

图像配准和时间平均在 DNA 单分子 AFM 探测中的应用

王春梅^①, 孙洁林^{①*}, 龙飞^①, 赵俊^①, 胡钧^{①②}

① 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240;

② 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800

* 联系人, E-mail: jlsun@sjtu.edu.cn

2009-07-27 收稿, 2009-10-30 接受

国家重点基础研究发展计划(编号: 2007CB936004, 2006CB932505)资助项目

摘要 增强单分子成像的信噪比(SNR)对单分子精细结构的识别和分辨率的提高具有重要意义. 目前单纯依靠硬件技术的改善无法突破固有限制, 众多研究表明, 图像处理技术是进一步提高单分子成像 SNR 的重要方法. 原子力显微镜(AFM)的单分子成像具有独特优势, 至今还未有利用图像处理方法改进低信噪比单分子图像的报道. 本文以单个 DNA 分子为典型样品, 针对操纵及弹性研究等方面的独特研究基础, 以时间平均法替代电子显微镜等技术中针对可重复形态制样的单分子分类平均法, 对单个 DNA 分子的 AFM 时间序列图像采用图像配准和时间平均方法, 有效改善了图像的信噪比, 能够恢复背景中与噪声量级相当的信号. 结合其他技术, 本方法可实现图像精细结构的进一步解析和识别应用, 有望在 AFM 单分子操纵中起到重要作用. 本文描述的基于图像配准和信噪比评估的方法具有普适性, 可应用于 AFM 成像质量及状态的定量评估表征中.

关键词

图像配准
DNA
AFM
时间平均
信噪比

应用单分子成像技术实现单个生物分子的结构解析和功能研究具有重要的科学意义^[1-4]. 至今为止, 研究人员已经发展了多种先进的显微成像方法实现单个生物分子的成像, 近来更是不断取得显著突破^[5-8]. 单分子结构解析面临的重要技术挑战是其成像可达到的信噪比(SNR)^[9,10], 增强信噪比是单分子成像研究的关注内容之一^[3,9]. 相关的一些研究内容已经表明, 除了硬件技术的改进, 图像处理方法是进一步突破硬件成像极限、改善单分子图像信噪比、获得超高分辨的重要方法^[3,10,11]. 典型的方法如 Klug 以及发展的物体三维结构高分辨重构图像处理技术在发展晶体电子显微学及核酸-蛋白质复合体的晶体学结构方面有卓越贡献^[10-12]. 由于成像技术、样品制备、仪器设备、成像条件和数据分析等方面的需求, 至今为止, 研究人员在电子显微镜、X-ray 以及共聚焦显微镜等领域, 已经针对性发展了多种图像处理技术, 以改善仪器的分辨率并实现定量分析^[13].

20世纪80年代发展起来的原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM), 适用于直接观测 3D 表面结构. 由于其在成像环境(真空/空气/液体)和分辨率上的优势, 目前已经成为广泛使用的单分子探测(结构/操纵)的基本方法之一^[14-18]. 目前, AFM 在单个生物分子成像方面还存在分辨率不足的问题. 当前, 人们集中于改善 AFM 仪器系统的固有缺陷, 主要包括针尖的形状和大小^[19-21]、系统热漂移和热扰动^[22-25]、扫描管的 creep/迟滞效应、仪器电子学系统的设计等^[26,27]方面, 相关研究在一定程度上增加了实验测量的稳定性和可靠性. 但是, 单纯的硬件和测量方法的改造仍然无法突破一些固有限制(如分子无规则热运动)造成的实验测量误差. 因此借鉴其他显微成像中的图像处理方法是可能的途径之一. 在电子显微镜技术研究中, 引入图像分类叠加法, 将同种生物分子独立个体的各种形态进行分类叠加, 获得了高信噪比的平均像(当叠加数为 M 时, 图像能谱信噪

英文版见: Wang C M, Sun J L, Long F, et al. Application of image alignment and time averaging methods in AFM detection for single DNA molecules. Chinese Sci Bull, doi: 10.1007/s11434-010-0104-8

比增加 M 倍)^[28], 进而得到超高分辨三维重构结构^[29]. 同样地, 这种方法也已经应用于提高 AFM 图像的信噪比. 例如, 图像相关平均法已经成功地应用于规则排列的蛋白分子 AFM 成像研究中^[17,18,30], 并获得了密排列的蛋白分子的 AFM 高信噪比精细结构. 但是, 对于单分散制备在衬底上的 DNA 分子, 难以获得衬底上形态完全相同的 DNA 分子, 因而无法应用上述分类平均法, 也未见相关适用的提高信噪比图像处理方法的报道.

我们一直关注于应用 AFM 实现单个 DNA 分子的精细结构、力学性质及其识别和操纵的研究, 已经发展了满足不同需求的单分散制备 DNA 分子的方法、单分子径向弹性性质的研究方法, 以及长时间实时操纵单个 DNA 分子的研究方法^[31-35]. 研究表明, DNA 分子本身在设定的成像环境下能够保证状态不变, 因此增加每一点的采样次数能够提高信噪比. 但是, AFM 系统中的热漂移使针尖的高精度原位数据采集难以实现, 增加帧扫描时间不能改善图像分辨率, 反而会降低 X/Y 方向分辨率, 同时引起图像几何畸变效应的增强. 因此, 我们借鉴 EM 中广泛应用的图像配准方法, 以时间平均替代分类平均, 针对性地发展了改善单个 DNA 分子 AFM 图像信噪比的方法: 在稳定漂移状态下采集时间序列 AFM 图像, 以图像配准方法计算成像中的漂移状态, 进而寻找热漂移后的时间序列图像之间的重叠部分以图像平均法提高信噪比, 并采用基于相似度的信噪比分析方法定量分析成像统计噪声. 该方法显著提高了单个 DNA 分子图像的信噪比, 能够恢复背景中与噪声量级相当的信号, 有望在相关的高分辨率结构识别和纳米操纵等应用研究中发挥重要作用.

1 材料与方 法

λ DNA (450 ng/ μ L) 购自华美生物工程公司, 针尖 NSC11 (力的常数为 48 N/m, 共振频率 300 kHz 左右). 实验用水为经过 Milli-Q 滤水器的去离子水, 电导率为 18.2 M Ω .

用 10 mmol/L 的 Ni(NO₃)₂ 溶液修饰新鲜剥离的裸云母衬底, 取 5~10 μ L 浓度为 10 ng/ μ L 的稀释后 DNA 分子溶液以分子梳技术将 DNA 制备在 Ni⁺云母衬底上, 该方法制备的 DNA 样品能够很好固定在衬底上且不易受成像因素而发生变化.

AFM 图像采集使用 Veeco Instruments 公司产品

(Nanoscope IIIa), 选择动态模式 AFM (也称为轻敲模式/振幅调制模式 AFM) 进行成像. 在漂移稳定的情况下, 选择合适的 DNA 分子片断, 连续采集同方向扫描(避免扫描管的迟滞效应^[23])的 49 幅时间序列 DNA 分子.

2 图像处理算法

(i) 图像分割. 采用基于空间域聚类分析的最大类间方差阈值分割法(ostu method)^[36]实现对 DNA 图像的分割, 进而对采集数据进行 Z 方向离线自动漂移校正.

(ii) 图像配准. 热漂移是 AFM 测量或操纵系统中首先需要考虑解决的问题^[22-25]. 在开环 AFM 系统中, 由于热漂移和压电驱动器的滞后效应, 连续几个小时内连续采集的 AFM 图像之间通常有较大的漂移. 当前多数的闭环系统能够减小但不能完全消除热漂移, 因此, 通常情况下需要首先对时间序列的 AFM 图像进行配准, 消除定向漂移, 才能进一步进行 AFM 图像的时间平均.

实际情况下, AFM 的漂移不仅仅引起采样图像之间在 X, Y 方向上的漂移, 通常还会引起图像本身的形变, 需要采用非几何变换的配准方法来消除图像之间由于漂移而带来的影响, 该方法通常很难实现. 通过控制实验环境, 并在采样之前经过长时间的热稳定, 在此条件下, 连续采集图像, 可认为图像之间只发生了平移变化. 利用基于相似性测度方法^[28,37]对图像进行初步平移配准. 基于相似度的基本归一化 cross-correlation 配准算法如下, 其中 $p(i, j)$ 为相似系数, R 和 S 是扫描图像在 X, Y 方向上的扫描像素数. 如果 $p(i, j)$ 达到最大值, 那么 i 和 j 可以分别认为是图像 g_2 相对于图像 g_1 在 X 和 Y 方向上的漂移.

$$p(i, j) = \frac{\sum_{r=1}^R \sum_{s=1}^S [g_1(r, s) - \overline{g_1(i, j)}][g_2(r+i, s+j) - \overline{g_2(i, j)}]}{\{\sum_{r=1}^R \sum_{s=1}^S [g_1(r, s) - \overline{g_1(i, j)}]^2 \sum_{r=1}^R \sum_{s=1}^S [g_2(r, s) - \overline{g_2(i, j)}]^2\}^{0.5}} \quad (1)$$

我们使用快速归一化算法^[38]提高配准算法的漂移计算速度. 经由配准计算的漂移速率是当前图像采样状态的表征值之一, 表征采集图像的畸变情况, 畸变小且相同的图像才适用于后续时间平均处理. 基本的 cross-correlation 方法已广泛用于热漂移的实时计算及补偿控制^[22-25,39], 但是配准精度有限; 对于实验采集的数据, 在离线情况下进一步采用无参

考图像的迭代配准方法^[30,40]避免 DNA 分子参考图像信噪比过低的影响, 提高配准精度.

(iii) 时间平均. 在实验中, 我们连续采集 M 幅静态 AFM 图像, 假设这些图像在成像过程中: (1) 本身没有发生任何变化; (2) 采集的图像由于漂移造成的畸变相同; (3) 仅包含随机噪声, 附加噪声具有零均值且互不相关. 那么采用时间平均方法理论上能够在不降低信号的基础上, 图像的信噪比提高 M 倍^[37].

(iv) 能谱信噪比(SNR)计算. Cross-correlation 方法^[37]是广泛应用于电子显微镜中的一种 SNR 估计方法. 实验中可以假设成像过程是静态的, 同时假定:

(1) 不同时刻获得的图像具有相同的统计特性;

(2) 获得的图像由信号 σ_s 和不相关的零均值噪声 σ_n 组成.

则配准后图像的能谱信噪比 SNR 估计值可由下式得到

$$\text{SNR} = \sqrt{\frac{p}{1-p}} = \frac{\sigma_s^2}{\sigma_n^2}, \quad (2)$$

其中, p 为由方程(1)计算的两幅图像的相似系数, σ_s^2 和 σ_n^2 分别为信号和噪声方差. Cross-correlation 方法是一种适用于实时图像信噪比评估的方法, 但是对于平均数据只能估计 $M/2$ 幅数据平均后的信噪比. 对于 M 幅图像的信噪比我们采用 SSNR 统计方法^[41]计算.

3 结果与讨论

图 1(a)自左往右显示的是连续采集的同方向扫描的 49 幅时间序列 DNA 分子中的第 2, 22 和 48 幅图, 每幅图的采集时间为 2 min, 采样间隔为 $191/256 \text{ nm} = 0.75 \text{ nm}$. 由图 1(a)可以清楚地看出时间序列图像之间存在明显的漂移. 图 1(b)是由无参考迭代图像配准算法计算的漂移时前后两次配准之间的输出误差, 可见第 7 次迭代时 X 和 Y 方向迭代输出误差均为 0, 达到稳定配准. 但是我们需要注意到, 配准算法本身的误差取决于原始图像的采样分辨率, 采样分辨率越低, 配准算法造成的误差越大. 配准算法的精度, 将直接影响后续的时间平均叠加结果. 在本例中, 配准算法 X/Y 方向的误差在一个像素(本例中约 0.75 nm)范围之内.

图 1(c)是经由稳态配准后计算的 X 方向和 Y 方向的漂移随时间的变化情况, X 方向和 Y 方向的漂移均近似为线性, 由最小方差拟合可得 X 方向的漂移

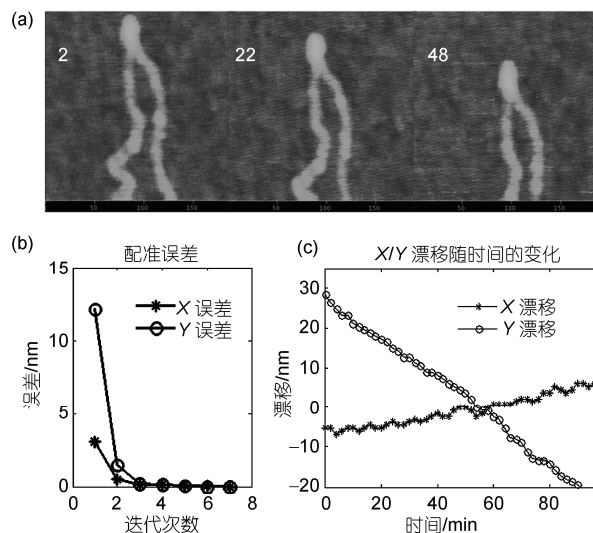


图 1 用基于相似度的无参考迭代图像配准算法计算的漂移 (a) 采集的 49 幅时间序列 DNA 分子中的第 2, 22 和 48 幅, 每幅采集时间 2 min, 扫描范围 $191 \text{ nm} \times 191 \text{ nm}$, 像素 256×256 ; (b) 迭代配准算法输出误差; (c) 由稳态迭代配准图像计算的 X/Y 方向漂移变化

速率 $x_{\text{drift}} \approx 0.13 \text{ nm/min}$, Y 方向的漂移速率 $y_{\text{drift}} \approx 0.52 \text{ nm/min}$. 由于图像漂移近似线性且漂移速率较小, 每幅图像之间的畸变情况相似且畸变可表征为: X 方向每像素的畸变 $x_{\text{distortion}} \approx 0.13 \text{ nm/min} \times 2 \text{ min}/256 = 1 \text{ pm/像素}$, 畸变率约 0.13%; Y 方向每像素的畸变 $y_{\text{distortion}} \approx 0.52 \text{ nm/min} \times 2 \text{ min}/256 = 4 \text{ pm/像素}$, 畸变率 0.5%. 由于漂移呈线性且畸变率低, 适用于直接进行时间平均算法; 在畸变过大的情况下, 理论上可以进行额外修正校正图像畸变^[42], 但是过于不稳定的成像状态可能造成校正效果不佳.

图 2 为 DNA 分子的配准效率与表面随机噪声分析. 图 2(a)为由 cross-correlation 方法估计的不同数量图像平均后的 SNR 曲线. 由图中拟合结果可见, 信噪比曲线呈现良好的线性关系, 系统的整体随机噪声随着平均图像数量的增加成正比减小, 表明原始图像之间具有良好的相似性, 使用的迭代配准算法具有高精度和有效性. 我们可以由 2 幅原始图像 cross-correlation 方法定量计算出单幅图像的信噪比约为 4.16, 整体噪声 $\sigma_n \approx 0.061 \text{ nm}$; 而由 SSNR 方法表征 49 幅 DNA 图像平均后的信噪比约为 207.7, 整体噪声 $\sigma_n \approx 0.009 \text{ nm}$, 信噪比提高了约 49 倍, 符合理论预期. 图 2(b)左图为由 49 幅配准后的 DNA 分子 AFM 图像计算的每一点的随机噪声分布图(即标准方差图), 显示 DNA 分子表面的随机噪声大小并非

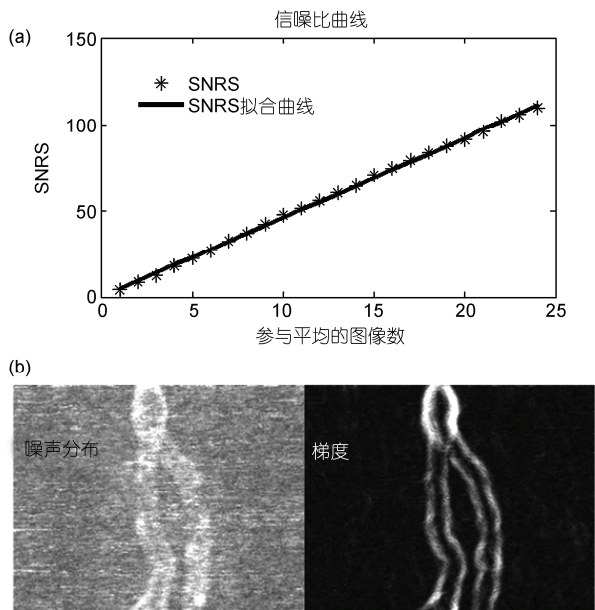


图2 配准效果的SNR分析及随机噪声的表面梯度相关性
 (a) cross-correlation 信噪比分析结果, 纵轴为信噪比, 横轴为平均的图像幅数, “*”和直线分别为计算和拟合结果, 线性 SNR 表明数据相似度高且配准精度高. (b) 表面随机噪声与拓扑结构梯度相关. 左图为由 49 幅 DNA 分子配准图像计算的表面方差, 即表面随机噪声分布图, 衬底随机噪声 0.04 nm, DNA 上梯度高的部分噪声约为 0.09 nm; 右图为 49 幅图像平均后的 DNA 分子的表面梯度图

完全相同, 而是与样品表面梯度相关(右图). 在无 DNA 的平坦衬底部分, 随机噪声大小约为 0.04 nm, 而 DNA 分子上梯度较大部分, 随机噪声增长至约为 0.09 nm, 增加近一倍. Stark 等人^[43]已经阐述过成像的固有误差与表面梯度相关, 而本研究分析表明, AFM 图中的随机噪声同样与表面梯度相关: 梯度小, 扫描管移动速度小, 成像较稳定, 随机噪声小; 梯度大, 扫描管移动速率大, 成像不稳定, 随机噪声大. 经 49 幅平均后, 衬底与 DNA 上的噪声均减小约 7 倍, 分别为 0.006 nm 及 0.013 nm. 目前 AFM 在 Z 方向的分辨率约为 0.1 nm, 与噪声的量级相当, 对于普通的无规则结构, 由于噪声量级接近 0.1 nm, 故图像很难真正达到 0.1 nm 的 Z 方向分辨率; 平均后的噪声分析表明随机噪声方差缩小, 远小于 0.1 nm, 故 AFM 图像在垂直方向上能够达到 0.1 nm 以下的分辨率.

图 3 为 DNA 分子时间平均结果与分析. 图 3(a) 为不同数量图像配准叠加后的结果, 自左往右分别为原始图像、16 幅图像平均和 49 幅图像平均的 AFM 图. 比较图 3(a)中平均后的 DNA 分子的图像与原始图像, 由于噪声的降低, 图像信噪比明显提高, 特别

是背景中已经随平均图像数量的增加逐渐显示出一些原始图像中未出现的明显结构(图 3(a)箭头所示). 图 3(b)为图 3(a)3 幅 AFM 图中的白线对应部分的截面图. 由截面图明显可见: (i) DNA 分子原始图像由于形变、制样、成像等原因信号较低, 仅为 0.3~0.4 nm, 与 DNA 分子上的噪声量级相当; (ii) 图像的信号部分(DNA 部分)基本没有随图像平均数量的增加而变化, 但是图像的噪声不断减小, 背景噪声得到了明显的抑制, 信噪比显著提高, 有利于结构参数(尤其是高度)测量的准确性; (iii) 原始图像中样品表面背景部分呈现的主要是 0.1 nm 左右的无规则波动信号, 但是经由时间平均以后的截面图上明显显示出原始图像中实际上存在与噪声量级相当的微弱信息. 由此可见, 噪声是影响单分子图像结构信息的一个重要因素, 而图像平均法能够解析出淹没在噪声中的微弱信息, 提高图像的信噪比. 此外, 16 幅平均图像和 49 幅平均图像的截面图信息也显示参与图像平均的数量并非越多越好, 当图像达到一定的信噪比之后, 可解析的结构就不再变化了, 平均的数量主要影响的是定量分析的测量误差.

对于 DNA 分子, 当前单纯的图像平均法虽然提高了其 AFM 图像的信噪比, 还未观察到 DNA 分子上的明显结构, 这与 DNA 分子的形变以及针尖有限形貌使 XY 方向分辨率的降低有关. 近年来, 振动模式扫描极化力显微镜(VSPFM)在研究生物分子的结

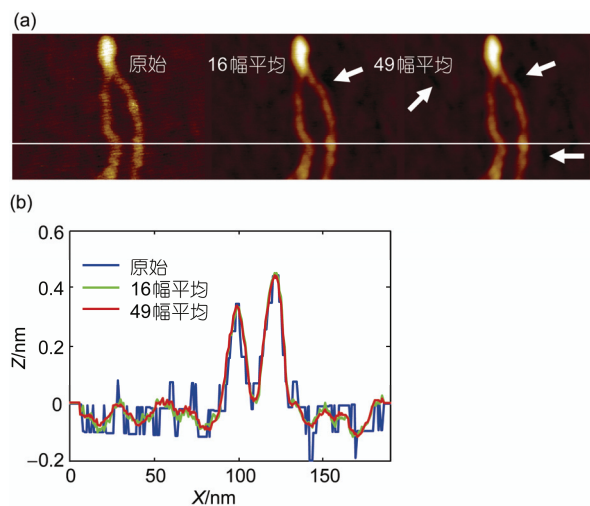


图3 DNA 分子图像的时间平均叠加分析

(a)自左往右分别为: 原始图像、16 幅平均图像以及 49 幅平均图像, 箭头指向部分为随着平均图像数量的增加背景上逐渐出现的一些信息; (b) (a)中 AFM 图中白线处对应的横截面图

构以及力学性质上已经有了很大的突破,但是部分成像数据处于弱信息成像状态,信噪比非常低,影响了此方法对于生物分子无形变状态结构的重构.本文中发展的图像平均法适用于弱信息的提取,因此结合 VSPFM^[31,32,44]以及当前在针尖形貌测量上的研究进展^[19,21],进一步开拓图像处理技术在 AFM 中的应用将在单分子精细结构重构以及 DNA 操纵中起到重要作用.此外,纳米尺度的精确测量与定量评估表征已经受到越来越多的关注^[45,46],当前对 AFM 成像的定量评估也还处在起步探索阶段,本文发展的图像处理算法在成像状态定量评估上也具有普适性,对于漂移(xdrift/ydrift)、畸变程度(xdistortion/ydistortion)、成像噪声 σ_n 以及能谱信噪比 $SNR = \sigma_s^2 / \sigma_n^2$ 的表征计算方法有助于 AFM 测量结果的定量比较.

4 结论

本文以 DNA 分子为例,发展适用于提高单分子

信噪比的图像处理方法.针对 DNA 分子在制样和弹性研究等方面的基础及特性,应用图像配准和 SNR 分析方法分析了样品表面噪声的统计特性,发现样品表面的噪声与表面梯度相关;在此基础上利用时间平均方法明显提高了低信噪比单个 DNA 分子 AFM 图像的信噪比,当前已经能够解析出背景中淹没在噪声中的 0.1 nm 以下的结构,改善了 DNA 分子 Z 方向的分辨率.而本文中对漂移、畸变以及信号噪声相关的信息的表征方法则适用于 AFM 成像状态的定量表征和测量结果定量比较.

但是,单个生物分子结构的精确解析的局限性不仅仅来自 Z 方向的噪声,还来自针尖卷积效应对 X/Y 方向分辨率的降低以及成像力造成的形变.在本文研究的基础上结合 VSPFM^[32,47]及去卷积方面的进展^[19,21],进一步开拓图像处理技术的应用,将有望在单分子精细结构解析中有所突破,而且能提高包括分子手术在内的单分子纳米操纵领域的研究和应用水平.

致谢 感谢上海交通大学分析测试中心的支持.

参考文献

- 1 Harada Y. Studies on biomolecules using single molecule imaging and manipulation techniques. *Sci Technol Adv Mater*, 2004, 5: 709—713
- 2 Moerner W E. New directions in single-molecule imaging and analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12596—12602
- 3 Kapanidis A N, Strick T. Biology, one molecule at a time. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34: 234—243
- 4 Sako Y, Yanagida T. Single-molecule visualization in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, Suppl: SS1—SS5
- 5 Chi K R. Super-resolution microscopy: Breaking the limits. *Nat Methods*, 2009, 6: 15—18
- 6 Gustafsson M G L. Super-resolution light microscopy goes live. *Nat Methods*, 2008, 5: 385—387
- 7 Palmer D J. X-ray microscopy makes for super resolution. *Mater Today*, 2008, 11: 10
- 8 Huang B, Wang W Q, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2008, 319: 810—813
- 9 Hemmer P R. Suppressing noise in single molecule imaging using quantum optics - art. *P Soc Photo-Opt Ins*, 2007, 6603: 60307
- 10 Amos L A, Finch J T. Aaron Klug and the revolution in biomolecular structure determination. *Trends Cell Biol*, 2004, 14: 148—152
- 11 Klug A. From Macromolecules to Biological Assemblies. Nobel Lecture, 1982
- 12 Caspar D L, DeRosier D J. The 1982 Nobel Prize in chemistry. *Science*, 1982, 218: 653—655
- 13 Bonnet N. Some trends in microscope image processing. *Micron*, 2004, 35: 635—653
- 14 Fechner P, Boudier T, Mangelot S, et al. Structural information, resolution, and noise in high-resolution atomic force microscopy topographs. *Biophys J*, 2009, 96: 3822—3831
- 15 Santos N C, Castanho M. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophys Chem*, 2004, 107: 133—149
- 16 Lang H P, Hegner M, Meyer E, et al. Nanomechanics from atomic resolution to molecular recognition based on atomic force microscopy technology. *Nanotechnology*, 2002, 13: R29—R36
- 17 Scheuring S, Boudier T, Sturgis J N. From high-resolution AFM topographs to atomic models of supramolecular assemblies. *J Struct Biol*, 2007, 159: 268—276

- 18 Muller D J, Anderson K. Biomolecular imaging using atomic force microscopy. *Trends Biotechnol*, 2002, 20: S45—S49
- 19 Itoh H, Fujimoto T, Ichimura S. Tip characterizer for atomic force microscopy. *Rev Sci Instrum*, 2006, 77: 103704
- 20 Villarrubia J S. Algorithms for scanned probe microscope image simulation, surface reconstruction, and tip estimation. *J Res Nat Inst Stand Technol*, 1997, 102: 425—454
- 21 Wang C M, Itoh H, Sun J L, et al. Characterizing atomic force microscopy tip shape in use. *J Nanosci Nanotech*, 2009, 9: 803—808
- 22 Tranvouez E, Boer-Duchemin E, Comtet G, et al. Active drift compensation applied to nanorod manipulation with an atomic force microscope. *Rev Sci Instrum*, 2007, 78: 115103
- 23 Yang Q, Jagannathan S, Boharman E W. Automatic drift compensation using phase correlation method for nanomanipulation. *IEEE Trans Nanotechnol*, 2008, 7: 209—216
- 24 Abe M, Sugimoto Y, Namikawa T, et al. Drift-compensated data acquisition performed at room temperature with frequency modulation atomic force microscopy. *Appl Phys Lett*, 2007, 90: 203103
- 25 Sugimoto Y, Innami S, Abe M, et al. Dynamic force spectroscopy using cantilever higher flexural modes. *Appl Phys Lett*, 2007, 91: 2171
- 26 Danzebrink H U, Koenders L, Wilkening G. The scanning force microscope as a measuring tool. *Simposio de Metrología 2006*, 25: 1—5
- 27 Danzebrink H U, Koenders L, Wilkening G, et al. Advances in scanning force microscopy for dimensional metrology. *CIRP Ann-Manuf Technol*, 2006, 55: 841—878
- 28 Frank J, Verschoor A, Boublik M. Computer averaging of electron-micrographs of 40s ribosomal-subunits. *Science*, 1981, 214: 1353—1355
- 29 Frank J. Electron microscopy of functional ribosome complexes. *Biopolymers*, 2003, 68: 223—233
- 30 Scheuring S, Fotiadis D, Moller C, et al. Single proteins observed by atomic force microscopy. *Single Mol*, 2001, 2: 59—67
- 31 Hu J, Xiao X D, Ogletree D F, et al. Imaging the condensation and evaporation of molecularly thin films of water with nanometer resolution. *Science*, 1995, 268: 267—269
- 32 周星飞, 安红杰, 郭云昌, 等. 基于原子力显微镜的单个 DNA 分子压弹性测量. *科学通报*, 2005, 50: 1434—1437
- 33 Lu J H, Li H K, An H J, et al. Positioning isolation and biochemical analysis of single DNA molecules based on nanomanipulation and single-molecule PCR. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 11136—11137
- 34 Hu J, Zhang Y, Gao H B, et al. Artificial DNA patterns by mechanical nanomanipulation. *Nano Lett*, 2002, 2: 55—57
- 35 An H J, Guo Y C, Zhang X D, et al. Nanodissection of single- and double-stranded DNA by atomic force microscopy. *J Nanosci Nanotech*, 2005, 5: 1656—1659
- 36 Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE T Syst Man Cyb*, 1979, 9: 62—66
- 37 Frank J, Alali L. Signal-to-noise ratio of electron micrographs obtained by cross-correlation. *Nature*, 1975, 256: 376—379
- 38 Lewis J P. Fast template matching. *Vision Interface*, 1995, 95: 120—123
- 39 Mokaberi B, Requicha A A G. Drift compensation for automatic nanomanipulation with scanning probe microscopes. *IEEE Trans Autom Sci Eng*, 2006, 3: 199—207
- 40 Penczek P, Radermacher M, Frank J. Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice. *Ultramicroscopy*, 1992, 40: 33—53
- 41 Unser M, Trus B L, Steven A C. A new resolution criterion based on spectral signal-to-noise ratios. *Ultramicroscopy*, 1987, 23: 39—51
- 42 Xu Z H, Li X D, Sutton M A, et al. Drift and spatial distortion elimination in atomic force microscopy images by the digital image correlation technique. *J Strain Anal Eng Des*, 2008, 43: 729—743
- 43 Stark M, Moller C, Muller D J, et al. From images to interactions: High-resolution phase imaging in tapping-mode atomic force microscopy. *Biophys J*, 2001, 80: 3009—3018
- 44 Hu J, Xiao X D, Salmeron M. Scanning polarization force microscopy: A technique for imaging liquids and weakly adsorbed layers. *Appl Phys Lett*, 1995, 67: 476—478
- 45 Pratt J R, Kramar J A, Newell D B, et al. Review of SI traceable force metrology for instrumented indentation and atomic force microscopy. *Meas Sci Technol*, 2005, 16: 2129—2137
- 46 Fujita D, Itoh H, Ichimura S, et al. Global standardization of scanning probe microscopy. *Nanotechnology*, 2007, 18: 084002
- 47 Wang H B, Zhou X F, An H J, et al. Study of radial compression elasticity of single xanthan molecules by vibrating scanning polarization force microscopy. *J Nanosci Nanotech*, 2008, 8: 3864—3867