

机械手细胞微注射的深度提取 及图像数据处理

郭阿全, 钟 辉, 洪小雅, 席文明, 孙道恒
(厦门大学 机电系, 福建 厦门 361005)

摘要: 在细胞注射时, 显微镜上 CCD 获取的只是注射针的二维信息, 但光轴方向的深度信息丢失, 这会导致细胞注射的失败, 必须用其他方法获得。利用激光三角测量法对注射针以及细胞载玻片的深度信息进行测量, 通过纳米平台的移动来标定激光入射角参数, 对获取的数据进行图形化处理, 确定线激光条纹图像间的偏移距离, 从而获得标准物体高度与激光条纹图像偏移量的像素比值, 该比值可以用来计算实际物体的高度。另外, 利用三自由度机械手, 对测量的探针离细胞载玻片的距离进行验证, 获得激光三角测量法的误差值。实验结果表明, 在细胞注射中, 利用激光三角测量法获得注射针的深度信息是可行的。

关键词: 细胞微注射; 激光三角测量; 图像数据处理; 微机械手

中图分类号: TN247 文献标识码: A 文章编号: 1671-4776 (2007) 11-1012-05

Extraction of Depth Information and Image Processing in Manipulator Cell Injection

GUO A-quan, ZHONG Hui, HONG Xiao-ya, XI Wen-ming, SUN Dao-heng
(Department of Mechanical and Electrical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Only two dimensions information of injection needle could be captured by CCD in microscope image, and the lack of the depth information through the optical axis of microscope system would result in the failure of cell injection. A new way called laser triangulation to extract depth information of the injection needle and the slide glass was presented. The measuring principle was calibrating the projection angle of laser, was calibrated by the remotion of nano platform, then ascertain the displacement of laser stripe, S by image processing, The height of actual objects will be decided by $S \cdot \tan \theta$. In addition, the error of laser triangulation is demonstrated to be about from 5 to 10 μm by calibration using a 3-DOF manipulators. The result indicates that it is feasible to measure the depth information of injection needle by laser triangulation with the required precision in cell injection.

Key words: cell injection; laser triangulation; image processing; micro manipulator

PACC: 4262E

1 引言

单个细胞分析是理解生物个体的基本方法, 研究单个细胞可以发展高选择性、基于细胞的传感器、鉴定基因组成和合成特殊的 DNA。治疗男性脱发和生产转基因生物体, 都需要将单个细胞隔离并进行操作。最近的微生物学研究显示, 操作单个细胞越来越复杂, 例如克隆技术。因此, 对高效率、高成功率的复杂生物操作技术的研究也越来越广泛, 并逐渐成为生物技术领域研究的重点, 这其中就包括了对细胞注射方法的研究。

所谓细胞注射就是指将玻璃微针刺入细胞, 将外源物质通过玻璃针注射到细胞内部的过程。随着显微操作技术和微量注射技术的发展, 细胞注射已成为现代细胞学与分子生物学领域对各种过程和结构进行研究的重要方法^[1], 被广泛应用于生物学和遗传学中^[2], 特别是在体外遗传注射和 DNA 克隆技术^[3]以及刚刚兴起的细胞生物力学中^[4]。目前国外主要是采用微操作与视觉方法相结合的方式来改进细胞注射任务^[3, 5-6]。

细胞注射需要在显微镜下完成, 如果利用 CCD 将图像提取到计算机中进行处理, 根据显微镜成像原理只能得到物体的二维坐标, 而物体沿显微镜光轴方向的深度信息将会丢失。该信息直接影响细胞注射成功与否, 如注射针可能从细胞上方通过而不与细胞接触或注射针在细胞的上半部分接触并刺穿细胞, 更严重的是注射针可能与细胞载玻片碰撞, 造成注射针或注射系统损坏。在实际操作中, 虽然通过纳米平台 Z 轴的位移就可获得探针进入细胞的深度信息, 并且也可以实现自动测量和控制, 但由于本文是利用安装在机械手上的注射针来对细胞进行操作, 而细胞是固定在纳米平台上的, 机械手和纳米平台是分立放置的。如果通过移动纳米平台 Z 轴来获得探针进入细胞的深度信息, 也就是要改变显微镜的焦距, 使得细胞注射平面不在焦距上。这就会产生一系列的问题, 使得细胞注射实验难于开展。能否利用机械手的 Z 轴控制精度测量探针进入细胞的深度信息? 为此, 本文在纳米平台的基础上增加激光测量成功解决该难题。

本文采用激光三角测量获得物体的深度信息^[7],

方法是让一点激光源通过一个柱面镜变为线激光, 然后让该线激光通过一光栅形成很细的激光条纹, 该条纹倾斜照射在物体上, 当物体高度发生变化时, 倾斜的条纹会发生偏移, 根据激光的倾斜角度以及条纹的偏移量, 就可以获得物体的高度。

2 深度信息测量原理

图 1 是测量原理, 假设线性激光投影到平面的 A 点, 如果有一物体与该线激光相交, 则原来投影到 A 点的光线就会投影到物体表面上的 B 点。假设 A 与 B 点的水平距离为 s , 物体的高度为 h , 则 s 与 h 的关系为

$$h = s \cdot \tan \theta \quad (1)$$

式中: θ 为激光器的倾角; s 可以由安装在显微镜上的 CCD 获得, 如果激光器的倾角已知, 则物体的高度 h 就可以通过式 (1) 得到。

利用该方法也可以测量注射针的深度信息, 方

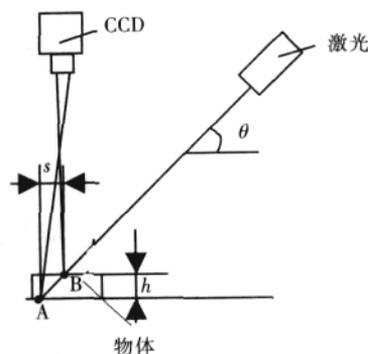


图 1 深度信息测量原理

法是将注射针固定在三自由度机械手的末端, 然后水平移动机械手, 使注射针的顶端与线激光相交, 利用式 (1) 就可以计算注射针的高度。系统中采用的机械手具有高的位置精度, 这样可以利用机械手在深度方向的移动距离, 来检测激光测量探针高度的精度。但问题是, 并不知道注射针是否移动到 A 点所在平面。用一个简便方法解决这一问题, 原理如图 2 (b) 所示。光纤冷光源将光倾斜照射在显微镜视场中, 当注射针不与平面接触时, 见图 2 (b) 左面部分, 注射针的顶端 C 和它的投影 D 点不重合, C 点距离平面越远则 CD 之间的水平距离越大, 该距离可以由 CCD 直接观察到; 而当注射针与平面接触时, 见图 2 (b) 右面部分, 注射针

顶端 C 与它的投影 D 重合。利用该方法可以精确测得注射针顶部离 A 点所在平面的距离，从而检测激光测量法的精度。

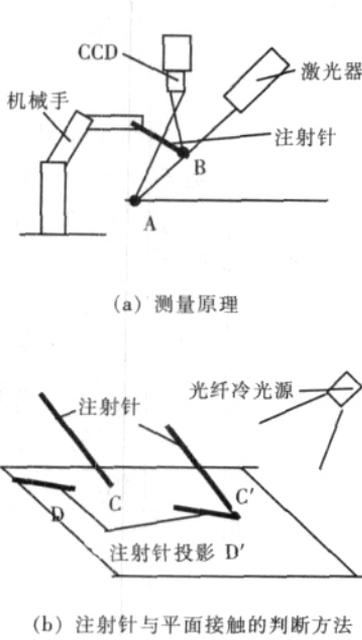


图2 注射针的深度信息测量

3 测量系统的标定

在测量过程中，激光器的角度是固定的，设 $K_1 = \text{tg}$ 为常数，式 (1) 变为

$$h = s \cdot K_1 \quad (2)$$

式 (2) 中物体高度 h 与激光线偏移距离 s 成线性关系，假设激光线在 CCD 中所成像的偏移距离为 s' ，因为 CCD 是线性成像，所以 s 与 s' 的比值也为常数，设该常数为 K_2 ，则

$$s = s' \cdot K_2 \quad (3)$$

由式 (2) 和 (3) 得

$$h = s' \cdot K_1 \cdot K_2 \quad (4)$$

令 $K = K_1 \cdot K_2$ 为常数，则 h 与 s' 成线性关系

$$K = \frac{h}{s'} \quad (5)$$

K 值标定方法为：将线激光投影到三自由度平台上，记录下对应激光线初始位置，然后将平台沿深度方向移动 h 个距离，这时在图像中初始激光线产生偏移，假设偏移距离为 s' ，则利用式 (5) 可以标定出 K 。后面将利用该 K 值计算物体的高度

和注射针的高度，方法是检测出相应激光线的偏移距离，然后用 K 乘偏移距离就可以得到物体的高度。

利用上述方法同样可以对水平面上的两个方向进行标定，在水平面的两个方向上，由于 CCD 像素数目不同，所以要分别进行标定。标定方法是在平台上分别画一水平线和垂直线，在两个方向分别移动 h 距离，在图像空间计算水平线和垂直线的移动距离 s ，两值之比即为水平方向和垂直方向的标定结果，分别用 K_s 和 K_v 表示。

4 实验数据处理与分析

实验系统如图 3 所示，由下列设备组成：微生物操作机械手 (MP-285, 三自由度, 美国 Sutter 公司生产, 40 nm 精度)、纳米运动平台 (M-112.1DG, 三自由度, 德国 PI 公司生产, 20 nm 精度)、显微镜 (体视 K-700Z, 中国麦克奥迪公司生产)、CCD (UC-930CL, 美国 Uniq 公司生产)、图像捕捉卡 (METORII, 加拿大 Matrox 公司生产) 和线性激光系统 (包括激光器、柱面镜和光栅)。

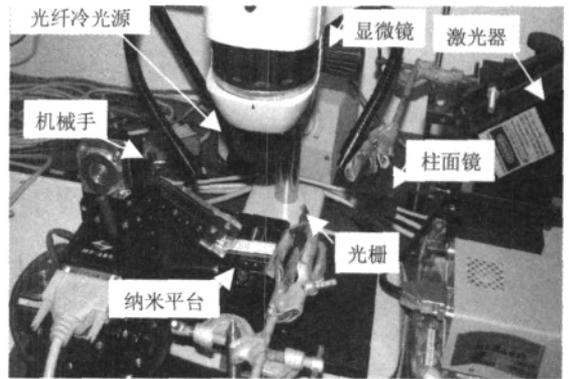
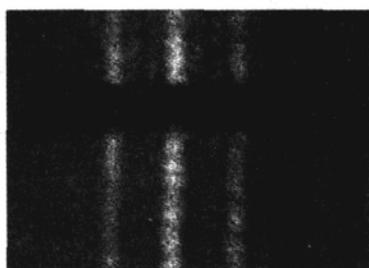


图3 细胞注射实验系统

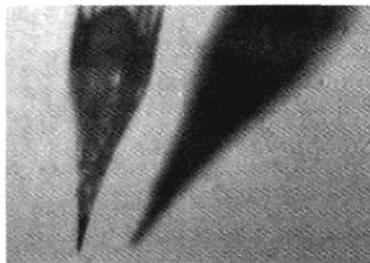
在该系统上将完成一个已知尺寸的微小长方体形状测量和机械手末端注射针距平台距离测量。在物体测量前首先对系统进行标定，得到 $K = 8.215 \mu\text{m}/\text{pixel}$, $K_s = 17.213 \mu\text{m}/\text{pixel}$, $K_v = 12.911 \mu\text{m}/\text{pixel}$ 。

图 4 是测量物体时，用显微镜上的 CCD 拍摄的图像。图 4 (a) 是测量长方体时获得的图像，从图中可以明显的看出线激光发生偏转，该偏转距离由编制的 C++ 程序获取；图 4 (b) 是测量注射针

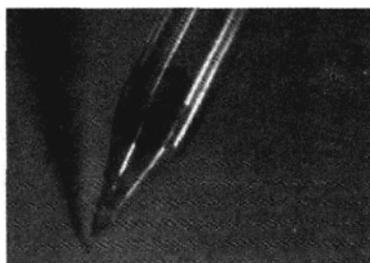
顶端高度时，注射针不与平台接触时获得的图像，这时阴影与针图像不相交；图 4 (c) 是测量注射针顶端高度时，注射针与平台接触时获得的图像，这时阴影与针图像相交。当注射针与平台接触时，可以利用机械手的移动距离检测注射针的测量高度。



(a) 长方体高度测量



(b) 探针与平台不接触



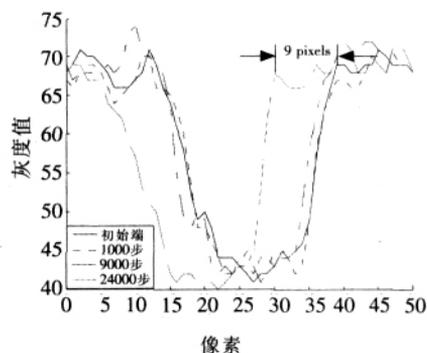
(c) 探针与平台接触

图 4 物体高度测量

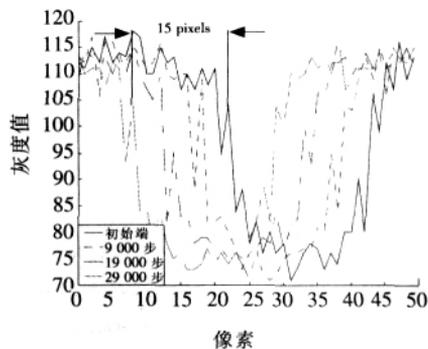
由于激光条纹图像边界模糊，图像数据量大，如果用数据直接处理，则图像边界的提取存在较大的误差，从而影响测量精度。文中对图像数据进行图形化处理，从而减小条纹偏移量的误差，提高测量精度。

图 5 是对获取的数据进行图形化处理的结果，Z 向数据图形化处理没有给出，处理方法与 X、Y 向相同。从图中可以容易确定线激光条纹图像间的偏移距离，从而对 X、Y 向进行标定。以图 5 (a)

为例，图中的“初始端”表示激光条纹的初始位置，“1000 步、9000 步、24000 步”分别表示纳米平台移动 1000, 9000, 24000 步后的激光条纹位置。通过编制的 C++ 程序，对获取的条纹图像中的某一行进行扫描，在 Matlab 中绘制出该行的像素点位置与其灰度值的变化曲线，通过观测图形曲线，就可确定线激光图像间的偏移距离。具体方法为：任取两条曲线，如选择“初始端”曲线和“24000 步”曲线，可知两曲线之间相差 24000 步，在两曲线上选取峰值变化明显的对应两点进行比较，如图 5 (a) 中选取点所示，可观测到两点间相差 9 个像素。纳米平台每个脉冲行程为 6.47488 nm，所以水平方向的标定 $K_s = 24000 \div 9 (\text{pixel}) \times 6.47488 (\text{nm}) = 17.266 \mu\text{m}/\text{pixel}$ 。选取多组像素点计算后取平均值得 $K_s = 17.213 \mu\text{m}/\text{pixel}$ 。同理，可求得 K_x 和 K_y 的值。



(a) X 向数据图形化处理



(b) Y 向数据图形化处理

图 5 图像数据图形化处理

表 1 是物体实际参数与线激光测量的数据比较和误差分析, 通过对测量尺寸与实际尺寸 (其中长方体尺寸和注射针离平台的实际距离分别由千分尺和机械手测量得到) 进行比较得到各种误差值。从测量过程来看, 这些误差主要由线激光条纹产生,

线激光条纹越细, 该误差就越小。另外, 这个精度是没有考虑 CCD 畸变等原因的精度, 实际对各种参数进行标定后, 精度可以达到 5 μm 以下。而且, 本系统是利用体视显微镜, 其操作对象是生殖细胞, 尺寸相对较大, 精度可以达到要求。

表 1 实际参数与线激光测量的数据比较和误差分析

测量的物体	次数	实际测量/ μm	线激光测量 (像素 $\times K$) / μm ($K=8.215 \mu\text{m}/\text{pixel}$)	绝对误差	平均相对误差/ %
注射针顶端	1	3877.44	3885	7.560	0.2
	2	3172.96	3178.79	5.830	0.2
	3	2705.04	2694.105	10.935	0.4
长方体高度	1	353.245	349.2	4.045	1.1
	2		353.6	0.355	0.1
	3		357.4	4.155	1.2

5 结 论

在细胞显微视觉注射中, 物体图像是二维的, 丢失了深度信息, 该信息的丢失直接影响细胞注射能否成功, 更严重的是会损坏设备。本文采用一种简单的线激光三角测量法完成注射针顶端的深度信息测量, 根据实际的细胞注射系统, 利用一种简单的标定方法避免线激光入射角的繁琐测量, 对获取的数据进行图形化处理以确定线激光条纹图像间的偏移距离, 提高了测量精度。实验数据表明, 采用文中的测量方法可以完成物体深度获取, 得到满足要求的测量精度。在后续研究中, 将把该深度信息集成到伺服控制方程中, 完成机械手细胞自动显微注射。

参考文献:

[1] 章维一, 侯丽雅. 微系统领域的关键技术 [J]. 中国机械工程, 2000, 11 (11): 1305-1308.
[2] ZHANG X J, ZAPP S, QUATE C F, et al. Ultrasonic microinjection characterized by integrated micro-optical force encoder [C] // Hilton Head 2004: A Solid-State Sensor, Actuator and Microsystems Workshop. Hilton Head Island, South Carolina, USA, 2004.

[3] YUN S, NELSON B J. Microrobotic cell injection [C] // Proceedings of the 2001 IEEE International Conference on Robotics & Automation. Seoul, Korea, 2001: 620-625.
[4] BAO G, SURESH S. Cell and molecular mechanics of biological materials [J]. Nature Materials, 2003, 2: 715-725.
[5] SUN Y, WAN K T, ROBERTS K P, et al. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida [J]. IEEE Trans on Nanobioscience, 2003, 2 (4): 279-286.
[6] LI X, ZONG G, BI S. Development of global vision system for biological automatic micro-manipulation system [C] // IEEE Int Conf on Robotics and Automation. Korea, 2001: 127-132.
[7] BUERKLE A, FATIKOW S. Laser measuring system for a flexible microrobot-based micromanipulation station [C] // Proceedings of the 2000 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems. Takamatsu, Japan, 2000: 799-804.

作者简介:

郭阿全 (1980—), 男, 硕士研究生, 研究领域为生物操作与微系统集成、视觉伺服控制, E-mail: gaqlong@yahoo.com.cn;

席文明 (1965—), 男, 博士, 副教授, 研究领域为生物操作与微系统集成、机器人学、视觉伺服控制;

孙道恒 (1965—), 男, 工学博士, 博士生导师, 2004.1-2005.12 受 Berkeley Scholarship Program 资助, 作为访问学者于加州大学伯克利分校机械工程系、BSAC 从事 MEMS/NEMS 研究, 研究领域为微纳机电系统 (MEMS/NEMS)。