

## СВЕРХТОЧНАЯ РЕГИСТРАЦИЯ СМЕЩЕНИЯ ИСТОЧНИКА СВЕТА В ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

**В** начале 80-х годов прошлого века был изобретен сканирующий туннельный микроскоп [1], а чуть позднее – атомно-силовой [2], с помощью которых получены изображения с разрешением менее 1 нм. Однако сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) позволяет исследовать лишь свойства поверхности объекта, а изучать, тем более, визуально наблюдать его внутреннее строение, невозможно.

В связи с этим появилась необходимость разработки новых методов оптической микроскопии для сверхточного изучения объектов, размеры которых не превышают нескольких нанометров. Эта проблема особенно актуальна для таких социально значимых областей науки, как биология, микроэлектроника, кристаллография, где положение и движение объекта необходимо определять со сверхвысокой точностью.

Сверхточная регистрация смещения объекта и определение его положения довольно близки по сути, так как зная точное положение объекта в конечный и начальный момент времени, можно определить его смещение; зная смещение и начальное положение можно определить его конечное положение. Отсюда следует, что эти задачи можно решать, не отделяя одну от другой.

Прорыв в области оптической микроскопии был совершен в середине 1980-х годов в результате создания ближнепольного оптического микроскопа, позволяющего получать разрешение в 20 нм [3–4]. Позднее был проведен ряд исследований [5], в которых зарегистрировано смещение образца на 5 нм.

Сканирующий ближнепольный микроскоп имеет ряд недостатков:

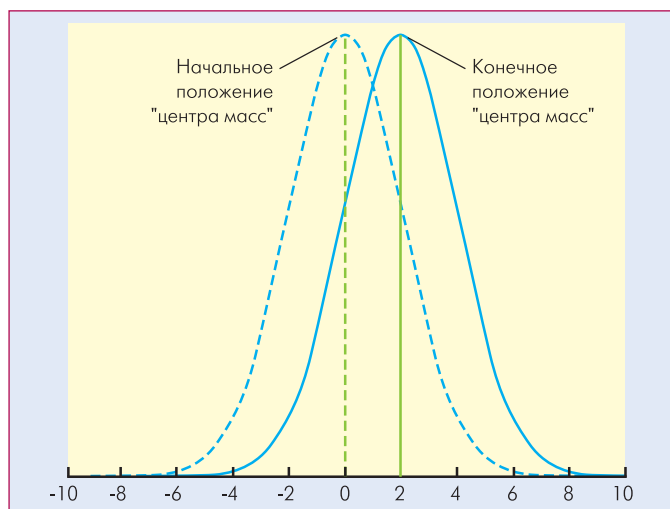
- снятие одного кадра требует значительного времени, что не позволяет исследовать быстроизменяющиеся процессы;

- являясь разновидностью зондового, микроскоп дает информацию об оптических свойствах поверхности, но не позволяет детально исследовать объемные структуры.

В последние годы разработаны методы сверхточного определения положения светящейся точки и в дальнепольной оптической микроскопии [6]. Большинство их основано на многократной активации и дезактивации флуоресцентных меток, в результате чего формируется большой объем данных для статистической обработки [7–10]. В результате удалось определить положение источника света с точностью ~2 нм.

Однако способ имеет следующие недостатки:

- время сбора данных составляет несколько часов;



**Рис.1** Схема метода "центра масс":  
 - - - - первоначальное положение источника света,  
 — положение источника света после смещения.

- для устранения шумов, проявляющихся при эксперименте, необходимо применение сложных методов коррекции;
- для достижения высокой точности требуется обработка очень большого массива информации.

В данной работе предложены два метода сверхточной регистрации смещения источника света, которые условно можно назвать:

- метод регистрации смещения "центра масс";
- метод определения изменения разности интенсивностей двух областей.

Произведена теоретическая оценка и установлено, что данными методами при использовании малозумящей камеры и качественной оптики можно наблюдать смещение источника света с точностью ~1 нм.

Для оценки методов проведен реальный эксперимент. Установлено, что даже с помощью обычной вебкамеры Deep View F-2сп (компания Webbers), характеристики которой далеки от идеальных, и метода регистрации смещения "центра масс" можно фиксировать движение источника света на 100 нм.

В обоих методах предполагается, что источник света – гауссовый пучок, при этом движение исследуется вдоль одной декартовой оси.

### МЕТОД РЕГИСТРАЦИИ СМЕЩЕНИЯ "ЦЕНТРА МАСС"

Для определения расстояния, на которое смещается источник света, можно следить за изменением положения одной точки. Удобней всего наблюдать за смещением "центра масс", который находится по формуле:

$$\bar{R}_{ц.м.} = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \bar{r} I(\bar{r}) d\bar{r}}{\int_{-\infty}^{+\infty} I(\bar{r}) d\bar{r}},$$

где  $I(\bar{r})$  – функция распределения интенсивности в пространстве.

В одномерном случае интегрирование ведется вдоль одной оси, и формула принимает вид:

$$X_{ц.м.} = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} x I(x) dx}{\int_{-\infty}^{+\infty} I(x) dx},$$

где  $I(x)$  – функция распределения интенсивности вдоль декартовой оси  $Ox$ .

Для регистрации смещения необходимо:

- найти первоначальное положение "центра масс";
- сместить источник света;
- определить новое положение "центра масс";
- найти расстояние, на которое сместилась эта точка;
- определить изменение положения источника света, которое равно смещению "центра масс".

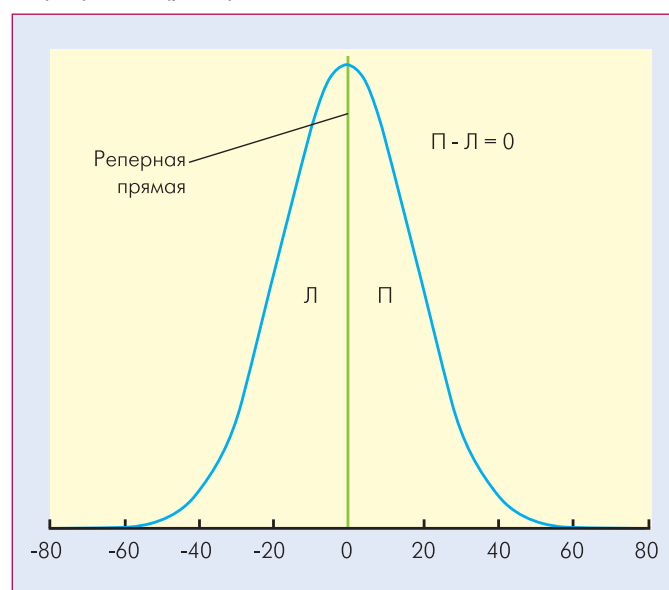
Схема метода представлена на рис.1.

### МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗНОСТИ ИНТЕНСИВНОСТЕЙ ДВУХ ОБЛАСТЕЙ

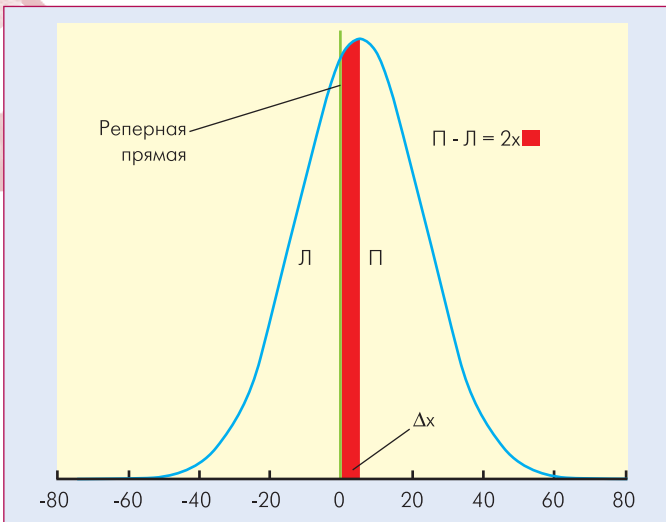
Метод широко используется в атомно-силовой микроскопии при регистрации относительного смещения отраженного лазерного пучка при отклонении кантилевера.

Он реализуется следующим образом:

- находится точка, соответствующая первоначальному "центру масс". Эта точка делит ось  $Ox$  на правую ("П") и левую ("Л") части (рис.2);



**Рис.2** Первоначальное положение изображения источника света. Разность суммарных интенсивностей правой и левой частей относительно первоначального положения "центра масс" равна 0



**Рис.3** Источник света смещен относительно первоначального положения на  $\Delta x$ . Изменение разности суммарных интенсивностей правой и левой частей относительно первоначального значения равно удвоенной площади красной области

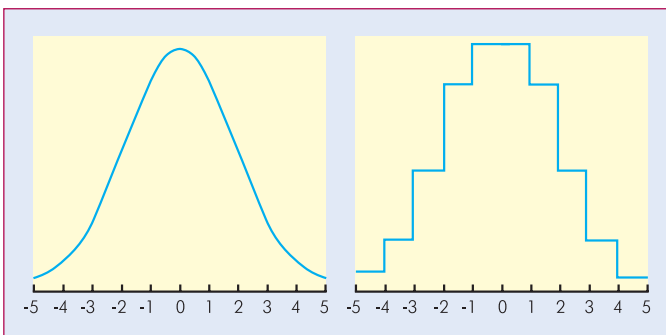
- рассчитывается разность суммарных интенсивностей, соответствующих правой и левой части;
- смещается источник света;
- рассчитывается новая разность суммарных интенсивностей правой и левой частей относительно той же точки (рис.3);
- по изменению разности интенсивностей фиксируется смещение источника света.

### СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ

Чтобы определить, какой из вышеописанных методов точнее, необходимо изучить их в условиях, близких к реальным. Были сделаны следующие предположения:

- в системе присутствуют шумы;
- гауссиан аппроксимируется ступенчатой функцией. Ширина ступени равна единице, что соответствует одному пикселю на матрице камеры, а высота – среднему значению функции Гаусса в интервале  $(i-1, i)$ , где  $i$  – целое число (рис.4). Для оценки "сверху" точности методов полагается, что высота ступени определяется с точностью  $1/256$  (соответствует камере низкого качества).

Разработана программа, позволяющая моделировать смещение источника и фиксировать его движение по одному из

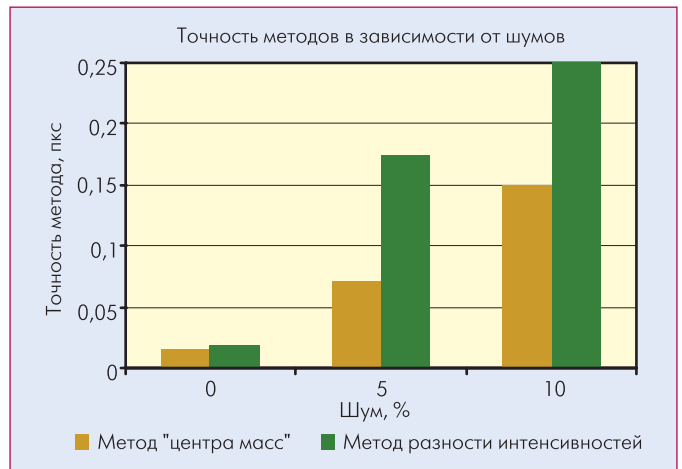


**Рис.4** Аппроксимация гауссиана ступенчатой функцией

вышеописанных методов. Точность каждого эксперимента оценивалась, как  $\max(|\Delta x - \Delta x'|)$ , где  $\Delta x, \Delta x'$  – смещение идеального и аппроксимированного гауссиана.

Эксперимент проводился для каждого метода как без шумов, так и при их наличии. Результат представлен на рис.5.

Из диаграммы следует, что при наличии погрешности, связанной только с оцифровкой, оценка точности обоих методов "сверху" составляет  $\sim 0,015$  расстояния, соответствующего одному пикселю на матрице.

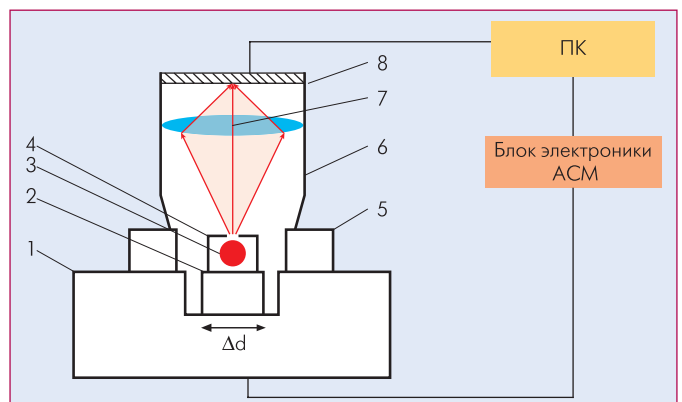


**Рис.5** Погрешность точности метода "центра масс" и разности интенсивностей в зависимости от шума: по вертикали – погрешность определения положения источника света, измеренная в долях от линейного размера одного пикселя камеры, по горизонтали – доля шума от основного сигнала (%)

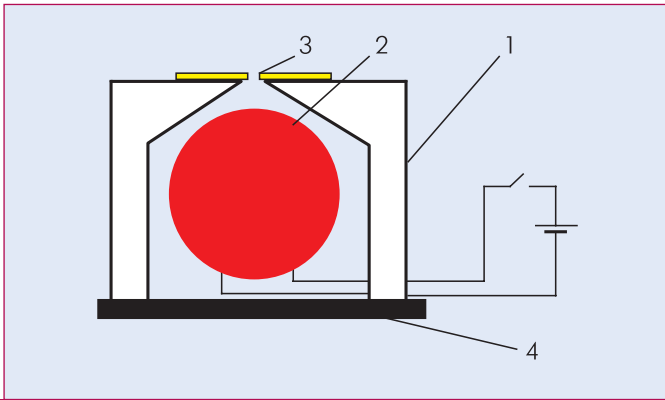
Таким образом, при отображении 100 нм на 1 пиксель (в случае качественной оптики) точность регистрации движения будет  $\sim 1,5$  нм, а при использовании качественной камеры (с точностью оцифровки лучше, чем  $1/256$ ) это значение может быть значительно снижено.

### УСТАНОВКА

Для получения оценочных значений работы методов проведен эксперимент с реальным источником света. Для этого из



**Рис.6** Схема установки: 1 – прецизионный сканер атомно-силового микроскопа, 2 – подвижный столик, 3 – источник света, 4 – держатель источника света с отверстием, 5 – подставка для камеры, 6 – камера, 7 – линза камеры, 8 – матрица камеры

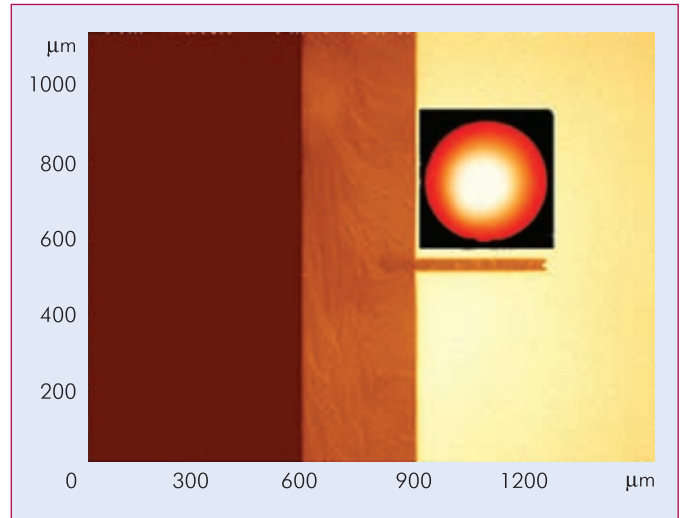


**Рис.7** Схема источника света: 1 – корпус, 2 – источник света, 3 – фольга с отверстием в 300 мкм, 4 – металлическая пластина

светодиода, вебкамеры Deep View F-2sp компании Webbers и подставки атомно-силового микроскопа была сконструирована установка (рис.6) и источник света с диаметром светового пучка ~300 мкм (рис.7).

Движение источника света осуществлялось с помощью пьезокерамической трубки атомно-силового микроскопа и контролировалось при поддержке программы "ФемтоСкан Онлайн".

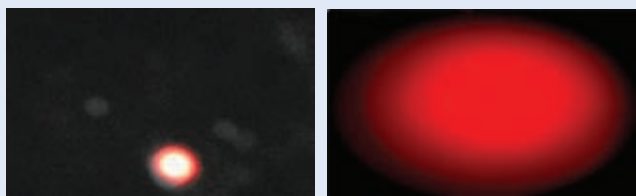
Для определения движения использована программа "ФемтоСкан ВидеоСенс", которая регистрировала смещение по одному из вышеописанных методов.



**Рис.8** Кантилевер с балкой в 350 мкм в вебкамере. Точечный источник света (на черном фоне)

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для калибровки системы в видеокамере наблюдался объект с известными размерами, например, кантилевер (рис.8). Исходя из его "паспортной длины" (350 мкм) и количества точек на матрице камеры (в эксперименте 640×480) определялось расстояние, которое соответствует одному пикселю на матрице. В эксперименте оно равнялось 2,4 мкм. Этот параметр вносился в программу "ФемтоСкан ВидеоСенс".



**Рис.9** Результат обработки видеосигнала: видеосигнал, захваченный камерой (слева); сигнал после обработки (справа)

Затем запускалась программа, "ФемтоСкан ВидеоСенс" которая позволяла захватывать и обрабатывать изображение, получаемое от источника света. Результат обработки видеосигнала представлен на рис.9.

С помощью программы "ФемтоСкан Онлайн" задавались расстояние и частота движения (1 Гц), на которое смещался источник света. Эти значения являлись контрольными при проверке правильности результатов эксперимента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Смещение на 200 нм.

Из рис 10, 11 следует:

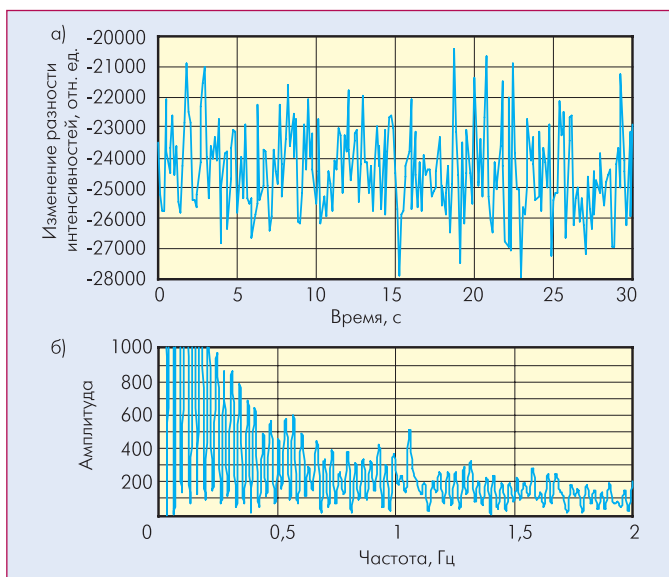
- смещение "центра масс" приблизительно равно 0,2 мкм;
- Фурье-образ разности интенсивностей имеет незначительный пик около 1 Гц, в то время, как график Фурье-образа зависимости смещения "центра масс" от времени имеет пик на частоте 1 Гц.

Можно сделать вывод, что оба метода регистрируют смещение на 200 нм.

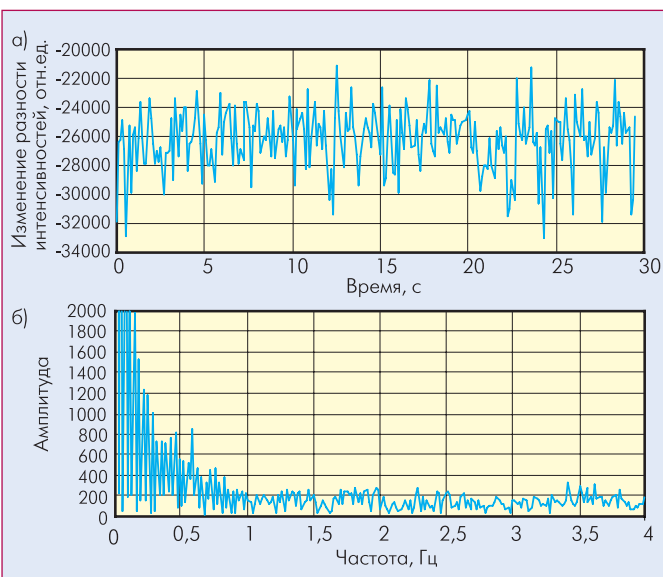
### Смещение на 100 нм.

Из рис 12, 13 следует:

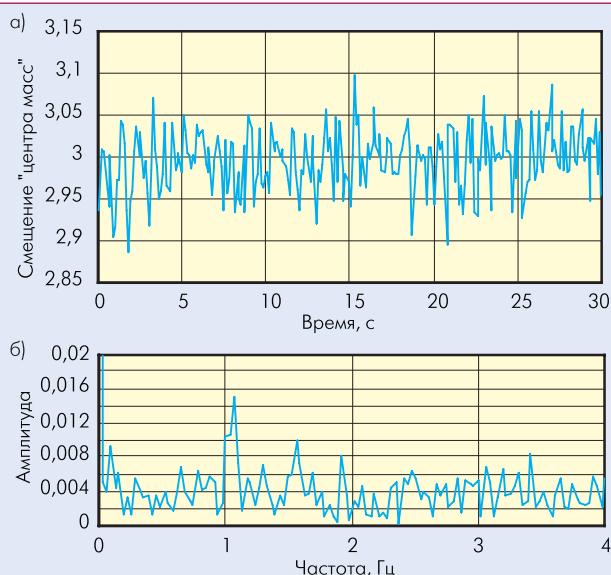
- смещение "центра масс" приблизительно равно 0,1 мкм;
- на графике Фурье-образа зависимости разности интенсив-



**Рис.10** Метод регистрации изменения разности интенсивностей при смещении на 200 нм: а) зависимость разности интенсивностей от времени, б) Фурье-образ зависимости изменения разности интенсивностей



**Рис.12** Результат работы метода регистрации изменения разности интенсивностей при смещении на 100 нм: а) зависимость разности интенсивностей от времени, б) Фурье-образ зависимости изменения разности интенсивностей

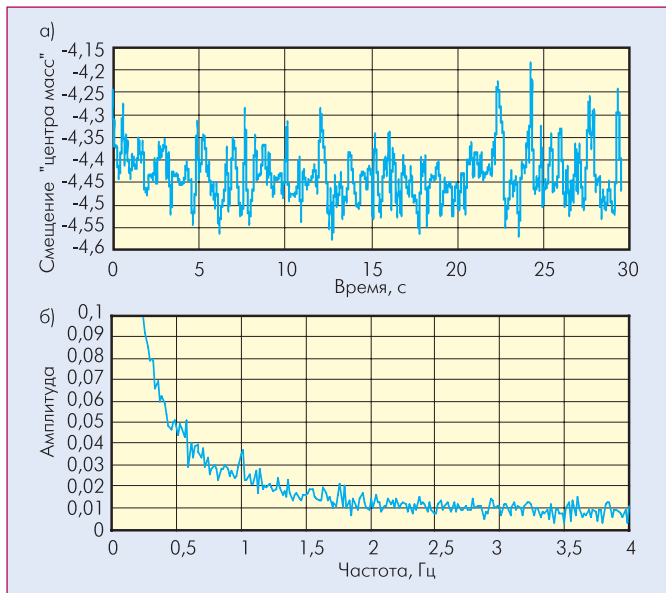


**Рис.11** Метод регистрации смещения "центра масс" при движении на 200 нм: а) зависимость смещения "центра масс" от времени, б) Фурье-образ смещения "центра масс"

ностей от времени сигнал с частотой 1 Гц не выделяется на фоне шумов, в то время, как на графике Фурье-образа смещения "центра масс" присутствует выделяющийся пик на частоте 1 Гц.

Таким образом, метод регистрации смещения "центра масс" оказывается более точным, чем метод разности интенсивностей, и позволяет наблюдать движение на 100 нм.

- Продемонстрировано, что даже при использовании камеры невысокого качества можно достичь регистрации смещения источника света на 100 нм.
- В ходе компьютерного эксперимента установлено, что методы регистрации смещения "центра масс" и изменения разности интенсивностей двух областей позволяют регистрировать смещение с точностью 0,015 от расстоя-



**Рис.13** Результат работы метода регистрации смещения "центра масс" при движении на 100 нм: а) зависимость смещения "центра масс" от времени, б) Фурье-образ зависимости смещения "центра масс"

ния, отображаемого одним пикселем на матрице камеры. При использовании совершенной оптики и качественной камеры это соответствует ~1 нм.

- При наличии шумов метод регистрации смещения "центра масс" более точен.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. **Binnig G., Rohrer H.** Surface imaging by Scanning Tunneling Microscopy. – Ultramicroscopy, 1983, 11, 157–160.
2. **Binnig G., Quate C.F., Gerber C.** Atomic Force Microscopy. – Phys. Rev. Lett., 1986, 56, 930–933 (1986).
3. **Pohl D.W, Denk W. And Lanz M.** Optical stethoscopy: Image recording with resolution  $\lambda/20$ . – Appl. Phys. Lett. 1984, 44, 651–653.
4. **Eric Betzig and Jay K. Trautman.** Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit. – Science, 1992, 257, 189–195.
5. **Betzig E., Finn P.L. and Weiner J.S.** Combined shear force and near-field scanning optical microscopy. – Appl. Phys. Lett 1992, 60, 16.
6. **Willig K.I., Rizzoli S.O., Westphal V., Jahn R., Hell S.W.** STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. – Nature 2006, 440, 935.
7. **Hofmann M., Eggeling C., Jakobs S., Hell S.W.** Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2005, 102, 17565.
8. **Mark Bates W., Bo Huang, Graham T. Dempsey, Xiaowei Zhuang,** Multicolor Super-Resolution Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes. – /Science, 2007, 317, 1749–1753.
9. **Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino,** Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. – Science, 2006, 313, 1642–1645.
10. **Климов А.А., Климов Д.А.,** Трехмерный цветной флуоресцентный микроскоп с разрешением лучше 20нм для объектов в твердых и влажных средах. – Сборник тезисов первой всероссийской школы-семинара "Современные достижения бионаноскопии". – М.: 2007, МГУ, 24.