

## ردیابی سه بعدی تک ذره کلئیدی کروی با استفاده از معادله انتقال شدت

ندیم رضائی<sup>۱</sup>، مصطفی آخته<sup>۱</sup>، احمد درودی<sup>۲</sup>، احسان احدی اخلاقی<sup>۳</sup>، و محمد اولین چهارسوقی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۴۵۱۹۵-۶۶۷۳۱  
<sup>۲</sup> مرکز پژوهشی اپتیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۴۵۱۹۵-۶۶۷۳۱  
<sup>۳</sup> گروه فیزیک، دانشگاه زنجان

چکیده - دستیابی به مشخصه‌های دینامیکی تک ذره در حوزه‌های فیزیک زیستی و فیزیک مواد نرم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مقاله یک روش تجربی نوین برای ردیابی سه بعدی تک ذره کلئیدی کروی با استفاده از میکروسکوپ نوری ارائه شده است. اساس این کار بر پایه پردازش تصویر و همچنین بهره‌گیری از فاز نسبی بازتابی شده از طریق معادله انتقال شدت است. آزمایش‌ها بر روی تک ذرات کروی میکرونی شناور در سیال انجام گرفته است. ابتدا مسیر حرکت سه بعدی در فضا و زمان مشخص شده است. در ادامه سرعت ته‌نشینی ذره و ضرایب پخش در سه بُعد به صورت تجربی اندازه‌گیری شده است. مقایسه نتایج تجربی با مقادیر مورد انتظار نظری نشان از انطباق خوب آن‌ها با یکدیگر دارد.

کلید واژه- ردیابی سه بعدی تک ذره، معادله انتقال شدت، پخش.

## Three-dimensional single particle tracking of spherical colloids using transport of intensity equation

Nadim Rezaei<sup>1</sup>, Mostafa Aakhte<sup>1</sup>, Ahmad Darudi<sup>3</sup>, Ehsan A. Akhlaghi<sup>1,2</sup>, Mohammad A. Charsooghi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan 45137-66731, Iran.

<sup>2</sup> Optics Research Center, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan 45137-66731, Iran.

<sup>3</sup> Physics Department, Zanjan University

Abstract- Finding dynamical characteristics of a single particle has an especial importance in the area of soft and biological physics. This work introduces a new experimental method to track a spherical colloidal particle in three dimension by applying optical microscopy. The work is based on applying image processing methods and using the obtained relative phase from transport of intensity equation (TIE). We applied our method to study a single micron-sized spherical particles floating in the fluid. At first step, we found the coordinates of the particle in three dimension, then we obtained the sedimentation velocity and diffusion coefficients using the experimental data. Comparing the experimental results with theoretical one showed a good coincidence between them.

Keywords: Single particle tracking, Transport of intensity equation, Diffusion.

## ۱- مقدمه

تکنیک ردیابی تک ذره، امکان دستیابی به مشخصات دینامیکی ذره را با دقت قابل ملاحظه‌ای در بازه‌های فضایی میکرومتری و حتی نانومتری فراهم می‌کند. از این‌رو در حوزه‌هایی چون، فیزیک زیستی و فیزیک مواد نرم برای مطالعه مواردی از قبیل فرایند انتقال در سلول‌ها و باکتری‌ها [۱] و برهم کنش بین ذرات کلئیدی [۲] مورد توجه قرار گرفته است. ردیابی ذره در صفحه، نسبتاً ساده است. متداول‌ترین روش برای ردیابی دو بعدی پیدا کردن مرکز جرم ذره برای هر تصویر از فیلم‌های ویدیویی است. میکروسکوپ‌های رایج، قادر به مشخص کردن مسیر حرکت سه بعدی ذره در طول زمان نیستند. اما دستیابی به اطلاعات دقیق از موقعیت ذره و نزدیک‌تر شدن هر چه بیشتر به آن‌چه در واقعیت و در طی فرایندهای زیستی رخ می‌دهد، مستلزم پیدا کردن راه حلی برای ردیابی سه بعدی ذرات میکرونی است. طی دو دهه اخیر روش‌های مختلفی برای حل مشکلات مرتبط با سنجش موقعیت ذره در عمق پیشنهاد شده است، که تمام‌نگاری دیجیتالی [۳] و ردیابی ذرات فلورسانسی [۴] از جمله روش‌های سرآمد در این زمینه هستند. در این مقاله روشی جدید برای ردیابی سه بعدی ذرات میکرونی با استفاده از فاز نسبی بازیابی شده از معادله انتقال شدت (TIE) ارائه شده است.

## ۲- مبانی نظری

TIE روشی غیرتداخلی برای محاسبه فاز نور است. از این‌رو، این روش را می‌توان برای محاسبه توزیع فاز باریکه‌های نیمه‌همدوس نیز به کار برد. تیاگو نشان داد که اگر توزیع شدت برای دو صفحه نزدیک به هم که عمود بر راستای انتشار موج‌اند محاسبه شوند، با نوشتن معادله هلمهلتز، می‌توان فاز را از معادله انتقال شدت،

$$-k \frac{\partial I(\mathbf{r}_T, z)}{\partial z} = \nabla_T \cdot (I(\mathbf{r}_T, z) \nabla_T \phi(\mathbf{r}_T, z)) \quad (1)$$

به دست آورد. که در آن  $\nabla_T^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2}$ ،  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$

عدد موج،  $I(\mathbf{r}_T, z)$  و  $\phi(\mathbf{r}_T, z)$  هم به ترتیب شدت و فاز موج منتشر شده‌اند. تیاگو با جایگزین کردن میدان اسکالر پیوسته  $\nabla_T \psi(\mathbf{r}_T, z)$  به جای  $I(\mathbf{r}_T, z) \nabla_T \phi(\mathbf{r}_T, z)$ ، معادله TIE را به صورت یک معادله پواسون درآورد و به کمک تابع گرین فاز را محاسبه کرد [۵]. در این مقاله برای حل

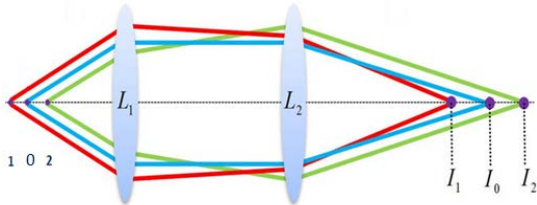
معادله TIE از روش بازیابی تقریبی فاز به کمک تبدیل فوریه دو بعدی استفاده شده است که آلن و همکارانش فاز را به صورت،

$$\phi(\mathbf{r}_T, z) = -F^{-1} k_r^{-2} F \nabla_T \cdot [I^{-1}(\mathbf{r}_T, z) \nabla_T \psi(\mathbf{r}_T, z)] \quad (2)$$

به دست آوردند [۶]. که در آن  $F$  و  $F^{-1}$  به ترتیب عملگرهای تبدیل فوریه و تبدیل فوریه معکوس‌اند. همچنین  $k_r^2 = k_x^2 + k_y^2$  است که  $k_x$  و  $k_y$  به ترتیب مولفه‌های فضای فوریه معادل در فضای  $x$  و  $y$  هستند.

## ۳- چیدمان آزمایش

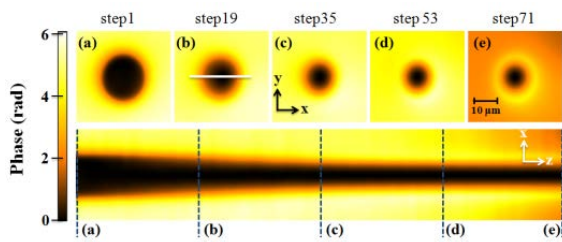
اگر چیدمانی میکروسکوپی را به صورت شکل ۱ متصور شود که در آن نقاط بنفش رنگ در سمت چپ نمایانگر حضور ذره در عمق‌های مختلف،  $L_1$  عدسی شیئی و  $L_2$  عدسی تصویری ساز و نقاط بنفش رنگ سمت راست نیز نمایانگر تصویر ذره به ازای عمق‌های مختلف است. فرض کنید ذره‌ای وجود دارد که حد فاصل نقطه ۱ تا نقطه ۲ را طی می‌کند. دو CCD هم در نقاط  $I_1$  و  $I_2$  قرار دارند که می‌توانند شدت نور عبوری از ذره را در عمق‌های مختلف به طور همزمان ثبت کنند. به این ترتیب، با حل معادله انتقال شدت می‌توان فاز نسبی ناشی از حضور ذره را برای هر یک از گام‌های حرکتی ذره در محل بین دو توزیع شدت  $I_1$  و  $I_2$  یعنی نقطه  $I_0$  به دست آورد.



شکل ۱: طرح‌واره‌ای از چیدمانی میکروسکوپی را نمایش می‌دهد که در آن با هر بار جابه‌جایی ذره بنفش رنگ بین نقاط ۱ و ۲ طرح شدتی متفاوتی توسط دو CCD در محل  $I_1$  و  $I_2$  ثبت می‌شود.

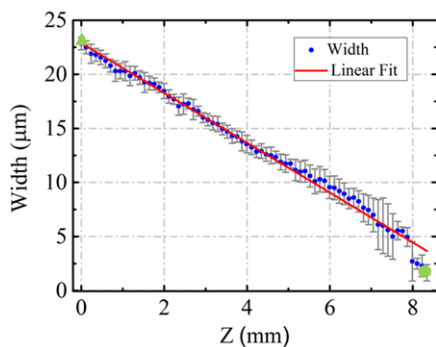
شکل ۲: تصویری شماتیک از چیدمان آزمایش را نمایش می‌دهد. تمامی آزمایش‌ها توسط میکروسکوپ نوری وارون، محصول شرکت Olympus مدل IX-71 صورت گرفته است. نور سفید منبع، پس از عبور از یک فیلتر سبز با طول موج عبوری  $550 \pm 30$  وارد چکالنده نور می‌شود. سپس نور عبوری از ذره به عدسی شیئی می‌رسد. همچنین قبل از خروجی میکروسکوپ، عدسی تصویرساز قرار گرفته است. برای این‌که بتوانیم دو تصویر همزمان از ذره داشته باشیم یک قطعه اپتومکانیکی به خروجی میکروسکوپ متصل می‌شود. در وسط این قطعه از یک باریکه‌شکن استفاده شده

شکل ۴). در صورتی که برای تمامی فازهای به دست آمده در عمق‌های مختلف، یک برش عرضی پیوسته در امتداد محور  $x$  و از مرکز آن برداریم، تصویری به صورت قسمت پایینی شکل ۴ به وجود می‌آید. در این صورت مشاهده می‌شود که با سقوط ذره، توزیع پهنای فاز محاسبه شده کاهش می‌یابد. این پهنای در محل نصف ارتفاع اندازه‌گیری شده است.



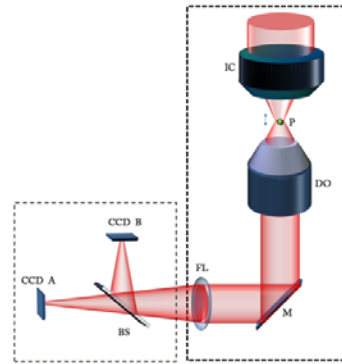
شکل ۴: قسمت بالایی شکل، فاز بازیابی شده معادل برای تصاویر شدتی شکل ۳ است. قسمت پایینی شکل، یک برش عرضی پیوسته در امتداد محور  $x$  و از مرکز آن برای تمامی فازهای بدست آمده در عمق‌های مختلف است.

شکل ۵ رفتار پهنای توزیع فاز ذره را بر حسب  $Z$  که حاصل میانگین‌گیری از ۱۰ سری داده آزمایشگاهی است، نمایش می‌دهد. نتایج به دست آمده بیانگر این است که بیشینه پهنای فاز نسبی همواره محلی است که تصویر ذره در کانون تصویرساز CCD A قرار دارد و کمینه آن محلی است که تصویر ذره در کانون تصویرساز CCD B قرار دارد. با تقریب خوبی به این داده‌های تجربی می‌توان یک خط برازش کرد.



شکل ۵: نمودار پهنای فاز نسبی بر حسب  $Z$ . خطای آزمایش نیز از انحراف از معیار حاصل از ۱۰ سری آزمایش مشابه محاسبه شده است. در مرحله بعدی آزمایشی مشابه برای ذره‌ای با شعاع ۱۰ میکرون و شناور در سیال ترتیب داده شد. افت‌وخیز تک ذره کروی، در حد فاصل کانون تصویرساز دو CCD با سرعت شش عکس در ثانیه ثبت شده است. استفاده همزمان از دو CCD باعث محدود شدن سرعت تصویربرداری شده است. شکل ۶ نمودار تغییرات پهنای

است که نور خروجی از میکروسکوپ را با نسبت شدت ۵۰:۵۰ به سمت CCDهای  $A$  و  $B$  که در راستای عمود بر هم قرار گرفته‌اند، ارسال می‌کند. فاصله CCDها از باریکه‌شکن  $z$  و  $z + \delta z$  در نظر گرفته شد که  $\delta z$  برابر ۸/۳۵ بود.

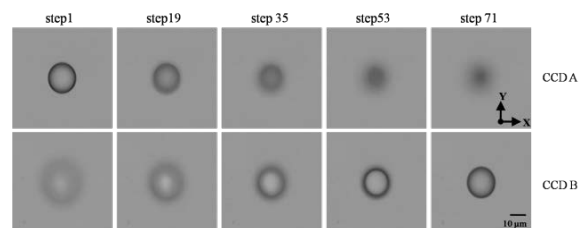


TIE imaging apparatus Microscope IX-71

شکل ۲: تصویری کلی از چیدمان آزمایش.

#### ۴- فرایند ردیابی سه بعدی

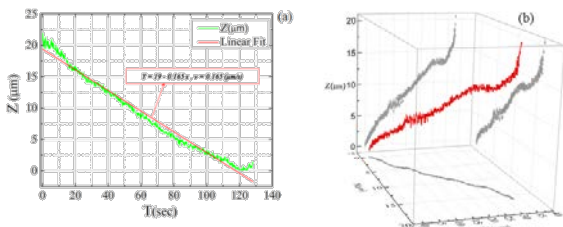
برای شناخت رفتار تغییرات توزیع فاز ناشی از حضور ذره در محل بین دو CCD ابتدا آزمایشی برای ذره‌ای چسبیده به لامل با شعاع ۱۰ میکرون تدارک داده شد. ذرات درون محفظه‌ای که حاوی سیالی چند ده میکرولیتری قرار دارند. با توجه به اندازه ذرات از عدسی شیئی  $20\times$  استفاده شد. عدسی شیئی  $20\times$  مدل Olympus به گونه‌ای روی ذره تنظیم می‌شود که تصویر ذره در کانون تصویرساز CCD نزدیک‌تر قرار گیرد (گام اول از CCD A در شکل ۳). به کمک پیچ نانومتری تعبیه شده روی میکروسکوپ، در هر مرحله با گام  $20 \pm 280$  نانومتری عدسی شیئی به ذره نزدیک شده و تصاویر مربوطه ثبت شده است (شکل ۳).



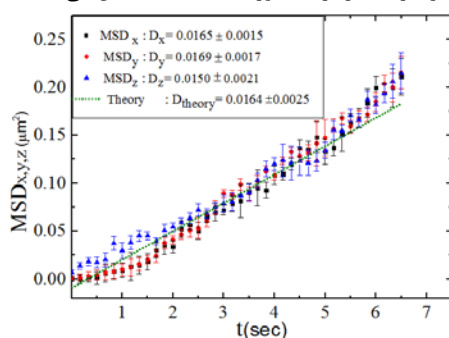
شکل ۳: تصاویر شدتی ثبت شده توسط دو CCD در صفحه  $(x, y)$ .

این کار تا جایی که تصویر ذره در کانون تصویرساز CCD قرار گیرد، ادامه می‌یابد. انجام این فرایند مشابه سقوط واقعی ذره در حد فاصل بین دو CCD در فضای تصویرساز است. اگر معادله (۲) را برای هر یک از جفت شدت‌های به دست آمده از دو CCD حل شود، می‌توان فاز مربوط به ذره را در صفحه بین دو CCD محاسبه کرد (سطر اول

پارامترهای مختلف مشخص شد که پهنای فاز در محل نصف قله، رابطه‌ای خطی با عمق دارد. به این ترتیب روشی برای تعیین عمق ذرات کلئیدی ارائه شد.



شکل ۷: نمودار افت و خیز گرمایی ذره در راستای Z و بر حسب زمان (a). مسیر حرکت ذره را به صورت سه بعدی نمایش می‌دهد (b).



شکل ۸: نمودار میانگین مجذور جابه‌جایی‌ها برای مختصات x، y و z بر حسب زمان.

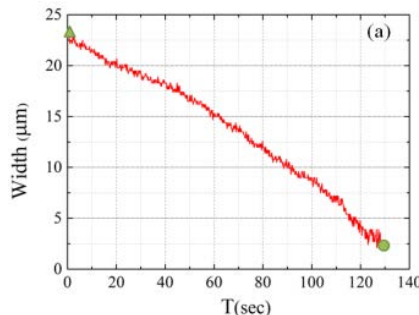
برای تأیید صحت این روش و همچنین بررسی عملکرد آن در تحلیل دینامیک ذرات کلئیدی، سرعت ته‌نشینی و حرکت پخشی ذره کلئیدی ۱۰ میکرونی، مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در متن اشاره شده است سرعت ته‌نشینی با مقادیر نظری تطابق خوبی دارد و همچنین مطابق با نمودارهای شکل ۸ ضرایب پخش در سه بعد بر پیش‌بینی‌های نظری منطبق هستند.

## مراجع

- [1] Saxton, Michael J., et al. "Single-particle tracking: applications to membrane dynamics." *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 26.1 (1997): 373-399.
- [2] Crocker, John C., et al. "Methods of digital video microscopy for colloidal studies." *Journal of colloid and interface science* 179.1 (1996): 298-310.
- [3] Lee, Sang-Hyuk, et al. "Characterizing and tracking single colloidal particles with video holographic microscopy." *Optics Express* 15.26 (2007): 18275-18282.
- [4] Speidel, Michael, et al. "Three-dimensional tracking of fluorescent nanoparticles with subnanometer precision by use of off-focus imaging." *Optics letters* 28.2 (2003): 69-71.
- [5] Reed Teague, Michael. "Deterministic phase retrieval: a Green's function solution." *JOSA* 73.11 (1983): 1434-1441.
- [6] Allen, L. J., and M. P. Oxley. "Phase retrieval from series of images obtained by defocus variation." *Optics communications* 199.1 (2001): 65-75.
- [7] Allen, L. J., and M. P. Oxley. "Phase retrieval from series of images obtained by defocus variation." *Optics communications* 199.1 (2001): 65-75.

[۸] محمد اولین چهارسوقی، حمیدرضا خالصی‌فرد و رامین گلستانیان، ردیاب اتوماتیک دو بُعدی ذرات کلئیدی در میکروسکوپ نوری، شانزدهمین کنفرانس انجمن اپتیک و فوتونیک ایران، دانشگاه یزد، بهمن ۱۳۸۸.

توزیع فاز را بر حسب زمان نمایش می‌دهد. با توجه به رابطه خطی بین پهنای توزیع فاز و عمق که در قسمت قبل به دست آمد، می‌توان تغییرات Z در فضای تصویرسازی را بر حسب زمان تعیین کرد.



شکل ۶: نمودار پهنای توزیع فاز ذره برای ۱۰ میکرونی شناور در سیالی با دمای ۱۵ درجه سانتیگراد بر حسب زمان.

با استفاده از روابط تصویرسازی به سادگی می‌توان Z معادل را در فضای جسم به دست آورد (شکل ۷(a)). آغاز و پایان این نمودار به ترتیب منطبق بر مشاهده ذره در CCD اول و دوم است. شیب خط برازش شده به این نمودار که بیانگر سرعت ته‌نشینی ذره است برابر با  $0.005 \mu\text{m}/\text{s}$  به دست آمده است که به طور نظری انتظار می‌رود  $0.165 \mu\text{m}/\text{s}$  به دست آید. سرعت ته‌نشینی ذره  $0.167 \pm 0.002 \mu\text{m}/\text{s}$  به دست آید. اکنون با به دست آمدن موقعیت ذره در راستای Z و محاسبه موقعیت عرضی آن در صفحه با استفاده از تکنیک پردازش تصویر و از روش مرکز جرم (شدت) که در آن با استفاده از آستانه شدت تصویر حاصل تبدیل به یک تصویر منطقی شده و مرکز پیکسل‌ها تعیین می‌شود [۸] می‌توان نمودار مسیر حرکت سه بعدی ذره در طول زمان را به صورت شکل ۷(b) نمایش داد. برای محاسبه تجربی ضریب پخش از رابطه  $MSD(r_i) = 2D_i T$  استفاده شد. که در آن  $D_i$  ضریب پخش و T دمای سیال است. شکل ۸ نمودار میانگین مجذور جابه‌جایی‌ها را در هر سه راستای فضایی بر حسب زمان نمایش می‌دهد. شیب این نمودارها متناسب با ضریب پخش است. مقادیر به دست آمده برای ضرایب پخش حاکی از مطابقت و نزدیکی مقادیر پخش تجربی و تئوری دارد.

## ۵- نتیجه‌گیری

در این مقاله با به کارگیری همزمان دو CCD و تحلیل شدت‌های ثبت شده، با استفاده از معادله انتقال شدت فاز جسم در عمق‌های مختلف اندازه‌گیری شد. با بررسی