

文章编号 1004-924X(2006)03-0416-06

生物显微切割微操作仪的设计与研制

王会香,陈立国,孙立宁,刘亚欣

(哈尔滨工业大学 机器人研究所,黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:设计了一种能够自动、快速、精确地分离和提取指定细胞群或单个细胞的微操作机器人系统,研制了基于功率超声振动原理的微切割工具(其切割频率在15~50 kHz,振动幅值在0~1 μm 可调)和真空吸附式微拾取工具(压力可在0~0.5 MPa精确控制),应用人体肝脏组织5 μm 厚病理石蜡切片进行了显微切割的实验。实验结果证明了超声振动式切割工具对组织无伤害,真空吸附工具收集样品有效且整体系统适应于生物工程中微切割操作的实验需求,具有较高的可靠性、稳定性和准确性。

关键词:生物显微术;显微切割;微操作;超声振动;真空吸附

中图分类号:Q-336 文献标识码:A

Design of micromanipulation instrument for bio-microdissection

WANG Hui-xiang CHEN Li-guo SUN Li-ning LIU Ya-xin

(*Robotic Institute, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China*)

Abstract: This micromanipulation system provides a technology to procure pure population of targeted cells quickly and accurately for pathology research. Essential micromanipulations were executed by microdissection tool based on ultrasonic vibration (vibration frequency and amplitude at 15~50 kHz and 0~1 μm) and microcollection tool was based on vacuum adsorption (controllable pressure at 0~0.5 MPa). A 5 μm liver embedded sections were dissected and collected successfully in the experiments, the contrast testing experiment indicates that the micromanipulation system is applicable to bio-microdissection in high stability and accuracy, in which the ultrasonic vibration is no harm to tissue and vacuum adsorption is in good availability to collection samples.

Key words: biological microscopy; microdissection; micromanipulation; ultrasonic vibration; vacuum absorption

1 引言

显微切割技术^[1]是指通过显微操作系统来实现显微目标物质切割分离,从众多不同的样品中

无污染地选择单细胞或细胞群进行DNA、RNA和蛋白质分析的一种简单快捷的方法,特别是对癌症的研究,该技术具有在同样的样品上、甚至在同样的单细胞上给研究人员提供信息的独特本领,是一种基于形态学传统方法和分子技术相结

收稿日期:2005-11-23;修订日期:2006-01-20.

基金项目:哈尔滨市青年科学基金(No. 2004AFQ X J 0 59);高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20050213029)。

合的新技术。例如,研究癌症侵袭转移的分子机制,需从病理切片中提取肿瘤细胞或细胞群进行显微分析,如 RNA 放大、RT-PCR 化验^[2](实时连续变异逆转录酶聚合酶链反应),由于组织切片中肿瘤组织中存在正常间质细胞成分的影响,一些生物信息经常被干扰或掩盖,因而制约了分子诊断技术的应用。但要分析病理或分析基因排列情况等,必须从切片中提取指定的单个细胞或细胞群^[3-4]。目前,医院和研究机构普遍采用人工操作,操作者使用微玻璃针等工具,在显微镜下长时间工作,工作强度大,操作人员易疲劳,人为误差不可避免。因此,改变手动系统操作复杂、效率低的状况,为生物医学工程提供自动或半自动的微操作系统,成为提高医疗手段和病情诊断成功率的重要内容。

目前国外主要使用激光显微切割系统,一是应用红外激光热熔切割技术,如美国 Arcturus 公司研制的激光捕获微切割系统 LCM;二是应用紫外激光冷切割技术,如德国莱卡公司研制的激光微切割系统 LMD,而国内目前没有看到相关显微切割系统的报道。本文研制的是基于超声振动切割方式的面向生物显微切割作业的微操作机器人系统,该系统在显微视觉系统的引导下,能够实现被操作生物体(细胞、染色体等)的识别和定位,通过对多自由度操作手和微操作器的自动或半自动的任务规划来完成生物组织切片的显微切割作业。

2 系统体系结构及本体设计

2.1 系统体系结构

本微操作机器人系统是针对生物医学领域中的细胞、亚细胞级的操作而设计的,操作对象的特殊性决定了微操作机器人应具备以下显著特点:(1)驱动精细,操作精密;(2)具有很高的定位精度和重复定位精度;(3)高倍率,高分辨率的显微视觉系统及视觉伺服控制系统^[5];(4)具有良好的动态响应特性;(5)微作业工具应具有很高的几何精度及精度稳定性。因而,针对以上的特点且作为一种专用的精密设备的生物显微操作系统的设计遵循了实用、精确的原则,其整体系统样机如图 1 所示,主要包括三个部分:传感系统、控制系统和操作系统。

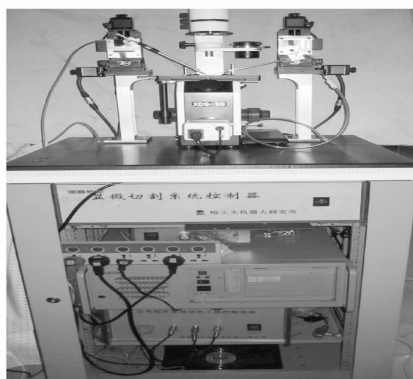


图 1 系统样机

Fig. 1 Global view of the system

传感系统是采用适当的传感器件或装置去感知或测量被操作对象的某些特征,并以此指导操作或确认操作结果。被操作细胞和操作器末端位置是控制系统所需要的最基本的参数。本系统采用显微镜作为传感装置,并在其目镜光路上安装 CCD 摄像机构成显微视觉系统,实现被操作物和操作器末端的精确定位;控制系统是根据传感系统获得的被操作物和操作器的位置,规划出操作器的执行路径。本系统采用两个多轴控制卡来分别控制左右操作手的运动;操作系统是指完成实验要求所必需的工具以及辅助设施,它在控制系统的控制下运动。在本系统中,操作系统主要包括二个部分:其一是固定在微操作机器人系统左操作手上的微切割工具(精细的微切割针),其二是固定在右操作手上的拾取工具,用于把切割下的目标组织收集在指定的位置。

软件系统包括显微视觉图像处理模块、系统标定模块、工具运动路径规划模块、运动控制模块、自动寻找工具及末端位置模块以及人机交互界面。现阶段,该系统主要完成对病理组织切片中病变细胞群的切割及拾取操作。该微操作机器人采用了模块化设计思想,只要配备不同的微操作工具模块进行稍加调整,就可以完成不同类型的微操作。

2.2 机械本体设计与其驱动控制

机械本体以一个倒置生物显微镜为主体,在显微镜的左边安装了一个携带微切割工具用的微操作手,右边安装了一个携带拾取工具用的微操作手,两个微操作手与显微镜之间采用松耦合的方式,这样避免了对显微镜本体做改造而带来的

各种不良影响。

两个微操作手的机械机构均采用三维直角坐标机构,将三个微动平台按照正交的方式进行组装,叠加构成了在三维空间中作平移运动的机构。操作过程中既需要大范围快速运动(如操作手运动到显微视觉范围内)也要求高精度的局部位置调整(如操作手 Z 轴运动至显微镜聚焦平面获得清晰图像)。针对这两种运动要求,实验通过控制步进电机驱动器的细分数来实现不同的运动分辨率和运动速度。电机驱动控制卡采用哈尔滨工业大学博实精密仪器公司自行研制的 HIT6502 可编程多轴控制卡。图 2 是该系统微操作手采用的三维拼接式的微动平台及其驱动控制装置,其运动参数如表 1 所示。



图 2 三维运动平台及其驱动控制装置

Fig. 2 3-axis stage and its drivers

表 1 三维拼接移动平台运动参数

Tab. 1 Motion parameters for 3-axis stage

序号	参数名称	数值
1	运动行程	30 mm×30 mm×30 mm
2	运动分辨率	2 μm(大范围宏动时)
		0.1 μm(局部范围微动时)
3	重复性	5 μm(大范围宏动时)
		±0.5 μm(局部范围微动时)
4	最高运动速度	10 mm/s

此外,为了能使这两个微操作手在较小的工作空间下更灵活地操作目标,在两手臂的末端关节处都加入了一个手动的旋转自由度,这样就可以根据操作对象的不同,灵活地调整微操作手或微操作器与载物台之间的最佳角度以适应各种需要。

3 微操作器的设计

微操作机器人系统具体执行的显微切割操

作任务,主要是由微操作手末端的微操作器来完成目的细胞的切割分离及其拾取收集。为此,分别设计了超声振动式微切割针作为微切割工具以及真空吸附式微玻璃管作为拾取工具。这两个微操作器分别安装在左右操作手臂上,通过操作手臂的运动来实现位置定位后再进行相应的操作。

3.1 微切割工具的研制

将超声切割原理引入微操作领域^[6-7],研制了基于超声振动原理的微切割工具。它实际上是功率超声的一种应用,是利用超声的生物效应中的机械效应来实现切割的。即当声强较低时,生物组织在超声的作用下产生弹性振动,其振动幅值与声强的平方根成正比;但声强过高时,组织的机械振动超过其弹性极限,造成组织的断裂或粉碎。具体表现为振动加速度大于一定阈值,生物组织会被切割;反之,当加速度小于这个阈值时,生物组织表现为被压缩的弹性体,而不会被破坏。其关系公式如下:

$$I = \frac{1}{2} \rho c \omega^2 \epsilon_m^2, \quad (1)$$

$$a = -A\omega^2 \sin(\omega t - \phi) = -A(2\pi f)^2 \sin(2\pi f t - \phi). \quad (2)$$

式中 I 为声强; ρ 为介质密度; c 为声速; ϵ_m 为振动幅值; f 为振动频率; A 为最大振幅;可见,能实现振动加速度可调的超声发生装置是该技术发展的关键。

生物显微切割的对象一般都是病理组织切片或是微小的细胞组织,切割所需功率不大,为实现对不同切割样品以最少能量、最佳效果的切割需求,设计了一般工作频率不超过 60 kHz,振动幅值 0~1.5 μm 可调的微切割工具。利用有限元软件对该显微切割工具的核心部件即叠堆压电陶瓷进行模态分析,设计了显微切割工具本体结构,并对其驱动与控制电路进行设计,满足了微切割工具振动频率和幅值调整需要,即微切割工具的功率可调。因此,本文利用压电陶瓷非谐振动态应用状态来实现振动状态可调的要求。即要求微切割工具控制与驱动电路输出能够驱动压电陶瓷的幅值和频率可调的交变电压信号。

叠堆陶瓷作为超声发生装置,夹持机构采用一端固定、一端自由的约束形式,且微操作手与载物台成 40~60°(实验研究,切割效果良好),末端采用微细切割针,切割针通过粘在陶瓷前端的弹

性夹与叠堆陶瓷连接。微细的切割针是选用硬度较高且摩擦系数较低的钨,制作成其尖端直径大约 $3\sim 5\ \mu\text{m}$ 左右的微针(轴对称圆锥形)其四周各个方向均匀锋利,光滑,因而在超声波激励的作用下,该切割针在各个方向均是一把锋利的刀,在切割过程中不必改变切割方向即可完成切割工作。图 3 为切割工具结构实物照片。

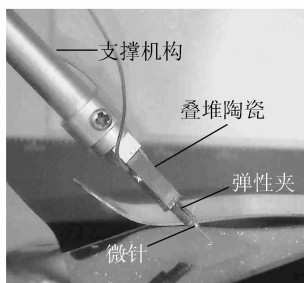


图 3 微切割工具结构图

Fig. 3 Structure of microdissection tool

为实现微切割工具振动状态可调的需求,要求微切割工具控制与驱动装置输出能够驱动压电陶瓷的幅值和频率可调的交变电压信号,如图 4 为微切割工具驱动控制电路,主要由波形信号发生和功率放大两个单元组成。根据微切割系统技术指标,要求切割工具最大能够产生 $10\ 000\ \text{g}$ 左右加速度。具体技术参数为:振动频率在 $15\sim 50\ \text{kHz}$ 范围内可调($0.5\ \text{kHz}$ 步长);振动幅值 $0\sim 1\ \mu\text{m}$ 可调。驱动微切割工具能够产生的最大加速度大约为 $10\ 000\ \text{g}$ 左右。

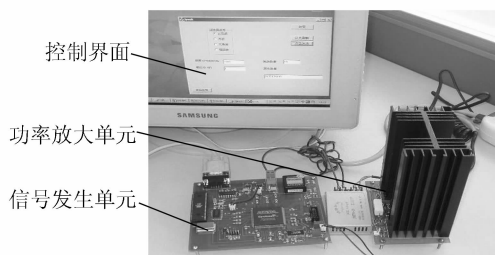


图 4 微切割针驱动控制电路

Fig. 4 Printed circuit board for microdissection needle

3.2 微拾取工具的研制

微切割工具在显微视觉系统的监控下,完成指定目标的切割分离后,微拾取工具就应及时地将其收集到指定的器皿中,以备接下来进行 DNA 或 RNA 的提取与分析,因而适宜的拾取工具在

整体系统中也是至关重要的。

由于被分离的目标体积非常小,通常尺寸在微米级,且受分离目标的形状体积不规则、存在形态不同、操作对象是生物体或生物组织的自身特性等因素的影响,不易采用需严格控制夹取力的微夹钳进行拾取操作。为避免因夹取物体而引起的变形和损坏,采用了真空吸附原理设计了微拾取单元利用真空负压进行拾取操作。由尺度效应决定了作用于微米级物体的重力相对于表面张力来说很小,粘着力起主导作用,而重力以及惯性力则可以忽略不计了^[8]。由于微小物体的重力不能克服表现为吸附作用的粘附力,因此释放微小物体必须通过施加外力才能实现,并且还要保证放置操作的有效、准确而不至于由于正压过大导致“吹跑”现象。为此,本文设计了以微细玻璃管为末端操作,采用真空吸附单元进行目的细胞的拾取收集工作。图 5 是真空吸附原理及实物组成图。

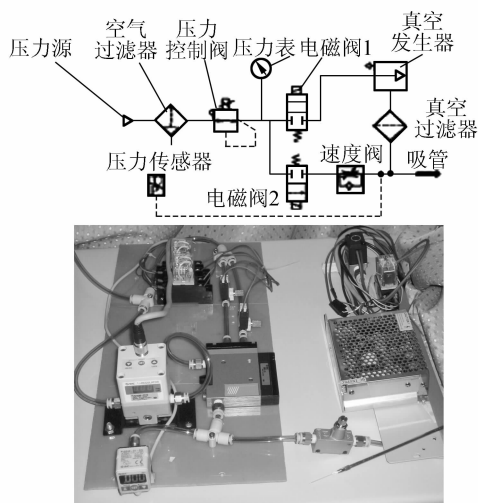


图 5 真空吸附拾取单元

Fig. 5 Vacuum collection setup

真空单元由气源、比例压力阀、真空发生器、电磁开关阀、速度调节阀、真空过滤器、压力表以及压力传感器等构成。考虑空气的可压缩性、气动元件的非线性和管路的压力损失,为提高真空单元的拾取和释放能力,采用了线性比例压力阀和混合压力传感器构成压力闭环比例控制来获得满意的压力调节效果。电磁阀 1 通电,执行真空吸取,电磁阀 2 通电,执行释放操作。

末端吸取工具采用外径 $1\ \text{mm}$,内径 $0.6\ \text{mm}$

的硼酸盐拉制而成的微玻璃管,经反复实验总结出其尖端最佳尺寸为被拾取微粒尺寸的 25~50%。例如被拾取的目的细胞的尺寸在 80 μm 左右,那么经拉针器拉制后的微玻璃管的尖端尺寸为 20~40 μm 。

4 实验研究

根据第 3 节的公式 1 和 2 可知:振动频率和幅值可影响切割声强,在能保证达到切割阈值的情况下,调节频率或振幅均可获得良好的切割效果。针对人体肝脏组织的病理石蜡切片作了大量的实验,切片厚度从 5~30 μm 不等。其实验效果如图 6~8 所示。图中显示的均是 5 μm 厚石蜡包埋切片在显微物镜 4 倍,CCD 放大 5 倍、分辨率为 480 l 即分辨率可达 2 μm 的情况下拍摄的结果。从这些实验图片可以看出:无超声振动切割时边缘组织不均匀,有周边组织脱落现

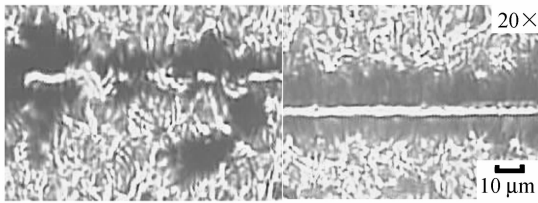


图 6 1 kHz 和 30 kHz 切割对比

Fig. 6 Dissection contrast for 1 kHz and 30 kHz

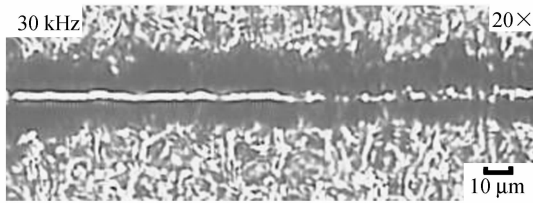


图 7 0.83 μm 和 0.28 μm 切割对比

Fig. 7 Dissection contrast for 0.83 μm and 0.28 μm

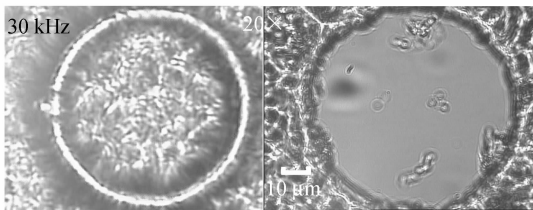


图 8 切割及拾取(切割直径 100 μm)

Fig. 8 Dissection and collection(Dia, 100 μm)

象,切割轨迹不平滑。在同一频率(30 kHz)振幅大的(0.83 μm)超过了切割阈值,切割彻底,效果好。并且在施加超声振动后进行切割,不仅切割轨迹可控性增强(微操作手的位置控制)而且切割轨迹边缘组织由于超声振动影响,其边缘平整、均匀,具有较好的切割效果并且超声的振动使周围的组织振动松散,与载玻片的粘着力减小,因而更易于真空吸附装置的收集。由于真空单元采用压力比例阀和压力传感器可以实时监控正负压力大小,因而吸取和释放操作较稳定。

此外在实验中还发现有一些参数可影响实验效果,针对 5 μm 的石蜡切片,各种参数调整到如下表 2 所示情况,可达到最佳切割效果。

表 2 切割 5 μm 肝脏病理组织切片最佳切割参数

Tab. 2 Optimal parameters for microdissection of liver slice at 5 μm

序号	参数名称	数值
1	切割频率	30 kHz
2	切割幅值	0.8 μm
3	插入深度	3~4 μm
4	放置倾角	50°
5	运动速度	100 $\mu\text{m}/\text{s}$

5 结 论

实验结果证明该微操作系统在生物显微切割操作中应用的有效性,解决了手动系统操作复杂、效率低下、提取样本不纯等状况。基于功率超声振动原理设计的微切割工具使切割边缘平整、均匀,具有较好的切割效果,且经过实验论证对组织无伤害(有关资料显示激光切割方式对组织或多或少有一定的伤害^[9]);采用真空吸附式微拾取工具实现了准确、快捷、简便的收集工作,为后续 DNA、RNA 或蛋白质的分析减少了许多处理作业工序。该生物显微切割微操作机器人系统,在显微视觉伺服系统的监控下,对末端的微操作器(超声振动式微切割针和真空吸附式微玻璃管)形成的大闭环控制下,使微操作工具定位精确,操作灵活,实现了亚微米级的操作精度和多自由度协调控制,对病理切片中病变组织的能够快速且精确地分离和提取,对生物医学工程的发展具有很大的推动作用。

目前本文所讨论的微操作机器人系统已经成功地在生物显微切割实验中获得应用。为了适应生物医学工程中更广泛的实验需求,其各种功能还需进一步完善,特别是为满足切割培养的活体

细胞的需求而要完善各种微操作器的辅助设计以及它们在显微视觉系统中的更加精确的定位和控制。

参考文献:

- [1] 闫庆国,黄高升,朱德生,等. 显微切割技术鉴定病毒核内包涵体[J]. 第四军医大学学报,2000,21(1):6-9.
YAN Q G., HUANG G S, ZHU D SH, *et al.* Microdissection technique in the determination of viral intranuclear inclusions[J]. *J. Fourth Mil. Med. Univ.*, 2000,21(1):6-9. (in Chinese)
- [2] BALL H J, MCPARLAND B, DRIUSSI C, *et al.* Isolating vessels from the mouse brain for gene expression analysis—using laser capture microdissection[J]. *Brain Research Protocols*, 2002,9:206-213.
- [3] SCHUTZE K, LAHR G. Identification of expressed genes by laser mediated manipulation of single cells[C]. *Nat. Biotechnology*, 1998,16.
- [4] ARAR F, MORISHIMA K. Bio-micro-manipulation[C]. *IROS 1997 IEEE*, 1997,1300-1303.
- [5] 李旭东,宗光华,毕树生,等. 生物工程微操作机器人视觉系统的研究[J]. 北京航空航天大学学报,2002,28(3):249-252.
LI X D, ZHONG G H, BI SH SH. Research on global vision system for bioengineering-oriented micromanipulation robot system [J]. *Journal of Beijing University of Aeronautics and Astronautics*, 2002,28(3):249-252. (in Chinese)
- [6] ARAI F, AMANO T. Microknife using ultrasonic vibration[J]. *International Symposium On Micromechatronics And Human Science.*, 2000 *IEEE*, 200,165-2000.
- [7] ARAI F, AMANO T. Mechanical micro-dissection by microknife using ultrasonic vibration and ultra fine touch probe sensor[C]. *International Conference on Robotics, 8 Automation, Seoul*, 2001 *IEEE*, May 21-26.
- [8] ZESCH W, BRUNNER M, WEBE A. Vacuum tool for handling micro objects with a nanorobot[C]. *Proceedings of the 1997 IEEE, International Conference on Robotics and Automation, Albuquerque, New Mexico*, 1997,1761-1766.
- [9] EMMERT F F, BUCK M R, CHUQUI R, *et al.* Immuno. LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for RNA analysis[J]. *American Journal of Pathology*, 1999, 154(1): 61-66.

作者简介:王会香(1978—),女,哈尔滨工业大学机器人研究所博士研究生,从事微纳米定位与驱动技术,微操作技术,生物医疗微操作机器人等的研究。