

# 一种基于大范围扫描离子电导显微镜的 形貌和体积测量方法

郭仁飞, 庄 健, 于德弘

(西安交通大学机械工程学院, 陕西西安 710049)

**摘 要:** 针对现有测量方法不能同时实现大尺寸样品表面的总体和局部形貌的三维高分辨率测量以及体积计算的不足, 提出了一种形貌和体积测量方法. 本文首先构建了大范围扫描离子电导显微镜 (Large-scale Scanning Ion Conductance Microscopy, L-SICM) 系统, 并利用数据拼接技术来扩展现有 SICM 系统的水平测量范围, 从而实现样品形貌的大范围三维高分辨率测量, 最后结合背景移除等数字图像处理技术来计算目标对象的体积. 对亚毫米级样品的实验结果表明, 基于 L-SICM 的测量方法可以有效完成大尺寸样品的总体和局部形貌的三维高分辨率测量及体积计算, 且避免由光学测量方法引入的非线性误差. 另外, 采用更小的水平扫描步距 (125 nm) 可以减小 5.82% 的体积测量误差和 38.12% 的测量标准差, 从而提高了系统测量的准确性和稳定性.

**关键词:** 形貌和体积测量; 扫描离子电导显微镜; 大范围; 数据拼接

**中图分类号:** P204; TH742

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0372-2112 (2017)05-1072-06

**电子学报 URL:** <http://www.ejournal.org.cn>

**DOI:** 10.3969/j.issn.0372-2112.2017.05.007

## Topography and Volume Measurement Method Based on Large-scale Scanning Ion Conductance Microscopy

GUO Ren-fei, ZHUANG Jian, YU De-hong

(School of Mechanical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China)

**Abstract:** A topography and volume measurement method is proposed to deal with the drawbacks of existing methods that they cannot simultaneously finish measuring the global and local morphologies of large-scale sample surface and volume calculation in a three-dimensional (3D) and high-resolution way. The large-scale scanning ion conductance microscopy (L-SICM) system was firstly built and the data stitching technique was used to extend the lateral measurement range of the existing SICM system, thus the large-scale, 3D and high-resolution measurement result of the sample morphology can be obtained. Finally, digital image processing techniques such as subtracting background were utilized to accurately calculate the volume of the target object. Experimental results on sub-mm level sample indicate that the L-SICM based measurement method can effectively measure the global and local morphologies of large-scale sample in a 3D and high-resolution way and accomplish calculating the target volume and avoiding the nonlinear errors introduced by the optical measurement methods. Moreover, using smaller lateral scanning step (125 nm) can decrease the volumetric measurement error by 5.82% and the standard deviation of volume measurement by 38.12%, therefore improving the accuracy and stability of the measurement system.

**Key words:** topography and volume measurement; scanning ion conductance microscopy; large-scale; data stitching

## 1 引言

形貌和体积测量在科学研究中的应用十分广泛, 例如工程材料表面形貌的三维表征, 基于形貌表征的

发动机磨损与故障诊断, 以及基于体积测量的活细胞功能及病理学研究等. 通常对形貌和体积测量方法有以下要求: (1) 具有较高的测量分辨率 (亚微米以下) 和准确性. (2) 具有足够的测量范围以适应不同尺寸的样

品。(3)尽量减小测量过程对样品形貌的影响或损坏。(4)对样品的预处理要求简单且易于操作。(5)测量结果直观、易于理解。

显微镜技术是目前最常用的微观形貌测量方法,但是常用的几种显微镜都不能完全满足上述要求。荧光显微镜<sup>[1]</sup>因采用荧光染料而产生光致漂白效应(Photo-bleaching)会直接影响测量的准确性,且激发光源可能对样品表面造成光线损害;激光共聚焦显微镜<sup>[2]</sup>受到物镜数值孔径和激发光波长的限制,其测量分辨率较低,且不能准确测量局部坡度较大的表面;基于相移技术的数字全息显微镜<sup>[3]</sup>需要采用复杂的相提取算法来获得高度信息,测量结果不易于理解,且样品表面的反射/折射率会影响测量的准确性;电子显微镜<sup>[4,5]</sup>常常需要对样品进行固化、脱水、染色等复杂的预处理,使样品表面产生微观变形或损坏;原子力显微镜<sup>[6,7]</sup>常用的轻敲模式会使样品表面产生微观变形,并使测量结果的解释变得复杂。扫描离子电导显微镜(Scanning Ion Conductance Microscopy, SICM)<sup>[8,9]</sup>是一种可以在液态环境下直接对样品表面进行非接触、高分辨率三维测量的形貌测量方法。但是,传统 SICM 与上述高分辨率测量方法有一个共同的缺点,即水平测量范围有限。传统 SICM 的水平测量范围为  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ,严重限制了 SICM 在大尺寸(超过传统 SICM 水平测量范围)样品的形貌和体积测量中的应用。因此本文基于数据拼接和数字图像处理技术,构建了一种大范围扫描离子电导显微镜系统(L-SICM)。该方法解除了传统 SICM 系统在成像范围上的约束,允许同时实现大尺寸样品的总体和局部形貌的三维定量测量和体积计算。

## 2 L-SICM 系统

### 2.1 系统组成及工作流程

图 1 为 L-SICM 系统的组成示意图。单幅图像的精确测量由分别安装在水平方向上的 XY 压电陶瓷(P621. 2CL, PI, Germany)和安装在垂直方向上的 Z 压电陶瓷(P621. ZCL, PI, Germany)来协作完成。各方向上压电陶瓷的行程均为  $100\ \mu\text{m}$ 。为了实现水平方向上的大范围测量并便于将扫描探头粗略定位到感兴趣的样品区域,将 XY 压电陶瓷、Z 向压电陶瓷分别安装在 XY 向微电机和 Z 向微电机上。微电机(型号均为 M111. 1DG, PI, Germany)的行程均为  $15\ \text{mm}$ ,且单向重复性定位精度为  $0.1\ \mu\text{m}$ ,满足大范围测量的使用需求。

L-SICM 用于形貌和体积测量的具体工作流程如图 2 所示。主要包括扫描参数设置,单幅图像扫描与保存数据,数据拼接,以及数据后处理等四个阶段。

扫描参数分为大范围扫描参数和单幅扫描参数两种。大范围扫描参数主要通过设定进行单幅扫描的总

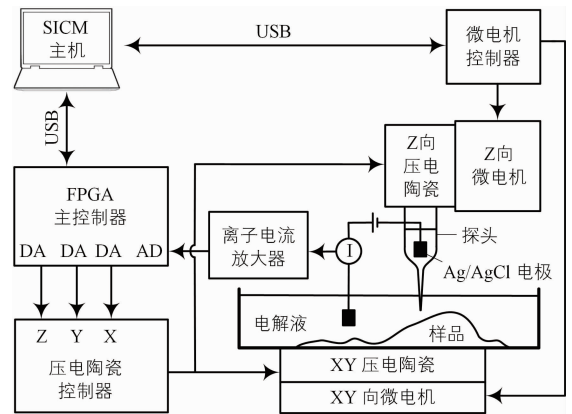


图1 L-SICM系统

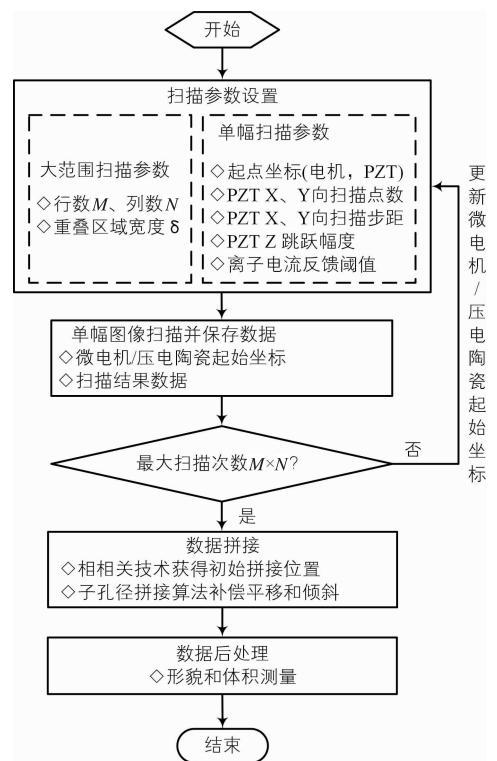


图2 基于L-SICM的形貌和体积测量流程

次数(行数  $M \times$  列数  $N$ )来确定总体扫描范围,并通过设定相邻图像间的重叠区域宽度  $\delta$  来保障后续数据拼接的可靠性。单幅扫描参数主要有单幅扫描范围(行数  $m \times$  列数  $n$  和水平扫描步距),压电陶瓷在 Z 向的跳跃幅度,探头的进给/提升速度,以及离子电流的反馈阈值等。扫描参数设定完毕后,SICM 系统会循环调用单幅图像扫描程序来完成扫描并保存数据,直至达到设定的最大扫描次数。在数据拼接阶段,以前面保存的微电机和压电陶瓷的起点坐标为参考拼接位置,利用基于傅里叶逆变换的相相关技术<sup>[10]</sup>获得测量结果的初始拼接位置,然后利用基于最小二乘优化的子孔径拼接算法<sup>[11]</sup>,以均方根误差之和最小化为准则补偿图像间的

平移和倾斜,最终实现测量数据的最优拼接.本文实验中采用方形子孔径代替原算法的椭圆形子孔径,即以每幅测得的 SICM 图像作为子孔径,其余参数均采用默认参数值.而在数据后处理阶段,则利用数字图像处理技术对测得的形貌数据进行分析并完成目标对象的体积计算.

## 2.2 形貌分析和体积计算

在利用上述 L-SICM 系统直接测得大尺寸样品表面形貌的三维测量结果后,需要利用数字图像处理技术来分析和计算感兴趣的目标对象的形貌和体积.如图 3 所示,形貌分析和体积计算的具体步骤如下:

(1)背景移除.由于样品在测量时可能处于倾斜状态,或者目标对象本身附着在曲面上,因此如果直接以测得的高度数据进行计算则会计入由样品放置状态或目标对象基底曲面引入的额外体积,如图 3(a)所示.本文采

用基于‘滚动球体’(rolling ball)<sup>[12]</sup>的背景移除技术来解决这一问题.原理是利用给定半径的球体沿测得形貌的底面滚动,则将球面顶点的运动轨迹所形成的曲面作为测得图像的背景从测量数据中移除,如图 3(b)所示.滚动球体的半径取值一般要远大于测得图像中目标对象的最大尺寸,以充分保留目标对象的有效数据.

(2)目标对象提取.通过对测得的图像进行阈值化处理以获得目标对象的边界,如图 3(c)所示.

(3)形貌分析和体积计算.将目标对象轮廓之外的所有数据清零,仅保留目标对象的有效数据,如图 3(d)所示.通过对所有像素点的高度值进行累加,然后乘以单个像素的面积(取决于 SICM 的水平扫描步距)即可得到目标对象的体积值.对目标对象的形貌分析则可以通过对剖面属性或者像素间的位置关系的分析和计算来获得.

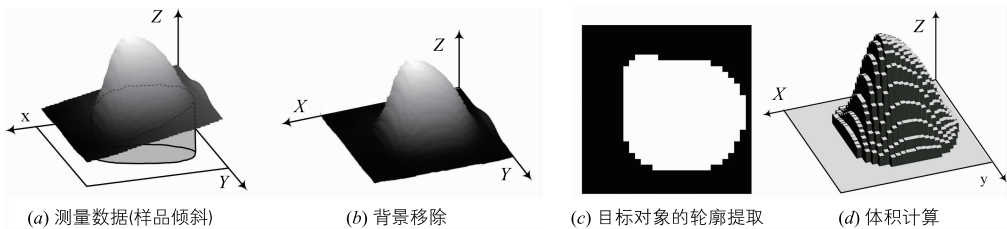


图3 形貌分析和体积计算步骤

## 3 实验验证及分析

### 3.1 微透镜形貌测量实验

首先为了验证 L-SICM 系统的有效性,利用自行构建的 L-SICM 实验平台对具有微透镜阵列结构的样品表面进行了形貌测量.样品利用平版印刷技术<sup>[13]</sup>加工制成,材料为聚二甲基硅氧烷(PDMS).L-SICM 对样品的预处理要求十分简单,只需用超纯水进行简单清洗,然后放入浓度为 0.1 M/L 的氯化钾水溶液中便可直接进行形貌测量.

图 4(a)为利用 L-SICM 系统的单幅扫描程序进行连续扫描获得的序列图像(2×3),相邻图像间的重叠区域宽度均设定为 10 μm;单幅图像的尺寸为 100 μm×100 μm,扫描点数为 500×500.由图 4(a)的测量结果可见,由于单个微透镜的总体尺寸大于传统 SICM 的测量范围(100 μm×100 μm),因此单幅扫描程序不能测得微透镜的总体形貌.图 4(b)为图 4(a)的序列图像经过数据拼接后获得的大范围三维测量结果,图 4(c)为图 4(b)的俯视图,而图 4(d)为图 4(c)中虚线处的剖面属性图.由图 4(b)可知,L-SICM 可以成功实现微透镜样品总体形貌的三维测量,总体测量范围达到 300 μm×200 μm.图 4(a)与图 4(b)的对比充分说明了 L-SICM 在大尺寸样品三维形貌测量方面的重要性.基

于 L-SICM 的测量方法弥补了传统 SICM 水平测量范围有限的不足<sup>[14]</sup>,可以在保持高分辨率成像的同时实现样品表面总体和局部形貌的三维定量测量.从图 4(d)的剖面属性可以看到数据拼接效果较好,没有明显的拼接误差.通过对上述 L-SICM 的测量结果依次进行背景移除和目标轮廓提取后,可以计算出单个微透镜的体积值为  $1.87E+5 \mu\text{m}^3$ .

上述实验表明,本文提出的基于 L-SICM 的形貌和体积测量方法可以有效扩展传统 SICM 的测量范围,同时实现大尺寸样品的总体和局部形貌的三维高分辨率测量以及体积计算.基于光学测量原理的测量方法通常具有测量速度快的优点,但光学衍射极限限制了这些方法的测量精度.而本文提出的 L-SICM 基于非光学的测量原理,因而可以有效避免光学衍射极限对测量精度的影响<sup>[15]</sup>,但其测量速度一般比光学测量方法要慢.因此,本文提出的基于 L-SICM 的测量方法与光学测量方法可以在性能上实现优势互补,从而更好地满足大尺寸样品在三维高分辨率测量方面的应用需求.例如,可以首先利用光学测量方法来快速定位感兴趣的样品区域,然后采用本文提出的 L-SICM 进行进一步的大范围高分辨率测量.总之,本文提出的基于 L-SICM 的测量方法是对已有三维形貌测量方法的重要补充,且其非接触、非光学的测量原理有助于提高形貌和体

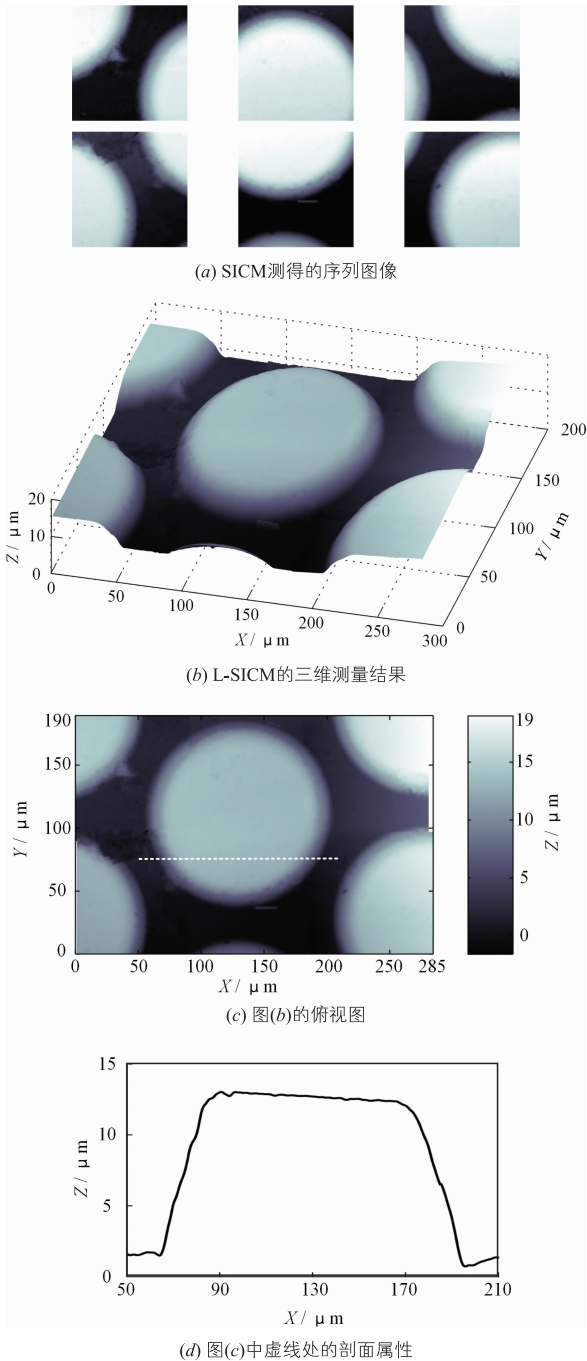


图4 微透镜样品的大范围形貌测量

积测量的准确性.

### 3.2 “Xi’an”字符串的形貌及体积测量

为了进一步验证 L-SICM 在形貌和体积测量方面的有效性,对由 PDMS 压印的具有“Xi’an”字符串阵列的样品表面进行了形貌测量和体积计算. 图 5(a)为循环调用 L-SICM 系统的单幅扫描程序获得的序列图像(2×6),单幅图像的扫描点数均为 144×144,水平扫描步距设定为 625nm. 相邻图像的重叠区域宽度设定为 20μm;图 5(b)为图 5(a)的序列图像经过数据拼接后

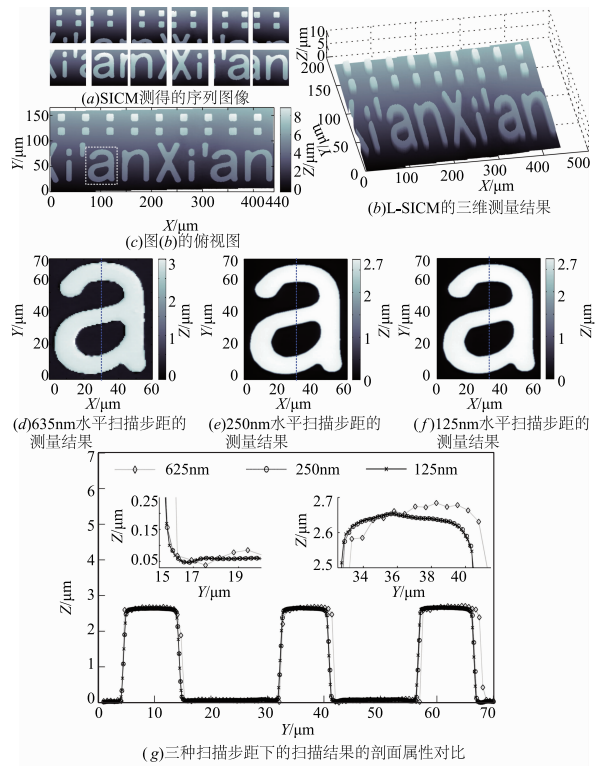


图5 “Xi’an”字符串的形貌测量

获得的大范围测量结果的三维视图,而图 5(c)为图 5(b)的俯视图. 图 5(d)~图 5(f)分别为采用同一探头(尖端开口半径约为 50nm)但以不同的扫描步距(625nm,250nm,125nm)对图 5(c)中虚线框指示的字符 a 进行三维高分辨率形貌测量的结果. 三种扫描步距下的扫描结果的剖面属性对比如图 5(g)所示.

由图 5(b)可见,L-SICM 可以有效实现“Xi’an”字符串的总体形貌的三维测量,且从图 5(b)中很难看出相邻图像间的拼接痕迹. 这说明数据拼接误差较小,拼接效果良好. 而传统的基于光学测量原理的大范围测量方法,例如共聚焦显微镜则会因光照强度不均匀而导致相邻图像间存在非线性的强度差异,因此必须设计复杂的融合算法来减小拼接误差<sup>[10]</sup>. 而本文采用的基于 L-SICM 的测量方法由于测量过程与光无关,因此可以避免由光学因素引入的非线性误差,使后续数据处理更加简单且有助于减小拼接误差. 由图 5(d)~5(f)三种扫描步距下的形貌对比可见,在相同的测量条件下,采用 625nm 扫描步距的测量结果在字母‘a’的边缘处很不光滑(存在明显的锯齿状特征);而采用更小的扫描步距(250nm 和 125nm)则可以获得边缘更光滑且具有更多形貌细节的测量结果,但 250nm 扫描步距和 125nm 扫描步距的扫描结果在外观上差异不大. 图 5(g)中三处剖面属性的局部放大视图再次印证了上述观察结果. 另外还可以发现,采用 625nm 扫描步距获得

的水平方向的特征尺寸一般比采用 250nm 和 125nm 步距的要大一些. 这主要是由于增大扫描步距导致测量分辨率降低引起的. 而采用 250nm 步距的测量结果的剖面轮廓与 125nm 的对应结果总体上保持一致, 仅在字母‘a’的边缘处由于形貌高度的急剧变化和扫描步距的不同而产生可辨别的较小差异. 这说明较小的扫描步距有助于更准确地测量高度急剧变化区域的形貌信息. 按照前述体积计算方法对三种扫描步距下的 10 次测量结果依次进行背景移除、提取目标对象(字母 a)并计算体积, 其统计结果如表 1 所示.

表 1 三种扫描步距下的体积测量结果对比

序号	625 nm 步距的体积计算值( $\mu\text{m}^3$ )	250 nm 步距的体积计算值( $\mu\text{m}^3$ )	125 nm 步距的体积计算值( $\mu\text{m}^3$ )
1	5417.01	5167.24	5190.02
2	5564.67	5209.11	5063.88
3	5049.44	4951.18	4934.81
4	5227.90	5113.07	5045.4
5	5593.54	5217.35	5156.11
6	5392.40	5159.98	5028.21
7	5232.05	5114.26	5047.81
8	5218.20	5110.31	5036.4
9	5392.78	5160.09	5013.29
10	5614.44	5191.65	5062.39
体积均值	5370.24	5139.42	5057.83
标准差	$\pm 187.34$	$\pm 76.660$	$\pm 71.41$

由表 1 的体积测量结果可知, 总体上, 体积测量均值随着扫描步距的减小而减小. 若以 625nm 步距的体积测量均值为参考, 则采用 250nm 和 125nm 的水平扫描步距分别可以减小 4.30%、5.82% 的体积测量误差. 这与图 5(g) 中观察到的现象是相符的, 说明虽然采用较大的扫描步距可以减少扫描工作量, 但这也明显降低体积测量的准确性. 但是也要注意, 由于实验样品的表面形貌变化比较简单, 250nm 和 125nm 步距下测得的体积均值的差值并不大, 仅为 250nm 步距时体积均值的 1.59%. 这说明虽然采用较小的扫描步距有助于获得更精确的测量结果, 但还应该根据样品表面形貌的复杂程度和具体应用需求来综合选取合适的扫描步距. 另外还可以发现, 采用较小的扫描步距的体积测量结果的标准差也较小. 例如, 125nm 步距下体积测量的标准差仅为 625nm 步距下的标准差的 38.12%, 这说明采用较小的扫描步距还有助于提高 SICM 系统的测量稳定性.

## 4 结论

本文提出了一种基于大范围扫描离子电导显微镜

(L-SICM) 的表面形貌和体积的测量方法. 基于数据拼接和数字图像处理技术的 L-SICM 克服了传统 SICM 在水平方向测量范围不足(仅  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ) 的缺点, 可以同时实现大尺寸(亚毫米级)样品表面的总体和局部形貌的三维高分辨率测量以及目标对象的体积计算. 非接触、非光学的测量原理使 L-SICM 可以最小化测量过程对样品形貌的影响, 并避免由仪器干扰或光强不均匀引起的非线性测量误差且使后续数据拼接过程更加简单. 而通过采用更小的水平扫描步距, 则可以进一步提高测量的准确性和稳定性. 对亚毫米级样品的测量实验验证了本文所提出的测量方法的有效性, 为大尺寸样品的表面形貌分析和体积测量提供了一种新的解决方案.

## 参考文献

- [1] Allansson L, Khatibi S, Gustavsson T, et al. Single-cell volume estimation by three-dimensional wide-field microscopy applied to astroglial primary cultures[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1999, 93(1): 1–11.
- [2] Gray J D, Kolesik P, Hoj P B, et al. Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue[J]. *Plant Journal*, 1999, 19(2): 229–236.
- [3] Khmaladze A, Matz R L, Epstein T, et al. Cell volume changes during apoptosis monitored in real time using digital holographic microscopy[J]. *Journal of Structural Biology*, 2012, 178(3): 270–278.
- [4] Briggman K L, Bock D D. Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2012, 22(1): 154–161.
- [5] Hua Y, Laserstein P, Helmstaedter M. Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics[J]. *Nature Communications*, 2015, Article number: 6(7923).
- [6] Jiao Y, Schaffer T E. Accurate height and volume measurements on soft samples with the atomic force microscope[J]. *Langmuir*, 2004, 20(23): 10038–10045.
- [7] Schneider S W, Larmer J, Henderson R M, et al. Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy[J]. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 1998, 435(3): 362–367.
- [8] Hansma P K, Drake B, Marti O, et al. The scanning ion-conductance microscope[J]. *Science*, 1989, 243(4891): 641–643.
- [9] Korchev Y E, Gorelik J, Lab M J, et al. Cell volume measurement using scanning ion conductance microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2000, 78(1): 451–457.

- [10] Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11):1463–1465.
- [11] Zhao Z, Zhao H, Gu F, et al. Non-null testing for aspheric surfaces using elliptical sub-aperture stitching technique [J]. *Optics Express*, 2014, 22(5):5512–5521.
- [12] Sternberg S R. Biomedical image processing[J]. *Computer*, 1983, 1(16):22–34.
- [13] Ye X, Ding Y, Duan Y, et al. Room-temperature capillary-imprint lithography for making micro-nanostructures in large areas[J]. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 2010, 28(1):138–142.
- [14] Novak P, Li C, Shevchuk A I, et al. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(4):279–281.
- [15] Ushiki T, Nakajima M, Choi M, et al. Scanning ion conductance microscopy for imaging biological samples in liquid: A comparative study with atomic force microscopy and scanning electron microscopy [J]. *Micron*, 2012, 43(12):1390–1398.

## 作者简介



郭仁飞 男, 1988 年出生, 博士研究生. 主要研究领域为扫描离子电导显微镜的优化设计与创新应用.

E-mail: guorenfei302088@163.com



庄健(通信作者) 男, 1974 年出生, 副教授, 博士生导师. 主要研究领域为微纳测量技术、智能优化算法、机电控制系统等.

E-mail: zhuangjian@mail.xjtu.edu.cn