

学校编码: 10384

学 号: 19920071151180

分类号 _____ 密级 _____

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于视觉控制的细胞自动批量
注射系统研究

Research on Automated Batch Cells Injection System
Based on Visual Control

姚胜强

指导教师姓名: 席文明教授

专 业 名 称: 机械电子工程

论文提交日期: 2010年5月

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()
课题(组)的研究成果,获得()课题(组)
经费或实验室的资助,在()实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,
未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

细胞注射作为基本的生物微操作技术，在转基因、克隆、人工受精、医药研究等方面发挥着重要作用。当前，细胞注射主要以手动或者半自动化的注射方式来完成，但是细胞注射的高度技巧性、复杂性和不稳定性使手动和半自动化注射方式效率低下、重复性差。本文研究一套能够自动批量完成细胞注射的系统，以提高细胞的注射效率和成功率，减轻操作人员的负担。本文的主要工作有以下几个方面：

1. 细胞自动批量注射系统的综述。对细胞注射在生物研究中的作用和现有细胞注射系统以及采用的技术进行综述，引出细胞批量注射系统的研究意义。

2. 细胞批量注射系统的体系结构。介绍系统中各个设备的性能参数以及细胞批量固定芯片的设计和制作。

3. 细胞的自动识别和注射针的识别与跟踪。利用 Canny 算法、椭圆拟合、Hough 变换等图像处理算法识别细胞和注射针，采用基于金字塔的模板匹配实现注射针的实时跟踪。

4. 显微镜自动聚焦研究。对各种清晰度评价算法和自动聚焦搜索策略进行比较，最终采用“Brenner”梯度算法和“爬山二分法”搜索策略实现了显微镜的快速自动聚焦。

5. 显微视觉系统的标定。建立显微视觉模型，利用高精度机械手上的注射针针尖作为标定参考点，进行显微视觉系统的二维标定。

6. 机械手和二维纳米平台的视觉控制研究。提出基于牛顿迭代法的视觉控制方法，通过迭代逼近，实现机械手的精确定位。实验结果表明，基于牛顿迭代法的视觉控制方法满足细胞注射的精度要求。对于二维移动纳米平台的定位，在标定的基础上，采用基于位置的开环控制方法控制其运动。

7. 细胞自动批量注射系统软件实现、软件控制下的单细胞注射实验与批量细胞模拟注射实验。

关键词：细胞自动注射；批量；标定；视觉控制；自动聚焦

ABSTRACT

As a basic technology of bio-micromanipulation, cells injection plays an important role in many research fields, such as transgenics, cloning, artificial insemination, drug development, and so on. Currently, the cells injection is mainly implemented manually or semi-automatically, which results in low efficiency and poor reproducibility, because of cell injection's high technique, complexity, and instability. This paper aims to develop an automated batch system of cells injection to improve the efficiency and reduce the burden on operators. This work focus on the following topics:

1. Review of automated batch cells injection system. The role of cells injection in the biological research, present cells injection systems and related technology are firstly reviewed. Then, the importance of automated batch system of cells injection is introduced.

2. The structure of the automated batch system of cells injection. The capability and parameters of the injection system equipments are introduced. The design and microfabrication of the chip for batch cells immobilization are also described in detail.

3. Cells recognizing, injector recognizing and tracking. The cells and injector are recognized by image processing such as Canny algorithm, ellipse fitting algorithm and Hough transform. And pyramid-based template matching is used for real-time tracking of injector.

4. Auto-focusing research for microscope. Several kinds of sharpness evaluation algorithms and searching strategy are compared for selecting the best ones. At last, the Brenner gradient algorithm and "climbing dichotomy" searching strategy are selected as the best algorithms for the high-speed auto-focusing.

5. Calibration of the micro-vision system. A model of micro-vision system is firstly established. Then the 2D micro-vision system is calibrated with high-precise micromanipulator.

6. Research on visual control of the micromanipulator and the 2D nano-stages. A new visual control based on the Newton iterative method is proposed. By the iterative method, the manipulator can be controlled to approach the objective position precisely. The experiment shows that accuracy of the visual control based on the Newton iterative method meets the needs for cells injection system. Meanwhile, the position-based open loop control is adopted for 2D nano-stages which are used to translate the batch cells immobilization chip.

7. Software implementation for the automated batch cells injection system. The single cell injection experiment and batch cells injection simulation are also implemented with the injection software.

Key Words: Cells automation injection; Batch; Calibration; Visual control; Auto-focusing

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 微操作与微装配系统	1
1.3 细胞自动批量注射系统的研究意义和研究现状	3
1.4 论文研究内容	7
第 2 章 细胞自动批量注射系统的体系结构	9
2.1 引言	9
2.2 机械手系统	10
2.3 二维纳米平台	11
2.4 显微视觉系统	11
2.5 细胞批量固定芯片	12
2.5.1 细胞固定技术.....	12
2.5.2 细胞批量固定芯片设计.....	13
2.5.3 硅片微通孔阵列制作工艺流程.....	14
2.6 小结	15
第 3 章 细胞和注射针的识别与跟踪	16
3.1 引言	16
3.2 细胞识别	17
3.2.1 图像预处理.....	17
3.2.2 边界提取.....	20
3.2.3 椭圆拟合.....	22
3.2.4 细胞识别鲁棒性分析.....	25

3.3 注射针识别与跟踪	26
3.3.1 注射针识别与跟踪方法综述.....	26
3.3.2 注射针识别.....	27
3.3.3 基于模板的跟踪.....	28
3.3.4 模板匹配速度的提高.....	30
3.3.5 模板匹配精度的提高.....	31
3.4 小结	31
第 4 章 显微镜自动聚焦技术的研究.....	33
4.1 引言	33
4.2 自动聚焦原理	34
4.2.1 光学成像模型和失焦原理.....	34
4.2.2 自动聚焦原理.....	34
4.3 清晰度评价算法	35
4.3.1 清晰度评价算法标准.....	35
4.3.2 清晰度评价算法.....	35
4.4 自动聚焦实验	37
4.5 自动聚焦搜索策略	40
4.5.1 搜索策略比较.....	40
4.5.2 爬山二分法自动聚焦搜索实验.....	41
4.6 自动聚焦误差分析与改进	42
4.7 小结	43
第 5 章 显微视觉系统标定.....	44
5.1 引言	44
5.2 传统视觉系统标定方法	44
5.2.1 小孔模型.....	44

5.2.2 传统标定方法.....	47
5.3 显微视觉系统标定	47
5.3.1 显微视觉模型.....	48
5.3.2 显微视觉系统标定原理.....	49
5.3.3 不同放大倍数下的标定方法.....	51
5.3.4 单目显微视觉系统立体操作方法.....	51
5.3.5 显微视觉系统标定实验.....	52
5.4 小结	53
第 6 章 机械手与二维纳米平台的视觉控制.....	55
6.1 引言	55
6.2 视觉控制方法概述	55
6.3 细胞注射系统机械结构分析和视觉控制结构分析	57
6.4 牛顿迭代法数学基础	58
6.4.1 牛顿迭代法的构成.....	58
6.4.2 牛顿迭代法的收敛性.....	60
6.5 基于牛顿迭代法的视觉控制方法	61
6.5.1 视觉控制迭代方程的建立.....	61
6.5.2 图像处理 and 机械手误差对迭代法的影响.....	63
6.6 二维纳米平台控制	64
6.7 基于牛顿迭代法的视觉控制实验	66
6.8 小结	67
第 7 章 细胞自动批量注射系统软件和细胞注射实验	69
7.1 引言	69
7.2 注射系统软件开发平台	69

7.3 注射系统软件架构	70
7.4 任务模块的实现	72
7.4.1 摄像机模块实现.....	72
7.4.2 机械手模块实现.....	73
7.4.3 二维纳米平台模块实现.....	74
7.4.4 用户接口模块实现.....	74
7.5 细胞注射实验	75
7.5.1 单细胞自动注射实验.....	75
7.5.2 批量细胞模拟注射实验.....	76
7.6 小结	77
第 8 章总结和展望	79
8.1 本文的主要成果	79
8.2 工作展望	80
参考文献.....	81
攻读硕士学位期间发表的论文.....	88
致谢.....	89

Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 Foreword	1
1.2 Micro-manipulation and micro-assembly systems	1
1.3 Significance and background of automated batch cells injection system research	3
1.4 Contents	7
Chapter 2 Structure of automated batch cells injection system	9
2.1 Introduction	9
2.2 Manipulator system	10
2.3 2D nano-stages	11
2.4 Micro-vision system	11
2.5 Cells batch immobilization chip	12
2.5.1 Technology of cells immobilization.....	12
2.5.2 Cells immobilization chip desgin.....	13
2.5.3 Chip microfabrication.....	14
2.6 Conclusions	15
Chapter 3 Recognition and tracking for cells and injector	16
3.1 Introduction	16
3.2 Cells recognition	17
3.2.1 Image preprocessing.....	17
3.2.2 Edge extraction.....	20
3.2.3 Ellipse fitting.....	22

3.2.4 Robustness analysis of cells recognition	25
3.3 Injector recognition and tracking	26
3.3.1 Review of injector recognition and tracking	26
3.3.2 Injector recognition	27
3.3.3 Tracking based on template matching	28
3.3.4 Improvement for template matching speed	30
3.3.5 improvement for template matching accuracy	31
3.4 Conclusions	31
Chapter 4 Auto-focusing research of microscope	33
4.1 Introduction	33
4.2 Foundation of auto-focusing	34
4.2.1 Optical projection model and out-of-focus principle	34
4.2.2 Foundation of auto-focusing	34
4.3 Sharpness evaluation algorithm	35
4.3.1 Criterias for Sharpness evaluation algorithm	35
4.3.2 Sharpness evaluation algorithm	35
4.4 Auto-focusing experiment	37
4.5 Searching strategy of auto-focusing	40
4.5.1 Comparision for searching strategy	40
4.5.2 Climbing and dichotomy searching exprement	41
4.6 Analysis and improvement of auto-focusing error	42
4.7 Conclusions	43
Chapter 5 Micro-vision calibration	44
5.1 Introduction	44
5.2 Traditional vision calibration	44

5.2.1 Pinhole model	44
5.2.2 Traditional calibration methods	47
5.3 Micro-vision calibration	47
5.3.1 Micro-vision model.....	48
5.3.2 Micro-vision calibration principle	49
5.3.3 Calibration with different zoom lens	51
5.3.4 3D manipulation with monocular vision.....	51
5.3.5 Micro-vision calibration experiment.....	52
5.4 Conclusions.....	53
Chapter 6 Visual control for manipulator and 2D nano-stages	55
6.1 Introduction.....	55
6.2 Review of visual control methods	55
6.3 Mechanical structure and visual control analysis of cells injection system	57
6.4 Mathematic foundation of Newton iterative method	58
6.4.1 Principle of Newton iterative method	58
6.4.2 Converge of Newton iterative method	60
6.5 Visual control based on Newton iterative method	61
6.5.1 Iterative formation for visual control.....	61
6.5.2 Effect of errors resulting from image processing and manipulator on Newton iterative method.....	63
6.6 Visual control for 2D nano-stages.....	64
6.7 Experiment with visual control based on Newton iterative method	66
6.8 Conclusion	67
Chapter 7 Automated batch cells injection system software and cells injection experiments.....	69

7.1 Introduction	69
7.2 IDE for injection system software	69
7.3 Structure of injection system software	70
7.4 Model achievement	72
7.4.1 Camera model	72
7.4.2 Manipulator model.....	73
7.4.3 2D nano-stages model.....	74
7.4.4 GUI model	74
7.5 Cells injection experiments	75
7.5.1 Singnal cell injection.....	75
7.5.2 Simulative patch cells injection	76
7.6 Conclusions	77
Chapter 8 Conclusions and future works	79
8.1 Main results	79
8.2 Future works	80
Reference	81
Publications	88
Thanks	89

第 1 章 绪论

1.1 引言

有人预言 21 世纪是属于生物技术的世纪，生物技术正为人类的生活带来一场新的革命。细胞注射技术是指把外源物质（比如，DNA、RNA、蛋白质、精子）通过微注射针或者电穿刺等方式注入到个体细胞中，是现代转基因、人工受精、遗传学、医药研究等生物技术的基本手段。由于注射的对象一般是直径介于 10 微米到 1 毫米之间的细胞，加上注射环境的复杂、多变、不稳定，这不仅要求注射系统中的执行机构具有很高的定位精度，也要求系统有相当的智能性。因此，研究能够自动高效完成细胞注射的系统成为很多科学家和企业努力的方向。

1.2 微操作与微装配系统

微操作与微装配是指对细胞与生物组织的操作和对微小器件的装配^[1]。随着科学技术的发展和生产领域的不断扩大，研究的重点由宏观世界逐渐进入微观领域，微操作与微装配成为当今科学技术领域最重要的关键论题之一。传统的微机电系统（MEMS）借助于集成电路工艺，利用蚀刻技术制造微小尺寸的机械器件，如梳状结构、微悬臂梁等。该工艺的第一个好处是能够把微器件制造在硅基材料上，并且很容易跟控制电路集成封装为微电机系统。同时另一好处就是所设计制造微器件能够批量生产，极大地降低成本。但由于受到集成电路工艺的限制，生产出的微机械器件纵深小，一般为二维或者二维半的器件，同时作为单一的加工材料——硅，其力学性质存在很大的缺陷。另一方面，微器件难以封装，不同的对象采取不同的封装方法，很难形成统一的标准，因而成本大大提高。对于制造功能更加强大，结构更加复杂，并由不同材料组成的 MEMS 微器件，这个工艺就不适合了。

为了克服传统集成电路工艺制造微器件存在的缺点，德国科学家发明了 LIGA 技术。它可以制造出真正的三维微器件，同时能够加工金属材料。但所生

产的微器件需要装配后才能形成微机电系统,这就需要精度很高的微操作机器人系统完成装配工作。图 1.1 是利用微装配技术,将传统加工方法生产的微机械器件装配在一起,形成复杂微机械系统。

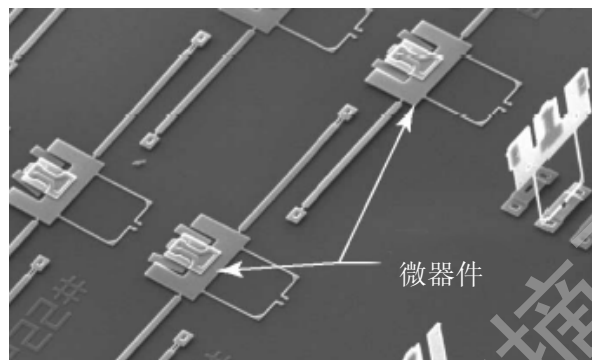


图 1.1 硅微器件的装配

微操作或微装配和宏观的操作或装配最大的不同在于它们的操作对象在尺寸方面的不同,尺寸效应对微对象产生了跟宏观对象有天壤之别的独特现象。在微观下,微器件相互之间或者微器件与机械手之间的粘滞力包括范德华力、静电力、表面张力等占了主导作用。这些作用力远比微器件的重力还大。对于抓取微器件或者移动微器件来说,粘滞力是有利的,但要把微器件放下却是相当困难的,这与宏观情形有很大的不同。这种特性要求微操作系统有特别的机械机构来完成微器件的抓取和释放。目前通常采用两种方法来解决微器件的释放问题:辅助方法和非辅助方法^[2]。微操作系统与宏操作系统的不同还在于系统行为的不同、操作精度的不同、制造与监测手段的不同、操作介质和环境要求的不同^[3]。这些不同都源自于微操作与微操装配对象的微小化引起的物理性质的不同。

微操作与微装配系统涉及到的技术包括:显微视觉控制、微机器人技术、传感器技术、虚拟现实技术等,是一个多学科交叉的领域。近几十年来,无论是发达国家还是一些发展中国家,都在这一领域投入了相当大的研究资金。如从 1991 年开始,日本就实施一个为期十年的微机械技术研究开发计划,共投入 250 亿日元。这些投入对微操作与微装配系统的理论和应用产生了巨大的推进作用,世界各国在不同领域相继推出了各种功能各异的微操作与微装配系统。

细胞自动注射系统是微操作技术在生物工程领域的具体应用,细胞自动批量

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库