

新型低溫顯微鏡之研製與性能測試

李柏廷¹ 楊江益^{1*}

1. 國立宜蘭大學生物機電工程學系

摘要

低溫顯微鏡系統是藉由軟體整合一個能控制溫度恆定以及升溫、降溫速率的冷凍台座，結合顯微鏡及影像輸出設備所構成的系統。傳統的低溫顯微鏡以液態氮進行系統的升溫及降溫控制。然而，高價位以及大體積使得傳統的低溫顯微鏡無法被廣泛地使用。本研究以控制熱電致冷晶片的表面溫度取代傳統的液態氮流體控制，研製的系統具有輕巧、安裝及操作維護容易、溫度控制精準及價格便宜等優點。目前研發的系統，可以準確地在每秒等速下降 0.5°C/sec 至 3°C/sec 的範圍內進行等速率降溫控制；而恆溫控制的結果，其與設定溫度的誤差皆控制在 0.5°C 以內。經以豐年蝦卵進行系統整合測試，結果發現應用本系統進行細胞內凍結特性之研究為可行。

【關鍵詞】低溫顯微鏡，熱電致冷晶片

Development and Performance Test of a Novel Cryomicroscope

Po-Ting Lee¹ Chiang-Yi Yang^{1*}

1. Department of Bio-Mechatronics Engineering, National I-Lan University

Abstract

A cryomicroscope system was composed of a cold stage, a temperature-controlled(TEC) circuit, an image processing unit, and a software for system integration. The cooling and heating rates of a conventional cryomicroscope for the cryopreservation of biological cells are controlled by using liquid nitrogen. However, the conventional cryomicroscope can not be widely used by some laboratories for the reasons of high price and large size. The purposes of this study are to develop a cryomicroscope system based on thermoelectric cooling chip (TEC) instead of liquid nitrogen. TEC cryomicroscope has the advantage of small size, easy setup, precise temperature controlling, and low price. The developed system can achieve accurate control of cooling rate between 0.5°C/sec and 3°C/sec and isothermal control with root mean square errors lower than 0.5°C compared with the setting temperature. The results show that TEC cryomicroscope is viable for studying on intracellular ice formation phenomenon in biological cells, for example, *Artemia shrimp* in this study.

Keywords: Cryomicroscope, Thermoelectric cooler

*corresponding author, e-mail: cyyang@niu.edu.tw

前言

早期的生物學家必須在冬天的時候利用低溫的室外環境，經由顯微鏡觀察細胞在低溫下的狀態(Steponkus et al., 1984)；或是將冰塊與氯化鈉混合放入箱子中，以形成一個低溫環境，接著以顯微鏡觀察箱內低溫對生物細胞的影響(Diller and Caralho, 1970)。前述的方法無法對溫度進行控制，只能隨機取得溫度對生物細胞的影響。近數十年來，因為低溫流體(如液態氮)能夠比較方便取得，利用低溫流體為基礎所設計的低溫顯微鏡有了很大的發展空間。低溫顯微鏡是藉由一個能夠控制溫度恒定以及升溫降溫速率的冷凍台座結合顯微鏡形成的系統架構，使得生物細胞能夠在冷凍台上得到一個可以準確控制的低溫環境。傳統的冷凍台座主要是利用熱的傳導或對流原理以及配合冷凍臺座的移動方式來設計，主要可以分為對流式、傳導式以及方向式三種類型(林, 1991; 王與林, 1992; 龍與林, 1994)，但這種型式的儀器價格非常昂貴，且操作不易、佔空間，還有可以改善的空間。近來由於熱電致冷晶片(Temperature Control, TEC) 技術的發達，使得低溫顯微鏡的性能有令人期待的重大發展，藉由更高性能的低溫顯微鏡能產生更低的低溫環境以及更準確的溫度恒定控制及升溫降溫速率控制。江衍樹、吳昌宏及林達德(2003)研製完成第一台熱電致冷低溫顯微鏡，使得低溫顯微鏡的技術有了重大的突破，唯複雜的溫控電路設計使得安裝、維護較為複雜，且操作者的訓練必需具有機電工程的背景，此不利將熱電致冷低溫顯微鏡推廣至生技研究人員使用；再者江等的低溫顯微鏡使用傳統顯微鏡，其工作距離使得實驗受到了相當程度的限制。本研究即根據江等的低溫顯微鏡進行改良，除了簡化電路的設計外，並以非傳統顯微鏡解決工作距離的問題。本研究應用TEC晶片設計簡易的溫控電路，利用電腦軟體加以控制，控制溫度下降速度及恆溫控制，改善前述低溫顯微鏡價格昂貴、操作不易、佔空間以及更換儀器的不便，使得觀察低溫環境更加便利，並以豐年蝦卵測試其性能，研製完成的系統具有簡單、維護容易以及可攜帶性，期許未來可以被廣泛地應用在生物細胞冷凍之研究。

材料與方法

一、TEC 晶片(Frost-74)

所謂熱電致冷晶片(TEC 晶片)是一個 P-N 半導體材料的組合元件，利用帕爾帖(Peltier)效應來致冷或加熱。在 TEC 兩端加上一個直流電壓就會產生電流，會使 TEC 的一端發熱，另外一端致冷。發熱的一端稱之為“熱端”，致冷的一端稱之為“冷端”。若把 TEC 兩端的電壓反向會導致相反的電流方向，使得熱端變為冷端，冷端變成熱端。本研究研製的低溫顯微鏡系統的溫控系統，即是利用 TEC 的特性，經由適當的散熱來達成溫控的目的。

二、熱電致冷低溫顯微鏡(FS-180)系統

熱電致冷低溫顯微鏡系統的構架如圖 1 所示，以圖控軟體 LabVIEW 整合冷凍台，簡易型可程式溫度控制電路系統以及顯微鏡影像擷取系統。簡易型可程式溫度控制電路系統以熱電致冷晶片為主體，連接自行設計的溫控電路以及 NATIONAL INSTRUMENTS PCI 6221 資料擷取卡(NI 6221 卡)，並以個人電腦做監控。實驗時將生物細胞取出放置於工作台上，利用熱電偶模組(NI-9221)感測晶片表面生物細胞溶液的溫度，即時將讀取的溫度傳送到個人電腦的程式中，接著應用 PID 控制法則經由 NI 6221 模組輸出不同的電壓大小來控制熱電致冷晶片的電流大小及方向，以達到對晶片表面溫度的恆溫及等速率降溫等元控制。

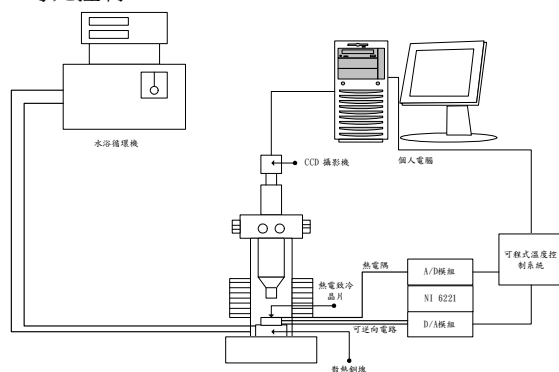


圖 1 熱電致冷低溫顯微鏡系統

Fig. 1 Schematic of the setup of a TEC cryomicroscope.

三、溫度控制電路

TEC 晶片需要較大的功率來驅動，所以電路必須要能提供功率 65 瓦特以上的電壓及電流給 TEC 晶片，才能達到所要求的低溫環境；而 NI-6221 只能提供小功率的電流及電壓，因此必需設計一個能夠承受高功率的放大電路，並且能夠防止工作電流燒毀 NI-6221 卡。本研究所設計的電路主要以電晶體 2N3055 驅動 TEC 晶片，並加裝電晶體 2N222 成爲達林頓電路之型態，來降低電源供應器所提供之初始電壓值，經由放大電流，即順利推動熱電致冷晶片，並解決大電流反嗜 NI-6221 卡的問題。再者爲使電流能夠反向，在 TEC 端加裝一個直流繼電器，以 NI-6221 卡進行電流正反向控制，如此就能夠利用提供正反向的輸入電流給 TEC 晶片，而達到快速降溫或升溫的目的（圖 2）。

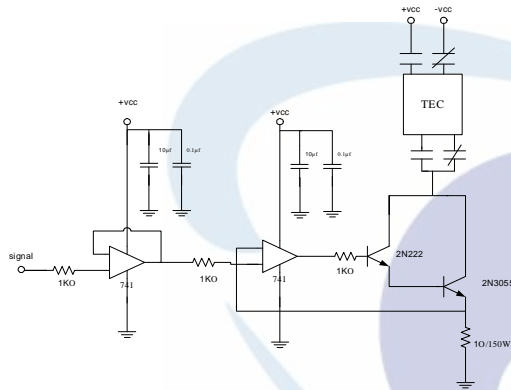


圖 2 簡易型溫度控制電路

Fig. 2 Diagram of an EZ-type temperature control circuit for a TEC chip.

四、熱電偶溫度校正

本研究使用 T-type 熱電偶感測 TEC 的表面溫度，熱電偶在使用前必需進行調校，才能得到準確的溫度。調校的步驟如下：

(一) 0°C 的溫度校正

1. 先將燒杯倒入冰水，接著加入半杯冰塊，攪拌冰水至使用溫度計量測冰水溫度爲 0°C。
2. 當冰水溫度爲 0°C 時，執行 LabVIEW 程式讀取並記錄熱電偶所感測到的冰水溫度。
3. 將所得到的感測溫度值作平均，得出實際感測溫度的平均值，接著在程式中作調校，使得最後得出平均溫度與 0°C 的誤差值低於 0.003°C 以內，即完成調校。

(二) 室溫的溫度校正

1. 以溫度計量取室溫，若爲 15 至 20°C 則做 20°C 的溫度校正；若爲 20 至 25°C 則做 25°C 的溫度校正；若爲 25 至 30°C 則做 30°C 的溫度校正，以此類推。

2. 先將燒杯倒入蒸餾水，接著放到加熱攪拌器(型號：PMC 502)上加熱並攪拌至校正溫度(使用溫度計量測)。

3. 執行 LabVIEW 程式讀取並記錄熱電偶所感測到的溫度。

4. 將所得到的感測溫度值作平均，得出實際感測溫度的平均值，接著在程式中作調校，使得最後得出平均溫度與室溫的誤差值低於 0.003°C 以內，即完成調校。

五、程式內之溫度及其對應電壓調校

在研製的低溫顯微鏡系統中，經由 NI-6221 卡讀入的資料型態爲溫度，而輸出的資料型態爲電壓，因此必需以實驗方式求得兩者之間的轉換公式。作法爲藉由控制 NI-6221 卡輸出固定的電壓，在 0~10 伏特之間輸出以每次增加一伏特的固定電壓，並且維持此電壓直到熱電致冷晶片表面溫度到達穩定的狀態，此時開始記錄熱電致冷晶片的表面溫度約 4 分鐘，即可得到當輸出電壓固定時晶片的表面溫度與時間的關係圖，將此 10 筆資料做統計迴歸，即可得到溫度與電壓之間的轉換公式。

六、PID(比例-積分-微分)控制參數調校

本研究使用 PID 控制法則進行恆溫及等速率降溫的控制。比例增益(或 P 控制)是控制機構的位置與動作信號的大小成一定比例，在比例控制的操作中有一明顯的缺點，即操作程序有負荷變化時，其變數即有偏差的情形發生，爲了消除此偏差必須使用重整裝置，即加入積分控制，而成爲比例積分控制 (PI 控制)。對於落後較大的程序，輸出的命令常無法即時消除誤差，因此必須在比例控制的後面加入微分控制，以預測誤差的走向，此稱爲比例微分控制 (PD 控制)。

傳統的 PID 控制方程式如方程式 (1)

$$\mu(t) = K_c \left(e(t) + \frac{1}{T_i} \int_0^t e(\tau) d\tau + T_d \frac{de(t)}{dt} \right) \dots (1)$$

上式中， $\mu(t)$ 表示控制的目標值； K_c 稱爲比例增益 (Proportional gain)， T_i 稱爲積分時間 (Integral time)， T_d 稱爲微分時間 (Derivation time)。

本研究使用傳統的 Ziegler-Nichols 調校法調校 PID 參數。Ziegler-Nichols 的參數計算如方程式 (2)

$$K_c = \frac{1.2}{RL} \quad T_i = 2L \quad T_d = \frac{L}{2} \dots \dots (2)$$

上式中， R 、 L 爲由系統步階響應所決定的參數。在此， R 可看作是系統響應中變化最大的斜率，即單位時間內溫度的最大改變量， L 則是熱電

致冷晶片所造成系統輸出的延遲時間，即在改變電流後晶片表面溫度開始變化的時間，藉由實驗求得不同系統的 R 、 L 值即可求得初步的 PID 參數，再依照這組參數去進行細微的調整以獲得最佳的控制效果。

七、簡易型低溫顯微鏡系統整合測試

豐年蝦學名為 *Artemia shrimp*，為魚類繁殖者最好的飼料。若是沒有豐年蝦的存在，在繁殖的工作上將有極大的阻礙出現。豐年蝦在繁殖上的應用已行之有年，其在繁殖魚苗具有保存容易、孵化方法簡單，隨時可進行大量孵化以提供魚苗所需，其剛孵化的無節幼蟲，大小及營養價值極符合各種魚苗的需求，也因為其具有保存容易、孵化方法簡單等的優點，故本研究以豐年蝦卵做為系統整合測試的材料。

結果與討論

一、熱電偶溫度校正

冰水溫度為 0°C 時，以及室溫溫度為 20°C 時，執行程式並以熱電耦線進行溫度感測，經由 LabVIEW 程式讀取並記錄溫度，在將所得到的感測溫度值作平均，得出平均實際感測溫度值為 3.097°C 。如圖 3，將此溫度在程式中作調校，校正前及校正後的結果如圖 4 所示，其平均溫度誤差值為 0.002°C ，低於 0.3% 。

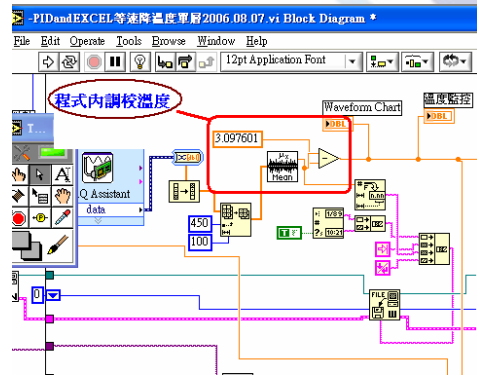


圖 3 熱耦線溫度校正式

Fig. 3 Calibration program for temperature measured from thermal couple using LabVIEW as the development kit.

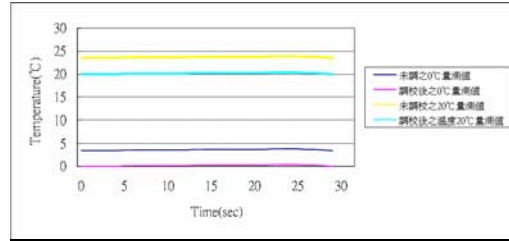


圖 4 使用 0°C 及 20°C 進行溫度量測之調教

Fig. 4 Linear calibration of temperature measured from thermal couple at 0°C and 20°C

二、程式內之溫度及其對應電壓調校

本研究在自行開發的 LabVIEW 程式中設定電壓值，藉由控制 NI-6221 卡輸出固定的電壓，使其在 0~10 伏特之間以每次增加一伏特的電壓做為輸出，並且維持此固定輸出電壓一段時間，使 TEC 晶片表面溫度達穩定的狀態。此時開始記錄熱電致冷晶片的表面溫度與時間的關係(圖 5)，取各溫度曲線達穩定後的溫度進行迴歸，得到如圖 6 之線性方程式 ($R^2=0.72$)。

由圖 6 可知，雖然可能有其他高階的曲線可以得到更高的判定係數值。但因為在程式的處理上，只要能知道電壓與電流的關係，即使判定係數不高的線性方程式，若輔以 PID 控制法則，預料應該可以有不錯的控制結果，因此本研究並未針對高階的迴歸方程式進行研究及討論。

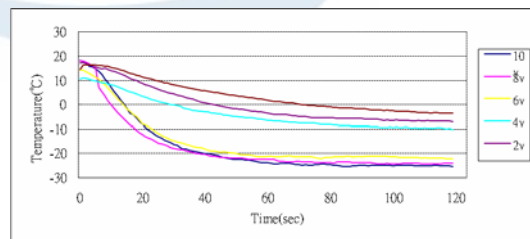


圖 5 TEC 晶片對輸入電壓之溫度反應曲線

Fig. 5 Characteristic response curve of cold-side temperature V.S. 2、4、6、8、10 input voltage of a TEC chip.

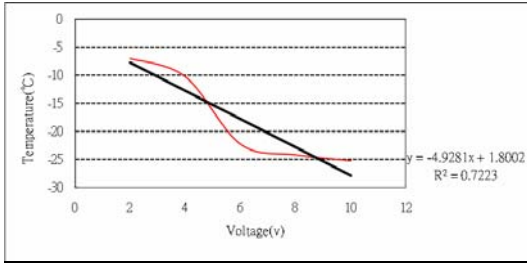


圖 6 TEC 輸入電壓與 TEC 表面溫度之線性迴歸

Fig. 6 Linear regression of cold-side response temperature V.S. 2、4、6、8、10 input voltage of a TEC chip.

三、PID(比例-積分-微分)控制參數調校與實驗結果

在調整 PID 參數之前，必須先求出 R 、 L 以獲得初步的參數值再進行微細調整。在求取 R 、 L 的實驗中，先將熱電致冷晶片表面的溫度維持在 -5°C ，之後直接步階輸出 12 伏特(系統之最大輸出)的電壓，使系統以最大的功率作輸出，持續讀取溫度，得到溫度變化與時間關係圖(圖 7)。圖 7 中，橫軸為時間(秒)，縱軸為控制輸出的溫度。將其在溫度開始變化的部份放大可得圖 8，由圖 8 判斷並計算得到 $L=0.83$ 秒， $R=-1.6^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ，利用方程式(2)可得 K_C 、 T_I 及 T_D ，接著使用如方程式(3)PID 控制法則的簡化公式計算 K_P 、 K_I 、 K_D 值。

$$K_p = K_c - \frac{K_I}{2} \dots\dots (3)$$

$$K_I = K_c * \frac{T_s}{T_I}$$

$$K_D = K_c * \frac{T_D}{T_s}$$

其中， T_s 為取樣時間，本系統的取樣時間 $T_s=1$ 秒。

由方程式(2)、(3)可得到 PID 控制參數的最佳值如下：

$$K_p = 5.845$$

$$K_I = 0.0785$$

$$K_D = 0.6361$$

四、不同降溫速率結合到恆溫控制的性能測試

經實驗求得的 PID 參數代入程式中，進行不同降溫速率結合到恆溫控制的性能測試。本試驗設定由初始溫度 15°C 下降至 -15°C 的溫度範圍內以 -0.5°C

$/\text{sec}$ 、 $-1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 、 $-2^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 、 $-3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 等四種降溫速率進行測試，結果如圖 9 所示。在等速率降溫方面皆呈線性，而連結到恆溫控制後，其與設定溫度的誤差如圖 10 所示。誤差值皆被控制在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以內。

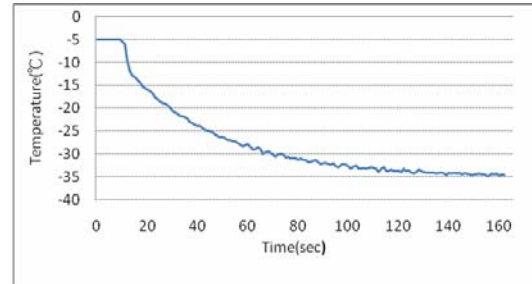


圖 7 輸入最大電壓(12V)後之 TEC 表面溫度反應曲線

Fig. 7 Extreme characteristic response of cold-side temperature of a TEC chip by using 12 V as input voltage.

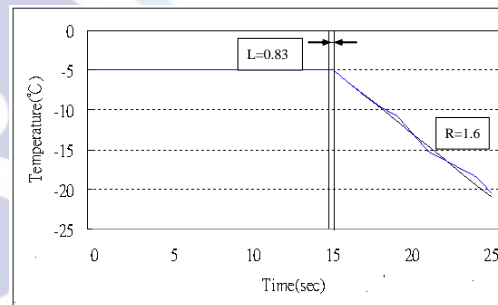


圖 8 R、L 參數之判定曲線

Fig. 8 Determination of R、L values.

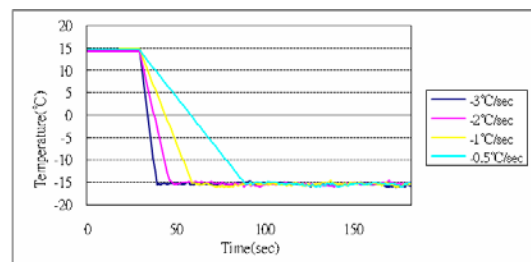


圖 9 不同降溫速率結合到恆溫控制之性能測試曲線(P:5.845, I:0.0785, D:0.6361)

Fig. 9 Test of constant cooling rates following a -15°C isothermal. (P:5.845, I:0.0785, D:0.6361)

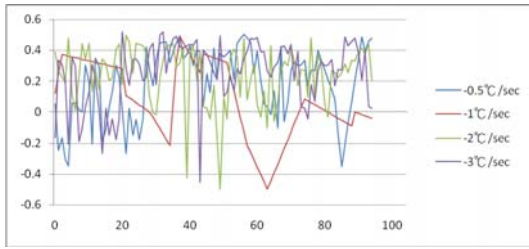


圖 10 恆溫控制的誤差曲線(P:5.845, I:0.0785, D:0.6361)

Fig. 10 Errors of measured temperature of cold-stage in comparison with the setup values of a performance isothermal test. (P:5.845, I:0.0785, D:0.6361)

五、豐年蝦卵試驗

取 10 顆豐年蝦卵，進行凍結率計算，實驗條件為：設定-2°C/sec 之等速率降溫控制，接著為-15°C 之恆溫控制。實驗共進行 180 秒。實驗的溫控結果如圖 11 所示。所有過程皆以影像擷取裝置記錄之(圖 12-17)。圖 12-17 中的亮點表示細胞已經發生細胞內凍結，經判讀圖片中之凍結情形，可得表 1 之豐年蝦卵之凍結率對照表。

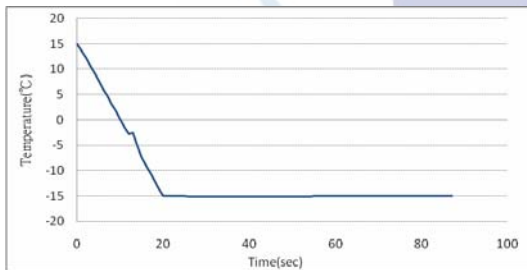


圖 11 以豐年蝦卵進行系統整合測試之 TEC 表面溫度曲線(P:5.845, I:0.0785, D:0.6361)

Fig. 11 Performance test of temperature control of self-developed TEC cryomicroscope by using artemia's eggs as sample. (P:5.845, I:0.0785, D:0.6361)



圖12 冷凍豐年蝦卵5秒

Fig. 12 Observation of IIF of artemia's eggs in cryo-preservation procedure at 5 second.

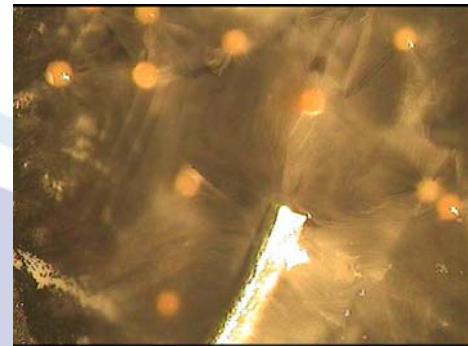


圖13 冷凍豐年蝦卵25秒

Fig. 13 Observation of IIF of artemia's eggs in cryo-preservation procedure at 25 second.

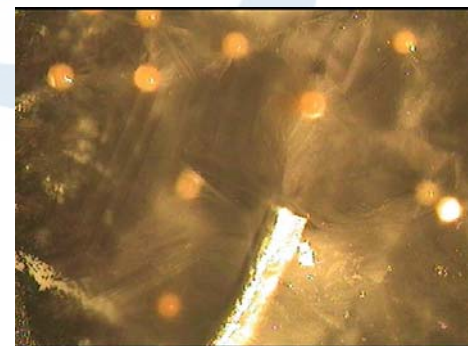


圖14 冷凍豐年蝦卵30秒

Fig. 14 Observation of IIF of artemia's eggs in cryo-preservation procedure at 30 second.

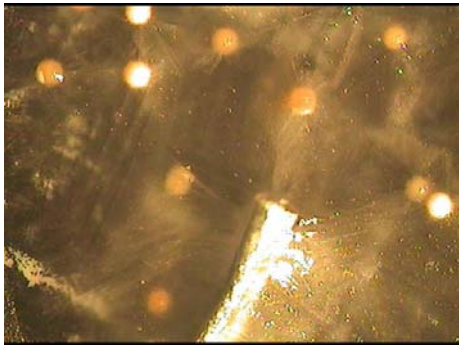


圖15 冷凍豐年蝦卵45秒

Fig. 15 Observation of IIF of artemia's eggs in cryo-preservation procedure at 45 second.

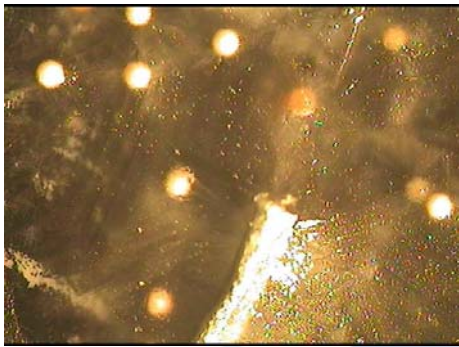


圖16 冷凍豐年蝦卵50秒

Fig. 16 Observation of IIF of artemia's eggs in cryo-preservation procedure at 50 second.

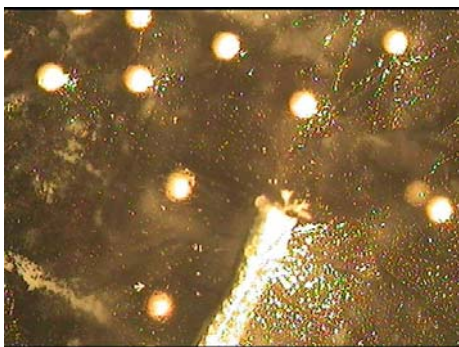


圖17 冷凍豐年蝦卵80

Fig. 17 Observation of IIF of artemia's eggs in cryo-preservation procedure at 80 second.

表1 豐年蝦卵凍結率與溫度、時間之對照表

Table 1 Observations of IIF phenomena and IIF temperature for artemia's eggs by using self-developed TEC cryomicroscope.

| 實驗時間 | 對照溫度 | 凍結率 |
|--------------------|----------|------|
| 下午 02:43:45 (30 秒) | -14.9885 | 10% |
| 下午 02:43:55 (40 秒) | -15.1047 | 20% |
| 下午 02:44:00 (45 秒) | -15.1787 | 30% |
| 下午 02:44:05 (50 秒) | -15.0058 | 40% |
| 下午 02:44:10 (55 秒) | -15.2415 | 60% |
| 下午 02:44:20 (65 秒) | -15.0992 | 80% |
| 下午 02:44:25 (70 秒) | -15.1687 | 90% |
| 下午 02:44:40 (85 秒) | -14.7526 | 100% |

六、與現有的低溫顯微鏡做比較

較之近期的熱電致冷低溫顯微鏡，本研究的系統其組裝及維護更為容易，且以非傳統顯微鏡解決工作距離沒有限制。目前的系統在降溫之控制上，可以準確地在每秒等速下降 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 至 $3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 的範圍內進行調整及控制，而恆溫控制的結果亦相當穩定（誤差在 0.5°C 的範圍之內）。簡易的電路設計使得操作者易學易懂，3055 以及 TEC 晶片都設計為抽換式，維修更為容易。本研究以豐年蝦卵進行系統整合測試，結果發現系統整合的結果相當令人滿意，未來應測試不同的 TEC 晶片，使系統的低溫性能更加提昇，並期能將其推廣以取代目前生物技術領域使用的液態氮低溫顯微鏡。

結 論

低溫顯微鏡是觀察生物細胞處於低溫下其凍結狀態的工具，藉由各實驗條件的進行以及觀察，找出對於各種不同細胞的冷凍保存方法，包括冷凍速率、冷凍溫度、抗凍劑的選擇。如果方法選擇適當，就能夠使細胞得以長久保存。以往較先進的低溫顯微鏡均需要使用液態氮來作為冷媒，這種型式的儀器價格非常昂貴，且操作不易、占空間，而本研究利用熱電致冷晶片所研製的系統具有體積小，設備簡單以及更能精確控制溫度恒定與升溫、降溫速率

等優點，較之近期的熱電致冷低溫顯微鏡系統，本研究的系統組裝及維護更為容易，且以非傳統顯微鏡解決工作距離的問題。目前的系統在降溫之控制上，可以準確地在每秒等速下降 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 至 $3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 的範圍內進行調整及控制，而恆溫控制的結果亦相當穩定(誤差在 0.5°C 的範圍之內)。本研究以豐年蝦卵進行系統整合測試，結果發現系統整合的結果相當令人滿意，未來應測試不同的 TEC 晶片，使系統的低溫性能更加提昇，並期待能將其推廣以取代目前被廣泛使用的液態氮低溫顯微鏡。

參考文獻

- 王建勝、林達德。1992。對流式低溫顯微鏡冷凍臺與溫控系統之設計。農業機械學刊1(1)：2-49。
- 江衍樹、吳昌宏、林達德。2003。熱電致冷低溫顯微鏡之研製。中華農業機械學會論文發表會：209~210。
- 林達德。1991。微電腦低溫顯微鏡系統之研製與應用。臺灣大學農學院研究報告。31(2)：88-104。
- 龍侃、林達德。1994。方向式低溫顯微鏡系統之研製與應用。農業機械學刊3(4)：15-24。
- Diller, K. R. and E. G. Cravalho. 1970. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing process in biological cells. *Cryobiology* 7:191-199.
- Steponkus, P. L., M. F. Dowgert, J. R. Ferguson ,and R. L. Levin. 1984. Cryomicroscopy of isolated plant protoplast. *Cryobiology* 21:209-233.

97年8月22日投稿

98年1月8日接受