

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Platforma pro mikromanipulaci se vzorky kapalných látek

Jakub Drs

České vysoké učení technické v Praze

Vedoucí práce:
Ing. Jiří Zemánek

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta elektrotechnická
Katedra řídicí techniky

Praha, 2015

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta elektrotechnická

katedra řídicí techniky

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Jakub Drs**

Studijní program: Kybernetika a robotika
Obor: Systémy a řízení

Název tématu: **Platforma pro mikromanipulaci se vzorky kapalných látek**

Pokyny pro vypracování:

1. Navrhněte a realizujte platformu pro manipulaci s malým množstvím kapalných látek (nanolitry), která bude schopná současně pohybovat se dvěma různými kapičkami s využitím elektrokinetických jevů (např. dielektroforéza, elektroosmóza, apod.).
2. Platforma by měla autonomně fungovat na základě obrazové zpětné vazby.
3. Jako základ platformy použijte již existující čtyřsektorové elektroodové pole pro dielektroforézu.
4. Otestujte koncept platformy za použití polystyrenových kuliček namísto kapek analyzované látky. Najděte vhodný způsob, jak stávající systém modifikovat, aby ho bylo možné použít pro manipulaci s látkami v kapalně formě.

Seznam odborné literatury:

- [1] H. Morgan and N. G. Green, AC electrokinetics: colloids and nanoparticles. Philadelphia, PA: Research Studies Press, 2003.
- [2] A. Ramos, Electrokinetics and Electrohydrodynamics in Microsystems. Springer, 2011.
- [3] T. B. Jones and T. B. Jones, Electromechanics of Particles. Cambridge University Press, 2005.
- [4] M. P. Hughes, Nanodynamics in engineering and biology. Boca Raton, Fla.; London: CRC, 2002.

Vedoucí: Ing. Jiří Zemánek

Platnost zadání: do konce letního semestru 2014/2015

prof. Ing. Michael Šebek, DrSc.
vedoucí katedry



prof. Ing. Pavel Ripka, CSc.
děkan

V Praze dne 3. 2. 2014

Abstrakt

Výsledkem této práce je nová mikromanipulační technologie využívající dielektroforézy k manipulaci s pevnými i kapalnými látkami v kapalném médiu.

První část práce se zabývá demonstrací principu 2D manipulace s polystyrenovými kuličkami. Pro demonstraci bylo zvoleno jednovrstvé elektrodové pole, které v kombinaci s obrazovou zpětnou vazbou a jednoduchým plánovacím algoritmem umožňuje autonomní manipulaci v celé aktivní oblasti elektrodového pole. Demonstrována byla i současná manipulace se dvěma objekty a jejich vzájemné přivedení k sobě.

Druhá část práce se zabývá modifikací dané platformy pro manipulaci s kapičkami. Princip manipulace byl nejprve ověřen na testovací třídící platformě. Získané poznatky byly dále využity pro návrh nové platformy integrující elektrodové pole, manipulační komůrku i generátor kapiček na jediný mikrofluidický čip.

Abstract

This work presents a novel micromanipulation concept based on dielectrophoresis capable of manipulation both of liquid and solid samples immersed in liquid medium.

The first part of this study demonstrates the ability of 2D micromanipulation of polystyrene microbeads. A single layer electrode array has been used for the experiments utilizing control strategy based on visual feedback and trajectory planning. Fully automated 2D manipulation with single particle has been demonstrated as well as simultaneous manipulation with two particles and bringing them together in the middle of the array.

The second part of the work deals with droplet manipulation. As a proof-of-concept a simple sorting device has been demonstrated. Based on this device a new manipulation platform has been proposed, integrating an electrode array, a manipulation chamber and a droplet generator in a single microfluidic chip.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje v souladu s Metodickým pokynem o dodržování etických principů při přípravě vysokoškolských závěrečných prací.

V Praze dne _____

podpis

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval celé své rodině za podporu v průběhu realizace této práce, dále pak svému vedoucímu Jiřímu Zemánkovi za vstřícný přístup, cenné rady a podporu během celé práce, Dr. Františku Foretovi a Evgenii Basova z ústavu analytické bioinstrumentace v Brně za spolupráci na projektu a umožnění přístupu do jejich laboratoře. V neposlední řadě také Zdeňku Hurákovi za opakovanou pomoc, doporučení a podporu při výjezdech do zahraničí v průběhu značné části mého studia.

Obsah

1. Motivace a Cíle	1
1.1. Aplikace dielektroforézy a kapiček v oleji	2
1.1.1. Kapičky v oleji jako mokroreaktory	2
1.2. Tvorba emulze vody a oleje	3
1.3. Možnosti manipulace s kapičkami	4
1.3.1. Electrowetting	5
1.3.2. Elektroforéza	5
1.3.3. Optická pinzeta	7
1.3.4. Dielektroforéza	7
1.4. Matematicko-fyzikální popis dielektroforézy	8
1.4.1. Positivní a negativní dielektroforéza	9
1.4.2. Dielektroforéza postupnou vlnou a elektrorotace	10
2. Navázání na minulou práci	11
2.1. Manipulace s polystyrenovými kuličkami	11
2.2. Experimentální platforma	11
2.3. Řízení dielektroforézy	12
2.4. Návrh manipulační strategie	14
2.4.1. Implementace řídicího algoritmu	17
2.5. Rozpoznávání v obraze	19
2.5.1. Kalibrace souřadného systému	19
2.5.2. Detekce objektu	21
2.5.3. Zpřesňování pomocí těžiště	22
2.6. Výsledky experimentů	23
2.6.1. Paralelní manipulace se dvěma objekty	27
3. Manipulace s kapičkami	29
3.1. Způsob manipulace s kapičkami	30
3.2. Testovací platforma pro ověření principu manipulace	31
3.2.1. Poznatky získané na testovací platformě	36
3.3. Návrh platformy pro manipulaci s kapičkami	37
3.3.1. Elektrodové pole	37

3.3.2. Mikrofluidika	40
3.3.3. Vysokonapěťový generátor	42
4. Závěr	53
4.1. Návrh manipulačního algoritmu pro čtyřsektorové pole	53
4.2. Manipulace s vodními kapičkami	54
A. Výrobní postupy vyzkoušené v rámci této práce	I
A.1. Výroba mikrofluidických systémů z PDMS	I
A.2. Spincoating na katedře řídicí techniky	II
A.3. Fotorezist SU-8	III
A.4. Vrtání do skla	IV
A.5. Výroba elektrodových polí na ITO fólii	V
A.6. Leptání do skla	VI
A.7. Hydrofobní teflonová vrstva	VII

Seznam použitých zkratk

ITO	Indium tin oxide
CM	Clausius-Mossotti faktor
UV	ultrafialové záření
UIACH	Ústav analytické chemie
ZIF	Zero insert force
PDMD	PolyDiMethylSiloxane
SU-8	Typ negativního fotorezistu
MPC	Model predictive control
DMA	Direct memory access
CRC	Cyclic redundancy check
PET	Polyethylene terephthalate

Seznam použitých symbolů

F	Síla
E	Intenzita elektrického pole
r	Polohový vektor
q	Elektrický náboj
p	Dipólový moment
R	Poloměr
ε	Permitivita
K	Clausius-Mossotti faktor
T	Translační matice
\mathbb{R}	Rotační matice
S	Matice změny měřítka
T_A	Matice afinní transformace
φ	Úhel natočení
$G(x, y)$	Gaussovské jádro
$G_{2d}(x, y)$	Druhá derivace Gaussovského jádra

1. Motivace a Cíle

Tato práce se zabývá mikromanipulací s malými objekty v kapalině za pomoci dielektroforézy. Mikromanipulace se obecně těší vzrůstajícímu využití v celé řadě vědních oborů. Příkladem může být chemie a biologie, kde je potřeba manipulovat s velice malým množstvím látek, případně s konkrétními buňkami. Dále mikroelektronika, vyžadující kontaktování obvodů se stále klesajícími rozměry a jejich umísťování do pouzder. V neposlední řadě také moderní léčebné metody využívající roboty s mikrometrovou přesností.

Konkrétním zájmem této práce je manipulace s vodními kapičkami v oleji, nacházející aplikaci v oboru chemie. Tento projekt je rozvíjen ve spolupráci s Ústavem analytické chemie, oddělením analytické bioinstrumentace AV ČR v Brně, jehož celkovým výsledkem by měla být analýza rakovinných buněk využívající uzavření testovaných buněk do miniaturních vodních kapiček v inertním oleji. Část rozpracovaná v této práci by měla mít za úkol manipulaci s individuálními kapičkami, jejich třídění a řízené slučování a dále samotnou tvorbu emulze. Vše by mělo fungovat automaticky na základě obrazové zpětné vazby z mikroskopu. Součástí této práce by měl být i návrh a vývoj testovací aparatury, volba vhodného principu generování emulze a manipulace s kapičkami.

Podkladem pro tento projekt jsou poznatky získané při práci na platformě čtyřsektorového elektrodového pole pro dielektroforézu. Tato platforma byla určena k demonstraci principu bezkontaktní 2D manipulace s polystyrenovými kuličkami o průměru 50 μm v deionizované vodě na základě fyzikálního jevu nazývaného dielektroforéza. V rámci této práce byl navržen zpětnovazební algoritmus umožňující manipulaci s polystyrenovými kuličkami za pomoci planárního elektrodového pole. Algoritmus využívá diskretizace prostoru pro plánování trajektorie a obrazové zpětné vazby pro určování pozice. Úspěšně byla demonstrována manipulace s jedním objektem v celé aktivní oblasti elektrodového pole a dále paralelní manipulace se dvěma objekty a jejich vzájemné přivedení k sobě uprostřed pole.

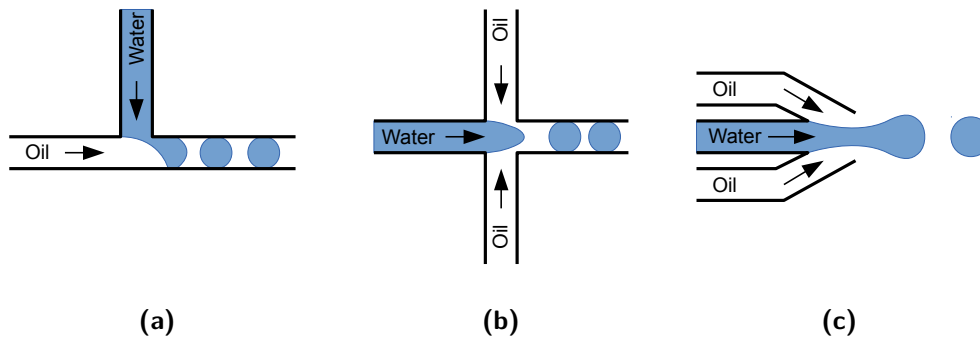
1.1. Aplikace dielektroforézy a kapiček v oleji

1.1.1. Kapičky v oleji jako mokroreaktory

Kapičky vody v oleji nacházejí využití v oboru chemie jako takzvané mikroreaktory. Do dané problematiky udává stručný úvod přehledový článek [1]. Z hlediska efektivity i rychlosti chemických analýz je výhodné použít co nejnižší množství vstupních látek. S nástupem tzv. kombinatorické chemie, kdy je potřeba provést obrovské množství chemických reakcí a následných analýz nároky na efektivitu ještě řádově stouply. Kombinatorická chemie často spojena s analýzou biologických procesů. Například lidský genom obsahuje 30 000 jednotlivých genů kódujících nejrůznější proteiny. Pokud bychom chtěli studovat interakci každých dvou proteinů, obnáší tato analýza přibližně 10^9 jednotlivých reakcí.

Konvenční metody dávkování pomocí mikropipet mají z tohoto hlediska značná omezení. Obvyklé množství dávkované kapaliny je v řádu jednotek mikrolitrů. Oproti tomu s poměrně jednoduchými technologiemi založenými na mísení oleje s vodou v malých prostorech nebo na sprejovém efektu, lze dosáhnout generování kapiček o velikosti menší než $1 \mu\text{m}$, což odpovídá objemu v řádu femtolitrů, tedy o mnoho řádů nižší než konvenční pipetování. Řada prací již demonstrovala využití kapiček jako tzv. mikroreaktorů. Příkladem může být článek [2] popisující využití vodní emulze pro zkoumání genetické informace. Jednotlivé geny mohou být uzavřeny do mikrokapiček a zkoumány tak jejich konkrétní vlastnosti.

Další aplikací kapiček v oleji jsou tzv. umělé buňky. Skutečné buňky jsou sami o sobě velmi složitými chemickými továrnami na nejrůznější sloučeniny a analýza chemických reakcí uvnitř je velmi obtížná. Buňka si navíc chrání svůj obsah buněčnou membránou, která je jednou z jejích nejdůležitějších součástí. Umělé buňky slouží jako zjednodušující modely imitující některé vlastnosti skutečných buněk. Buněčná membrána chránící obsah buňky může být nahrazena kapičkou vody v oleji o přibližně odpovídajícím objemu. Do kapičky mohou být dále přidány biologicky aktivní látky získané z živých buněk narušením jejich buněčné membrány za pomoci ultrazvuku [3], či jiné technologie a případným doplněním dalších cizích látek. Tento princip umožňuje zkoumat izolované buněčné procesy jako je např. funkce jednotlivých enzymů či syntéza proteinů. Do dané problematiky podává stručný úvod článek [4]. Jsou zde rozebrány různé postupy vytváření umělých buněk, typy umělých buněčných membrán, metody manipulace a výroba mikrofluidických systémů pro zacházení s umělými buňkami.

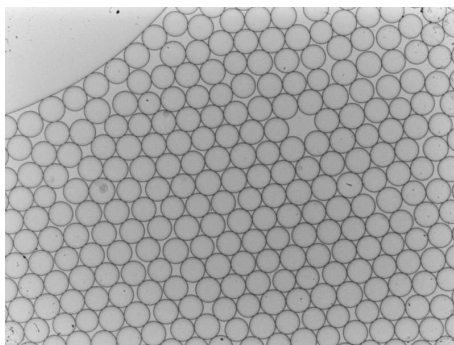


Obrázek 1.1.: Mikrofluidické systémy pro tvorbu emulze: (a) Nejjednodušší spojení typu “T”. (b) Spojení typu “+” - Olej je přiváděn ze dvou stran. (c) Systém typu “Flow-focusing” - umožňuje generovat menší a pravidelnější kapičky.

1.2. Tvorba emulze vody a oleje

Existuje celá řada procesů generujících vodní emulzi. Ty nejjednodušší jsou založeny na obyčejných mechanických vibracích, jiné využívají ultrazvuk. Jsou známy i metody na bázi elektrospreje, viz [5]. Elektrosprejové metody přinášejí oproti ostatním zásadní rozdíl. Kapičky jsou zde oddělovány z výchozího vzorku silným elektrickým polem (napětím několika kV). Díky tomu jsou produkované kapičky v nevodivém oleji elektricky nabitě a vzájemně se odpuzují. Výchozí emulze je proto sama o sobě stabilní, tedy generované kapičky se samovolně neslévají a nejsou zapotřebí žádné další příměsi surfaktantů pro stabilizaci emulze. Dalším důležitým důsledkem této metody je možnost nabitými kapičkami pohybovat za pomoci vnějšího elektrického pole tzv. elektroforéza.

V našem případě se však budeme zabývat tvorbou emulze v mikrofluidických systémech. Hlavním důvodem výběru této metody pro naši aplikaci je možnost pravidelného a pomalého generování kapiček o dobře definované velikosti, což je velmi důležité pro budoucí manipulaci. Existuje celá řada nejrůznějších tvarů mikrofluidických systémů. Několik příkladů je na obrázku 1.1. Nejjednodušší variantou (a) je obyčejné propojení mikrofluidických kanálků ve tvaru písmene T. Tento design vykazuje nejhorší vlastnosti co se týče stejnoměrnosti kapiček avšak vyniká jednoduchostí výroby a použití. Značné zlepšení přináší verze (b), která přivádí olej z obou stran. Výhoda spočívá v tom, že se vodní kapičky při svém oddělování nedotýkají stěn mikrofluidického systému, což vede k daleko vyšší stabilitě jejich velikosti. Poslední verze (c) navíc přidává zúžení urychlující výstupní tok kapaliny a umožňuje generování kapiček do volného prostoru.



Obrázek 1.2.: Surfaktanty stabilizovaná emulze vody a decalinu. Velikost kapiček je přibližně 100 μm .

Velmi důležitou kapitolou při vytváření emulze je volba chemických sloučenin. Některé požadavky vyplývají přímo z aplikace buněčné analýzy. Kapičky musí poskytovat buňkám vyhovující životní prostředí. V praxi to znamená, že výchozím médiem je tzv. fyziologický roztok tedy asi 1% vodný roztok chloridu sodného. Dále je potřeba, aby použitý olej byl v co nejmenší míře rozpustný ve vodě a veškeré použité chemikálie byly netoxické. Další požadavky pak vyplývají z potřeb samotné manipulace. Emulze vody a oleje je sama o sobě nestabilní a po krátkém čase se opět rozdělí na dvě výchozí sloučeniny. Je proto třeba ji stabilizovat tzv. surfaktanty. To jsou chemické látky ovlivňující povrchové napětí kapaliny. Ukazuje se však, že surfaktanty jsou komerčně dostupné pouze pro minimum olejů. V této oblasti provedla výzkum kolegyně Evgenia Basova z Ústavu analytické chemie v Brně. Zde budou proto pouze odcitovány výsledky důležité pro tuto práci [6].

Jako optimální typ oleje byl zvolen decalin. Hlavním důvodem této volby je existence komerčně dostupných surfaktantů pro tento typ oleje, díky kterým je výsledná emulze s vodou velice stabilní i po dobu několika týdnů. Zvoleny byly surfaktanty Span 80 a Triton X 100 o vzájemné koncentraci 98:2 pro olejovou fázi a Tween 80 pro vodní fázi. Výsledkem jsou velice pravidelné kapičky i při použití nejjednoduššího mikrofluidického generátoru tvaru T. Pravidelnost generovaných kapiček ilustruje obrázek 1.2. Takto získaná emulze zůstává stabilní po dobu i několika týdnů a jeví se jako nejvhodnější řešení pro konečnou aplikaci analýzy rakovinných buněk.

1.3. Možnosti manipulace s kapičkami

Existuje celá řada fyzikálních principů a sil umožňujících manipulaci s mikroskopickými kapičkami. V této kapitole budou probrány základní metody využívané

k mikromanipulaci, jejich výhody a možnosti použití.

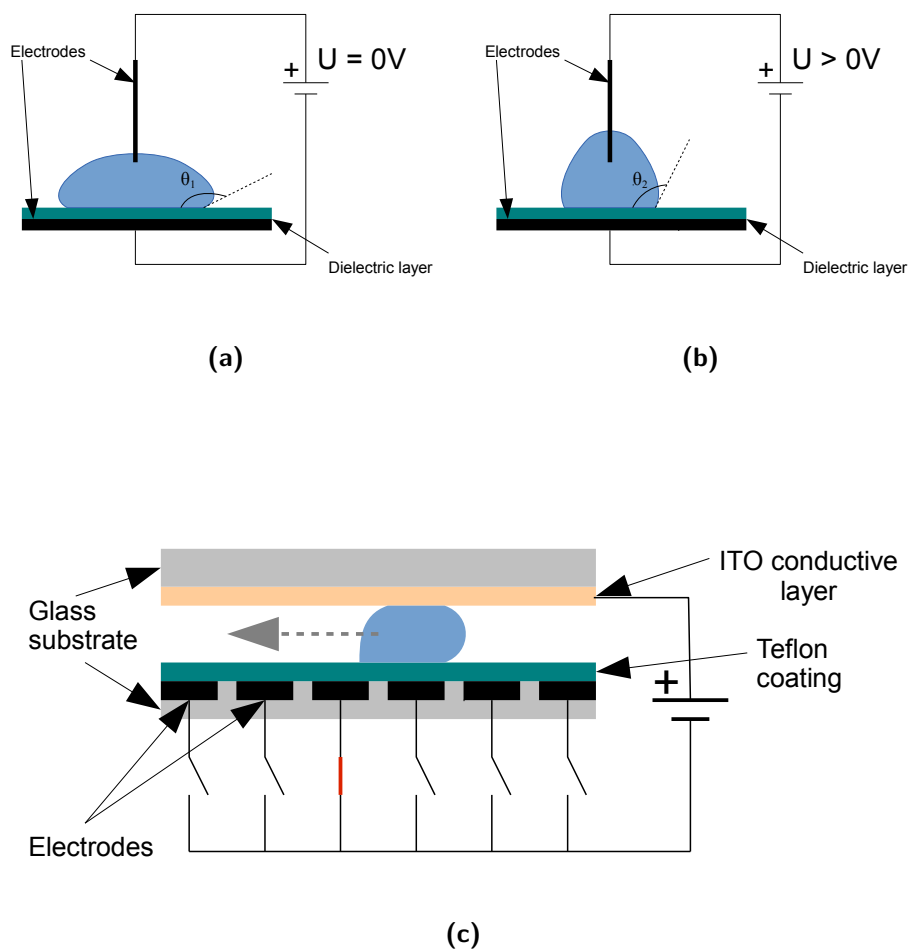
1.3.1. Electrowetting

Pravděpodobně nejznámějším a nejvíce využívaným jevem pro manipulaci s kapičkami je tzv. electrowetting. Základy tohoto jevu včetně matematického odvození je možné nalézt například v literatuře [7]. Jde o jev, kdy se v závislosti na přivedeném napětí mění kontaktní úhel mezi kapičkou vody a podkladovým materiálem. Základní testovací sestava je znázorněna na obrázku 1.3. Skládá se z dvojice elektrod na které je přiváděno stejnosměrné napětí. Podkladová elektroda je potažena nevodivou vrstvou, která má dvě základní funkce. V první řadě slouží k prevenci elektrolýzy vody uvnitř kapičky a zároveň bývá tvořena hydrofobní sloučeninou, která má vysoký klidový kontaktní úhel θ_1 . Důvodem je, že electrowetting kontaktní úhel snižuje a pokud je klidový úhel vysoký je možné ho ovlivňovat ve větším rozmezí. V případě nesymetrického ovlivnění kontaktního úhlu může být electrowetting využit k manipulaci, neboť na kapičku začne působit síla ve směru nižšího kontaktního úhlu. Efekt je podobný, jako při umístění kapičky vody na rozhraní hydrofilního a hydrofobního povrchu, kdy se kapička velmi rychle samovolně přemístí na hydrofilní povrch.

Aplikaci tento jev nachází v digitální mikrofluidice [8], tedy mikrofluidice pohybující s diskretním množstvím kapaliny - kapičkami. Typická konfigurace pro manipulaci s kapičkami je znázorněna na obrázku 1.3c. Vyznačuje se obvykle šachovnicovou strukturou individuálně adresovaných elektrod s malými mezielektrodovými vzdálenostmi, jejichž povrch je potažen hydrofobní teflonovou vrstvou. Protilehlou elektrodu tvoří sklíčko s průhlednou vodivou vrstvou ITO umožňující pozorování probíhajících jevů. Manipulační napětí přiváděné na elektrody je obvykle v rozmezí 50 až 200 V.

1.3.2. Elektroforéza

Elektroforéza vyvolává pohyb elektricky nabitých částic ve vnějším elektrickém poli. Pro manipulaci s kapičkami ji lze použít pouze v případě, že jsou kapičky elektricky nabité. Toho lze dosáhnout například elektrosprejovým efektem, jak bylo zmíněno v kapitole 1.2. Široké využití nachází elektroforéza v kombinaci s kapilárními efekty. Přivedení vysokého napětí na opačné konce kapiláry vyvolává uvnitř tzv. elektroosmotický tok. Tento jev je podmíněn malým průměrem kapiláry (desítky mikrometrů) a vznikem tzv. "elektrické dvojvrstvy" (electrical double layer) u stěny kapiláry. Podrobněji je daný jev vysvětlen například v [9].



Obrázek 1.3.: Princip electrowettingu: (a) Klidový stav. (b) Změna tvaru kapičky při přivedeném napětí. (c) Typická aparatura pro manipulaci s kapičkami.

1.3.3. Optická pinzeta

Optická pinzeta je zařízení využívající silně fokusovaný laserový paprsek k manipulaci s malými průhlednými objekty. Jev je silně závislý na indexu lomu a jeho podstatou je lom světla na hranici objektu. Ze zákona zachování momentu hybnosti plyne, že pokud objekt změní hybnost procházejícího fotonu (lom světla), musí sám pocítit stejnou změnu hybnosti. Důsledkem je, že objekt je stabilizován v ohnisku zaostřeného laserového paprsku. Jev je proto také někdy nazýván optickou pastí.

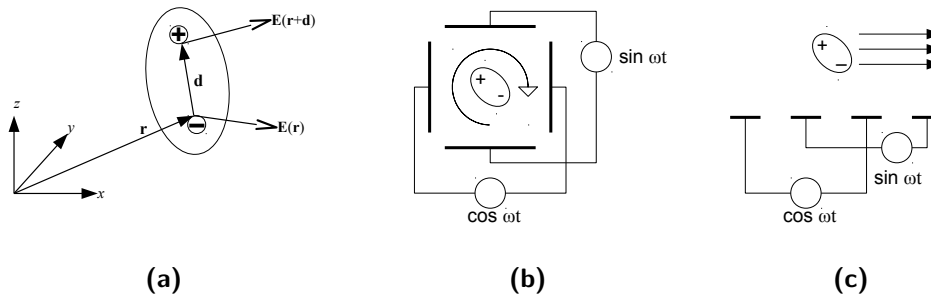
Optické pinzety se obecně dobře hodí k individuální manipulaci s kapičkami, avšak každá kapička potřebuje vlastní laserový paprsek. Manipulace je však obvykle dosaženo pouze mechanickou manipulací vzorkem oproti zdroji laserového světla, což zamezuje použití velkého množství paprsků. Další nevýhodou je parazitní ohřev objektu způsobený pohlcením části laserového záření.

1.3.4. Dielektroforéza

Dielektroforéza je definována jako pohyb elektricky neutrálních objektů vystavených vnějšímu nehomogennímu elektrickému poli. Nehomogenní elektrické pole je obvykle generováno soustavou různě tvarovaných elektrod, na které je přiváděno stejnosměrné nebo střídavé napětí. Elektrody bývají v přímém kontaktu s kapalným médiem, ve kterém plují malé částice. V závislosti na přiváděném napětí je poté možné s těmito částicemi pohybovat.

Dielektroforéza je obvykle patrná až při velmi malých rozměrech. Využití proto nachází v mikromanipulaci, viz práce [10] využívající fenoménu dielektroforézy v kombinaci s obrazovou zpětnou vazbou k rychlé a přesné manipulaci s malými objekty v ethanolu. Další důležitou vlastností je velmi silná závislost vyvolané síly na elektrických vlastnostech média i částic, konkrétně na jejich vodivosti a permitivitě. Díky tomu nachází dielektroforéza také velké využití při třídění a separaci různých objektů obvykle biologického původu. Jednu z takových aplikací demonstruje již poměrně starý článek [11], kde jsou filtrovány rakovinné buňky na základě odlišné kapacity plazmatické membrány.

Pro tuto práci je však nejdůležitější vlastností schopnost manipulovat s kapičkami v oleji. Ukazuje se, že dielektroforéza je v tomto ohledu vhodným nástrojem, neboť permitivita i vodivost vody a oleje se řádově liší, což je podmínkou pro vznik dielektroforetické síly. Její výhodou je i možnost manipulovat s opravdu malými objemy. Řada prací již demonstrovalo manipulaci s jednotlivými buňkami o velikosti přibližně $1\ \mu\text{m}$. Příkladem může být [12]. Rozměr jednoho μm odpovídá objemově jedné polovině femtolitru, což je například za hranicí běžné manipulace za pomoci electrowettingu.



Obrázek 1.4.: Typy dielektroforézy: (a) Konvenční dielektroforéza - V místě obou nábojů je elektrické pole různé. (b) Elektrotace - Otáčení objektu v rotačním elektrickém poli. (c) Dielektroforéza postupnou vlnou - Objekt pohybující se ve směru gradientu fáze. (Překresleno z [13])

Vzhledem k tomu, že fenomén dielektroforézy je pro tuto práci stěžejní a v okruhu elektrotechnických inženýrů není obecně známý, bude jeho podrobnějšímu popisu věnována celá následující podkapitola. Podrobné odvození, ze kterého také vychází tato práce, je provedeno např. v knize [13].

1.4. Matematicko-fyzikální popis dielektroforézy

Uvažujme elektricky neutrální avšak polarizovatelný objekt vystavený vnějšímu elektrickému poli. V důsledku působení tohoto pole se objekt elektricky polarizuje a dochází k hromadění elektrického náboje na jeho povrchu. Celkově však zůstane objekt elektricky neutrální. Polarizaci objektu můžeme v nejjednodušším případě vysvětlit jako nepatrné vychýlení elementárních nábojů obsažených v hmotě ze svých klidových poloh na základě Coulombovy síly vyvolané externím polem. Schematický obrázek 1.4a ilustruje takový případ. Z obrázku je navíc patrné, že pokud bude vnější elektrické pole nehomogenní, bude na oba opačné náboje dipólu působit rozdílná síla. Celý objekt bude tedy pocívat sílu rovnou jejich součtu

$$\mathbf{F} = -q\mathbf{E}(\mathbf{r}) + q\mathbf{E}(\mathbf{r} + \mathbf{d}). \quad (1.1)$$

Celou soustavu vychýlených nábojů uvnitř objektu můžeme v prvním přiblížení nahradit dipólovým momentem, jehož velikost bude úměrná externímu elektrickému poli, $\mathbf{p} \approx \mathbf{E}$. Tuto aproximaci můžeme použít v případě, že velikost objektu je zanedbatelná oproti nehomogenitě vnějšího elektrického pole.

Pokud bude vnější elektrické pole homogenní bude celý systém v rovnováze a na objekt nebude působit žádná síla. V případě nehomogenního pole však

bude na každý elementární náboj působit různá Coulombova síla v závislosti na rozdílných pozicích nábojů. Celková síla působící na objekt bude úměrná gradientu elektrického pole a velikosti indukovaného dipólového momentu. Jak již bylo zmíněno je i samotný dipólový moment úměrný elektrickému poli. Rovnici pro sílu tedy můžeme zapsat v následujícím tvaru

$$\mathbf{F} \approx \nabla E \cdot \mathbf{p} \approx \nabla \mathbf{E}^2, \quad (1.2)$$

kde \mathbf{E}^2 má význam elektrostatického tlaku. Síla je tedy úměrná gradientu tlaku obdobně jako v klasické mechanice. Vztah 1.2 nám udává základní kvalitativní chování dielektroforetické síly ve stacionárním poli.

1.4.1. Positivní a negativní dielektroforéza

Výše uvedený vztah v rovnici 1.2 odpovídá pouze obecnému řešení ve stacionárním poli. Přesnějšího vyjádření dosáhneme doplněním konstanty úměrnosti a rozšířením tohoto vztahu pro harmonický průběh elektrického pole.

Jak již bylo zmíněno, závisí dielektroforéza na elektrických vlastnostech kapalného média i plovoucího objektu. Uvažme pro začátek pouze bezeztrátové prostředí (dokonale nevodivé). Potom lze pro kulově symetrický objekt odvodit dielektroforetickou sílu, viz např. [13]

$$\mathbf{F} = 2\pi R^3 \varepsilon_1 \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_1}{\varepsilon_2 + 2\varepsilon_1} \nabla \mathbf{E}^2, \quad (1.3)$$

kde ε_1 značí permitivitu prostředí, ε_2 permitivitu kulového objektu a R jeho poloměr. Podíl permitivit v tomto vztahu má již ve fyzice své místo a je nazýván CM (Clausius-Mossotti) faktor

$$K = \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_1}{\varepsilon_2 + 2\varepsilon_1}. \quad (1.4)$$

Tato veličina má pro dielektroforézu značný význam. Ze vztahu je zřejmé, že CM faktor je kladný pro $\varepsilon_1 < \varepsilon_2$ a záporný pro $\varepsilon_1 > \varepsilon_2$. Z toho plyne, že i dielektroforéza je pozitivní nebo negativní v závislosti na poměru obou permitivit. Např. pro kombinaci polystyrenových kuliček ($\varepsilon_{r2} \approx 3$) a vody ($\varepsilon_{r1} \approx 80$) vychází CM faktor záporný. Polystyrenové kuličky proto pocitují negativní dielektroforézu a jsou vypuzovány z míst s vysokým gradientem elektrického pole. Naopak pro kombinaci vodních kapiček ($\varepsilon_{r2} \approx 80$) v oleji ($\varepsilon_{r1} \approx 5$) obdržíme kladnou hodnotu a kapičky budou do míst s vysokým gradientem přitahovány.

1.4.2. Dielektroforéza postupnou vlnou a elektrorotace

Dalším rozšířením vztahu pro dielektroforézu je uvažování ztrátového prostředí a časově proměnného pole vzniklého harmonickým buzením. Pro harmonický ustálený stav můžeme využít Fourierovy transformace a odvodit komplexní Claussius-Mossotti faktor závislý na frekvenci.

$$K^*(\omega) = \frac{\varepsilon_2^* - \varepsilon_1^*}{\varepsilon_2^* + 2\varepsilon_1^*}, \quad (1.5)$$

kde komplexní permitivity mají tvar

$$\varepsilon^* = \varepsilon + \frac{\sigma}{j\omega}. \quad (1.6)$$

Pro dielektroforetickou sílu platí následující vztah

$$\mathbf{F} = 2\pi R^3 \varepsilon_1 \Re \{K^*(\omega)\} \nabla \mathbf{E}_{RMS}^2. \quad (1.7)$$

Jde o přímé rozšíření dříve odvozeného vztahu 1.3 pro prostředí se ztrátami. Je, který tento vztah popisuje, se nazývá konvenční dielektroforéza. Díky ztrátovému prostředí se však objevuje zcela nový fenomén. Indukovaný dipólový moment uvnitř objektu může mít oproti vnějšímu elektrickému poli fázové zpoždění. Interakce vnějšího pole s takto fázově zpožděným dipólovým momentem poté vyvolává dvě nové síly, které v bezztrátovém prostředí nebyly patrné. V prvním případě je to tzv. elektrorotace vyvolávající otáčení objektu, viz obrázek 1.4b. Ve druhém je to dielektroforéza postupnou vlnou způsobující pohyb objektu ve směru či proti směru gradientu fáze, jak je vidět na obrázku 1.4c. Oba tyto jevy jsou podmíněny přítomností nejméně tří elektrod, na které jsou přiváděny fázově posunutá signály. Při použití pouze dvou elektrod nebo signálů s fázovým rozdílem 180° elektrorotace ani dielektroforéza postupnou vlnou nenastává.

2. Navázání na minulou práci

Jak již bylo zmíněno v úvodní kapitole, inspirací této diplomové práce se stal dřívější projekt čtyřsektorového pole pro dielektroforézu sloužící k manipulaci s polystyrenovými kuličkami, na kterém jsem pracoval v rámci své bakalářské práce a individuálního projektu. Vzhledem k tomu, že je na tuto práci v mnohém navazováno a také za účelem lepší dokumentace, budou v této kapitole probrány základy této dřívější práce.

2.1. Manipulace s polystyrenovými kuličkami

Zcela původní motivací manipulace s pevnými objekty za pomoci dielektroforézy v naší skupině byly biologicky inspirované samosestavovací procesy vyžadující pro svou funkci náhodný pohyb komponent. Tato aplikace je podrobněji rozebrána v diplomové práci vedoucího mé práce Jiřího Zemánka [14]. Má úloha v tomto projektu se již této původní aplikaci netýká, ale využívá získané poznatky a část instrumentace z tohoto projektu. Úkolem této práce bylo navrhnout automatický řídicí algoritmus schopný na základě obrazové zpětné vazby autonomně manipulovat s polystyrenovou kuličkou a plánovat vhodnou trajektorii mezi současnou a cílovou pozicí.

Motivací této práce je tedy především demonstrace použitého fyzikálního jevu dielektroforézy ve spojení s řídicí technikou pro účely mikromanipulace. Navržený manipulační princip může být dále aplikován pro konkrétní úlohy, jak je tomu v druhé části této práce.

2.2. Experimentální platforma

Detailní popis použité platformy je již podrobně zdokumentován v mé bakalářské práci [15] a článku [16]. V této kapitole bude proto platforma popsána jen velice stručně, čistě za účelem pohodlí čtenáře.

Experimentální platforma se skládá ze čtyř základních součástí, kterými jsou elektrodové pole, 64-kanálový generátor, kamerový systém a počítač s řídicím algoritmem. Pravděpodobně nejdůležitějším prvkem je samotné elektrodové pole znázorněné na obrázku 2.1b. Jde o skleněný podklad, na který je nanášena vrstva

zlata o síle přibližně 50 nm. Ve vrstvě zlata je poté za pomoci laserového paprsku vytvořena struktura 48 planárních elektrod. Na toto pole elektrod je následně nalepen bazének z polymeru, do kterého je nalita deionizovaná voda s polystyrenovými kuličkami. Šířka elektrod i velikost kuliček byla v tomto případě zvolena na 50 μm . Shodné chování máme však ověřeno i na elektrodách šířky 100 μm a kuličkách velikosti 250 μm .

Pro generování signálů přiváděných na elektrody slouží 64-kanálový generátor vyvinutý v naší skupině. Jde o zařízení umožňující generování 64 fázově posunutých obdélníkových signálů na základě příkazů posílaných z PC přes sériovou linku. Všechny kanály mají společně nastavitelnou frekvenci a amplitudu v rozmezí 0 – 20V při 50Hz – 3.15MHz a individuálně nastavitelnou fázi v rozmezí 0 – 360° v 16 krocích. Výstupní signály jsou generovány za pomoci darlingtonových tranzistorů s pull-up rezistory.

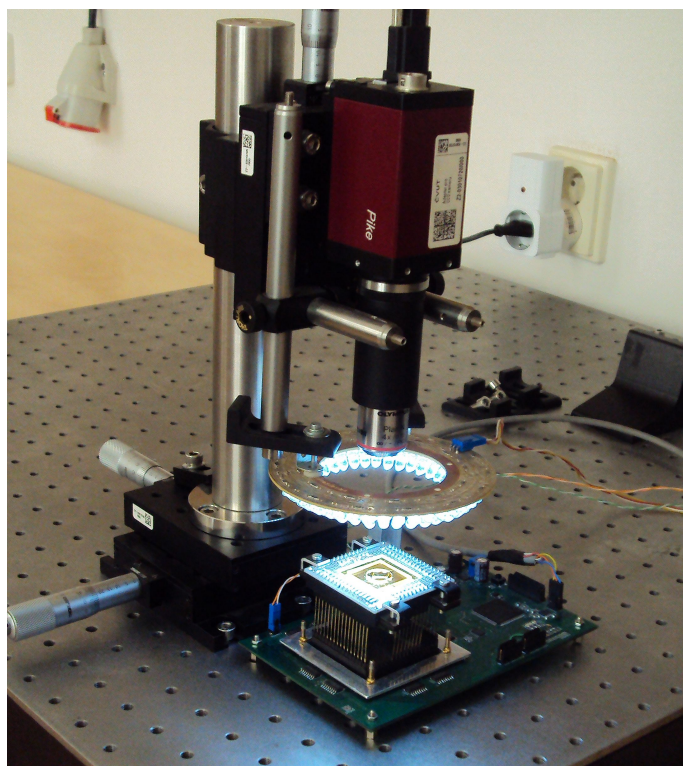
Navržený způsob řízení pomocí fázově posunutých signálů se ukázal být velice praktický, neboť z implementačního hlediska je daleko snazší individuálně měnit fázi signálu než jeho amplitudu. Změnou vzájemné fáze mezi dvěma elektrodami měníme i efektivní hodnotu napětí, od které se odvíjí vliv konvenční dielektroforézy. Zároveň tento způsob umožňuje vyvolat dielektroforézu postupnou vlnou, která ovšem v této práci není využita.

2.3. Řízení dielektroforézy

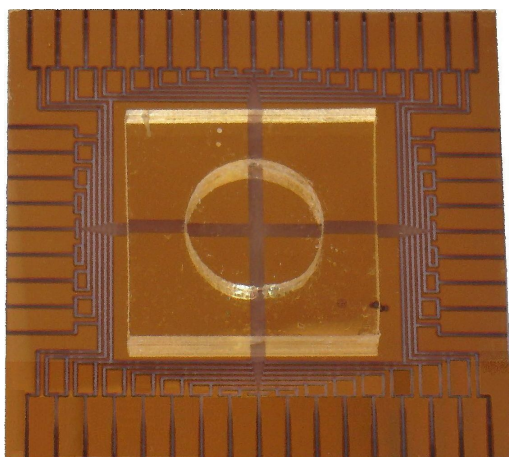
Pro kombinaci polystyrenových kuliček a deionizované vody je reálná část Claussius-Mossotti faktoru záporná pro nízké i vysoké frekvence. Z toho vyplývá, že na polystyrenové kuličky bude působit negativní dielektroforéza. V praxi to znamená, že jsou kuličky odpuzovány od “aktivních” elektrod. V našem případě tedy od elektrod, které mají odlišnou fázi od ostatních.

Koncept planárního elektrodového pole v zásadě umožňuje dva jednoduché typy pohybů, jak je znázorněno na obrázku 2.2. První způsob detailně zobrazený na obrázku 2.3a spočívá v odpuzování polystyrenové kuličky od aktivovaných elektrod. Tímto způsobem můžeme například vyvolat pohyb napříč přes paralelně uspořádané elektrody jednoduchým posouváním aktivované elektrody na jednu nebo na druhou stranu.

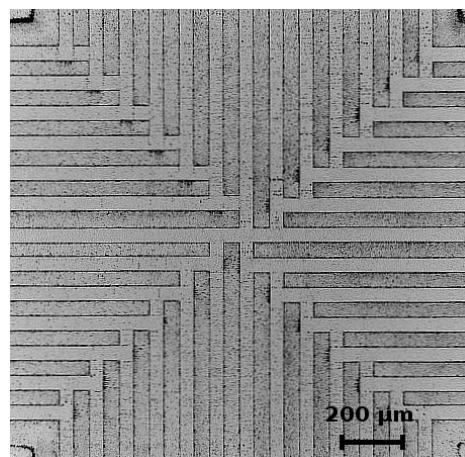
Druhou možností na obrázku 2.3b je využití lokálních stabilních oblastí. Dielektroforetická síla díky své nelinearitě umožňuje překvapivou možnost vyvolat stabilní levitační polohu. Daný jev si můžeme představit jako potenciálové pole tvaru obráceného dna koňakové láhve. Tedy z jisté části prostoru, v obrázku vyznačené červenou elipsou, budou objekty stahovány do středu stabilní oblasti, kde se nachází equilibrium. Toto je poměrně vzácný jev. Například použitím



(a)



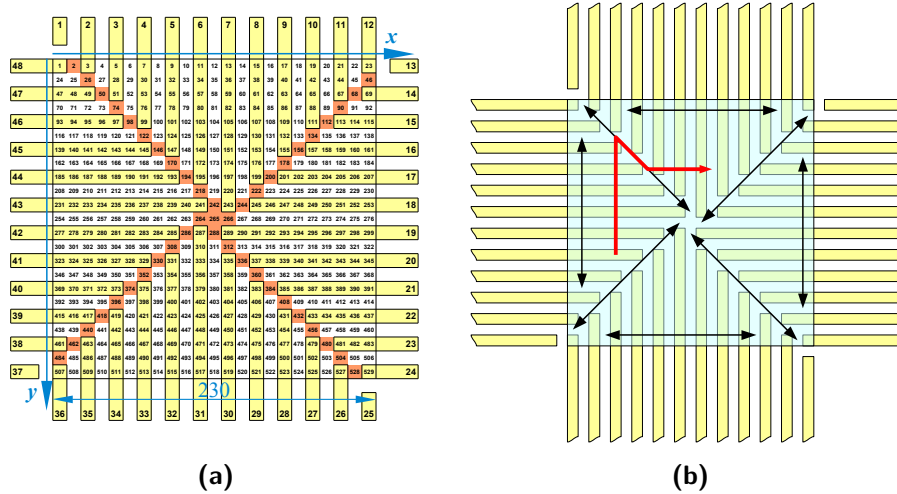
(b)



(c)

Obrázek 2.1.: Platforma pro manipulaci s polystyrenovými kuličkami: (a) fotografie kompletní platformy, (b) elektrodové pole na skle, (c) pohled na pole přes zvětšovací objektiv kamery

2. Navázání na minulou práci



Obrázek 2.2.: Řízení na čtyřsektorovém elektrostatickém poli: (a) Diskretizace aktivní oblasti do tvaru šachovnice - každé šachovnicové pole má své jedinečné číslo, oranžová pole vyznačují pozice dosažitelných stabilních ekvilibríí, modré šipky definují kalibrované obrazové souřadnice. (b) Možnosti čtyřsektorového pole - černé šipky naznačují možné implementované pohyby, červená šipka naznačuje příklad trajektorie.

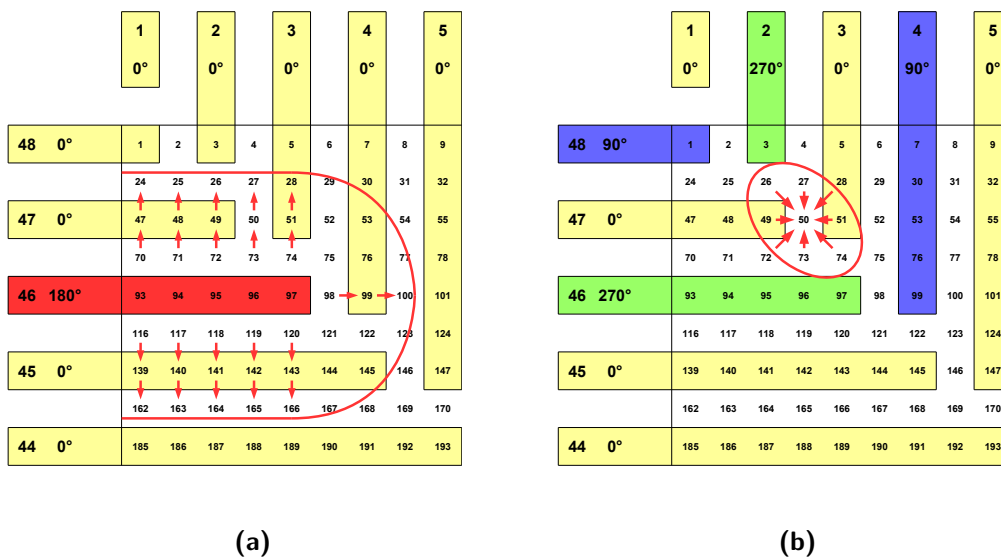
magnetického pole nelze dle Earnshawovy věty podobného efektu bez použití zpětné vazby dosáhnout. Pokud je navíc konfigurace elektrod na planárním poli vhodná, je možné vyvolat stabilní oblasti, které se vzájemně překrývají. Jejich postupným přepínáním lze poté opět manipulovat s polystyrenovými kuličkami. Velmi zajímavou vlastností zmíněného postupu je možnost řízení v otevřené smyčce, což při manipulaci s extrémně malými objekty, které není snadné detekovat v obraze kamery, může znamenat značný průlom.

2.4. Návrh manipulační strategie

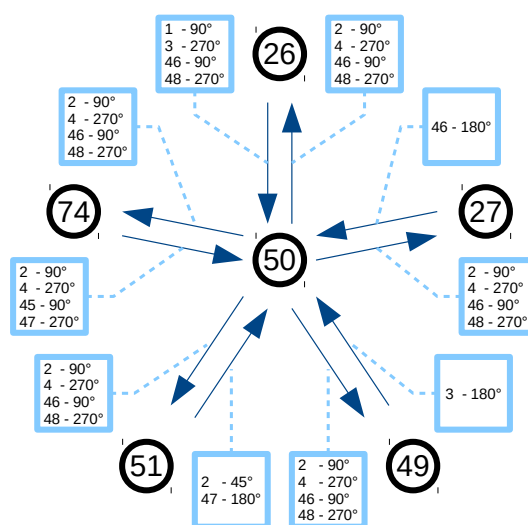
Oba výše zmíněné postupy byly využity k návrhu algoritmu řízení. Vzhledem k tomu, že jde spíše o demonstrativní řešení než skutečnou aplikaci, bylo při návrhu dbáno především na jednoduchost a snadnou pochopitelnost algoritmu spíše než na efektivitu a robustnost.

Aktivní plocha čtyřsektorového pole byla diskretizována do tvaru šachovnice o rozměru 23×23 polí, viz obrázek 2.2a. Nad tímto diskrétním prostorem dále pracuje řídicí algoritmus. Jeho úlohou je zajistit přemístění polystyrenové kuličky z libovolné počáteční pozice na elektrostatickém poli do libovolné cílové pozice.

Z navržené kombinace implementovaných pohybů vyplývá, že trajektorie mezi



Obrázek 2.3.: Dva základní principy využití pro návrh řízení: (a) Směr pohybu v případě jedné zapnuté elektrody. Červená čára ohraničuje ovlivněnou oblast. (b) Stabilní equilibrium způsobené čtyřmi aktivovanými elektrodami o střídajících se fázích. Červená elipsa v tomto případě vyznačuje přibližnou hranici stabilní oblasti.



Obrázek 2.4.: Část orientovaného grafu reprezentujícího stavový prostor. Vrcholy grafu jsou jednotlivá pole a jeho hrany znázorňují jednokrokové přesuny. Ke každé hraně dále náleží informace o fázích přivedených na elektrody (v modrých rámečcích).

dvěma body nemůže být libovolná. Jak již bylo zmíněno, implementován byl pohyb ve směru kolmém na elektrody nebo na jejich diagonálním rozhraní. Jejich kombinací však již můžeme složit trajektorii propojující libovolné dva body, jak je vidět na obrázku 2.2b.

Úkolem řídicího algoritmu je tedy nejen řízení pohybu kuličky ale i plánování vhodné trajektorie. Tuto v obecném případě dosti složitou úlohu současného plánování trajektorie a řízení lze však v našem případě vyřešit velice elegantně a jednoduše na základě zavedené diskretizace prostoru a empiricky ověřené abecedy jednokrokových pohybů. Vezměme v úvahu například trajektorii z obrázku 2.2b. Trajektorie začíná v bodě 327. Z tohoto bodu je možné posunout se pouze nahoru nebo dolů aktivováním elektrody číslo 40 resp. 42. Tento postup je možné opakovat až po dosažení diagonálního rozhraní. Zde se uplatní druhý postup manipulace pomocí přepínání stabilních ekvilibrií. Pozice těchto stabilních oblastí jsou znázorněny oranžovou barvou na obrázku 2.2a. Každá z nich zasahuje do osmice sousedních polí, jak je vidět na obrázku 2.3b. Postupným přepínáním stabilních oblastí tedy můžeme vyvolat pohyb po diagonále. Opětovné opuštění diagonály ve směru kolmém na elektrody je možné odpuzením od konce elektrody.

Pokud chceme tuto úlohu řešit automaticky, je třeba ji reprezentovat ve formě

vhodné ke strojovému zpracování. Zcela přímočará je v tomto případě reprezentace stavového prostoru ve formě orientovaného grafu. Vrcholy grafu zde budou jednotlivá šachovnicová pole a hrany budou směřovat k sousedním polím, na které je možné se přesunout v jednom kroce příslušným přepnutím elektrod. Každá hrana musí mít také přidruženou informaci, jaké fáze mají být na elektrody přivedeny. Výřez takového grafu je znázorněn na obrázku 2.4. Vybraná část zobrazuje jedнокroková propojení s polem číslo 50. Je vidět, že z tohoto pole se můžeme dostat do pěti sousedních polí. Nikoli tedy do celé osmice. To je způsobeno geometrií elektrodového pole, která takové pohyby jednoduše neumožňuje. Můžeme si dále všimnout, že všechny hrany směřující zpět na výchozí pole mají stejnou konfiguraci fází přiváděných na elektrody. To je proto, že na této pozici je možné vyvolat stabilní equilibrium. Nad takto sestaveným grafem dále pracuje plánovací algoritmus.

Ze samotné podstaty úlohy vyplývá několik vlastností grafu. Především je graf souvislý, neboli mezi každými dvěma vrcholy existuje orientovaná cesta. Tuto vlastnost už jsme intuitivně odvodili z obrázku 2.2b tvrzením, že složením diagonálního pohybu a pohybu napříč elektrodami lze propojit dvě libovolná pole. Tuto vlastnost můžeme snadno dokázat i z matice sousednosti grafu \mathbb{A} . Tato matice velikosti $N \times N$, kde N je počet vrcholů grafu (v našem případě $N = 629$) je definována tak, že každý prvek $a_{i,j}$ je roven jedné v případě, že z vrcholu i existuje hrana do vrcholu j . V opačném případě je roven nule. Souvislost grafu ověříme např. vypočtením \mathbb{A}^n , kde $n < N$ a následnou kontrolou nulových prvků. Pokud se ve výsledku žádné nuly nevyskytují, je graf souvislý. Z tohoto výrazu můžeme určit i nejdelší optimální cestu existující v grafu nalezením nejmenšího n , pro které platí předchozí podmínka. Nejdelší možná optimální cesta má potom délku právě n , které je v našem případě rovno $n = 50$.

2.4.1. Implementace řídicího algoritmu

Orientovaný graf bývá v počítačové logice reprezentován dvěma způsoby. Buďto spojovým seznamem, nebo maticí sousednosti. Efektivní volbou by v tomto případě měl být spojový seznam, neboť zabírá daleko méně paměti počítače a umožňuje efektivnější prohledávání. Z důvodu větší přehlednosti a upravitelnosti, ale také kvůli implementaci v MATLABu, který je daleko lépe vybaven pro práci s maticemi než se spojovými seznamy, byla však zvolena matice sousednosti. Zde se také nachází důvod, proč nejsou šachovnicová pole indexována dvěma indexy, ale pouze jedním. Matice sousednosti by v takovém případě musela být čtyřrozměrná a obsahovat dvě hodnoty indexů (v praxi je toto řešeno funkcí `ind2sub`, která jednorozměrný index převádí na dvourozměrný).

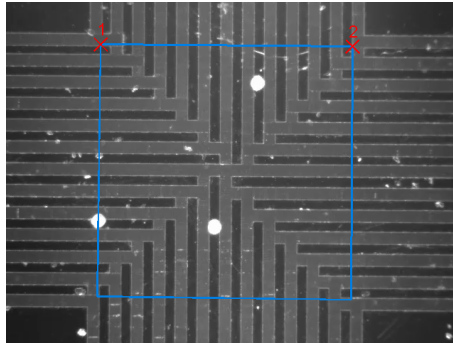
Za stejným účelem a to, aby byl řídicí algoritmus co nejjednodušší, bylo pro

plánování trajektorie zvoleno prohledávání do šířky. Optimální trajektorie je tedy volena ve smyslu nejmenšího počtu kroků. Pokud takových trajektorií existuje více, je jedna z nich náhodně vybrána.

Pokud by se polystyrenová kulička chovala přesně podle předpokládaných vlastností, teoreticky by stačilo celou dráhu naplánovat na počátku a poté pouze na základě obrazové zpětné vazby přepínat jednotlivé kroky. Bohužel je však trajektorie velmi často ovlivněna různými nepředpokládanými vlivy. Plánovanou trajektorii je proto potřeba za běhu řídicího algoritmu upravovat. Nevýhodou prohledávacích algoritmů pro účely řízení v reálném čase je, že výpočetní náročnost se řádově mění v závislosti na délce hledané trajektorie a není snadné určit nejdelší dobu průběhu. Z tohoto důvodu byla zvolena metoda předplánování veškerých možných trajektorií předem, které je zde možné díky nevelkému stavovému prostoru. Plánovací algoritmus se jednoduše spustí pro všechny kombinace počátečních a cílových pozic a výsledky prohledávání se uloží do tabulky. Jak již bylo zmíněno, z každé předplánované trajektorie je nejdůležitější pouze první krok, protože v následujícím kroce již může být trajektorie negativně ovlivněna. Stačí si proto z každé této trajektorie uložit první krok a celá naplánovaná trajektorie může být následně iterativně zrekonstruována. V této chvíli je nutná poznámka, že trajektorie musí být optimalizována na základě monotónně rostoucího kritéria (každá část cesty musí mít nenulovou kladnou cenu), aby se zamezilo vzniku cyklů. Kritérium ve formě počtu kroků však tuto podmínku dozajista splňuje. Výsledkem celé této poměrně výpočetně náročné operace je tedy čtvercová matice velikosti 629×629 obsahující pro každou startovní a cílovou pozici číslo příštího pole naplánované trajektorie. Tato matice má mimochodem stejné rozměry jako samotná matice sousednosti a umožňuje velmi rychlé plánování trajektorie, které tak může být prováděno v každém cyklu řídicího algoritmu i při velmi vysoké frekvenci.

Navržený řídicí algoritmus je ve skutečnosti velmi jednoduchou variantou explicitního MPC (Model predictive control). MPC je moderní řídicí algoritmus využívající znalosti modelu systému k predikci jeho chování a optimalizaci vstupní sekvence. Jeho největší výhodou je, že do řídicí sekvence zahrnuje i informaci o omezení systému, jako jsou například saturace vstupu nebo limity stavových veličin. Algoritmus pracuje tím způsobem, že v každém kroce je vypočtena optimální budoucí vstupní sekvence obvykle metodou LQ (linear quadratic) řízení na konečném časovém horizontu několika desítek vzorků. K samotnému řízení je však použit pouze první prvek vygenerované sekvence a v dalším cyklu se celá optimalizace provádí znovu. Z toho vyplývá, že MPC je velmi výpočetně náročné.

Tuto zjevnou nevýhodu částečně řeší tzv. explicitní MPC. Tato varianta prediktivního řízení využívá tzv. off-line optimalizace na celém stavovém prostoru.



Obrázek 2.5.: Snímek elektrodového pole získaný z kamery. Na obrázku jsou vidět polystyrenové kuličky velikosti $50\ \mu\text{m}$ a dále je naznačena kalibrace souřadného systému. Červené křížky značí místa pro kliknutí při kalibraci.

Výsledkem takové optimalizace bývá po částech definovaná funkce stavů určující řízení. Řídicí algoritmus poté v každém kroku namísto provádění optimalizačního výpočtu pouze vyhodnocuje tuto funkci. Tento trik umožňuje uplatnění prediktivního řízení i pro poměrně rychlé procesy vyžadující vzorkovací frekvenci v řádu kHz.

Navržený řídicí algoritmus je tedy explicitním MPC. Pouze díky povaze úlohy je stavový prostor konečný a optimalizace nevyužívá LQ kritéria, ale prohledávacího algoritmu k nalezení optimální vstupní sekvence. Tabulka předpočítaných hodnot je velikosti $629 \times 629 \times 2$ byte, tedy méně než 1 MB dat.

2.5. Rozpoznávání v obraze

Velmi důležitou součástí řídicího systému je rozpoznávání v obraze. Tedy počítačový algoritmus, který na základě obrazu z kamery vypočte prostorové souřadnice kontrolovaného objektu. Obraz je snímán černobílou kamerou PIKE F-032 o rozlišení 640×480 pixelů a maximální snímkové frekvenci 120 fps. Obrázek 2.5 zobrazuje snímek z kamery s polystyrenovými kuličkami o velikosti $50\ \mu\text{m}$. Na obrázku je vidět, že elektrodové pole není vycentrované a je mírně pootočené. Úkolem algoritmu je tedy nejen nalezení hledaného objektu v obraze, ale i kalibrace obrazových souřadnic.

2.5.1. Kalibrace souřadného systému

Kalibrace souřadného systému probíhá vždy na začátku algoritmu kliknutím do dvou krajních bodů aktivní oblasti, viz obrázek 2.5. Z těchto bodů se dále sestaví afinní transformace souřadnic do pracovního prostoru zvyrazněného na

obrázku 2.2a modrým čtvercem.

Transformace se provádí v tzv. homogenních souřadnicích. Jde o jednoduchou matematickou pomůcku, díky které je možné reprezentovat nelineární transformace ve 2D prostoru (např. translace) pomocí maticového násobení v prostoru o jednu dimenzi větším. Vztah mezi kartézskými a homogenními souřadnicemi bodu \mathbf{P} jsou definovány následujícím způsobem.

$$\mathbf{P}_c = \begin{bmatrix} X \\ Y \end{bmatrix} \rightarrow \mathbf{P}_h = \begin{bmatrix} X/\omega \\ Y/\omega \\ \omega \end{bmatrix}, \quad (2.1)$$

kde ω je volný parametr, který může být libovolně měněn, avšak z praktického důvodu bývá jeho hodnota rovna jedné, neboť v tomto případě degenerují homogenní souřadnice bodu do tvaru

$$\mathbf{P}_h = \begin{bmatrix} X \\ Y \\ 1 \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

a není třeba operace dělení pro zpětný převod do kartézských souřadnic. Samotná afinní transformace se skládá ze tří základních operací jimiž jsou translace, rotace a změna měřítka. Jak již bylo zmíněno, v homogenních souřadnicích mohou být tyto operace reprezentovány maticovým násobením. Pro translaci má transformační matice tvar

$$\mathbb{T} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & T_x \\ 0 & 1 & T_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}. \quad (2.3)$$

Transformace rotace je reprezentována maticovým násobením i v kartézských souřadnicích. V homogenních souřadnicích je pouze rozšířena o jednu dimenzi

$$\mathbb{R} = \begin{bmatrix} \cos(\varphi) & \sin(\varphi) & 0 \\ -\sin(\varphi) & \cos(\varphi) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}. \quad (2.4)$$

Poslední transformací v našem případě je změna měřítka

$$\mathbb{S} = \begin{bmatrix} S_x & 0 & 0 \\ 0 & S_y & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}. \quad (2.5)$$

Vzhledem k tomu, že je rovina elektrodového pole rovnoběžná s obrazovou rovinou můžeme parametry S_x a S_y považovat za shodné. Je tedy vidět, že celá

transformace má čtyři volné parametry . Jsou jimi posun ve směru x a y a úhel natočení φ a zvětšení S . Všechny tyto parametry jsou přímo odvoditelné z obou kalibrovaných bodů, které jsou rovněž určeny čtyřmi parametry. Kompletní afinní transformace může být poté vypočtena ze soustavy rovnic propojující kalibrované body nebo jako součin dílčích transformačních matic

$$\mathbb{T}_A = \mathbb{T} \cdot \mathbb{R} \cdot \mathbb{S} . \quad (2.6)$$

2.5.2. Detekce objektu

Jak je vidět na obrázku 2.5 jsou polystyrenové kuličky na elektrodovém poli velmi dobře patrné. Jejich poloha může být velmi snadno nalezena např. pomocí prahování intenzity a následným výpočtem těžiště prahovaného objektu. Rozpoznávací algoritmus byl však od počátku připraven na manipulaci s více objekty a v tomto případě není výpočet těžiště vhodný, neboť poloha těžiště dvou objektů se nachází mezi nimi.

Z toho důvodu byl zvolen k detekci kuliček algoritmus detekce lokálních maxim. Algoritmus pracuje na základě konvoluce s druhou derivací gaussovského jádra. Základní výhodou tohoto postupu je, že gaussovské jádro v rovnici 2.7 stejně jako i jeho derivace je takzvaně separabilní neboli rozložitelné na součin dílčích funkcí v jednotlivých proměnných.

$$G(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma_1\sigma_2} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x^2}{\sigma_1^2} + \frac{y^2}{\sigma_2^2}\right)} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_1} e^{-\frac{x^2}{2\sigma_1^2}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_2} e^{-\frac{y^2}{2\sigma_2^2}} \quad (2.7)$$

Díky této vlastnosti poté můžeme rozložit dvourozměrnou konvoluci na jednorozměrnou pro sloupce a řádky zvlášť což vede ke značnému zefektivnění algoritmu. V diskrétní podobě je algoritmus konvoluce definován rovnicí

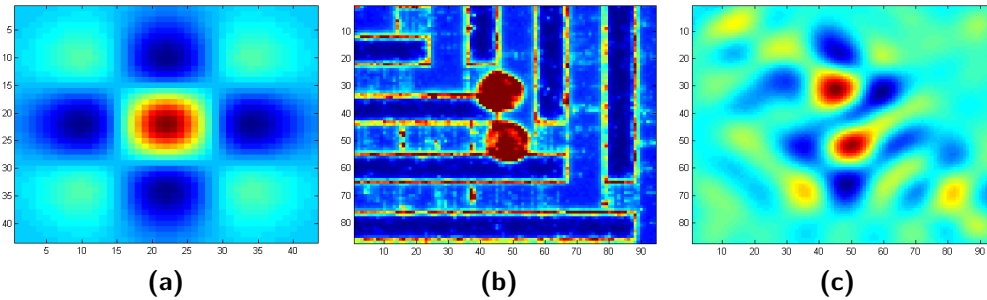
$$I \star G = \sum_{k=0}^p \sum_{l=0}^p I_{i-k, j-l} G_{k,l} , \quad (2.8)$$

kde I značí obrázek velikosti $m \times n$ a G je konvoluční jádro velikosti $p \times p$. Celkový počet operací je tedy v tomto případě úměrný $m \times n \times p^2$. Díky separabilnosti gaussovského jádra však můžeme konvoluci zapsat následujícím způsobem

$$I \star G = \sum_{k=0}^p I g_{i-k, j} G_k , \quad (2.9)$$

kde

$$I g = \sum_{k=0}^p I_{i, j-k} G_k . \quad (2.10)$$



Obrázek 2.6.: Rozpoznání objektu v obraze za pomoci konvoluce s derivací gausiánu: (a) konvoluční jádro - druhá derivace gausiánu, (b) Dvě blízké kuličky v obraze (výřez z obrazu kamery v pseudobarvě), (c) výsledek konvoluce

G_k je zde dílčí jednorozměrné gaussovské jádro z rovnice 2.7 velikosti p . Celkový počet operací je tedy v tomto případě redukován na $m \times n \times 2p$, tedy náročnost algoritmu je o jednu dimenzi snížena.

Hlavní výhodou tohoto algoritmu je, že dokáže rozlišit i dvě velice blízké kuličky, neboť bere v úvahu i širší okolí objektu. Výsledné konvoluční jádro dané vztahem

$$G_{2d}(x, y) = \frac{(\sigma^2 - x^2)(\sigma^2 - y^2)}{\sqrt{2\pi}\sigma^9} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (2.11)$$

je znázorněno na obrázku 2.6a. Je zřejmé, že tento tvar není zcela optimální. Postrádá rotační symetrii a jeho znaménko se střídavě mění v osmici sousedních čtverců. To je bohužel daň za separabilitnost jádra v kartézských souřadnicích. Ta nám však přináší takové zrychlení algoritmu, že se využití derivace gaussovského jádra rozhodně vyplatí, a jak je vidět na obrázku 2.6c, pro účely rozpoznávání polystyrenových kuliček je zcela postačující. I dva velice blízké objekty znázorněné na obrázku 2.6b vyústí po konvoluci ve dvě zcela oddělená lokální maxima. Pro získání pozic jednotlivých objektů tedy výsledek konvoluce prahujeme a vybíráme lokální maxima.

Dalšího zrychlení algoritmu dále můžeme docílit využitím předpokladu, že se objekty na elektrodovém poli nepohybují příliš rychle. Konvoluci tedy můžeme provádět pouze v těsném okolí předchozí pozice objektu.

2.5.3. Zpřesňování pomocí těžiště

Výše popsaný algoritmus využívající konvoluce a vyhledání lokálních maxim má jednu drobnou nevýhodu. Lokální maximum se nenachází vždy v přesném středu objektu. Je to dáno tím, že intenzita objektu v obraze mírně kolísá a také proto, že je poloha maxima ovlivněna okolím objektu. Z tohoto důvodu byl

využit druhý algoritmus využívající prahování intenzity a výpočtu těžiště pro zpřesnění polohy. Aby však nedocházelo k posunu těžiště mezi dva blízké objekty, je pro výpočet zvoleno velice těsné okno. Pozice tedy může být korigována pouze o několik pixelů a nemůže dojít k posunu mimo zvolený objekt.

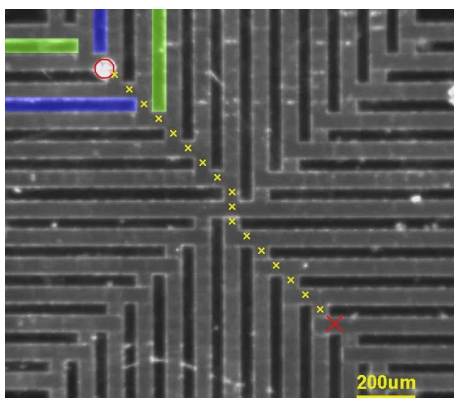
Výsledkem je poměrně robustní algoritmus, který dokáže odlišit i dvě dotýkající se polystyrenové kuličky a umožňuje sledování jejich polohy v reálném čase. Experimenty navíc ukázaly, že je schopen zpracovat přibližně 30 až 50 snímků za vteřinu, což je pro naši aplikaci více než dostatečné, neboť řídicímu algoritmu postačí přibližně 10 až 15 snímků za vteřinu.

2.6. Výsledky experimentů

Poté, co byla platforma sestavena a oživena, bylo provedeno několik experimentů za účelem prokázání funkčnosti a opakovatelnosti manipulace. Vzorkovací frekvence algoritmu byla zvolena na 15 Hz. Důvodem takto nízké frekvence přitom není samotný algoritmus. Ten může běžet daleko rychleji. Zpomalení způsobuje nutnost ukládání videa za běhu algoritmu pro účely pozdějšího vyhodnocení. Ukazuje se však, že snížení vzorkovací frekvence není problémem, neboť řídicí algoritmus pracuje spolehlivě i při takto nízké frekvenci. Amplituda signálů přiváděných na elektrody byla nastavena na 6 V při frekvenci 100 kHz. V obou těchto hodnotách je značná volnost. Algoritmus pracuje spolehlivě v rozmezí napětí od 5 do 15 V při frekvencích od 1 kHz do 3 MHz. Vyšší napětí však způsobuje zbytečně vyšší výkonovou ztrátu na budičích generátoru, proto je napětí drženo na své dolní hranici. Volba frekvence je zde téměř libovolná. Pro nízké frekvence je vyšší riziko vzniku elektrolýzy vody a následného poškození elektrod. V případě deionizované vody však tento jev pro daný rozsah napětí a frekvencí není významný. Pro frekvence vyšší než přibližně 1 MHz je poté výstupní napětí generátoru omezováno parazitními kapacitami elektrod a přívodních vodičů. Výstupní napětí je tak o něco nižší než nastavená hodnota. Ani tento jev však nepředstavuje přílišné komplikace.

Videa získaná z experimentů byla posléze vyhodnocena a doplněna o vizualizaci aktivních elektrod a plánované trajektorie. Ukázka této vizualizace se nachází na obrázku 2.7. Z obrázku je patrná funkce řídicího algoritmu. Nejprve je vyhodnocena poloha samotného objektu a index pole, na kterém se nachází. Tento index společně s informací o cílové pozici slouží k adresaci předpočítané matice obsahující informaci o příštím kroku řídicího algoritmu a příslušném akčním zásahu, viz podbarvené elektrody.

Předpočítaná matice obsahuje informaci pouze pro jeden krok algoritmu. Pokud chceme zobrazit celou plánovanou trajektorii, jak je tomu na obrázku 2.7,



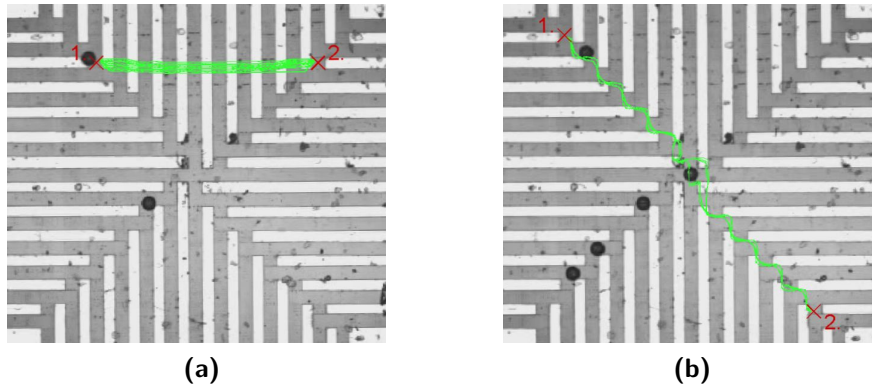
Obrázek 2.7.: Vizualizace funkce řídicího algoritmu. Aktivní elektrody jsou podbarveny na základě přivedené fáze, cílová pozice je značena červeným křížkem a plánovaná trajektorie je znázorněna křížky žlutými.

musíme ji vyhledat rekurzivně. Na základě aktuální a cílové polohy zjistíme polohu příští, z té následující atd. Tato informace však není pro samotné řízení nikterak důležitá, neboť je vždy použit pouze první krok naplánované trajektorie. Ve videu je však velmi užitečná, neboť nám ukazuje, jak se trajektorie mění v závislosti na vlivu prostředí.

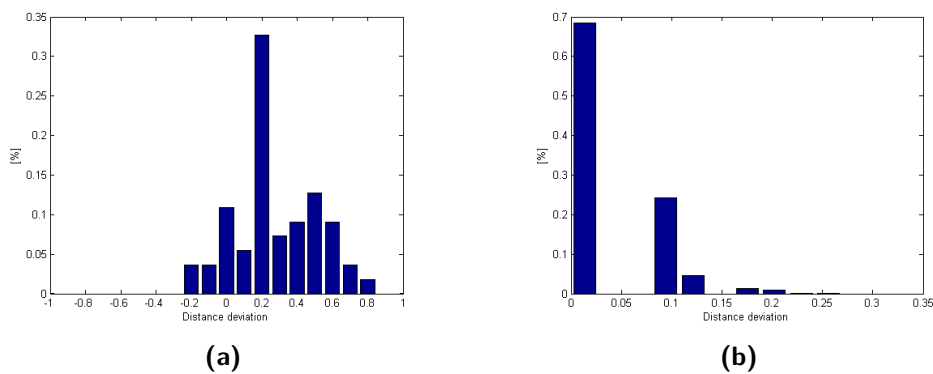
Ukazuje se, že odchylky od původně naplánované trajektorie jsou při řízení zcela běžné. Nastávají například při kolmém pohybu přes elektrody, kde strategie manipulace nedovoluje řízení objektu ve směru rovnoběžném s elektrodami, ale i v mnoha jiných situacích. Z experimentů však vyplývá, že i přes nejruznější odchylky je cílové pozice v naprosté většině případů dosaženo.

Za účelem prokázání opakovatelnosti procesu řízení, byla provedena série experimentů s jednoduchými opakujícími se trajektoriemi, viz obrázek 2.8. Trajektorie byly voleny tak, aby co nejlépe vystihovaly procesy na elektrodovém poli. Vzhledem k tomu, že se každá libovolná trajektorie skládá z pohybu po diagonálním rozhraní a pohybu napříč přes elektrody, je potřeba charakterizovat především tyto dva základní pohyby.

Při pohybu napříč přes elektrody je velice důležité charakterizovat odchylku ve směru rovnoběžném s elektrodami, ve kterém je kulička neřiditelná. Pro tento účel byl zvolen experiment na obrázku 2.8a. Vyhodnocena byla odchylka od ideální trajektorie ve tvaru přímky propojující dva výchozí body trajektorie. Jelikož k největší odchylce dochází vždy na začátku trajektorie při opouštění diagonálního rozhraní a po zbytek trajektorie se již odchylka víceméně nemění, byla jako nejvíce charakterizující zvolena odchylka v polovině této trajektorie. Výsledné rozložení naměřených dat je zobrazeno ve tvaru histogramu na obrázku 2.9a. Z obrázku je na první pohled patrné, že rozložení odchylky trajektorie je vy-



Obrázek 2.8.: Testovací trajektorie pro testování opakovatelnosti procesu řízení: (a) testování manipulace ve směru kolmém na elektrody, (b) testování na diagonálním rozhraní.



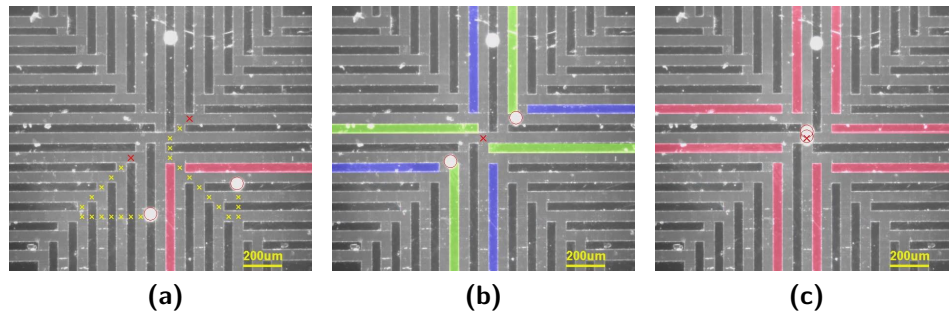
Obrázek 2.9.: Histogramy rozložení odchylky od plánovaných trajektorií. Horizontální osa zobrazuje velikost odchylky normovanou k velikosti jednoho šachovnicového pole a vertikální osa značí procentuální výskyt. Histogram (a) zobrazuje odchylku při pohybu napříč přes elektrody v kolmém neřiditelném směru a na histogramu 2.9b je zobrazena absolutní vzdálenost dvou trajektorií na diagonálním rozhraní.

chýlené do kladných hodnot. Kuličky tady mají spíše tendenci přibližovat se ke středu elektrodového pole. Vodorovné měřítko zobrazeného grafu je normováno k velikosti jednoho šachovnicového pole. Pro hodnoty odchylky v rozmezí od -0.5 do 0.5 tedy připadá poloha objektu na stejné šachovnicové pole a je z pohledu řídicího algoritmu nerozlišitelná. Z histogramu však vidíme, že přibližně ve 30% případů je tato hranice překročena. V případě této testovací trajektorie nepůsobí taková změna žádný problém. Algoritmus okamžitě zareaguje změnou plánované trajektorie a vertikální poloha se upraví při dosažení diagonálního rozhraní. Problém však může nastat, bude-li cílová poloha zvolena například v polovině úseku napříč elektrodami. V takovém případě algoritmu nezbývá jiná možnost než vrátit kuličku zpět na diagonální rozhraní a pokusit se o dosažení správné cílové pozice znovu. V některých případech toto může vést k několika cyklům. Nakonec je však i takovéto cílové pozice obvykle dosaženo.

Na diagonálním rozhraní je situace zcela odlišná. Jak je vidět na obrázku 2.8b je tato trajektorie velice dobře definována. To je dáno tím, že je kulička držena ve stabilních oblastech a veškeré náhodné odchylky díky tomu samovolně odeznívají. Můžeme si však všimnout, že se trajektorie liší v dopředném a zpětném směru. Ve směru nazpět například neprochází trajektorie středem pole. Tato odchylka je způsobena nepřesností elektrodového pole, díky které se kulička pravidelně dostává na nepředpokládanou pozici, ze kterého existuje jiná trajektorie.

Statisticky byla v případě diagonálního rozhraní vyhodnocena absolutní vzdálenost opakovaných trajektorií. Vzdálenost byla měřena přes všechny pixely testovaných trajektorií. Na obrázku 2.9b je vidět výsledek experimentu. Z histogramu je zřejmé, že téměř ze 70% jsou trajektorie zcela totožné. Porovnáme-li dále zbylé odchylky s odchylkami na obrázku 2.9a, zjistíme, že jsou oproti nim zcela zanedbatelné.

Z experimentů tedy vyplývá, že pokud budeme brát v úvahu fyzikální omezení systému a budeme volit cílové pozice buď na diagonálním rozhraní nebo ve středu pole, můžeme dosáhnout velice dobré opakovatelnosti a perfektní stability cílové pozice. Pokud se totiž ta bude nacházet v místě stabilního equilibria, bude kulička vždy přesně stabilizována v centru stabilní oblasti. Tedy již ne na základě obrazové zpětné vazby, ale na základě tvaru elektrického pole generovaného elektrodami. Cílová pozice bude tedy v tomto případě definována daleko přesněji než je původní rozlišení algoritmu na jedno šachovnicové pole a to minimálně na rozlišení dané histogramem 2.9b.



Obrázek 2.10.: Paralelní manipulace se dvěma objekty: (a) obě kuličky jsou nejprve navigovány do přednastavených pozic v protilehlých kvadrantech pole, (b) v momentě kdy jsou na svých místech spustí se přednastavená sekvence dvou kroků, která kuličky přivede do středu pole, (c) obě kuličky se nacházejí ve středu pole.

2.6.1. Paralelní manipulace se dvěma objekty

Velkou výhodou systémů s více aktuátory je možnost paralelní manipulace s více objekty. V našem případě elektrodového pole se 48 individuálně řízenými elektrodami je tato možnost více než zjevná. Navíc paralelní manipulace otevírá dveře celé řadě zajímavých úloh jako je třídění, separace nebo řízené slučování různých objektů. Aplikací těchto úloh může být například již zmíněná kombinatorická chemie, kde je zapotřebí řízeně slučovat malá množství výchozích látek, či biologii pro třídění jednotlivých buněk. Rozhodli jsme se proto demonstrovat i tuto možnost manipulace. Konkrétně tedy paralelní manipulaci se dvěma objekty a jejich vzájemné přivedení k sobě veprostřed elektrodového pole.

Při paralelní manipulaci však nastává značný problém s plánováním. Je třeba vzít v úvahu i vzájemné ovlivňování řízení obou objektů a možné kolize používaných elektrod. V obecném případě jde o relativně komplikovanou úlohu, kterou již není tak snadné naplánovat předem. Jelikož však jde v našem případě manipulace s polystyrenovými kuličkami víceméně o demonstrativní řešení, byla tato úloha vyřešena pouze ve zjednodušené formě.

Funkce implementovaného algoritmu je naznačena na obrázku 2.10. Hlavní myšlenkou je nejprve připravit obě kuličky do přednastavených pozic v protilehlých kvadrantech diagonálního rozhraní, viz obrázek (a). Tato velice jednoduchá strategie sama o sobě předchází naprostě většině kolizí, neboť tím, že jsou přednastavené pozice v protilehlých kvadrantech jsou přirozeně využívány odlišné elektrody pro manipulaci s oběma objekty. Důležitá je však správná volba těchto pozic, aby nedocházelo ke křížení trajektorií. Kritériem pro toto rozhodnutí je zde kratší součet vzdáleností počátečních a přednastavených pozic.

Samotný řídicí algoritmus může bez problému běžet paralelně ve dvou instancích. Rozpoznávání v obraze bylo od počátku připraveno pro sledování více objektů a samotné řízení pak sestává pouze z vyhledávání v tabulce. Výstupní data pro ovládání elektrod jsou poté kombinací obou zmíněných instancí řídicího algoritmu. Vzájemné ovlivňování obou algoritmů je tedy v tomto případě ignorováno a je spoléháno pouze na geometrické oddělení.

V momentě, kdy obě kuličky dosáhnou svých cílových pozice v protilehlých kvadrantech, je provedena sekvence dvou přednastavených kroků, která kuličky dopraví do středu pole, jak je znázorněno na obrázcích (b) a (c). Díky tomu, že byly kuličky ve známých pozicích, mohly být oba tyto kroky opět naplánovány předem. V tomto případě již je samozřejmě třeba vzít v úvahu vzájemné ovlivňování řízení. Geometrie pole a volba výchozích pozic však dovoluje snadno kuličky přiblížit k sobě a poté uzavřít do společného equilibria uprostřed pole.

Z podstaty navrženého algoritmu vyplývají některá omezení. Tím základním je omezení na počáteční vzdálenost obou kuliček z důvodu kolizí. Obecně můžeme říci, že pokud budou kuličky na počátku v různých kvadrantech elektrodového pole, je pravděpodobnost kolize velmi nízká. Avšak i pokud tato podmínka není dodržena ke kolizím dochází pouze vyjíměčně. Pokud ke kolizi přeci jenom dojde, stále to nemusí nutně znamenat ztrátu funkčnosti algoritmu. V zásadě zde existují tři varianty. Buď může dojít k přiblížení obou kuliček, které skutečně povede ke ztrátě funkčnosti, neboť algoritmus nebude schopen kuličky opět rozdělit. Další možností je uvážnutí algoritmu na mrtvém bodě, kdy se řízení obou kuliček navzájem blokuje. Nejpravděpodobnější však je, že se řízení vzájemně ovlivní, nicméně algoritmus zareaguje změnou trajektorií a bude pokračovat ve své funkci.

Četnost kolizí bohužel nebyla vyhodnocena ani statisticky, ani analyticky, jelikož pro statistickou analýzu nebylo nashromážděno dostatečné množství dat a analyticky nejsme schopni děje na elektrodovém poli přesně popsat.

Empirická zkušenost však říká, že ke kolizím dochází velice zřídka a pokud dojde k zastavení algoritmu, obvykle je to z jiného důvodu, jako je nepřesná kalibrace souřadnic, nebo nesprávné nastavení parametrů kamery.

3. Manipulace s kapičkami

Po úspěšné demonstraci manipulace s polystyrenovými kuličkami za pomoci dielektroforézy nastal čas pokusit se aplikovat získané poznatky v reálné aplikaci. V našem případě se nabízí manipulace s biologickým materiálem, která vyústila v již zmíněný projekt analýzy rakovinných buněk. V úvahu by připadala manipulace se samotnými buňkami. Řada prací již takovou manipulaci za pomoci dielektroforézy demonstrovala. Příkladem může být článek [17], kde je využíváno dielektroforézy k přesnému umístění buňky na testovací elektrody za účelem měření impedance. Nebo [18], kde je využíváno dielektroforézy k asistované koncentraci buněk z výchozího vzorku do připravených pozic. V obou zmíněných případech však nejde o manipulaci v pravém slova smyslu. Spíše se jedná o cílenou koncentraci buněk na základě pozitivní dielektroforézy, kdy jsou buňky přitahovány k řídicím elektrodám, nebo za pomoci stabilního equilibria vyvolaného negativní dielektroforézou.

Obecným problémem při manipulaci s buňkami za pomoci dielektroforézy je fakt, že elektrické vlastnosti buněk i média jsou si velice blízké. Z toho vyplývá, že dielektroforetická síla je velmi slabá a její účinky se projeví až v delším časovém horizontu. Teoreticky je možné sílu zvýšit za pomoci vyššího napětí přivedeného na elektrody. Zde však musíme vzít v úvahu možné ovlivňování buněčných procesů vysokým elektrickým polem, viz [19], které může vést k nesprávné funkci či usmrcení buněk. Zde tedy narážíme na jakousi horní hranici manipulace s buňkami za pomoci dielektroforézy.

Z výše zmíněných důvodů proto byla zvolena manipulace s vodními kapičkami v oleji. Tento přístup oproti předchozímu přináší celou řadu výhod. V první řadě jsou elektrické vlastnosti vody a oleje diametrálně odlišné. Pro permitivitu a vodivost platí přibližné hodnoty

$$\varepsilon_{r H_2O} \approx 80 \quad , \quad \sigma_{H_2O} \approx 1.5 \text{ S m}^{-1} \quad (3.1)$$

$$\varepsilon_{r oil} \approx 2 \quad , \quad \sigma_{oil} \approx 10^{-6} \text{ S m}^{-1} . \quad (3.2)$$

Velikost dielektroforetické síly bude proto mnohanásobně vyšší, než by tomu bylo v případě buněk ve fyziologickém roztoku. Další nespornou výhodou je, že samotnou manipulaci lze provádět i bez použití buněk, což je při provozování na fakultě elektrotechnické značným odlehčením. V neposlední řadě je tento postup

také o mnoho univerzálnější, neboť do kapiček můžeme uzavřít libovolné buňky či chemikálie a můžeme je dále řízeně třídít či slučovat. Tento přístup tedy slibuje mnoho velmi užitečných a zajímavých aplikací, viz kapitola 1.1.

3.1. Způsob manipulace s kapičkami

Obecně přináší manipulace s kapičkami celou řadu nových aspektů, které je třeba vzít v úvahu. Oproti původní situaci manipulace s polystyrenovými kuličkami zde nastává zcela zásadní rozdíl v použití dielektrické forézy. V původním případě byla voda médiem obklopujícím polystyrenové kuličky. Zde se však stává manipulovaným objektem obklopeným olejem. Z kombinace vodivosti a permitivity 3.2 vyplývá, že na vodní kapičky bude působit pozitivní dielektrická foréza namísto negativní. Veškeré ověřené principy manipulace z předchozího projektu tedy nejsou v případě kapiček použitelné.

Kapičky v tomto případě nebudou odpuzovány od aktivních elektrod, ale budou k nim přitahovány. Obecně můžeme říci, že nejvyšší gradient elektrického pole je na hranách elektrod a speciálně v okolí jejich rohů a ostrých zakončení. Do těchto míst budou tedy kapičky přitahovány. Je proto nutné upravit celou strategii řízení včetně návrhu elektrodového pole.

Další změnu přináší vysoká vodivost vody způsobená přidávkou soli pro zachování vhodného prostředí pro buňky. Pokud takováto voda přijde do přímého styku s elektrodami, má to za následek jejich velice rychlou degradaci. Elektrody je proto nutné chránit před přímým kontaktem s kapalinou tenkou izolační vrstvou. Tato vrstva má však bohužel za následek značné snížení dielektrické síly. Pro manipulaci je poté potřeba značně vyššího napětí.

Velmi podstatnou změnou je samotná nutnost použití mikrofluidického systému. Jedním z důvodů je, že použitý olej se na vzduchu velice rychle odpařuje a vzhledem k jeho ceně není otevřená platforma výhodná. Dalším důvodem je fakt, že vodní kapičky je třeba nějakým způsobem generovat a přivádět na přesně určené místo na elektrodového poli. Uzavřená mikrofluidická soustava je proto velice výhodná. Přináší však s sebou i jisté komplikace. Především je zde nutné vzít v úvahu kapilární síly a smáčivost povrchu. Pokud chceme, aby se kapičky volně pohybovaly mikrofluidickým systémem, je třeba zajistit, aby byl jeho povrch tzv. hydrofobní (nesmáčivý). Smáčivost povrchu závisí na celé řadě aspektů, jejímiž hlavními činiteli jsou typ materiálu a hrubost povrchu. Například hladký skleněný povrch je sám o sobě relativně nesmáčivý. Pokud však prošel procesem leptání či broušení, je situace o mnoho horší. Vodní kapičky budou takto upravený povrch smáčet a nebudou se snadno pohybovat. Smáčivost však můžeme relativně snadno upravit nanesením tenké teflonové vrstvy.

Ta se nanáší z vodní teflonové emulze a následně se zapéká při 300 °C.

Bohužel však ani teflonová vrstva nezabrání dalšímu nežádoucímu jevu zvanému koalescence. Koalescence je proces, kdy více malých kapiček splyne do jedné větší. K tomuto jevu dochází, jelikož střídavé elektrické pole používané pro manipulaci zároveň narušuje surfaktanty stabilizovanou olejovou membránu mezi jednotlivými kapičkami. Tomuto jevu je bohužel velice obtížné zabránit a jediným zatím úspěšným řešením se jeví držet kapičky v dostatečné vzdálenosti od sebe. Toho je možné dosáhnout při samotném generování kapiček použitím většího množství oleje než vody a dále pak samotnou manipulací. Vzhledem k tomu, že již je v této aplikaci předpoklad paralelní manipulace samozřejmostí, klade tento jev zcela nový požadavek na funkci regulátoru. Ten musí zajistit, aby se kapičky v žádném případě nedostaly příliš blízko sebe.

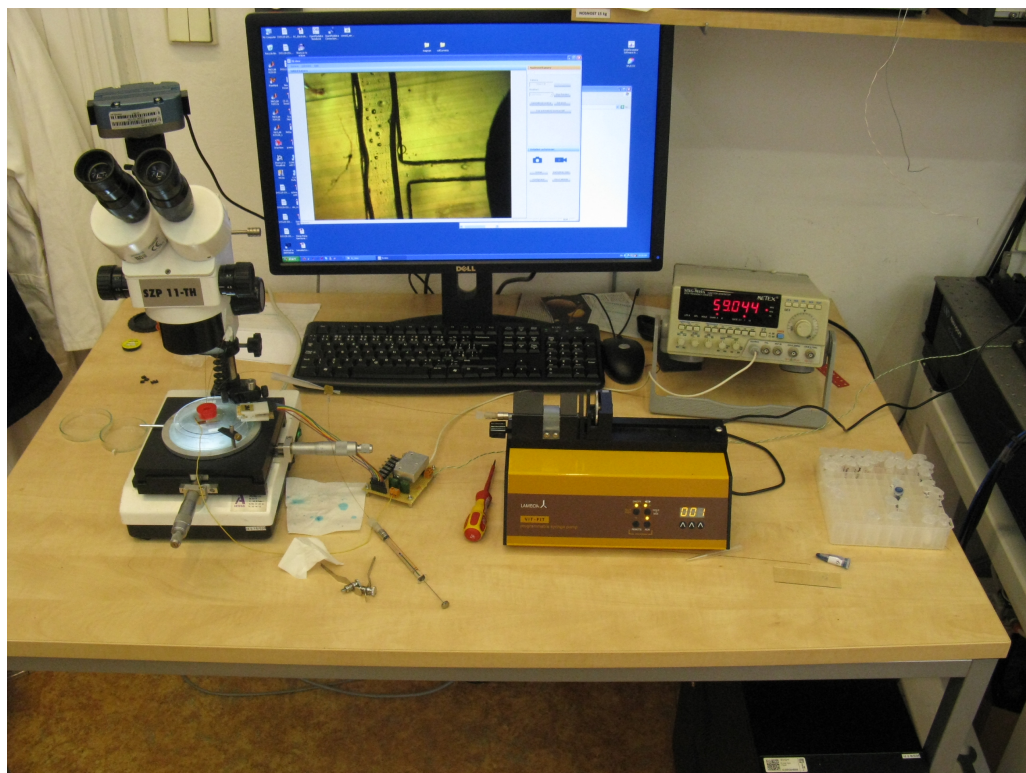
3.2. Testovací platforma pro ověření principu manipulace

Je zřejmé, že řešení výše nastíněné situace nemohlo být navrženo v jednom jediném kroce. Implementace v tomto případě vyžaduje příliš mnoho změn od původní manipulace s polystyrenovými kuličkami. Úloha byla proto řešena iterativně a jednotlivé principy byly testovány zvlášť. Postupným sjednocováním vyzkoušených součástí však nakonec vznikla kompletní testovací platforma, kombinující všechny výše zmíněné části dohromady. Přesto, že byla tato platforma sestavena jen z běžně dostupného laboratorního materiálu a již dříve použitého elektrodového pole, posloužila jako cenný zdroj informací a inspirace pro návrh finální platformy. Z tohoto důvodu bude tato testovací platforma rozebrána o trochu podrobněji, přičemž bude kladen důraz právě na získané poznatky.

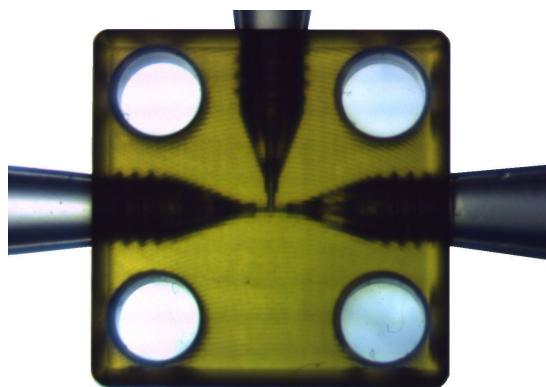
Kompletní testovací platformu můžeme vidět na obrázku 3.1. Platforma se skládá ze tří základních součástí, kterými jsou generátor kapiček, mikrofluidická manipulační komůrka s elektrodovým polem a napěťový zesilovač s přepínači pro řízení elektrod.

Začneme nejprve u generátoru kapiček. Ten sestává ze dvou skleněných mikrostříkaček o objemu 50 μ l, laboratorního dávkovače, přírodních kapilár a mikrofluidické propojky ve tvaru písmene “T”. Základním požadavkem při generování kapiček je dostatečná plynulost celého procesu. Jak již bylo zmíněno, pro dodržení dostatečné vzdálenosti mezi kapičkami a prevenci koalescence je zapotřebí při míšení použít většího množství oleje než vody. Toho je možné dosáhnout několika způsoby. Nejlepším řešením by bylo použití dvou samostatných dávkovačů. V naší laboratoři však bohužel máme k dispozici pouze jeden. Druhou variantou je použít různé objemy stříkaček pro olej a vodu umístěné

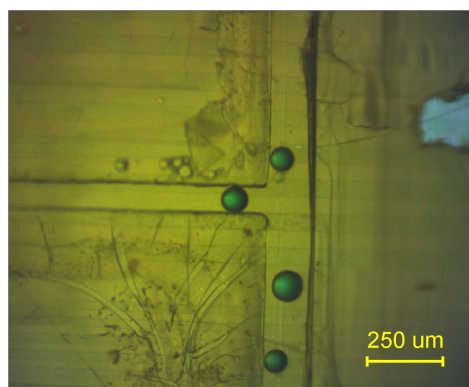
3. Manipulace s kapičkami



(a)

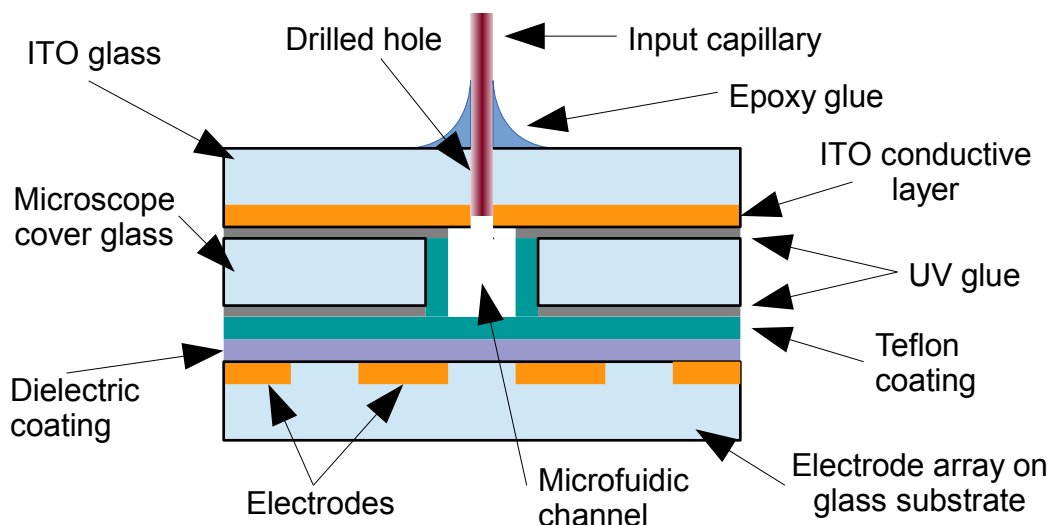


(b)



(c)

Obrázek 3.1.: Testovací platforma pro ověření principu manipulace: (a) Fotografie kompletní platformy sestávající z laboratorního dávkovače, dvou skleněných mikrostříkaček a manipulační platformy umístěné pod mikroskopem. (b) Generátor kapiček ve tvaru písmene “T”. (c) Obraz z kamery při manipulaci. Kapičky jsou přiváděny horizontálním kanálkem za pomoci proudu kapaliny a následně jsou směřovány nahoru, nebo dolů za pomoci elektrod (horizontální slabě tmavší proužky).



Obrázek 3.2.: Schematický řez testovací platformou. Soustava se skládá ze tří základních vrstev. Jsou jimi elektrodové pole s izolační vrstvou fotorezistu a hydrofobní vrstvou teflonu, krycí mikroskopová sklíčka tvořící průřez mikrofluidického kanálku a ITO sklíčko s vyvrtanými otvory pro vstupní kapiláry tvořící protilehlou elektrodu proti elektrodovému poli. Všechny tři vrstvy jsou fixovány za pomoci UV lepidla.

do společného dávkovače. Toto řešení je v zásadě možné, avšak opět naráží na nedostatek vybavení, neboť menší stříkačky než $50\ \mu\text{l}$ nemáme k dispozici. Toto řešení tedy vede ke zvýšení rychlosti generování kapiček a zbytečně vyššímu průtoku obou kapalin (Vyplývá z nutnosti použít větší stříkačku pro olejovou fázi). Pro účely vyzkoušení procesu manipulace se ukázalo jako dostatečné řešení zobrazené na obrázku 3.1a. Tedy stříkačka s olejovou fází byla umístěna do dávkovače a vodní fáze byla dávkována ručně. Pro otestování manipulace bylo toto řešení dostatečné, avšak pro konečnou aplikaci není zcela vyhovující. Proces dávkování kapalin proto stále vyžaduje další úpravy. Možným řešením je pořízení či stavba druhého dávkovače. Finální řešení však stále ještě není známé.

Samotný generátor kapiček můžeme vidět na obrázku 3.1b. Jde o komerčně dostupnou mikrofluidickou “T” propojku o vnitřním průřezu $75\ \mu\text{m}$. Z principu generování kapiček je zřejmé, že není možné vytvořit menší kapičky než je průřez kanálku. V praxi jsou kapičky spíše o něco větší. Z experimentů vyplývá, že jejich velikost je přibližně $100\ \mu\text{m}$. Pro konečnou aplikaci by však bylo výhodnější generovat kapičky menší. Důvodů k tomu je několik. V první řadě to vede k nižší spotřebě výchozích chemikálií. Dalším důležitým důvodem je však také odlišení naší metody manipulace od již poměrně dobře zvládnuté technologie využívající electrowettingu. Díky dielektroforéze bychom totiž měli být schopni manipulovat

s daleko menšími kapičkami blízcími se rozměrům jednotlivých buněk.

Bezpochyby nejdůležitější součástí celé platformy je elektrodové pole s mikrofluidickou manipulační komůrkou. To můžeme vidět na obrázku 3.1c. Je zde patrné, že jde opět o spojení ve tvaru písmene “T”. Tento tvar byl zvolen z důvodu použitého elektrodového pole s paralelními elektrodami, které není pro manipulaci za pomoci pozitivní dielektroforézy příliš vhodné. Dielektroforetická síla se totiž projevuje nejvíce v mezeře mezi elektrodami avšak dopravit kapičku přes elektrodu se jeví jako značný problém. Použijeme-li však pro manipulaci výše zmíněné “Těčko”, bude přechodu přes elektrody napomáhat proud kapaliny, čímž je manipulace značně usnadněna.

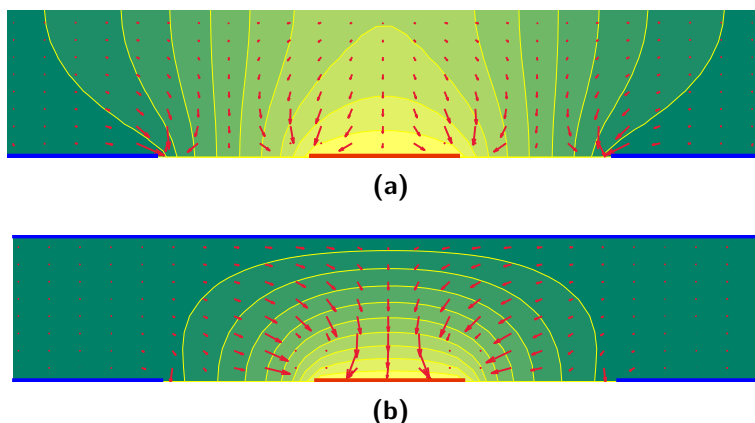
Úlohou, která je v tomto případě řešena, je třídění kapiček, které jsou přiváděny proudem kapaliny z levé části systému. V momentě, kdy kapičky opustí horizontální přívodní kanál a dosáhnou vertikálního propojení, jsou směřovány za pomoci elektrod buď směrem nahoru nebo dolů. Vzápětí, jsou však kapičky opět strhávány proudem kapaliny a odváděny pryč z manipulační oblasti. Platforma tedy simuluje jakousi třídící technologii, kde kritérium není odvozeno od fyzikálních vlastností materiálů, ale je zcela libovolně voleno operátorem.

Zásadní pro návrh manipulační platformy jsou v tomto případě parametry mikrofluidického systému. Schematický řez tímto systémem je znázorněn na obrázku 3.2. Základem je elektrodové pole s paralelními elektrodami. Šířka jedné elektrody stejně jako mezery odpovídá 100 μm . Elektrody jsou vyrobeny z průhledného vodivého materiálu zvaného ITO (indium tin oxide), který umožňuje použití spodního osvětlení při umístění pod mikroskop. Na elektrodovém poli je dále nanášena tenká izolační vrstva sestávající z běžného fotorezistu pro výrobu plošných spojů a dále teflonová vrstva zajišťující hydrofobní povrch. Síla obou vrstev nebyla měřena, avšak dle mého odhadu odpovídá maximálně jednotkám mikrometrů.

Samotná mikrofluidická část je tvořena třemi běžnými krycími mikroskopovými sklíčky. Tloušťka těchto sklíček udává průřez kanálku a odpovídá přibližně 100 μm . Okraje sklíček, které jsou ve styku s kapalinou, jsou opět potaženy teflonovou vrstvou. Ta je v tomto případě zcela nezbytná, neboť hrany sklíček jsou po průmyslovém řezání dosti hrubé a zabraňují volnému pohybu kapiček.

Horní vrstva mikrofluidického systému sestává ze sklíčka s průhlednou ITO vrstvou, do kterého jsou vyvrtány otvory pro přívodní kapiláry. Toto sklíčko tvoří protilehlou uzemněnou elektrodu proti elektrodovému poli a upravuje tak rozložení elektrického potenciálu a směr dielektroforetické síly pro snadnější manipulaci. V předchozí aplikaci manipulace s polystyrenovými kuličkami nebyla tato protilehlá elektroda nutná. V případě kapiček a pozitivní dielektroforézy však přináší podstatnou změnu.

Rozložení elektrického potenciálu a vyvolané dielektroforetické síly byly si-



Obrázek 3.3.: Porovnání rozložení elektrického potenciálu a vyvolané dielektroforetické síly simulované v programu COMSOL : (a) při použití obyčejného skla směřuje dielektroforetická síla především dolů směrem k elektrodám, což je pro manipulaci víceméně nevhodné, (b) použitím uzemněné vodivé vrstvy ITO dochází k výraznému upravení orientace dielektroforetické síly ve prospěch manipulace.

mulovány v programu COMSOL za pomoci metody konečných prvků. Rozdíl, který použití ITO sklíčka přináší, je patrný na obrázku 3.3. V případě bez použití protilehlé elektrody směřuje dielektroforetická síla převážně dolů, což je pro manipulaci víceméně nevhodné. Na obrázku jsou patrná čtyři lokální maxima. Dvě z nich se dle zájmu nachází na hranách “aktivované” elektrody, avšak další dvě se parazitně nacházejí na hranách elektrod sousedních. Použitím vrchního sklíčka s vodivou vrstvou ITO však dochází k výraznému zlepšení rozložení silového pole ve prospěch manipulace. Obě postranní maxima téměř vymizí a dielektroforetická síla působí převážně ve směru k aktivované elektrodě, což je pro manipulaci daleko vhodnější.

Celá mikrofluidická část byla posléze sesazena pod mikroskopem a zafixována pomocí UV lepidla.

Poslední částí testovací platformy je obyčejný sinusový generátor ve spojení s napěťovým zesilovačem. Z hlediska potřebného manipulačního napětí se zde ukazuje značný rozdíl oproti předchozímu případu. Pro manipulaci s polystyrenovými kuličkami bylo zapotřebí napětí pouze několika jednotek voltů. V případě kapiček je to však přibližně 60 voltů. Důvodem toho je především fakt, že velikost dielektroforetické síly silně závisí na permitivitě použitého média, viz rovnice 1.3. Dosadíme-li do rovnice hodnoty pro polytyrenové kuličky v deionizované vodě a dále pro kapičky fyziologického roztoku v oleji, zjistíme, že velikost dielektroforetické síly je v případě kapiček přibližně $20\times$ nižší. Dalším důvodem je také nevodivá vrstva chránící elektrody před elektrolýzou. Ta bohužel také ze-

slabuje elektrické pole vyvolané elektrodami. V nepolední řadě je také na vinně samotná pozitivní dielektroforéza, která způsobuje, že jsou kapičky v neustálém kontaktu s elektrodovým polem a k manipulaci je proto potřeba vyšší síly.

Pro potřebné zesílení napětí byl použit obvod LM2422. Jde o tříkanálový monolitický zesilovač s fixním ziskem určený původně pro generování katodového napětí v CRT obrazovkách. Jeho parametry však překvapivě dobře vyhovují i požadavkům pro buzení elektrod na elektrodovém poli. Hlavní výhodou je vysoké výstupní napětí až do výše $200 V_{pp}$ a možnost buzení kapacitní zátěže při vysokých frekvencích. Šířka pásma tohoto zesilovače činí plných 30 MHz. Co se týče buzení jednotlivých elektrod byla, v případě testovací platformy využita nejjednodušší možná varianta připojení elektrod k výstupu zesilovače za pomoci mikrospínačů, podobně jako je tomu na obrázku 1.3c. Ovládání elektrod je tedy v tomto případě pouze manuálně řízené operátorem.

3.2.1. Poznatky získané na testovací platformě

Jak již bylo předesláno, hlavním účelem celé testovací platformy bylo ověřit princip manipulace za pomoci pozitivní dielektroforézy, ale také načerpat potřebné praktické poznatky pro návrh budoucí manipulační platformy. Možnost manipulace se podařilo ověřit za použitého napětí 60 V. Velikost dielektroforetické síly byla zběžně prověřena i z hlediska frekvenční závislosti. Ve shodě s teoretickým předpokladem vycházejícím z reálné části Clausius-Mossotti faktoru 1.5 však žádná viditelná frekvenční závislost pozorována nebyla.

Velice dobře patrným jevem pozorovaným při experimentech je však koalescence, tedy splynutí dvou dotýkajících se kapiček při vystavení vnějšímu střídavému elektrickému poli. K tomuto jevu dochází ve chvíli, kdy se dvě kapičky při manipulaci přiblíží k sobě. V našem případě je to velice nežádoucí efekt, kterému bude nutno věnovat zvýšenou pozornost a to jak v průběhu generování kapiček, tak i při samotné manipulaci.

Pro návrh manipulační platformy s kapičkami byla vyvozena celá řada nových poznatků. Oproti manipulaci s polystyrenovými kuličkami bude muset platforma projít kompletní rekonstrukcí. Počínaje elektrodovým polem, které bude muset kompletně změnit svůj design, neboť příčný pohyb přes paralelní elektrody není za pomoci pozitivní dielektroforézy praktický. Této změně také odpovídá kompletní rekonstrukce strategie řízení. Manipulace bude v tomto případě probíhat pouze na elektrodovém rozhraní. Oproti předchozímu případu zde navíc není možné vyvolat stabilní ekvilibrium.

Zcela novou součástí manipulační platformy je generátor kapiček. Komerční verze použitá pro testovací platformu se ukázala jako nedostatečná. Pro novou platformu bude proto cílem integrovat generátor přímo na mikrofluidický čip

v těsné blízkosti elektrodového pole. Důvodem k tomu je možnost generování menších kapiček a pozorování procesu generace společnou kamerou pro obrazovou zpětnou vazbu. V neposlední řadě je tu i možnost využití této informace pro zpětnovazební řízení procesu generování kapiček.

Stejný nemůže zůstat ani generátor používaný k řízení elektrod. Jak již bylo zmíněno, k manipulaci s kapičkami je potřeba vyššího napětí. Bude proto nutné navrhnout zcela nový hardware pro buzení elektrod.

3.3. Návrh platformy pro manipulaci s kapičkami

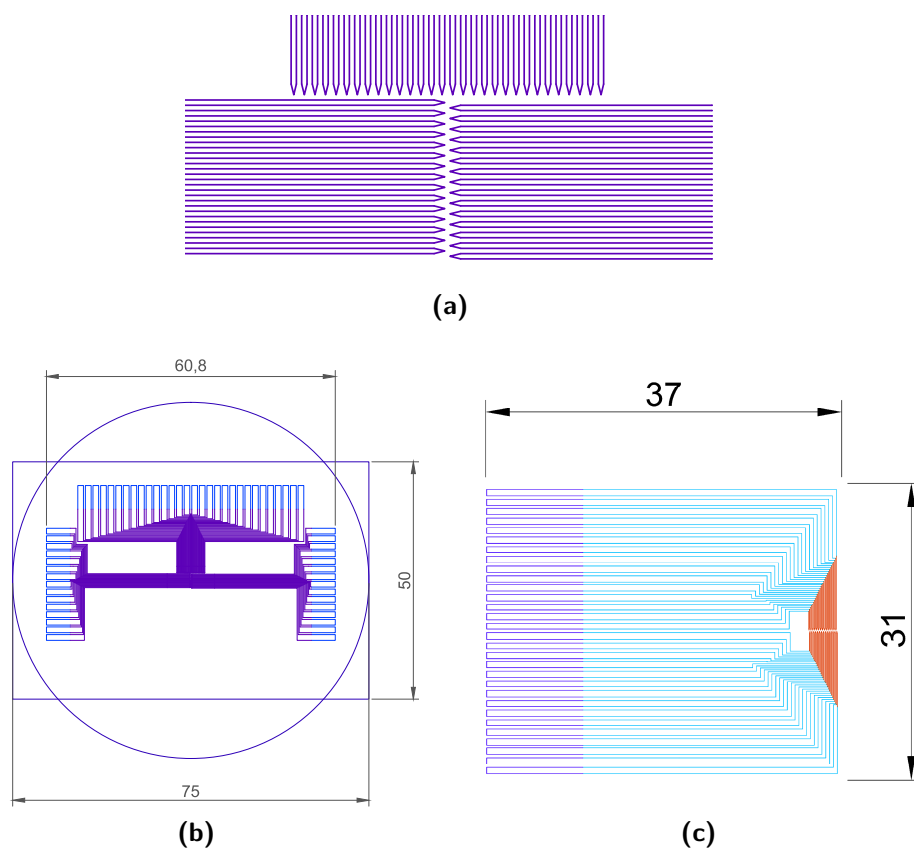
Poté, co se úspěšně podařilo prokázat možnost manipulace s kapičkami za pomoci pozitivní dielektroforézy, nastal čas pro návrh finální manipulační platformy umožňující zpětnovazební řízení za pomoci obrazové zpětné vazby a paralelní manipulaci s více objekty. Jednotlivé části návrhu budou popsány v této podkapitole.

3.3.1. Elektrodové pole

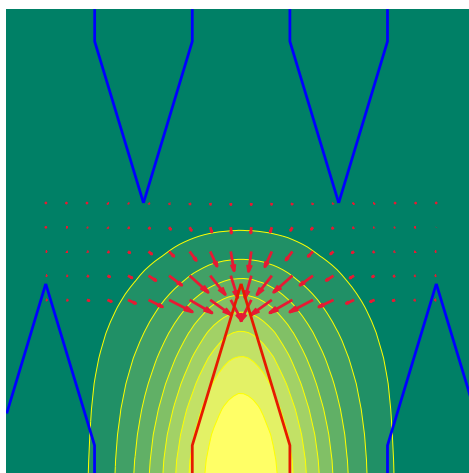
Vzhledem k nutnosti adaptace platformy pro pozitivní dielektroforézu prodělalo elektrodové pole podstatné změny co se týče návrhu i výrobního procesu. Z hlediska pozitivní dielektroforézy je výhodná manipulace pouze na rozhraní elektrod. Tomuto účelu byl podřízen i návrh elektrodového pole. Jak je vidět na obrázku 3.4a, tento design opět simuluje jakousi “T” třídící platformu. Zašpičatělé konce elektrod mají za následek, že hrot působí přibližně jako bodový zdroj elektrického pole. Vodorovné elektrody jsou oproti sobě posunuty o polovinu periody. Pohyb po jejich rozhraní proto může být do jisté míry přibližně aproximován jako pohyb mezi třemi bodovými zdroji síly určenými nejbližšími elektrodami. Rozložení silového pole zobrazuje obrázek 3.5.

Praktickou součástí návrhu elektrodového pole je technologie výroby. V průběhu práce bylo vyzkoušeno několik postupů ve spolupráci s UIACH AV ČR v Brně. V zásadě zde připadají v úvahu dvě možnosti. První z nich je tzv. “lift-off”. Tento postup spočívá v nanesení fotorezistu na skleněný wafer, osvětlení přes masku elektrod a následné vyvolání negativního motivu. Poté je na substrát naprášena vrstva kovu nebo jiného vodivého materiálu (např. ITO). Posledním krokem je rozpuštění zbylého fotorezistu, se kterým se odplaví i pokrývající naprášená vrstva. Vodivá tedy zůstanou pouze místa, kde se při naprašování nenacházel fotorezist. Pro tuto výrobní technologii bylo navrženo elektrodové pole na obrázku 3.4b. Výhodou této technologie je, že naprášenou vrstvu není zapotřebí leptat. Vzhledem k tomu, že je tato vrstva typicky zlatá (chemicky velmi

3. Manipulace s kapičkami



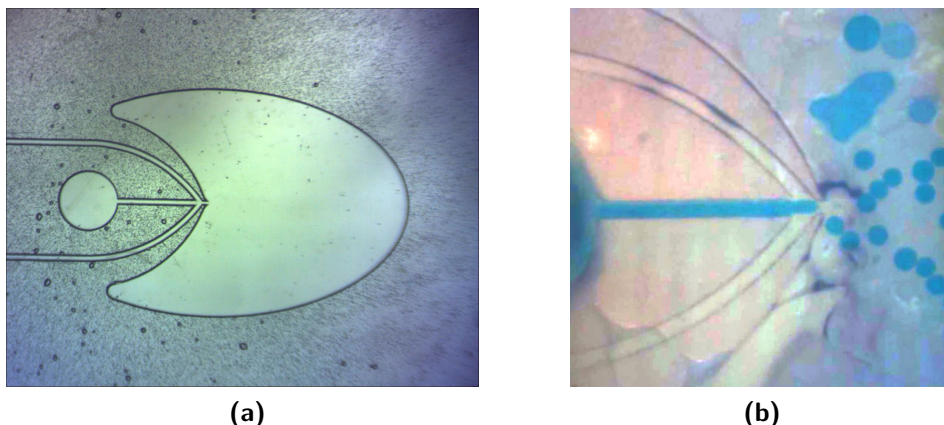
Obrázek 3.4.: Elektrodové pole pro manipulaci s kapičkami: (a) detailní pohled na aktivní oblast elektrodového pole, (b) verze navržená pro výrobu na skleněném waferu, (c) zjednodušená verze upravená pro výrobu na plastové fólii.



Obrázek 3.5.: Směr dielektroforetické síly vyvolané zašpičatěnými elektrodami simulovaný v programu COMSOL. Obrázek vyznačuje horizontální řez manipulační platformou v polovině mezi elektrodovým polem a ITO sklíčkem. Hrot elektrody zde působí přibližně jako bodový zdroj síly.

odolná), přináší tato metoda značné usnadnění. Nevýhodou je vyšší náchylnost k výskytu poruch, tedy přerušených nebo propojených elektrod. Tento problém v našem případě nakonec vyústil v použití jiné metody využívající leptání vrstvy přes fotorezist, stejně jako je tomu při výrobě plošných spojů.

Polotovarem pro tuto metodu se stala komerčně dostupná plastová PET fólie s připravenou průhlednou vodivou vrstvou ITO. Ta přináší celou řadu výhod. Kromě průhlednosti je ITO vrstva také snadno leptatelná ve slabé 5% kyselině chlorovodíkové za použití běžného fotorezistu pro výrobu plošných spojů. Praktickým důsledkem toho je, že proces můžeme provádět u nás v laboratoři. Potřebujeme k tomu pouze litografickou masku, kterou nám mohou vyrobit naši partneři v laboratoři v Brně. Celý postup je tedy téměř shodný s výrobou plošných spojů. Na připravenou fólii je nanášena spincoatováním tenká vrstva fotorezistu. Fotorezist se nechává zaschnout při 70 °C. Následuje osvětlení přes masku a vyvolání v 0.7% roztoku hydroxidu sodného. Posledním krokem je již zmíněné leptání ITO vrstvy v kyselině a odstranění zbylého fotorezistu v acetonu. Popsaná metoda poskytuje dostatečnou přesnost pro výrobu elektrodových polí s šířkou elektrod 100 μ m bez nutnosti čistého prostředí a speciálních chemikálií. Jedinou nevýhodou je špatná mechanická odolnost takto vyrobených polí která je však kompenzována snadnou reprodukovatelností díky použité masce.



Obrázek 3.6.: Mikrofluidický systém vyleptaný ve skle: (a) fotografie vyleptaného motivu ve skleněném substrátu, (b) testování mikrofluidického generátoru kapiček.

Nemalou výhodou takto vyrobených polí je také velice snadné kontaktování za pomoci ZIF (zero insert force) konektoru pro ploché kabely. Kontaktování skleněných substrátů totiž přináší celou řadu obtíží ohledně mechanického uchycení a kontaktování velkého množství elektrod.

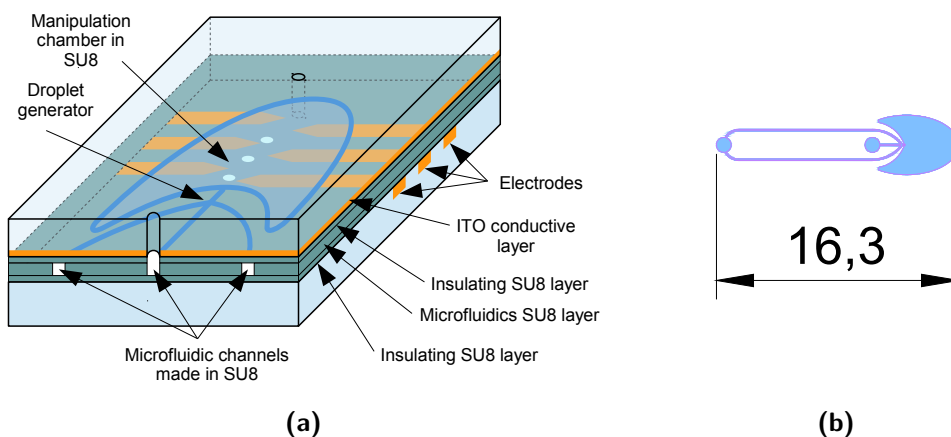
3.3.2. Mikrofluidika

Mikrofluidická část platformy byla navržena s cílem integrovat generátor kapiček i manipulační platformu na jeden jediný čip. Za tímto účelem byla provedena celá řada experimentů týkajících se výrobních technologií. První experimenty byly prováděny s tzv. PDMS (Poly-Di-Methyl-Siloxane). Tato sloučenina je organickým polymerem na bázi silikonu, hojně využívaná pro výrobu mikrofluidických systémů. Jejimi vlastnostmi jsou optická transparentnost, snadná replikovatelnost díky odlévání do forem a vysoká elasticita materiálu. V našem případě však tuto sloučeninu bohužel nelze použít, neboť použitý olej má schopnost pronikat do materiálu a způsobovat tak jeho objemové rozpínání.

Několik experimentů bylo provedeno s mikrofluidickým systémem vyleptaným ve skle, jak je tomu na obrázku 3.6. Zde se však neosvědčilo slepení skleněného substrátu s plastovou fólií tvořící elektrodové pole, které obvykle vedlo k zalepení mikrofluidických kanálků. Navíc tento způsob neumožňuje použití protilehlé ITO elektrody.

Z výše uvedených důvodů byla pro výrobu mikrofluidického systému zvolena metoda využívající fotorezistu SU-8. Tento běžně používaný fotorezist na bázi epoxidové pryskyřice je určený pro nanášení vrstev za pomoci spincoatování. Je dostupný v celé řadě viskozit umožňujících nanášení vrstev o síle od jednotek

až po stovky mikrometrů. Nemalou výhodou je i vysoká chemická odolnost a dostatečná hydrofobnost povrchu, která umožňuje vynechat teflonovou vrstvu.



Obrázek 3.7.: Návrh mikrofluidické části vyrobené přímo na elektrodovém poli za pomoci fotorezistu SU-8: (a) Schematický náčrt platformy obsahující mikrofluidický generátor kapiček i manipulační komůrku v jedné vrstvě SU-8. (b) Návrh masky pro přenesení na fotorezist.

Návrh kompletního mikrofluidického systému pro výrobu za použití fotorezistu je zobrazen na obrázku 3.7. Celá platforma je vyrobena přímo na elektrodovém poli postupným nanášením SU-8 vrstev. První vrstva o síle přibližně $2\mu\text{m}$ tvoří již zmíněnou izolaci elektrodového pole. Na tuto vrstvu je dále nanášena vrstva druhá o síle přibližně $100\mu\text{m}$, do které je přenesen motiv mikrofluidické části. Poslední vrstva je opět slabší a je nanášena na protilehlé ITO sklíčko.

Zde se nachází drobný problém neboť do tohoto sklíčka musí být zároveň vyvrtány otvory pro vstupní kapiláry. Na sklíčko s otvory však již není možné spincoatovat souvislou vrstvu. Při pokusu o vrtání otvorů až po nanášení vrstvy je však prakticky nemožné zachovat tuto vrstvu dostatečně čistou pro následné slepení. Řešením této situace je vyvrtání otvorů předem avšak ne skrz celý substrát. To umožní nanášení vrstvy na nepoškozený povrch, které je následováno proražením tenkého zbytku skla za pomoci obyčejné jehly.

Posledním krokem při výrobě mikrofluidické platformy je sesazení a slepení obou částí do jednoho bloku. K tomuto účelu opět posloužila jedna z vlastností fotorezistu SU-8. Ten totiž při dosažení 150°C měkne a umožňuje slepení obou vrstev pouhým přitlačením k sobě, viz [20]. Tento krok je však velmi kritický, neboť při přílišném přitlačení může dojít k zalepení mikrofluidických kanálků. Tento problém také bohužel nastal v průběhu této práce, takže kompletní mikrofluidickou manipulační platformu se nepodařilo vyrobit.

3.3.3. Vysokonapěťový generátor

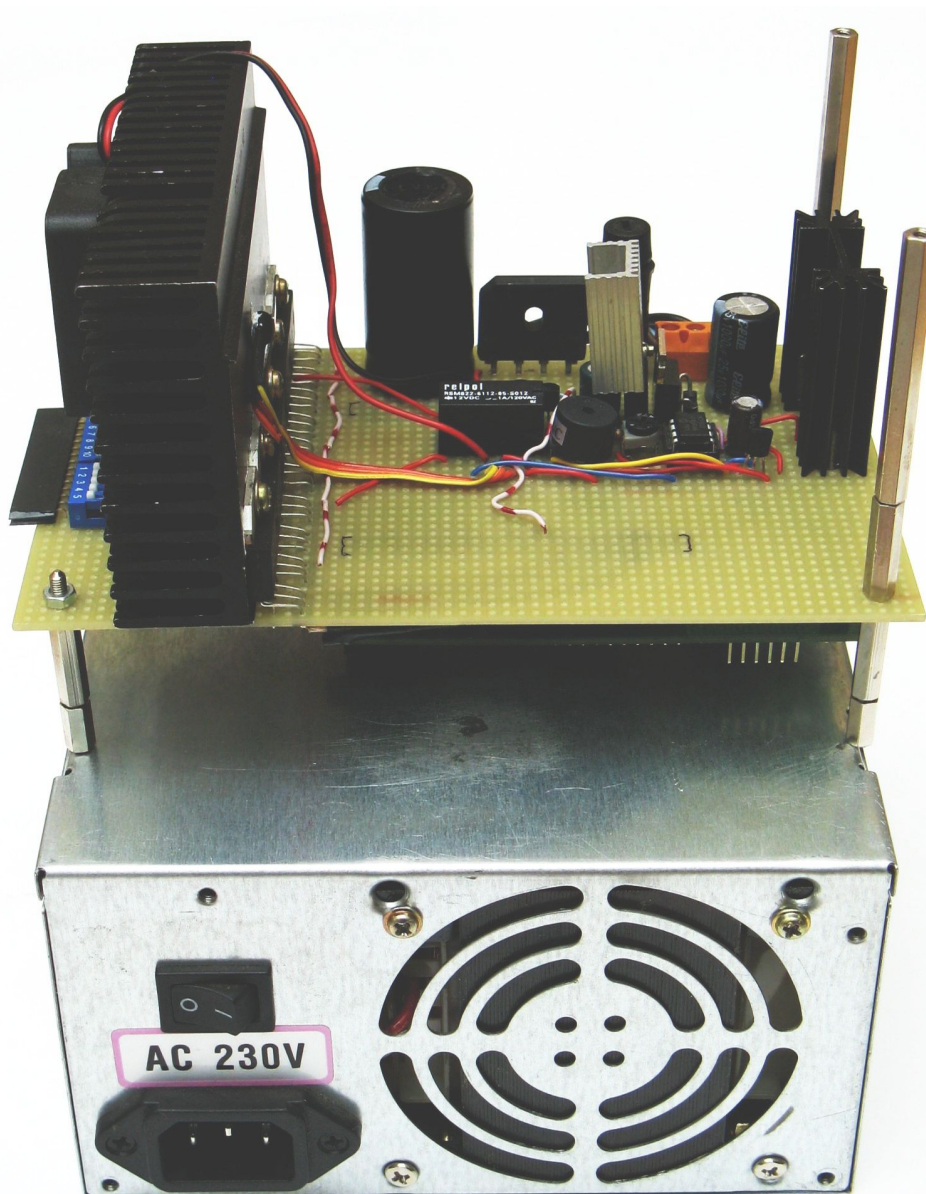
Součástí návrhu manipulační platformy byla i výroba nového generátoru pro řízení elektrod. Hlavním důvodem ke stavbě nového zařízení byla nutnost použití vyššího napětí pro dosažení dostatečné manipulační síly za pomoci pozitivní dielektroforézy. Při návrhu generátoru však bylo dbáno i na další aspekty, jako je maximální generovaná frekvence či snadné připojení za pomoci USB.

Nová konstrukce vychází z předchozí osvědčené verze 64-kanálového generátoru použitého pro manipulaci s polystyrenovými kuličkami popsané v kapitole 2. Stejně jako v předchozí konstrukci jsou generovány obdélníkové signály o společné amplitudě a frekvenci s 16 možnými fázovými rozdíly. Oproti původní verzi je zde však celá řada změn. Hlavním rozdílem je použití mikroprocesoru na místo hradlového pole. Jádrem nového generátoru je vývojový kit DISCOVERY s procesorem STM32F407. Použití tohoto kitu velmi usnadňuje celý návrh, neboť již obsahuje veškeré podpůrné obvody pro mikroprocesor a snižuje nároky na výrobu plošného spoje. Výhodou je také velmi snadná implementace USB rozhraní použitého ke komunikaci s PC. Komunikační protokol je zde navržen ve třídě emulovaného sériového portu, která nevyžaduje speciální ovladače a umožňuje univerzální použití libovolného vývojového prostředí pro implementaci řídicí aplikace na PC. Oproti předchozí verzi je zde značně vyšší výstupní napětí až do výše 200 V a o málo vyšší maximální frekvence, která činí 5.25 MHz. Nevýhodou je však nižší počet kanálů, který je v tomto případě omezen na 15.

Z pohledu výstupního napětí a maximální frekvence je pro účely manipulace s kapičkami konstrukce generátoru značně předimenzována. Pro vyvolání pozitivní dielektroforézy je zapotřebí napětí pouze 60 V a frekvence v řádu desítek kilohertz. Dosažitelnost vyššího napětí a při vysokých frekvencích však otevírá dveře řadě budoucích aplikací, jako je manipulace s velice malými objekty až do řádu stovek nanometrů či objekty s blízkými dielektrickými vlastnostmi obklopujícímu médiu. Vysoká frekvence je také zapotřebí pro dielektroforézu postupnou vlnou či elektrorotaci.

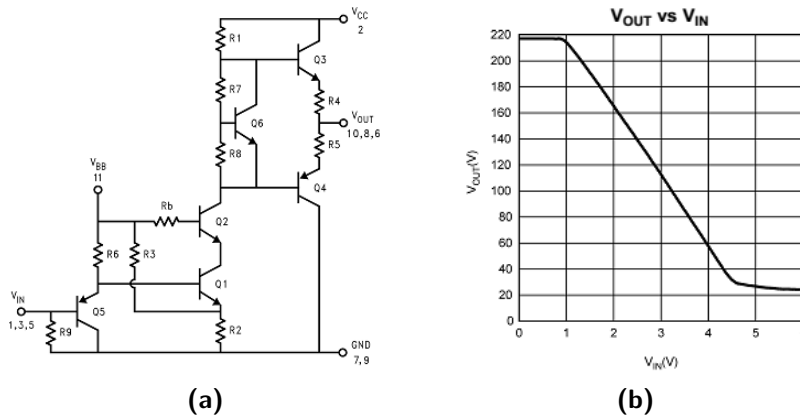
Návrh hardwarové části

Návrh hardwaru generátoru se do značné míry odvíjel od volby výstupních napěťových zesilovačů. Z důvodu velkého množství kanálů zde kromě maximálního napětí a šířky pásma hraje nemalou roli i velikost pouzdra a výkonové ztráty jednotlivých zesilovačů. K finální konstrukci generátoru byl nakonec zvolen obvod LM2422, stejně jako v případě testovací platformy. Důvodem jsou zde tři zesilovače integrované v jednom pouzdře a velice snadná implementace vyžadující pouze minimum externích součástí. Blokové schéma obvodu a vstupně



Obrázek 3.8.: Fotografie navrženého generátoru. Generátor byl vyroben na desce univerzálního plošného spoje. Jádrem je pětice tříkanálových vysokonapěťových zesilovačů LM2422 (na chladiči) ovládaných výstupy vývojového kitu DISCOVERY umístěného zespoda plošného spoje. Napájecí zdroj zde tvoří transformátor o výkonu 150 VA s vinutími 12 a 80 V umístěný do krabičky od PC zdroje.

3. Manipulace s kapičkami



Obrázek 3.9.: Blokové schéma a vstupně výstupní charakteristika obvodu LM2422 převzaté z datasheetu obvodu.

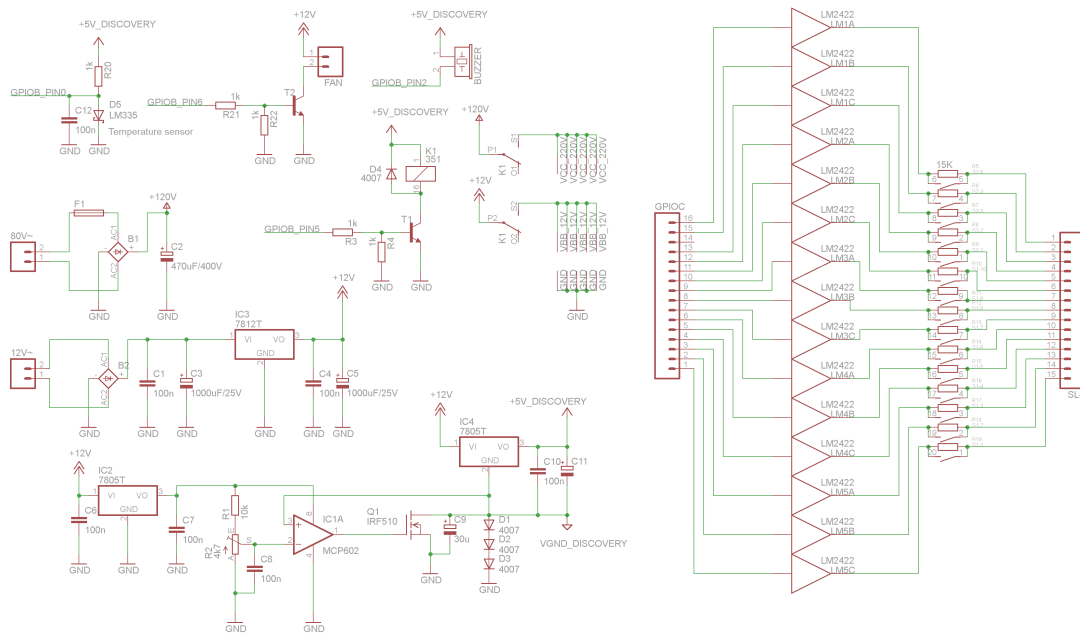
výstupní charakteristika převzaté z datasheetu se nachází na obrázku 3.9. Jak je vidět, zesilovač je invertující s lineární vstupní charakteristikou v rozmezí 1 až 4.5 V. To poměrně dobře odpovídá 3.3 voltové logice DISCOVERY kitu avšak pro využití plného výstupního rozsahu je zapotřebí posunutí nuly. Parametrem obvodu, který je zde nutno vzít v úvahu, je výkonová ztráta. Dle datasheetu může být ztráta každého pouzdra až 22 W. Při použití 5 obvodů pro dosažení celkového počtu 15 kanálů činí tato hodnota plných 110 W. V praxi je výkonová ztráta o mnoho nižší zejména při použití nižších frekvencí. V žádném případě se však nejedná o zanedbatelnou hodnotu a neobejde se bez aktivního chlazení. Z tohoto důvodu je praktické nenechávat obvody zapnuté po dlouhou dobu a odpojovat jejich napájecí napětí v průběhu nečinnosti generátoru.

Mechanická konstrukce generátoru je zobrazena na obrázku 3.8. Vzhledem k jednoduchosti konstrukce byl generátor postaven pouze na destičce univerzálního plošného spoje. Na obrázku je patrný velký chladič s pěticí zesilovačů opatřený teplotním senzorem a ventilátorem. Dále je zde konektor pro zasunutí DISCOVERY kitu nalézající se zespoda plošného spoje a napájecí transformátor umístěný do krabičky od PC zdroje.

Schéma navrženého zapojení se nachází na obrázku 3.10. Celá konstrukce se v zásadě skládá z několika jednoduchých součástí. V první řadě je to napájecí zdroj pro DISCOVERY kit umožňující posunutí nuly. Zapojení je implementováno za pomoci tranzistoru a operačního zesilovače MCP602 ve zpětné vazbě umožňujícího precizní sledování nízkých napětí. Zapojení tří sériových diod na výstupu tranzistoru omezuje maximální posunutí nuly přibližně na 2.1 V.

Druhou částí jsou samotné zesilovače LM2422. Zapojení je v tomto případě zcela jednoduché. Vstupy zesilovačů jsou buzeny přímo digitálními výstupy DIS-

3.3. Návrh platformy pro manipulaci s kapičkami



Obrázek 3.10.: Schéma navrženého generátoru.

COVERY kitu. Vzhledem k tomu, že pro značnou část aplikací není zapotřebí nízké výstupní impedance, jsou výstupy zesilovačů připojeny přes 15 k ochranné rezistory. Tyto rezistory chrání výstupy zesilovačů před náhodným zkratem. V případě potřeby je však možné ochranné rezistory přemostit pomocí mikrosplínačů a dosáhnout tak požadované nízké výstupní impedance potřebné zejména při vysokých frekvencích. Napájecí napětí zesilovačů je připojené přes relé sloužící k jeho odpojení v průběhu nečinnosti generátoru.

Součástí návrhu je i měření teploty chladiče, ovládání ventilátoru a bzučák. Napájecí zdroj je zde tvořen transformátorem o výkonu 150 VA s vinutími 12 a 80 V \sim . Výstupní napětí generátoru při použití tohoto zdroje je fixní o amplitudě přibližně 90 V $_{pp}$.

Návrh firmware

Firmware generátoru byl vytvořen ve vývojovém prostředí Keil 4.71 v programovacím jazyce C. Jeho hlavní úlohou jsou v zásadě tři základní požadavky. V první řadě je tomu komunikace s PC a obsluha USB rozhraní. Dále je to samotné generování signálů pro elektrody a v neposlední řadě kontrola teploty zesilovačů a ovládání ventilátoru.

Komunikační rozhraní bylo navrženo v rámci třídy emulovaného sériového portu. Pro tento účel velice pomohl vzorový kód poskytnutý autorem Martin Thomas [21], ze kterého vyplývá celá obsluha USB rozhraní. Jak již bylo zmí-

něno, třída emulovaného sériového portu poskytuje celou řadu výhod. V první řadě je tomu dostatečně rychlá plně duplexní komunikace bez nutnosti návrhu vlastních ovladačů. Dále je to spolehlivost přenosu a velice snadná univerzální implementace. V rámci této třídy byl poté navržen jednoduchý komunikační protokol, který bude podrobněji rozebrán v následující sekci.

Pro vlastní generování signálů byl využit vnitřní DMA řadič mikroprocesoru, který je schopen sekvenčně zapisovat část paměti na výstupní port, bez nutnosti zatěžování výpočetního jádra. Algoritmus tedy pracuje na bázi tabulky, viz 3.1, která je periodicky kopírována na výstupní port. Vzhledem k 16 možnostem generovaných fází je zapotřebí stejného počtu řádků tabulky, přičemž každý řádek tabulky vyznačuje logickou hodnotu výstupního portu v daném časovém okamžiku. Jednotlivé zápisy DMA jsou periodicky spouštěny za pomoci nastaveného timeru. Algoritmus je tedy zcela nezávislý na běhu procesoru vyjma okamžiku změny výstupních fází, kdy je nutno tuto tabulku jednorázově přepsat.

Z popsaného principu vyplývá, že výstupní frekvence generovaného signálu je odvozena od frekvence spouštěcího timeru vydělené počtem řádků tabulky. Snížením počtu řádků tabulky tedy můžeme dosáhnout vyšší výstupní frekvence, což je v některých případech praktické. Generátor proto obsahuje funkci snížení rozsahu výstupních fází a to na 8 nebo 4 za účelem zvýšení výstupní frekvence. Maximální frekvence 5.25MHz je tedy možné dosáhnout pouze v rozsahu čtyř fází.

Poslední funkcí firmwaru generátoru je ovládání napájecího napětí zesilovačů a řízení ventilátoru na základě teploty chladiče. Z důvodu citlivosti experimentů na vibrace způsobené ventilátorem je zde navržena strategie, která tento vliv omezuje. V případě vypnutých výstupů se ventilátor zapíná při dosažení hranice 40 °C a vypíná při poklesu pod 30 °C. Při zapnutých výstupech a tedy předpokládaném průběhu experimentu se ventilátor zapíná až při 70 °C, přičemž při dosažení 60 °C se zapíná varovný signál upozorňující uživatele krátkými pípnutími, že ventilátor bude brzy spuštěn. Při počáteční teplotě 30 °C poskytuje tato strategie přibližně 10 minut pro nerušený průběh experimentu, což je v naprosté většině případů zcela dostačující.

Běžící ventilátor udrží za běžných podmínek teplotu chladiče přibližně na 50 stupních. V případě poruchy je však implementováno i bezpečnostní odpojení napájecího napětí zesilovačů při překročení 80 °C.

Komunikační protokol

Pro ovládání generátoru přes emulovaný sériový port byl navržen jednoduchý paketový komunikační protokol. Při jeho návrhu bylo dbáno především na účel-

Tabulka 3.1.: Vzorová tabulka pro DMA řadič při generování fázově posunutých signálů. Jednotlivé řádky tabulky jsou sekvenčně zapisovány za pomoci DMA na výstupní port. Sloupce tabulky zde značí časové posloupnosti pro jednotlivé piny procesoru. Nastavené fáze pro jednotlivé kanály generátoru jsou v tomto případě posloupností 0, 1, 2, ... 15.

IO 0	IO 1	IO 2	IO 3	IO 4	IO 5	IO 6	IO 7		IO 15
0	1	1	1	1	1	1	1		0
0	0	1	1	1	1	1	1		0
0	0	0	1	1	1	1	1		0
0	0	0	0	1	1	1	1		0
0	0	0	0	0	1	1	1		0
0	0	0	0	0	0	1	1		0
0	0	0	0	0	0	0	1		0
0	0	0	0	0	0	0	0		1
1	0	0	0	0	0	0	0		1
1	1	0	0	0	0	0	0		1
1	1	1	0	0	0	0	0		1
1	1	1	1	0	0	0	0		1
1	1	1	1	1	0	0	0		1
1	1	1	1	1	1	0	0		1
1	1	1	1	1	1	1	0		1
1	1	1	1	1	1	1	1		0

nost a spolehlivost komunikace. Protokol je navržen tak, že komunikaci vždy zahajuje počítač zasláním řídicího paketu. Na tento příkaz generátor odpovídá buďto potvrzující nebo chybovou zprávou. Obousměrná komunikace je zde nezbytná pro zajištění spolehlivosti a snadného ladění.

Z důvodu použití generátoru pro řízení v reálném čase, může čekání na každou odpověď generátoru znamenat snížení propustnosti komunikačního kanálu a omezení maximální řídicí frekvence. Protokol byl proto navržen tak, aby odpověď generátoru mohla být buď zcela ignorována, nebo vyhodnocována dodatečně. Každý řídicí paket proto obsahuje pořadové číslo, které je promítnuto do odpovědi generátoru. Při zpětném vyhodnocení je proto každá odpověď generátoru jednoznačně přiřazena ke svému zdrojovému příkazu.

Navržená struktura komunikačního protokolu je zobrazena v tabulce 3.2 a 3.3. Každý paket zde začíná startovacím znakem “P” následovaný binárním pořadovým číslem a textovým identifikátorem typu příkazu. Každý příkaz má dále přednastavené množství binárních dat v rozmezí od 0 do 16 bytů dle typu příkazu. Paket je zakončen textovým řetězcem “CRC” a kontrolním součtem tvořeným jednoduchým sečtením jednotlivých bytů příkazu s přetékáním. Kontrolní součet je zde spíše z implementačního hlediska nežli pro zabezpečení přenosu, neboť komunikace po USB je vybavena vlastním CRC. Chybný kontrolní součet upozorňuje na chyby v implementaci v průběhu ladění a například zabraňuje vykonání příkazu s nesprávným množstvím dat.

Generátor podporuje celkem 5 jednoduchých příkazů, kterými jsou vypnutí a zapnutí výstupů, nastavení výstupní frekvence, nastavení počtu generovaných fází a nastavení fázového posuvu generovaných signálů, jak je vidět v tabulce 3.2. Příkazy “WAKE” a “SHDN” slouží k vypnutí a zapnutí výstupů generátoru ovládáním napájecího napětí výstupních zesilovačů. Příkaz “FREQ” nastavuje výstupní frekvenci a je následován 16-bitovým číslem pro nastavení periody timeru spouštějícího DMA přenos. Základní frekvence procesoru je v tomto případě 168 MHz. Pro dosažení výstupního kmitočtu je tato hodnota dělena zmíněnou periodou timeru a dále počtem generovaných fází. Vzhledem k tomu, že i DMA přenos má jistá omezení, je nejnižší možná hodnota periody timeru 8. Při minimálním rozsahu 4 generovaných fází odpovídá tato hodnota již výše zmíněné maximální frekvenci 5.25 MHz.

Dalším příkazem v pořadí je “PHSN”, který nastavuje rozsah generovaných fází. Textový identifikátor je zde následován jedním bytem dat. Podporované jsou však pouze tři hodnoty a to 16, 8 a 4. Jak již bylo zmíněno, tato funkce byla implementována pro dosažení vyšších frekvencí. Rozsah generovaných fází je transparentní pro nastavení fázového posuvu. V případě nižšího rozsahu jsou pouze ignorovány nejnižší bity nastavené hodnoty. Ovlivněna je ale maximální frekvence. Generátor však tuto závislost kontroluje a při pokusu o nastavení

Tabulka 3.2.: Struktura implementovaného paketového protokolu: tabulka příkazů pro řízení generátoru.

Start. znak	Pořadové číslo	Příkaz	Binární data	CRC	Kontrolní součet	Funkce příkazu
'P'	1 byte	'DATA'	16 bytes	'CRC'	1 byte	nastaví fáze
'P'	1 byte	'FREQ'	2 bytes	'CRC'	1 byte	nastaví frekvenci
'P'	1 byte	'SHDN'		'CRC'	1 byte	vypne výstupy
'P'	1 byte	'WAKE'		'CRC'	1 byte	zapne výstupy
'P'	1 byte	'PHSN'	1 byte	'CRC'	1 byte	počet fází

nepodporované hodnoty je vrácena chybová hláška.

Posledním implementovaným příkazem je příkaz “DATA”. Tento příkaz je používán při samotné manipulaci pro nastavení fázových posuvů. Argumentem příkazu je 16 bytů dat. Při současné implementaci je zapotřebí pouze 8 bytů (4 bity pro každý kanál). Komunikační protokol byl však navržen pro možné rozšíření počtu kanálů na 32.

Druhou polovinou komunikačního protokolu jsou potvrzovací nebo chybové pakety, kterými generátor odpovídá na přijaté příkazy. Implementované odpovědi jsou zobrazeny v tabulce 3.3. Každý řídicí paket zde má přidruženou svou potvrzovací variantu, kterou generátor dává najevo, že byl příkaz úspěšně vykonán. Spravována je však i celá řada chyb. Nejobecnější chybou je nerozpoznaný příkaz tedy “ER_CMD”. Tato zpráva je generována v případě nerozpoznaného textového identifikátoru příkazu. Dále to může být chybný kontrolní součet “ER_CRC”, či nesouslednost v pořadových číslech paketů “ER_SQN” upozorňující na možné vypadnutí paketu. Nutno dodat, že v případě nesousledného pořadového čísla je chybová zpráva spíše varováním, neboť příkaz je vykonán i v případě této chyby. Generátor v tomto případě vrací dvě odpovědi a to potvrzení o vykonání příkazu a chybovou hlášku nesousledného pořadového čísla. Poslední chybou, kterou generátor rozpoznává, je zadání nepodporované hodnoty počtu generovaných fází či příliš vysoké frekvence. Tyto dvě hodnoty se vzájemně ovlivňují. Maximální frekvence není možno dosáhnout při plném rozsahu 16 generovaných fází a obdobě při použití maximální frekvence nelze nastavit plný fázový rozsah. Obě tyto závislosti jsou však kontrolovány a nepodporovanou hodnotu není možné zadat. Maximální dovolené hodnoty se nachází v tabulce 3.4.

3. Manipulace s kapičkami

Tabulka 3.3.: Struktura odpovědí generátoru. Každý řídicí příkaz má přiřazenu odpověď potvrzující vykonání daného příkazu. V případě neshody vrací generátor jednu z chybových hlášek.

Start. znak	Pořadové číslo	Příkaz	Data příkazu	CRC	Kontrolní součet
'P'	1 byte	'DATAOK'		'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'FRQSET'	2 byte nastavené děličky	'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'SHDNOK'		'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'WAKEOK'		'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'PHSNOK'		'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'ER_CRC'	' Check sum error!'	'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'ER_CMD'	' CMD not recognised!'	'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'ER_SQN'	' SQN discontinuity!'	'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'ER_FRQ'	' Unsupported frequency!'	'CRC'	1 byte
'P'	1 byte	'ER_PHS'	' Unsupported Phase!'	'CRC'	1 byte

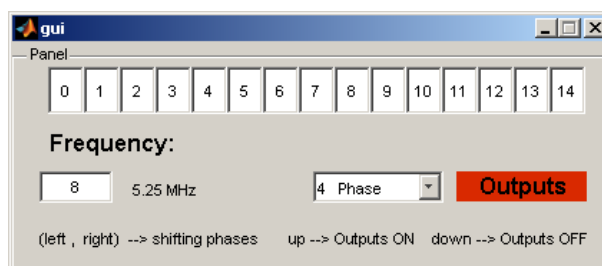
Tabulka 3.4.: Maximální možná frekvence pro daný fázový rozsah.

Fázový rozsah	Minimální dělitel	Maximální výstupní frekvence
4	8	5.25 MHz
8	16	2.625 MHz
16	32	1.31 MHz

Vzorová ovládací aplikace

Pro účely úvodního testování, ale také jako ukázková aplikace umožňující snadné manuální ovládání generátoru, bylo navrženo jednoduché grafické rozhraní v prostředí Matlab. Navržená aplikace je zobrazena na obrázku 3.11. Tato aplikace umožňuje ovládání veškerých funkcí generátoru za pomoci několika ovládacích prvků a klávesnice. Řádek textových polí slouží k zadání fází pro jednotlivé kanály. Celou touto sekvencí lze dále rotovat za pomoci šipek klávesnice, což je velice praktické při jednoduchém testování manipulace. Číslo zadávané do textového pole pro nastavení frekvence představuje dělicí poměr k základnímu kmitočtu, který v tomto případě odpovídá 42 MHz. Nastavení fázového rozsahu je pro frekvenci transparentní, pouze omezuje její maximální hodnotu. Výsledná frekvence je indikována ve vedlejším textovém poli.

Současně s návrhem aplikace bylo provedeno i testování propustnosti komuni-



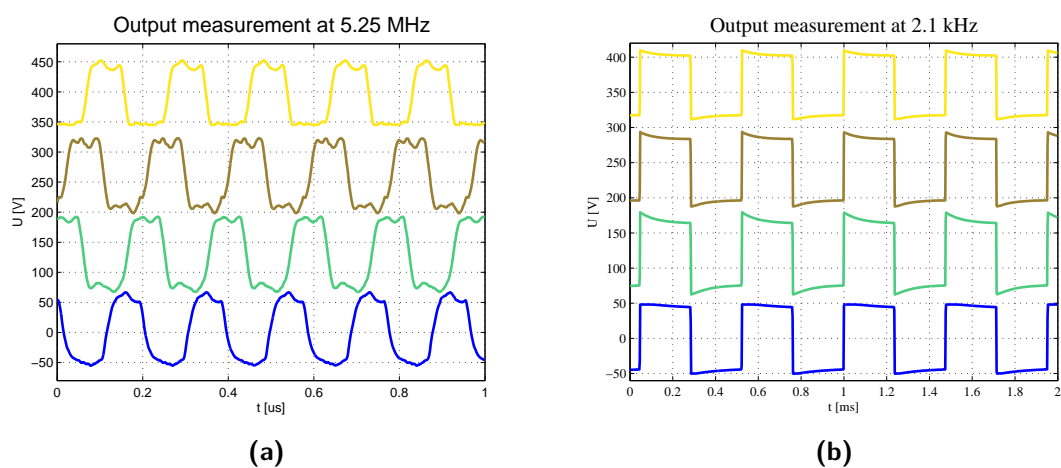
Obrázek 3.11.: Vzorová grafická aplikace pro řízení generátoru navržená v prostředí Matlab. Tato aplikace dovoluje ovládat všechny funkce generátoru a umožňuje snadné manuální ovládání.

kačního kanálu mezi generátorem a počítačem. Testován zde byl časový interval mezi odesláním řídicího paketu a přijetím odpovědi generátoru. Pro účely měření byl použit velmi jednoduchý skript v prostředí Matlab bez podpory real-time běhu. Výsledkem tohoto experimentu byla průměrná doba odezvy 0.02 s tedy opakovací frekvence přibližně 50 Hz. Tato hodnota je více než dostatečná pro všechny naše dosavadní aplikace. Pro jakoukoliv budoucí řídicí aplikaci je proto doporučeno kontrolovat odezvu generátoru po každém odeslání příkazu stejně, jako je tomu v aplikaci vzorové.

Měření výstupního signálu generátoru

Při ožívování celé konstrukce generátoru bylo provedeno i jednoduché měření výstupního signálu. Obrázek 3.12 zobrazuje dva případy pro nízkou a vysokou frekvenci. Z obrázku je patrné, že výstupy kanálů nejsou zcela symetrické a každý kanál má trochu odlišný průběh. Z ohledu naší aplikace však tyto drobné odchylky nehrají přílišnou roli. Rozdíly ve středních hodnotách signálů se neprojeví, díky izolační vrstvě elektrod filtrující stejnosměrnou složku, a odchylka v efektivní hodnotě nečiní více než 3 %. Na obrázku 3.12b je dále patrný dynamický pokles amplitudy při každé půlperiodě signálu. Pravděpodobným důvodem tohoto jevu je, že jsou zesilovače impedančně přizpůsobeny pro vyšší frekvence a při nízkých frekvencích se dynamika tohoto přizpůsobení projevuje zmíněným poklesem amplitudy. Pro účely manipulace však tento jev opět nepředstavuje výraznou potíž, neboť je na všech kanálech téměř symetrický a na manipulaci se projevuje pouze rozdíl mezi kanály.

3. Manipulace s kapičkami



Obrázek 3.12.: Měření výstupního signálu generátoru: (a) maximální generovaná frekvence $f=5.25$ MHz, kanály jsou oproti sobě posunuty o 90° , (b) měření při nízké frekvenci bez fázového posuvu. Na průběhu signálu je patrný dynamický pokles amplitudy při každé periodě signálu. Pravděpodobnou příčinou je zde impedanční přizpůsobení zesilovače pro vyšší frekvence.

4. Závěr

4.1. Návrh manipulačního algoritmu pro čtyřsektorové pole

Výsledkem této diplomové práce je celá řada praktických přínosů. V první části práce, v rámci individuálního projektu, proběhl návrh a zprovoznění 2D manipulace za pomoci dielektroforézy na čtyřsektorovém elektrodovém poli. V tomto případě se jedná o manipulaci v silovém poli vyvolaném velkým množstvím diskrétních aktuátorů (48 elektrod).

Optimalizace silového pole s takto vysokým počtem aktuátorů je obecně náročný problém vyžadující velké množství strojového času. Navíc je dielektroforetická síla nelineární a neplatí zde princip superpozice. Pro řízení v reálném čase proto může být praktičtější využití diskrétní abecedy přednastavených fázových vzorů se známými silovými účinky. Tato abeceda ve spojení s jednoduchým plánováním trajektorií poté umožňuje efektivní manipulaci v celé aktivní oblasti elektrodového pole.

Zmíněná úloha byla vyřešena v rámci této práce. Byla navržena abeceda 137 fázových vzorů a manipulační prostor byl diskretizován do tvaru šachovnice o velikosti 23×23 polí. Za pomoci těchto dvou principů byl dále navrhnut řídicí algoritmus, který zajišťuje současné plánování trajektorie a řízení objektu v reálném čase.

Algoritmus je navržen tak, že optimalizace trajektorie je explicitně předpočítána pro celý manipulační prostor, přičemž ukládán je pouze první krok každé trajektorie. Řídicí algoritmus běžící v reálném čase poté pouze vybírá příslušné hodnoty z předpočítané tabulky a může běžet na velmi vysoké frekvenci omezené pouze rychlostí vyhodnocení polohy objektu. Strategie řízení je tedy variantou explicitního MPC.

Demonstrována byla úspěšná manipulace s jedním objektem v rámci celé manipulační oblasti čtyřsektorového pole, ale i paralelní manipulace se dvěma objekty a jejich vzájemné přivedení k sobě. Tento princip otevírá cestu k jednoduché a levné bezkontaktní mikromanipulaci pro technologie typu lab-on-chip či pro výrobu digitální mikrofluidiky. Manipulace zde může dosahovat mimořádné přesnosti díky možnosti vyvolat stabilní equilibrium ve fyzikálním silovém poli.

4.2. Manipulace s vodními kapičkami

Druhá část této práce probíhající v závěrečném semestru se zabývá manipulací s vodními kapičkami v oleji za pomoci dielektroforézy. Hlavním výsledkem této fáze je samotná demonstrace manipulačního principu na testovací platformě, tedy schopnost vyvolat dostatečnou sílu pro samotnou manipulaci. Dalšími dílčími výsledky jsou návrh vysokonapěťového generátoru a mikrofluidického manipulačního čipu, které jsou základními stavebními kameny pro budoucí manipulační platformu.

Navržený generátor je schopen ovládat 15 elektrod při napětí až do výše 200 V a frekvence do 5.25 MHz. Komunikace s PC je zajištěna pomocí USB rozhraní, v rámci kterého je emulován sériový port. Součástí návrhu je i jednoduchý komunikační protokol zajišťující spolehlivou komunikaci díky ověřování vykonaných příkazů generátoru a kontrole posloupnosti paketů. Komunikace zároveň dosahuje dostatečně rychlé odezvy nutné pro řízení v reálném čase.

Mikrofluidický manipulační čip byl navržen s cílem integrovat elektrodové pole, manipulační komůrku, i generátor kapiček na jeden jediný uzavřený čip. Jako vhodný materiál byl po sérii experimentů zvolen fotorezist SU-8. Mikrofluidická část je navržena pro výrobu přímo na elektrodovém poli ve vrstvě fotorezistu uzavřená ITO sklíčkem s vyvrtanými otvory pro vstupní kapiláry.

Funkční prototyp manipulačního čipu se v průběhu této práce bohužel nepodařilo vyrobit. Důvodem byly technické nedostatky při uzavírání celé platformy a nedostatek času. Zpětnovazební manipulaci s kapičkami která byla cílem této práce se tedy bohužel nepodařilo ověřit.

Navržený koncept manipulace je však podložen předchozími úspěšnými experimenty na testovací platformě a s vysokou pravděpodobností se jej v budoucnu podaří dokončit. Jeho potenciál je nejen v konkrétní aplikaci diagnózy rakovinných buněk, ale i v mnoha dalších odvětvích jako je kombinatorická chemie, či tvorba umělých buněk.

Na rozdíl od hojně rozšířené technologie elektrowettingu, používané pro manipulaci s kapičkami, přináší náš přístup využívající dielektroforézy celou řadu odlišností. V první řadě jde o objemovou nikoliv povrchovou sílu. Manipulované kapičky tedy nemusí být v přímém kontaktu s povrchem pole a mohou být řádově menší. Výhodou je i použití inertního oleje zabraňujícího vysychání kapiček, který v případě elektrowettingu obvykle není přítomný.

Vyvíjená technologie tedy nabízí nový originální způsob manipulace s kapičkami nacházející potenciální využití v širokém spektru oblastí. K manipulaci je zapotřebí pouze jednoduchých planárních elektrodových polí, které mohou být vyrobené i na plastové fólii. Výsledkem tedy mohou být levné jednorázově použitelné diagnostické čipy k analýze rakovinných buněk, ale i komplexní a uni-

verzální nástroje pro kombinatorickou chemii umožňující provádět tisíce izolovaných chemických analýz při vyšší propustnosti a nižším množstvím výchozích látek než při konvenčně používaných metodách.

Literatura

- [1] A. D. Griffiths and D. S. Tawfik, “Miniaturising the laboratory in emulsion droplets,” *Trends in Biotechnology*, vol. 24, pp. 395–402, Sept. 2006.
- [2] D. S. Tawfik and A. D. Griffiths, “Man-made cell-like compartments for molecular evolution,” *Nature Biotechnology*, vol. 16, no. 7, pp. 652–656, 1998.
- [3] D. E. Hughes and W. L. Nyborg, “Cell Disruption by Ultrasound Streaming and other activity around sonically induced bubbles is a cause of damage to living cells,” *Science*, vol. 138, pp. 108–114, Dec. 1962.
- [4] M. Takinoue and S. Takeuchi, “Droplet microfluidics for the study of artificial cells,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 400, pp. 1705–1716, June 2011.
- [5] H. Aoki, H. Kurita, K. Takashima, T. Paillat, and A. Mizuno, “Generation of Water Droplet in Fluorocarbon Using Electrostatic Atomization,” in *2010 IEEE Industry Applications Society Annual Meeting (IAS)*, pp. 1–4, 2010.
- [6] E. Basova, J. Drs, J. Zemanek, Z. Hurak, and F. Foret, “Integrated Microfluidic Device for Droplet Manipulation,” *Chemické Listy*, vol. 107, pp. S291–S293, 2013. WOS:000328730800003.
- [7] A. Ramos, ed., *Electrokinetics and Electrohydrodynamics in Microsystems*. Vienna: Springer Vienna, 2011.
- [8] S. K. Cho, H. Moon, and C.-J. Kim, “Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits,” *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 12, no. 1, pp. 70–80, 2003.
- [9] M. P. Hughes, *Nanoelectromechanics in Engineering and Biology*. CRC Press, Oct. 2002.

- [10] M. Kharboutly and M. Gauthier, “High speed closed loop control of a dielectrophoresis-based system,” in *2013 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA)*, pp. 1446–1451, May 2013.
- [11] P. R. C. Gascoyne, X.-B. Wang, Y. Huang, and F. Becker, “Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood,” *IEEE Transactions on Industry Applications*, vol. 33, pp. 670–678, May 1997.
- [12] I.-F. Cheng, H.-C. Chang, D. Hou, and H.-C. Chang, “An integrated dielectrophoretic chip for continuous bioparticle filtering, focusing, sorting, trapping, and detecting,” *Biomicrofluidics*, vol. 1, p. 021503, May 2007.
- [13] T. B. Jones, *Electromechanics of Particles*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press, Sept. 2005.
- [14] J. Zemánek, “Noncontact parallel manipulation with micro- and mesoscale objects using dielectrophoresis,” Master’s thesis, CTU in Prague, Faculty of Electrical Engineering, Czech Republic, 2009.
- [15] J. Drs, “Čtyřsektorové elektrodové pole pro dielektroforézu,” bachelor thesis, CTU in Prague, Faculty of Electrical Engineering, Czech Republic, 2012.
- [16] J. Zemanek, J. Drs, and Z. Hurak, “Dielectrophoretic actuation strategy for micromanipulation along complex trajectories,” in *2014 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM)*, pp. 19–25, July 2014.
- [17] N.-C. Chen, C.-H. Chen, M.-K. Chen, L.-S. Jang, and M.-H. Wang, “Single-cell trapping and impedance measurement utilizing dielectrophoresis in a parallel-plate microfluidic device,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 190, pp. 570–577, Jan. 2014.
- [18] M. Cha, J. Yoo, and J. Lee, “Bacterial cell manipulation by dielectrophoresis on a hydrophobic guide structure,” *Electrochemistry Communications*, vol. 13, pp. 600–604, June 2011.
- [19] J. Voldman, “Dielectrophoretic Traps for Cell Manipulation,” in *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology* (M. Ferrari, R. Bashir, and S. Wereley, eds.), pp. 159–186, Springer US, Jan. 2007.
- [20] P. Svasek, E. Svasek, B. Lendl, and M. Vellekoop, “Fabrication of miniaturized fluidic devices using SU-8 based lithography and low temperature

wafer bonding,” *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 115, pp. 591–599, Sept. 2004.

- [21] Martin Thomas, “ARMv7 Cortex M3 and Cortex M4 examples and source-code.” http://siwawi.bauing.uni-kl.de/avr_projects/arm_projects/index_cortex.html.

A. Výrobní postupy vyzkoušené v rámci této práce

A.1. Výroba mikrofluidických systémů z PDMS

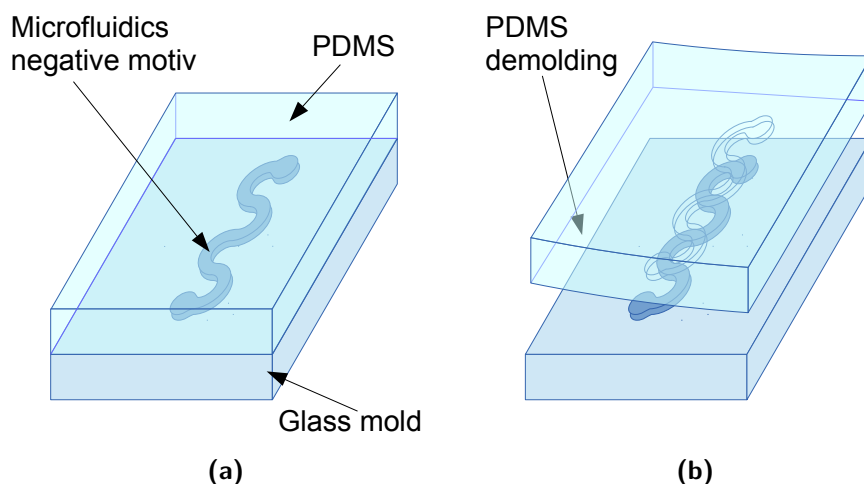
PDMS (Polydimethylsiloxan) je polymer na bázi silikonu používaný hojně pro výrobu mikrofluidických systémů. Jde o dvousložkovou čirou elastickou odlévací hmotu s hmotnostním poměrem obou složek 1:10. Tento poměr je nutné co nej přesněji dodržet a obě látky velmi dobře promíchat. Při míchání obvykle dochází k vytvoření velkého množství nežádoucích bublinek. Nejjednodušší způsob, jak se bublinek zbavit, je jednoduše počkat. PDMS se za pokojové teploty vytvrzuje velmi pomalu (až 48 hod). Je proto možné nechat PDMS po promíchání několik hodin odstát. Tento způsob však není stoprocentní a lze ho řádově zlepšit umístěním PDMS do vakuové komory. To má za následek, že i nejmenší vzduchové bublinky se nafouknou do velkých rozměrů a daleko snáze vyplouvají na hladinu a praskají.

PDMS se obvykle odlévá do forem, které mohou být buďto vyleptány ve skle nebo vyrobeny z vrstvy SU-8, jak je vidět na obrázku A.1. Jak již bylo zmíněno, za pokojové teploty se PDMS vytvrzuje velice dlouho. Tento proces však lze zkrátit přibližně na 10 min ohřátím na 150 °C.

Plazmová aktivace povrchu

Díky odlévání na skleněný povrch má výsledný odlitek velice dobrou přilnavost na hladké typy povrchů. Pro mnoho aplikací je proto možné pouhé přiložení odlitku na skleněný povrch nebo na druhý díl PDMS a přirozená přilnavost materiálu zajistí dostatečnou adhezi. Tohoto postupu využíváme například při lepení bazének na elektrodová pole.

Existuje však způsob, jak oba díly neoddělitelně propojit a to pomocí plazmové aktivace povrchu. Za tímto účelem máme vyrobenou improvizovanou plazmovou tužku upravenou ze zdroje pro plazmovou kouli. Nejde o nic jiného než o hrotovou elektrodu, na kterou je přiváděno vysokofrekvenční napětí několika kilovolt. Při přiblížení této tužky k povrchu skla a nebo PDMS dojde k zapálení



Obrázek A.1.: Odlévání PDMS do formy. Forma může být přímo vyleptána ve skle nebo vytvořena ve vrstvě SU-8 na skle.

malého plazmového výboje. Interakcí výboje s látkou dochází k tzv. plazmové aktivaci povrchu. Takto ošetřený povrch má vyšší povrchovou energii a tedy i vyšší smáčivost díky tzv. otevřeným povrchovým vazbám. Po přiložení dvou takto aktivovaných částí PDMS případně PDMS na sklo a ohřátí na 80 °C dochází k chemickému provázání obou povrchů a velice pevnému spojení. Takto vytvořená vazba PDMS na skle je dokonce silnější než pevnost samotného materiálu. Při pokusu o mechanické oddělení dochází k vytrhávání částí materiálu přilepených na sklo.

A.2. Spincoating na katedře řídicí techniky

V průběhu této práce došlo k zapojení spincoateru v laboratoři za strojovnou KN:E-s109 umožňujícího nanášení tenkých vrstev přímo na našem pracovišti. Spincoater potřebuje pro svůj provoz přívod stlačeného vzduchu, který byl připojen na kompresor od laboratorního modelu “míčky”. Kompresor se zapíná vypínačem ve vedlejší místnosti s frézkou poblíž radiátoru, kde je také umístěn uzávěr stlačeného vzduchu. Provozní tlak je nastaven na 5 barů.

Spincoater využívá stlačeného vzduchu jednak pro profuk osy otáčení, aby nemohlo docházet ke kontaminaci vnitřních částí spincoateru, a jednak pro generování vakua pro přídržnou přísavku za pomoci Venturiho efektu. Jak profuk, tak Venturiho vývěva mají oddělené přípojky stlačeného vzduchu o tlaku 4 až 5 barů. Oba tyto tlaky, stejně jako hodnota dosaženého vakua, musí splňovat

požadované minimální hodnoty, aby bylo možné spincoater spustit.

Typický cyklus spincoatování sestává z následujících kroků:

- 1) Přípravení waferu na přídržnou přísavku a zapnutí vakua.
- 2) Nanesení požadované sloučeniny na wafer přímým nalitím nebo sprejováním.
- 3) Rozprostření sloučeniny po celém povrchu waferu při nízkých otáčkách typicky 30 s při 1000 rpm.
- 4) Ztenčení vrstvy na požadovanou tloušťku při vysokých otáčkách - otáčky a čas je třeba zjistit z datasheetu příslušné sloučeniny.
- 5) Krátké zvýšení otáček na velmi vysokou hodnotu pro odstředění přebytku chemikálie hromadícího se na kraji waferu 5 s při 6000 rpm.
- 6) V našem případě je nezbytné okamžitě po spincoatování umístit wafer do čisté petriho misky pro zamezení usedání prachových částic na čerstvý povrch.
- 7) Nanesenou vrstvu je obvykle nutné nechat zaschnout typicky při zvýšené teplotě cca 60 °C.

Čas od času je potřeba spincoater vyčistit od zbytků chemikálií. Jednoduchým trikem značně usnadňujícím tuto činnost je vyložení vnitřku spincoateru alobalovou fólií, která zachytí většinu nečistot a čas od času ji vyměnit.

A.3. Fotorezist SU-8

SU-8 je negativní fotorezist na bázi epoxidové pryskyřice určený pro nanášení různě silných vrstev za pomoci spincoatování. Tento proces je teoreticky možné používat u nás v laboratoři. SU-8 je dostupné v celé řadě ředění, takže lze dosáhnout vrstev o síle od jednotek až po stovky mikrometrů. Parametry pro dosažení konkrétních hodnot je třeba dohledat v příslušných datasheetech.

Proces přípravy fotorezistu obnáší několik zapékacích kroků. Vzhledem k tomu, že je vrstva fotorezistu citlivá na teplotní šoky (roste vnitřní napětí), probíhá zapékání vždy ve dvou krocích (při 65 a 95 °C). Vzhledem k tomu, že již máme k dispozici dvě laboratorní ploténky, je praktické rozehřát obě dvě na zmíněné teploty a poté pouze, přesouvat vzorek z chladnější na teplejší ploténkou. Vždy je třeba použití ochranné hliníkové fólie, neboť SU-8 je velmi lepivá a těžko omývatelná sloučenina.

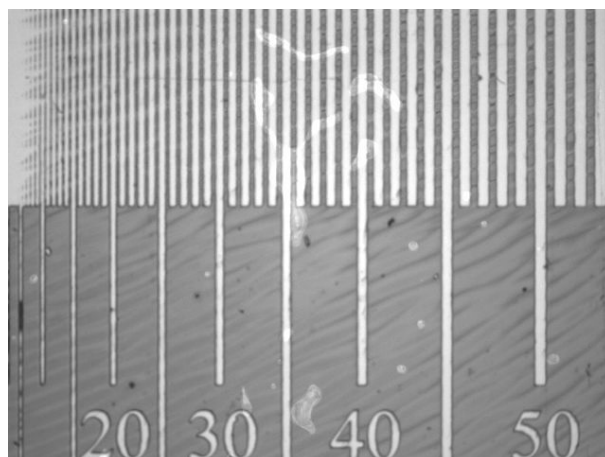
Výrobní postup SU-8 sestává z následujících kroků:

- 1) Přípravení waferu na přídržnou přísavku spincoateru a zapnutí vakua.
- 2) Nalítí SU-8 na substrát. Zde se nejvíce osvědčilo nalévat fotorezist přímo z láhve a nepokoušet se o pipetování, neboť to obvykle vede k tvorbě bublinek. Fotorezist se nalévá doprostřed waferu tak, aby výsledná kapka byla asi velikosti desetikoruny.
- 3) Spincoating - patřičný program je třeba dohledat v datasheetu pro danou viskozitu a požadovanou sílu vrstvy.
- 4) Soft Bake - Po nanesení vrstvy následuje její zapékání. Časy zapékání je opět nutné dohledat v datasheetu.
- 5) Exposure - Fotorezist je dále osvětlen UV zářením přes masku. SU-8 je negativní fotorezist a osvětlená místa se vytvrdí a neosvětlená budou později rozpuštěna. V naší laboratoři byla vyzkoušena doba osvitu na 8 min. ze 4 centimetrové vzdálenosti od UV zářivky. Tato hodnota platí pro sílu vrstvy 40 μm .
- 6) Post Bake - Po osvětlení je třeba fotorezist opět zapéct, aby došlo k vytvrzení “cross-link” osvětlených oblastí. Časy, viz datasheet.
- 7) Develop - SU-8 má speciální vývojku na bázi acetonového rozpouštědla (nikoliv aceton). Časy pro konkrétní síly vrstvy je opět možné dohledat v datasheetu, ale jednodušší je proces kontrolovat vizuálně.
- 8) Hard Bake - Na závěr procesu je možné provést finální zapečení při 150 až 200 °C. Tento krok zvyšuje mechanickou a chemickou odolnost výsledného motivu, ale je možné tento krok i vynechat.

Další vlastností fotorezistu SU-8 je možnost slepení dvou vrstev za účelem uzavření mikrofluidického systému. To se provádí tím způsobem, že se obě vrstvy přitisknou k sobě a zahřejí na přibližně 150 °C. Při této teplotě fotorezist mírně změkne a dojde ke spojení obou vrstev. Je třeba však dávat pozor, aby nedošlo k zalepení i mikrofluidického systému. Doporučuji proto přitisknout obě vrstvy za pomoci tabulky skla a po celou dobu proces vizuálně kontrolovat.

A.4. Vrtání do skla

Vrtání do skla je možné provádět na CNC frézce za pomoci tvrdokovového vrtáku určeného pro tento účel. **Vrtání je nutné provádět pod vodou.** Vody přitom nemusí být moc. Stačí v místě vrtání nanést větší kapku vody a vrtat



Obrázek A.2.: Testovací vzor vyleptaný do vrstvy ITO na plastové fólii. Zobrazený vzor je posloupností čar o síle od 1 do 60 μm s krokem 1 μm . Čísla v dolní části zobrazují řády hodnot.

v jejím objemu. Osvědčené nastavení frézky pro tento účel je 10.000 ot/min při 0.05 mm/sec (frézka se pomaleji pohybovat neumí).

Praktické je nevrtnat otvor skrz, ale pouze do 3/4 síly materiálu. Zbylou vrstvu skla je poté možné prorazit jehlou ze strany vrtání. V tomto případě je vyštípnutá část skla daleko menší, než při vrtání skrz celou tloušťku.

A.5. Výroba elektrodových polí na ITO fólii

Efektivní metodou výroby elektrodových polí, kterou je možné provádět přímo na našem pracovišti, je použití plastové PET (Poly-ethylene terephthalate) fólie s připravenou průhlednou vodivou vrstvou ITO jako polotovaru. Výrobní postup je velice podobný jako při výrobě plošných spojů. Používá se stejný typ fotorezistu a leptání vrstvy probíhá ve slabé kyselině chlorovodíkové. Dosažená přesnost metody za použití skleněné litografické masky s motivem ve vrstvě chromu je přibližně $\pm 5 \mu\text{m}$. Testovací vzor demonstrující možnosti popsané metody je zobrazen na obrázku A.2

Osvědčený postup výroby těchto polí je následující:

- 1) Ustříhnutí části folie s vodivou ITO vrstvou o požadované velikosti. Je třeba přitom fólii příliš neohýbat, neboť vrstva ITO je poměrně křehká.
- 2) Nalepení fólie na skleněný substrát. Tento krok je nutný kvůli spincoatování fotorezistu, neboť samotná fólie by se vlivem přísavného vakua zdeformovala. K přilepení se osvědčilo použití parafilmu ohřátého na 50 °C.

- 3) Nanesení vrstvy fotorezistu. Je možné použít běžný fotorezist pro výrobu plošných spojů POSITIV nebo typ ma-P 1225. Vodivá ITO vrstva je chráněna tenkou plastovou fólií, kterou je nutno před nanášením odstranit. Fotorezist je nanesen sprejováním nebo pipetováním v souvislé vrstvě pokrývající celou plochu fólie.
- 4) Spincoatování vrstvy - program 4 (600 rpm/30 s, 3000 rpm/30 s).
- 5) Zasychání fotorezistu při 50 °C po dobu 45 – 60 min. Vrstvu je třeba přikrýt petriho miskou kvůli ochraně před prachem.
- 6) Osvícení fotorezistu přes masku elektrod. Osvědčená doba osvitů je 4 minuty ze vzdálenost 4 centimetrů od UV zářivky.
- 7) Osvícený motiv je vyvolán ve vývojce tvořené 0.7% roztok NaOH (v případě ma-P 1225 je roztok 0.3%). Při vyvíjení roztokem mírně mícháme a proces ukončujeme, když je negativní motiv elektrod zcela rozpuštěný. Vývojku je vhodné používat vždy pouze jednou.
- 8) Leptání ITO vrstvy v 5% kyselině chlorovodíkové. Doba leptání je zde 80 s. V případě opakovaného použití kyseliny se může čas leptání mírně prodlužovat.
- 9) Rozpuštění zbylého fotorezistu v isopropylalkoholu.

A.6. Leptání do skla

Leptání do skla se provádí převážně za účelem výroby formy pro odlévání PDMS. Polotovarem pro výrobu je litografická maska od firmy Nanofilm. Jde o skleněnou destičku s připravenou vrstvou chromu a fotorezistu. Tento proces však není možné provádět na našem pracovišti.

Postup je následující:

- 1) Fotorezist se osvítí na litografu.
- 2) Vývoj fotorezistu ve vývojce doporučené výrobcem.
- 3) Leptání chromu. Leptadlo na chrom se nevytláčí, neboť po vyčerpání je možné jej opět “oživit”.
- 4) Umytí zbytku fotorezistu v acetonu.

- 5) Leptání skla v roztoku kyseliny Fluorovodíkové (HF) a chlorovodíkové (HCl). Zadní strana skla se přelepí lepicí páskou aby nedocházelo ke zbytečnému leptání a vyčerpávání roztoku. Pro leptání je vhodné použít teflonovou misku. **Pozor fluorovodík - HF je jedna z nejnebezpečnějších chemikálií, se kterou je možné přijít do styku. Vdechování výparů a styk s kůží mohou vést k vážným zdravotním problémům. Vždy je třeba používat ochranné rukavice (nejlépe dva páry) a vždy pracovat pouze v laboratorní digestoři.** Doba leptání skla je typicky velmi dlouhá v řádu desítek mikrometrů za hodinu. Konkrétní časy je třeba dohledat pro příslušnou koncentraci leptadla.
- 6) Odleptání zbylého chromu.

A.7. Hydrofobní teflonová vrstva

Pro dosažení vysoce nesmáčivého povrchu je možné na skleněný, ale i jiný povrch, nanést tenkou teflonovou vrstvu. Proces je poměrně snadný. Na požadovaný povrch se nanese vrstva vodní teflonové emulze a to buď spincoatováním, nebo prostým namočením. Tato vrstva se následně zapéká při 300 – 350 °C. Vrstva při zapékání pozvolna ztrácí mléčnou barvu a stává se zcela čirou. V momentě, kdy je čirý celý povrch zapékání můžeme ukončit.