

CONTROLLING AND EVALUATION OF LASER MICROMANIPULATION EXPERIMENTS

Jan Kaňka

Master Degree Programme (2), FEEC BUT

E-mail: xkanka03@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Ivo Provazník

E-mail: provaznik@feec.vutbr.cz

Abstract: This work is focused on the development of a user friendly software within LabView™ environment and its laboratory utilization in various activities related to laser micro-manipulations and laser micro-spectroscopy of living microorganisms. Both techniques belong to the growing group of contact-less and nondestructive techniques for manipulation and diagnostic of single living microorganisms, cells, or viruses. Within this project we mastered the driving of peripheries (JAKE), calibration of CCD scene, real-time image processing of the CCD scene, automatic selection of the cell for further laser processing, targeting of the laser beam to the cell and the cell repositioning by a focused laser beam, controlled motion of micro-positioning stage, controlling the acquisition and processing of the Raman spectrum from a living microorganism. The final goal of our activity is a fully automatic laser-based sorting of living cells depending on their chemical compositions. This work has been elaborated at the Institute of Scientific Instruments of the ASCR, v.v.i. under the supervision of prof. Pavel Zemánek.

Keywords: EEICT, laser, Raman, spectroscopy, micro-manipulation, micro-fluidics, channel, LabView™

1. ÚVOD

Moderní biologie a biotechnologie se snaží pochopit fungování organismů na úrovni jednotlivých buněk či mikroorganismů s využitím fyzikálních a přístrojových přístupů, které jsou k buňkám maximálně šetrné a ponechávají je i po zásahu plně životaschopné. Laserové záření vhodné vlnové délky se jeví jako velmi vhodný kandidát, neboť je možné jej vhodnou optikou zacílit na jednotlivou buňku či organismus, prochází přes celý mikroobjekt a navíc umožňuje využít řady metod laserové spektroskopie k získání informací o celém objemu mikroobjektu. Méně známou skutečností je, že světlo má i mechanické účinky a vhodně tvarovaný laserový svazek umožňuje bezkontaktní zachycení mikroobjektu do tzv. optické pasti a jeho přemístování v prostoru [1,2]. Kombinace manipulačního i diagnostického potenciálu laserových svazků nabízí řadu unikátních možností, jak zkoumat organismy a buňky vyskytující se převážně ve vodném prostředí, a dále rozvíjet techniky označované jako „Lab on a Chip“. V této práci jsme se zaměřili na kombinaci optické mikromanipulační techniky známé jako optická pinzeta [2] a ramanovské mikroskopie [3].

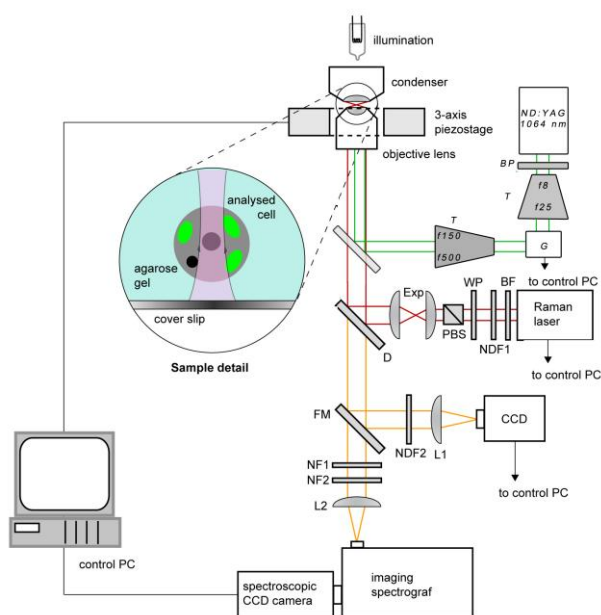
2. ROZBOR

Silové působení světla je založeno na přenosu hybnosti fotonů světla na mikroobjekt během absorpce a rozptylu světla mikroobjektem. Z hlediska silového působení světla se zavádí tzv. *rozptylná síla* (*scattering force*), která je úměrná optické intenzitě dopadajícího světla na mikroobjekt a působí ve směru šíření světla, a *gradientní síla*, která je závislá na prostorovém gradientu optické intenzity záření a působí ve/proti směru tohoto gradientu v závislosti na indexech lomu okolního prostředí a mikroobjektu [1,2].

Ramanovská spektra mají původ v nepružném rozptylu dopadajícího záření objekty a jednotlivá spektrální maxima odpovídají přechodům mezi vibračními stavy molekulárních vazeb. V práci se zaměřujeme na nerezonanční ramanovský rozptyl, který lze vybudit ozářením objektu laserovým svazkem o libovolné vlnové délce [3].

Obr. 1 ukazuje uspořádání nejdůležitějších částí sestavy pro chytání a diagnostiku řas.

- 1) Část detekční. CCD kamera snímá oblast vzorku s řasami. Jednotlivé snímky jsou softwarově vyhodnoceny a slouží k nalezení vhodné řasy a manipulacím s ní.
- 2) Část chytací. Chytací laserový svazek je vychylován dvěma galvanometrickými zrcadly, a optickou cestou fokusován. Touto cestou je prováděna mikromanipulace s řasami.
- 3) Část spektroskopická. Obsahuje laser o vlnové délce 785 nm, který je rovněž vhodnou optickou cestou fokusován do stopy srovnatelné s vlnovou délkou laseru. Ramanovská spektra jsou detekována spektrografem a tekutým dusíkem chlazenou CCD kamerou.



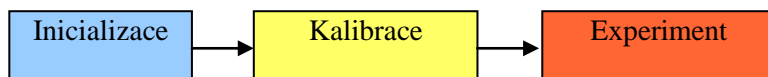
Obrázek 1: Schéma experimentální sestavy

D – polopropustné zrcadlo, Exp – expandér svazku, PBS – polarizační dělič svazku, WP – $\lambda/2$ fázová desička, NDF1,2 – šedý filtr, BF – pásmová propust pro vlnovou délku chytacího svazku (1064 nm), L1 – čočka, CCD – snímací kamera, G – galvanometrická zrcadla, T – teleskop

Takto uspořádaný systém je řízen pomocí programového prostředí LabViewTM. Byl vytvořen a odladěn program, který automaticky detekuje buňky řas zpracováním CCD obrazu metodou úpravy morfologie obrazu následovanou detekcí hran a binární reprezentací buněk. Ovládané periferie se skládají z CCD kamery, galvanometrických zrcadel, uzávěrek laserů, řízení intenzity osvětlení vzorku, sklopného zrcadla pro výběr spektroskopické nebo zobrazovací cesty, snímání ramanovského spektra. Software dále zpracovává a vyhodnocuje změřená spektra, na jejichž základě je vyhodnoceno chemické složení řas a následně přesunutí do kultivační či odpadní části mikrofluidního čipu. Rozhodovacím kritériem je vzájemný poměr, pro měření klíčových, specifických látek, projevujících se ve změřeném spektru jako lokální maxima (peaky).

3. STRUKTURA ALGORITMU

Samotný software je rozdělen na tři části:



3.1. INICIALIZACE

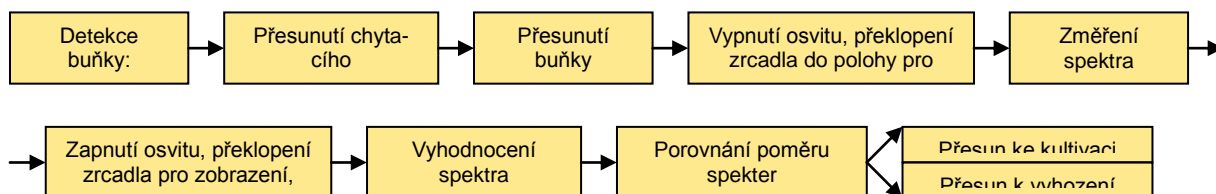
Nastavení parametrů CCD kamery (X/Y offset, X/Y velikost FOV, H/V binning), výběr analogových a digitálních linek, pro řízení zrcadla, osvitu a závěrky a parametry spektrografu (expoziční čas, centrální vlnovou délku, teplotu detektoru, výběr mřížky).

3.2. KALIBRACE

Výpočet koeficientů pro přepočet polohy chytacího svazku z CCD pixelů na napětí na galvanometrických zrcadlech, které zajišťují správné polohování chytacího svazku a přesun mikroorganismu. Dále je provedena kalibrace spektrografu, která zajišťuje správný přepočet z pixelů na spektroskopické CCD kameře na cm^{-1} horizontální osy grafu měřených spekter. Kalibrační koeficienty jsou uloženy, aby nebylo nutné provádět opětovnou kalibraci, nedošlo-li ke změnám v sestavě.

3.3. EXPERIMENT

Vlastní třídění je sekvenční a plně automatický proces. V případě, že je ze strany operátora vyžadována kontrola nad separačním procesem, je možné program přepnout do semi - automatického režimu, který dává uživateli možnost upravit parametry zobrazení kamery, detekci buněk, změnu oblastí pro vyhledávání spektrálních maxim či přesunu měřené buňky do kultivačního nebo odpadního kanálu. Sekvenci třídění ilustruje následující diagram:



4. ZÁVĚR

Byl sestaven a odladěn software pro automatické třídění řas na základě měření jejich Ramanova spektra. K bezkontaktní manipulaci s řasami je použit fokusovaný laserový svazek - optická pinzeta. Proces třídění probíhá plně automaticky, uživateli je však ponechána možnost měnit parametry procesu zobrazení, detekce buněk, rychlost přesunu buněk mezi pozicemi a další parametry pro vyhodnocení spekter. Tato práce si klade za cíl vytvořit uživatelsky příjemné prostředí kontroly třídění řas, které budou po následné kultivaci užity jako biopalivo.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla vypracována v Ústavu přístrojové techniky AV ČR, v.v.i., pod vedením prof. RNDr. Pavla Zemánka Ph.D. a za podpory projektů MPO FR-TI1/433, MŠMT a EK ALISI No. CZ.1.05/2.1.00/01.0017.

REFERENCE

- [1] Svoboda, K., Block, S. M., „Biological applications of optical forces“, Annual Reviews Inc., 1994, str. 247-285
- [2] Ashkin, A. Dziedzic, J. M., Bjorkholm J.E., Chu, S., „Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles“, Optics Letters, 1986, str. 288-290
- [3] Ferraro, J.R., Nakamoto, K., Brown, C.,W., „Introductory Raman Spectroscopy“, Academic Press, 2003
- [4] Samek, O., Jonáš, A., Pilát, Z., Zemánek, P., Nedbal, L., Tříška, J., Kotas, P., Trtílek, M., „Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells“, Sensors, 2010