

生物工程中的微操作机器人系统*

毕树生 宗光华 赵 玮

(北京航空航天大学机器人研究所 北京 100083)

张建勋

(南开大学计算机系 天津 30071)

摘要 对微操作在生物工程的作用作了简要叙述,着重介绍了当前国内外微操作机器人系统的发展状况。在广泛调研的基础上提出了比较理想并切实可行的面向生物工程的微操作机器人系统的物理结构。

关键词 生物工程 显微操作 微操作机器人

1 引言

在研究生物演化的过程中,遗传和变异是两个重要的概念。遗传性赋予生物种的稳定,保证生物种的延续。变异性赋予生物种的进化,保证生物种对各种环境的适应。遗传和变异是在一个生物体内统一起来的。在生物演变的长河中,自然发生的变异是非常缓慢的,随着生物科学的发展,人类开始学会干预生物的变异。本世纪 70 年代兴起的以基因(DNA)重组为核心的现代生物技术发展突飞猛进,日臻完善,在短短二十七年的时间内已经取得了许多激动人心的成果。美国和比利时的科学家已把细菌中抗卡那霉素的基因转移到向日葵、烟草、胡萝卜等细胞中,结果这些作物抗卡那霉素的能力比同类作物高 8 倍以上;在欧洲已经取得了牛产人乳、乒乓葡萄、粉色土豆、蓝色苹果等转基因食品的成功;日本通过基因工程,采用细胞融合技术把固氮基因直接转移到禾本科(诸如稻、麦)作物的根上,使之直接固氮,这样不施氮肥或少施氮肥也能丰产;美国威斯康星大学把菜豆的储藏蛋白基因转移到向日葵里并使该基因得到了表达;1963 年,我国童弟周教授利用自制的显微注射器成功地在金鱼和膀胱鱼上进行了细胞核移植,在国际上首创研究移核鱼和培育鱼类新品种的一个新方法;1983 年,美国华盛顿大学和宾夕法尼亚大学的学者利用显微操作技术,把大鼠的生长激素基因与小鼠一段管开关的基因组成重组体,把这个重组体注射到小鼠的受精卵里,再把受精卵移植到雌鼠体内,生下来的小鼠的生长速度比普通小鼠的平均生长速度快 50%;1989 年,北京农业大学陈永福院士应用显

* “863”资助项目

收稿日期:1998-02-23

修稿日期:1998-03-29

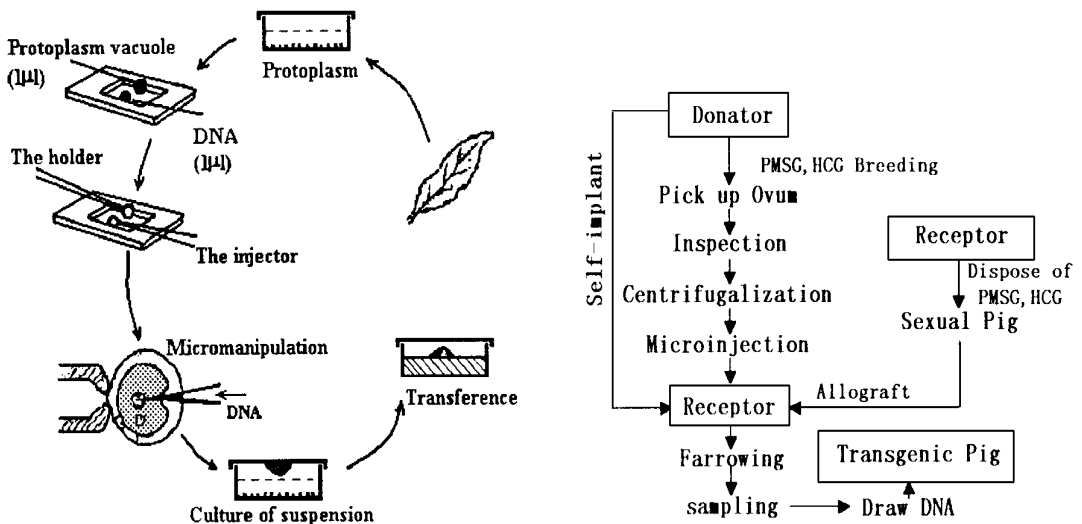
微注射技术, 将OMT/PGH 基因导入猪的受精卵, 得到我国的第一批转基因猪; 1997 年克隆羊“多利”及克隆猕猴的出现, 使得生物技术成为当今世界自然科学中最为活跃的领域。

如果说CT 机、核磁共振等仪器的出现极大推动了现代医疗工程的发展, 上述一系列成果的取得则几乎完全取决于科研工作者的灵巧双手与聪明才智。因为与其它领域相比, 现代生物工程的实验手段和设备还比较落后, 基本处于手工或半自动操作。这无疑减缓了生物技术的飞速发展。因此很多国家投入巨资进行生物实验设备的改造。利用微操作机器人系统完成基因工程中的显微操作被证明是一种切实可行的办法。基于这种动机, “863”计划智能机器人主题组织北京航空航天大学、中科院自动化所及南开大学, 于1997 年4~5 月开展了“面向生物工程的微操作机器人系统”的全国性调研, 调研的内容包括显微操作在基因工程中的地位、目前国内微操作设备的状况、微操作机器人系统的发展前景及潜在市场等。本文就是调研工作的总结。

2 生物工程中的显微操作

生物工程一系列的基因导入和细胞操作程序中, 归纳起来大致是两种方法: 化学法(工具酶)和显微操作法。因为化学法常使胚胎形成嵌合体, 需要进一步筛选, 花费的时间较长, 成功率也低; 显微操作法导入外源基因效率高, 常能获得良好的表达。因导入的外源基因往往是在细胞期就整合到受体的染色体上, 发育成的体细胞和生殖细胞一般都能整合上外源基因, 因此显微操作法日益受到生物界科研人员的青睐。图1 是典型的生物显微操作程序。

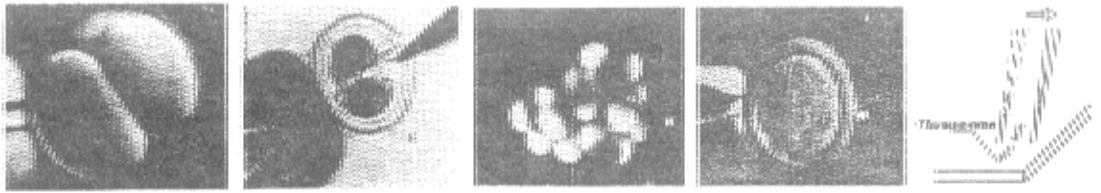
生物工程中的显微作业形式也不尽相同, 如细胞的切割、分离、融合, 细胞内器官(核、染色体、基因)的转移、重组、拉伸、固定, 细胞壁挤孔, 细胞群体的操纵等, 其操作尺度都是在微米或纳米级(见图2)。



(a) botanical micromanipulation

(b) micromanipulation of transgenic pig

Fig. 1 Micromanipulation procedure for bioengineering



1) fusion of cell 2) dissection of cell 3) selection of cell 4) injection of cell 5) amputation of gene

Fig. 2 Application of micromanipulator system

由于生物工程技术的研究对象是具有“生命”的动植物或其细胞, 每一个实验环节的失败都会导致生命的死亡, 前功尽弃, 造成人力、物力、时间的巨大浪费。就目前来说, 实验动植物的净化技术, 细胞的培养、洗涤、消毒技术, 基因表达水平的检测技术等自动化程序都已很高, 所以显微操作技术和手段的提高关系着实验成败的关键。但因显微注射和基因切割等微操作工具一直停留在手动或半自动状态, 这无疑会大大限制实验成功率的提高。从方法学角度考虑, 也不太符合“系统工程”的原则。例如, 利用人工微注射法产生转基因家畜(猪、羊、牛)的成功率只有 1% 左右(转基因小动物的成功率更低)。一个熟练操作人员一天约可注射 100 个受精卵, 折合成活一个, 而培养一个熟练的操作人员要花 5 年时间。目前, 国内在进行植物线形染色体切割时, 都是手动操作, 且必须在夜深人静、操作员状态极佳时进行。因此, 改良显微操作技术和手段是基因工程能否产业化的关键技术之一。

3 国内外生物显微操作的现状

目前生物工程界普遍使用的显微操作仪基本已被 Olympus、Nikon、Leica、Opton、Bio-Rad 等公司垄断。这些显微操作仪形式大同小异(见图 3), 它一般由三大部分组成: (1) 显微镜系统; (2) 左右微动操作手(Micromanipulator); 操作手上装有执行器, 不同的作业形式安装不同的执行器, 如微吸管、微注射针、切割刀、微电极等。微动操作手各有三个自由度, 通过球铰型操作杆控制, 其微调率约在 $1/16$ 和 $1/800$ 之间; (3) 微液压泵, 由微液压泵来控制外源 DNA 液体的注射量或汲取量。

至于显微操作的一般技术已有种种解说, 这里以小鼠受精卵(早期胚胎)内导入外源基因为例, 简单地叙述一下利用现普遍使用的微操作仪进行操作的基本步骤: (1) 首先从培养皿中取出卵细胞, 并移到附着在操作皿内的培养小液滴上; (2) 调节显微镜工作台, 把卵细胞调到显微镜视野内; (3) 操作左操纵杆, 使微吸管(执行器)与细胞核在同一聚焦面上, 并使微吸管吸引固定住卵表面; (4) 操作右操纵杆, 使微注射针(执行器)扎入细胞核中; (5) 旋转微液压

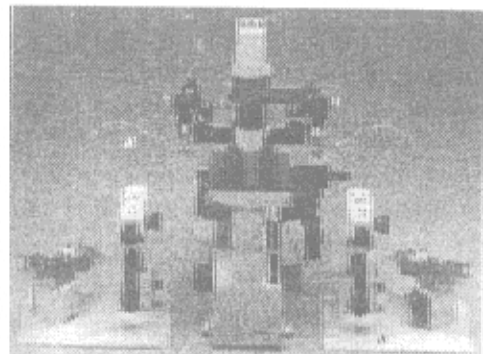


Fig. 3 Micromanipulator

泵吸引固定住卵表面; (4) 操作右操纵杆, 使微注射针(执行器)扎入细胞核中; (5) 旋转微液压

泵,使微量外源DNA液滴通过注射针注入核内;(6)作完注入DNA的受精卵尽可能快地放回培养箱内(或移植到养母输卵管内),使之继续发育。在上述一系列操作中,操作员的眼睛要时刻通过目镜注视着操作过程,且双手必须灵巧精确地调节左右微操作手和微液压泵。

目前,国际上大都利用上述微操作仪进行细胞操作或基因重组。我国一些重点实验室在国家重点投资的情况下,其仪器配备已达国际水平。如内蒙古大学实验动物研究中心和中科院动物发育所使用的是德国Leica公司生产的微操作仪,价值50万人民币;北京农业大学国家生物技术重点实验室使用的是日本Olympus公司生产的微操作仪,价值40万元人民币;医科院基础技术研究所医学分子生物国家重点实验室使用的是日本Nikon牌微操作仪,价值5万美金;农科院畜牧所购买的是德国Opton牌微操作仪,价值为8万德国马克。“价高并不一定物美”。通过剖析显微操作录像和总结操作人员的实际操作经验,我们归纳出了现微操作仪的几点不足:(1)它靠操作员在显微镜下用左右手动完成粗-微运动调节、视野转换(全局视场和局部视场)与聚焦,不大符合人机工程学中集中操作的原则;(2)因为是手动,成功率受操作者自身因素的影响大,刺破细胞膜时易对细胞或胚胎造成机械损伤,效率低;(3)操作难度较大,必须专职培训过的人员才能熟练操作,不符合微操作仪器“精度高、操作简单”的基本思想;(4)胚胎或细胞在体外的操作时间过长,容易致死;(5)显微摄影装置直接安装在显微镜上,按动快门的振动往往成为实验中的问题;(6)液压传动存在可压缩性,因而准确度不够高;(7)缺少转动自由度,因此手指的某些灵巧动作不易实现,而增加自由度又意味着操作的复杂化。所以科研人员普遍希望能够以机械代替人工,以自动代替手动,以摄像图形操作代替显微镜操作,使这项显微操作技术能够简单化、自动化,进而实现工程化,真正实现基因工程。

工欲善其事,必先利其器。在生物工程中,迫切需要自动化技术和信息技术发挥愈来愈大的作用。计算机的普及,八十年代后期机器人技术的成熟,以及传感技术、计算机视觉和图像处理技术的日臻完善,特别是最近几年微机械电子系统的崛起,使在更高技术层次上构架微操作机器人系统成为可能。日本已研制成功所谓计算机参与控制的用于生物工程的微操作机器人系统,价格高达80万美金;美国Bio-Rad公司和德国的Leica公司开发的用于细胞显微操作的立体视觉系统报价20万美元;加拿大McGill大学八十年代成功地研制出用于细胞操作的遥控式微机器人系统;Grace等人研制出可作视网膜手术的遥控微型机器人,即在眼球运动的条件下,进行切除弹性网膜或个别病理细胞的手术。目前,我国有上百家单位在从事转基因工程、蛋白质工程、细胞工程和胚胎工程的研究,但生物显微操作第一线使用的大都是十分简陋的设备。从1996年12月23日在北京召开的第一届国际转基因动物学术会议了解到,我国在显微操作仪方面的研究和开发尚属空白,因此可以说面向生物工程应用的显微操作机器人系统有很大的潜在市场。

4 微操作机器人系统的物理结构

我国的生物科学发展不太平衡,从整体设备、实验动植物质量、研究水平来看要低于发达国家。但从局部情况看,如学术理论、基因工程、胚胎学的研究和实验动物的应用方面,也有达到超过国际水平的。在知识产权保护概念日益深入人心的今天,如果不是从我国的基础研究中孕育出一批具有开发价值的产品,而只是采取简单的拿来主义的态度,我国在21世纪的生物

医学技术发展是不可想象的。目前我国生物科技工作整体水平与发达国家的差距,最主要的是设备条件上的差距。在所有的生物实验设备中,如动植物的养殖设备、二氧化碳细胞培养净化仪器、显微操作系统、生物光学显微镜及各种器皿,尤以显微操作系统最为昂贵。进口一台半自动的微操作机械手就花费几万至几十万美元,其成本在所有实验设备中占的份额最大。目前,我国微作业第一线使用的大都是自制的简陋设备,一些操作必须在夜深人静,外界干扰少,且操作员状态极佳的情况下进行,即采取“硬件不足软件补”的策略。从长远和发展规律的观点来看这种策略是不可取的。中国作为一个拥有高科技的独特发展中大国,其科学研究的成果和发展潜力是举世公认的。因此,我们有能力也有信心研制出具有中国特色的生物微操作系统。

开发研制微操作机器人系统的指导思想是什么呢?内蒙古大学校长旭日干院士、北农大国家生物技术实验室主任陈永福院士、中科院动物发育所所长杜森教授及工作在第一线的科研人员们对此提出了宝贵意见。开发研制生物微操作机器人系统应遵循一定的原则或指导思想,即“精度高、易操作、成本低”。按照这个指导思想设计出的微操作机器人系统应具有分捡功能、视觉功能、精密移动定位功能、DNA 注入和汲取剂量的控制功能等。图 4 是我们绘制的微操作机器人系统的理想结构图,它以下几部分组成:

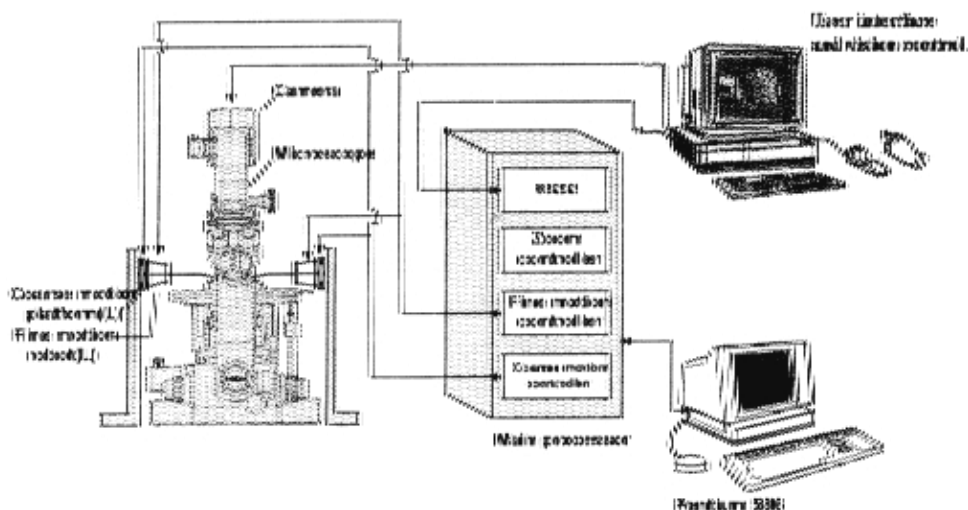


Fig. 4 Structural drawing of micromanipulator system

(1) 4~5 个自由度的微动机器人或操作手。

微动机器人是微操作系统的核心。现有微操作仪的运动精度在微米级,分辨率较低,只能完成较大细胞(如牛、羊、猪等大动物的卵细胞)的注射、汲取、切割、融合等操作,且易对细胞造成机械损伤,而对于较小细胞或耐受性较差的细胞或基因片段的微细操作则无能为力。解决这一问题的最佳途径是采用微动机器人,因为微动机器人可以根据视觉系统提供的三维信息确定针与细胞之间的相对位姿关系,以便自动完成显微操作;微动机器人的工作空间要大于单个卵细胞的尺度($170\mu\text{m}$);微观世界里微执行器的位置远比姿态重要,因此机器人的自由度不宜过多;微动机器人的驱动器有多种选择:步进电机、压电陶瓷、inchworm motor 等。

(2) 三自由度粗动平台(2个)。

“粗动”只是一个相对概念,其实它的运动精度也在微米级。细胞是活体,在培养液中的位

姿有不确定性,且呈多个群聚状态。面对这类作业对象,完全靠操作空间有限的微动机器人模仿操作员的熟练动作有相当难度,因此必须在宏-微世界间切换,在宏世界中通过粗运动“寻的”,完成所谓“凝视”,然后靠微动机器人自动完成注射、切割等微细操作。另外,由于细胞(基因)操作必须用两只“手”完成,一只完成细胞的固定,一只完成细胞的微细操作,所以前者没有必要采用微动机器人,用粗动平台即可。粗动平台的驱动形式有三种:(a)完全手动调节式。这是一种具有 X 、 Y 及 Z 三个自由度的直角坐标式运动平台。这种方式成本较低,但操作成功率对操作员的熟练程度、精神状态的依赖性较大;(b)遥控操作模式。通过操作三自由度的球铰式操动杆或传感器指套,粗动平台做随从运动,主从运动之间有一定微调率;(c)全自动式。驱动器与视觉系统形成一个大闭环,可以根据视觉信号来调节平台的运动,使微执行器进入显微镜视野内,完成“寻的”。这种形式成本较高,实现起来相当困难。权衡三种驱动形式,尤以第二种最佳。

(3) 显微视觉系统。

目前科研人员在进行细胞操作时,只能通过目镜监视,容易造成眼睛的极度疲劳。因此视觉系统是改善显微操作的关键。

如果按硬件划分,此系统应包括倒置生物显微镜、彩色摄像头、图像处理卡、多CPU并行处理计算机。从细胞组织的培养到对细胞或基因的操作都离不开精密的生物显微镜。理想的生物显微镜应:(a)倒置型,即物镜要放在载物台的下方。因为载物台上要进行细胞操作,需要宽阔的操作空间;(b)具有无限远校正光学系统和成像效果良好的复消色差中继透镜,能产生最佳的图像清晰度,达到最好的光学校准水平,实现和正立显微镜相当的像质;(c)采用合适的光路和高反射镜片,实现极小的光能损失,从而大幅度提高观察效果;(d)观察视野愈宽阔愈好;(e)可以根据各种容器材料(玻璃或塑料)的不同透光特性有针对性地补偿像差,确保卓越的观察成像(传统物镜一般只能根据容器厚度补偿);(f)采用最佳的防震机构,即使在显微操作及显微摄影的条件下,也不会影响正在进行的实验和记录;(h)可连接闭路电视或计算机,并具有精细再现性,以利于从事显微研究并提供多方面的操作。

细胞由细胞膜、细胞质、细胞核组成,各部分颜色、深度均不同,所以必须采用彩色摄像头;监视器必须是平面直角彩显,因为一般的计算机显示器存在不同程度的散射现象,不能如实地反映微操作的实际过程;另外,如果可能的话,最好采用多摄像头或激光共聚焦系统,这样监视器得到的是立体的显微信息,因为要处理的数据量非常大,Pentium 586已不能满足需要,必须采用开放式多CPU并行处理计算机或工作站。

(4) 遥控操作模式。

因为两个三自由度运动平台完全实现自动有一定困难,操作员也不希望“无事可干”而要求有一定的临场感受,所以三自由度平台的运动可用操纵杆或传感器指套(*figure gloves*)控制。虚拟现实(VR)中人们提出了*date gloves*和*sensor gloves*的概念。在微操作系统中,动作指令一般仅从拇指-食指-中指三个指发出,因此利用传感器指套系统可以更有效地表达人指的随机复杂动作。

(5) 末端执行器系统。

固定卵用的微吸管前端外径不超过 $100\mu\text{m}$,毛细玻璃管半径 $20\mu\text{m}$,最细的探针直径为 $0.2\mu\text{m}$ 。因为微吸管或注射针交换非常频繁,所以必须选用装卸方便夹具。每次交换执行器,其

位姿都会发生变化,因此要求微操作机器人有自我标定功能。

(6) 微液压泵系统

微量注射(或汲取)是操作员最为头痛的问题。因为对注入的外源基因量(不到 $1p1$)要求很严格,过多会使细胞致死,过少又达不到目的。而液体惯性的存在又使得现有的旋转推进器不能精确地控制注入量的多少。如何解决这一矛盾是个很棘手的问题。

(7) 工作环境

因微操作机器人体积小,操作精细,且在被操作对象的微观世界里,不大服从于现有的一些物理法则,所以工作环境对微机器人的精度和稳定性影响很大,如粉尘、气流、静电、噪音、震动等。另外为了减少误差源,显微镜、视觉系统、粗动平台、微机器人等子系统应刚性地连接在一起。控制器、监视器、遥控系统等应与上述部分分开。

微观世界的作业过程经过视觉系统的处理后,在监视器上如实地表达出来,操作员可以根据显示图像来监视微作业的整个过程,并通过控制操纵杆(Joystick)或指套(Figure gloves)或鼠标(Mouse)来完成“寻的”和“凝视”,最后靠微机器人自动完成细胞的分离、融合、细胞内器官的转移、重组、拉伸、固定等微操作。这套系统我们不妨称之为“自动理解操作意图的微操作机器人系统”。

5 结 束 语

“面向生物工程的微操作机器人系统”研究是一个崭新的多学科交叉的前沿研究领域。它涉及机械工程、材料工程、电子工程、生物工程等多种工程技术和科学,有着深厚的应用背景和广阔前景。正是这种需求和可能,迎来了微操作机器人系统发展的机遇。从1991年起,日本、美国、加拿大、德国、荷兰、法国、芬兰、瑞士等国相继开始研制微操作系统,并制定了自己的有限发展战略,现已有产品问世。我国的基因技术研究已经达到世界先进水平,在转基因操作设备上的研制开发也应与这一地位相称。如果以“面向生物工程的微操作机器人系统”为突破口,及时开展微操作机器人系统的研究开发,不但有可能在短期内形成产品,而且还可带动其它领域(如微电子装配、光纤对接等)微机器人技术的发展。

参 考 文 献

- 1 宗光华,毕树生等.面向生物工程及显微手术的微操作机器人系统的全国性调研总结报告.1997.6
- 2 “863”计划生物领域办公室.生物领域八五重大项目总结报告.1997.2
- 3 张鸿卿,连慕兰.细胞生物学实验方法与技术.北京:北京师范大学出版社,1992
- 4 Rexroad CE. Animal Biotechnology. 1992, 3: 1
- 5 陈 竺.世纪之交的生命科学与中国生命科学界.生命科学,1996,4: 1~ 3
- 6 王东卫,刘 伟等.国外实验动物科学发展简况.上海实验动物科学,1997,1: 60~ 62
- 7 刘阳辉.坚持自己的主张,走符合国情的道路——芬兰实验动物培训班体会.实验动物科学与管理,1997,4: 44~ 45
- 8 罗伯特·李·霍茨等.生物技术革命方兴未艾.参考消息(第7版),1997.6

M icrom an ipulator System for Bioengineering

B I Shu-Sheng, ZON G Guang-Hua, ZHAO W ei

(*R obot Institute, B eijing University of A eronautics and A stronautics, B eijing 100083*)

ZHAN G J ian-Xun

(*D ep t of C omputer, N ankai University, T ianjin 300071*)

Abstract

In this paper, the action of micromanipulation on Bioengineering is listed briefly. The progress of micromanipulator for bioengineering made in the world is emphatically presented. An ideal and realistic micromanipulator system for bioengineering is proposed based on the investigation and study.

Key words: Bioengineering, Micromanipulation, Micromanipulator system

毕树生 男, 32 岁, 讲师。1992 年毕业于北京航空航天大学机械学专业, 获硕士学位。同年就职于北京航空航天大学机器人研究所。1994~ 1995, 受国家科委派遣在日本通产省机械技术研究所做客座研究员。近几年的研究方向为微操作机器人技术, 现已承担或参加多项“863”与“国家自然科学基金”项目, 发表论文十余篇。