

摘要

细胞微注射技术是细胞工程领域应用最广泛的技术之一，而目前国内细胞微注射装备基本依赖进口，价格昂贵，存在刺膜细胞变形大、流动正常性较差、生产率较低等缺点，且并未实现细胞注射自动化。

本文以微流体数字化技术为基础，设计基于压电驱动的数字化细胞微注射仪，通过搭建的数字化细胞微注射仪位移测试实验系统研究驱动波形、电压、频率、倾斜角度、预紧力对微注射仪位移特性的影响规律，进一步研究数字化细胞微注射仪用于细胞微注射的可行性。并提出注射微针制备装置拉针仪的设计方案，进行原理实验验证和拉针参数控制研究。

本文设计的数字化细胞微注射仪通过软件控制驱动波形、电压、频率等参数的变化来实现细胞注射快速进退针及注射操作，该方法避免了直接对结构进行调整以适应不同的操作要求，简单可靠，易于实现细胞注射自动化。实验结果表明，数字化细胞微注射仪具有刺膜细胞变形小、流动正常性好、注射分辨率高的优点。设计的拉针仪系统稳定性高、重复性好，能够拉制出符合要求的注射针。参数控制实验分析表明，应在有效的范围内减小加热时间和加热长度，提高加热电压。

关键词：细胞微注射；微流体数字化；压电驱动器；数字化微注射

Abstract

Cell Microinjection is one of the technologies widely used in the domain of Cell Engineering. However, the domestic equipment of cell microinjection now is totally depended on the foreign companies whose products are very expensive and inferior in cell distortion, flow stability and productivity. Furthermore, their products haven't realized the automation of cell microinjection.

Based on the Digital Microfluidic Technology, a cell microinjection device is designed, driven by piezoelectric actuation. Digital microinjection displacement testing experiment system is builded to research the influence of drive wave, voltage, frequency, gradient degree and impacted force. Furthermore, the cell microinjection experiment system is builded to research the effect of the microinjection device. In addition, a design scheme is presented to develop a micropipette puller, in order to fabricate good cell injection pipette.

By controlling the change of drive wave, voltage and frequency with soft, the cell microinjection device can well realize not only the rapid movement of pipette's going ahead and back, but also the microinjection manipulation. The device avoids direct adjustment to the structure, which makes it easy to realize the automation of cell microinjection. The results indicate that the device makes less distortion to the cell when penetrating into it. Also the device has a better flow stability and a higher resolving power of injection. The micropipette puller system designed in the paper can fabricate good cell injection pipette with high stability. The results indicate that it's better to increase the heat voltage and reduce the heat time and length in a proper range.

Keywords: cell microinjection, digitalization of microfluids, piezoelectric actuation, digitalization of microinjection

图表目录

图表编号	图表名	页码
图 1.1.1	手动微注射仪原理	4
图 2.2.1	压电驱动机构的移动原理	9
图 2.2.2	驱动电压波形	10
图 2.3.1	“惯性体—移动体”运动系统的动力学模型	10
图 2.3.2	水平急速伸长时动力学参照系	12
图 2.3.3	PZT 压电陶瓷在长度方向上加速度梯度	13
图 2.3.4	PZT 压电陶瓷在长度方向上速度梯度	14
图 2.4.1	数字化细胞微注射仪结构	15
图 2.4.2	压电陶瓷驱动器的联接	16
图 2.4.3	细胞注射针联接件	16
图 2.4.4	CETC 二十六所 WTYD 型压电陶瓷	17
图 2.4.5	WTYD 型压电陶瓷电压一位移特性	17
图 2.4.6	位移系数与惯性体 (m)、移动体质量(M)关系	18
表 2.4.1	装置关键零部件质量	18
图 2.4.7	持针器约束示意图	19
图 2.4.8	持针器弹性变形	19
图 2.4.9	数字化细胞微注射仪设计图	20
图 3.1.1	数字化细胞微注射仪进退针位移特性测试实验系统原理图	21
图 3.1.2	参数设置和发送模块界面	22
图 3.1.3	数字化细胞微注射仪	22
图 3.1.4	细胞注射微针外观图	23
图 3.2.1	注射针临界注射角度示意图	23
图 3.2.2	微注射针临界注射角度与微针半锥度、细胞半径的关系	24
表 3.3.1	不同倾斜角度下进针单步位移实验数据	25
表 3.3.2	不同倾斜角度下退针单步位移实验数据	25
表 3.3.3	不同倾斜角度下进针实际单步位移	25
表 3.3.4	不同倾斜角度下退针实际单步位移	25
图 3.3.1	倾斜角度与单步位移关系	25
表 3.3.5	不同预紧力下测得的机构单步位移数据	26
表 3.3.6	不同预紧力下机构实际单步位移数据	26
图 3.3.2	单步位移与预紧力关系曲线	27

图 3.4.1	电压驱动波形	27
表 3.4.1	进针波形、电压与单步位移的实验数据	28
图 3.4.2	进针驱动波形 a, b 的位移驱动特性	28
图 3.4.3	进针驱动波形	28
表 3.4.2	退针波形、电压与单步位移的实验数据	29
图 3.4.4	退针驱动波形 a, b 的位移驱动特性	29
图 3.4.5	退针驱动波形	30
图 3.5.1	单步位移与驱动电压线性关系曲线	30
表 3.5.2	驱动频率与进退针速度关系实验数据	31
图 3.5.2	驱动频率与进退针速度实验值曲线	32
图 4.1.1	注射驱动波形	33
表 4.1.1	注射波形 a, b 在不同电压下测得的机构单步位移数据	33
图 4.1.2	注射波形 a, b 位移特性曲线	34
图 4.2.1	细胞微注射实验系统	34
图 4.3.1	细胞注射过程	35
图 4.3.2	刺膜瞬间细胞变形对比图	36
图 5.1.1	微注射针外形图	38
图 5.2.1	无预紧力拉制微针原理图	40
图 5.3.1	拉针实验系统图	41
图 5.3.2	加热丝电路	41
表 5.3.1	加热丝参数与加热时间的关系	42
图 5.3.3	加热丝功率与电阻函数曲线图	42
表 5.3.2	加热长度与微器件内径的关系	43
表 5.3.3	加热电压与微针内径的关系	44
图 5.3.4	加热电压与加热时间的关系	44
表 5.3.4	加热时间与微器件内径的关系	45
表 5.3.5	微针内径与加热电压的关系	46
表 5.3.6	半锥度与加热电压的关系	46
图 5.3.5	微针内径与加热电压关系实验数据散点图	47
图 5.3.6	微针半锥度与加热电压关系实验数据散点图	47
表 5.3.7	微针内径与加热时间的关系	47
表 5.3.8	半锥度与加热时间的关系	48
图 5.3.7	微针内径与加热时间关系实验数据散点图	48
图 5.3.8	微针半锥度与加热时间关系实验数据散点图	48

表 5.3.9	微针内径与加热长度的关系	49
表 5.3.10	半锥度与加热长度的关系	49
图 5.3.9	微针内径与加热长度关系实验数据散点图	49
图 5.3.10	半锥度与加热长度关系实验数据散点图	49
表 5.3.11	控制参数相关性分析结果	50
图 5.3.11	微针针尖外形图	51
表 5.3.12	两种装置拉制的微针内径值对比	51
图 5.3.12	重力拉针仪原理图	52
图 5.3.13	电缸外形及参数图	53

声 明

本学位论文是我在导师的指导下取得的研究成果，尽我所知，在本学位论文中，除了加以标注和致谢的部分外，不包含其他人已经发表或公布过的研究成果，也不包含我为获得任何教育机构的学位或学历而使用过的材料。与我一同工作的同事对本学位论文做出的贡献均已在论文中作了明确的说明。

研究生签名: 岳伟 2008 年 6 月 20 日

学位论文使用授权声明

南京理工大学有权保存本学位论文的电子和纸质文档，可以借阅或上网公布本学位论文的部分或全部内容，可以向有关部门或机构递交并授权其保存、借阅或上网公布本学位论文的部分或全部内容。对于保密论文，按保密的有关规定和程序处理。

研究生签名: 岳伟 2008 年 6 月 20 日

1 绪论

1.1 细胞工程概述

细胞工程是指应用细胞生物学和分子生物学的方法，通过类似于工程学的步骤，在细胞整体水平或细胞器水平上，按照人们的意愿来改变细胞内的遗传物质以获得新型生物或特定细胞产品的一门综合性科学技术。

细胞工程涉及的领域十分广泛。根据研究对象可以将细胞工程分为微生物细胞工程、植物细胞工程和动物细胞工程三大类。从研究水平来划分，细胞工程可分为细胞水平、组织水平、细胞器水平和基因水平等几个不同的研究层次。就其技术范围而言，主要包括细胞培养、组织培养、细胞融合、细胞拆合、染色体操作、胚胎移植、细胞核移植等。

总体来说，细胞工程的应用主要体现以下四个方面：创造新物种；优良物种的快速繁殖与保护；相关产品的制备，包括有用代谢产物、人工组织或器官、生物能源；在遗传学、发育学等领域的应用。具体而言，细胞工程的一些主要研究领域包括：新型物种的培育、优良动植物的快速繁育与资源保存、植物细胞培养生产代谢产物、多倍体育种、试管动物、动物制药、干细胞、组织修复、器官培养、细胞工程能源等^[1]。

1.2 细胞微操作技术

细胞的大小在微米级尺度，在细胞克隆、细胞杂交、染色体及胚胎移植等细胞操作中必须借助显微手段，采用微工具进行。这种显微条件下进行的操作称为微操作（Micromanipulation），其操作空间是微米级的三维微空间。

根据不同的要求微操作有多种形式，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^[2]，用微操作对细胞进行解剖手术、人工受精、细胞核移植、基因注入、细胞内微量注射等。目前，经常用到的细胞微操作技术主要包括细胞核移植、细胞内药物注射、细胞核内DNA注射、胚胎注射及细胞单个分离等，例如多莉羊就是运用细胞核移植技术而成功的。将外源物质导入细胞是细胞显微操作中使用非常频繁的操作过程。

将外源物质导入细胞的方法很多，常见的有微注射（Microinjection）、电穿孔、钙沉淀、脂质体转染等。电穿孔是将细胞、原代培养物混合在培养基中，在直流电场作用的瞬间，细胞膜表面产生疏水或亲水的纳米级微小通道，这种通道能维持几毫秒到几秒，然后自行恢复。在此期间生物大分子如DNA可通过这种微小的孔道进入细胞。钙沉淀法（以磷酸钙沉淀法为例）是基于磷酸钙/DNA复合物的一种将DNA导入真核细胞的转染方法。磷酸钙有利于促进外源DNA与靶细胞表面的结合。磷酸钙

/DNA 复合物黏附到细胞膜并通过胞饮作用进入靶细胞^[3]。脂质体转染法是在体外进行细胞培养转染，转染试剂与靶细胞作用必须长达数小时，能得到很高的外源基因表达效率。微注射是利用玻璃微针刺入细胞，用药物注射的方式将原代培养物质导入细胞，是最常见、最简单有效的操作方法。

1.2.1 细胞微注射技术

细胞微注射技术是在显微环境下，通过机械的方法使微注射针穿刺细胞膜，将外源基因物质注入细胞核或细胞质内，培育成带有目的基因特征个体的技术。该技术广泛应用于原核内基因显微注射、体细胞核移植克隆动物、卵母细胞极体重组、单精子显微注射技术 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 等转基因动物生产领域。

微注射技术的优点^[4,5]：

- 对于原代培养物对培养基的变化特别敏感的细胞，微注射是 DNA 转移实验中唯一可行方法。电穿孔、脂质体转染等方法中原代培养物与培养基是混合的，要求原代培养物对培养基变化不敏感。
- 微注射只需要少量的样品，不需要制备和纯化大量昂贵的 DNA、抗体或重组蛋白质等，节约大量的成本和时间。电穿孔、脂质体转染等方法中需要大量的原代培养物。
- 微注射技术可以通过注射入细胞内的样品量估计出每个细胞所注入的分子数量。可以同时或连续向一个细胞注射两种或两种以上的样品，还可以将注射到细胞中的样品重新取出细胞再次注入同样的样品或不同的样品。微注射可以与细胞的前期、同期和后期处理相结合，以便达到最佳效果。
- 如果与免疫荧光法、原位杂交法或 PCR 法等敏感的分析技术相结合，注入样品的作用可以在单细胞水平上得到测定。
- 微注射可以实现两个细胞内的主要成分细胞核和细胞质直接接触，可以精确改变单个细胞或两个细胞的内环境和培养环境。
- 微注射可以向细胞注射 DNA、RNA，注射核酶、抗体、蛋白质、提纯的细胞器及其他天然或合成物。注射后可很快得出实验结果。

微注射技术的局限性：

- 微注射需要逐个进行细胞操作，就目前的微注射技术发展情况，每次实验时只能研究有限的细胞，一般仅限在几百个左右。
- 当针头穿过细胞膜或核膜时，微注射会给细胞带来一定程度的损伤，可能引起细胞局部离子强度及渗透压的改变。

微注射细胞膜穿刺是细胞注射关键操作之一，细胞膜穿刺过程是微米级的移动，不同性质的细胞膜要求不同的微针穿刺运动特性，例如弹性较大的细胞膜要求微针以较大的加速度刺入才能刺破细胞膜，而较硬的细胞膜则需要以较缓慢的速度刺入以避免产生细胞膜的损伤。在细胞微注射过程中，微注射的量一般要求不超过细胞总体积的 20%，要求微注射量分辨率在纳升 ($10^{-9}L$) 至皮升 ($10^{-12}L$) 甚至更高^[6]，对微注射量的可控性提出了较高的要求。

目前，定量微注射常用的有如下几种方法^[7]：

(1) 包被针尖法

在包被针尖方法中，将针尖（密闭针）浸到即将导入到细胞的物质溶液中。然后将浸蘸有样品液的微注射针刺入细胞，样品在细胞质中溶解。这种方法虽然既快又简单，但对实际导入细胞中样品的量是难以控制的。

(2) 被动注射法

在被动注射法中，针中充满注射溶液。溶液的填充是依赖虹吸的作用，即将针管末端插入溶液中使其针头充满溶液。也可将针头置于一定体积的样品中，使针的开放端由于虹吸作用而充满。将针刺入细胞中，样品被动地注入细胞中。这种方法避免了包被针尖方法所遇到的许多问题，包括由于针尖干燥使样品变性问题。另一个优点是导入到细胞中的物质的浓度是已知的，但控制注射的量极为困难。这是由于时间、位置以及导入样品进入细胞的速度无法精确控制。

(3) 直接压力法

相对于以上两种方法而言，直接压力法微注射应用较为广泛。它对大量的特异分子如细胞骨架蛋白质是很有效的。这种方法有如下两种不同的方式：

- 恒定流动微注射

恒定流动微注射方法最初是由 Graessman 开发成功的。他提出将相对恒定量的物质导入到生长于玻璃器皿的培养细胞中。注射物质的量取决于注射液中样品浓度、通过针尖的速度和针尖停留在细胞质中的时间。然而由于要精确的测定样品溶液流过针尖的速度有一定困难，因此难以精确测定最后注射入细胞中的溶液量。另该方法所需注射物质较多，因此对于十分宝贵的样品是不适合的。

- 气压脉冲流动注射

气压脉冲流动注射方法可能是当前最为广泛使用的方法。其主要原理是利用压力控制装置导入可控的脉冲气流来驱动一小份溶液通过针尖，从而实现定量注射。但由于气体的可压缩性导致流动正常性、注射量可控性较差。

南京理工大学微系统研究室提出的微流体数字化细胞微注射方法具有分辨率高, 可达飞升级, 扰动性好、流动阻力低等优点^[8,9]。

1.2.2 细胞微注射装备

细胞基因工程受到微注射装备这个瓶颈在自动化程度、成功率和生产率方面的制约。目前手动式微注射装备在国外已实现商品化生产, 著名制造厂商有美国的 Sutter 公司、日本的 Nikon 公司及 Narishige 公司、德国的 Eppendorf 公司等。微注射装备由微操作器、微注射仪和注射配套微工具制造仪组成。目前我国各个生物实验室都购买上述产品进行微注射工作。

各国制造的微操作器结构差别不大, 以日本尼康 NT-88NE 手动微操作器为例, 在细胞定位、寻找、接近技术上采用在倒置显微镜上安装两套手动机械式粗调和手动式液压微调机构分别控制吸持针和注射针, 由安装在显微镜上的高分辨率摄像头采集微针和细胞的图像通过计算机屏幕观察, 也可直接在显微镜的目镜上观察, 靠粗调旋钮和微调手柄进行空间三维操作。具有高放大倍数和高分辨率的显微镜将细胞注射图片放大, 由固定在显微镜上的摄像头 (CCD) 摄取检测图像并经图像采集卡 A/D 转换成数字信号, 由计算机软件对数字图像进行数字信号处理, 得到所需的各种目标图像特征值, 实现模式识别、坐标计算、灰度分布图等多种功能, 完成细胞注射的监控和精确检测定位。

手动微注射仪均采用传统的活塞原理, 以气体或液体作为压力传导介质, 如德国 Eppendorf 公司的手动微注射仪, 结构原理图见图 1.1.1。

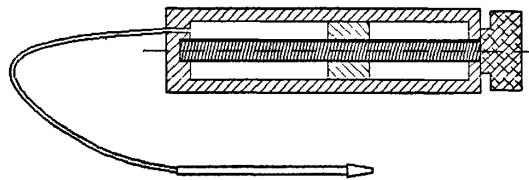


图 1.1.1 手动微注射仪原理

尽管手动注射已成为细胞微注射的常规方法, 但手动注射方法成功率低, 药物易被污染, 操作者的技能和经验成为注射成功与否的关键性因素, 操作技能的培训耗时长, 人工操作稳定性差^[10]。同时由于气体的可压缩性及压力传输管道的膨胀性, 微流动正常性差, 易出现无流量或流量过大胀破细胞的现象, 导致难以精确的控制注射量。

在国外从 20 世纪八十年代以来一直在开展对细胞微操作的自动化技术研究, 目的是充分利用计算机视觉和智能控制等先进技术, 研制出能够自动完成操作过程的微注射系统。自动化细胞注射涉及到细胞的捕捉、定位、刺膜、注射等关键环节, 国外相继研制出了一些各具特色的微操作机器人实验样机系统。

日本 Junko Sakiyama 等人开发了基于立体显微镜的视觉反馈伺服系统, 以提高运动和刺膜精度, 减小微注射对人工的依赖程度^[11]。

为解决微注射效率较低的问题日本 Satoru Sakai, Sachihiro Youoku 等人提出了一种可以同时捕捉许多细胞的微注射系统, 通过在硅基底上加工的微孔阵列同时吸持多个细胞, 然后逐一注射^[12]。

韩国的 Jea-Hong Shim, Sung-Yong 等人提出了一种基于三维重建技术的视觉引导微注射系统。该系统克服了二维图像易导致人工操作失准及细胞受损等问题^[13]。

美国明尼苏达大学的 Sun Yu 和 Bradley J.Nelson 提出了用于胚胎生殖领域的微注射系统, 该系统利用视觉伺服技术搜寻捕捉细胞, 注射终端装有反馈注射作用力的微型力传感器, 该微型力传感器由 MEMS 技术制造, 该系统为视觉引导手动注射, 且成本昂贵^[14]。

德国和西班牙的 F.Tagliareni, J.Brufau 等人提出了用于细胞注射的微机器人系统, 采用数个微型机器人分别完成细胞的捕捉、吸持和注射, 可连续注射 100 至 1000 个细胞, 机器人与主机通过红外无线通信, 但该系统尚处于实验阶段^[15]。

尽管国外有一些不同类型的微注射机器人的出现, 但实质上并未实现细胞注射的自动化, 仍依赖于人工的操作来实现各个环节的统一, 例如广为采用的气压脉冲流动注射系统其特点是微注射时通过对注射压力及注射时间的精确控制来实现对注射量的控制, 适合注射量在飞升至 100 皮升的显微注射操作^[16]。其工作压力可达 0.7Mpa, 气体的可压缩性及压力控制装置对脉冲时间的滞后反应特性导致流动正常性较差, 且该装置装载注射液操作不便, 每次装载可注射细胞数量较少, 生产率较低。

细胞刺膜是细胞微注射的关键环节之一, 细胞变形太大会对损伤细胞的活性, 目前商品化的细胞注射设备的细胞刺膜操作基本分为手动和电动两种, 手动刺膜通过精密液压泵来实现注射针的微进给刺膜, 但该原理难以产生较大的速度和加速度, 刺膜时细胞变形量大, 容易损伤细胞。有研究人员采用 MEMS 技术加工的微型力传感器来感知刺膜时力的变化并反馈到人手的触觉^[14], 但该方法成本昂贵, 效果不够理想, 仍在进一步研究中; 电动方式刺膜采用精密步进电机控制注射针的微进给刺膜, 但受步进电机运动精度影响, 注射针位移难以精确控制, 且步进电机在微米级的运动中难以产生较大的速度与加速度, 刺膜时细胞变形量依然较大。

相比较而言, 在国内, 关于细胞微注射方面的研究尚处于初级阶段, 南开大学机器人与信息自动化研究所主要对细胞染色体切割的微操作机器人进行了一定的研究, 并且取得了一定的成绩, 其主要工作是基于视觉控制的研究^[17,18]。中科院长春光机所以立体显微镜为核心, 建立了立体视觉系统, 主要用来显示微操作的动态过程。系统由体视显微镜、左右 CCD、监视器、液晶眼镜和控制电路构成。在控制电路的控制

下, 将左右两个光路的图像分别交替地显示在监视器上, 同时控制观察者配戴的液晶眼镜与监视器上显示的图像同步, 两眼观察到不同的图像, 观察者就可以感觉到立体效果^[19]。南京理工大学微系统研究室主要集中于基于微流体数字化技术的压电驱动微注射机器人系统及其装备的研究。

细胞注射针作为细胞注射的关键器件, 其参数对注射效果有着直接的影响, 目前国内其制作工具拉针仪基本依赖进口, 而国外拉针仪的售价约在 3000 美元左右, 配售专用拉针所需的毛细玻璃管单只售价近 5-7 元人民币, 且所售拉针仪在拉制微针时拉制参数是根据该配售毛细玻璃管材料及规格制定的, 当我国用户试图利用该拉针仪拉制国产毛细玻璃管时往往达不到微注射针的要求, 且微操作成功率仅 10% 左右, 对微针需求量大, 因此拉针仪的国产化是一个紧迫必要的课题。

1.3 课题来源及研究内容

1.3.1 课题来源

- 教育部博士学科点专项科研基金项目“物质数字化中微特性系统及合理流动形态的理论基础”(项目编号: 20060288005)
- 江苏省自然科学基金项目《物质数字化微传输-转化用微流体器件设计与制造基础》(项目编号: BK2007209)

1.3.2 研究内容

- (1) 数字化细胞微注射原理分析; 数字化细胞微注射仪结构设计、分析计算、零部件的选型、加工与装配。
- (2) 搭建数字化细胞微注射仪位移特性测试实验系统; 驱动波形编制; 驱动波形、电压、频率等参数对细胞微注射仪进退针位移特性的影响, 以及微注射仪倾斜角度、弹簧预紧力等参数对进退针位移特性影响的实验研究。
- (3) 搭建数字化细胞微注射实验系统; 驱动波形、电压、频率等参数对细胞微注射仪注液位移特性影响的实验研究; 数字化细胞微注射仪微注射效果的实验研究。
- (4) 细胞注射微针的制备方法研究; 注射微针制备装置拉针仪设计; 拉针仪设计方案的实验验证和优化。

2 基于微流体数字化技术的数字化细胞微注射仪设计

本章阐述数字化细胞微注射仪的技术背景和原理, 对工作原理作理论分析计算, 在此基础上设计数字化细胞微注射仪结构, 根据理论计算确定各零部件参数并对结构进行刚度校核, 以保证结构设计的可行性。

2.1 微流体数字化技术

本论文研究起点是南京理工大学微系统研究室章维一、侯丽雅两位教授发明的、拥有自主知识产权的“微流体数字化技术”。对于章维一、侯丽雅发明的“微流体数字化技术”原创性和先进性, 在江苏省科技厅于 2004 年 3 月 23 日主持的“微流体系统数字化技术”鉴定会上作了肯定(苏科鉴字[2004]第 145 号)。鉴定意见认为:“‘微流体系统数字化技术’的研究在基本概念和理论上有原创性, 为建立与信息数字化、能量传输及固体运动数字化有等同意义的物质传输数字化开辟了道路, 对微流体系统的研究和技术进步有重要意义; 该项研究总体达到国际先进水平。”

“微流体数字化技术”被《科技导报》(中国科学技术协会会刊)遴选为“2004 年中国科学、技术与工程重大进展”^[20]。

国家科学技术部基础研究司科技部高技术研究发展中心 2004 年 4 月 25 日编辑的《基础科学研究快报》第 4 期(总第 150 期)上的国内研究栏目中以“新微流体数字化技术可使液滴量分辨率达到飞升级”为题报道了这一研究成果。

“微流体数字化技术及其应用”于 2007 年 10 月在深圳召开的第九届中国国际高新技术成果交易会被评为“优秀产品奖”。

“微流体数字化技术”的原创技术特征如下: 方法上以脉冲为微流动基本形态; 以脉冲当地惯性力为主动力; 以脉冲波形、频率、幅值、相位、波数、波序列为驱动-控制-扰动参量; 装置上既无微可动件又无嵌入式微电路; 以外部宏驱动器影响微流道内部流动。性能上: 适用流体广, 包括各种液体和粉体; 流动分辨率高达飞升级; 脉冲量规整、序列可控的数字化流动; 可靠性高、抗固粒堵塞、气泡阻断; 工作条件利于保持生物活性; 结构简单、成本低^[8,21,22]。

2.2 压电驱动器

2.2.1 压电与电致伸缩效应

对某些压电晶体施加机械力, 晶体内部正负电荷中心发生相对位移并产生极化, 导致晶体两端表面出现符号相反的束缚电荷, 其电荷密度与外机械力成正比, 这种现

象称为正压电效应。当把具有正压电效应的压电晶体置于电场中，电场的极化作用引起晶体内部正负电荷中心产生相对位移，而导致晶体发生形变，这种由电场产生形变的现象称为逆压电效应。正压电效应和逆压电效应总称为压电效应。逆压电效应数学表达式为：

$$S_3 = S_{33}T_3 + d_{33}E_3 \quad (2.1)$$

式中 S_3 —伸缩应变； S_{33} —弹性顺度系数； T_3 —作用应力； d_{33} —压电效应常数； E_3 —作用电场强度。

压电晶体在电场的作用下，还有另外一种效应—电致伸缩效应。即压电晶体在电场的作用下，由于感应极化作用而引起的应变，应变大小与电场平方成正比，与电场方向无关。对于压电晶体，当只受到外电场作用时，应变是由上述两种效应叠加的结果，即具有机电耦合效应。因此，压电晶体在外电场的作用下，应变与电场的关系为 [23,24]：

$$S = dE + ME^2 \quad (2.2)$$

式中： dE —逆压电效应； ME^2 —电致伸缩效应； d —压电系数 (m/V)； M —电致伸缩系数 (m^2/V^2)； E —电场 (V/m)； S —应变。

逆压电效应仅在无对称中心晶体中才有，而电致伸缩效应则在所有的晶体中都有。但很多压电材料如石英、罗息盐等的压电系数比电致伸缩系数大几个数量级，结果在低于 1×10^6 V/m 的电场作用下只有第一项，即逆压电效应。

压电驱动器由压电晶体制造的，可以将压电体的逆压电效应产生的变形直接作用于从动件，使从动件产生变形或位移而实现机械驱动或机械控制。

压电驱动器具有极高的灵敏度，电压上极微小的变化可以被转换成非常平滑的变形，其最小变形量可以达到亚纳米级，相对变形量很少超过 1/1000。压电驱动器可以产生较大的力，高达 10000N，且具有极快的响应特性，可以达到微秒级，另外，压电驱动器具有稳定的性能和很长的使用寿命。因此，压电驱动器非常适用于每次循环机械位移非常小的器件^[25]。

本研究论文中涉及应用的都是堆栈式 PZT 压电陶瓷驱动器(PZT stack actuator)，论文以下部分下列相关名词等价：

PZT 压电陶瓷，堆栈式压电陶瓷，压电驱动器。

2.2.2 机构移动原理

机构的移动原理如图 2.2.1。移动体置于一个水平平面上，摩擦力保持不变，在垂直的端面上惯性体通过压电元件与之联接成一刚性整体。通过计算机控制驱动电路，给压电元件施以一定形式的电压波形，利用压电元件的“伸长—收缩”变形引起移

动体在某一方向上步进式移动^[26]。

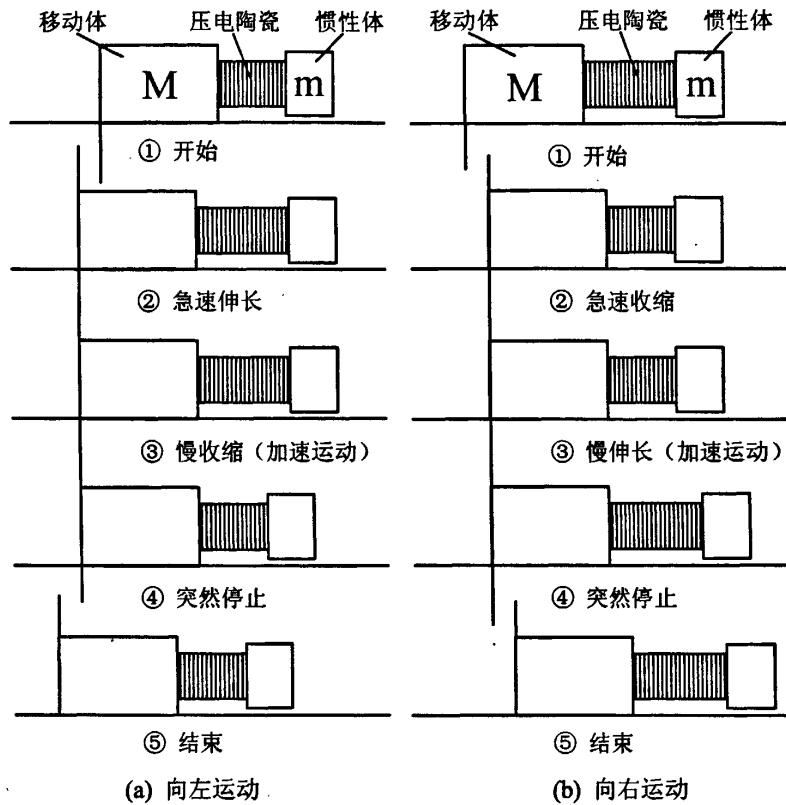


图 2.2.1 压电驱动机构的移动原理

- 向左驱动时（如图 2.2.1(a)所示）

- (1) 压电陶瓷在一定的初始状态（零电压或某基础电压）开始；
- (2) 跳变电压使压电陶瓷急速伸长，惯性体快速向右移动，同时移动体克服静摩擦力向左移动；
- (3) 驱动电压逐渐减小，压电陶瓷收缩，移动体向左移动并不断得到加速。
此时静摩擦力足以阻止移动体向右移动；
- (4) 压电陶瓷的收缩突然停止；
- (5) 由于惯性体具备一定的速度，从而冲击移动体向左又克服摩擦力移动一定距离，最后机构整体停止运动。

- 逆方向（向右）驱动

如图 2.2.1(b) 所示，只要将上述步骤中的“伸”与“缩”的关系反过来，则同样可以引起机构整体逆方向（向右）移动。

- 驱动电压波形

为了得到上述运动要求, 设计了驱动波形如图 2.2.2 所示。

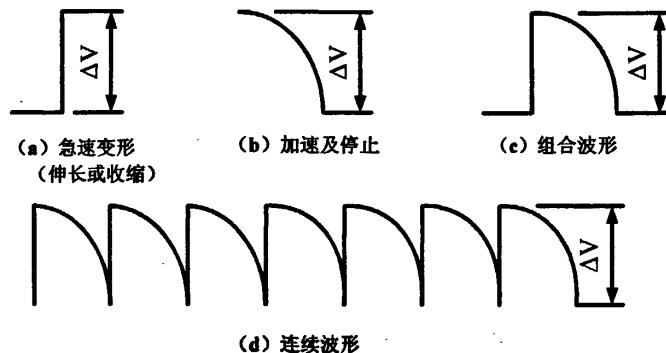


图 2.2.2 驱动电压波形

2.3 移动原理分析

● 动力学模型的建立

系统的动力学模型如图 2.3.1 所示:

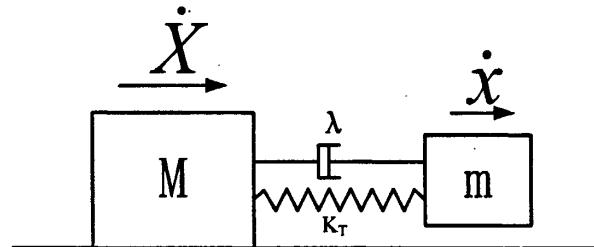


图 2.3.1 “惯性体—移动体”运动系统的动力学模型

参数及变量的定义如下:

m 、 x 、 \dot{x} 、 \ddot{x} 为惯性体质量、位移、速度、加速度; M 、 X 、 \dot{X} 、 \ddot{X} 为移动体质量、位移、速度、加速度; λ 、 K_T 为压电元件闭路、小信号操作时的阻尼系数、刚度。

另外定义 m_{PZT} 为压电陶瓷的质量, μ_0 、 μ 为移动体与接触平面的静、动摩擦系数; $\Delta L(t)$ 为压电元件在 t 时刻自然长度的变化量。

● 惯性体运动方程式

实际描述阻尼力很困难, 但理想阻尼模型仍能满足反应预测的结果^[27]。其数学模型为:

$$F_d = c\dot{x} \quad (2.3)$$

式中: c —正比常数; \dot{x} —运动速度。

对惯性体而言，其运动方程式可描述为：

$$m\ddot{x} + \lambda(\dot{x} + \dot{X}) + K_T[x - X - \Delta L(t)] = 0 \quad (2.4)$$

这正好与激振动外力 $F(t)=0$ 时的自由阻尼振动(free damped vibration)在系统具有两个自由度(x 、 X)时相吻合。自由阻尼振动时，在阻尼作用下，系统能量衰减。但是在压电位移系统中由于有 $\Delta L(t)$ 项存在，使得系统能量得以不断补充。 $\Delta L(t)$ 与工作信号放大器输出的驱动波形有关。因此惯性体运动为 2 自由度非线性振动系统^[27]。

当 $X=0$ 时，运动方程满足描述非线性系统振动的微分方程的一般形式：

$$\ddot{x} + f(\dot{x}, x, t) = 0 \quad (2.5)$$

- 移动体运动方程式

按摩擦状态分为两种情况：

(1) 静止时

此时，移动体不能克服静摩擦阻力而产生位移因此同时满足：

$$\begin{cases} \dot{X} = 0 \\ \lambda(\dot{x} - \dot{X}) + K_T[x - X - \Delta L(t)] < \mu_0(M + m + m_{PZT})g \end{cases} \quad (2.6)$$

故其运动方程式为：

$$M\ddot{X} = 0 \quad (2.7)$$

(2) 动摩擦状态时

因为式 (2.6) 不满足，故其运动方程式：

$$M\ddot{X} = \lambda(\dot{x} - \dot{X}) + K_T[x - X - \Delta L(t)] - \mu_0(M + m + m_{PZT})g \cdot \text{sign}(\dot{X}) \quad (2.8)$$

式 (2.8) 中 $-\mu_0(M + m + m_{PZT})g \cdot \text{sign}(\dot{X})$ 项表示动摩擦力与移动体运动速度 \dot{X} 方向相反。

- 跳变—抛物线电压信号产生的位移

这里只计算图 2.2.1 (a) 的情形，(b) 的计算方法与之类似，不再计算。

1) 压电陶瓷驱动电压为图 2.2.2 (a) 所示波形时 (跳变电压)

驱动电压在瞬时产生跳变 ΔV 时，PZT 压电陶瓷达到与跳变电压 ΔV 所对应的名义位移的时间 T_{\min} ：

$$T_{\min} \approx \frac{1}{3f_0} \quad (2.9)$$

式中： $f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K_T}{m_{\text{eff}}}}$ ， $m_{\text{eff}} = \frac{m_{PZT}}{3}$ 。

而此时压电陶瓷可产生的力为：

$$F_{\max} = K_T \cdot \Delta L \quad (2.10)$$

移动体与基平面之间的摩擦力（以静摩擦力计算）为：

$$f = \mu_0 (M + m + m_{PZT}) g \quad (2.11)$$

可以发现移动体与基平面之间的摩擦力与 PZT 压电陶瓷产生的力相比极小，其影响可忽略不计。因此在水平方向可以运用质心运动守恒定律。由于 m_{PZT} 相对 M、m 不可忽略，建立动力学参照系如图 2.3.2。

PZT 压电陶瓷伸长前的质心的坐标如图 2.3.2 (a) 所示为：

$$x_{c1} = \frac{Ma + m_{PZT}(a + \frac{L}{2}) + mb}{M + m_{PZT} + m} \quad (2.12)$$

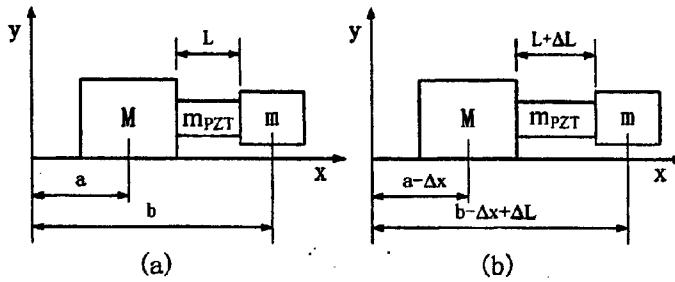


图 2.3.2 水平急速伸长时动力学参照系

PZT 压电陶瓷伸长前的质心的坐标如图 2.3.2 (b) 所示为：

$$x_{c2} = \frac{M(a - \Delta x) + m(a - \Delta x + \frac{L + \Delta L}{2}) + m(b - \Delta x + \Delta L)}{M + m_{PZT} + m} \quad (2.13)$$

由质心运动守恒定律，质心在 x 轴上坐标不变，即 $X_{c1} = X_{c2}$ 有：

$$Ma + m_{PZT}(a + \frac{L}{2}) + mb = M(a - \Delta x) + m(a - \Delta x + \frac{L + \Delta L}{2}) + m(b - \Delta x + \Delta L) \quad (2.14)$$

解得：

$$\Delta x_1 = \frac{m + \frac{1}{2}m_{PZT}}{M + m_{PZT} + m} \Delta L \quad (2.15)$$

2) 压电陶瓷驱动电压为图 2.2.2 (b) 所示波形时（抛物线）

在图 2.2.1 中 (a) ③阶段，压电陶瓷收缩，惯性体向左运动而移动体静止。此时，惯性体和 PZT 压电陶瓷加速运动而产生的惯性力应小于移动体与基平面之间的摩擦力（我们对系统略作简化，使 $\mu = \mu_0$ ）。

压电陶瓷对惯性体所产生的惯性力为：

$$F_m = ma \quad (2.16)$$

式中: a —移动体的加速度

在惯性体加速度为 a 时, 假设移动体静止。对于 PZT 压电陶瓷而言在 $0-L$ 的长度方向上加速度存在梯度, 如图 2.3.3 所示。

设微分长度质量为 m_i , 在 x 处加速度为 a_i , PZT 压电陶瓷在 L 处的加速度与惯性体的加速度相同, 为 a 。收缩时若在时间 t 内产生的位移为 ΔL , 且有:

$$\Delta L = \frac{1}{2}at^2 \quad (2.17)$$

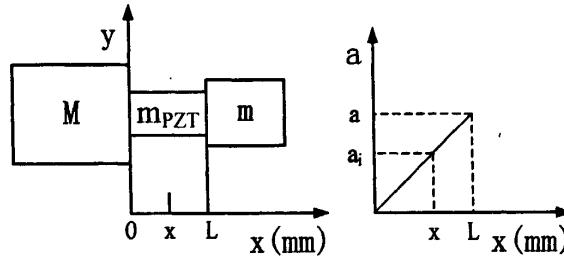


图 2.3.3 PZT 压电陶瓷在长度方向上加速度梯度

同时 x 处产生的位移为 $\frac{x}{L}\Delta L$, 且有:

$$\frac{x}{L}\Delta L = \frac{1}{2}a_i t^2 \quad (2.18)$$

由式 (2.17) 和式 (2.18) 可得:

$$a_i = \frac{x}{L}a \quad (2.19)$$

由 PZT 压电陶瓷质量产生的惯性力为:

$$\begin{aligned} F_{PZT} &= \sum_{i=0}^L m_i a_i = \int_0^L m_i \frac{x}{L} a dx \\ &= \frac{1}{2} m_i L a \\ &= \frac{1}{2} m_{PZT} a \end{aligned} \quad (2.20)$$

因为惯性体和 PZT 压电陶瓷加速运动而产生的惯性力应小于移动体与基平面之间的摩擦力, 所以有:

$$F_m + F_{PZT} \leq \mu_0 (M + m_{PZT} + m) g \quad (2.21)$$

因此可解得加速度 a 满足:

$$a \leq \frac{\mu_0 (M + m_{PZT} + m) g}{m + \frac{1}{2} m_{PZT}} \quad (2.22)$$

惯性体所受力 F_m 在 ΔL 上做功, 使惯性体获得速度 v_m , 由动能定理:

$$F_m \Delta L = \frac{1}{2} m v_m^2 \quad (2.23)$$

解得：

$$v_m = \sqrt{2a\Delta L}$$

惯性体所具有的动量为：

$$P_m = m v_m = m \sqrt{2a\Delta L} \quad (2.24)$$

PZT 压电陶瓷所具备的动量用 P_{PZT} 来表示。对 PZT 而言在长度方向上速度同样也存在梯度，如图 2.3.4 所示。

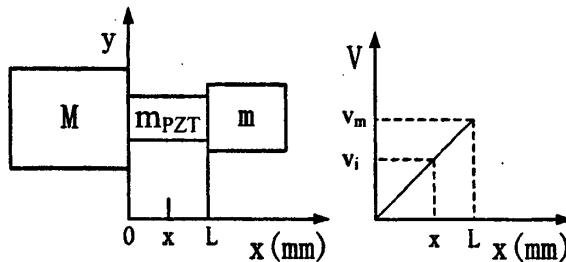


图 2.3.4 PZT 压电陶瓷在长度方向上速度梯度

微分长度质量 m_i ，由于移动体静止其速度为 v_i ，且有：

$$v_i = \frac{x}{L} v_m \quad (2.25)$$

微分长度质量具有的动量为：

$$p_i = m_i v_i = \frac{x}{L} m_i v_m \quad (2.26)$$

图 2.2.1 (a) ④状态 PZT 陶瓷所具备的总动量为：

$$\begin{aligned} P_{PZT} &= \sum_{x=0}^L m_i v_i = \int_0^L \frac{x}{L} m_i v_m dx \\ &= \frac{1}{2} m_i L v_m \\ &= \frac{1}{2} m_{PZT} v_m \end{aligned} \quad (2.27)$$

由动量守恒定律得图 2.2.1 中 (a) ④—⑤ (碰撞后) 系统具有的总速度为：

$$v = \frac{(m + \frac{1}{2} m_{PZT}) \sqrt{2a\Delta L}}{M + m_{PZT} + m} \quad (2.28)$$

系统克服摩擦阻力移动的距离为：

$$\Delta x_2 = \frac{v^2}{2\mu_0 g} = \frac{a\Delta L (m + \frac{1}{2} m_{PZT})^2}{\mu_0 g (M + m_{PZT} + m)^2} \quad (2.29)$$

由式 (2.22) 移动量的最大值在

$$a_{\max} = \frac{\mu_0 g (M + m_{PZT} + m)}{m + \frac{1}{2} m_{PZT}} \quad (2.30)$$

时获得, 此时有

$$\Delta x_{2\max} = \frac{m + \frac{1}{2} m_{PZT}}{M + m_{PZT} + m} \Delta L \quad (2.31)$$

可以发现上式中移动量与式 (2.15) 中移动量相等。

从以上结果可知移动机构特性:

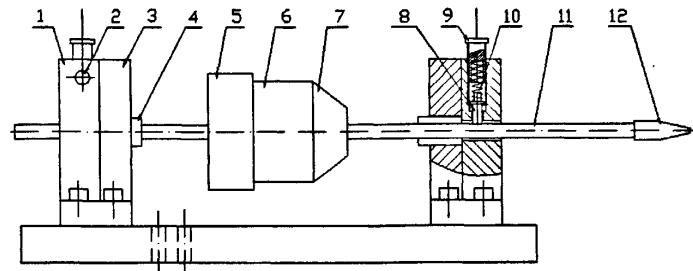
- 总移动量 Δx 正比于 ΔL (即 ΔV 一跳变电压);
- 当 PZT 压电陶瓷质量相对于移动体、惯性体不可忽略时如果数值 $\frac{m + \frac{1}{2} m_{PZT}}{M + m_{PZT} + m}$ 增大, 移动量也相应增加;
- 只有在 PZT 压电陶瓷质量远小于移动体、惯性体质量时才可被忽略, 此时前述公式 (2.15) 和 (2.31) 简化为:

$$\Delta x = \frac{m}{M + m} \Delta L \quad (2.32)$$

2.4 数字化细胞微注射仪设计

2.4.1 微注射仪结构组成及基本原理

根据机构微位移产生的原理提出了数字化细胞微注射仪的设计方案, 其结构原理见图 2.4.1。微注射仪主要由压电陶瓷、惯性体、移动体、弹簧压紧机构、支撑机构、注射针联接件等组成。



1.预紧力调节支座 2.防松螺钉 3.轴承支座 4.直线滚珠轴承 5.惯性体
6.压电陶瓷 7.固定件 8.压紧顶针 9.预紧力调节螺钉 10.弹簧 11.持针器 12.注射针联接件

图 2.4.1 数字化细胞微注射仪结构

细胞微注射过程中,该注射仪的进针、注射及退针操作均通过计算机改变驱动电压的波形、电压、频率等参数来实现,不需对装置本身作手动调节。通过大量的实验针对不同细胞微注射的要求确定出不同细胞微注射的控制参数,即可通过软件自动改变控制参数来控制细胞注射的过程,易于实现细胞微注射自动化。

由于定制的压电陶瓷没有提供安装螺纹等连接方法,安装面为平面,因此安装时只能采用高强度胶粘接方式与其它构件联接。设计中惯性体与压电陶瓷、移动体 1 与压电陶瓷均采用高强度胶粘接方式联接,固定件与持针器采用螺钉联接,方便拆卸,固定件、持针器和注射针联接件共同组成移动体,而压电陶瓷与持针器、惯性体与持针器均为空套配合,无联接,其装配图如图 2.4.2。

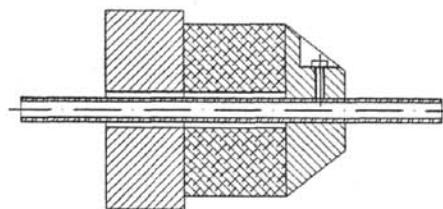


图 2.4.2 压电陶瓷驱动器的联接

注射针是细胞微注射中关键器件之一,注射针联接件需把注射针与微注射仪紧密联接在一起,要满足以下要求:

- 注射针与微注射仪紧密联接,在压电陶瓷驱动器震动过程中不易松动。
- 玻璃注射微针牢固装夹,并且不能使玻璃微针在装夹过程中发生断裂。
- 该联接件的整体结构在实验过程中尽量无扰动性。

综合上述因素设计如图 2.4.3 所示的连接件。

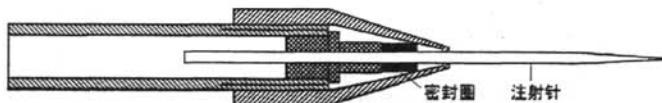


图 2.4.3 细胞注射针联接件

2.4.2 压电陶瓷选型及关键部件参数确定

常用的压电器件的形式较多,形状有圆片形、圆环形、板形、圆管形、虹形、弹珠形等。在微流体驱动方面应用最广泛的有压电堆栈式和双晶片式。国外比较著名的压电陶瓷生产厂商有德国的 PI 公司和日本的 TOKIN 公司等,国内生产厂商有重庆 CETC 二十六所、上海硅酸盐研究所及香港功能陶瓷有限公司等。本设计中采用的是堆栈式压电陶瓷,图 2.4.4 为微系统研究室向 CETC 二十六所定制的 WTYD 型压电陶

瓷外观图。



图 2.4.4 CETC 二十六所 WTYD 型压电陶瓷

WTYD 型压电陶瓷电压与位移特性关系如图 2.4.5。

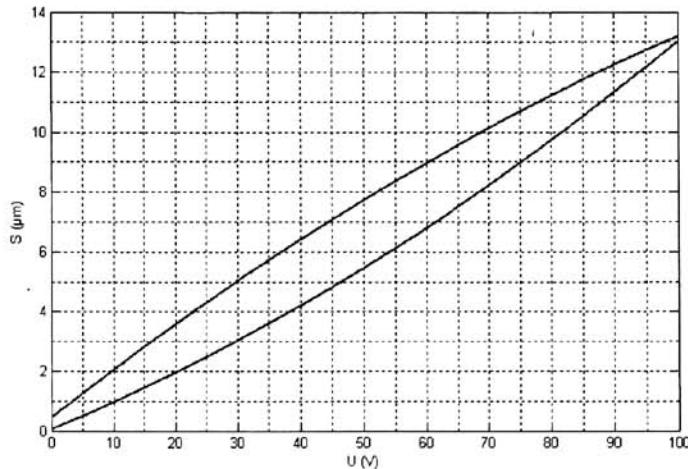


图 2.4.5 WTYD 型压电陶瓷电压一位移特性

WTYD 型压电陶瓷质量为 245g, 由 $\Delta x = \frac{m + \frac{1}{2}m_{PZT}}{M + m_{PZT} + m} \Delta L$ 可知当压电陶瓷质量相

对于移动体、惯性体不可忽略时, 如果位移系数 $\Delta = \frac{m + \frac{1}{2}m_{PZT}}{M + m_{PZT} + m}$ 增大, 移动量 Δx 也

相应增加, 因此惯性体、压电陶瓷和移动体质量的配比对机构的移动量有很大的影响。移动体又由固定件、持针器和微针联接件共同组成, 因此各部件尺寸及材料的选择直接关系到位移系数的大小。

首先研究惯性体、移动体质量的变化对机构位移系数的影响, 保持移动体质量不变(取 50g), 改变惯性体质量, 计算对应的位移系数, 再保持惯性体质量不变(取 300g), 改变移动体质量, 计算对应的位移系数, 将位移系数与惯性体、移动体质量变化关系绘制成曲线如图 2.4.6。

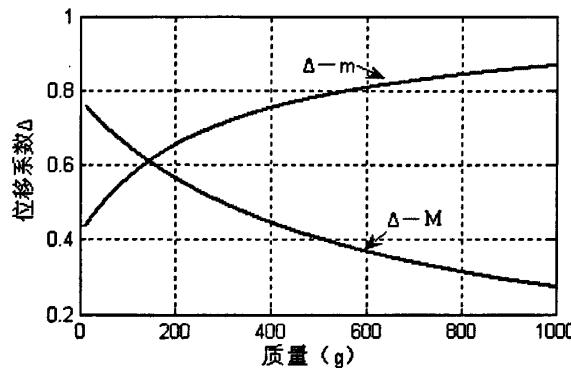


图 2.4.6 位移系数与惯性体 (m)、移动体质量(M)关系

由图 2.4.6 可知, 位移系数 Δ 随移动体质量 M 的增加而减小, 随惯性体质量 m 的增加而增加。因此在压电陶瓷质量一定的情况下要提高位移系数必须尽可能的增加惯性体质量, 减小移动体的质量。在实际应用中, 惯性体、移动体质量的确定还需考虑以下因素:

- 持针器作为移动体的一部分, 理论上要求质量越小越好, 而持针器承受着压电陶瓷及惯性体的全部重量, 需有较高的刚度以保证其微小变形对于注射操作要求可以忽略不计。
- 在增加惯性体质量时应考虑与压电陶瓷、选购件的配合及对持针器微变形的影响。
- 装置部分零件为购买件或购买后加工而成, 因此某些零件尺寸、材料的确定受限于选购的零件。

根据以上因素最终确定移动体中注射针联接件和固定件材料采用铝, 以减小移动体的质量, 持针器根据选购的铜质空心管道加工而成, 惯性体材料选择为密度较大的铜, 其各部分质量见表 2.4.1。

表 2.4.1 装置关键零部件质量

名称	质量(g)
压电陶瓷	245
惯性体	326
移动体 固定件	31
持针器及微针联接件	71
	40

根据惯性体、移动体及压电陶瓷的质量关系可以计算出机构位移系数 $\Delta=0.70$, 即 $\Delta x = 0.70 \cdot \Delta L$ 。

在此基础上有必要校核移动体中持针器的刚度, 以保证装置工作过程中持针器的弹性变形不影响细胞注射操作。持针器所受约束可简化为图 2.4.7 所示。

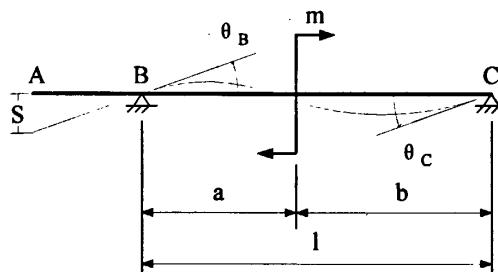


图 2.4.7 持针器约束示意图

持针器在弯矩 m 作用下发生弹性变形, 弯曲变形公式为^[28]:

$$\text{挠度 } v = \frac{mx}{6EI} (l^2 - 3b^2 - x^2), \quad (0 \leq x \leq a)$$

$$v = \frac{m}{6EI} \left[-x^3 + 3l(x-a)^2 + (l^2 - 3b^2)x \right], \quad (a \leq x \leq b) \quad (2.33)$$

$$\text{转角 } \theta_B = \frac{m}{6EI} (l^2 - 3b^2); \quad \theta_C = \frac{m}{6EI} (l^2 - 3a^2). \quad (2.34)$$

式中: E —黄铜弹性模量 (110GPa); I —持针器惯性矩, 对于环形管道 $I = \frac{\pi}{64} (D^4 - d^4)$; l —约束之间长度 (0.08m)。根据以上公式计算初始状态 ($a=0.032m$) 时 BC 段变形量 (图 2.4.8) 及转角 θ_B 、 θ_C 。

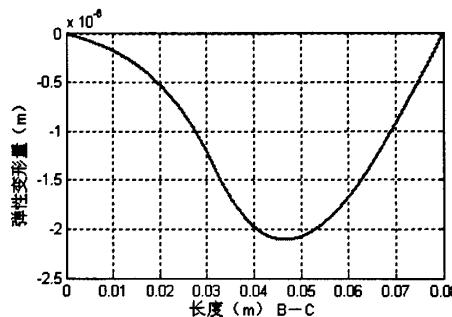


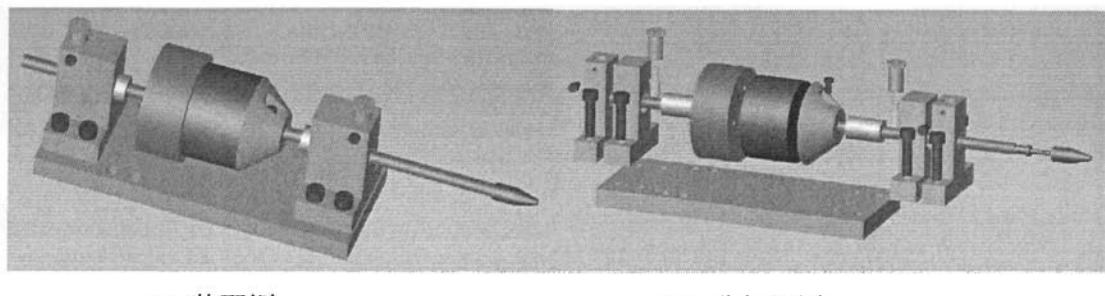
图 2.4.8 持针器弹性变形

$$\theta_B = -1.4615 \times 10^{-5} \text{ rad}; \quad \theta_C = 9.4997 \times 10^{-5} \text{ rad}.$$

从图 2.4.8 可看出持针器最大弹性变形量为 $2\mu\text{m}$ 左右, 分析可知影响注射操作要求的不是最大变形量, 而是转角 θ_B , 随着持针器向前 (或向后) 移动, 弯矩 m 作用点随之变化, 因此转角 θ_B 也随之变大 (或变小), θ_B 的变化将引起注射针针尖在竖直方向上产生位移 S , S 的变化量若达到微米级则必然对尺寸在同一数量级的细胞产生不可忽略的影响。一般的注射细胞直径在 $20\mu\text{m}$ — $120\mu\text{m}$ 之间, 从接近细胞膜、刺入细胞膜到进入核质附近进行注射, 整个针的位移不超过 $60\mu\text{m}$, 根据式 (2.34) 计算位移为 $60\mu\text{m}$ 时转角 θ_B 的变化量 $\Delta\theta_B = 8.9739 \times 10^{-7} \text{ rad}$, AB 段距离为 6—10cm, 以 10cm

计算可得 S 最大变化量为 $8.9739 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ ，其位移变化量比细胞尺寸低两个数量级，因此持针器刚度完全满足细胞微注射操作的要求。

各个零件参数确定后即可完成数字化细胞微注射仪结构的设计，最终装配图及分解视图见图 2.4.9。



(a) 装配图

(b) 分解视图

图 2.4.9 数字化细胞微注射仪设计图

2.5 本章小结

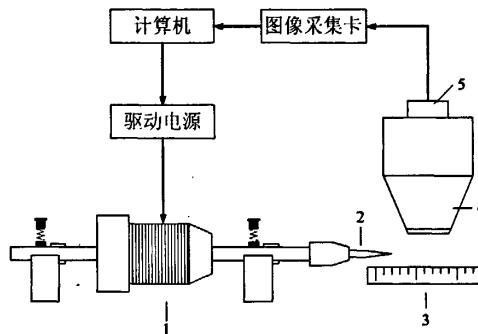
- (1) 阐述了微流体数字化技术的概念及应用。
- (2) 分析了压电与电致伸缩效应以及压电驱动机构位移产生的原理，并对机构移动原理进行分析计算，得出了机构位移总量与压电陶瓷变形量、惯性体质量、移动体质量之间对应关系的计算公式。
- (3) 提出数字化细胞微注射仪的设计原理及方案，并讨论关键零部件选型、参数确定的依据，校核关键部件的刚度，完成了数字化细胞微注射仪结构设计方案。

3 数字化细胞微注射仪进退针位移特性测试

本章搭建数字化细胞微注射仪进退针位移特性测试实验系统，在此基础上探索装置的各个参数对位移特性的影响规律，并研究驱动波形、电压、频率等参数对装置位移特性的影响。

3.1 数字化细胞微注射仪位移特性测试实验系统

数字化细胞微注射仪进退针位移特性测试实验系统原理如图 3.1.1。



1.数字化细胞微注射仪 2.注射针 3.微尺 4.显微镜 5.数码 CCD

图 3.1.1 数字化细胞微注射仪进退针位移特性测试实验系统原理图

压电驱动器在驱动波形的作用下实现注射针的前进及后退，通过显微镜、数码 CCD 和计算机记录微注射针在标尺刻度上方进针及退针的过程，根据驱动频率及每一百或几百微米进针和退针所需的时间计算出进针和退针的单步位移，从而得出数字化细胞微注射仪进退针的位移特性。

实验系统主要由驱动电源、数字化细胞微注射仪、细胞注射微针及联接件、微尺度显微测量系统等组成。实验设备有：

(1) 驱动电源

实验中使用的压电驱动电源是由一块插在计算机主板上的信号源和外部的功率放大器组成。通过任意波形驱动软件将波形的 1000 个数据写入信号源电路的 E²prom，由 E²prom 配合其它电路产生数字信号，然后通过 D/A 转换器输出模拟波形信号。外部的功率放大器将信号源输出的模拟波形信号放大 10 倍，通过 BNC 口输出给压电陶瓷，使压电陶瓷产生微量的位移。其最大输出功率 50W；闭环增益 20dB；失真度 0.1%^[29]。

任意波形驱动软件有两个特点：

- 用户可以通过任意波形驱动软件写入各种波形，还可以根据实际的需要，调

整输出波形的频率、电压等参数值。

- 用户可以通过任意波形驱动软件对电源进行单步驱动。

参数设置和发送模块界面如图 3.1.2 所示。

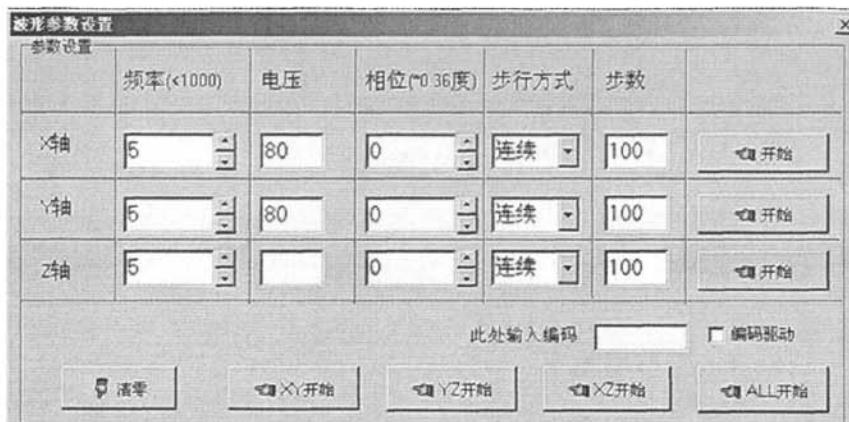


图 3.1.2 参数设置和发送模块界面

发送参数主要包括波形输出的频率和电压。由于每发送一次波形完成一个周期的驱动，因此发送频率决定了驱动的快慢。而电压实际上是输出波形的幅度值，电压值越大，压电驱动器形成的加速度绝对值越大。发送参数还包括相位和步行方式。相位主要用于多路发送时，决定各路间的相位差。步行方式可分为连续发送和单步发送两种。采用单步发送方式时应输入发送的次数，在发送完指定的次数后会自动停止。

设置完发送参数后即可开始波形发送。发送时硬件层的运作为时基电路产生基准时钟，经相位设定电路延时若干周期后通过控制门传输至地址计数器，将 E²PROM 中对应单元的数据读出经 D/A 转换器转换成模拟信号输出，地址计数器从 1 计数至 1000 后自动回至 1。如此周而复始，D/A 即连续输出驱动波形信号。

(2) 数字化细胞微注射仪

细胞注射成功率低，重复次数高，因此要求注射设备具有很高的精度、灵敏度及稳定性，减少由于设备原因造成操作失败，从而提高细胞注射的成功率。图 3.1.3 为本文设计的数字化细胞微注射仪。

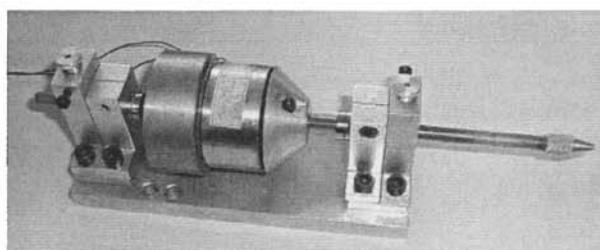


图 3.1.3 数字化细胞微注射仪

(3) 细胞注射微针

细胞注射微针是细胞注射操作中的关键部件。微注射过程中，微针几何参数对微注射结果起着至关重要的影响。根据不同细胞的注射要求，微针针尖可拉制成不同形状，为减小刺膜时细胞变形量，微针针尖可磨制出不同角度。图 3.1.4 为典型的细胞注射微针外观图。

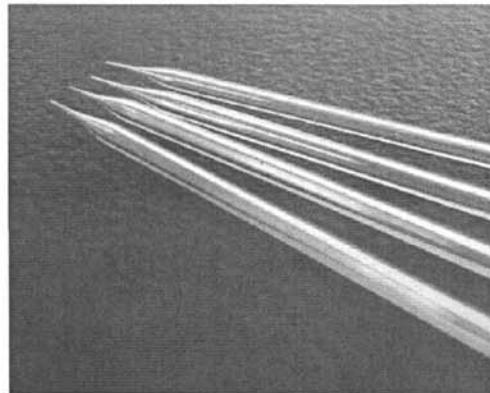


图 3.1.4 细胞注射微针外观图

(4) 微尺度显微测量系统

微尺度显微测量系统用于测量细胞注射微针在工作过程中的步长等参数，测量系统包括 CCD 摄像头、光学显微镜、计算机及数据采集卡。

3.2 注射角度的确定

受细胞注射操作平台及操作设备的限制，注射过程中微注射针需倾斜一定的角度，而实验证明装置倾斜后重力分量将减小退针速度。本节对注射角度作一定的研究，寻求最小注射角度。

注射针临界注射角度示意图如图 3.2.1。

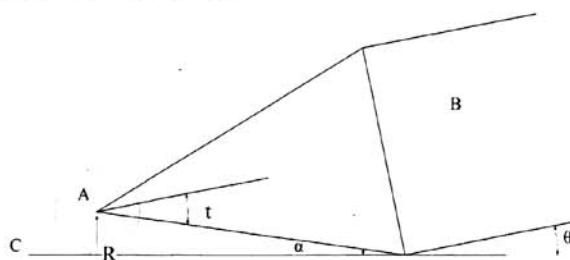


图 3.2.1 注射针临界注射角度示意图

图中 A 为待注射的细胞，半径为 R，B 为细胞注射针，C 为操作平台， θ 为注射针倾斜角度， t 为注射针半锥度。设微针未收缩段直径为 D，则

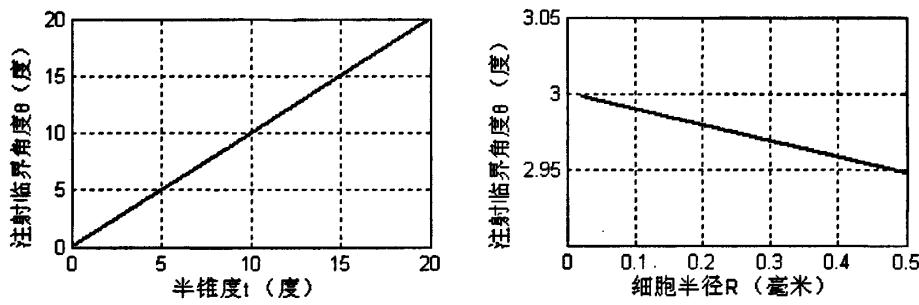
$$\alpha = \arcsin\left(\frac{2R \cdot \sin t}{D}\right) \quad (3.1)$$

故

$$\theta = t - \alpha = t - \arcsin\left(\frac{2R \cdot \sin t}{D}\right) \quad (3.2)$$

式 (3.1) 中有两个变量 R 及 t , 即待注射细胞半径和微注射针半锥度。

下面分别研究两个变量与倾斜角度的关系。拉制细胞注射针的毛细玻璃管外径 $D = 1\text{mm}$, 设 R 不变, 取细胞半径 $R = 0.05\text{mm}$, 绘制出微针倾斜角度 θ 与微针半锥度 t 的关系曲线图 (3.2.2(a)); 设微注射针半锥度 t 不变, 取 $t = 3^\circ$, 绘制出微针倾斜角度 θ 与待注射细胞半径 R 的关系曲线图 (3.2.2(b))。



(a) 临界角与半锥度关系曲线

(b) 临界角与细胞半径关系曲线

图 3.2.2 微注射针临界注射角度与微针半锥度、细胞半径的关系

由式 (3.1) 及图 3.2.2 可知:

- (1) 微注射针临界注射角度随微针半锥度的增加而增加, 且基本成线性关系。
- (2) 待注射细胞半径增大, 临界注射角度减小, 细胞半径尺寸本身对微注射针临界注射角度有影响, 但影响不大, 基本可以忽略。

实际操作中, 接近临界注射角度时不仅微注射针会触及操作平台, 注射针联接件也会接触操作平台, 而且先于微注射针接触操作平台, 因此半锥度是个相对的概念, 这种情况下半锥度应以微针连接件至微针针尖的尺寸来计算。在本设计中半锥度范围为 $5-10^\circ$, 注射临界角在 $5-10^\circ$ 之间。但在接近注射临界角的位置, 细胞注射针的调整很困难, 易碰断细胞注射针, 因此在实验中多采用 $10-20^\circ$ 。

3.3 微注射仪可调因素对进退针位移特性的影响

3.3.1 倾斜角度对进退针位移特性的影响

实验发现机微注射仪斜角度对进退针位移特性有较大的影响, 倾角提高了进针速度, 减小了退针速度, 为进一步研究倾角与位移特性的关系, 改变机构倾斜角度, 测得 60V 和 80V 驱动电压下进针与退针的单步位移数据。表 3.3.1、3.3.2 分别为进针及

退针条件下测得的位移数据。

实验参数：频率 2Hz。

表 3.3.1 不同倾斜角度下进针单步位移实验数据

电压 (V)	单步位移(μm)			
	10°	15°	20°	25°
60	4.17	5.56	6.25	8.34
80	6.25	7.14	8.34	12.50

表 3.3.2 不同倾斜角度下退针单步位移实验数据

电压 (V)	单步位移(μm)			
	10°	15°	20°	25°
60	1.61	1.53	1.42	0.50
80	2.64	2.47	2.26	1.12

表 3.3.1 及表 3.3.2 中测得的数据为注射针水平投影的单步位移, 由于机构倾斜一定角度 θ , 故机构实际单步位移 = 水平单步位移/ $\cos\theta$ 。换算为实际单步位移后数据见表 3.3.3 及表 3.3.4。

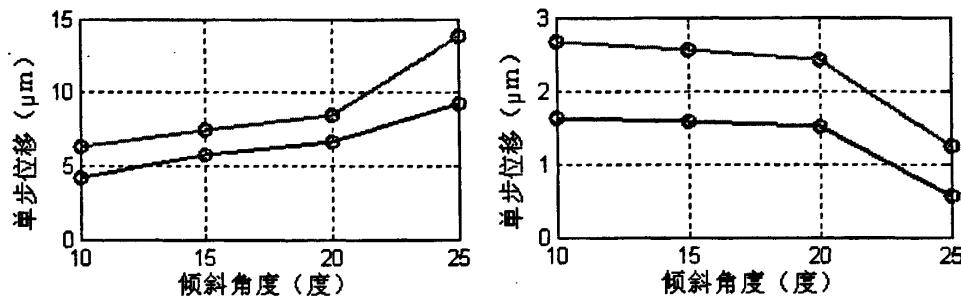
表 3.3.3 不同倾斜角度下进针实际单步位移

电压 (V)	单步位移(μm)			
	10°	15°	20°	25°
60	4.23	5.76	6.65	9.20
80	6.35	7.40	8.43	13.79

表 3.3.4 不同倾斜角度下退针实际单步位移

电压 (V)	单步位移(μm)			
	10°	15°	20°	25°
60	1.63	1.58	1.51	0.55
80	2.68	2.56	2.41	1.24

根据表 3.3.3 及表 3.3.4 中数据绘制出倾斜角度与进针、退针单步位移关系曲线图 (图 3.3.1)。



(a) 倾角与进针单步位移关系曲线

(b) 倾角与退针单步位移关系曲线

图 3.3.1 倾斜角度与单步位移关系

从图 3.3.1 可以看出随着倾斜角度的增加, 进针单步位移明显增大, 而退针单步位移逐渐减小, 倾斜角度为 25° 时进针及退针都有明显的改变, 即倾斜角度对单步位移的影响为非线性, 倾斜角度越大, 对位移特性影响越大。由图 3.3.1(b)可知倾斜角度为 25° , 电压 $60V$ 时, 单步位移仅 $0.55\mu m$, 过大的倾斜角度将大大降低退针速度, 因此不宜采用大的注射角度, 实验中通常取 $10-20^\circ$ 。

3.3.2 弹簧预紧力对进退针位移特性的影响

微注射仪预紧力结构中弹簧推动滑块作用于持针器上, 调节弹簧预紧力即可控制摩擦力的大小, 摩擦力对机构的位移特性有着重要的影响, 太大的摩擦力将导致机构位移减小甚至为零, 有必要对弹簧预紧力的影响作深入的研究。预紧力通过弹簧变形量与弹簧刚度求得。表 3.3.5 为不同预紧力作用下测得的机构单步位移数据。

实验参数: 驱动电压 $80V$, 频率 $2Hz$, 倾斜角度 20° 。

表 3.3.5 不同预紧力下测得的机构单步位移数据

预紧力 (N)	进针单步位移(μm)	退针单步位移(μm)
1.08	7.54	2.20
1.22	8.12	2.27
1.35	8.38	2.43
1.49	8.02	2.50
1.62	7.38	2.45

上述表中数据为实验测得的机构水平单步位移数据, 由于装置倾斜 20 度, 故机构实际单步位移 = 水平单步位移/ $\cos 20^\circ$ 。换算为实际单步位移后数据见表 3.3.6。

表 3.3.6 不同预紧力下机构实际单步位移数据

预紧力 (N)	进针单步位移(μm)	退针单步位移(μm)
1.08	8.02	2.34
1.22	8.64	2.42
1.35	8.92	2.58
1.49	8.53	2.66
1.62	7.85	2.61

根据表 3.3.6 中的机构实际单步位移数据拟合出单步位移与预紧力关系曲线如图 3.3.2。

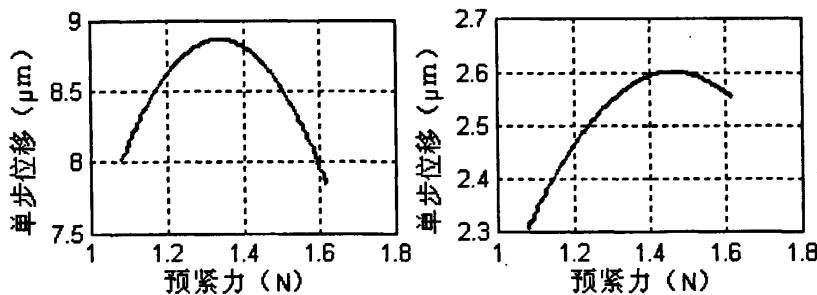


图 3.3.2 单步位移与预紧力关系曲线

从图 3.3.2 可以得出以下结论：

- (1) 进针状态下预紧力在 1.3N 左右时单步位移达到最大值 $8.8\mu\text{m}$ 左右；退针状态下预紧力在 1.5N 左右时单步位移达到最大值 $2.6\mu\text{m}$ 左右。即进针和退针状态下存在一个预紧力，使得在该预紧力下步位移达到最大值。
- (2) 进针和退针状态下步位移达到最大值时所对应的预紧力不同，退针状态下所对应的预紧力大于进针状态下所对应的预紧力。
- (3) 由于退针步位移仅有进针步位移的 $1/3$ 左右，即退针速度小于进针速度，为实现快速退针效果，故预紧力大小的选择应以退针数据为参考。

3.4 驱动波形的选择

驱动波形的变化对应于压电陶瓷驱动电压的变化，不同的驱动波形将产生不同的位移特性，根据机构位移产生的原理，作者设计了不同的进针波形和退针波形，通过实验对比不同驱动波形的位移驱动能力，并选出位移驱动能力较好的驱动波形。图 3.4.1 为作者设计的进针及退针电压驱动波形。

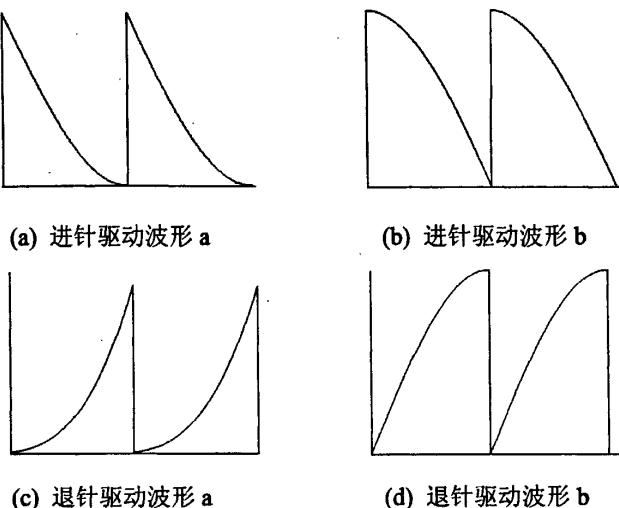


图 3.4.1 电压驱动波形

表 3.4.1 为进针驱动波形 a, b 在不同驱动电压下测得的进针单步位移数据。

实验参数: 频率 2Hz, 倾斜角度 20°。

表 3.4.1 进针波形、电压与单步位移的实验数据

波形	单步位移(μm)							
	10V	20V	30V	40V	50V	60V	70V	80V
进针 a	0.83	1.66	2.53	3.32	4.09	4.84	5.32	6.65
波形 b	1.02	2.22	3.32	4.43	5.32	6.65	7.60	8.87

将进针驱动波形 a, b 在不同电压下测得的机构单步位移数据分别绘图, 如图 3.4.2 所示。

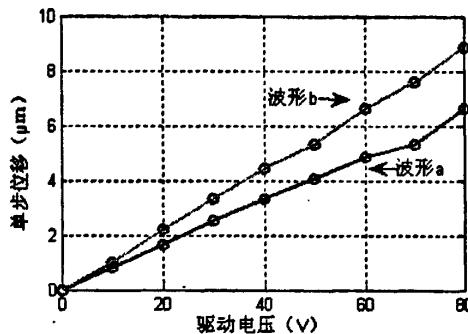
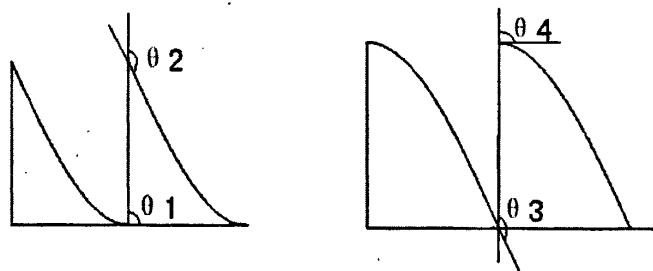


图 3.4.2 进针驱动波形 a, b 的位移驱动特性

从表 3.4.1 及图 3.4.2 中可得出以下结论:

- (1) 该数字化细胞微注射仪的进针单步位移从纳米级至微米级可控, 最大单步位移达到 8.87 μm, 完全满足快速进针刺膜的要求。
- (2) 在相同驱动电压下驱动波形 b 产生的机构单步位移高于波形 a。即进针驱动波形 b 的位移驱动特性优于进针驱动波形 a。

对进针驱动波形 a, b 的驱动能力差异作进一步的研究, 不同驱动电压对应不同的压电陶瓷位移量, 驱动电压的变化反映压电陶瓷位移的变化, 所以驱动电压波形的斜率变化即为压电陶瓷的速度变化。从图 3.4.3 可看出:



(a) 进针驱动波形 a

(b) 进针驱动波形 b

图 3.4.3 进针驱动波形

在驱动波形电压从零突变至峰值的瞬间, 曲线斜率变化量分别为 θ_1 、 θ_3 , 且 $\theta_1 < \theta_3$, 此处波形 a 产生的速度变化量小于波形 b, 即波形 a 此处产生的加速度小于波形 b, 从而产生的惯性力较小, 惯性体向后移动位移量较大, 压电陶瓷的伸长量较大一部分由惯性体后移量组成, 导致进针位移量较小, 因此其进针的单步位移小于波形 b 条件下产生的位移; 在 θ_2 处虽然压电陶瓷产生的加速度比 θ_4 处大, 但没有位移的突变, 对针针没有影响。因此进针驱动波形 a 的位移驱动能力差于进针驱动波形 b。

表 3.4.2 为退针驱动波形 a, b 在不同驱动电压下测得的退针单步位移数据。

实验参数: 频率 2Hz, 倾斜角度 20°。

表 3.4.2 退针波形、电压与单步位移的实验数据

波形	单步位移(μm)							
	10V	20V	30V	40V	50V	60V	70V	80V
退针 a	0	0	1.12	1.51	1.73	2.27	2.64	2.95
波形 b	0	0	0.99	1.34	1.57	2.05	2.43	2.66

将退针驱动波形 a, b 在不同电压下测得的机构单步位移数据分别绘图, 见图 3.4.4。

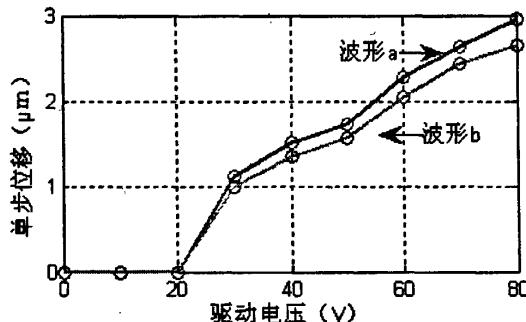


图 3.4.4 退针驱动波形 a, b 的位移驱动特性

从表 3.4.2 及图 3.4.4 可得出以下结论:

- (1) 该数字化细胞微注射仪的退针单步位移亦从纳米级至微米级可控, 最大单步位移达到 $2.95\mu\text{m}$, 仅为进针单步位移最大值的 $1/3$ 左右, 但可以通过加大驱动频率提高退针速度来实现注射后快速退针操作。
- (2) 驱动电压在 20V 以下机构没有位移, 原因分析为驱动电压较小时产生的惯性力不足以克服摩擦力及惯性体重力分量的影响, 因此没有位移产生。
- (3) 从退针驱动波形 a, b 的位移驱动特性曲线图可以看出在相同的驱动电压下, 退针驱动波形 a 产生的单步位移大于驱动波形 b, 即退针驱动波形 a 的位移驱动能力优于退针驱动波形 b。

对于退针驱动波形位移驱动能力的分析, 从图 3.4.5 可知:

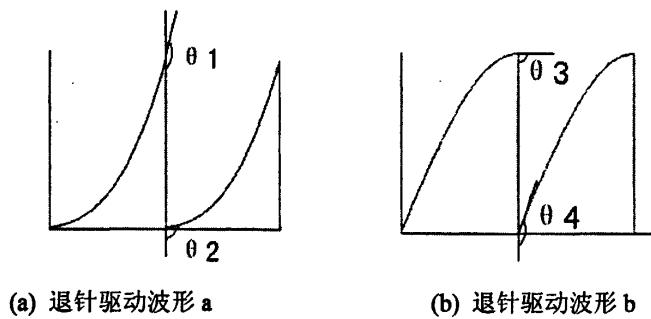


图 3.4.5 退针驱动波形

在驱动波形电压从峰值突变至零的瞬间, 曲线斜率变化量分别为 θ_1 、 θ_3 , 且 $\theta_1 > \theta_3$, 此处波形 a 产生的速度变化量大于波形 b, 即波形 a 此处产生的加速度大于波形 b, 从而产生的惯性力较大, 惯性体向前移动位移量较小, 压电陶瓷的收缩量大部分由持针器克服摩擦力后移组成, 因此其退针的位移大于波形 b 条件下产生的位移; 在 θ_2 处虽然压电陶瓷产生的加速度比 θ_4 处小, 但没有位移的突变, 对退针效果没有影响。综合其效果, 退针驱动波形 a 的位移驱动特性优于退针驱动波形 b。

3.5 驱动电压与频率对进退针位移特性的影响

在选择出进针、退针驱动波形的基础上, 对驱动电压与单步位移的关系作进一步的研究, 得出其规律, 为细胞注射操作参数选择提供数据参考。从图 3.4.2 及图 3.4.4 可看出进针及退针时机构单步位移与驱动电压的关系基本为线性, 采用最小二乘法拟合出其线性关系, (如图 3.5.1), 得出线性方程。

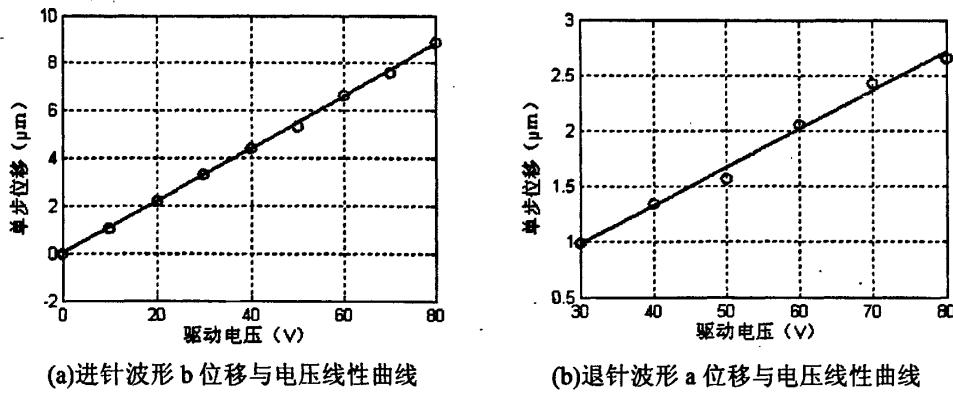


图 3.5.1 单步位移与驱动电压线性关系曲线

假设其函数关系为:

$$L = aU + b \quad (3.3)$$

其中 a 和 b 为待定系数, 采用最小二乘法的原理进行拟合^[30,31], 由最小二乘法的定义, 要使得下式取得最小值:

$$S = \sum_{i=1}^k [L_i - (aU_i + b)]^2 \quad (3.4)$$

只要使得下两式成立：

$$\frac{\partial S}{\partial a} = -2 \sum_{i=1}^k U_i [L_i - (aU_i + b)] = 0 \quad (3.5)$$

$$\frac{\partial S}{\partial b} = -2 \sum_{i=1}^k [L_i - (aU_i + b)] = 0 \quad (3.6)$$

由上述原理可求得进针波形 b 单步位移与电压关系线性方程为：

$$L = 0.1101U - 0.0242 \quad (0 \leq U \leq 80) \quad (3.7)$$

退针波形 a 单步位移与电压关系线性方程为：

$$L = 0.0346U - 0.0614 \quad (30 \leq U \leq 80) \quad (3.8)$$

由上文研究数据可知，倾斜角度的增加将明显降低退针速度，而细胞注射实验中有时需要较大的注射角度，提高退针速度的两个方法是提高驱动电压和驱动频率，而较大注射角度下驱动电压的增加对退针速度没有明显的提高，因此提高退针速度将依赖于驱动频率的增加。

表 3.5.2 为驱动频率对机构位移特性影响研究实验的数据，研究了驱动频率与进针及退针速度的关系。

实验参数：进针驱动电压 40V，退针驱动电压 80V，倾斜角度 20°。

表 3.5.2 驱动频率与进退针速度关系实验数据

频率 (Hz)	10	15	20	25	30	35	40	45	50
进针速度 (μm/s)	21.28	37.01	49.27	62.88	70.83	80.93	98.99	119.24	128.60
退针速度 (μm/s)	9.14	13.40	17.46	18.97	21.74	24.21	41.33	67.35	72.21

频率 (Hz)	55	60	65	70	80	90	100
进针速度 (μm/s)	150.41	160.03	169.59	172.34	216.08	244.64	304.05
退针速度 (μm/s)	72.60	78.61	83.22	87.53	91.20	106.23	124.13

根据表 3.5.2 实验数据绘制出驱动频率与进退针速度曲线图（图 3.5.2）。

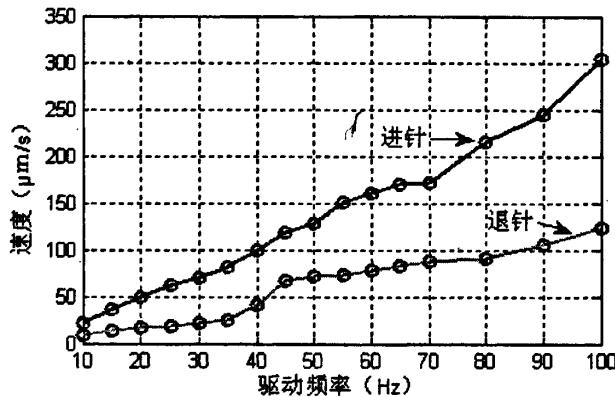


图 3.5.2 驱动频率与进退针速度实验值曲线

从图 3.5.2 可看出进针速度和退针速度与驱动频率的关系基本为线性, 40V 下进针速度约为 80V 下退针速度的两倍, 在频率为 100Hz 时, 退针速度达到了 $124.13\mu\text{m/s}$, 完全能够实现快速退针操作, 因此通过提高频率来加快进退针速度实现快速进退针的方法是完全可行的。

3.6 本章小结

- (1) 搭建了数字化细胞微注射仪进退针位移特性测试实验系统。
- (2) 研究了注射过程中注射针角度的下限值, 得出了该数字化细胞微注射仪的注射下限角度为 $5-10^\circ$ 的结论, 由公式 (3.2) 计算结果可知细胞尺寸本身对注射角度影响很小, 可以忽略。
- (3) 研究了倾斜角度对该装置进退针位移特性的影响。随倾斜角度的增加, 进针速度加快, 而退针速度减小。角度对进退针速度的影响为非线性, 倾斜角度达到 25° 时进针及退针单步位移都存在一个较大的突变, 退针单步位移仅为 $0.55\mu\text{m}$, 因此注射角度的增加一定程度上阻碍了快速退针的实现。
- (4) 研究了装置弹簧预紧力对进退针位移特性的影响。弹簧预紧力在达到一定值时进针和退针单步位移都存在一个最大值, 且进针和退针单步位移最大时所对应的弹簧预紧力不同, 前者小于后者, 而退针单步位移仅有进针的 $1/3$ 左右, 所以弹簧预紧力的选择应以退针为准。弹簧预紧力超过这个值时进针和退针单步位移都呈下降趋势。
- (5) 优化了进退针驱动波形。编制了不同的进针和退针驱动波形, 通过实验选择出位移驱动性能较好的波形。
- (6) 研究了驱动电压与频率对机构位移特性的影响。电压及频率与进退针速度基本呈线性关系, 且提高频率来实现快速退针是完全可行的。

4 数字化细胞微注射仪实验研究

本章在选择出进退针驱动波形的基础上进一步研究注射波形的驱动性能, 选择出满足要求的注射波形, 通过实验验证数字化细胞微注射仪用于细胞注射实验的可行性和实际效果, 探索进针、退针和注射各操作环节电压、频率等参数的控制规律。

4.1 注射波形的选择

数字化细胞微注射仪基于微流体数字化技术实现显微注射, 即采用可控的脉冲惯性力作用于细胞注射针, 使微针固壁沿其自身切向即纵向作加速度绝对值变化的运动, 加速度绝对值大时流体相对于固壁的切向惯性力大于流体的粘性力, 从而可以脱离注射针实现微注射。因此要求注射波形能够产生足够大的加速度, 更重要的是在注射过程中注射针不能有明显的位移。

从参考文献[32]知, 驱动器不加负载时, 驱动电压幅值固定不变, 改变频率, 随频率增加, 加速度变化小。驱动频率一定时, 改变电压, 加速度随电压增大而增大。驱动器接负载后, 随着驱动频率升高, 加速度也升高, 但变化不显著; 随驱动电压升高, 加速度明显升高。因此提高加速度可通过增加驱动电压的方法, 注射过程要求注射针不可以有明显的位移, 因此对注射波形的注液位移特性有很高的要求。

根据上述要求编制了图 4.1.1(a)、(b)的注射波形, 并通过实验研究其位移特性。

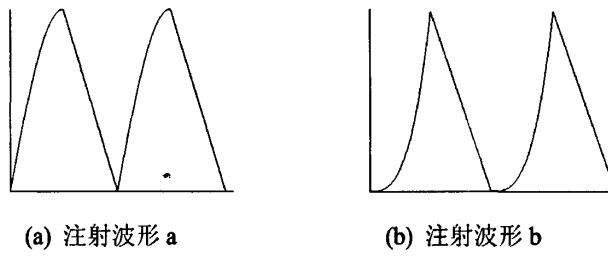


图 4.1.1 注射驱动波形

表 4.1.1 为注射波形 a, b 的位移特性实验数据。

实验参数: 频率 2Hz, 倾斜角度 20°。

表 4.1.1 注射波形 a, b 在不同电压下测得的机构单步位移数据

波形	单步位移(μm)							
	10V	20V	30V	40V	50V	60V	70V	80V
注射 波形 a	0	0	0	0.06	0.09	0.11	0.14	0.18
b	0	0	0	0	0	0.03	0.04	0.06

绘制注射波形 a, b 单步位移与电压关系曲线如图 4.1.2。

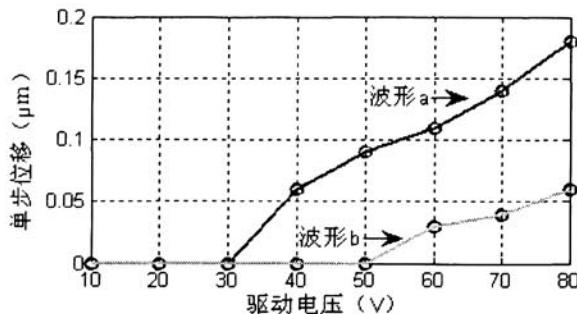


图 4.1.2 注射波形 a, b 位移特性曲线

与进针及退针的要求不同,注射操作要求在注射时注射针的位移越小越好,从图 4.1.2 可以看出注射波形 b 产生的机构单步位移较小,驱动电压 80V 时单步位移仅 $0.06\mu\text{m}$,完全满足注射操作的要求,且波形 b 产生位移的下限驱动电压值较高,因此位移特性优于注射波形 a。

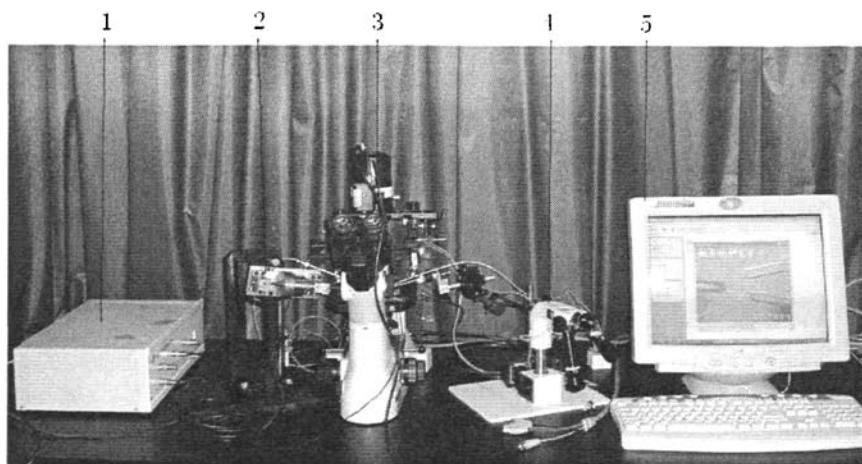
4.2 数字化细胞微注射实验系统

4.2.1 数字化细胞微注射的特点

数字化细胞微注射采用计算机对细胞注射进行过程控制,在注射过程中,细胞的输送、吸持、定位、注射针进针进行细胞膜穿刺、细胞内药液定量注射、注射针退出细胞、细胞释放等微操作过程完全通过计算机数字化控制。在注射过程中,由于采用了细胞自动输送式定位技术,吸持针在注射时始终保持固定位置,注射针只需做进针、注射、退针的简单动作,注射过程简单可靠。

4.2.2 实验系统的组成

细胞注射实验系统如图 4.2.1。



1.驱动电源 2.数字化细胞微注射仪 3.NIKON 显微操作台 4.微操作器 5.计算机

图 4.2.1 细胞微注射实验系统

驱动电源是由微系统研究室自主设计研发的,任意波形驱动软件将波形数据写入

信号源,然后通过D/A转换器输出模拟波形信号。功率放大器将信号源输出的模拟波形信号放大10倍,通过BNC口输出给压电陶瓷,使压电陶瓷产生微量位移。

数字化细胞微注射仪由驱动电源控制,通过不同的驱动波形、电压、频率来实现细胞注射过程中的快速进针、刺膜、退针及注射操作。细胞注射操作平台由Nikon倒置显微镜及微操作器组成,细胞微注射操作的过程观察及检测由计算机、图像采集卡和置于显微镜上的数码CCD来完成。

细胞注射的关键器件—注射针,其参数对注射效果有直接的影响,不同类型的细胞和不同类型的细胞操作对注射针参数有不同的要求,关于细胞注射针的制作将在第5章详细阐述研究。

4.3 实验结果及分析讨论

图4.3.1为细胞微注射实验过程中数码CCD录像的截图。

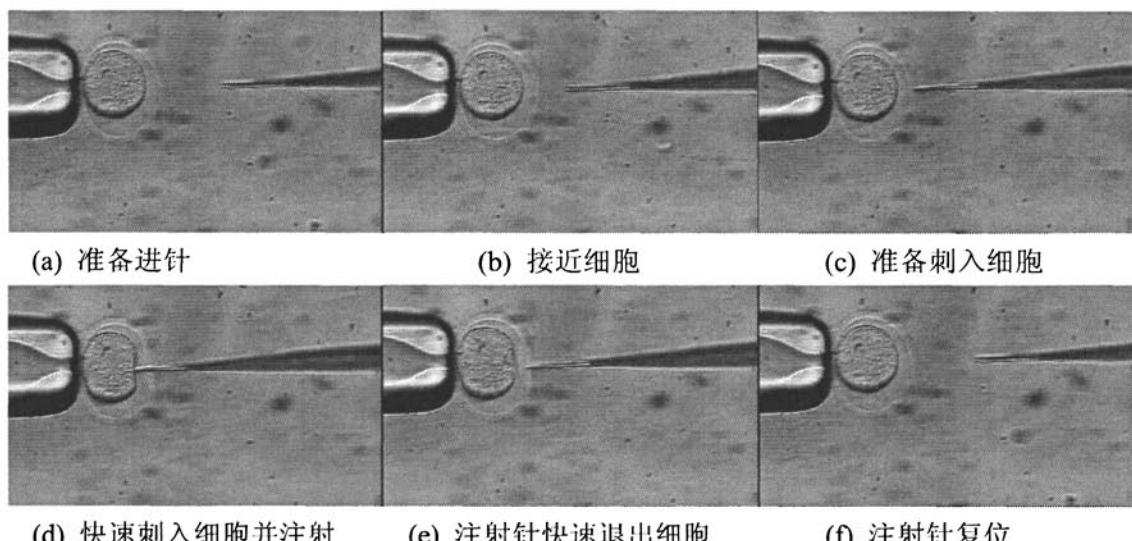
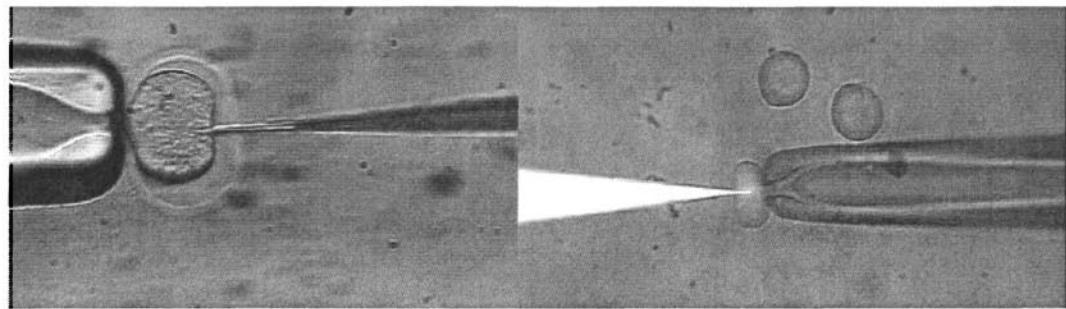


图4.3.1 细胞注射过程

- (a) 细胞吸持针吸住待注射的昆明鼠卵细胞,已吸入待注射药物的注射针安装于数字化细胞微注射仪中,准备进针。
- (b) 微注射针接近待注射细胞。
- (c) 微注射针接触细胞膜,准备快速刺膜。
- (d) 微注射针以较大的加速度快速刺入细胞并注射物质。
- (e) 注射完成后,微针快速离开细胞,以减小对细胞内生命物质的影响。
- (f) 细胞注射针复位,为下一个细胞注射操作作准备。

细胞微注射操作进针时,选用进针驱动波形及较小电压驱动(10—20V),注射针

缓慢接近待注射细胞，为减小注射针刺膜时的细胞变形量，在注射针接近细胞膜时选用较大电压驱动（50—80V），即以较大的速度和加速度刺破细胞膜，减小细胞变形，图 4.3.2 为数字化细胞微注射仪刺膜与手工方法刺膜瞬间细胞变形对比。从图中可以看出数字化细胞微注射仪膜瞬间的细胞变形量明显小于手工方法刺膜，有效地减小了对细胞活性的损伤。



(a) 细胞变形—数字化刺膜

(b) 细胞变形—手工刺膜

图 4.3.2 刺膜瞬间细胞变形对比图

注射时选用注射驱动波形，针对不同的细胞类型及注射量选用不同的驱动电压和频率。由于注射量极小，细胞注射前后没有明显的体积变化，目前检测注射量较为普遍的方法为荧光检测，图 4.3.2(b)中注射针内即为荧光物质，在荧光激发下高亮显示。该微注射仪注射量分辨率可达飞升级，注射针参数不变的情况下注射量受驱动电压、频率等参数的影响，注射量的控制参数研究及检测由研究室其他同学完成。

退针操作时选用退针驱动波形，提高驱动电压（80V）及驱动频率（80Hz 以上）来实现快速退针效果，减小对细胞活性的影响。

实验表明数字化细胞微注射仪能良好的实现细胞注射过程中的快速进针刺膜、注射及快速退针操作，有效的减小了刺膜时的细胞变形量，注射分辨率高，退针速度快，对细胞活性影响较小，可以作为一种有效的细胞微注射操作设备。

尽管数字化细胞微注射仪能满足细胞注射操作的要求，但仍有需改进之处，实验发现注射针注射效果不是很稳定，偶有倒吸现象产生，而加上平衡压力后可以达到良好的注射效果，在与加压设备的连接结构设计上有待改进。其次，所采用的压电陶瓷体积和质量较大，导致整体装置体积和质量较大，影响操作方便性。可采用性能更好、体积质量较小的压电陶瓷产品，提高装置的易操作性。

4.4 本章小结

- (1) 讨论了细胞注射过程对数字化细胞微注射仪的位移特性要求, 编制了注射驱动波形, 并进行位移特性实验研究, 选出了位移驱动特性更优的驱动波形。
- (2) 阐述了数字化微注射的特点, 搭建了细胞微注射实验系统, 通过实验研究数字化细胞微注射仪用于细胞微注射的实际效果, 实验表明数字化细胞微注射仪具有进退针速度快、细胞刺膜变形小、注射分辨率高的优点。

5 拉针仪设计及原理实验研究

细胞操作主要包括细胞核移植，细胞药物注射、细胞核内 DNA 注射、胚胎注射及细胞单个分离。主要操作工具是玻璃微针，对普通细胞注射要求针尖内孔直径在 $0.5-4\mu\text{m}$ ，细胞质内单精子注射中针尖内孔直径在 $4-5\mu\text{m}$ ，精原干细胞移植研究中卵细胞注射时针尖内孔直径在 $40\mu\text{m}$ ，细胞核移植及细胞单个分离要求将玻璃微针针尖磨制或锻烧成指定的形状用于吸持或勾取细胞^[33]。而细胞操作的微工具由拉针仪制作或在此基础上加工而成。

微系统研究室对拉针仪的研制已进行过一定研究，自主开发了利用重力拉制微针的装置^[34]，玻璃毛细管被加热至软化温度时即在质量块重力的作用下拉制成微针。但在使用过程中发现该装置拉制出的细胞注射针针尖尺寸波动范围大，即系统的稳定性低，可重复性差，成功率较低，而微针针尖尺寸直接影响注射量的大小，细胞注射要求注射针针尖尺寸一致性好，尺寸波动大不仅给注射针的筛选带来困难更重要的是影响了细胞注射量的精确控制。细胞注射针是细胞注射操作的关键器件，因此具有系统稳定性高，拉制微针尺寸一致性好的拉针仪是进行细胞工程技术研究必要的基础装备。

5.1 微针参数要求

根据细胞微注射的实际情况需要，对微注射针的外形提出了如图 5.1.1 所示的要求：



图 5.1.1 微注射针外形图

对于微针针尖内径，针对不同的细胞操作有不同的参数要求。微针锥部针干长度，即微针的收缩长度，一般为 $8-15\text{mm}$ ，收缩长度太长导致微针针尖刚度太低，不足以刺入细胞。理论上收缩长度越小越好，但收缩长度受拉制工艺参数的制约难以达到一个较小的数值。针尖斜角是为了更好的刺入细胞，一般为 $30^\circ-60^\circ$ ，采用磨制工艺完成。

5.2 拉针仪方案设计

5.2.1 微针材料的选择

目前国内并无专门用于制作细胞注射针、吸持针、微管道等微流体器件的毛细玻璃管。本研究室主要采用硼硅酸盐玻璃毛细管来制备微流体器件，如细胞注射针、吸持针、弯曲针、生物芯片点样微喷嘴等，材料的好坏直接影响到微针的成型效果，材料的性能也将直接决定玻璃微针的性能。硼硅酸盐玻璃毛细管有以下特点^[35,36]：

- (1) 良好的流动特性：毛细玻璃管的管壁甚为光滑，其表面性质如极性、表面吸附和表面反应性等均可以通过不同的化学方法对其进行表面改性，减小内部液体流动的阻力。由于微尺度效应下，微流体的流动机理与宏观状态流发生了很大的变化，液体分子间及其与固体流道之间的吸引力和粘着势在微流动中起主要作用，采用加工过的硼硅酸盐玻璃管作为细胞注射针材料，并对其内壁进行疏水化处理，可以得到良好的流动特性。
- (2) 优异的化学稳定性：在细胞微注射时，由于细胞培养皿中的培养基溶液要具有细胞正常的生存环境，因此会具有一定的酸性或碱性，且微针中的样品溶液也可能具有一定的酸性或碱性。因此，对微注射用微针材料就有特殊的要求，需具有的化学稳定性，能够抵抗一定的酸、碱性。硼硅酸盐玻璃毛细管除氢氟酸、浓碱、热硫酸外，几乎可耐一切酸、碱、盐的腐蚀，甚至比化学工业上常用的铬钢、铝钢等材料更耐腐蚀。
- (3) 良好的光学特性：透明的细胞注射针流路便于使用光电耦合成像器件(CCD)及显微图像处理系统进行微通道尺度的精确标定、流体流动的实时监测等。
- (4) 较好的工艺温度特性：耐热性好，可以热加工，也可进行锯、磨等冷加工，可以制成各种形状的成品。在细胞注射针的加工过程中，需要材料在一定的温度范围内具有良好的可塑性，能够在常温下磨制出不同的针尖角度，并达到较高精度要求。因此，所选择的材料要适于冷热加工，且工艺温度一定要恰当，不能太高，否则很难加工。
- (5) 一定的机械强度：首先注射针需要与微注射仪联接，能够在橡皮圈下夹紧并不至于用力过大使其断裂，在压电驱动器的高速震动下不易发生震裂；另外，微注射时，注射针需要扎入细胞核内，细胞本身具有一定的韧性，因此，对注射针就提出了一定的机械强度要求。
- (6) 原料来源充分，成本低。

硼硅酸盐玻璃的组分如下所示：

SiO_2 74.8%

Al_2O_3	3.5%
B_2O_3	14.5%
Na_2O	4.5%
K_2O	0.5%

其软化温度为 $770^{\circ}C \pm 10^{\circ}C$ 。

经试验, 选择北京正天易科贸有限公司生产的作电极用硼硅酸盐玻璃毛细管, 玻璃毛细管规格为外径 1.0mm、内径 0.6mm 及外径 1.6mm、内径 1.0mm。

5.2.2 拉针仪拉制原理

图 5.2.1 为设计的无预紧力拉制微针原理图。

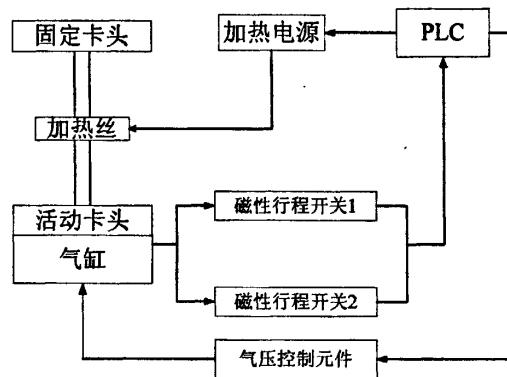


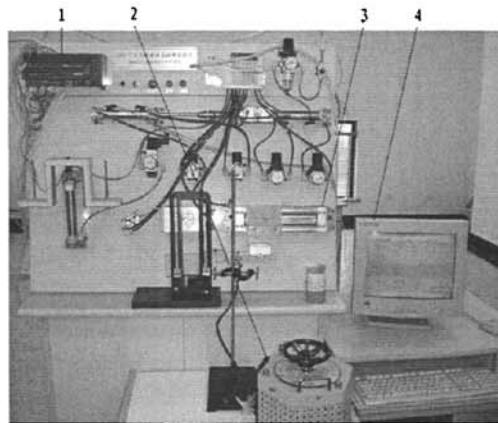
图 5.2.1 无预紧力拉制微针原理图

设计方案中采用气缸作为执行元件, 气缸具有速度快、可重复性好、稳定性很高的优良特性。细胞注射中对注射量的控制要求很高, 同一批次细胞注射要求注射量一致, 而注射不同物质时通常需更换细胞注射针, 针尖直径直接影响注射量的多少, 所以对细胞注射针参数的一致性要求很高。而注射针拉制过程极易受到各种因素的影响, 因此要求系统的稳定性很高, 而气缸可以很好的满足这一要求。方案中采用稳定性高的 PLC 控制整个系统, 从而保证每一次拉制过程中参数的一致性, 拉制出符合要求的细胞注射针。

5.3 拉针仪设计方案验证实验及优化

5.3.1 实验系统的搭建

拉针仪设计方案在 SMC 南京技术研究中心气动实验室进行设计方案的原理验证实验。实验系统如图 5.3.1 所示。



1.PLC 2.加热电源 3.MY1C25G-100L-Z73L 型气缸 4.计算机

图 5.3.1 拉针实验系统图

实验中采用 MY1C25G-100L-Z73L 滑块导轨式气缸, 重复精度高, 工作可靠性好, 气缸工作压力为 0.1—0.8Mpa, 速度为 100—1500mm/s, 加速度可达十几甚至几十倍重力加速度, 完全满足微针拉制的动力需求。

5.3.2 微针拉制参数的控制

(1) 加热丝的选择

镍铬电热合金丝具有高温强度较铁铬铝高, 高温使用下不易变形, 结构不易改变, 塑性较好, 易修复, 其辐射率高, 无磁性, 耐腐蚀性强, 使用寿命长等优点, 在实际中得到了广泛的应用。实验中笔者选用了直径 0.8mm、1mm 和 1.6mm 的镍铬合金加热丝, 通过实验测定其在电路中的加热性能。加热丝电路如图 5.3.2。

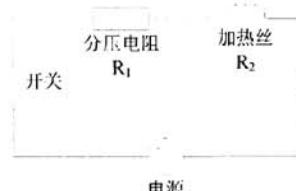


图 5.3.2 加热丝电路

由于加热丝电阻很小, 可承受的电压值较小, 为了扩大电源的输出电压, 从而提高输出电压的可调范围, 在电路中串入了分压电阻 R_1 来分担部分电压。实验数据见表 5.3.1。

实验参数: 输出电压 14V, 加热长度 3mm。

表 5.3.1 加热丝参数与加热时间的关系

加热圈直径 (mm)	3		2.5			1.5			
加热丝直径 (mm)	0.8	1	1.6	0.8	1	1.6	0.8	1	1.6
加热至玻璃软化时间 (s)	13	18	20	11	17	18	6	15	17

由表 5.3.1 中数据可得出以下结论:

A 加热圈直径一定时, 加热丝直径越大, 加热至玻璃软化的时间越长;

B 加热丝直径一定时, 加热圈直径越小, 加热至玻璃软化的时间越短。

对于结论 A, 理论分析如下:

设分压电阻为 R_1 , 加热丝电阻为 R_2 , 则加热丝功率为

$$P = \frac{U^2 \cdot R_2}{(R_1 + R_2)^2} \quad (5.1)$$

其中 U —输出电压; R_1 —分压电阻; R_2 —加热丝电阻; $R_1=0.8\Omega$, $R_2 < R_1$ 。

由式 (5.1) 知加热丝功率 P 与输出电压 U 的平方成正比, 其函数图像如图 5.3.3, 随着输出电压的升高, 加热丝功率迅速增大。

当加热丝电阻 R_2 小于分压电阻 R_1 时, 加热丝电阻 R_2 越大, 其功率越大; 当加热丝电阻 R_2 大于分压电阻 R_1 时, 随着加热丝电阻 R_2 的增大, 其功率逐渐减小。

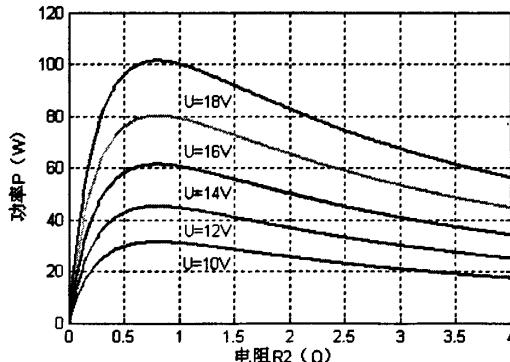


图 5.3.3 加热丝功率与电阻函数曲线图

本实验中加热丝电阻 R_2 小于分压电阻 R_1 , 长度一定时, 加热丝直径变大, 其电阻减小, 由图 5.3.3 可知加热丝功率减小, 所以加热至玻璃软化的时间变长。

对于结论 B, 其它参数相同的条件下, 加热圈直径越小其温度场越集中, 加热效率越高, 所以加热至玻璃软化的时间越短。综合上述因素本实验中选用直径为 0.8mm 的镍铬合金加热丝, 加热圈直径 2.5mm。

(2) 加热长度的确定

为了找出微器件内径与加热长度的关系, 固定合适的电压(U), 改变加热长度(L), 可分别得到微器件内径(d)的实验原始数据 (表 5.3.2)。

微针参数的检测由实验室现有的体式显微测量系统完成, 利用倒置法测量, 通过图像处理技术可对微流体器件端面直径进行精密检测^[34]。

实验参数: 加热丝直径 0.8mm, 加热圈直径 2.5mm, 加热电压: 14V, 硼硅酸盐玻璃管: 外径 1.0mm, 内径 0.6mm, 长 90mm。

表 5.3.2 加热长度与微器件内径的关系

器件编号	加热长度 L(mm)	微器件内径 d(μm)	器件类型
#01	1	玻璃管尚未软化被拉断	无效
#02	2	2	微针
#03	3	10	微管道
#04	4	35	微管道
#05	5	70	微管道

由实验数据可知, 加热长度为 1mm 时温度场不够集中, 大部分热量散发到环境中而损失, 玻璃管达不到软化的温度。加热长度大于 2mm 时由于加热范围扩大, 软化的玻璃材料增多, 在一定的行程内玻璃管被拉制成了微管道。

可以通过理论计算确定加热长度的范围, 设微管道外径为 D, 内径为 d, 微针收缩长度为 L, 加热长度为 L', 微针拉制具有对称性, 由拉制前后玻璃材料体积相等的原理可得:

$$2\Pi\left[\left(\frac{D}{2}\right)^2 - \left(\frac{d}{2}\right)^2\right] \cdot L = \frac{1}{3}\Pi\left[\left(\frac{D}{2}\right)^2 - \left(\frac{d}{2}\right)^2\right] \cdot L' \quad (5.2)$$

$$\text{求得 } L' = \frac{1}{6}L.$$

细胞注射微针要求收缩长度 L' 较短, 具有较高的强度, 通常 $L' \leq 15\text{mm}$, 即加热丝加热长度 $L \leq 2.5\text{mm}$, 可见理论计算与实验数据符合的较好。

(3) 加热电压对微针拉制效果的影响

为研究加热电压对拉制的微针内径的影响, 实验中固定了其它几个控制参数。实验测得不同电压下拉制的微针内径见表 5.3.3:

实验参数: 加热丝直径 0.8mm, 加热圈直径 2.5mm, 加热长度 2mm; 硼硅酸盐玻璃管: 外径 1.0mm, 内径 0.6mm, 长 90mm。

表 5.3.3 加热电压与微针内径的关系

微针编号	加热电压 U(V)	微针内径 d(μm)	加热时间 T(s)
#01	10	玻璃管尚未软化被拉断	无效
#02	11	玻璃管尚未软化被拉断	无效
#03	12	3	16
#04	13	2	14
#05	14	2	11
#06	15	2	8
#07	16	3	7
#08	17	3	6
#09	18	2	6
#10	19	加热丝被烧断	无效

由表 5.3.3 可知, 加热电压过小时, 加热温度达不到玻璃的熔点, 玻璃管被强得拉断; 加热电压过大则导致加热丝被烧断; 在加热电压允许的范围内, 电压的变化对微针的内径没有明显的影响, 但随着电压的增大, 玻璃管软化所需的加热时间越来越短, 且加热时间降幅愈来愈小, 其变化规律见图 5.3.4:

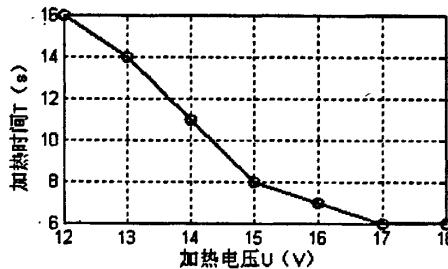


图 5.3.4 加热电压与加热时间的关系

随着加热电压的增大, 加热丝功率显著提高, 加热至玻璃管软化所需的时间便越来越短, 实验数据与理论符合得较好。

(4) 加热时间的控制

本设计方案采用气缸作为动力拉制微流体器件, 与采用重力拉制微器件的方法不同的是, 前者属于无预紧力拉制, 而后者属于有预紧力拉制, 玻璃管软化时即在重力作用下被拉伸, 无需考虑加热至拉伸所需的时间, 无预紧力拉制方法中加热至拉伸的时间则需精确控制才可以拉制出满足参数要求的微流体器件, 为此有必要对加热至拉伸的时间与微流体器件参数的关系进行详细的研究。实验数据见表 5.3.4。

实验参数: 加热丝直径 0.8mm, 加热圈直径 2.5mm, 加热长度 2mm, 加热电压 14V; 硼硅酸盐玻璃管: 外径 1.0mm, 内径 0.6mm, 长 90mm。

表 5.3.4 加热时间与微器件内径的关系

微器件编号	加热时间 T(s)	微器件内径 d(μm)	微器件类型
#01	10	玻璃管尚未软化被拉断	无效
#02	11	2	微针
#03	12	8	微针
#04	13	15	微管道
#05	14	25	微管道
#06	15	玻璃软化滴落	无效

由表可知, 加热时间太短玻璃管尚未来得及软化便被拉断, 而加热时间太长玻璃就会软化滴落, 这是应该避免的两个极端; 在允许的加热时间范围内, 随着加热时间的延长, 拉制的微器件内径也显著变大; 加热时间延长时, 被软化的玻璃材料变多, 在一定的行程内玻璃管被拉制成了微管道。

5.3.3 微针拉制工艺的优化设计

(1) 优化设计的目的

由前述的内容可知, 在细胞工程中, 对于微注射用的微针而言, 由于微针的某些几何参数对系统的性能影响较大, 甚至是决定性的作用, 因此对微针的某些几何参数提出了定量的要求。这就需要对微针的制作工艺参数进行定量的研究。

细胞注射微针需被控制的几何参数为:

微针的针尖内径值 d (μm)

微针的针尖外径值 D (μm)

微针针尖锥度 T (°)

在实际应用中主要考虑微针的针尖内径和锥度, 由拉针仪的拉制原理可知, 在制作过程中, 影响微针几何参数的工艺因素很多, 且每个影响因素都可能会影响不同的几何参数, 这样就会使得问题复杂化。欲得到一定几何参数的微针时, 将面临不知调整什么参数, 且具体调整到什么样的数值等问题。因此, 要想完全控制住微针的几何参数, 必须找出各影响因素对微针几何参数影响的规律, 这样才能按照影响规律制作出完全符合实验需要的微针。

(2) 优化设计的原理

经过对拉针仪方案深入的研究以及大量的试验后发现拉制微针时影响针尖几何参数的工艺参数主要包括: 1) 加热电压(U); 2) 加热时间 (T); 3) 电阻丝的加热长度(L)。固定一组参数, 只改变其中一个参数拉制微针, 测出微针的外形尺寸, 通过原始数据的曲线拟合可以得到这一参数对微针几何参数的影响规律, 从而可以有效的控制工艺参数。

(3) 优化设计的具体过程

选择合适的电阻丝装夹在拉针器上，现选用的是直径为 0.8mm 的镍铬合金电阻丝。用外径 $\Phi 1.0\mu\text{m}$ 、内径 $\Phi 0.6\mu\text{m}$ 的玻璃毛细管，按照微针优化设计的原理改变参数进行试验。根据所得的数据绘制出曲线图，拟合出数据的变化规律，并通过相关性分析得出各个拉制参数对微针参数的影响，得出最优设计。

● 加热电压对微针的影响

固定合适的加热时间 (T) 和加热长度 (L)，改变加热电压(U)，可分别得到微针内径 $d(\mu\text{m})$ (表 5.3.5)、半锥度 $t(^{\circ})$ (表 5.3.6)的原始数据。

实验参数：加热丝直径 0.8mm，加热长度 2mm；硼硅酸盐玻璃管：外径 1.0mm，内径 0.6mm，长 90mm。

表 5.3.5 微针内径与加热电压的关系

微针编号	加热电压 U(V)	微针内径 $d(\mu\text{m})$
#01	12	3
#02	13	2
#03	14	2
#04	15	2
#05	16	3
#06	17	3
#07	18	2

表 5.3.6 半锥度与加热电压的关系

微针编号	加热电压 U(V)	半锥度 $t(^{\circ})$
#01	12	1
#02	13	1.1
#03	14	1.3
#04	15	1.4
#05	16	1.6
#06	17	1.8
#07	18	2.0

分别绘制出表 5.3.5 及表 5.3.6 中实验值散点走势图如下：

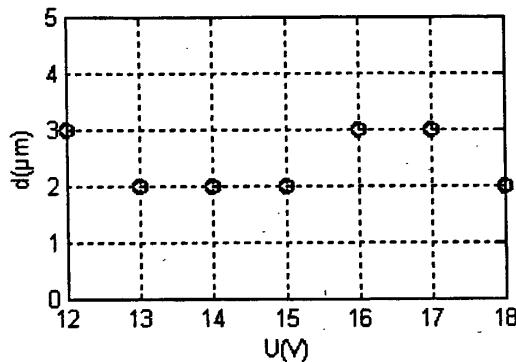


图 5.3.5 微针内径与加热电压关系实验数据散点图

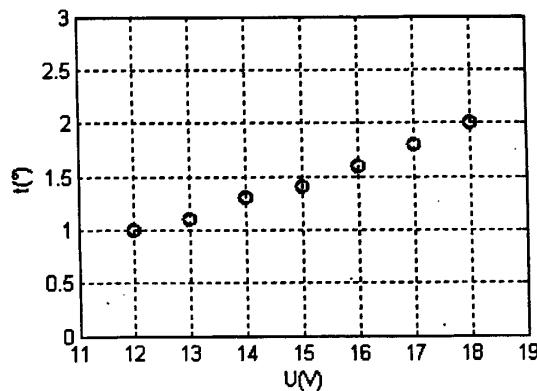


图 5.3.6 微针半锥度与加热电压关系实验数据散点图

由图中散点分布趋势可看出, 加热电压对微针针尖内径没有明显的影响, 散点的波动是由于工艺参数的波动、实验台的精度以及测量误差所造成的。而半锥度与加热电压成正比, 且基本呈线性关系。采用最小二乘法拟合出其线性关系为:

$$t = 0.1679U - 1.0607, \quad (11 < U < 19) \quad (5.3)$$

● 加热时间对微针的影响

固定合适的加热电压(U)和加热长度(L), 改变加热时间(T), 可分别得到微针内径 $d(\mu\text{m})$ (表 5.3.7)、半锥度 $t(^{\circ})$ (表 5.3.8)的原始数据。

实验参数: 加热丝直径 0.8mm, 加热长度 2mm, 加热电压 14V; 硼硅酸盐玻璃管: 外径 1.0mm, 内径 0.6mm, 长 90mm。

表 5.3.7 微针内径与加热时间的关系

微器件编号	加热时间 T(s)	微器件内径 $d(\mu\text{m})$	微器件类型
#01	11	2	微针
#02	12	8	微针
#03	13	15	微管道
#04	14	25	微管道

表 5.3.8 半锥度与加热时间的关系

微针编号	加热时间 T(s)	半锥度 $t(^{\circ})$
#01	11	1.3
#02	12	1.1
#03	13	0.8
#04	14	0.5

分别绘制出表 5.3.7 及表 5.3.8 中实验值散点走势图如图 5.3.7 和 5.3.8 所示。

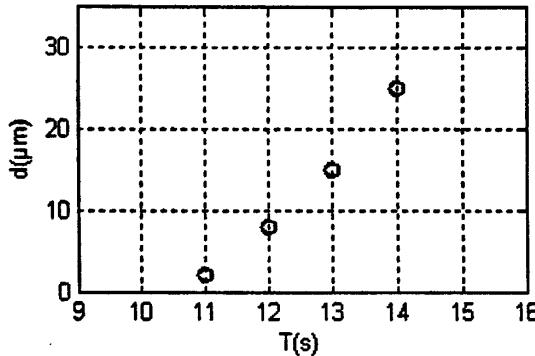


图 5.3.7 微针内径与加热时间关系实验数据散点图

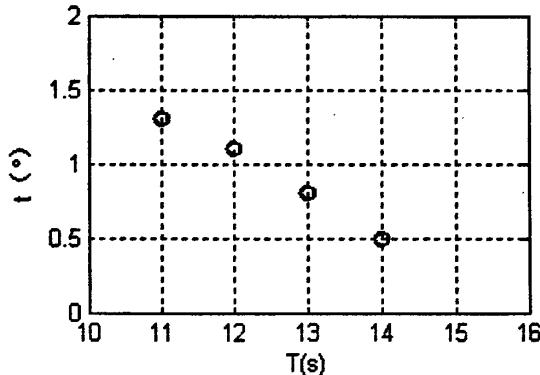


图 5.3.8 微针半锥度与加热时间关系实验数据散点图

由散点分布图可看出微针内径与加热时间成正比，基本为线性关系，而半锥度与加热时间成反比关系，且基本为线性关系。同样地利用最小二乘法可拟合出微针内径与加热时间的关系为：

$$d = 7.6T - 82.5, \quad (10 < T < 15) \quad (5.4)$$

微针半锥度与加热时间的关系为：

$$t = -0.27T + 4.3, \quad (10 < T < 15) \quad (5.5)$$

● 加热长度对微针的影响

固定合适的加热电压(U)和加热时间 (T)，改变加热长度 (L)，可分别得到微针内径 $d(\mu\text{m})$ (表 5.3.9)、半锥度 $t(^{\circ})$ (表 5.3.10)的原始数据。

实验参数: 加热丝直径 0.8mm, 加热电压: 14V, 硼硅酸盐玻璃管: 外径 1.0mm, 内径 0.6mm, 长 90mm。

表 5.3.9 微针内径与加热长度的关系

器件编号	加热长度 L(mm)	微器件内径 d(μm)	器件类型
#01	2	2	微针
#02	3	10	微管道
#03	4	35	微管道
#04	5	70	微管道

表 5.3.10 半锥度与加热长度的关系

器件编号	加热长度 L(mm)	半锥度 t(°)
#01	2	1.3
#02	3	1.1
#03	4	0.8
#04	5	0.5

实验值散点走势图如图 5.3.9 和 5.3.10 所示。

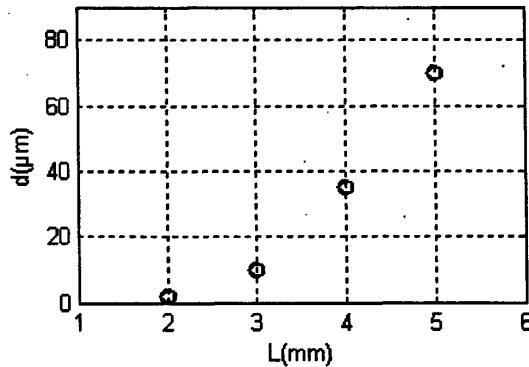


图 5.3.9 微针内径与加热长度关系实验数据散点图

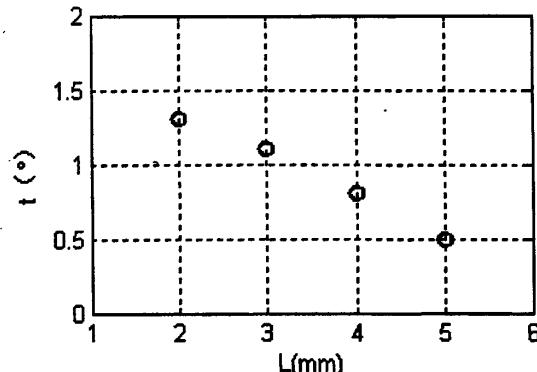


图 5.3.10 半锥度与加热长度关系实验数据散点图

同样的从散点图可以看出微针内径与加热长度基本成正比线性关系, 半锥度与加

热长度基本成反比线性关系。利用最小二乘法拟合其函数关系可得，

微针内径与加热长度的函数关系为：

$$d = 22.9L - 50.9, (2 \leq L \leq 5) \quad (5.6)$$

半锥度与加热长度的函数关系为：

$$t = -0.27L + 1.87, (2 \leq L \leq 5) \quad (5.7)$$

● 拉制参数相关性分析

为得出微针各种拉制参数对微针参数的影响程度，找出拉制微针参数的关键因素，提高系统稳定性，制作出参数一致性好的细胞注射针，需要研究各种拉制参数与微针参数的相关性，从而有针对性的控制拉制参数。相关系数的定义为^[38]：

$$Corr(X, Y) = \frac{Cov(X, Y)}{\sqrt{Var(X)} \sqrt{Var(Y)}} = \frac{Cov(X, Y)}{\sigma_x \sigma_y} \quad (5.8)$$

相关系数与协方差都可以衡量两个分量的相关程度，协方差是有量纲的量，相关系数消除了量纲的影响。表 5.3.11 为各种拉制参数与微针内径和半锥度的相关系数。

表 5.3.11 控制参数相关性分析结果

相关系数	加热时间	加热电压	加热长度
微针内径	0.9928	0	0.9665
半锥度	-0.9959	0.9948	-0.9959

从上述研究可以得出以下结论：

- (1) 微针内径与加热时间及加热长度高度相关，且加热时间对微针内径的影响高于加热长度。从加热长度的实验研究中可知加热长度大于等于 3mm 时由于玻璃软化材料增多，在一定的拉制行程内只能被拉制为微管道。而加热时间与微针内径正相关，因此要获得较小的微针内径应尽量缩短同一电压下的加热时间。微针内径与加热电压无相关性，从实验中可见在有效的电压范围内都可拉制出内径基本一致的微针。
- (2) 微针半锥度与加热时间、加热电压和加热长度均高度相关，且半锥度与加热时间和加热长度负相关，与加热电压正相关。即随着加热时间和加热长度的增加，半锥度减小；随着加热电压的增加半锥度增大。而较大的微针半锥度有利于增强微针的刚度，减小流动阻力，因此应该在允许的范围内减小加热时间及加热长度，增大加热电压。

通过以上研究得出要制作出参数更好，性能更优的细胞注射微针，应该在有效的范围内减小加热时间和加热长度，增加加热电压。综合以上因素确定拉制参数，图 5.3.11 为 CCD 拍摄的电压 18V，加热时间 6s，加热长度 2mm 条件下拉制的细胞注射

微针针尖外形图, 其针尖内径 $2\mu\text{m}$, 半锥度 2° 。

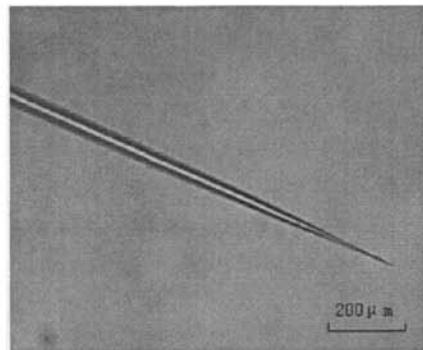


图 5.3.11 微针针尖外形图

5.3.4 设计方案评估及优化

(1) 系统稳定性评估

细胞微注射要求对于同一种细胞注射操作注射量一致、可重复性好, 而注射针内径直接影响着注射量的多少, 因此拉针仪需要有足够的系统稳定性来保证注射微针内径的一致性。通过分析本文拉针仪设计方案所拉制的微针内径尺寸波动性, 并与微系统研究室现有重力拉针装置作比较, 得出系统稳定性影响因素。

表 5.3.12 为本文设计方案及现有的重力拉针装置在各自参数一定的情况下拉制出的一组微针内径值。

表 5.3.12 两种装置拉制的微针内径值对比

微针拉制装置	微针内径 $d(\mu\text{m})$									
	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07	#08	#09	#10
(1) 本文设计方案	3	2	2	2	4	3	2	3	2	3
(2) 重力拉制装置	2	5	3	7	10	3	6	8	3	8

方差是用来描述随机变量取值的集中与分散程度的特征数。方差愈小, 随机变量的取值愈集中; 方差愈大, 随机变量的取值愈分散。采用方差来分析两种装置拉制的微针内径尺寸波动的大小。方差的定义为^[35]:

$$Var(X) = E(X - E(X))^2 \quad (5.9)$$

根据上述定义计算两组微针内径尺寸方差分别为 0.4889 、 7.3889 , 由此可见本文所设计的拉针仪拉制的微针内径尺寸波动明显小于实验室现有的重力拉针仪, 拉制的微针参数一致性较高, 从而具有更好的系统稳定性, 微针拉制成功率高。图 5.3.12 为微系统研究室重力拉针仪原理图。

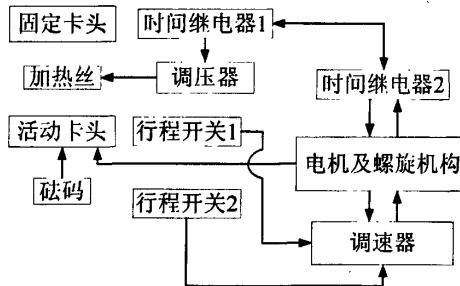


图 5.3.12 重力拉针仪原理图

其工作原理如下：硼硅酸盐玻璃毛细管装夹在固定卡头和活动卡头之间，活动卡头的底部配有可改变重量的砝码块，当加热丝通电时，硼硅酸盐玻璃管将受热变形，当温度达到硼硅酸盐玻璃的塑性加工工艺温度时，在砝码的重力作用下，硼硅酸盐玻璃管将被拉长，最终形成微针。调整时间继电器初值，可以改变加热时间。

影响其系统稳定性的因素主要有：

- 加热时间通过时间继电器来控制，而加热时间影响软化的玻璃材料的多少，因此对微针参数有着重要的影响。装置中采用的时间继电器精度低，无法实现对加热时间的精确控制，且为手动操作，重复精度很差，导致系统稳定性差，微针尺寸波动较大。
- 受制造精度及装配精度影响，装置中固定卡头与活动卡头存在对中性误差，且玻璃管每次装夹时对中性误差都不同，造成了微针拉制过程中发生弯曲及尺寸的波动，降低了微针拉制的成功率。

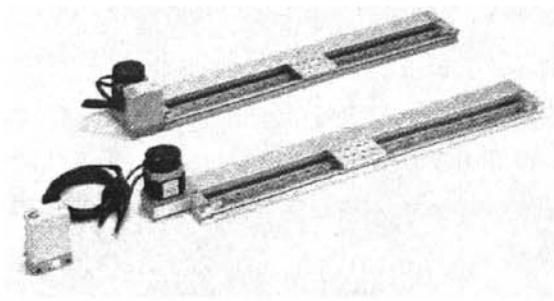
本文设计方案考虑了以上因素，采用 PLC 的定时器功能来精确控制加热时间，重复精度非常高，保证了每次加热时间的一致性。运动部件采用导轨滑动式气缸，直线度好，运动精度高，速度快，减少了加工、装配件的数量，提高了玻璃管定位精度及系统稳定性，从而拉制出参数一致的细胞注射玻璃微针。

(2) 设计方案的优化

实验中发现同一拉制条件下微针参数依然有一定的波动，环境温度对微针参数有一定影响。同时由于本设计方案采用气缸作为动力拉制微针，因此需要气源等相关设备，操作不够方便，为进一步提高系统稳定性，增强设备的可操作性，可从以下方面对拉针仪设计方案作进一步优化：

- 加热丝暴露于空气中，其温度场易受环境（温度、空气流动等）的影响较大，可以在加热丝周围设置保温屏障，减小环境对加热丝温度场的影响，提高加热丝温度场的稳定性。
- 气缸具有速度快，动力大，工作可靠等优点，但气源等气动附属设备体积大、

噪声大,操作方便性不高,作者在 SMC 中国有限公司南京营业所咨询时获悉一种具有和气缸相同特点的滑动导轨式执行部件—电缸。它采用直流电源驱动,反应速度快,易于操作控制,工作可靠。图 5.3.13(a)、(b)为其外形图及参数。



(a) 电缸外形图

型号		E-MY2H			
公称尺寸		16	25		
可搬质量		5kg	10kg		
搬运速度设定	100~1000 mm/s (选择式参见下表)				
搬运加速度设定	0.49~4.90 m/s ² (选择式参见下表)				
加减速方式	梯形驱动				
移动方向	水平方向				
定位个数	3 点停止	两端 (机械限位器)、中间位置 1 点			
	5 点停止	两端 (机械限位器)、中间位置 3 点			
重复定位精度	两端	±0.01 mm			
	中间	±0.1 mm			
中间位置设定方法	直接教学、JOG 教学				
设定处	控制器本体				
显示	电源用 LED、报警用 LED、定位完成 LED				
输入信号	驱动指令信号、非常停止输入信号				
输出信号	定位完成信号、异常检出信号、READY 信号				

(b) 电缸参数图

图 5.3.13 电缸外形及参数图^[39]

该电缸重复定位精度高,可搬质量达到 10kg,速度最大达到 1000mm/s,加速度为 0.05—0.5g 可调,并可根据需求定制,可达到 1.5g,完全满足微针拉制的动力要求,且该电缸具有中间多点定位功能,从而可以根据需求调节气缸行程。电缸由直流电源驱动,方便无噪声,克服了气动设备的缺点,与 PLC 结合可以实现电缸的自动化控制,工作稳定可靠,可拉制出参数一致性更好的细胞注射微针。

5.4 本章小结

- (1) 简述了细胞注射对注射针参数及注射针材料的要求, 讨论了现有拉针设备的不足, 并设计了以气缸为动力部件的微针拉制方案。
- (2) 根据拉针仪设计方案搭建了拉针实验系统, 通过实验研究拉制参数对微针参数的影响规律。
- (3) 根据实验结果研究得出控制参数的影响规律并进行优化设计, 分析了加热时间、加热电压及加热长度对微针参数的影响程度, 得出微针拉制参数的选择依据, 即应该在有效的范围内减小加热时间和加热长度, 提高加热电压。

6 结论与展望

6.1 结论

- (1) 以微流体数字化技术为基础, 设计基于压电驱动的数字化细胞微注射仪, 对机构移动原理和结构刚度进行分析计算, 确定出微注射仪各零部件参数, 实验结果表明结构刚度满足设计要求。
- (2) 搭建的数字化细胞微注射仪位移测试实验系统具有较高的精度, 通过实验得出了驱动波形、电压、频率、倾斜角度及预紧力对微注射仪位移特性的影响规律, 为细胞微注射参数控制提供了实验依据。
- (3) 通过搭建的数字化细胞微注射实验系统研究微注射仪细胞注射的实际效果, 实验结果表明: 本文研制的数字化细胞微注射仪具有进退针速度快、刺膜细胞变形小、注射量分辨率高(可达飞升级)的优点。
- (4) 针对本文拉针仪设计方案搭建的方案原理验证实验系统具有良好的系统稳定性, 通过实验研究得出了加热时间、加热电压及加热长度对微针参数的影响规律, 结果表明:
 - 加热时间对注射针参数影响显著, 因此要拉制出高质量的微针必须能够精确的控制加热时间。
 - 加热时间和加热长度与微针内径高度正相关, 与微针半锥度高度负相关, 加热电压与微针内径无明显关系, 与半锥度高度负相关, 因此应该在有效的范围内减小加热时间和加热长度, 提高加热电压。

6.2 展望

目前市场上商品化的细胞注射装备价格昂贵, 并未实现细胞注射自动化, 且存在流动正常性较差、持续工作能力和生产率较低等缺点。数字化细胞微注射仪集快速进退针、刺膜和注射于一完整连贯的过程中, 简单易操作, 可控性好, 易于实现细胞注射自动化成, 结合计算机视觉及智能控制技术可望研制出物美价廉的自动化细胞注射系统。

致 谢

本论文是在我的导师侯丽雅、章维一教授的悉心指导下完成的。侯老师、章老师渊博的知识、严谨的治学态度给我留下了深刻的印象。他们不仅在学术上对我严格要求，而且教会了我很多做人的道理，衷心的感谢侯老师、章老师孜孜不倦的教诲！

感谢李小宁老师、路建萍老师、朱丽老师、田桂中师兄、杨眉、兰海英、胡芳芳、顾小明等同学，他们无私的支持和帮助使我得以顺利完成本论文。

感谢微系统研究室的其他老师和同学们！

感谢父母的养育之恩及对我一如继往的关爱和支持！

参考文献

- [1] 罗九甫, 李志勇. 生物工程原理与技术[M]. 第1版. 北京: 科学出版社, 2006
- [2] 殷红, 杨淑慎, 郝建国. 细胞工程[M]. 第1版. 北京: 化学工业出版社, 2006
- [3] 王金发, 何炎明. 细胞生物学实验教程[M]. 第1版. 北京: 科学出版社, 2004
- [4] 西德一阿里吉尔, A.加西亚一卡冉卡, 张玉静等. 微注射和转基因实验指南[M]. 第1版. 北京: 科学出版社, 2002
- [5] Jun Sasaki, Sachihiro Youku, Kazuo Tamamushi, Akio Ito. Development of microchannel device for automated microinjection[J]. SPIE. 2005, Vol.5718: 186-196
- [6] Kiyoshi Taninaka, A.Yabuki, A.Ito, T.Harada. Precise Microinjection into Living Cells by Summation of Fluorescence Intensity[J]. 2004, Proc. of SPIE Vol.6441: 64410Z-1-64410Z-10
- [7] 彭秀玲. 基因工程实验技术[M]. 第1版. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997
- [8] 章维一, 侯丽雅. 微流体数字化的科学与技术问题(I): 概念、方法和效果[J]. 科技导报. 2005, 23(8): 4-9
- [9] 章维一, 侯丽雅. 微流体数字化的科学与技术问题(II): 物质数字化及物质能量信息同一数字化概念研究[J]. 科技导报. 2006, 24(3): 41-47
- [10] Zhe Lu, Peter C.Y.Chen, Joo Hoo Nam, Ruowen Ge, Wei Lin. A Micromanipulation System for Automatic Batch Microinjection[C]. IEEE International Conference on Robotics and Automation. 2007, 4: 3134-3135
- [11] Kallio P, Lind M. Position Control of A 3 DOF Piezohydraulic Parallel Micromanipulator . Proc of the 1998 IEEE Int. Conf. On Robotics & Automation[C]. 1998: 1823-1828
- [12] Hideki Yamamoto, Junko Sakiyama . Stereoscopic Visual Servo System for Microinjection[C] . IEEE Instrumentation and Measurement Technology Conference. 2002, 5: 1109-1112
- [13] Sun Yu, Bradley J.Nelson. Microrobotic Cell Injection[C]. Proceedings of the 2001 IEEE International Conference on Robotics & Automation. 2001, 5: 620-625
- [14] Jea-Hong Shim, Sung-Yong Cho, Dong-Hyuk Cha. Vision-guided micromanipulation system for biomedical application[J]. Proc. of SPIE. 2004, Vol.5604: 98-107
- [15] Satoru Sakai , Sachihiro Youku , Yoshinori Suto , Moritoshi Ando , Akio Ito . Automated high-throughput microinjection system for floating cells[J]. SPIE. 2005, Vol.5699: 59-66

- [16] Eppendorf Corporation. <http://www.eppendorf.cn>
- [17] 黄大刚, 卢桂章. 微操作机器人系统的大范围三维标定方法[J]. 机器人, 2002, 4: 353-357
- [18] 刘连臣, 卢桂章. 微操作机器人及其显微视觉伺服控制系统的研究[J]. 高技术通讯, 2001, 6: 56-58
- [19] 于波, 王立鼎. 一种双目分时显微立体成像系统的研制[J]. 光学精密工程, 1997, 5(4): 49-52
- [20] 科技导报编辑部. 2004年中国重大科学、技术与工程进展[J]. 科技导报, 2005, 23(2): 58-62
- [21] 章维一, 侯丽雅. 影响流体流动的方法及其装置和应用[P]. 中国: ZL 03152948.8, 授权日: 2006.5.24
- [22] 章维一, 侯丽雅, 刘天军. 细胞显微注射仪[P]. 中国: 申请号 200410065016.7. 授权日: 2007.11.15
- [23] 荆涛. 压电陶瓷微位移工作台在精密工件台上的应用研究[J]. 光学精密工程, 1994, 4(4): 64-68
- [24] 孙立宁, 安辉等. 改善电致伸缩陶瓷微位移器性能的研究[J]. 中国机械工程, 1994, 2(5): 6-7
- [25] 卢泽生, 刘海涛. 基于压电陶瓷的摩擦式微进给机构的设计[J]. 制造技术与机床, 2007, 6: 25-28
- [26] 樋口俊郎, 渡辺正浩, 工藤謙一. 压電素子の急速変形を利用した超精密位置決め機構. 精密工学会誌, 1988, 11: 2017-2112
- [27] William T Thomsan. 振动学理论及应用[M]. 第1版. 广州: 世界图书出版公司, 1994
- [28] 刘鸿文. 材料力学[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 1992
- [29] 周严, 侯丽雅, 章维一. 波形和参数在线可编程的功率电源及其应用[J]. 电测与仪表, 2004, 41(457): 16-19
- [30] 石振东, 刘国庆. 实验数据处理与曲线拟合技术[M]. 第1版. 哈尔滨: 哈尔滨船舶工程学院出版社, 1991
- [31] 阎凤文. 测量数据处理方法[M]. 第1版. 北京: 原子能出版社, 1990
- [32] 沙菁洁. 数字化无阀微泵的设计、制作及应用实验研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2007: 54-59
- [33] 杨益寿, 熊素芳, 龙文等. 小鼠卵细胞质内显微注入单精子受精的实验研究[J]. 解剖学报, 1998, 29(4): 441-445
- [34] 刘天军, 章维一, 侯丽雅. 细胞注射玻璃微针拉针器的研制[J]. 光学精密工程,

- 2003, 11(5): 432-436
- [35] D.G.Holloway. 玻璃的物理性质[M]. 第1版. 北京: 轻工业出版社, 1985
- [36] 范正明. 硼硅玻璃管道的应用[J]. 化工设计. 2001, 11(5): 15-17
- [37] 王春青. 微流体数字化技术中微器件的显微测量技术研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2006
- [38] 刘志万. 实验数据的统计分析和计算机处理[M]. 第1版. 北京: 中国科技大学出版社, 1989
- [39] SMC Corporation. <http://www.smc.com.cn/index.asp>