

秀丽线虫自动筛选微操作技术

孙明磊, 姜金岭, 王 頔, 王启伟

(北京航空航天大学机械工程及自动化学院, 北京 100193)

摘要:以模式生物为研究载体的生命科学筛选实验中迫切需求实现实验支撑手段的自动化。微操作技术(针对微小尺度对象)与机器人技术(自动化)的结合在此领域十分适合。开发了针对线虫的微操作平台;阐述了微小生物活体微操作与传统微操作的区别;给出了真空吸附式作业力学模型;利用显微视觉测距原理为微操作作业提供深度信息,给出了高斯模型深度信息提取算法并进行了相关实验。微操作实验表明:在无位置信息引导情况下,吸附操作的成功率仅为39%;引入了位置引导信息后,吸附成功率上升,达到94%。针对微小生物活体进行筛选操作的微操作平台,能提高系统生物学的实验效率与实验精度。

关键词:机电工程;微操作器;显微视觉;秀丽线虫;模式生物

中图分类号:TP242.6

文献标志码:A

文章编号:2095-2783(2013)08-0732-04

Microscopic vision based workcell for micro-operating *Caenorhabditis elegans* in system biology

Sun Minglei, Jiang Jinling, Wang Di, Wang Qiwei

(School of Mechanical Engineering and Automation, Beihang University, Beijing 100193, China)

Abstract: The automation of experimental support is urgently needed in screening model organisms. The micromanipulation (for micro-scale objects) combined with the robotic technology (automation) has wide applications in such fields. A micromanipulation platform for *Caenorhabditis elegans* is established. The differences between micromanipulation and traditional manipulation of microorganisms are addressed. A mechanical model of vacuum adsorption is given and discussed. Depth information of micromanipulation is provided using the principle of micro-vision and relevant experiments have been carried out. The experimental results show that the success rate of adsorption operation is less than 39% without position guiding and the success rate can reach 94% after adopting position guiding. The micromanipulation platform for screening microorganisms is helpful in improving the efficiency and precision of experiments in system biology.

Key words: mechatronics; micro-manipulators; microscopic vision; *Caenorhabditis elegans*; model organism

系统生物学采用的典型研究方法是以一些结构简单且神经发育完全的微小生物——模式生物为实验对象,如线虫、果蝇和斑马鱼等,通过大量实验,积累相关的原始数据,在对此数据进行分析、比较的基础上建立生物学模型,对生物特性进行模拟,最后再通过大量实验来验证此生物学模型。其中,秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是应用最为广泛的一种模式生物。由于其个体小、细胞定数、结构简单、生活周期短、发育迅速和易于得到突变体且虫体透明,因此尤为适于作为模式生物进行生物学研究^[1-2]。

目前,在涉及线虫筛选的实验过程中仍采用人工操作,耗时费力,筛选数量有限,科研人员迫切希望拥有高通量的自动化筛选设备以替代人工操作。上述事例在以模式生物为研究载体的生命科学筛选实验中普遍存在,类似研究领域对实验支撑手段实现自动化的要求也十分迫切。微操作技术(针对微小尺度对象)与机器人技术(自动化)的结合恰恰在这样的领域有用武之地。

1 微小生物活体微操作

微操作技术研究已发展到一定阶段,取得一些成果^[3-7]。该类研究主要面向生物工程应用,如基因工程、动植物克隆、染色体分析和人工受精等,操作对象为细胞、染色体等。本文所述的微小生物活体主要为用于生命科学研究模式生物,如线虫、果蝇幼虫、斑马鱼、水螅等。两相比较,存在以下主要差异。

1)对象尺度。①被操作的细胞、染色体大小在数微米级甚至更小,属于微尺度(microscale)^[8]甚至纳尺度(nanoscale)。②微小生物活体包括其幼体与成体,尺度分布在数十微米至数毫米之间。以线虫为例,其幼虫长约为80 μm ,直径约为20 μm ,属于微尺度(microscale);线虫成虫长约为500~1200 μm ,直径约为60~120 μm ,跨越了微尺度、中间尺度(Mesoscale)以及宏尺度(macroscale)的范围,见图1。

2)移动速度。①细胞、染色体的运动更多表现为借助液体环境的慢速随机运动,或接近静止。②本文所涉及微操作对象,如线虫、果蝇幼虫等,是具

收稿日期:2012-12-22

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20091102120022);国家自然科学基金资助项目(61071158)

作者简介:孙明磊(1974—),男,讲师,主要研究方向:显微视觉、微操作技术, sunminglei@buaa.edu.cn

有完善神经系统的多细胞生物个体,运动(蠕动)速度很快(在 $4.5\text{ mm} \times 3.3\text{ mm}$ 显微视场下观察,线虫成虫的移动速度约为 0.2 mm/s)。

3)外在形态。①细胞、染色体的外在形态相对固定。②微小生物活体则具有“不定形态”的特点。一是因为身体可能扭曲或蜷曲;二是个体生长发育,大小、结构不断变化。

4)操作环境要求。①活体细胞对培养环境的温度、湿度有明确的要求;环境颗粒或灰尘的体积甚至超过细胞,对操作产生严重干扰。②线虫、果蝇幼虫、斑马鱼等是完整的生物个体,其对环境的适应能力远胜活体细胞;微小生物活体的尺度、形状都使其与灰尘颗粒等干扰存在明显差别;普通实验室环境下即可对微小模式生物活体进行长时间操作,为机器人操作提供了方便。

5)操作性质。①针对细胞、染色体的微操作面对的主要矛盾是“微”;从目前的应用来看,操作的批量并不大。②面向微小生物活体的微操作首先要解决生命科学研究实验中筛选的问题,如何实现高通量操作就是一个主要矛盾。

综上可知,“面向微小生物活体自动筛选的微操作”具有以下三大特点:1)面向多尺度对象的操作;2)针对生物活体的操作;3)高通量筛选操作。

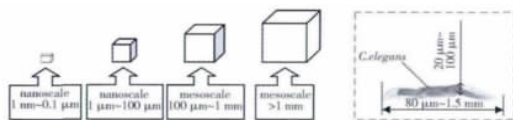


图1 微操作对象的尺度概念

Fig. 1 Concept of scale of micromanipulation objects

2 秀丽线虫微操作系统

秀丽线虫微操作系统主要由可自动聚焦的变焦显微视觉系统、交流伺服驱动的两自由度扫描平台以及一个步进驱动的两自由度真空吸附末端操作器组成,见图2。

系统软件的编制以及功能模块的划分是按照机器人系统的逻辑结构来划分的,同时也考虑了系统物理结构的特点。整个系统软件均基于 Windows 环境,利用 Visual C++ 6.0 完成。

系统界面可以分为三部分(参见图2)。

- 1) 工具栏:储存采集到的图片。
- 2) 视图窗口:显示显微视觉捕获的图像。
- 3) 控制窗口:实现系统的各项功能,完成真空拾取。

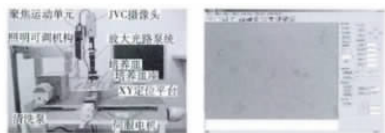


图2 微系统结构及操作界面

Fig. 2 Structure and interface of the micro-system

3 真空吸附末端微操作

3.1 真空吸附式作业力学模型

本文中的操作对象为秀丽线虫,针对该类生物活体的力学模型尚不清楚。尝试将操作对象近似为薄片椭圆体,假设吸取目标为理想的椭圆形物体,见图3。由于拾取对象的尺寸微小,与其接触的物体表面积也就同样微小,当空气干燥、无微液产生时,表面张力会大幅减少。当被操作对象是线虫有机体时,其属于亲水性物质,此时其黏着力主要是范德华力和表面张力。实验前已对培养皿已进行了静电处理,故可忽略静电力。

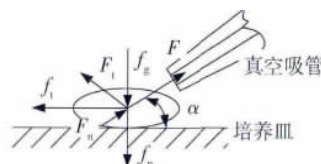


图3 真空吸附式作业力学模型

Fig. 3 Mechanical model of vacuum adsorption

假设操作对象的直径为 $100\text{ }\mu\text{m}$,其与接触面之间的有效距离 z 为 0.7 nm ,微小物体与培养皿之间范德华力为

$$F_{\text{vdw}} = \frac{Hd_0}{12z^2} = 2.517 \times 10^{-6}\text{ N}.$$

当微吸管在吸取动作开始时,并靠近了微小物体,此时假设目标对象与接触面之间的有效距离 z 为 1.5 nm ,此时的 d_0 应取微吸管直径假设 $40\text{ }\mu\text{m}$,微小物体与吸管之间的范德华力为

$$F'_{\text{vdw}} = \frac{Hd_0}{12z^2} = 2.193 \times 10^{-7}\text{ N}.$$

假设微小物体的密度近似为水的密度(操作对象是生物体),其重力的大小为

$$G = \pi r^2 h \rho g = 7.693 \times 10^{-8}\text{ N}.$$

以上计算结果表明,范德华力比重力高一个数量级,重力可以忽略不计。

考虑到线虫是生物有机体,线虫与培养皿的表面张力大小为

$$F_{\text{tens}} = 4\pi r \gamma = 4.584 \times 10^{-5}\text{ N}. \quad (1)$$

线虫与吸管的表面张力大小为

$$F'_{\text{tens}} = 4\pi r \gamma = 1.834 \times 10^{-5}\text{ N}. \quad (2)$$

由式(1)和式(2)可知,表面张力比范德华力和重力要大;则吸取的必要条件为

$$F + F_n > (f_g + f_n) \sin \alpha + f_t \cos \alpha. \quad (3)$$

式中, F 为真空微吸管所施加的气动力, F_n 为微吸管与被操作对象之间的黏着力, f_n 为被操作对象与培养皿之间的黏着力, f_t 为被操作对象与培养皿之间的切向黏着力, f_g 为被操作对象重力, α 为微吸管与培养皿平面的夹角。

当物体半径在 $10 \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 时,重力可忽略不计,且黏着力的大小会随着接触面之间距离的增大

而减小,则式(3)可简化为

$$F + F_n > f_n \sin \alpha + f_i \cos \alpha. \quad (4)$$

由式(4)可知,增大 F 和 F_n 可提高装置的吸取能力。可以通过增加真空度,或者增大吸管末端的直径来增大吸取能力。

既然表面张力远大于范德华力和重力,可用表面张力 F_{tens} 代替黏着力,即式(4)可简化为

$$F + F'_{\text{tens}} > F_{\text{tens}}. \quad (5)$$

真空管真空微吸管所施加的最小气动力 F_{min} 为

$$F_{\text{min}} = F_{\text{tens}} - F'_{\text{tens}} = 2.75 \times 10^{-5} \text{ N}.$$

释放的必要条件为

$$F > F_n - [(f_g + f_n) \sin \alpha + f_i \cos \alpha]. \quad (6)$$

此时,微小物体已经脱离了载玻片,因而与培养皿的黏着力已不存在,若忽略被操作对象的重力,则式(6)可简化为: $F > F_n$, 进一步简化为 $F > F'_{\text{tens}}$ 。因而在释放操作时,真空微吸管所施加的最小正压理论值为 $1.834 \times 10^{-5} \text{ N}$ 。

3.2 讨论

由上述理论计算,所需最小拾取吸取力 $F_{\text{min}} = 2.75 \times 10^{-5} \text{ N}$, 最小释放力为 $F_{\text{min}} = 1.83 \times 10^{-5} \text{ N}$ 。

通过实验得出的值均稍大于这一理论值,分析原因是由于压力传感器位置无法安装在气路的末端,无法精确测量微吸管尖端的气压值,吸管尖端管路的内径有较大的变化: $5 \text{ mm} \rightarrow 1.2 \text{ mm} \rightarrow 0.6 \text{ mm} \rightarrow 40 \mu\text{m}$, 产生较大的压力损失。微吸管尖端的实际吸力应小于上面的实验结果而接近理论计算值。另外,通常被吸取的线虫并不完全覆盖在微吸管的管口,有一定的缝隙存在,这使得所需的压力大于理论计算值。

4 显微视觉引导

4.1 原理

深度信息获取是显微视觉领域一个重要的具有实用性的问题。就本项目而言,在末端执行器对线虫进行吸附操作的时候,需要明确线虫与末端执行器之间的相对距离。单目显微视觉测距方法是解决此问题的现实方法。

基于单目显微视觉的深度信息提取方法主要分为两类:聚焦深度法和离焦深度法。

由文献[9]可知高斯模型的曲线形状与聚焦函数的曲线形状近似,则可使用高斯函数近似表示聚焦曲线:

$$F = F_p \exp \left\{ -\frac{(d - \bar{d})^2}{2(\sigma_F)^2} \right\}. \quad (7)$$

这里 \bar{d} 和 σ_F 是高斯分布的平均值和标准偏差。

对式(7)取自然对数得到

$$\ln F = \ln F_p - \frac{1}{2} \left(\frac{d - \bar{d}}{\sigma_F} \right)^2. \quad (8)$$

将 F_m 、 F_{m-1} 和 F_{m+1} 3 个值代入式(8)中,联立解方程组得到

$$\bar{d} = \frac{(\ln F_m - \ln F_{m+1})(d_m^2 - d_{m+1}^2)}{2\Delta d[(\ln F_m - \ln F_{m-1}) + (\ln F_m - \ln F_{m+1})]} - \frac{(\ln F_m - \ln F_{m-1})(d_m^2 - d_{m+1}^2)}{2\Delta d[(\ln F_m - \ln F_{m-1}) + (\ln F_m - \ln F_{m+1})]}, \quad (9)$$

$$\sigma_F^2 = \frac{-(d_m^2 - d_{m-1}^2) + (d_m^2 - d_{m+1}^2)}{2[(\ln F_m - \ln F_{m-1}) + (\ln F_m - \ln F_{m+1})]}.$$

利用式(8),可以求得 F_p

$$F_p = \frac{F_m}{\exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{d - \bar{d}}{\sigma_F} \right)^2 \right]}. \quad (10)$$

4.2 深度信息提取算法

给出高斯模型深度信息提取算法:

1) 使用大步长进行粗定位,运动得到 3 个位置点, x_0 、 x_1 和 x_2 , 满足 $F_1 > F_0$, $F_1 > F_2$;

2) 利用式(9)计算得到 \bar{d} 值,即 x_p 值;

3) 运动到 x_p 位置,得到 F_p , 若 $F_p > F_1$, 则 $x_0 = x_1$, $F_0 = F_1$, $x_1 = x_p$, $F_1 = F_p$, 否则, $x_0 = x_p$, $F_0 = F_p$;

4) 以 $|x_p - x_2|$ 为步长向曲线上升方向搜索;

5) 直到 $|x_p - x_2| < e$, 结束搜索,根据往复次数确定回差补偿,输出结果。

具体流程如图 4 所示。

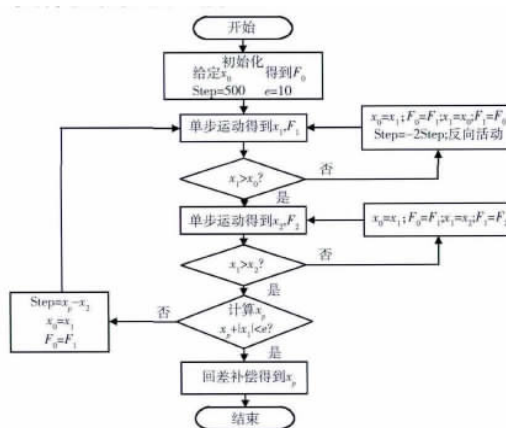


图 4 高斯模型深度信息提取方法流程

Fig. 4 Flow chart of Gaussian model based depth information extraction algorithm

以焦平面为起始位置,偏移定量步长后进行自动聚焦实验,记录下运动完成后所走过的步长。理想状态下,偏移量和运动量相等。用测微仪记录下每次算法得到聚焦位置并与初始位置进行比较。图 5 给出了多次实验结果,其样本标准差 $s = 0.675 \mu\text{m}$, 该值可以作为衡量自动聚焦精度的参数。实验表明高斯模型深度信息提取算法满足针对线虫操作的深度信息测量要求。

5 实验

将基于高斯模型的聚焦测距方法应用于秀丽线虫微操作系统,见图 6(a)。图 6(c)为末端执行器吸附线虫的图像。从不同位置进行重复性实验($n =$

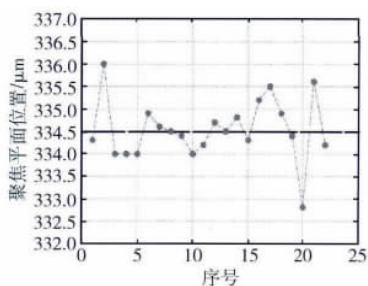


图5 高斯模型深度信息提取方法实验结果

Fig. 5 Experimental results of the depth information extraction algorithm

18),对比实验结果见图7:在无位置信息引导情况下,吸附操作的成功率仅为39%;引入了位置引导信息后,吸附成功率上升,达到94%。



图6 秀丽线虫真空吸附操作实验装置

Fig. 6 Experimental device of vacuum adsorption of *C. elegans*

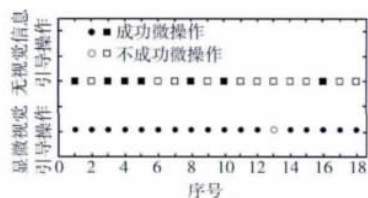


图7 秀丽线虫真空吸附实验结果

Fig. 7 Experimental result of vacuum adsorption of *C. elegans*

6 结 论

以模式生物为研究载体的生命科学筛选实验中迫切需求实现实验支撑手段的自动化。微操作技术(针对微小尺度对象)与机器人技术(自动化)的结合适用于此领域。本文研究了针对秀丽线虫的微操作平台,主要工作如下。

1)阐述了微小生物活体微操作与传统微操作的区别。

2)给出了真空吸附式作业力学模型并进行了讨论。

3)利用聚焦原理实现微操作作业深度信息测量,给出了高斯模型深度信息提取算法,并进行了相关实验。

4)微操作实验表明:在无位置信息引导情况下,吸附操作的成功率仅为39%;引入了位置引导信息后,吸附成功率上升,达到94%。

上述研究工作属于传统微操作向生物活体微操作的过渡性研究,下一步将针对生物活体微操作的特色技术展开继续研究。

[参考文献] (References)

- [1] 高谦. 微生物学与系统生物学发展[J]. 国外医学: 微生物学分册, 2004, 27(3): 1-2.
Gao Qian. Development of microbiology and systems biology [J]. Foreign Med Microbiol Sect, 2004, 27(3): 1-2. (in Chinese)
- [2] 石铁流, 李亦学. 系统生物学的现状与展望[J]. 中国科学基金, 2005, 19(5): 282-286.
Shi Tielu, Li Yixue. The current state and perspectives of systems biology [J]. Bull Natl Nat Sci Found China, 2005, 19(5): 282-286. (in Chinese)
- [3] Sun Yu, Nelson B J. Microrobotic Cell Injection [C] // Proceedings of the 2001 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 2001: 620-625.
- [4] Allegro S. Automatic Microassembly by Means of Visually Guided Micromanipulation [D]. Lausanne: Swiss Federal Institute of Technology, 1998.
- [5] 孙立宁, 陈立国, 刘品宽, 等. 微操作机器人显微视觉系统若干问题[J]. 光学精密工程, 2002, 10(2): 171-175.
Sun Lining, Chen Liguang, Liu Pinkuan, et al. Some issues on the micro-vision system for a micromanipulation robot [J]. Opt Precis Eng, 2002, 10(2): 171-175. (in Chinese)
- [6] 李银妹, 楼立人. 生命科学研究中的光镊技术[J]. 生命科学仪器, 2004, 2(4): 3-9.
Li Yinmei, Lou Liren. Optical tweezers in life science [J]. Life Sci Instrum, 2004, 2(4): 3-9. (in Chinese)
- [7] 宗光华, 孙明磊, 毕树生, 等. 宏-微操作结合的自动微装配系统[J]. 中国机械工程, 2005, 16(20): 2125-2130.
Zong Guanghua, Sun Minglei, Bi Shusheng, et al. A microassembly workcell with macro to micro automatic operations [J]. China Mech Eng, 2005, 16(20): 2125-2130.
- [8] Yang G, Gaines J A, Nelson B J. A supervisory Wafer-Level 3D microassembly system for hybrid MEMS fabrication [J]. J Intell Rob Syst, 2003(37): 43-68.
- [9] Nayar S K, Nakagawa Y. Shape from focus [J]. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell, 1994, 16(8): 824-831.