В результате происходит „размывание“ изображений частиц, что приводит к снижению точности оценки их параметров. В данной работе предлагается подход, позволяющий существенно уменьшить влияния медленного дрейфа в долговременных измерениях в экспериментах по люминесцентной наноскопии с одиночными мерцающими квантовыми точками. В настоящее время существует несколько подходов компенсации межкадрового сдвига, базирующейся на вычислении взаимно корреляционной функции между кадрами [1], однако этот метод не обеспечивает возможность оценки медленных дрейфов по соседним кадрам при практически значимых уровнях шума. Другие методы требуют наличия специальных маркеров [2]. Предлагаемый подход основан на оценке параметров функции, описывающей глобальный дрейф и субпиксельную компенсацию этого дрейфа в каждом кадре.

Описание подхода

Для получения аналитической зависимости неконтролируемого дрейфа используется полиномиальная ап-

проксимация. В работе предлагается подход, основанный на использовании информации о субдифракционных координатах мерцающих квантовых точек, зарегистрированных в достаточно длительной серии кадров (от нескольких сотен до нескольких тысяч) не требующих специальных маркеров. Для этого информация о координатах всех отметок, обнаруженных в анализируемой серии кадров, группируется в общий массив данных путем вычитания математического ожидания координат отметок в пределах трека из координат каждой отметки. Полученный таким образом набор точек аппроксимируется полиномом заданной степени. Полученная функциональная зависимость и будет характеризовать закон глобального дрейфа всех точек.

Поскольку поиск коэффициентов аппроксимирующего глобальный дрейф полинома производится на основании множества точек, сведенных в окрестность начала координат на основании оценок параметров локального дрейфа отдельных отметок, мерцание отметок не будет оказывать влияния на определение параметров глобального дрейфа.

Модельный эксперимент

Для оценки эффективности методики определения параметров глобального дрейфа был проведен вычислительный эксперимент, в котором моделировались серии кадров с флуоресцирующими отметками, координаты которых менялись в соответствии с заданным законом. Рассматривались случаи дрейфа по гармоническому (синусоидальному), линейному и полиномиальному законам. При моделировании задавались параметры, полученные в экспериментах с одиночными квантовыми точками CdSe/ZnS. Значение параметра дисперсии, определяющего ширину изображения одиночной квантовой точки, аппроксимируемой функцией Гаусса, задавалось равным 1.3 пикселя. Количество отметок в кадре составляет 16. Размер кадра — 100 × 100 пикселей.

* XIII International Conference on Hole Burning, Single Molecule, and Related Spectroscopies: Science and Applications (HBSM-2018), August 6–12, 2018, Suzdal–Moscow, Russia.

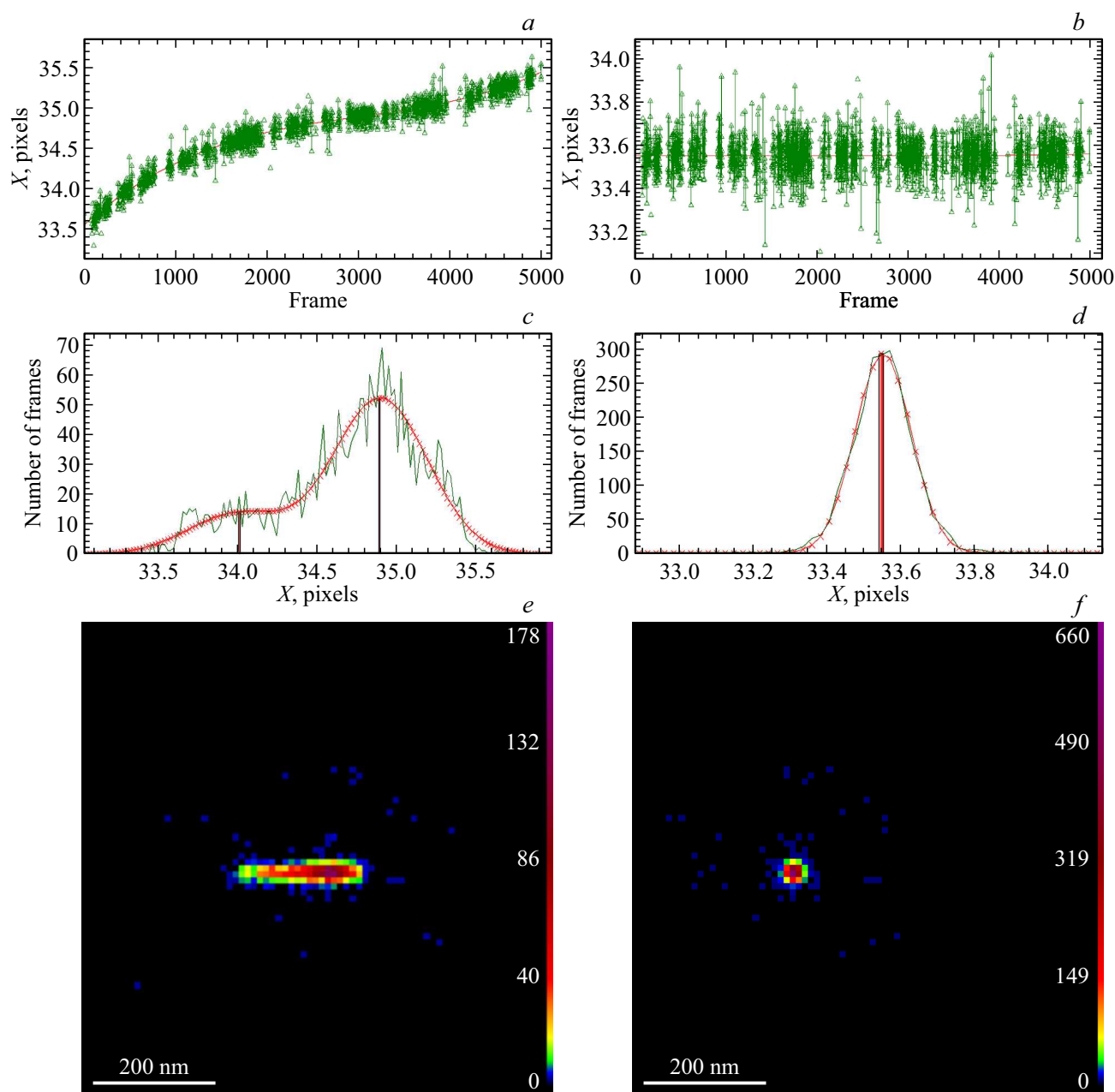


Рис. 1. Пример искажения значений вычисленных субпиксельных координат точки как при наличии глобального дрейфа, изменяющегося по полиномиальному закону (*a, c, e*), так и при его компенсации (*b, d, f*). Исходное значение координаты $X = 33.554$. Показаны изменения вычисленного значения координаты X до (*a*) и после (*b*) компенсации дрейфа, соответствующие им гистограммы (*c, d*), фрагмент двумерной гистограммы (*e, f*).

На рис. 1 показан график изменения координаты X квантовой точки (значения в пикселях) в условиях полиномиального дрейфа (рис. 1, *a*), при заданном начальном положении квантовой точки ($X = 33.554$, $Y = 8.943$) и отсутствии локального дрейфа. Из графика (рис. 1, *c*) видно, что функция распределения координат не подчиняется нормальному закону. Траектория нелинейна, гистограмма распределения (рис. 1, *c*) после ее аппроксимации имеет два максимума ($\sigma = 0.313$ (~ 31.3 nm), $X = 34.006$; $\sigma = 0.295$ (~ 29.5 nm), $X = 34.9$), что мо-

жет свидетельствовать о наличии двух или более точек, что противоречит исходным данным.

После компенсации глобального дрейфа видно, что распределение (рис. 1, *d*) подчиняется нормальному закону распределения с оценками параметров $\sigma = 0.076$ (~ 7.6 nm), $X = 33.553$, что соответствует исходным данным.

На графиках, представленных на рис. 2, *a-c*, сплошной линией показаны графики, отображающие гармонический (*a*), линейный (*b*) и полиномиальный (*c*) законы

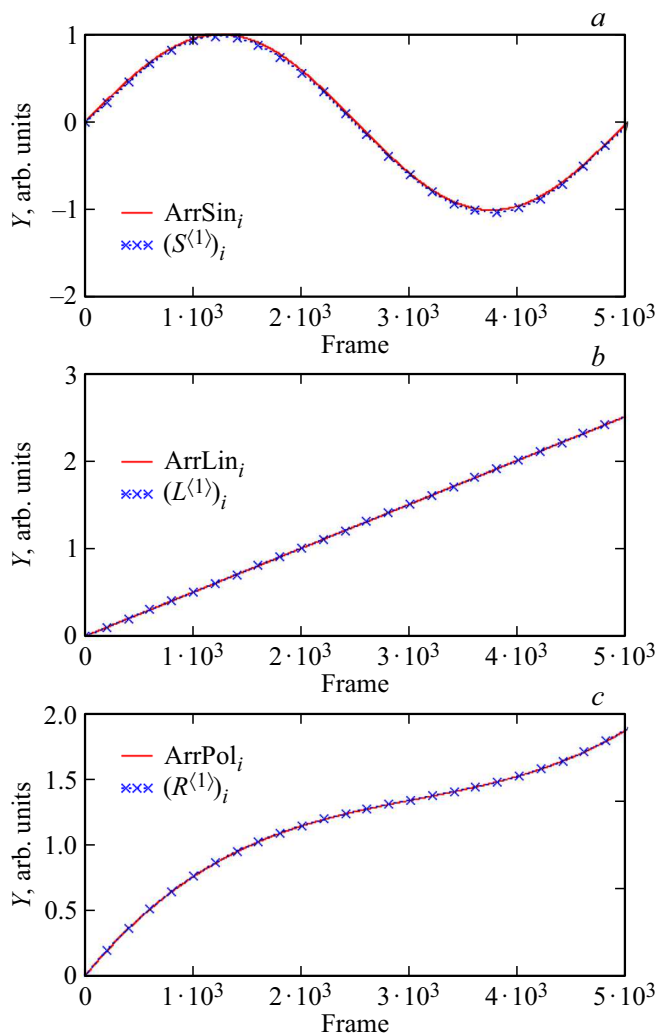


Рис. 2. Модели гармонического (а), линейного (b) и полиномиального (с) законов глобального дрейфа. По оси абсцисс отложен номер кадра.

глобального дрейфа отметок в кадре, X-маркерами — отсчеты аппроксимирующей функции. Представленные графики демонстрируют хорошее совпадение результатов аппроксимации с графиками дрейфа. Последующая компенсация глобального дрейфа позволяет восстановить изображение одиночного точечного излучателя и точно локализовать его положение в кадре (рис. 2, d).

Оценка качества восстановления линии дрейфа

Для оценки качества восстановления линии глобального дрейфа (рис. 2), изменяющегося по различным законам, можно воспользоваться критерием Фишера, для чего проверяется статистическая гипотеза НО о статистической незначимости уравнения регрессии. Проверка состоит в сравнении наблюдаемого значения F -критерия

Коэффициенты детерминации и значения F -критерия для модельного и реального экспериментов

Модель	R^2	F	$F_{critical}$
Гармоническая	0.99899572	$9.935 \cdot 10^5$	2.216
Линейная	0.999998548	$3.442 \cdot 10^9$	3.843
Полином	0.999978245	$7.655 \cdot 10^7$	2.607
Эксперимент	0.796143174	$6.734 \cdot 10^4$	2.214

с критическим значением при заданном уровне значимости, равным, например, 0.05 или 0.01. Величина F -критерия связана с коэффициентом детерминации R^2 :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{n=0}^{N-1} (E_n - S_n)^2}{\sum_{n=0}^{N-1} (E_n - \bar{E})^2},$$

где N — объем выборки, E — отсчеты координат в массиве эталона, \bar{E} — среднее значение координат, S — отсчеты координат в аппроксимированном массиве.

Значение F -критерия вычисляется по формуле

$$F = \frac{R^2}{1 - R^2} \frac{(N - m - 1)}{m},$$

где m — число степеней свободы.

Как видно из представленных в таблице данных, коэффициент детерминации во всех случаях очень близок к единице, а значения F -критерия значительно превышают критические, что свидетельствует о хорошем совпадении аппроксимирующей кривой с экспериментальными данными.

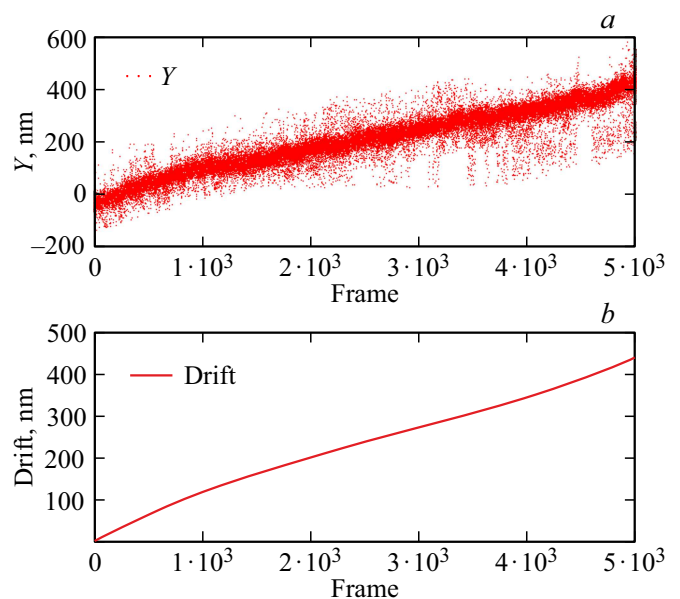


Рис. 3. Зависимость изменения субкоординатного значения Y для нескольких квантовых точек (а). Результат вычисления глобального дрейфа для координаты Y (b). По оси абсцисс отложен номер кадра.

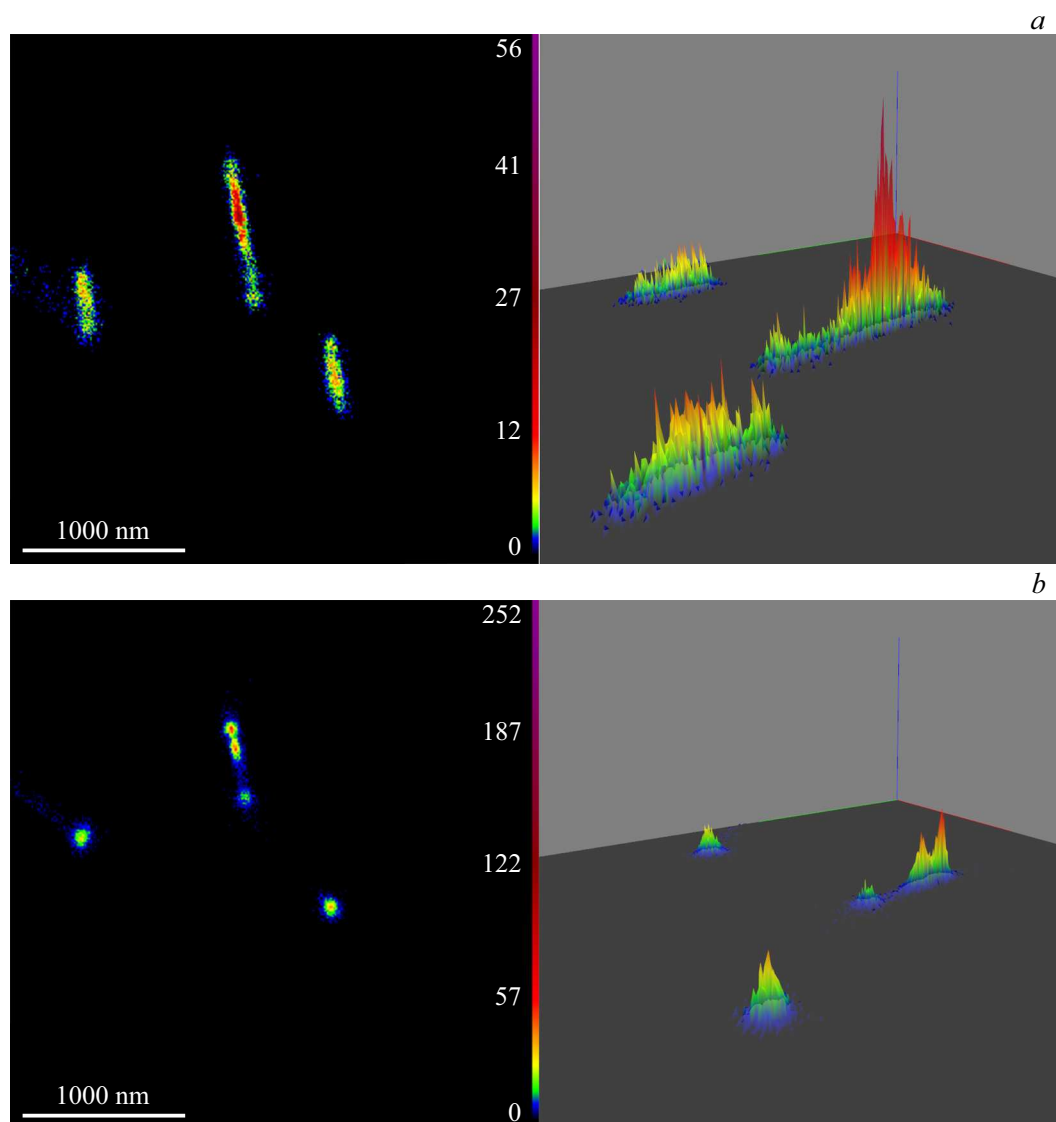


Рис. 4. Фрагмент 2D- и 3D-гистограммы распределения координат одиночных квантовых точек CdSe/ZnS, измеренных по 5000 CCD-кадрам без компенсации (*a*) и с компенсацией (*b*) глобального дрейфа.

Реальный эксперимент

Чтобы показать возможности предлагаемого подхода, мы используем экспериментальные данные о флуоресцентных изображениях одиночных коллоидных квантовых точках CdSe/ZnS с диаметром излучающего ядра ~ 4 nm, предоставленных исследовательской группой лаборатории спектров и молекул отдела молекулярной спектроскопии Института спектроскопии РАН [3–5]. Флуоресценция одиночных квантовых точек возбуждалась CW-лазером (Coherent Verdi V6) на длине волны 532 nm с интенсивностью возбуждения ~ 100 W/cm². Флуоресцентные изображения зарегистрированы с помощью камеры емCCD (Luca Andor) с временем экспозиции 100 ms на кадр.

Рисунок 3 показывает зависимость изменения субдифракционной координаты Y (nm) для нескольких

одиночных квантовых точек (рис. 3, *a*) и вычисленную функцию, описывающую глобальный дрейф (рис. 3, *b*).

На рис. 4, *a* показан пример изображения сверхразрешения для одиночных квантовых точек по серии кадров, в которой наблюдался значительный дрейф по координате Y . Это изображение представляет собой двумерную гистограмму пространственного распределения восстановленных (субпиксельных) координат одиночной квантовой точки [6]. Распределение плотности зарегистрированных координат одиночного точечного источника излучения представляет собой вытянутую линию вдоль направления дрейфа.

На рис. 4, *b* показано изображение, полученное по той же серии кадров, после компенсации глобального дрейфа. Плотность зарегистрированных координат представляет собой симметричную фигуру — круг, радиус

которого определяется точностью определения координат при однократном измерении.

Как и в случае с модельными изображениями, компенсация глобального дрейфа позволяет восстановить изображения одиночных точечных квантовых точек и точно локализовать их положение в кадре (рис. 4).

Заключение

Глобальный дрейф может быть компенсирован расширенными измерениями и корректным полиномиальным анализом. Модельный эксперимент показал высокую точность вычисления глобального дрейфа.

Выражаем благодарность за предоставленные данные исследовательской группе Лаборатории электронных спектров молекул Отдела спектроскопии конденсированных сред Института спектроскопии РАН.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-72-20266).

Список литературы

- [1] *Mlodzianoski M.J. et al.* // Opt. Express. 2011. V. 19. P. 15009.
- [2] *Ma H. et al.* // Biophysical J. 2017. V. 112. P. 2196.
- [3] *Naumov A.V., Eremchev I.Y., Gorshchev A.A.* // EPL. D. 2014. V. 68. P. 348.
- [4] *Shchukina A.L., Eremchev I.Y., Naumov A.V.* // Phys. Rev. E. 2015. V. 92. P. 032102.
- [5] *Eremchev I.Y., Osad'ko I.S., Naumov A.V.* // J. Phys. Chem. C. 2016. V. 120. P. 22004.
- [6] *Баев А.А., Роженцов А.А.* // Изв. РАН. Сер. физ. / Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2017. Т. 81. N 5. С. 606–610.